

**SOCIEDAD DE BIOQUIMICA DE CHILE
VIII REUNION ANUAL**

Cartagena, Chile

6 – 8 agosto de 1984

RESUMENES

Conferencia

Simposio Internacional

**BASES ESTRUCTURALES Y CINETICAS
DE LA REGULACION ENZIMATICA**

(Organizador: Dr. Hermann Niemeier)

Comunicaciones

**SOCIETY OF BIOCHEMISTRY OF CHILE
VIII ANNUAL MEETING**

Cartagena, Chile

August 6 – 8, 1984

ABSTRACTS

Lecture

International Symposium

STRUCTURAL AND KINETIC BASIS OF ENZYME REGULATION

(Convenor: Dr. Hermann Niemeier)

Communications

Conferencia

UTILIZACION DE ENZIMAS COOPERATIVAS DE MEMBRANAS COMO HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DE ESTRUCTURA Y FUNCION DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS. (Membrane cooperative enzymes as a tool for the investigation of membrane structure and related phenomena).

Farías, R.N. Instituto Superior de Investigaciones Biológicas, Departamento Bioquímica de la Nutrición (CONICET-UNT), Chacabuco 461. San Miguel de Tucumán, 4000, Tucumán, Argentina.

Increasing and conclusive evidence has been gathered showing that cooperative transitions of the activity of a given enzyme could be correlated to changes in the "conformation" or "state" of the protein involved. The determination of this kinetic parameter in membrane-associated enzymes might give some clues as to how these enzymes are regulated by the membrane. This information may also indicate whether some changes in membrane structure take

place under special conditions. Modulation of the allosteric transitions of membrane-bound enzymes through changes in bacterial or mammalian membrane lipid composition has been reviewed (Farías *et al*, 1975). The potential methodological importance of the measurements of cooperative transitions of membrane-bound enzymes as a natural probe of membrane conformation was suggested. In this context, it appears that the regulation of membrane-bound cooperative enzymes would serve as a useful tool for studying the physiological events that may lead to changes in membrane systems (Farías, 1980). In this work we offer biochemical evidence regarding a new molecular approach to the action of several hormones *in vitro* and *in vivo* on the membrane fluidity through studies on membrane enzymes.

REFERENCES

- FARIAS, R.N., BLOJ, B., MORERO, R.D., SIÑERIZ, F. and TRUCCO, R.E., (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 415, 231-251.
 FARIAS, R.N., (1980). *Adv. Lipid. Res.* 17, 251-282.

Simposio Internacional

COOPERATIVE INTERACTIONS IN HEXOKINASE D ("GLUCOKINASE"): KINETIC AND FLUORESCENCE STUDIES.

(Interacciones cooperativas en la hexoquinasa D ("glucoquinasa"): estudios cinéticos y de fluorescencia).

María Luz Cárdenas, Eliana Rabajille, Ian P. Trayer and Hermann Niemyer. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile, and Department of Biochemistry, University of Birmingham, P.O. Box 363, Birmingham B15 2TT, England.

The hexokinases are a group of isoenzymes catalysing the phosphorylation of glucose by ATP. One of them, hexokinase D,

commonly known as glucokinase, has a crucial role in glucose homeostasis and may be the sensor relating ambient glucose to insulin secretion. It occurs only in hepatocytes, where it is the predominant isoenzyme, and in pancreatic islets. Liver and pancreatic hexokinase D have positive cooperativity with respect to glucose, a characteristic that supports the presumed physiological role of the enzyme.

The molecular interpretation of the cooperativity poses some problems, as hexokinase D is a monomeric protein with only one active site to which classical equilibrium models of cooperativity cannot be applied. In an attempt to understand the kinetic cooperativity of hexokinase D at a molecular level, we have studied the effect

of different assay conditions on the cooperativity and the kinetic behaviour with different sugar substrates.

Hexokinases D displays positive cooperativity with mannose with the same n_H values (1.5-1.6) as with glucose, but higher $K_{0.5}$ values (8 mM at pH 8.0 and 12 mM at pH 7.5) In contrast, fructose and 2-deoxyglucose exhibit Michaelian kinetics. Although previously there was general agreement that hexokinase D (glucokinase) shows a very low activity with fructose by comparison with the other animal hexokinases, we have found that fructose is relatively no better as a substrate for the other mammalian hexokinases than it is for hexokinase D. Fructose, mannose, 2-deoxyglucose and N-acetylglucosamine acted as competitive inhibitors of glucose phosphorylation and decreased the cooperativity with respect to glucose, fructose being the most efficient. Galactose, which is neither a substrate nor an inhibitor, was unable to decrease the cooperativity, thus ruling out an unspecific effect of the other sugars, such as an increase of viscosity. These and other results are discussed on the basis of a slow-transition model, which assumes that hexokinase D exists mainly in one conformational state (E_I) in the absence of ligand and that the binding of glucose induces a conformational transition to E_{II} . This new conformation would have a higher affinity for the sugar substrates and a higher catalytic activity than E_{II} . Cooperativity would result from shifts of the steady-state distribution between the two enzyme forms as the sugar concentration increases. The inhibitors would suppress the cooperativity with respect to glucose by inducing or trapping the E_{II} conformation. The different kinetic behaviour of hexokinase D with the different sugar substrates would be the consequence of differences in the velocities of the conformational transitions induced by the sugar substrates. Glycerol, which at concentrations over 20% suppresses the cooperativity with a decrease in maximal velocity and $K_{0.5}$, would stabilize the E_{II} form or an equivalent.

The binding of glucose to the enzyme

increases the native fluorescence of hexokinase D by about 15%. The corresponding equilibrium binding curve is hyperbolic, supporting the kinetic origin of the cooperativity with respect to glucose. Glycerol also enhances the native fluorescence of hexokinase D, in agreement with the hypothesis that glycerol modulates the equilibrium between E_I and E_{II} . Fluorescence studies at different temperatures supports the existence of different conformations of the apoenzyme.

SOLVENT ISOTOPE EFFECTS ON THE HEXOKINASE IV REACTION: EVIDENCE FOR THE MNEMONICAL INTERPRETATION OF THE KINETIC CO-OPERATIVITY.

(Efectos del solvente isotópico en la reacción de la hexoquinasa IV; pruebas para la interpretación mnemónica de la cooperatividad cinética).

Athel Cornish-Bowden and Denise Pollard-Knight, Department of Biochemistry, University of Birmingham, P.O. Box 363, Birmingham B15 2TT, England.

Several groups of workers have found that hexokinase IV ("glucokinase") displays positive kinetic co-operativity with respect to one substrate, glucose, at high concentrations of the other, MgATP. It now seems clear that the co-operativity is a consequence of the existence of multiple conformational states of the free enzyme that are not at equilibrium under steady-state conditions. Any perturbation of the relative stabilities of these conformational states might be expected to perturb the co-operativity, and for this reason we have examined the effect of replacing the solvents 1H_2O by 2H_2O .

In pure 2H_2O the positivity co-operativity with respect to glucose disappears, and indeed is converted into negative co-operativity. The reaction is about 30% slower in 2H_2O than 1H_2O at high concentrations of both substrates, typical of the behaviour of other systems but there is a substantial inverse isotope effect at low glucose but

high MgATP concentrations, i.e. the reaction is about 3.5 times faster in $^2\text{H}_2\text{O}$ than in $^1\text{H}_2\text{O}$ under these conditions. In contrast to the behaviour with respect to glucose, the enzyme obeys Michaelis-Menten kinetics with respect to MgATP in both solvents.

