

SOCIEDAD DE BIOQUIMICA DE CHILE

V REUNION ANUAL

Y

SIMPOSIO INTERNACIONAL

RESPUESTAS BIOQUIMICAS

A ESTIMULOS EXTRACELULARES

I. MECANISMOS DE EXPRESION GENETICA

**II. EL CALCIO Y LOS NUCLEOTIDOS CICLICOS COMO SEGUNDOS
MENSAJEROS INTRACELULARES**

III. ACCION HORMONAL Y RECEPTORES DE LAS MEMBRANAS

16 al 18 de julio de 1981

PATROCINANTES:

PNUD—UNESCO RLA 78/024

ICRO – UNESCO

CONICYT – CHILE

ORGANIZACION DE LOS ESTADOS AMERICANOS

SERVICIO DE DESARROLLO CIENTIFICO,

CREACION ARTISTICA, UNIVERSIDAD DE CHILE

PUNTA DE TRALCA, CHILE

EFFECTS OF GLUCOCORTICOIDS ON THE COMPOSITION AND ARCHITECTURE OF THE CELL SURFACE – MEMBRANE – CYTOSKELETAL SYSTEM IN RAT GLIAL CELLS.

Armelin, Mari C. S. & Armelin, Hugo A.
Universidade de São Paulo, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica – C.P. 20780 – São Paulo, Brasil.

Glucocorticoids have been shown to transiently and partially inhibit proliferation of brain glial cells both “in vivo” and “in vitro”. The mechanism of action of these hormones is still poorly understood. C₆ rat glioma cell line constitutes a convenient model system to study steroid hormones’ mechanism of action. Our approach has been to select variants with different responses to these hormones. One such variant (ST1) when subjected to hydrocortisone treatment, has been shown to undergo reversible phenotypic alteration from the transformed to the normal phenotype. The analysis of cell surface and cytoskeletal elements by indirect immunofluorescence showed: a) one important cell surface protein—fibronectin—is absent from ST1 cells’ surface but the hormone treatment restores an extensive fibronectin meshwork; b) at least one cytoskeletal element—microtubules—reorganizes into a radially distributed network in hormone treated cells. Therefore, an important part of the phenotypic reversion observed in this cell system is achieved by modulation of cell surface composition and cytoskeletal architecture. By mutagenesis (MNNG) it has been possible to derive morphological variants which allow separation of the glucocorticoid effects on the cell surface from the effects on cytoskeleton (sponsored by FAPESP, CNPQ and UNTP).

LARGE VARIABILITY OF LYSINE-RICH HISTONE (H₁) SUBSPECIES: IS THIS A MICRO ADJUSTEMENT OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF CHROMATIN?

Burzio, Luis O. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Although the role of the core histone (H₂ A, H₂ B, H₃ and H₄) in maintaining the

first level of packing of DNA in the nucleosome is quite clear, the participation of a heterogeneous group of basic protein referred to as lysine-rich histone or H₁ is only partially known.

Three aspects of this problem will be discussed: a) Flexibility or limits of H₁ definition, emphasizing the partial overlapping of properties between HMG proteins, “Typical” H₁, new variants of H₁ (TH₁) related to spermatogenesis, and a special group of more basic protein (H₅ and H₀); b) Post-synthetic modifications of H₁ histones (ADP-ribosylation and phosphorylation) and their possible role in the organization of the nucleofilament; c) Finally, the characteristic of human H₀ and the hypothetical function of this lysine-rich protein in terminal cell differentiation and quiescence.

(Supported by Grant DI UACH RS-79-20).

INVOLVEMENT OF CALCIUM AND CYCLIC NUCLEOTIDES IN THE MEIOTIC MATURATION OF AMPHIBIAN OOCYTES.

Connelly, C.; Jedlicki, E.; Orellana, O.; Echeverría, M.; Plaza, M., and Allende, J.E. – Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, and Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Casilla 6671, Santiago 7, Chile.

Isolated *Xenopus laevis* oocytes can be induced to undergo meiotic maturation by treatment with gonadotropins or progesterone. Hormone treatment causes a transient decrease in cAMP levels and a concomitant increase in free calcium ion.

These phenomena may be related by the finding that these cells contain a cyclic nucleotide phosphodiesterase that can be activated by calmodulin (CaM) and calcium ions. This enzyme differs from other cAMP phosphodiesterases present in oocytes in that it also hydrolyzes cGMP with equal efficiency and higher affinity. The activation of the enzyme with CaM can be inhibited by phenothiazine derivatives. The CaM activated phosphodiesterase is apparently not active on microinjected substrates as evidenced by the fact that cGMP

is hydrolyzed at a very low rate and the *in vivo* hydrolysis of cAMP is not inhibited by phenothiazine or stimulated by the microinjection of CaM and Ca²⁺

Supported by Ford Foundation, the Organization of American States and the University of Chile.

AMINOACYLATION OF TRANSFER RIBONUCLEIC ACID: FIDELITY, MISCHARGING AND PROOFREADING.

Cramer, F.; von der Haar, F.; and Stenbach, H. Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abt. Chemie, D-3400 Göttingen, GFR.

A correct recognition and aminoacylation of specific tRNA with the corresponding amino acid by aminoacyl-tRNA synthetase is one of the most important prerequisites which determine the accuracy and fidelity of the translation of the RNA message into a protein sequence.

tRNA species with an altered C-C-A terminus are a versatile tool for investigation of the mechanism of aminoacylation. The properties of native and modified tRNAs in the correction of misactivation and misacylation have been studied.

Distinction of the amino acids is achieved by a two step process and by accurate interaction of tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase. The non-accepting OH of the 3'-terminus of tRNA causes corrective hydrolysis of a misacylated amino acid. Every misactivated and proofread amino acid consumes one molecule of ATP.

In the yeast system the overall specificity in distinguishing valine and isoleucine is about 1 : 180 000. Investigations of mammalian systems exhibit a change in the proofreading mechanism gaining higher specificity.

STIMULATION OF CELLULAR DNA SYNTHESIS AND NUCLEOLAR REACTIVATION INDUCED BY SV40 DNA FRAGMENTS.

(Estimulación de síntesis de ADN celular y reactivación nucleolar inducida por fragmentos de ADN del virus SV40).

Galanti, N.; Soprano, K.; Jonak, G.; and

Baserga, R. Department of Pathology, Temple University, Philadelphia Pa. 19140, USA.

The product of the SV40 A gene (T antigen) induces cellular DNA replication in non-permissive cells and reactivation of silent rRNA genes in human-mouse hybrid cells.

By manual microinjection, we have introduced SV40 DNA fragments, alone or in plasmid, in non-permissive cells and in human-mouse hybrid cells. The biological activity of these fragments was investigated in microinjected cells by incorporation of 3H-thymidine, by immunofluorescence of T antigen and by incorporation of labeled uridine into human and mouse rRNA.

Our combined results show that the information for stimulation of cellular DNA synthesis is coded within a definable fragment of SV40 A gene, different from the sequence that codes for nucleolar reactivation.

(This work was done while N.G. was a fellow of the John Simon Guggenheim Fund).

STRUCTURED AND TRANSCRIPTION OF YEAST tRNA GENES.

González E.; Standring, D.; Villanueva, J.; Gómez, I.; Bello, A.; Bull P.; Valenzuela, P. and Venegas, A. Laboratorio de Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Chile.

We have isolated and studied several yeast tRNA genes. From their structural analysis the presence of intervening sequences in some of them has been detected. We have studied in detail the yeast tRNA^{phe} gene family, finding that all of them are split genes. On the other hand, some genes like those coding for tRNA^{arg} and tRNA^{met}_I do not contain introns.

In order to obtain further information about tRNA biosynthesis we have initiated transcription studies using cloned genes and HeLa cell-free extracts. Transcription experiments carried out with a cloned tRNA^{leu}₃ gene suggest that the order of one of the events during tRNA maturation, the RNA splicing, depends on the *in vitro* transcription system used.

A comparative analysis of several tRNA gene sequences, searching for similarities with the "consensus intragenic sequence" proposed by Koski for 5 S and tRNA genes, has allowed us to detect sequences that represent potential intragenic control regions in several other tRNA genes. Looking at some initiator tRNA^{met} gene sequences, differences in these regions can be observed.

The wide occurrence of the intragenic control mechanism in eucaryotic genes transcribed by RNA polymerase III will be discussed.

Supported by DIUC, U.C. and NSF Cooperative Science Programs in Latin America.

MEDIATION OF Ca²⁺ RESPONSES BY CALMODULIN.

Klee, Claude B. Laboratory of Biochemistry, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.

The intracellular Ca²⁺-binding protein, calmodulin, acts in several different ways as a universal receptor for Ca²⁺ acting as a second messenger.

Firstly, the sequential binding of Ca²⁺ to calmodulin generates stepwise conformational transitions which enable calmodulin to transform quantitative changes in Ca²⁺ concentrations into qualitatively different cellular responses. Secondly, the different Ca²⁺ dependent interactions of calmodulin with its several protein targets also allow calmodulin to effect a kinetic regulation of the Ca²⁺ signal. In contrast to phosphorylase kinase which interacts with calmodulin in the absence of Ca²⁺ cyclic nucleotide phosphodiesterase needs Ca²⁺ for interaction and for activation and exhibits a highly cooperative Ca²⁺-dependent activation. The fast deactivation of the enzyme upon removal of Ca²⁺ suggests that different degrees of Ca²⁺ occupancy may be needed for interaction and activation. Thirdly, the two second messengers Ca²⁺ and cAMP are closely linked at the levels of phosphorylation of the target proteins, regulation of cyclic nucleotide and Ca²⁺ concentrations and also by virtue of inter-

actions between their two intracellular receptors: the regulatory subunit of protein kinase, and calmodulin.

BEHAVIOR OF THE tRNA POPULATION DURING CELL DIFFERENTIATION AND DEVELOPMENT.

(Comportamiento de la población de tRNA durante diferenciación celular y desarrollo).

Krauskopf, Manuel, Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Many reports have shown that qualitative and quantitative changes in the tRNA population occur in a number of organisms during different developmental and functional stages. This work was undertaken in order to assess the involvement of tRNA in development and cell differentiation in two different organisms: *Bombyx mori* and *Cyprinus carpio*.

In collaboration with other laboratories we have examined the functional adaptation of some tRNA isoacceptor species during the terminal differentiation of silkgland. We have also studied the behavior of the tRNA population in the acclimatization process. The carp hepatocyte undergoes profound morphological changes between the winter and summer seasons, which can be associated to differences in gene expression. The *in vivo* content of several aminoacyl-tRNAs decreases significantly during summer, where protein synthesis is more active. This behavior contrasts with the one observed in *B. mori* where the intracellular level of the aminoacyl-tRNAs increases concomitantly with the biosynthesis of fibroin. Possible interpretations will be discussed.

(Supported by Grant DI UACH RSE-80-17).

MECHANISM OF CONTROL OF ADENYLATE CYCLASE BY INHIBITORY RECEPTORS.

Klee, Werner A. - Laboratory of General and Comparative Biochemistry, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA.

Adenylate cyclase is under the control of two types of receptors: stimulatory, ones

such as β -adrenergic or glucagon; and inhibitory, ones such as α -adrenergic and opiate. It has become reasonably clear in recent years that stimulatory receptors, when coupled to adenylate cyclase, facilitate the exchange of GTP for GDP and thereby activate the enzyme. The mechanism of action of inhibitory receptors has, until recently, been much less well understood. Receptor mediated inhibition of adenylate cyclase has been known to require GTP, in common with stimulatory receptors, and in addition Na^+ as well. We have recently found that in neuroblastoma x glioma cell hybrid and in brain membranes opiate receptors inhibit adenylate cyclase by stimulatory GTP hydrolysis in the presence of Na^+ . Preliminary evidence indicates that α -adrenergic receptors share this mechanism of action. Thus, inhibitory receptors act by stimulating the adenylate cyclase turn-off mechanism, whereas stimulatory receptors speed up the turn-on reaction.