An inverse isotope effect as large as 3.5 is unusual, and in the case of hexokinase IV it was entirely unexpected. Nonetheless, it can be rationalized in terms of the mnemonical mechanism proposed previously as an explanation of the kinetic co-operativity in $^1\text{H}_2\text{O}$. One way of describing this cooperativity is to say that the reaction is slower at low glucose concentrations than one would expect from the rate at high concentrations: the mnemonical explanation of this is that the highly reactive form of free enzyme released at the end of the catalytic cycle can only manifest its high reactivity if it encounters a glucose molecule and converts it into products before it has time to relax to the more stable form; this is likely to happen only at high concentrations of both substrates. If the equilibrium is perturbed, however, so that the enzyme form released at the end of the catalytic cycle ceases to be the less stable, no such effect will be possible and the unexpectedly slow reaction at low glucose concentrations will not be seen. One can gain additional information about the nature of an isotope effect by making a "proton inventory", i.e. by studying the kinetics in mixtures of $^1\text{H}_2\text{O}$ and $^2\text{H}_2\text{O}$. In the case of hexokinase IV the dependence of rate on the mole fraction of $^2\text{H}_2\text{O}$ is markedly non-linear, so that although the rate for 0.25 mM glucose and 4.3 mM MgATP is 2.4 times faster in $^2\text{H}_2\text{O}$ than in $^1\text{H}_2\text{O}$, it is only 1.2 times faster in an equimolar mixture of the two. This marked curvature eliminates certain simple explanations of the isotope effect, but it does not, unfortunately, discriminate between some more realistic possibilities that are more obviously of relevance to the hexokinase IV reaction. In particular, the results would be consistent not only with stabilizing of one form of free enzyme, as suggested above, but also with an increase in $^2\text{H}_2\text{O}$ of the rate constant for binding of glucose to the other form in $^2\text{H}_2\text{O}$.

CHEMICAL MODIFICATION AND STRUCTURE OF THE ACTIVE SITE OF PYRUVATE KINASE.

(Modificación química y estructura del sitio activo de la piruvato-quinasa).

Jaime Eyzaguirre. Laboratorio de Bioquímica. Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

Important advances have been made in recent years in the elucidation of the structure of pyruvate kinase. Muirhead and co-workers (1) using X-ray diffraction, have established the three-dimensional structure of the cat muscle enzyme at 2.6 Å resolution. The primary structure is known for yeast (2) and chicken muscle (3) pyruvate kinases; the first has been established by sequencing the enzyme gene, while the second by sequencing the cDNA corresponding to its mRNA. An important aspect in the study of the mechanism and function of pyruvate kinase is to establish the location of the active site of the enzyme and the amino acid residues participating in substrate binding and catalytic activity. Johnson *et al.* (4) have specifically labeled the bovine muscle enzyme with trinitrobenzene-sulfonic acid and have sequenced a TNP-peptide.

Work performed in our laboratory with the rabbit muscle enzyme has shown the participation of an arginine residue in the binding of phosphoenolpyruvate by chemical modification with butanedione (5). More recently, dialdehyde-ADP (oADP) has been used as an affinity label of the enzyme (6).

oADP irreversibly inactivates pyruvate kinase. The inactivation reaction is first-order with respect to oADP and follows saturation kinetics, indicating that the enzyme first forms a reversible complex with the inactivator. ADP and ATP, especially in the presence of Mg^{+2} , protect very strongly against inactivation, while PEP and pyruvate are less effective. oADP is not a substrate of pyruvate kinase but behaves as a competitive inhibitor. Using ^{14}C -oADP, it was shown that the enzyme binds 6-7 oADP molecules per subunit, indicating

that a considerable amount of non-specific binding occurs.

If the enzyme is pre-incubated with cold oADP in the presence of high concentration of ATP, dialyzed and incubated with ^{14}C -oADP, the enzyme is inactivated and only one oADP molecule incorporates per sub-unit. After reduction and carboxymethylation, the modified enzyme was treated with trypsin, and the digest was subjected to gel filtration. The purified labeled peptide was sequenced, and a sequence identical to the first 26 residues of the peptide isolated by Johnson *et al.* (4) was obtained.

An identical sequence can also be found in the chicken muscle enzyme, and a region of high homology is also present in the yeast enzyme. The fact that this region is highly conserved from low eukaryotes to mammals is an additional indication that it is located in a site essential for catalysis.

REFERENCES

1. LEVINE, J., MUIRHEAD, H., STAMMERS, D.K. and STUART, D.I. (1978). *Nature* 271, 626-630.
2. BURKE, R.L., TEKAMP-OLSON, P. and NAJARIAN, R. (1983). *J. Biol. Chem.* 258, 2193-2201.
3. LONBERG, N. and GILBERT, W. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 3661-3665.
4. JOHNSON, S.C., BAILEY, T., BECKER, R.R. and CARDENAS, J.M. (1979). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 90, 525-530.
5. CARDEMIL, E. and EYZAGUIRRE, J. (1979). *Arch. Biochem. Biophys.* 192, 533-538.
6. HINRICHS, M.V. and EYZAGUIRRE, J. (1982). *Biochim Biophys. Acta* 704, 177-185.

ALLOSTERIC REGULATION AND AGGREGATION STATES OF *E. COLI* PHOSPHOFRUCTOKINASES.

(Regulación alostérica y estados de agregación en fosfofructoquinasas de *E. coli*).

Victoria Guixé¹ and Jorge Babul². ¹ Departamento de Biología y ² Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile.

Enzyme catalyzed reactions are regulated by modulation of key reactions that control metabolic fluxes. One of the main modes of regulation is the control of the activity of a given amount of enzyme through several types of mechanisms.

Between these are the conformational changes that alter the interactions between polypeptide chains, that change the enzyme aggregation state, or both. These changes are the result of binding of small molecules such as substrates or effectors, and have been shown to be of special importance in the regulation of enzymes composed of several polypeptide chains. At a physiological level it is likely that the picture is more complex and combinations of regulatory mechanisms such as conformational changes and polymerization-depolymerization reactions would take place.

Because of the structural complexity of regulatory enzymes, knowledge of the relationship between their structure and function is far from complete. Such is the case with phosphofructokinase, an enzyme considered crucial for the regulation of glycolysis since it catalyzes the first unique step of the pathway and, as expected, is regulated by several effectors (1). The enzyme from several sources has been characterized and show a variety of regulatory properties. The wild type strain of *E. coli* contains two phosphofructokinases (Pfk). Pfk-1, the main isozyme, is an allosteric enzyme which shows cooperativity with respect to fructose-6-P, while the minor isozyme, Pfk-2, presents hyperbolic kinetics (2). Strains with the *pfkB1* mutation contain increased levels of Pfk-2 and strains with a closely linked mutation, *pfkB10*, generate a more labile enzyme, Pfk-2*. Double mutants, *pfkB1 pfkB10*, present high levels of the variant enzyme. The *in vivo* function of Pfk-2 is not known. However, the presence of high levels of this isozyme in strains lacking Pfk-1 restores growth on sugars and does not cause growth abnormalities. On the other hand, strains with high levels of Pfk-2* are markedly impaired in their growth on glycerol and other gluconeogenic carbon sources (3). Characterization of Pfk-2 and Pfk-2* shows that they have different kinetic features. Both enzymes present an ordered sequential mechanism with a different order of addition of substrates and release of products (4). Furthermore, the enzymes behave differently towards ATP,

an inhibitor of the majority of the phosphofructokinases studied and considered of importance for its regulation. At subsaturating fructose-6-P concentrations, MgATP only inhibits Pfk-2. This effect diminishes upon increasing the fructose-6-P concentration, decreasing the pH of the reaction mixture or using other nucleotides instead of ATP. Free ATP inhibits Pfk-2 and Pfk-2* and acts as a competitive inhibitor with respect to the substrate MgATP in both cases.

Zonal sedimentation experiments in sucrose density gradients of Pfk-2 solutions show that the enzyme can be present as a dimer or a tetramer depending on relative concentrations of MgATP, free ATP and fructose-6-P. In conditions under which Pfk-2 is inhibited, low fructose-6-P and high MgATP concentrations, the enzyme is present as a tetramer. As the fructose-6-P concentration is raised, the inhibitory effect of MgATP is abolished and the enzyme is converted to a dimer. However, at inhibitory concentrations of free ATP the enzyme is a dimer. On the other hand, Pfk-2* is a dimer in all conditions studied. These results suggest the presence of a regulatory site for MgATP in Pfk-2 which is affected in Pfk-2* as a consequence of the *pfkB10* mutation. Furthermore they suggest that the MgATP inhibition of Pfk-2 is related to the prevalence of a tetrameric aggregation state. Possibly, Pfk-2* is not able to polymerize into a tetramer because of the alteration in its regulatory site for MgATP. (Financiado por Universidad de Chile, Proyecto B-1368 y B-1998; Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Proyecto 0255; PNUD-UNESCO CHI 81/001 y O.E.A.).

REFERENCIAS

1. BLOXHAM, D.P. and LARDY, H.A. (1973). In *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.), 3rd ed., Vol. 8, pp. 239-278, Academic Press, New York.
2. BABUL, J. (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 4350-4355.
3. DALDAL, F., BABUL, J., GUIXE, V., and FRAENKEL, D. G. (1982). *Eur. J. Biochem.* 126, 373-379.
4. CAMPOS, G., GUIXE, V. and BABUL, J. (1984). *J. Biol. Chem.* 259, 6147-6152.

THE SYSTEMIC THEORY OF CONTROL. (La teoría sistémica del control).

Henrik Kacser. Department of Genetics, University of Edinburgh, Edinburgh EH9 3JN, Great Britain.

The interdependence of all reaction steps within a cell or organism has the consequence that the rate of one enzyme catalyzed reaction is affected by its neighbours and through these by all the enzymes in the system. It is therefore in principle impossible to make assertions about the control which one step exercises, even if the complete algebraic formulation for that step is available. Even the fullest information on all steps (hardly possible in practice) would only result in a very large set of simultaneous non-linear equations to which there is no analytical solution.

The theory avoids this problem by considering the responses of each rate to perturbations of the molecular concentrations while it is embedded in the whole system. It defines Elasticity Coefficients for each rate

$$e = \frac{v_i}{M_j} \frac{\partial \ln v_i}{\partial \ln M_j}$$

There are as many elasticity coefficients for rate v_i as there are participating molecules, M_j . When these rates are coupled to each other into a system, the combination of the elasticity coefficients generate systemic responses, the Control Coefficients,

$$\text{e.g. } C_{E_j}^{F_i} = \frac{\partial \ln F_i}{\partial \ln E_j}$$

Such dimensionless numbers give a quantitative measure of how a system flux, F_i , is controlled by an enzyme E_j . The relative values of control coefficients give the distribution of control in the system. This distribution is constrained by the flux summation property,

$$\sum_{j=1}^n C_{E_j}^{F_i} = 1.$$

Experimental methods, using modulation methodologies, are available to determine both elasticity and control coefficients.

CHAOTIC RESPONSE OF A GLYCOLYTIC MODEL SYSTEM. (Respuesta caótica de un sistema glicolítico modelo).

Mario Markus and Benno Hess. Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie, Rheinlanddamm 201, 4600 Dortmund 1, FRG.

A glycolytic model containing detailed rate laws for the enzymes phosphofructokinase and pyruvate kinase reveals a rich variety of time patterns when the substrate input flux is changed periodically [1,2]. These patterns may be periodic, quasiperiodic or chaotic. Upon slow variation of the external flux parameters (amplitude and frequency), we found conditions at which the response of the system is described by several hysteresis loops nested into each other. Under such conditions, the system acts as a complex memory device, where several time patterns – we found up to four of them – may occur under the same values of the external parameters and may be switched from one to another by short substrate pulses.

The model system is described by two time dependent phase variables x_1 and x_2 . x_1 and x_2 may be two metabolite concentrations, for example. A three-dimensional plot with the coordinates x_1 , x_2 and t yields trajectories screwing their way into infinity in the t -direction. A plot with the coordinates x_1 , $x_2 \cos \omega_e t$ and $x_2 \sin \omega_e t$, where ω_e is the external frequency, yields a finite graphic display. In this representation, periodic solutions appear as closed curves, while chaotic solutions randomly fill up a well defined attractor. A cut through this attractor with a plane defined by $t = (\varphi + 2\pi n)/\omega_e$, for a given phase φ and $n = 1, 2, 3, \dots$, yields a stroboscopic portrait of the solution. Upon variation of φ , the stroboscopic portrait of a chaotic solution displays a transformation consisting of stretching, folding and pressing of the attracting region.

Chaos obeying the stretch-fold-press transformation, as well as a variety of periodic time patterns, were recently verified experimentally in the theoretically predicted range of external parameters by measurements of NADH fluorescence in extracts of ba-

ker's yeast (M. Markus, D. Kuschmitz and B. Hess, in preparation).

The significance of these results in the understanding of biological time patterns will be discussed.

REFERENCES

- [1] Hess, B. and Markus, M. (1984) *in Synergetics – from Microscopic, to Microscopic Order* (Frehland, E., ed.) pp.6-16, Springer-Verlag, Berlin.
 [2] Markus, M. and Hess, B. (1984) *Proc., Nat. Acad. Sci. USA.*, in the press.

ROLE OF THE DIANIONIC FORM OF THE NUCLEOTIDE 5' LAST PHOSPHATE IN CATALYSIS, REGULATION, AND POLYMERIZATION PROCESSES. (Rol de la forma dianiónica del fosfato terminal 5' del nucleótido en procesos de catálisis, regulación y polimerización).

Octavio Monasterio and Serge N. Timasheff. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile and Graduate Department of Biochemistry, Brandeis University.

Regulation of the metabolic processes by nucleotides has been extensively studied. Thus, the involvement of cyclic nucleotides (cAMP) in cascade mechanisms of regulation, covalent modification (phosphorylation, adenylation) and allosteric effectors (ATP, GTP, CTP, AMP, etc.), are usually reported in the literature. However, the role of the different parts of the nucleotide molecule in these processes is poorly understood. Two experimental approaches have been introduced in order to know about the active conformation of the nucleotides that interacts with the binding site of a protein: nuclear magnetic resonance spectroscopy and the use of stable metal complexes of some nucleoside triphosphates (ATP and GTP). These two approaches have been useful to determine the location of the metal in the active complexes of the enzymes and the mechanisms of the substitution reactions on phosphorus (1,2). However, these types of studies have not directly allowed to study the role of the negative charges of the nucleotide on its mechanism of action. In

order to know the role of the negative charges of the last phosphate of the nucleotide, the hydroxyl group has been substituted by a fluorine atom. Since the fluorine atom is smaller than the hydroxyl group (Van der Waals radii 1.35 Å and 2.20 Å respectively) the binding of the substituted nucleotide should not be hindered sterically: differences in behavior could be rather due to the higher electronegativity of the fluorine atom. A consequence of this is the lower affinity constant of the fluorinated analog for divalent cations (GTP-Mn $K_{as} = 151,000$; GTP F-Mn $K_{as} = 6,100$). 5'-fluorophosphate analogs of nucleotides seem to mimic nucleotides with one hydrogen on the phosphate chain. These fluorophosphate derivatives have been used to study the nucleotide mechanism of action in hexokinases, myosin (ATP γ F), glycogen phosphorylase b (AMP α F) and elongation factor G (GTP γ F). These analogs act as competitive non-hydrolyzable inhibitors.

Tubulin polymerization and other reversible associations of macromolecules are regulated by GTP (3,4). In order to study whether tubulin polymerization requires the dianionic form of GTP, we studied the effect of GTP γ F on the polymerization process. GTP γ F was a competitive inhibitor of the GTPase activity of tubulin-colchicine complex and it stopped the polymerization process during the course of reaction and no depolymerization occurred. This indicates that GTP γ F has access only to the nucleotide exchangeable site of the free tubulin dimer. Tubulin has one mole of magnesium tightly bound per mole of dimer. In order to know whether the inhibitory effect of GTP γ F was due to the release of the metal, we replaced magnesium per manganese (a paramagnetic ion) and we followed the paramagnetic effect of manganese on the fluorine NMR signal from the GTP γ F-tubulin-metal complex. In this way we determined the location of the metal site respect to the nucleotide site. Longitudinal and transversal relaxation times measurements of the ^{19}F -NMR signal allowed us to determine that the distance of the manganese site to the fluorine atom was between 5 to 8 Å. From these studies

we concluded that the presence of the dianionic form of the last phosphate of the metal-GTP complex is essential to stimulate the polymerization of tubulin. Furthermore, these findings and the cases mentioned above suggest a general requirement of the dianionic form of the last phosphate in the 5'-phosphates chain for the mechanism of action of nucleotides in catalysis, regulation and polymerization of proteins. (Supported by NIH Grants Nos. GM 14603 and CA 16707).