PROPERTIES AND SPECIFICITY OF THE LOW MOLECULAR WEIGHT FORMS OF PHOSPHORYLASE PHOSPHATASE ISOLATED FROM RABBIT SKELETAL MUSCLE.

Lee, E. Y. C.; Silberman, S. R., and Ganapathi, M. K.— Department of Biochemistry, University of Miami, Florida, USA.

Phosphorylase phosphatase may be isolated from skeletal muscle by a procedure involving treatment of extracts with high concentrations of ethanol. The enzyme subsequently isolated is of low molecular weight. In this report we describe the purification of two forms of this enzyme to homogeneity. Enzyme C-I has a molecular weight of 34,000, and enzyme C-II has a molecular weight of 32,500. The specificity of both enzymes has been examined. Both C-I and C-II will dephosphorylate phosphorylase, glycogen synthase, phosphorylase kinase, and phosphorylated histone. However, there are strong qualitative differences. Enzyme C-I has is very active on phosphorylase α , whereas C-II has a low activity toward this substrate. The dephosphorylation of phosphorylase kinase had

been examined in detail. Enzyme C-I is relatively specific for the dephosphorylation of the beta-subunit, whereas C-II is relatively specific for the dephosphorylation of the alpha-subunit of phosphorylase kinase.

(Supported by NIH Grant AM 18512 and in part by the Florida Heart Association).

DNA POLYMERASES AND DNA SYNTHESIS IN PLANT CELLS.

(DNA polimerasas y síntesis de DNA en células vegetales).

Litvak, S.; Castroviejo, M.; Tarragó-Litvak, L.; Christophe, L.; Tharaud, D., y Hevia-Campos, E. Institut de Biochimie Cellulaire du C.N.R.S. 1 rue Camille Saint Saëns. 33000 Bordeaux. France.

The past 8 years have witnessed a rapid rise in interest in the DNA-dependent DNA polymerases of vertebrates and specially of mammalian cells. It is now well established that animal cells have three different polymerases called α (involved in nuclear DNA replication), β (DNA repair, and γ (mitochondrial DNA replication). Much less information is available on plant cell DNA polymerases. In this meeting we will discuss the following points:

I. Ungerminated wheat embryos contain multiple DNA polymerases called by us A, B, C and mitochondrial.

II. The study of the properties of these polymerases, mainly the inhibition by specific agents as aphidicolin, ddTTP and N-ethylmaleimide suggest very strongly that wheat DNA polymerases B and C are of the α type and enzyme A of the γ type. Mitochondrial DNA polymerase from wheat embryos has many properties different to those of the animal mitochondrial polymerase, thus it is difficult to classify as a γ -like DNA polymerase.

III. The results obtained when studying the changes of the wheat enzymes during germination confirm the similarity between wheat DNA polymerase B and animal polymerase α . Moreover we will discuss the results concerning the antigenic relationship between the plant polymerases.

Supported by C.N.R.S. and the University of Bordeaux II.

REGULATORY ROLE OF SODIUM AND POTASSIUM IN ANGIOTENSIN II INDUCED STEROIDOGENESIS.

Marusic, Elisa T. Departamento Fisiología y Biofísica, Universidad de Chile.

The main factors controlling the activity of the adrenal cortex are well documented and there are many examples of careful and reliable studies of the mechanism by which ACTH increases corticoid production by the zona fasciculata. However, aldosterone biosynthesis by the zona glomerulosa is regulated by an intriguing system in which several different stimuli are involved: renin-angiotensin, ACTH and potassium ions. All these stimuli are affected by sodium and potassium states and the purpose of this communication is to summarize studies by the author on the inter relationships of the various adrenocorticotrophic stimuli by an analytical approach of dissecting and studying these factors individually in an "in vitro" system and comparing with simultaneous studies "in vivo". Particularly the sensitization phenomena observed during sodium depletion will be considered in regard to plasma membrane receptors for angiotensin II and to the mitochondrial enzymes involved in the late pathway of aldosterone biosynthesis.

LACTOGENESIS REGULATION BY Ca^{2+} AND CYCLIC NUCLEOTIDES.

Sapag-Hagar, M., Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Cyclic AMP (cAMP) and adenylate cyclase (AC) activity in rat mammary gland (MG) are high in pregnancy and low during lactation, showing an inverse relationship with cyclic GMP (cGMP) levels and cAMP-phosphodiesterase (PD) activity. We have also found that low concentrations of Ca^{2+} ($1 \mu M$) activates AC from MG of pregnant rats and that the increase of intracellular Ca^{2+} in the lactating gland would lead to an eventual inhibition of AC, suggesting a close relation between Ca^{2+} and cAMP in which the mutual interaction would constitute a feedback loop. Mammary calmodulin activity increases significantly along the lactogenic cycle contributing also to

explain the increase in PD activity and the low level of cAMP during lactation. Studies in explants of rat MG showed that cAMP markedly inhibited the synthesis of DNA, RNA and fatty acids as well as the activities of those enzymes involved in lipogenesis.

Our results suggest that the opposing action of cAMP and cGMP in MG would represent a modulatory mechanism for lactogenesis and that the high cAMP level before parturition plays a negative regulatory role in hormonally induced biosynthesis and secretion of the characteristic components of milk which would be stimulated with cAMP decrease after parturition.

(Supported by grant B1138-8113, Universidad de Chile).

ADENILATO-CICLASAS DEPENDIENTES DE Mn^{++} . (Mn^{++} -dependent adenylate cyclases).

Torres, H.N. - IIB "Fundación Campomar" - FCEyN - UBA - Obligado 2490, Buenos Aires, Argentina.

La primera adenilato-ciclase dependiente de Mn^{++} fue descubierta en el hongo ascomicete *Neurospora crassa* en este laboratorio. Enzimas con similares características fueron luego descritas por otros autores en *Blastocladiella*, *Saccharomyces*, *Trypanosoma*, *Mucor*, células germinales de testículo, espermatozoides, y en una variante de células de linfoma S-49. Estas enzimas no son estimuladas por fluoruro, o por GTP o por toxina colérica.

En *Neurospora* el gen cr-1 es responsable de la actividad ciclase. La presencia de AMP cíclico en el medio de cultivo produce la reversión fenotípica del efecto de mutaciones de dicho gen.

Las adenilato-ciclasas dependientes de Mn^{++} representan en general un tipo primitivo de ciclase ("protociclase") carente del componente regulador que reconoce nucleósidos de guanosina. Algunas de estas ciclasas pueden obtenerse como formas solubles en ausencia de detergente, siendo purificables por métodos utilizables con enzimas globulares "solubles".

Determinados tipos de "protociclase" pueden reconocer al componente regulador de eritrocitos aviares. Los sistemas reconstituidos, heterólogos, presentan propieda-

des similares a la "holociclasa" de membranas de eucariotes superiores.

(Supported by B-1016-801 Grant. U. de Chile).

LUTROPIN REGULATION OF STEROIDOGENESIS IN LEYDIG CELLS.

Valladares, Luis; Ronco, A.M. and Roisman, E., División Ciencias Básicas, INTA. Universidad de Chile.

The regulation of steroidogenesis and testosterone synthesis in the interstitial cells of the testis depends upon the secretion and actions of luteinizing hormone (LH) from the anterior pituitary gland. LH acts as the trophic hormone for Leydig Cell development and maintenance, and also as the acute stimulus for testosterone biosynthesis and secretion. The action of LH and the closely related placental hormones, human chorionic gonadotropin are mediated through high affinity membrane receptor which activate the adenylate cyclase-protein kinase enzymatic pathway. The precise mechanism by which this phosphorylation pathway regulates steroidogenesis has not been clarified, but a major site of action during LH stimulation is early in the biosynthetic pathway, at the conversion of cholesterol to pregnenolone.

The control of this reaction appears to be the predominant mechanism of hormonal regulation in all steroidogenic target cells during stimulation by the respective trophic hormones. In the testis, LH-induced stimulation of androgen synthesis depends upon the continuous synthesis of protein and RNA during hormone action, and the presence of a labile protein is necessary for LH stimulation of testosterone secretion.

THE GENOME OF BACTERIOPHAGE PM2: CLONING, RESTRICTION ENDONUCLEASE MAP AND ORIGIN OF REPLICATION.

Urquiaga, I.; Alonso, A.; Valenzuela, P.; Venegas, A.; Vicuña, R. and Yudelevich, A. Laboratorio de Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Chile.

The entire PM2 genome has been cloned in the pBR322 plasmid vector using *E. coli* as a host. The DNA was inserted at the unique pBR322 PstI site. The seven fragments generated by digestion of PM2 DNA with HindIII have also been separately cloned at the HindIII site of pBR322.

A detailed restriction map of PM2 DNA has been obtained, with sites distributed throughout the genome. None of several restriction enzymes recognizing the sequence GATC cleaves PM2 DNA indicating that such a sequence is not present in the viral DNA.

Utilization of thymidine-requiring mutants of *Alteromonas espejiana* BAL 31 as a host for infection with bacteriophage PM2 has enabled us to localize the origin of replication of PM2 DNA. In order to synchronize viral DNA replication, thy cells were deprived from thymidine and subsequently infected with PM2 phage. The addition of a pulse of ³H-thymidine or ³²P-orthophosphoric acid plus unlabeled thymidine allowed us to label the origin of replication. Subsequent analysis of the labelled DNA shows that the origin of replication is located in fragment HindIII-4, and that replication is unidirectional.

METILACION DE PROTEINAS EN VARIAS ESPECIES BACTERIANAS (Protein methylation in several bacterial species) Amaro, A.M., Mardones, E., Toledo, H. y Jerez, C.A. - Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile.

Algunas proteínas de *E. coli* son metiladas y al parecer estas modificaciones son importantes para las funciones que desempeñan. Hemos determinado el grado de metilación de las proteínas ribosomales y del factor de elongación Tu en distintas especies de procariontes para establecer si estas modificaciones post-traduccionales son universales en las bacterias.

Se utilizaron *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* y *Alteromonas espejiana* (bacteria marina), los cuales se crecieron en presencia de metil-³H-metionina y/o 1-¹⁴C-metionina. La separación electroforética de las proteínas ribosomales y la determinación de su metilación se efectuaron como en: Mardones, E., Amaro, A.M., and Jerez, C.A. 1980, J. Bacteriol. 142:355-358. Los aminoácidos metilados se determinaron por cromatografía después de hidrólisis ácida de las proteínas.

Encontramos que tanto el número de proteínas ribosomales metiladas como su grado de metilación son muy similares en todas las especies estudiadas. Esto sugiere que las metilaciones de las proteínas ribosomales en los procariontes son altamente conservadas y pueden, por lo tanto, ser importantes para su función. Por otro lado, bacterias que poseen dos genes para el factor de elongación Tu, como *E. coli*, presentan Tu metilado. En cambio, en una bacteria con un solo gen para Tu como el *B. subtilis*, este factor no aparece metilado.

Financiado por Univ. de Chile, proyecto B.1065.8124.

EFFECTO DE LAS VARIACIONES DEL POTENCIAL DE REPOSO SOBRE LA LIBERACION DE PROSTAGLANDINAS (PGs). (Effect of changes in the membrane potential on the release of prostaglandins).

Barioglio, S.; Lacuara, J.L. Instituto de Fisiología. Fac. C. Médicas. U.N. Córdoba (República Argentina).

La liberación de PGs a partir de miometrio, y el potencial de reposo del mismo, fluctúan durante el ciclo estral y la preñez. En el presente trabajo se investigó una posible relación entre ambos parámetros. Para ello, se incubaron trozos uterinos de rata en estado de estro en 3 diferentes soluciones despolarizantes: medio Krebs Pinger Bicarbonato (KRB)+KCl 20mM, KRB+procaína, KRB sin Ca⁺⁺ y en solución hiperpolarizante (KRB sin K⁺); se cuantificaron las PGs totales liberadas al medio por bioensayo. Con el primer grupo se obtuvo un notorio aumento en el eflujo de estas sustancias respecto a los controles (en KRB), mientras que con solución hiperpolarizante, la liberación disminuyó, a cifras menores que los mismos; se descartó la posibilidad de que la liberación en KRB-KCl 20mM fuera consecuencia de la hiperosmolaridad o del mayor trabajo muscular inducido por KCl, incubando los tejidos en KRB-KCl 20mM isotónico y en KRB-KCl 20mM+papaverina. Los valores obtenidos no fueron significativamente diferentes a los anteriores. Los resultados sugieren que los cambios en el potencial de reposo o bien en los flujos iónicos inducidos por dicha alteración podrían contribuir al control de la liberación de PGs a partir de útero.

POLI(ADP-RIBOSA) SINTETASA EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE TESTICULO DE RATA. (Poly(ADP-ribose) synthetase in rat testis mitochondria). Burzio, L.O., Sáez, L.J. y Cornejo, R. - Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Poli(ADP-ribose) sintetasa, una enzima localizada en el núcleo de eucariontes, fue encontrada en mitocondrias aisladas de testículo de rata (actividad específica = 125 a 400 pmoles de ADP-rib incorporados/mg proteína). Similares niveles se encontraron en mitocondrias de testículo de toro (283 pmoles/mg proteína) y de hamster (147 pmoles/mg proteína). En contraste, la actividad de esta enzima es baja (3 pmoles/mg proteína) en mitocondrias de hígado, cerebro y espermio de rata.

La enzima mitocondrial es inhibida por nicotinamida, teofilina y timidina, y además requiere DNA para su actividad. Que no es un contaminante nuclear, lo demuestran los siguientes resultados: a) en mitocondrias purificadas por sedimentación en gradiente de sacarosa, la actividad coincide con marcadores mitocondriales; b) el Km ap. de la enzima mitocondrial es 21 μM, comparado con un Km ap. de 220 μM para la enzima nuclear; c) tratamiento con digitonina muestra que la enzima está en el complejo membrana interna-matriz mitocondrial; d) estudios de desarrollo muestran que la máxima actividad de la enzima mitocondrial coincide con la aparición de espermatocitos primarios en el epitelio germinal. (Proyecto DI UACH RS-79-20).

PROGESTERONA EN LA MADURACION DEL OOCITO Y EN LA INCUBACION DEL SAPO MARSUPIAL GASTROTHECA RIOBAMBAE Y SINTESIS OVARICA DE ESTEROIDES (Role of progesterone on oocyte maturation and on incubation in the marsupial frog *G. riobambae* and evidence of ovarian steroid synthesis). Campos, M., Merizalde, C., Ruiz, R., y del Pino, E.M. - Departamento de Biología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Progesterona y hCG inducen la maduración del oocito in vitro. En Quito los oocitos maduraron 10 horas más pronto que en Santiago de Chile (Lab. del Dr. J.E. Allende). Además hubo maduración espontánea de los controles. La maduración se acelera en oocitos preincubados en solución de Barth (MBS) y luego expuestos a progesterona. Oocitos de hembras tratadas con 50 IU hCG maduraron espontáneamente en menos de 1 hora. Pero si se guarda el ovario en MBS libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ la maduración se para y solo se reinicia al exponer los folículos a progesterona en MBS. Los folículos ováricos producen esteroides al igual que los folículos post-ovulatorios. La progesterona produce cerramiento y vascularización de la bolsa mientras que hCG actúa solo en hembras con ovarios grandes.

Por tanto hormonas de la hipófisis parecen estimular la producción por el ovario de una hormona parecida a progesterona la cual gatilla la maduración y los cambios reproductivos de la bolsa. Hay gatillamiento endógeno de los oocitos y la maduración puede ser parada y reiniciada experimentalmente.

EFFECTO DE VARIOS NUCLEOTIDOS CICLICOS COMO MEDIADORES DE LA ACCION HORMONAL EN CELULAS DE HIGADO FETAL. (Effects of different cyclic nucleotides as mediators of hormone action in fetal liver cells). P. Cañas, L.F. Congote. McGill University, Royal Victoria Hospital, Department of Endocrinology, Montreal, P.O. Canadá.

El efecto de cAMP, cGMP y cCMP y sus derivados como posibles mediadores de la acción de hormonas como eritropoyetina y prostaglandinas fue estudiado en células de hígado fetal en cultivos de corto término. Los efectos de estos nucleótidos se midieron en procesos a corto y largo plazo como la síntesis de RNAs y hemoglobinas fetales.

La síntesis de RNAs se midió utilizando núcleos aislados y agregando ^3H -UTP como precursor. La síntesis de dos hemoglobinas fetales de ternero, Fo y F1, se midió en células de hígado fetal preparadas por tripsinización e incubadas 20 horas con nucleótidos cíclicos y 5 horas con ^3H Leucina.

De los tres nucleótidos cíclicos solamente cGMP a 10^{-8} M y 10^{-9} M estimuló la síntesis de RNAs en condiciones de baja fuerza iónica y el efecto es sensible a α -amanitina a bajas concentraciones. Por otra parte, los tres nucleótidos cíclicos estimularon la síntesis de hemoglobinas fetales a concentraciones mayores que 10^{-7} M, siendo los efectos muy diferentes de acuerdo a la concentración del nucleótido y al tipo de hemoglobina sintetizada. PGE₁ y PGE₂ tienen el mismo efecto que cAMP a 10^{-7} M.

Estos resultados indican que de los tres nucleótidos cíclicos sólo cGMP tiene la capacidad de estimular la síntesis de RNAs y hemoglobinas simultáneamente y es el más probable segundo mensajero de eritropoyetina en este tejido.

INTERACCION DE LA GLUCOQUINASA CON FRUCTOSA. (Interaction of glucokinase with fructose).

Cárdenas, M.L., Rabajille, E. y Niemeyer, H. Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

La glucoquinasa es una enzima hepática que cataliza la fosforilación por medio de MgATP de diversas hexosas. Mientras la función de saturación es sigmoidea con glucosa y con manosa ($n_H = 1,5$), es hiperbólica con 2-desoxiglucosa. En este trabajo se muestra que la función de saturación con fructosa es también hiperbólica, a todas las concentraciones de MgATP usadas.

La actividad fosforilante de fructosa se medía a través de la formación de NADPH₂, utilizando fosfoglucoisomerasa y glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa como enzimas auxiliares. Para medir la fosforilación de glucosa se omitía la isomerasa.

Los resultados de estudios en velocidad inicial a pH 8,0 son compatibles con un mecanismo en secuencia. La K_m para fructosa es 174 mM (solo es fosforilada la fructofuranosa), y la K_m para ATP es 0,35 mM. El valor para fructosa es más de 30 veces superior al $K_{0.5}$ para glucosa. La V_{max} con fructosa es 2,6 veces la V_{max} con glucosa. La cooperatividad cinética con glucosa desaparece al medir su fosforilación en presencia de sustratos alternativos o análogos, siendo la fructosa el más eficiente: a una concentración semejante a su K_m se logra un n_H de 1,0. La fructosa protege a la enzima de la inactivación por el ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico).

La información sugiere que la fructosa es capaz de interactuar con la enzima libre e inducir un cambio conformacional. (Financian SDCACI (U. Chile) y OEA).

DNA POLIMERASAS Y SINTESIS DE DNA EN OOCITOS ESTADO VI DE XENOPUS LAEVIS. (DNA polymerases and DNA synthesis in large oocytes of Xenopus laevis). - Carvallo, P. Olate, J. y Tarragó-Litvak, L. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

La microinyección de DNA nativo no se traduce en una replicación del mismo. Sin embargo, nuestros resultados y los de otros grupos indican que existe una actividad DNA polimerásica muy importante en estos oocitos. En una primera etapa hemos caracterizado las DNA polimerasas en este estado. En el núcleo hemos encontrado solamente una DNA polimerasa que tiene todas las propiedades de la polimerasa α descrita en otras células animales. En la fracción mitocondrial hemos encontrado la DNA polimerasa β . No hemos podido poner en evidencia la DNA polimerasa β , descrita por otros autores en el citoplasma soluble de oocitos estado VI.

Los experimentos diseñados para la búsqueda de un inhibidor de la síntesis de DNA presente en oocitos no maduros serán discutidos.

La microinyección de DNA activado o de matrices sintéticas del tipo poli dA-oligo dT₁₂ más TTP radiactivo, tanto en núcleos como en citoplasma de oocitos, se traduce en el caso de los núcleos en una incorporación del precursor radiactivo. La caracterización de las DNA polimerasas de oocitos, utilizan diferentes matrices sintéticas e inhibidores específicos implicados en la síntesis de DNA después de microinyección será descrita.

CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL E INTERCAMBIO DE PROTONES EN SNC; ALCOHOLISMO PERMANENTE Y FILIAL, SUBSTRATOS SITIO I. (CNS Mitochondrial respiratory chain and proton exchange in filial and permanent alcoholism. Site I Substrates). Egaña, E., Ramírez, M.T. y Ilona, I. Instituto de Medicina Experimental Facultad de Medicina - Universidad de Chile.

Dado que al ingerir etanol aparece acetaldehído (AcCHO) circulante elevándose la oferta a SNC y se altera especialmente la membrana mitocondrial, nos interesó conocer si la ingestión permanente y filial de EtOH "in vivo" y el AcCHO "in vitro" afectan la respiración y el movimiento de protones en mitocondria de SNC. Se usó sustratos NAD-dependientes (sitio I).

Rata adulta ambos sexos. Normal, bebe H₂O; "A.G./12" bebe EtOH 12% v/v (70^a generación); "A.G./25" recibe EtOH 25% v/v (4^a generación); "A.G./H₂O" bebió EtOH hasta la 48^a generación, después ingiere H₂O (25^a generación). Mitocondria de cerebelo, método B5hne et al. 1-1.5 mg/ml en 2 ml de medio Clark y Nicklas pH 7.4. Glutamato 10mM, Piruvato 10mM, Malato 2mM; ADP 0.09mM; 200 nM Ca²⁺; 0.1-0.25-0.5 y 1mM AcCHO. Consumo de O₂ y transporte de protones medidos en polarógrafo Gilson.

Con Glut/Mal. como sustrato no se afecta estado 4. Estado 3, RCR, H⁺/Ca²⁺, ADP/O, H₂O Ca²⁺/O están descendidos en los 3 grupos experimentales vs normal. Al agregar AcCHO estos valores bajan, aún en normal, en relación directa a la concentración. Al usar Pir/Mal se afecta el estado 4 al igual que los otros parámetros; pero los valores son más bajos que con Glu/Mal en iguales condiciones experimentales. Estos resultados indicarían que el complejo piruvato dehidrogenasa es más sensible a la acción de AcCHO y permitiría postular que hay alteración de membrana en la ingestión permanente y filial de EtOH.

ESTUDIO COMPARATIVO DEL PROCESO DE ACUMULACION DE Ca^{++} EN MITOCONDRIAS DE HIGADO DE RATAS EN DIFERENTE ESTADO NUTRICIONAL (comparative study of Ca^{++} uptake process in rat liver mitochondria at different nutritional state) Ferreira, J. y Gil, L. Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina U. de Chile.

Al comparar la estimulación de las velocidades de oxidación de glutamato y de succinato por Ca^{++} en mitocondrias de hígado de ratas sometidas a desnutrición calórica-proteica aguda, con ratas alimentadas con dieta normal, se observa que las $V_{máx.}$ de consumo de O_2 están disminuidas en un 32% y 35% y las $V_{máx.}$ de liberación de H^+ en un 32% y 34% cuando los sustratos oxidados son glutamato y succinato respectivamente. La afinidad aparente de Ca^{++} no se ve afectada (K_m app $1 \times 10^{-6} M$). Los controles respiratorios de Ca^{++} disminuyen en 37% para glutamato y 26% para succinato a una concentración de Ca^{++} de 0.2 mM. La razón $Ca^{++}/2e = 2$ en ratas normales y desnutridas con ambos sustratos, pero con glutamato se obtiene este valor a concentraciones menores de Ca^{++} en mitocondrias de ratas desnutridas, sugiriendo que tienen menor número de sitios de incorporación para Ca^{++} . La razón $H^+/2e = 2$ en ambos estados nutricionales lo que sugiere que la desnutrición calórica-proteica aguda no afecta el proceso de acoplamiento de energía.