REFERENCES

1. MILDVAN, A.S., COHN, M. (1978). *Meth. Enzymol.* 49G, 322-359.
2. CORNELIUS, R.D., HART, P.A., CLELAND, W.W. (1977). *Inorg. Chem.*, 16, 2799-2805.
3. TIMASHEFF, S.N., GRISHAM, L.M. (1980). *Ann. Rev. Biochem.* 49, 565-591.
4. ALLENDE, J.E. (1982). *Arch. Biol. Med. Exp.*, 15, 347-355.

CONCURRENCE OF MULTIPLE MECHANISMS IN THE REGULATION OF ENZYME ACTIVITY. (Concurrencia de mecanismos múltiples en la regulación de la actividad enzimática).

Hermann Niemeyer, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile.

Since the initial discovery in the middle fifties of the principal mechanisms for enzyme regulation the capacity of some enzymes to integrate a great amount of metabolic information has been recognized. In reality the modulation of enzyme activity involves a complex network of interactions operating in opposite or complementary manner.

A primary mechanism of modification of enzyme activity is the *concentration of substrates and cofactors* of the catalyzed reaction. In most enzymes of putative significance for the regulation of a metabolic pathway, commonly called "regulatory enzymes", the dependence of activity upon substrate concentration departs from the classic hyperbolic Michaelis-Menten function and cooperativity (positive or negative) is apparent. The saturation function with substrate for several of these enzymes is represented to a good approximation by

the equation $v = V \frac{S^h}{K_{0.5}^h + S^h}$

although some of them display more complicated kinetics. $K_{0.5}$ is the concentration for half-maximal velocity (V), and h is the Hill coefficient, used operationally to express the degree of cooperativity. Such regulatory enzymes are often oligomeric proteins with several interacting sites. In addition to the catalytic sites, they are provided with regulatory or *allosteric* sites that specifically bind metabolites that modulate enzyme activity. Occasionally the allosteric effector is a substrate or product of the reaction. Allosteric sites are generally located in the same subunit responsible for the catalysis, although in a few cases there are special regulatory subunits. The action of regulatory effectors (activators, inhibitors) results generally in changes of the enzyme affinities for the substrate(s) through modifications in $K_{0.5}$ and h . Of greatest interest is the pattern of delicate interplay of substrates and modifiers, in such a way that algebraic addition, synergism or antagonism of effects may be observed in kinetic and/or binding experiments. For example, allosteric inhibitors act as competitive inhibitors inasmuch as their effects are counteracted by increasing substrate concentrations. Although they do not compete for the same site, they are mutually exclusive. Activators and inhibitors operate similarly to determine a particular level of activity at a given ratio of ligand concentrations. It is accepted that the interaction of the enzyme with a ligand influences the interaction with other ligand and that this is accomplished through conformational changes of the enzyme protein.

In addition, the response of enzyme activity to a particular set of ligand concentrations depends in many cases on the *covalent modification* of the enzyme through the action of converter enzymes that are themselves receptors of regulatory signals. The converter enzymes can amplify these signals by acting in cascade upon the substrate enzymes, which may be other converter enzymes. The modified enzyme and the original form differ in their affinities for substrates, cofactors and allos-

teric effectors. Conversely, the extent and rate of enzyme modification, i.e., the susceptibility to covalent modification, is often a function of the relative concentrations of the several ligands. In general, covalent modification and allosteric effectors act complementarily in the sense of obtaining either an augmented or a decreased activity at non-saturating concentrations of the substrate(s).

In multicellular organisms the steady state of the original and modified forms of interconverted enzymes through phosphorylation-dephosphorylation is a function of hormonal equilibria and nervous command, and thus the integrative *endocrine and nervous systems* participate in the regulation of metabolism. Typically, glucagon and catecholamines promote phosphorylation by means of adenylate cyclase or Ca^{2+} -dependent mechanisms, and insulin antagonizes their actions.

The concurrence of diverse mechanisms of regulation on a single enzyme, with complex and coherent interactions, leads to a flexible and effective regulation of the enzyme activity. A given set of conditions favours the activation and other set the inhibition and the possibility is given to establish different intermediate states of activity smoothly and continuously, which may be representative responses of the cell to its environment.

Another mechanism operating upon enzymes and to which a role in the control of metabolic fluxes is often assigned refers to changes in the *concentration of the enzyme protein*. It is well documented that several enzymes decay under given circumstances (repression, deinduction) and increase (induction) under others. The mechanisms of these changes are rather well understood in bacteria, especially when related to the control of the modification of rates of synthesis of enzymes. Less is known in relation to protein degradation. In eucaryotes the subject appears more complicated and the progress is slow. It has been shown that changes in concentration of some enzymes are related to modifications in the rate of synthesis, which correlates with levels of specific mRNA, but the mechanism of such control is not well

understood. The levels of other enzymes appear to result from major changes in their rates of degradation. Finally, enzyme levels are not infrequently, the result of the interplay of changes in the rate of synthesis and degradation. Whichever the mechanism may be, it appears that enzymes whose levels are drastically modified after manipulations of the diet or the endocrine system are the same enzymes that are the subject of a plurality of mechanisms to control their activities. One is tempted to speculate that enzymes that are modified in their conformation through non covalent or covalent interactions may serve as regulatory signals for their synthesis and/or degradation. The changes in the amount of enzymes are rather slow as compared to regulation of activities and therefore probably not an efficient mode of control of the flux of a given metabolic pathway. However, they may represent a mechanism for a better distribution of the cell material in order to avoid the maintenance of unused enzymes, on one hand, and to permit an increase of enzymes actively used, on the other.

The superimposition upon the regulatory enzymes of multiple mechanisms makes it difficult to analyze each action separately and to understand its exact contribution to the modulation of the enzyme activity. Even more difficult appears the evaluation of the participation of such multi-modulated enzymes on the regulation of a metabolic pathway within the cell. At present, several attempts are made from theoretical and experimental approaches to have a better insight on this problem. The application of non invasive methodologies perhaps gives some insight into some of the problems. On the other hand, theoretical treatments of the metabolic network may put some order on our views of it, and may suggest new experimental approaches to test the models that will appear. Many of these aspects of metabolic regulation are treated in depth during the Symposium and some of the main contributions will be discussed.

(Supported by Departamento de Investigación y Bibliotecas, Universidad de Chile,

Fondo Nacional de Ciencias and by the Organization of American States).

COOPERATIVE BEHAVIOUR IN MONOMERIC ENZYMES. CHANGE OF NEGATIVE TO POSITIVE COOPERATIVITY BY EFFECT OF A LIGAND. (Comportamiento cooperativo en enzimas monoméricas. Cambio de cooperatividad negativa a positiva por efecto de un ligando).

Jose Manuel Olavarria. Instituto de Investigaciones Bioquímicas. Fundación Campomar, Buenos Aires, Argentina.

Glucokinase is a monomeric enzyme that displays atypical kinetics, characterized by: *a*) kinetic cooperativity with some glucosidic substrates, *b*) a hyperbolic saturation function with MgATP that modulates cooperativity for glucose, and *c*) at the lowest concentration of MgATP it seems that the positive cooperative becomes negative.

In a previous paper Olavarria *et al.* (1) proposed a model (I) that reproduces characteristics *a* and *b* but never *c*. Some other models of increasing complexity were studied. The second model discarded (II) was that of Meunier *et al.* (2). These authors indicate that with this model the second substrate has no effect on the extent of cooperativity of the first. However when observations were only performed at substrate concentrations around $K_{0.5}$ it is possible to observe a reduction on n_H correlative to the reduction of the second substrate, but values lower than 1 were never obtained. The next model studied (III) was similar to model I but it is considered that only the higher affinity enzyme conformer is catalytically active. Under this conditions the value of the velocity of conformational equilibrium between both enzyme substrate species (α) can change the cooperative behaviour, from negative to positive. If the second substrate modifies α it is possible to reproduce the *a*, *b* and *c* characteristics of glucokinase.

An additional conclusion resulting from this work is that theoretical results must be specially focused to experimentally attainable conditions.

REFERENCES

1. OLAVARRIA, J.M., CARDENAS, M.L., NIEMEYER, H. (1982). *Arch. Biol. Med. Exp.* 15, 365-369.
2. MEUNIER, J.C., BUC, J., NAVARRO, A., RICARD, J. (1974). *Eur. J. Biochem.* 49, 209-223.

METABOLIC CONTROL OF GLUTAMINE SYNTHETASE IN *E. COLI*. (Control metabólico de la glutamina-sintetasa en *E. coli*).

Sue Goo Rhee, P. Boon Chock and Earl R. Stadtman. Laboratory of Biochemistry, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20205, U.S.A.

Glutamine synthetase which links the assimilation of NH₃ with biosynthetic pathways leading to the formation of protein, nucleic acids, complex polysaccharides and various coenzymes is a strategic target for rigorous cellular control in enteric bacteria (1). The control mechanism utilizes several different basic principles of cellular regulation including: (i) cumulative feedback inhibition by multiple end products of glutamine metabolism (1); (ii) divalent cation mediated conformational changes in glutamine synthetase (1); (iii) repression and derepression of glutamine synthetase synthesis in response to availability of ammonium nitrogen (2); and (iv) metabolic interconversion of glutamine synthetase between covalently modified (inactive) and unmodified (active) forms. Together these diverse mechanisms provide the flexibility needed for effective regulation of the enzyme.

The metabolic interconversion of glutamine synthetase involves two nucleotidylation cycles (3), namely, the uridylylation-deuridylylation cycle of a regulatory protein, P_{II}; and the adenylylation-deadenylylation cycle of glutamine synthetase; the first cycle is catalyzed by uridylyltransferase-uridylyl-removing enzyme and the latter cycle by adenylyltransferase. Our studies have revealed that the interconversion between adenylylated and unadenylylated forms of glutamine synthetase is a dynamic process and that for any given metabolic condition, a steady state is

established for the state of adenylylation of glutamine synthetase. Since the fluctuations in the concentrations of metabolites are sensed by means of multisite interactions of the bicyclic cascade enzymes with these allosteric effectors, any change in the allosteric effectors concentration will lead automatically to changes in the relative activities of the converter enzymes, thereby the state of adenylylation of glutamine synthetase is adjusted accordingly. With this regulatory mechanism, the state of adenylylation of glutamine synthetase can be varied smoothly and continuously over a wide range in response to metabolic demand. Theoretical analysis revealed (3) that, in addition to their capacity to integrate a vast amount of metabolic information, cyclic cascades can serve as signal amplifiers, and they can elicit a cooperative type of response to increasing effector concentrations. These predictions have been confirmed in *in vitro* experiments by using purified components of the glutamine synthetase cascade (4) as well as in *in vivo* experiments by using permeabilized *E. coli* cells (5).

Interestingly, the converter enzymes in both nucleotidylation cycles are single polypeptides catalyzing two opposing reactions (6, 7). Detailed mechanistic studies on the adenylyltransferase (4) show that modulation of this enzymic activity involves a complex network of synergistic or antagonistic interactions between ligands and that the extent of modulation by a given effector is dependent upon the presence of other ligands. In addition, the data reveal the advantage of associating two opposing enzymic activities in one polypeptide. It enhances the sensitivity in response to the changes in the concentration of a given effector which can bind to a single site on the bifunctional enzyme causing an opposite effect on the two enzymic activities. This type of advantage is particularly useful in cyclic cascade systems because the net effect of activating the covalent modification step and inactivating the demodification reaction is to further increase the fractional modification of the interconvertible enzyme and vice versa.

REFERENCES

1. STADTMAN, E.R. and GINSBURG, A. (1974). In *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.), 3rd ed., pp. 755-807, Academic Press, New York.
2. MAGASANIK, B. (1982). *Ann. Rev. Genet.* 16, 135-168.
3. CHOCK, P.B., RHEE, S.G., and STADTMAN, E.R. (1980). *Ann. Rev. Biochem.* 49, 813-843.
4. RHEE, S.G., PARK, R., CHOCK, P.B. and STADTMAN, E.R. (1978). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 3138-3142.
5. MURA, U., CHOCK, P.B. and STADTMAN, E.R. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 13022-13029.
6. CABAN, C.E. and GINSBURG, A. (1976). *Biochemistry* 15, 1569-1580.7.
7. GARCIA, E. and RHEE, S.G. (1983), *J. Biol. Chem.* 258, 2246-2253.

EFFECTS OF 2,5-ANHYDROMANNITOL IN RAT HEPATOCYTES. (Efectos del 2,5-anhidromanitol en hepatocitos de rata).

Patricio T. Riquelme, Nancy M. Kneer, Mary Ellen Wernette-Hammond, and Henry A. Lardy. Institute for Enzyme Research, Madison, WI 53705, U.S.A.

2,5-Anhydro-D-mannitol (2,5-AM-ol) is an analog of the β -furanose form of D-fructose that lacks the C-2 hydroxyl and is thus locked in the furan ring structure. In hepatocytes isolated from fasted normal or diabetic rats, 2,5-AM-ol inhibits gluconeogenesis from substrates that enter the gluconeogenic pathway prior to fructose-1,6-bisphosphatase. 2,5-AM-ol prevents hormonal stimulation of gluconeogenesis and the corresponding decrease in lactate production from dihydroxyacetone. Metabolite crossover analyses suggest that the effect of 2,5-AM-ol is to activate pyruvate kinase and also to stimulate phosphofructokinase-1 and/or to inhibit fructose-1,6-bisphosphatase but cellular fructose-2,6-P₂ content is decreased. To define more clearly the mechanism of action of 2,5-AM-ol on gluconeogenesis, the accumulation of its phosphorylated metabolites, 2,5-AM-ol-1-P and 2,5-AM-ol-1,6-P₂ was measured in hepatocytes metabolizing the fructose analog, and the effects of the 2,5-AM-ol phosphates on rat liver phosphofructokinase-1, fructose 1,6-bisphosphatase, and pyruvate kinase were examined *in vitro*. Under near physiological conditions, 2,5-AM-ol-1-P is not as good a substrate as fructose-6-P for purified rat liver phosphofructokinase-1.

2,5-AM-ol-1,6-P₂ is a poor substitute for fructose-2,6-P₂ as an activator of the enzyme, and at high concentrations, comparable to those that accumulate in isolated hepatocytes, it can act as a product inhibitor. Rat liver fructose 1,6-bisphosphatase is inhibited competitively by 2,5-AM-ol-1,6-P₂ vs. fructose-1,6-P₂, but the AMP inhibition of fructose 1,6-bisphosphatase is not potentiated by 2,5-AM-ol-1,6-P₂. Pyruvate kinase activity is stimulated by micromolar concentrations of 2,5-AM-ol-1,6-P₂ in a manner similar to that of fructose-1,6-P₂. Prior treatment of hepatocytes with 2,5-AM-ol does not alter the glucagon induced decreases in the affinity of pyruvate kinase for P-enolpyruvate and for fructose-1,6-P₂.

These data indicate that the effects of 2,5-AM-ol on gluconeogenesis result from an accumulation of 2,5-AM-ol-1,6-P₂ which can account for an inhibition of fructose 1,6-bisphosphatase and an activation of pyruvate kinase and, further, that this accumulation could overcome the inhibition of pyruvate kinase by phosphorylation.

2,5-AM-ol decreases lactate formation and tritiated water formation from [5-³H]-glucose in hepatocytes metabolizing glucose, indications that flux through phosphofructokinase is decreased. The inhibition by 2,5-AM-ol of glycolysis in isolated rat hepatocytes is probably caused by inhibition of phosphofructokinase-1 via a decrease of fructose-2,6-P₂, product inhibition by 2,5-AM-ol-1,6-P₂, or a combination of both.

CHEMICAL MODIFICATION OF THE ALLOSTERIC SITES OF FRUCTOSE 1,6-BISPHOSPHATASE. (Modificación química de sitios alostéricos de la fructosa 1,6-bisfosfatasa).

Juan C. Slebe, Alejandro Reyes and Elizabeth Hubert E. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

The identification of essential residues within the active and allosteric sites of enzymes and other biologically active proteins, by means of selective chemical modifications, is of importance for unders-

tanding the relationship between their biological activities and structures.