Financiado Proy. N° de SDCACI U. de Chile.

ACOPLAMIENTO DE LA SUBUNIDAD CATALITICA DE LA ADENILATO-CICLASA DE NEUROSPORA CRASSA CON LA SUBUNIDAD REGULATORIA DE MEMBRANAS ERITROCITICAS DE AVE. (Coupling between the catalytic subunit of Neurospora crassa adenylate cyclase and the regulatory subunit of avian erythrocyte membranes). Flawiá, M.M., Kornblihtt, A.R. y Torres, H.N. - IIB "Fundación Campomar" FCByN - UBA - Obligado 2490, Buenos Aires, ARGENTINA.

La adenilato-ciclase de la cepa salvaje de Neurospora crassa se encuentra en parte como forma asociada a membrana y el resto en forma soluble. La cepa cr-1 carente de actividad adenilato-ciclase no posee ninguna de ambas formas. La enzima, particulada o soluble, no se activa por F^- , GTP, o toxina del cólera y tiene una dependencia absoluta por el Mn^{++} para su actividad catalítica.

La adenilato-ciclase de eucariotes superiores está constituida por un componente "C" catalítico y un componente "G/F" regulatorio. La ciclase de Neurospora solo posee un componente "C". Se puede purificar el componente "G/F" de eritrocitos de aves y acoplarlo al componente "C" de Neurospora crassa. El sistema reconstituido es: a) Activo en presencia de Mn^{++} y Mg^{++} ; b) Estimulable por F^- ; c) Estimulable por GTP y GMP-P(Mg^{++})-P y d) Sensible a una estimulación por isonroteranol. Para que se produzca la reconstitución es necesaria la presencia del componente "C" asociado a un sistema de membranas. El fenómeno no se observa cuando se utiliza una subunidad "C" soluble o cuando se utilizan membranas de la cepa mutante cr-1 carente de actividad adenilato-ciclase.

UNION DE DOS PEPTIDOS TRIPTICOS DE APOMIOGLOBINA DE CABALLO POR MEDIO DE TRIPSINA (Trypsin assisted coupling of two horse apomyoglobin tryptic peptides) Gaule, C. y Herrera, C., Instituto de Ciencias Químicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

La apomioglobina de caballo es una proteína globular de 153 residuos aminoácídicos, que ha sido usada como modelo para estudios de semisíntesis, lo que involucra la realización de procedimientos tanto de hidrólisis como de síntesis de enlaces peptídicos. En este trabajo se ensaya un nuevo procedimiento de síntesis catalizada por una enzima proteolítica.

Por hidrólisis triptica de N^{α}, N^{ϵ} , maleil apomioglobina de caballo se obtienen tres péptidos a los que se denomina A (1-31), B (32-139) y C (140-153). Los péptidos A y C fueron sometidos a una reacción catalizada por tripsina en una solución de alta concentración de reactantes y con un 60% (v/v) de dimetil formamida. Después de 4 días la mezcla de reacción se somete a separación por filtración en Sephadex G-50 y los productos son identificados en base al contenido aminoácido determinado en un analizador de aminoácidos.

Se obtienen cuatro fracciones de reacción. La composición aminoácídica de estas fracciones, consideraciones teóricas respecto a sus pesos moleculares relativos y el orden de elución, permiten establecer que se trata de: I tripsina, II polipéptido A-C (formado por la unión de los péptidos A+C), III péptido A y IV péptido C.

Los resultados indican que ha sido posible sintetizar un enlace peptídico por medio de tripsina en condiciones de reacción tales que han permitido revertir la acción catalítica normal de esta enzima.

CARACTERIZACION DE MINICIRCULOS DE TRIFANOSOMAS SUDAMERICANOS. (Mini-circle characterization from South American Trypanosomes). Gojman, S.G.^a; Frasch, A.C.C.^{a,b}; Cazzullo, J.J.C. y Stoppani, A.O.^{a,b}. - ^aInstituto de Química Biológica, ^bCentro de Investigaciones Bioenergéticas, Universidad de Buenos Aires e ^cInstituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. M. F. Chaben" Ministerio de Salud Pública y Medio Ambiente.

La digestión de los minicírculos de DNA kineotoplástico con dos endonucleasas de restricción, nos permitió caracterizar y diferenciar stocks de dos tripanosomas sudamericanos, Trypanosoma cruzi y Trypanosoma rangeli. Ambas endonucleasas (¹MspI y ²BspRI) cortan los minicírculos en regiones de mayor variabilidad evolutiva.

Otra endonucleasa de restricción (TaqI) a diferencia de las anteriores, corta los minicírculos en una región más altamente conservada, ya que una sola banda prominente de 1/4 de su peso molecular fue observable en todos los stocks estudiados.

Estos resultados sugirieron un modelo acerca de la posible evolución de estas moléculas de DNA.

ROL DE SULFATIDOS EN LA FOSFATASA DEPENDIENTE DE POTASIO. (Sulphatide role in the K^+ -dependent phosphatase) González, M.E., Jedlicki, A. y Zambrano, F. Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Departamento de Biología, Universidad de Chile.

La hidrólisis específica de sulfátidos en membrana plasmática inactiva la (Na^+K^+) -ATPasa sensible a ouabaina, siendo importante dilucidar en que etapa específica de su mecanismo de acción, son ellos requeridos. Resultados previos involucran a los sulfátidos en la afinidad de la enzima por K^+ , por lo tanto se estudió la dependencia de ellos en la actividad fosfatásica dependiente de K^+ , que cataliza la defosforilación del complejo ATPásico.

Al pretratar con arilsulfatasa, una fracción microsomal rica en actividad (Na^+K^+) , se observa que la actividad decae en un 80% cuando se ha hidrolizado un 59% de los sulfátidos. A diferencia de la inhibición por ouabaina, la inactivación provocada por la hidrólisis de sulfátidos no es revertida por K^+ , en cambio la adición de sulfátidos microdispersos produce un incremento de la actividad remanente. El hecho que concentraciones altas de K^+ no sean capaces de abolir el efecto causado por la hidrólisis de sulfátidos indicaría que de alguna manera, la afinidad por potasio ha sido modificada lo que traería como consecuencia la inactivación de la fosfatasa y así la defosforilación del complejo intermediario no podría ocurrir.

Los resultados obtenidos estarían, de esta manera, apoyando la hipótesis que los sulfátidos son un requerimiento lipídico de la (Na^+K^+) -ATPasa y que específicamente estarían involucrados en la etapa de defosforilación de la enzima y en la afinidad por K^+ .

ASPECTOS CINÉTICOS Y ESTEQUIOMÉTRICOS DE LA CARBAMILACION DE FRUCTOSA 1,6-BIFOSFATASA. (Kinetic and stoichiometric aspects of fructose 1,6-bisphosphatase carbamylation). Herrera, R., Ojeda, A. y Slebe, J.C. - Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

La carbamilación de la Fructosa 1,6-bisfosfatasa, enzima clave en el control de la gluconeogénesis, conduce a importantes alteraciones de las propiedades regulatorias de esta enzima sin afectar su actividad catalítica. El tratamiento de la enzima con $NaNCO$ conduce a una pérdida de la inhibición cooperativa por AMP y de la activación por cationes monovalentes. En presencia del sustrato, la modificación produce una pérdida de la cooperatividad sin alterar la unión del nucleótido ni la activación de la enzima por K^+ .

En este trabajo se presenta un estudio de la cinética y estequiometría de la reacción de la enzima con NaN^14CO , bajo diferentes condiciones de modificación. La reacción de modificación se detiene por dilución en Tris 20 mM pH 7.5 y/o TCA al 10% cuantificándose los parámetros cinéticos alterados y la radioactividad precipitable.

Los resultados obtenidos indican que existen 4 residuos lisina/mol enzima relacionados con la cooperatividad hacia el AMP y otros 4 residuos relacionados con la unión del nucleótido. Se sugiere la participación de 2 grupos reactivos relacionados con la activación por K^+ . (Proyecto DI UACH RSM-79-9).

REPLICACION DEL DNA Y FORMACION DE INTERCAMBIOS ENTRE CROMATIDAS HERMANAS. (DNA replication and sister-chromatid exchange formation). Gutiérrez, C., Calvo, A., Hernández, P. - Instituto de Biología Celular, Velázquez, 144, Madrid-6. ESPAÑA.

Los intercambios entre cromátidas hermanas (SCEs) se consideran hoy como una de las pruebas citológicas más gráficas de intercambios de material genético entre las cromátidas del cromosoma eucariótico.

Nos analizamos las frecuencias de SCEs en los cromosomas de segunda mitosis desde el inicio de los tratamientos con 5-bromodesoxiuridina (BrdUrd) en células meristemáticas de *Allium cepa* L. Los cromosomas de células que han replicado en presencia de BrdUrd durante 2 ciclos poseen mayor número de SCEs que los de células que sólo incorporaron BrdUrd durante el primero. Este doble diseño nos ha permitido determinar que, en nuestras condiciones experimentales, existe una frecuencia basal de 0.11 SCEs por cada 10^9 nucleótidos que replican y que la incorporación de BrdUrd en el genoma provoca un incremento de 0,58 SCEs por cada 10^9 nucleótidos y por ciclo de replicación, sobre las frecuencias basales.

Por último, nuestros resultados apoyan la existencia de un mecanismo de formación de SCEs muy ligado a la replicación cromosómica y presentamos la hipótesis de que en su inducción y formación participan las 4 cadenas de polinucleótidos del DNA que acaba de duplicarse.

Regulación de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa y la Sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa de los cloroplastos de espinaca. (Regulation of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase and sedoheptulose-1,7-bisphosphatase). C.M. HERTIG y R.A. WOLOSIUK. - Instituto de Investigaciones Biológicas Fundación Campomar, Buenos Aires, Argentina.

En la asimilación fotosintética de CO_2 por las plantas superiores, la regeneración del aceptor primario de CO_2 , la ribulosa-1,5-bisfosfato, está regulada por la fructosa-1,6-bisfosfatasa ($Fru-P_2asa$) y la sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa ($Sed-P_2asa$) de los cloroplastos.

Estudios recientes han establecido que la tioredoxina reducida interactúa con la fructosa-1,6-bisfosfato y el Ca^{2+} en la regulación de la actividad $Fru-P_2asa$. Otros azúcares difosfato (sedoheptulosa-1,7-bisfosfato, ribulosa-1,5-bisfosfato, glucosa-1,6-bisfosfato) reemplazan a la fructosa-1,6-bisfosfato; en tanto que el Ca^{2+} lo es solamente por el Mn^{2+} . El Ca^{2+} presenta un efecto dual sobre la $Fru-P_2asa$ de los cloroplastos actúa en la activación de la enzima mediada por tioredoxina reducida y fructosa-1,6-bisfosfato, en tanto inhibe la actividad catalítica.

Por otra parte, la actividad $Sed-P_2asa$ de los cloroplastos, es modificada por la Sedoheptulosa-1,7-bisfosfato, Ca^{2+} , y tioredoxina reducida. Un efecto del Ca^{2+} , similar al encontrado con la $Fru-P_2asa$, fue observado con esta enzima.

Los resultados mencionados sugieren que al producirse la transición oscuridad-luz, la tioredoxina reducida interactúa con los metabolitos del estroma de los cloroplastos en la regulación del ciclo de Benson-Calvin.

INHIBIDORES E INACTIVADORES DE LAS CARBOCICLASAS DE CITRUS LIMONUM (Inhibitors and inactivators of *Citrus limonum* carbocyclases). Holuique, L., Chayet, L. y Cori, O. Dep. de Bioquímica, Fac. de Ciencias Básicas y Farm. Universidad de Chile.