Fructose 1,6-bisphosphatase (Fru-P₂ase) catalyzes an essential step in gluconeogenesis. Its activity is modulated by allosteric inhibition by AMP, inhibition by both fructose 2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P₂) and high levels of fructose 1,6-bisphosphate (Fru-1,6-P₂), and activation by univalent cations such as K⁺ or NH₄⁺ (1). However, the mechanism of action of these effectors is poorly understood. Furthermore, the nature of the inhibition by Fru-1,6-P₂ and Fru-2,6-P₂ is controversial. The enzyme is a tetramer with identical subunits and it seems to have no single amino acid whose modification completely eliminates the enzyme activity or sensitivity to AMP (2).

In an effort to understand the mechanism of action of K⁺ on the activity of neutral pig kidney Fru-P₂ase, the effect of the cation on the substrate inhibition property was studied. Potassium increased the apparent Km for Fru-1,6-P₂ and decreased the inhibitory effect of high concentrations of substrate. At concentrations of Fru-1,6-P₂ below 25 μM, the monovalent cation became inhibitory.

The functional groups related to monovalent cations activation and substrate inhibition have been studied by chemical modification. Treatment of Fru-P₂ase with NaNCO leads to loss of activation by monovalent cations as well as to loss of AMP inhibitions (3,4). The high substrate inhibition was also affected and a K⁺ activation-substrate inhibition relationship was proposed (3,5). The alteration of the regulatory properties was dependent on the modification conditions used. Significant protection to the loss of K⁺ activation and decrease substrate inhibition was afforded by the presence of Fru-1,6-P₂ (25 mM), whereas AMP preferentially protected against the loss of AMP inhibition.

Alteration of monovalent cations activation showed biphasic first order kinetics and two groups, namely R or L type, were distinguishable based on their fast or slow rates of reaction with cyanate. The rate of reaction was followed as a function of pH in order to determine the pK and the pH-independent second order rate constant

of these groups. These values were: pK_R = 7.2, pK_L = 5.7, k_R = 1041 M⁻¹s⁻¹ and k_L = 35 M⁻¹s⁻¹.

Two moles of ¹⁴C-cyanate/mole of enzyme were incorporated concomitantly with the loss of K⁺ activation (6). The carbamylation was reversible and corresponds with the S-(¹⁴C) carbamylcysteine isolated from the modified enzyme (7). This confirms that a reactive cysteine residue was involved in both properties (K⁺ activation and Fru-1,6-P₂ inhibition) suggesting that K⁺ decreases the affinity of the enzyme for Fru-1,6-P₂ at both the catalytic site and an allosteric site for Fru-1,6-P₂.

These results together with those reported by several other laboratories will be discussed in terms of whether an allosteric site for Fru-2,6-P₂ is present in Fru-P₂ase. (Supported by Grants RS-82-36, Dirección de investigación, UACH; CHI 81/001 PNUD-UNESCO).

REFERENCES

1. TEJWANI, G.A. (1983). *Adv. Enzymol.* 54, 121-194.
2. BENKOVIC, S.J. and DE MAINE, M.M. (1982). *Adv. Enzymol.* 53, 45-82.
3. SLEBE, J.C., OJEDA, A., HUBERT, E. and MACCIONI, R. (1981) in *Molecular Approaches to Gene Expression and Protein Structure* (Siddiqui, M.A.Q., Krauskopf, M. and Weissbach, H., eds.), pp. 329-363, Academic Press, New York.
4. SLEBE, J.C., HERRERA, R., HUBERT, E., OJEDA, A. and MACCIONI, R. (1983) *J. Prot. Chem.* 2, 437-443.
5. OJEDA, A., HERRERA, R., MACCIONI, R. and SLEBE, J.C. (1980). *Arch. Biol. Med. Exp.* 13, 93 (Abstract).
6. HERRERA, R., OJEDA, A. and SLEBE, J.C. (1981) *Arch. Biol. Med. Exp.* 14, 200 (Abstract).
7. HUBERT, E. and SLEBE, J.C. (1983) *Arch. Biol. Med. Exp.* 16, R-86.

ISOTOPIC ANALYSIS OF GLUCOSE UTILIZATION IN MICROINJECTED FROG OOCYTES. (Análisis isotópico de la utilización de glucosa en oocitos microinyectados de rana).

Tito Ureta and Jasna Radojković. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Casilla 653, Santiago, Chile.

Microinjection of amphibian oocytes allows the modification of intracellular levels of substrates, intermediates, cofactors and en-

zymes. Therefore, the system qualifies as an *in vivo* test tube for the study of metabolic pathways and of several features of flux regulation. We have chosen oocytes of the leptodactylid frog *Calyptocephalella caudiverbera* to study glucose utilization by means of isotopic analysis.

Use of glucose labeled with ^{14}C - or ^3H - at specific positions permits the conclusion that oocytes utilize glucose mainly for glycogen synthesis and to a lesser extent for the pentose phosphate pathway (1,2). Glycolysis, glycogenolysis and gluconeogenesis are not operative in these cells (2). Several labeled intermediates (glucose-6-P, glucose-1-P, fructose-6-P, UDPglucose), are also incorporated into glycogen and, with the exception of UDPglucose, they serve also as precursors for the pentose phosphate pathway. Co-injection of labeled glucose and any of the above mentioned intermediates results in a marked decrease of $^{14}\text{CO}_2$ production but no effect at all in the case of glycogen deposition has been observed. The opposite effect has been observed by co-injection of labeled glucose plus glucose-1,6-bis-P.

If [^{14}C] glucose is allowed to enter into the cells from the incubation medium and intermediates are microinjected, the effects are quite different to those described above: unlabeled glucose-6-P, glucose-1-P or UDPglucose markedly decrease carbon incorporation both into glycogen and CO_2 . However, fructose-6-P, while decreasing incorporation into CO_2 , does not affect glycogen labeling although it is a very efficient substrate for polysaccharide deposition.

In attempts to perturb carbon flux from glucose to glycogen and CO_2 several cofactors have been microinjected. NADP^+ microinjection results in six- to ten-fold stimulation of $^{14}\text{CO}_2$ production sugges-

ting that the pentose phosphate pathway operation is limited by an unfavourable $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ratio (3). Carbon incorporation into glycogen in the presence of high NADP^+ levels is decreased and the effect is only partially explained by higher flux through the pentose phosphate pathway. NADP^+ effects are mimicked by phenazine methosulfate but not by NAD^+ , nicotinamide, ATP, ADP or AMP.

Hexokinase levels are the lowest of those carbohydrate-metabolizing enzymes present in frog oocytes. To test its role as a rate-limiting enzyme of glycogen synthesis or of the pentose phosphate pathway, microinjection of pure yeast hexokinase was performed. When glucose was present in the extracellular medium no effect of hexokinase microinjection on either pathway was observed. With microinjected glucose however, a stimulatory effect of hexokinase on $^{14}\text{CO}_2$ production and a marked decrease of carbon incorporation on glycogen was observed.

As a plausible explanation of these observations we suggest extensive compartmentation of the process of glycogen synthesis. However, the possibility of alternative pathways of glucose utilization for polysaccharide synthesis and the pentose phosphate pathway cannot be perfunctorily dismissed. (Supported by Departamento de Investigación y Bibliotecas, Universidad de Chile; Fondo Nacional de Ciencias and by the Organization of American States).

REFERENCES

1. URETA, T., RADOJKOVIC, J. (1979). *Acta Cient. Venez.* 30, 396-400.
2. RADOJKOVIC, J., URETA, T. (1982). *Arch. Biol. Med. Exp.* 15, 395-405.
3. URETA, T., RADOJKOVIC, J. (1980). *Federation Proc.* 39, 2143. (Abst. 2826).

COEXISTENCIA DE MÚLTIPLES VARIANTES DE HISTONAS H2A, H3 Y H4 EN ESPERMATOZOIDES DE *TETRAPYGUS NIGER*. (Coexistence of multiple variants of histones H2A, H3 and H4 in sperms of *Tetrapygus niger*. Aínol, L., Puchi, M., Madsone, R. e Imschenetzky, M. Depto. Biología Molecular, Facultad Ciencias Biológicas y Recursos Naturales, (U. de Concepción).

La cromatina de espermatozoides de equinodermos está organizada en nucleosomas formados por dos pares de histonas H2A; H2B y de H3; H4 respectivamente rodeados de 146 pares de bases de ADN. En las regiones internucleosomales se encuentra la histona H1 interaccionando con la partícula nucleosomal y el ADN que une estas partículas.