Las carbociclasas catalizan la transformación de neril y geranilpirofosfato en hidrocarburos monoterpénicos cíclicos.

La enzima purificada es inactivada por bromuro de bencilo 1 mM. Reacciona un 29% de los SH titulables de la preparación. Esta fracción no cambia en presencia de complejos de Mn-substrato que protegen a la enzima en un 75%. Participarían en la reacción enzimática no sólo grupos SH sino que probablemente metioninas.

El dimetilalilpirofosfato (C_5) es un inhibidor tan efectivo como el citronelilpirofosfato (C_{10} saturado), en tanto que el isopentenilpirofosfato (C_5 no alílico), los pirofosfatos inorgánicos y el 6 amino hexilpirofosfato son inhibidores muy poco eficientes. Se concluye que para que una molécula sea reconocida por las carbociclasas se requiere tanto un grupo pirofosfato como una estructura alílica. El dimetilalilpirofosfato, que tiene ambas características, no tiene el largo de cadena suficiente para la ciclación.

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA DESCARBOXILASA PIROFOSFOMEVALONICA DE HIGADO DE POLLO. (Purification and properties of chicken liver pyrophosphomevalonate decarboxylase.) Jabalquinto, A.M., Alvear, M. y Cardemil, E. Departamentos de Medicina Experimental y de Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La descarboxilasa pirofosfomevalónica cataliza la descarboxilación del pirofosfomevalonato, una de las primeras etapas en la síntesis del colesterol a partir del ácido nevalónico.

La descarboxilasa se purificó a partir de homogenizado de hígado de pollo. Las etapas de purificación comprenden cromatografía en columnas de DEAE celulosa, Sephadex G-200, fosfocelulosa, hidroxilapata y azul dextrano-Sepharose. Se obtuvo una enzima 85-90% pura con un 4% de rendimiento.

La enzima requiere para su actividad Mg^{++} o Mn^{++} y presenta un pH óptimo entre 4.5 y 6.0. Su peso molecular es de 87.000 ± 6.250 y está compuesta de 2 subunidades. La descarboxilasa presenta cinética hiperbólica, siendo las K_m para MVAPP y ATP de $1.41 \cdot 10^{-5} M$ y $5.04 \cdot 10^{-5} M$, respectivamente. Los estudios cinéticos indican un mecanismo secuencial para la adición de los sustratos.

Financiado por proyecto B-402-813-3, U. de Chile.

MODIFICACION DE RESIDUOS DE ARGININA DE DOS ISOAPIRASAS (Modification of arginyl residues of two isoapirases) A.M.Kettlun, M.A.Valenzuela S.Silva, M.Mancilla y A.Traverso. Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Bioquímica. U. de Chile. Fac. de Ciencias Básicas y Farm.

La apirasa es una enzima que hidroliza enlaces pirofosforicos, siendo ATP, ADP y PPP los sustratos más utilizados para medir su actividad. Se ha purificado apirasa de cuociente $ATPasa/ADPasa=1$ (*S.tuberosum* var. *Desirée*) y otra $ATPasa/ADPasa=10$ (var. *Pimpernel*). Estas diferencias cinéticas podrían explicarse por el distinto grado de compromiso que tendrían los mismos residuos de amino ácidos en sitio activo (COO^- , Trp y Tir).

Basándose en el hecho que la mayoría de las enzimas cuyos sustratos son aniónicos tienen residuos de arginina en el sitio activo, se modificaron las 2 apirases con diacetilo (en tampón borato) encontrándose una cinética de inactivación de pseudo primer orden y un número fraccionario de argininas que se explicaría por la dimerización de las enzimas producida por el borato. Fenilglioxal en $NaHCO_3$ produce también el mismo tipo de cinética de inactivación, sin dimerización de las enzimas. De esta manera se pudo calcular el número de argininas de ambas isoenzimas. Los sustratos protejieron a estas enzimas de la inactivación con estos dos reactivos.

SOLUBILIZACION Y CARACTERIZACION DE LA ADENILATO CICLASA DE ESPERMATOZOIDES DE RATA. (Solubilization and characterization of rat spermatozoa adenylate cyclase). Kornblihtt, A.R., Flawia, M.M. y Torres, H.N. - IIB "Fundación Campomar" - FCEyN - UBA - Obligado 2490, Buenos Aires, ARGENTINA.

La adenilato ciclasa (AC) de espermatozoides es una enzima localizada en la membrana plasmática. Su actividad es dependiente de Mn^{++} e insensible a la activación por F^- , nucleótidos de guanosina, toxina de cólera y hormonas polipeptídicas. Estas últimas características son idénticas a las descritas para la AC soluble de células de la línea germinal de testículo.

La AC de espermatozoides de epidídimo de rata fue solubilizada en un 80% por un tratamiento secuencial con los detergentes Brij 58 y Lubrol PX. El complejo enzima detergente sometido a ultracentrifugación en gradientes de sacarosa en H_2O y D_2O presenta un $S_{20,w}$ de 3,5 S y un v de $0,8 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$. Parámetros similares fueron obtenidos para la AC soluble de testículo, centrifugada en iguales condiciones.

Por otra parte se comprobó que ambas enzimas (solubilizada con detergente y soluble) presentan el mismo punto isoeléctrico ($pI=5,25$) y el mismo K_m (1 mM para el $ATP-Mn^{++}$).

Estos datos indicarían que, aún cuando la AC de espermatozoides es una proteína integral de membrana y la AC de células germinales es una enzima citosólica soluble, ambas podrían representar una misma entidad molecular con diferente localización intracelular en distintas etapas de la diferenciación del epitelio germinal.

INHIBICION DE LA CONDUCTANCIA DE K^+ ACTIVADA POR CALCIO EN ERITROCITOS HUMANOS POR DROGAS QUE INHIBEN A CALMODULINA (Inhibition of calcium-activated K^+ conductance by calmodulin-inhibitory drugs). Lackington, I. y Orrego, F. Depto. Fisiología y Biofísica, Fac. Medicina, Universidad de Chile.

La conductancia de K^+ activada por el ión calcio citosólico gK^+ (Ca^{++}) ocurre en numerosos tejidos animales, pero su mecanismo íntimo es desconocido. Usando drogas que inhiben a calmodulina (CAM), tales como las fenotiazinas clorpromazina y flufenazina; como las difenilbutilpiperidinas pimozida, fluspirileno y penfluridol o como el W-7, hemos estudiado si estas drogas también inhiben a gK^+ (Ca^{++}). Se usó globulos rojos humanos lavados 3 veces e incubados en (mM) NaCl 135, KCl 0.2 MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, HEPES-NaOH pH 7.4 20 (Sanchez y col.). El eflujo neto de K^+ se midió con un electrodo sensible a K^+ .

La k_1 de salida de K^+ en ausencia del ionóforo de calcio A23187 y de drogas fue de 0.00245 min^{-1} ; al agregar 0.5 mM A23187 k_1 aumentó 20 veces a 0.0503 min^{-1} . Esta salida estimulada por calcio es exponencial hasta que se ha perdido 80% del K^+ de los C.R. Las drogas inhibidoras de CAM son poderosas inhibidoras de gK^+ (Ca^{++}), con IC_{50} (mM) para pimozida 6.2; penfluridol 3.9; fluspirileno 8.2; clorpromazina 36; flufenazina 68; y W-7 23. Aparece un coeficiente de correlación r de 0.988 entre la capacidad de estas drogas de inhibir gK^+ (Ca^{++}) y CAM.

EFFECTO DE CATIONES DIVALENTES EN LA PRODUCCION DE ALDOSTERONA. (The effect of divalent cations on aldosterone production). Lobo, M.V. - Departamento de Fisiología y Biofísica, Escuela de Medicina, Universidad de Chile.

Se estudió el efecto de los iones Sr^{++} y Ba^{++} en la esteroidogénesis en condiciones basales y en presencia de angiotensina II, potasio y ACTH, comparándose con la respuesta a Ca^{++} , el cual es necesario para el efecto de estos estímulos. La producción de aldosterona se midió en células aisladas de glomerulo sa de buey, las que fueron incubadas en solución Krebs-Ringer-Bicarbonato en el cual 1.25 mM Ca^{++} se sustituyó por Sr^{++} o Ba^{++} . Ambos cationes fueron capaces de reemplazar al calcio en la producción de esteroides cuando las células se estimularon con angiotensina II o ACTH. La producción de aldosterona relativa fue $Ca > Sr > Ba$.

Sin embargo cuando el estímulo fue potasio ni Sr^{++} ni Ba^{++} fueron capaces de reemplazar al calcio en su respuesta; este hallazgo difiere con los resultados encontrados en otros tejidos endocrinos en los cuales Sr^{++} es capaz de imitar al calcio en su acción. Además estos resultados indican que habría una disociación en el mecanismo por el cual angiotensina II y potasio estimulan la producción de aldosterona.

Financiado parcialmente por:
Proyecto N°1/81, PNUD/UNESCO, RLA 78/024
Proyecto N°B-1378-811-5, Univ. de Chile.

ACTIVIDAD ENZIMATICA EN MEMBRANAS PLASMATICAS DE PAROTIDAS DE RATON EN EL PERIODO PRE-REPLICATIVO. (Enzyme activity in the plasma membranes from mouse parotid glands along the prereplicative period). López Solís, R.O. y Galanti, N. - Dpto. de Biología Celular y Genética, Fac. Medicina, U.de Chile.

El isoproterenol es una catecolamina beta adrenérgica que induce síntesis de ADN en los acinos de parotidas de ratón por un mecanismo no mediado por los receptores beta. Este efecto, sin embargo, parece vincularse a cambios específicos en la composición química de la membrana plasmática, como es una disminución temprana de su contenido de ácido siálico. Para correlacionar estos cambios con la funcionalidad de la membrana se analizó la actividad de fosfodiesterasa (E.C. 3.1.4.1), Mg-ATPasa (E.C. 3.6.1.4), proteína kinasa (2.7.1.37) y leucina aminopeptidasa (E.C. 3.4.1.1) en dos fracciones de membranas plasmáticas (liviana y pesada) aisladas a lo largo del período pre-replicativo.

La actividad de estas enzimas disminuye en períodos tempranos con recuperación posterior, a excepción de proteína kinasa, que aumenta continuamente en las membranas livianas.

Las variaciones observadas en la actividad de estas enzimas y la disminución temprana del contenido de ácido siálico en la membrana plasmática durante el período pre-replicativo, sugieren que el isoproterenol induce una modificación generalizada dinámica a nivel de este agragado de macromoléculas.

Proyectos B 1245 811-2, U de Chile y Programa Multiinstitucional Integrado de Biología de la Reproducción Celular, O.E.A.

RESIDUOS DE GALACTOSA, N-ACETIL NEUROAMINICO, FUCOSA Y MANOSA, CONSTITUYENTES DE LA GLICOPROTEINA CEA ASOCIADA A MEMBRANAS DE CELULAS TUMORALES DE TEJIDO GASTRICO. (Galactose, N-acetyl neuroaminic acid, fucose and mannose, carbohydrate components of glycoprotein associated to membranes of human cancer digestive cells). Lorie, L., Adriasola, N. Lab. Inmunobioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso.

La glicoproteína asociada a membranas de células tumorales del sistema digestivo humano conocida como antígeno carcinoembriológico (CEA) se ha descrito con variables contenidos glucídicos, los que serían responsables de perturbaciones en los mecanismos de reconocimiento y destrucción de las células tumorales in vivo, a nivel de receptores celulares de superficie de células inmunoreactivas.

En base a estos hechos se inició el estudio de la fracción glucídica de esta glicoproteína, para lo cual se preparó a partir de un pool de tejido gástrico tumoral un extracto perclórico que se purificó por cromatografía en columna de DEAE-Sephadex A-50.

La fracción aislada y purificada que reveló la presencia de glicoproteína con un contenido de glucídicos de 32.1% fue sometida a hidrólisis ácida y analizada por cromatografía gaseosa y en papel. Los resultados obtenidos evidencian la presencia de galactosa, N-acetil neuroamínico, fucosa y manosa.