El análisis electroforético bidimensional de histonas totales de *Tetrapygus niger* en geles que contienen urea-ácido acético-Tritón DF-16 en primera dimensión y urea-ácido acético-Tritón X-100 en segunda dimensión reveló la presencia de tres variantes de histona H3, dos variantes de histona H2B y 4 variantes de histona H4. Análisis previos de estas fracciones utilizando geles SDS en la segunda dimensión no indicaban microheterogeneidad de estas fracciones, excepto para H4 en que aparecían dos variantes no bien resueltas.

Se investigó la posibilidad de que las variantes obtenidas representarían la expresión de genes alelos presente en diferentes individuos de una población de erizos de mar, obteniéndose resultados negativos. Se analizaron 8 individuos los cuales presentaron idéntica microheterogeneidad para las histonas H3, H2B y H4. Los resultados obtenidos indican claramente que en espermatozoides de *Tetrapygus niger* coexisten variantes de las histonas nucleosomales H3, H2B y H4. Las características de estas variantes sugieren que estas difieren en el contenido en dominios hidrofóbicos.

Proyecto 20.31.02 Universidad de Concepción.

SÍNTESIS Y METILACION DEL COMPLEJO PENTAMÉRICO (EL7L12)₄·EL10 DEL RIBOSOMA BACTERIANO. (Synthesis and methylation of the pentameric (EL7L12)₄·EL10 complex from the bacterial ribosome). Amaro, A.M. y Jerez, C.A. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La subunidad 50S del ribosoma de *E. coli* posee el complejo pentamérico (EL7L12)₄·EL10 que es esencial para la síntesis proteica. Se sabe que las proteínas EL7L12 son metiladas y que esta modificación aumenta cuando las bacterias son crecidas a bajas temperaturas (27°). Para determinar el posible papel fisiológico de esta modificación hemos estudiado 1) la metilación del complejo en distintas condiciones y en diferentes bacterias, y 2) la síntesis del complejo a partir de DNA y su metilación *in vitro*.

La metilación *in vivo* se determinó por las razones 3H/C14 después de aislar las proteínas ribosomales de células crecidas en presencia de (metil-3H) metionina y (1-14C)metionina. La metilación *in vitro* se efectuó con ribosomas sub-metilados artificialmente o con el complejo sintetizado a partir de λ rfid18 DNA en presencia de (metil-3H)-S-adenosil-metionina. Los productos se caracterizaron por inmunoprecipitación con suero antiEL7L12.

Encontramos que se metilan todas las proteínas del complejo tanto en *E. coli* como en *B. stearothermophilus*. Por otro lado, sólo las proteínas EL7L12 aumentaron su grado de metilación en células crecidas a 27°. Los sistemas de metilación *in vitro* permitirán aislar por primera vez la o las enzimas modificantes del complejo ribosomal y estudiar el posible efecto de esta modificación post-traducciona en la actividad del ribosoma.

Financiado por Universidad de Chile, Proyecto B-1972-8414 y CONICYT, Proyecto 1147/83.

ANÁLISIS CINÉTICO DE LA REACTIVACION DE LA D- β -HIDROXIBUTIRATO DESHIDROGENASA CON MEZCLAS DE LECITINAS DE CADENA CORTA (Kinetic analysis of D- β -Hydroxybutyrate dehydrogenase reactivation with mixtures of short-chain lecithins). Cortese, J.D. y Vidal, J.C. Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (UBA-CONICET) Fac.Farm.y Bioquímica. Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina.

La D- β -Hidroxi-butilirato apoDeshidrogenasa (apoBDH) es una enzima de la membrana mitocondrial interna que es purificada en forma soluble y libre de lípidos (catalíticamente inactiva), puede ser reactivada por lecitinas de cadena corta en concentraciones inferiores a la concentración micelar crítica. Se ha demostrado (Cortese y col. 1982, *Biochemistry*, 16, 3899-3908) que la reactivación de la apoBDH requiere la ocupación simultánea por PC de dos sitios idénticos y no interactuantes (SINI) por un mecanismo de equilibrio rápido con adición indistinta de ambos ligandos. Cuando se titula espectrofotométricamente siguiendo la reducción de NAD⁺ a 340 nm se obtienen curvas bifásicas, linealizándose la parte ascendente con $1/V_0$ en función de $1/PC$ (los valores de V_m obtenidos por extrapolación son 105|PC(6:0)|, 118|PC(7:0)| y 137|PC(8:0)| μ mol NAD reducido. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, y las constantes de disociación (K_L) son 4,6 mM con PC(6:0); 1,4 mM con PC(7:0) y 0,13 mM con PC(8:0). Con n especies, los equilibrios múltiples entre las PC's y SINI son $E-(PC)_2$ como única especie activa predican que $v_0/V_m = 1/(1 + \sum |Li|/Ki)^2$ donde

Li/Ki es la concentración específica (reducida) de i -ésima PC. Utilizando mezclas con fracción molar constante de PC, será $\sum Li/Ki = (\sum Xi/Ki) \cdot [L_t]$, donde Xi es la fracción molar de la i -ésima PC ($[L_t]$ concentración total de PC). Para cada mezcla de PC se puede definir una constante de disociación global (promedio pesado) $K_w = (\sum Xi/Ki)^{-1}$ que implica la independencia estadística de cada interacción sitio-PC, y que brinda por cálculo las mismas constantes de disociación que se obtienen con lecitinas puras. Se concluye que las consideraciones de equilibrio expresadas en ecuaciones de Adair para mezclas de PC's verifican las K_L 's y V_m 's obtenidas con lípidos puros.

INMOVILIZACION DE PEPSINA EN DERIVADOS DE QUITOSANO. (Pepsin immobilization in chitosan derivatives). Curotto, E., Alea, J. y González G.. Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso.

El empleo de enzimas inmovilizadas elimina problemas de las enzimas en solución: la enzima es recuperable, su estabilidad es favorecida y en las proteasas no sufren autodigestión. Se estudió la unión de pepsina a derivados de quitosano por ser un producto natural abundante, no tóxico y es insoluble en las condiciones estudiadas. Los derivados fueron: quitosano injertado con metaacrilato de metilo (Matriz 1 y Matriz 2), que fue una donación, y succinil-quitosano (Matriz 3) sintetizado a partir de anhídrido succínico con un rendimiento de 83%. La unión de pepsina a las Matrices 1 y 2 fue no covalente, a la Matriz 3 fue por enlace amida. La actividad de la enzima se midió en batch con agitación por el método de Anson para Matrices 1 y 2 y con N-acetil-fenilalanil-diidotirosina para Matriz 3.

La actividad péptica retenida en Matriz 1 fue de 67%, en Matriz 2 de 100% y en Matriz 3 de 79%. La estabilidad de pepsina unida a Matriz 2 disminuye en 50% en 3 meses, en Matriz 3 baja en 57% en 1 mes. Se concluye que es factible inmovilizar pepsina en derivados de quitosano sin alterar significativamente su actividad.

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE UNA PROTEASA DE CUCURBITA FICIFOLIA. (Purification and characterization of a protease from Cucurbita ficifolia). Curotto, E., Tapia, G. y González, G. Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso.

Las proteasas tienen un amplio espectro de utilización tecnológica. Sus principales aplicaciones se encuentran en la industria alimentaria, de detergentes y en síntesis de productos biológicamente activos. Se describe la purificación y caracterización de una proteasa de la pulpa de alcayota (*C. ficifolia*) para empleo en los campos mencionados. Por precipitación fraccionada con sulfato de amonio, Sephacril S-300 y CM-Sepharosa se logró la purificación de una enzima altamente activa frente al sustrato Azocoll. Por electroforesis en SDS se determinó un PM mínimo de 76.000, la temperatura óptima es de 60°C y el pH óptimo de 9,2. La acción frente a sustratos sintéticos revela una especificidad hacia residuos aminoácidos apolares pequeños. De acuerdo a los valores de temperatura y pH óptimos la enzima podría utilizarse en la industria de detergentes y por su alta actividad sería útil en la industria alimentaria.