Estos resultados fueron corroborados utilizando anticuerpos anti CEA absorbidos separadamente con estos monosacáridos los que inhibieron la hemoaglutinación pasiva en presencia de la glicoproteína CEA.

BIOSINTESIS DE ISOPRENOIDES, CARACTERIZACION DEL SISTEMA ENZIMATICO DE FLÁVEDO DE CITRUS PARADISI (Biosynthesis of Isoprenoid: Characterization of the Enzymatic system from Citrus paradisi flavedo). Lozada, R., Pérez, L.M., Cori, O. Lab. Bioquímica, Fac. Ciencias Bas. y Farm. U. de Chile y *Dep. Química, U. de Antioquia Medellín Colombia.

Un extracto acuoso de *C. paradisi* incorpora un 25% de la radiactividad del (3R) MVA, en presencia de ATP y metales bivalentes, a isoprenoides de 5,10 y 15 átomos de carbono tanto de conformación E como Z.

La isopentenil pirofosfato-isomerasa del sistema no requiere metal bivalente para su actividad. Requiere de la presencia de grupos SH, aunque no es inhibida por DTNB 200 μ M, pero es inactivada a 30° por DTNB 200 μ M en ausencia de sustrato.

La C₁₅-prenilsintetasa del sistema forma en presencia de Mg²⁺ los productos E-FPP y Z-FPP, mientras que con Mn²⁺ solamente sintetiza el E-FPP. No utiliza NPP como sustrato. Requiere de grupos SH para su actividad, siendo inactivada reversiblemente por DTNB. La reacción de modificación sigue un patrón cinético monofásico y deseudoprimer orden.

El sistema presenta además actividades fosfatásicas, que hidrolizan diversos compuestos fosforilados.

LA RECUPERACION DEL EFECTO LETAL POR LUZ ULTRAVIOLETA EN CELULAS DE RATA 3T3 CARENCIADAS EN G₀ NO ES DEBIDO SOLAMENTE A LA ESCISION DE DIMEROS. (Recovery of the lethal effect of UV-light in 3T3 mouse cells arrested in G₀ is not accounted for excision of dimers only). Menck, C.F.M. y Meneghini, R. - Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidad de São Paulo, Brasil.

Las células de mamíferos poseen varios mecanismos que permiten su sobrevivencia por mas que tengan lesiones en su genoma. Entre estos mecanismos, claramente el reparo de escisión, que implica en la remoción de la lesión es el más conocido.

Hemos estudiado la cinética de eliminación de los dímeros de pirimidina, principal lesión producida por luz UV a 254 nm, en células de rata del linaje 3T3. A más de eso se midió la capacidad de formación de colonias de células 3T3 sincronizadas, que fueron irradiadas a diferentes tiempos de la fase S del ciclo celular. Es necesario resaltar que la replicación del DNA dañado es considerada la responsable por el apareamiento de lesiones letales. Observamos que estas células presentan una recuperación en su viabilidad, dependiendo del tiempo entre la irradiación y el inicio de la fase S. Esta recuperación supera aquella esperada por el número de dímeros aún presentes en el genoma. Por otro lado también observamos que estas células presentan un proceso inducido de reparo que permite a la maquinaria de replicación del DNA ultrapasarse más fácilmente al dímero. Es posible que este proceso sea responsable por lo menos en parte por la recuperación de la viabilidad citada arriba.

Financiado por FAPESP y CNPq.

PURIFICACION DE UN INHIBIDOR DE QUINASAS DE PROTEINAS A PARTIR DE EXTRACTOS DE EMBRIONES DE POLLO. (Purification of a protein kinase inhibitor from chicken embryo extracts). Molina y Vedia, L. y Correa, H.N. - IIB "Fundación Campomar" - FCEYN - UBA - Obispo 2490, Buenos Aires, ARGENTINA.

A partir de extractos de embriones de pollo se ha purificado un factor inhibitorio de la actividad de diferentes tipos de quinasas de proteínas dependientes o no de AMP cíclico.

Las etapas de purificación utilizadas fueron: cromatografía de intercambio iónico, calentamiento, extracción con etanol, filtración en geles y electroforesis.

El factor es termoestable, su peso molecular es aproximadamente 2000 y es de naturaleza aparentemente polipéptica. Luego de su hidrólisis con ácido clorhídrico y dansilación se detectó la presencia de los siguientes aminoácidos: lys, asp (asn), glu (gln), arg, gly, ala, val y ser. Por otro lado el compuesto da reacción de fosfato.

El compuesto presenta características bastante similares a las descritas para los putativos "segundos mensajeros" de la insulina.

ASCORBATO ATRAPADOR DE RADICALES SUPEROXIDO? Is ascorbate a superoxide radical scavenger?

O'Reilly, S. y González, G. Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso.

En el metabolismo celular de organismos aeróbicos se ha comprobado la producción de radicales superóxido altamente reactivos que pueden producir daño celular. Estos radicales son primariamente eliminados por la superoxidismutasa, existiendo también atrapadores no enzimáticos, como el ascorbato. Se ha estudiado el efecto del ascorbato sobre un sistema productor de radicales superóxidos.

El sistema utilizado consistió en la reducción del nitro blue tetrazolium (NBT) por la riboflavina fotoreducida de acuerdo al método de Winterbourn modificado en este trabajo.

Los resultados indican que no es claro el efecto del ascorbato a las altas concentraciones utilizadas como atrapador de radicales, pues no se observa una inhibición neta en la resucción del NBT, la que sí es evidente a menores concentraciones de ascorbato. Por otra parte se observa reducción del NBT por el ascorbato, tanto en ausencia como en presencia de luz, siendo ésta mayor en el último caso.

La reducción simultánea del NBT por riboflavina fotoreducida y por ascorbato explica la aparente ausencia de inhibición por este último a concentraciones altas, pues por un lado estaría inhibiendo la reducción del NBT mediada por riboflavina, y por otro estaría reduciéndolo directamente. A bajas concentraciones de ascorbato donde la reducción del NBT por éste es menor su efecto como atrapador es evidente.

REGULACION DE FOSFODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS EN OVARIO DE *X. LAEVIS*. (Regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterases from *X. laevis*). Orellana, O., Jedlicki, E., Plaza, M., Connelly, C. y Allende, J. - Depto. Bioquímica, Fac. de Medicina y Depto. Biología, Fac. de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Univ. de Chile.

La regulación del proceso de maduración meiótica de oocitos de anfibio involucra cambios en los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos y del ión calcio libre. Las enzimas que degradan nucleótidos cíclicos han sido analizadas en extractos de ovario de *X. laevis*. La actividad fosfodiesterásica de cAMP del extracto no es alterada mayormente por la presencia del ión calcio y el activador proteico de las fosfodiesterasas, calmodulina. Por otro lado la separación cromatográfica del extracto en DEAE-celulosa permite distinguir varias actividades enzimáticas que hidrolizan cAMP y/o cGMP, una de las cuales (FDE I) es estimulada entre 6 y 10 veces por calmodulina/Ca⁺⁺. El extracto ovárico contiene además un factor proteico que inhibe la activación por calmodulina/Ca⁺⁺. Este factor ha sido parcialmente caracterizado en columnas de afinidad de Sepharose-Azot de Cibacron.

Experimentos de saturación de la enzima FDE I por cGMP y de filtración en geles de Sephadex sugieren la presencia de dos o más formas enzimáticas con diferente susceptibilidad a calmodulina/Ca⁺⁺. La digestión parcial de FDE I con tripsina provoca un aumento de la actividad basal para cAMP y cGMP y la pérdida de la estimulación por calmodulina/Ca⁺⁺.

Estos estudios en ovarios de anfibio sugieren que las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos y sus proteínas moduladoras juegan un rol importante en la respuesta celular ante cambios en los niveles de calcio. Patrocinado por Fund. Ford, OEA, Univ. de Chile.

ACCION REGULADORA DE LA CALMODULINA EN GLANDULA MAMARIA. (Regulatory action of calmodulin in mammary gland). Pizarro, M., Puente, J. y Sapag-Hagar, M. - Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas Universidad de Chile.

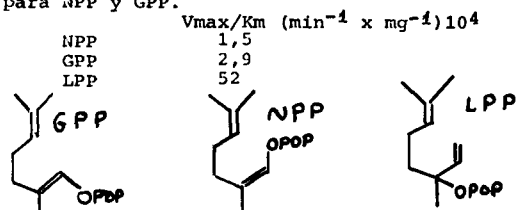
En la glándula mamaria (GM) el AMP cíclico (cAMP) es un regulador negativo de la lactogénesis. Se ha demostrado en muchos tejidos que la 3':5' nucleótido fosfodiesterasa es activada por calmodulina, una proteína de bajo peso molecular que participa en diversos procesos celulares. En este trabajo se demuestra la presencia de esta proteína activadora en la GM y su relación con las variaciones de los nucleótidos cíclicos y calcio a lo largo del ciclo lactogénico.

Se ensayó la proteína activadora por su propiedad de activar la fosfodiesterasa tanto de cerebro de bovino como de GM en lactancia.

Los resultados muestran que la calmodulina aumenta significativamente a lo largo del ciclo lactogénico. Esto explicaría, en parte, el aumento de actividad de la fosfodiesterasa de cAMP de Km alta en la GM durante la lactancia. La actividad de la calmodulina es dependiente de calcio e inhibida por trifluoperazina; además, las características cinéticas de la activación de la fosfodiesterasa de GM resultaron ser análogas a las de calmodulina de otros tejidos, confirmando así la universalidad de su acción. Proyecto B1138-8113 Universidad de Chile.

LINALIL Pirofosfato ¿SUBSTRATO EN LA BIOSINTESIS DE HIDROCARBUROS MONOTERPENICOS? (Linalyl Pyrophosphate: A substrate for the biosynthesis of monoterpene hydrocarbons?) Portilla, G., Rojas, M.C. y Cori, O. Deps. de Bioquímica y de Química, Fac. de Ciencias Básicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

El flavado de *Citrus limonum* contiene enzimas que a partir de los substratos Geranyl pirofosfato (GPP) o neril pirofosfato (NPP) sintetizan hidrocarburos monoterpénicos cíclicos sin que medie isomerización de GPP en NPP o viceversa. Es posible que se forme ligado en el sitio activo de la enzima un intermedio de estructura terciaria por migración del grupo pirofosfato desde un carbono primario a uno terciario. Se sintetizó este posible intermediario, Linalil pirofosfato (LPP). La carbociclase de *C. limonum* forma limoneno, α y β pineno a partir de LPP. Al igual que para GPP y NPP hay requerimiento absoluto de Mn²⁺. La eficiencia catalítica es mayor que para NPP y GPP.



AI SLAM IENTO Y CARACTERIZACION PARCIAL DE HISTONAS DE OOCITOS DE *TETRAPYGUS NIGER*. (Isolation and partial characterization of histones from unfertilized eggs of *Tetrapygus niger*). Puchi, M., Momberg, A., Massone, R., Inostroza, D., Imshentzky, M. Depto. Biología Molecular, Universidad de Concepción.

Se ha demostrado en oocitos de *Tetrapygus niger* la presencia de cinco fracciones proteicas con características de histonas de células eucarióticas y dos fracciones, CS1 y CS2, particulares de oocitos y de los primeros estados de segmentación.

Con el objeto de caracterizar estas proteínas, se procedió al aislamiento de cada fracción para la determinación de su composición en aminoácidos y peso molecular.

Las histonas de oocitos fueron purificadas por electroelución desde geles de poliacrilamida al 15% - urea 6M - ácido acético 0.9N.

Las fracciones aisladas son microheterogéneas: H1 con un PM de 20.000 es rica en gli, ala y lis; H3 de 18.000 es rica en lis, arg, gli; H4 de 10.000 es rica en lis, arg, glu y gli; CS1 y CS2 de 21.500 y 26.000 respectivamente, son ricas en gli, lis y glu. H2A y H2B no fueron analizadas.

Las histonas de oocitos tienen una composición de aminoácidos significativamente diferente de las histonas de células somáticas y de espermatozoides.

Trabajo financiado por OEA y por Vice Rectoría de Investigación, U. de Concepción.

CARACTERIZACION DE LA SUBUNIDAD CATALITICA DE LA ADENILATO CICLASA DE NEUROSPORA CRASSA. (Characterization of the catalytic subunit of *Neurospora crassa* adenylate cyclase). Reig Macia, J.A., Kornblihtt, A.R., Flawia, M.M. y Torres, H.N.- IIB "Fundación Campomar" - FCEyN - UBA - Obligado 2490, Buenos Aires, ARGENTINA.

La adenilato ciclasa de *Neurospora crassa* se encuentra asociada tanto a membranas como en forma soluble. La proporción de ésta última se incrementa con la fuerza iónica del buffer empleado en la extracción.

La referida forma soluble se purificó por: cromatografía hidrofóbica, filtración en gel de agarosa, cromatografía de afinidad en Blue Dextran-Sepharose y electroforesis preparativa en geles de poli(acrilamida). En geles analíticos de poli(acrilamida) en presencia de SDS las fracciones más puras mostraron un componente polipeptídico mayoritario con un peso molecular aparente de 63 000 daltons.

Se determinó el radio de Stokes y la constante de sedimentación de dicha ciclasa; los valores fueron 7,3 nm y 6,2 S respectivamente. En base a estos valores se calculó un PM de 200 000, un volumen específico parcial de 0,74 ml.g⁻¹ y un coeficiente friccional de 1,65. Evidencias experimentales permiten postular que la adenilato ciclasa de *Neurospora crassa* está constituida por tres monómeros idénticos de PM 63 000 daltons.

MECANISMOS DE DETOXICACION EN ECHINOCOCCUS GRANULOSUS: Glutación-S-Transferasa (Glutathione-S-transferase in *Echinococcus granulosis*). Repetto Y. y Morello A. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina Universidad de Chile.

Hidatidosis es una enfermedad causada por la larva (escólices) de *E. granulosis*. Las drogas son inefectivas en controlar el parásito posiblemente debido a problemas de permeabilidad, o a sistemas detoxicantes.

Los escólices de *E. granulosis* se obtuvieron de quistes de hígado de ovinos. La actividad de la enzima se determinó usando como sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB). La concentración del conjugado formado se determinó a 340 nm en un espectrofotómetro de doble haz (ΔE conjugado 9.6; mM⁻¹ cm⁻¹).

La glutación-transferasa se encuentra solamente en el citosol. Su velocidad máxima es de 45 nmoles de sustrato conjugado por min. y por mg de proteína. El Km(mM) para CDNB y G-SH son 1.1 y 0.25 respectivamente.

La enzima es inducida en un 30% por tratamiento con fenobarbital o naftoflavona. Los escólices contienen glutación en una concentración de 287 nmoles/g.

Estos resultados sugieren que la glutación-transferasa podría jugar un rol en la resistencia del parásito a drogas.

Financiado por grant B-9308124. Universidad de Chile.

Estudios sobre el mecanismo de iniciación y terminación en DNA's circulares de doble hebra (Studies on the mechanism of initiation and termination of closed circular double stranded DNA's). Reinberg, D., Zipursky, L., Brown, D. and Hurwitz, J.- Albert Einstein College of Medicine, N. York.

Los mecanismos por los cuales DNA circulares de doble hebra son replicados, son procesos complejos, que requieren a lo menos 15 actividades enzimáticas diferentes. La especificidad de la replicación de DNA radica en el mecanismo de iniciación y terminación, esta especificidad está dada en el reconocimiento de la secuencia iniciadora y terminadora. Hemos estudiado estos procesos usando los DNAs de los fagos ϕ X174, G4 y del plasmido pBR322.

Los estudios indican que los mecanismos que operan en la iniciación de la hebra viral y complementaria en ϕ X174 son diferentes en cuanto a la secuencia reconocida y proteínas iniciadoras. Estudios con fragmentos de DNA conteniendo la estructura necesaria para el reconocimiento requerido para iniciación y terminación de la hebra viral, indican que ambas se encuentran contenidos en la misma secuencia, y que cuando ésta es clonada en el DNA de pBR322, éste puede ser replicado en reacciones específicas para ϕ X174. Estos estudios demuestran además, que en ambas hebras del DNA de pBR322 existen secuencias necesarias para iniciación de la síntesis de DNA por un mecanismo similar al que opera en la síntesis de la hebra complementaria de ϕ X174.

ACLIMATACION A TEMPERATURA EN PECES. ESTUDIOS EN UN SISTEMA DE HEPATOCITOS AISLADOS (Acclimatization in fish. Studies in an isolated hepatocytes system). Sáez, L.J., Amthauer, R., Coicochea, O. y Krauskopf, M.- Institutos de Bioquímica y de Embriología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Aun cuando se han identificado cambios en la síntesis de macromoléculas durante la aclimatación de ectotermos, no se ha podido determinar con claridad la naturaleza de la estrategia compensatoria, ni el mecanismo de respuesta de la síntesis proteica en estos procesos.

Hace algún tiempo informamos la obtención de hepatocitos aislados del pez *Cyprinus carpio* (Arch. Biol. Med. Exper. 12, 495, 1979). Ahora presentamos resultados acerca de su capacidad de reconocimiento, de autoagregación y de originar estructuras similares a tejido, los que confirman su alta integridad morfológica y funcional, permitiendo el uso de ellos para investigar la síntesis de macromoléculas durante aclimatización. La síntesis de proteínas y RNA en hepatocitos aislados de carpas aclimatadas a ambas estaciones, presentó una marcada dependencia de la temperatura. Se detectó una mayor velocidad de síntesis en las células aisladas de peces de verano, respecto a los de invierno.

Los resultados permiten concluir que durante la adaptación térmica existe una compensación inversa, y que el efecto de la temperatura se correlacionaría con una posible hibernación del animal. (Financiado DI RSE-80-17).

EFFECTO DE BENZO(a)PIRENO (BP) SOBRE LAS DNA POLIMERASAS DE CELULAS ANIMALES. (Effect of BP on animal DNA polymerases). Salazar, I., Gil, L. y Litvak, S. Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina. Universidad de Chile.

El BP es una substancia con un alto poder cancerígeno. Al inyectarla a un animal produce en las primeras 72 hrs. una disminución transiente de las síntesis de DNA. Hasta ahora se han atribuido los efectos celulares de la droga a su capacidad para unirse al DNA nuclear y mitocondrial después de ser activada. Dado que BP también se une a proteínas, hemos investigado su efecto sobre las DNA polimerasas. Nuestros resultados muestran que: 1) La síntesis de DNA en núcleos de ratas inyectadas con BP es menor que en núcleos controles. 2) La incubación con NADPH, un cofactor de la BP hidroxilasa, aumenta notablemente, la inhibición de la síntesis de DNA en núcleos de ratas tratadas. 3) La actividad DNA polimerasa solubilizada de núcleos de animales tratados es mucho menor que la de núcleos controles. 4) La incubación *in vitro* de núcleos normales con BP, inhibe la síntesis de DNA. Este efecto es muy potenciado por el NADPH. 5) La DNA polimerasa más afectada por BP tanto *in vivo* como *in vitro* es la enzima α . La polimerasa β es más resistente.

Nuestros resultados indican un efecto directo del BP sobre las DNA polimerasas así como una relación entre este efecto y la BP hidroxilasa nuclear.

Proyectos: B-535-802 y B-933-812 del SDCACI.

EFFECTO DE CLORURO DE SODIO SOBRE ACTIVIDAD PROTEOLITICA UNIDA A CROMATINA DE HUEVO DE ERIZO TETRAPYGUS NIGER ACTIVADO POR AMONIO. NaCl effects on chromatin bound proteolytic activity from ammonium activated sea urchin egg.

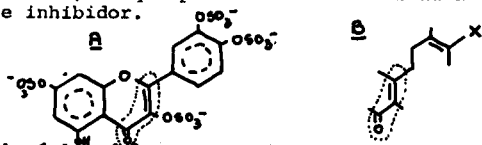
Sánchez., L., Merino, V., Ponce, O. Departamento de Biología Molecular. Universidad de Concepción, Concepción.

La cromatina de huevo de erizo de mar activado por amonio presenta actividad proteolítica alcalina (pH 8), que es extraída parcialmente por tratamiento con ClNa 0.3 - 0.7M. Esta fracción soluble sometida a electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida SDS presenta diecinueve bandas de proteínas correspondientes a histona H1 y proteínas no histónicas de alto y bajo peso molecular. La actividad proteolítica de esta fracción, es selectiva para histona H1 y algunas proteínas no histónicas.

ClNa 1M inhibe la actividad, en cambio, ClNa 2M y 3M, la incrementan y la hacen menos específica. ClNa 2M-Urea 5M no inhiben esta actividad. El efecto de ClNa sobre la actividad proteolítica sugiere la existencia de más de una actividad enzimática en el huevo activado por amonio. La degradación de proteínas cromatínicas producida en presencia de ClNa 2M-Urea 5M, indica que la capacidad transcripcional de la cromatina reconstituida puede estar modificada por la acción de estas actividades.

EFFECTOS DEL TETRASULFATO DE QUERCETINA SOBRE DESHIDROGENASAS (Effect of quercetin tetrasulfate on some dehydrogenases) Seelenfreund, D., Chayet, L., y Cori O. Lab. de Bioquímica, Dep. de Bioquímica, Fac. de Ciencias Básicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

Para evaluar el papel relativo de síntesis estereoespecífica de preniltirofosfatos e isomerización redox de prenoles, se estudió el efecto de derivados del cromeno sobre diversas deshidrogenasas. El 3,7,3',4' tetrasulfato de quercetina (A) obtenido de Flaveria bidentis inhibe no competitivamente la reducción de oxaloacético (OAA) por la deshidrogenasa mállica de corazón de bovino con una K_i de 4 μ M, valor 10 veces menor que K_M para OAA y NADH. La inhibición es aparentemente mixta para NADH. Otras deshidrogenasas no fueron inhibidas, lo que prueba la selectividad de este inhibidor.



El núcleo del cromeno tiene un sistema conjugado semejante al de un aldehído alílico (B). Por lo tanto será útil en el estudio de las isomerizaciones citadas.

Proyecto en colaboración con H.R. Juliani y V.E. Sosa, Univ. Nacional de Córdoba. (2/81 PNUD-UNESCO y B 1127-81-14 U. de Ch.)

FOSFOPROTEINAS FOSFATASAS EN EL HONGO PUCOR ROUXII. (Phosphoprotein phosphatases from the fungus Pucor rouxii). Seigelchifer, M. y Passeron, M.S. Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Las fosfoproteínas fosfatasa son enzimas que desfosforilan numerosas proteínas fosforiladas; son muy importantes en relación con el metabolismo del cAMP porque son las encargadas de revertir la acción de las proteínas quinasas dependientes de cAMP y, en última instancia, la acción del nucleótido cíclico.

Se detectó actividad de fosfoproteína fosfatasa en extractos crudos de la forma filamentososa del hongo. La actividad enzimática se midió por la liberación de fosfato inorgánico radiactivo, utilizando como sustrato histona fosforilada.

Se purificó parcialmente la enzima a partir de extractos solubles, mediante los siguientes pasos: cromatografía en columna de DEAE-celulosa y filtración por Sephadex G100. El peso molecular aparente de la enzima parcialmente purificada es de 35.000 daltones. En extractos crudos preparados en presencia de inhibidores de proteasas no se detectaron formas de mayor peso molecular.

Independientemente del grado de purificación, la actividad enzimática es fuertemente inhibida por iones fosfato o fluoruro. El efecto de este último es revertido parcialmente por iones Mn^{++} .

En sobrenadante de 100.000G la enzima es activada entre 2 y 4 veces por iones Mn^{++} ; activación que se pierde parcialmente después del pasaje por DEAE-celulosa. Se está estudiando si estos cambios de sensibilidad al metal se deben a la presencia de un inhibidor o a la coexistencia de más de una forma enzimática.

GROWTH REQUIREMENTS FOR Mg^{2+} AND Ca^{2+} FROM NORMAL AND TRANSFORMED CELLS. Solange M.F. Ribeiro & Hugo A. Armelin. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

The requirements for Mg^{2+} and Ca^{2+} have been analysed in different cell types (mouse, rat and hamster)

Normal cells require high ($>100\mu M$) Mg^{2+} levels for growth whereas transformed cells grow regularly in low ($<10\mu M$) concentrations of this cation. Growth arrest of normal cells by Mg^{2+} starvation is due to cell death with no sign of cell cycle arresting in Go. Mg^{2+} deprivation does not interfere with the growth rate in transformed cells, although morphological alterations are detectable in these cells.

Ca^{2+} deprivation increases the requirements of normal cells for serum growth factors. DNA synthesis of Go arrested Ca^{2+} starved 3T3 fibroblasts can be stimulated by "low" Ca^{2+} serum; this cell response seems to be independent of the Mg^{2+} concentration in the medium.

Partially transformed fibroblasts (characterized by a) high glycolysis rate; b) high capacity for piling up and c) low response to growth factors) still require high Mg^{2+} concentrations for growth. Only cells that have reached the anchorage independent stage of transformation grow well in low Mg^{2+} medium. This last observation suggests that low requirement for Mg^{2+} is an essential feature of the malignant state.

Financial support: FAPESP, CNPq and Project PNUD/UNESCO RLA 78/024.

CARACTERISTICAS "IN VITRO" DE LA ACTIVIDAD RNA POLIMERASA ASOCIADA CON ROTAVIRUS HUMANO. ("In vitro" characterization of human rotavirus associated RNA polymerase). Spencer E. y Arias M.L. Lab. de Virología, División de Ciencias Básicas. INTA. U. de Chile.

Hemos aislado a partir de deposiciones diferentes tipos de rotavirus humano. Este virus contiene entre 5-10 polipeptidos estructurales y 11 segmentos de RNA de doble hebra que constituyen su genoma. Este virus parece ser de replicación citoplasmática por lo que contiene un aparato enzimático destinado a llevar a cabo los eventos tempranos de la infección celular. Hemos caracterizado en forma preliminar la actividad RNA polimerasa RNA dependiente asociada al virus.

Esta actividad enzimática cosedimenta con el virus cuando éste es sometido a centrifugación en gradientes de sucrosa. De los resultados obtenidos al analizar sus requerimientos de ribonucleosidos trifosforados, cationes divalentes, sales y otros se desprende que es una actividad RNA polimerasa RNA dependiente que utiliza RNA de doble hebra como templado. El proceso de transcripción está asociado a la hidrólisis de ATP a ADP y fósforo inorgánico, ya que análogos no hidrolizables de ATP inhiben la transcripción.

Otros sustratos tales como S-adenosil metionina también afectan las características de la síntesis de RNA por un mecanismo que probablemente este asociado a la modificación del extremo 5' terminal de RNA sintetizado por el virus. En condiciones adecuadas el virus parece transcribir al menos 8 especies distintas de RNA.

SOLUBILIZACION POR ATP PRODUCE UNA FORMA MODIFICADA DE HEXOQUINASA A MITOCONDRIAL (ATP-solubilization results in a modified form of mitochondrial hexokinase A).

Ureta I, Radojković J y Bustamante E. Dept. Biología Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, y Dept. Ciencias Fisiológicas, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

En varios tejidos de rata, parte de la actividad hexoquinásica (HK) se encuentra en mitocondrias y puede ser solubilizada específicamente por ATP o glucosa 6-P. Se estudió la composición isoenzimática de las HK solubilizada por tales efectores.

Se purificaron mitocondrias de cerebro y corazón de ratas adultas, de hepatomas Morris y de hígado de ratas recién nacidas. Las mitocondrias se incubaron con ATP, o glucosa 6-P o Triton X-100. Después de centrifugar, los líquidos sobrenadantes se cromatografiaron en DEAE-celulosa y se midió actividad HK de los eluidos.

La incubación de mitocondrias con ATP produjo la aparición de HK-A, HK-B y de una nueva forma inmunológicamente relacionada con HK-A, menos retenida en las columnas, que denominamos HK-Am. La incubación con glucosa-6-P o Triton sólo produjo la aparición de HK-A y HK-B. La mayor proporción de HK-Am se obtuvo con mitocondrias concentradas (25 mg/ml de proteínas) y ATP 10 mM. HK-Am es inestable al almacenamiento, diálisis o dilución, reconvirtiéndose a la forma HK-A. En la transición HK-A \rightarrow HK-Am no interviene el fosfato γ de ATP ya que AMP-PNP produce el mismo efecto. La incubación con [γ - ^{32}P]ATP no produjo marca en HK-Am. Las Km para glucosa y ATP de HK-A y HK-Am son iguales, pero por la inestabilidad de HK-Am no se descartó la existencia de diferencias con significado fisiológico. (Financiado por PNUD/UNESCO, SDCACI-Univ. Chile y la Organización de Estados Americanos).

MECANISMO DE LA DEPLECION DE GLUTATION HEPATICO INDUCIDA POR ETANOL (E). (Mechanism of the glutathione depletion induced in the liver by ethanol). Valenzuela, A.¹, Fernández, N.¹, Fernández, V.², y Videla, L.A.² Unidades de Bioquímica, 1. INTA y 2. División de Ciencias Médicas Occidente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La ingesta aguda de E provoca un 50% de disminución en la concentración de glutatión reducido (GSH) en el hígado, asociada a un aumento en su índice lipoperoxidativo. El presente trabajo estudia dos posibles mecanismos involucrados en este efecto de E: oxidación y translocación al plasma y/o bilis.

Ratas Wistar macho (150 g) ayunadas por 16 hr recibieron E (5 g/kg) o glucosa isocalórica y fueron sacrificadas 6 hr después. GSH y GSSG (glutatión oxidado) fueron determinados enzimáticamente.

Se observa una disminución del GSH hepático y un aumento del GSSG, el cual da cuenta del 20% de la reducción de GSH. Se produce, además, una disminución del GSH y GSSG biliar y un aumento de la concentración plasmática de ambos. En el glóbulo rojo no hay cambios en el contenido de glutatión, pero sí un cambio en el estado de oxidación.

Se concluye que la depleción de GSH hepático por E es debida a una oxidación parcial en el tejido y a una translocación al plasma. Se discute la eventual formación de un conjugado entre GSH y acetaldehído proveniente del metabolismo de E. (Financiado por S.D.C.A.C.I., U. de Chile, B-1162-811-3).

PARTICIPACION DE METALES BIVALENTES EN LA HIDROLISIS ENZIMATICA DE PIROFOSFATOS. (Bivalent metal requirements on the enzymic hydrolysis of pyrophosphates). Valenzuela, M.A., Fanta, N., Kettlun, A.M., Traverso-Cori, A. Laboratorio de Bioquímica, Dep. de Bioquímica, Fac. de Ciencias Básicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

La apirasa de tubérculo de S. tuberosum (var. Desirée) requiere de la presencia de metales bivalentes para catalizar la hidrólisis de sustratos pirofosfatos orgánicos (ATP, ADP) e inorgánicos (PPP, PP).

Se comparan las actividades enzimáticas frente a los siguientes metales: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} y Zn^{2+} determinando:

- 1) El pH óptimo de las actividades ATPasa, ADPasa y PPPasa.
- 2) los valores de S_{50} de estos metales para cada uno de los tres sustratos.
- 3) la acción de estos metales sobre la relación entre las actividades enzimáticas (cociente ATPasa/ADPasa y ATPasa/PPPasa).

Además se describe el fenómeno de histéresis producido por la incubación de estos metales con la enzima en ausencia de sustratos. Se muestra la reversión de esta respuesta cinética lenta de la apirasa por acción de sustratos y agentes quelantes.

PLASMIDIOS DE BACTERIAS TERMOFILICAS (Plasmids from thermophilic bacteria). Vásquez, C., Venegas, A., Valenzuela, P., Yudelevich, A y Vicuña, R. Laboratorio de Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Se han aislado dos plasmidios, pTT-1 y pTF-62 que se encuentran normalmente en el citoplasma de las bacterias termofílicas Thermus thermophilus HB 8 y Thermus flavus AT 62, respectivamente. Con el objeto de utilizar estos elementos extracromosomales como vectores en un sistema transformante en bacterias termofílicas, se ha hecho una caracterización física de los plasmidios. Datos de microscopía electrónica y electroforesis en geles de agarosa, revelan un peso molecular de 6.0 megadaltons para pTT-1 y de 6.8 megadaltons para pTF-62. El contenido de G más C de ambos plasmidios, determinado por cromatografía en papel luego de hidrólisis ácida, es de un 68%. También se han determinado los respectivos grados de sobre enrollamiento y número de copias por célula.

Los mapas físicos de pTT-1 y pTF-62 fueron construidos utilizando diversas enzimas de restricción.

Financiado por la Dirección de Investigación de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

ANALISIS ESTRUCTURAL DE UN SEUDOGEN DE β TUBULINA HUMANA. (Structural analysis of a human β tubulin pseudogene). Venegas, A., Pichuantes, S., Medina, M. A., Gómez, M.I., Bull, P. y Valenzuela, P. Laboratorio de Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Hemos descrito previamente el aislamiento de varios genes de α y β tubulina humana utilizando el vector Charon 4A. Para un análisis estructural más fino de uno de ellos, se han clonado subfragmentos del clon original β -9 en pBR322 y pBR325. Estudios de hibridización según Southern, contra un cDNA de cerebro de pollo sugería la presencia de un gen de β tubulina intacto, en base a consideraciones de tamaño y mapa de restricción.

La secuenciación del DNA, según el método de Maxam y Gilbert, de la región que contiene este posible gen reveló la presencia de secuencias similares a la del gen de pollo. La conversión de esta codificación a secuencia aminoacídica incrementa la homología con la secuencia proteica propuesta para la β tubulina de pollo, pero se detectó en la región codogénica la presencia de varias señales de término de la traducción. Además, no se detectó la presencia de intrones. Estos últimos rasgos permiten definir esta estructura como un seudogen.

Con el fin de probar la funcionalidad de éste, hemos realizado experimentos preliminares de transcripción *in vitro* utilizando el sistema de células HeLa, con resultados negativos.

Se discute la presencia y relevancia de seudogenes en eucariotes. Financiado por DIUC, U.C.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA PARTICULA NUCLEOPROTEICA EN OOCITOS DE Cyprinus carpio (Isolation and characterization of a nucleoprotein particle from Cyprinus carpio oocytes). Villanueva, J., Molina, V., Molina, H., Araya, A. y Krauskopf, M. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Los oocitos previtelogénicos de anfibios y teleosteos contienen una gran cantidad de tRNA y RNA 5S. Esencialmente todo el RNA 5S y una alta proporción del tRNA están almacenados en dos partículas nucleoproteicas que sedimentan a 7S y 42S.

Se aislaron partículas del tipo 42S de oocitos previtelogénicos de carpa, centrifugando un homogeneizado en gradiente de sacarosa (15 a 30%). La fracción correspondiente se concentró por centrifugación a 105.000 g, precipitación con etanol frío o con sulfato de amonio. El análisis electroforético de las partículas indicó la presencia de RNA 5S y tRNA. Se identificaron además dos proteínas de un peso molecular aproximado a 37.000 y 50.000, y una tercera, que se encuentra presente en menor proporción.

Los experimentos de aislamiento de tRNA y RNA 5S de oocitos sugieren una posible interacción entre estas dos macromoléculas. El RNA 5S, aun después de aislado contiene tRNA^{Pro} y tRNA^{Leu}, especies que se encuentran en la partícula 42S.

(Financiado por Proyecto DI UACH RSE-80-17).