EFFECTO DEL ALCOHOLISMO PERMANENTE Y FILIAL & DEL AcCHO SOBRE ENERGIA EN SNC : MITOCONDRIA. (Permanent & filial alcoholism & AcCHO effect on CNS mitochondrial energy). Eraña, E. & Ramirez, M.T. Instituto de Medicina Experimental, Laboratorio de Neuroquímica - Facultad de Medicina - Universidad de Chile - Santiago 7-Chile.

La oxidación de sustratos en la mitocondria es la fuente de energía necesaria para todas sus funciones. Este proceso general se puede alterar por mecanismos que inhiban la cadena respiratoria mitocondrial. En este trabajo analizamos la producción de energía proveniente de oxidación de sustratos, la fosforilación oxidativa e incorporación de Ca^{2+} , en mitocondria de SNC en un modelo de alcoholismo experimental ("A.G. rats") ya conocido; se estudia además el efecto AcCHO sobre estos parámetros.

Ratas adultas ♂ y ♀ Wistar. Control y 3 grupos experimentales "A.G./12", "A.G./25", "A.G./H₂O" (anteriormente descritos). Mitocondria de cerebelo obtenidas por método de Clark y Nicklas modificado. Resto de la técnica ya comunicada anteriormente. Sustrato Sitio I: Piruvato/Malato, Sitio II: succinato; AcCHO 0,1, 0,25, 0,5 & 1,0mM.

Sitio I normal: notoria inhibición por AcCHO de la oxidación de sustratos, estados 3 & 4, ADP/O, incorporación de Ca^{2+} & razón Ca/O. La ingestión de EtOH, "A.G. rats", muestra leve efecto depresor. Sitio II: estos parámetros no se alteraron mayormente. El AcCHO fue inhibidor sólo en Sitio I pero no Sitio II.

El AcCHO al disminuir la oxidación de sustratos (Sitio I), limita la disponibilidad de energía de la mitocondria para la fosforilación oxidativa & incorporación de Ca^{2+} por tanto disminuye las razones ADP/O & Ca^{2+} /O. "A.G. rats" no mostraron mayores diferencias con normal. Dado que AcCHO es oxidado en la mitocondria, suponemos que se altera la velocidad de transporte de electrones (Sitio I) y posiblemente la fuerza del movimiento de protones.

Grant D.D.I. U. de Chile - Proyecto B 1050-845-5.

ESTRUCTURA DE UN GEN DE tRNA^{ser} DE *T. THERMOPHILUS* Y ESTUDIOS DE TRANSCRIPCIÓN IN VITRO. (Structure of a tRNA^{ser} gene from *T. thermophilus* and studies on its in vitro transcription.) Davagnino, J., González, E., Gross, D., Yáñez, L., Lira, P., Sánchez, H. y Venegas, A. Laboratorio de Bioquímica. Pontificia Universidad Católica de Chile.

A partir del genoma de *Thermus thermophilus* HB8 se ha clonado un fragmento BamHI de 3200 pb que contiene un gen de tRNA^{ser}. Este fue detectado por hibridación con ³²P-tRNA total del mismo organismo. Luego de secuenciación de una zona de 506 pb según el método de Maxam y Gilbert, la localización exacta y su identificación se logró por análisis computacional con un programa que pliega secuencias con características de tRNA. Esto fue comprobado por hibridación Southern con ³²P-tRNA de un fragmento de 90 pb, que según el análisis anterior, contenía la mayor parte del gen. Estudios comparativos de secuencia revelan una homología de 75% entre este gen y tRNA^{ser} de *E. coli*. Además, dio hibridación positiva con un tRNA de *T. thermophilus* que fue purificado por electroforesis bidimensional y que carga serina-3H.

El gen es transcrito a 60°C por la polimerasa homóloga produciendo un RNA "run off" de 400 bases, a pesar que se presume la presencia de una señal de terminación de la transcripción al final del gen.

El promotor de este gen presenta características procarionóticas típicas, incluyendo las secuencias canónicas -10 y -35 en las posiciones adecuadas. Como rasgo distintivo este promotor presenta una región de 17 bases que separa estos elementos, que tiene un alto contenido en GC, característica que podría ser propia de promotores que operan a altas temperaturas.

El promotor es también reconocido por la RNA polimerasa de *E. coli*.

Financiado por el Consejo Superior de Ciencias (CONICYT), DIUC (Universidad Católica) y PNUD-UNESCO (programas CHI 81/001 y 84/003).

TOXICIDAD DE FENILHIDRAZINA SOBRE CELULAS DE MEDULA OSEA Y ERITROCITOS. EFECTO PROTECTOR DEL FLAVONOIDE SILIMARINA (Toxicity of phenylhydrazine on bone marrow cells and erythrocytes. Protective effect of silymarin). Garrido A. Barria I., Guerra R., Valenzuela A. Lab. Bioquímica. INTA. Casilla 15138, Santiago 11. Chile.

Numerosos flavonoides son utilizados en la actualidad con fines terapéuticos en una gama muy amplia de patologías. La silimarina es una oxoflavona utilizada en el tratamiento de numerosas hepatopatías tanto de origen tóxico como infeccioso y aunque su mecanismo de acción es desconocido, se le atribuyen propiedades protectoras y estabilizantes de la membrana celular. Trabajos anteriores del grupo han caracterizado un efecto protector de silimarina en la disminución del glutatión y el aumento de la lipoperoxidación hepática producida por la intoxicación aguda con etanol en ratas. Ambos efectos han sido explicados como una consecuencia de las propiedades anti oxidantes del flavonoide.

La fenilhidrazina es un tóxico celular cuya actividad se relaciona con la formación de radicales libres del oxígeno y la inducción de lipoperoxidación. El tóxico produce "in vitro" una importante disminución del glutatión intracelular y de la viabilidad en eritrocitos y células de médula ósea de ratas. En estas últimas produce, también, una disminución en la síntesis de RNA. El tratamiento de las ratas con silimarina "in vivo" (200 mg/kg i.p.) protege contra el efecto de fenilhidrazina "in vitro" evitando la disminución del glutatión, el aumento de la lipoperoxidación y el efecto sobre la viabilidad celular. El flavonoide, además, produce un aumento en la síntesis de RNA en las células de médula ósea. Se discute el mecanismo de acción de silimarina a nivel de estas células y las perspectivas de utilización terapéutica en patologías diferentes a las hepáticas, donde se le utiliza principalmente.

(Trabajo financiado por DIB, proyecto B-2019-8412).

LOCALIZACION MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE SITIOS DE UNION DE RNA POLIMERASA DE BAL31 A DNA DE FAGO PM2.- (Localization by electron microscopy of BAL31 RNA polymerase binding sites to PM2 phage DNA). B. González, M. Susaeta, E. Espinoza, P. Bull y A. Yudelevich, Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile.

El genoma del bacteriofago PM2 es un DNA circular de doble hebra con un peso molecular de 6.3×10^6 y con un alto grado de sobre enrollamiento, características que lo hacen un buen modelo para estudios de transcripción y replicación del DNA.

Estudios previos realizados con RNA polimerasa de BAL31 nos han permitido detectar varios sitios de unión de la polimerasa al DNA de PM2. Estos sitios fueron detectados basándose en la aparición de sitios refractarios al corte con ciertas enzimas de restricción tales como Hinc II o Hind III, al preincubar DNA de PM2 con RNA polimerasa de BAL31. De este modo pudimos localizar sitios de unión a 0,54, 0,71, 0,72 y 0,74 unidades de mapa (U.M.). En experimentos realizados con alta fuerza iónica aparecen nuevos sitios de unión en la región de 0,2-0,3 U.M. y 0,64 U.M. A fin de corroborar estos resultados y detectar otros sitios de unión no detectables mediante este método hemos estudiado la interacción entre RNA polimerasa BAL31 y DNA de PM2 mediante microscopía electrónica. Utilizando este método hemos podido confirmar sitios de unión en las regiones 0,54, 0,71, 0,72 y 0,74 U.M., además de los sitios en la región 0,2-0,4 U.M., pero además hemos podido detectar un nuevo sitio de unión localizado en la región 0,08 U.M. La unión de la RNA polimerasa a todos estos sitios sólo se produce cuando se usa holoenzima y DNA sobre enrollado.

Estos estudios están siendo complementados con estudios de transcripción *in vitro*, y estudios de secuencia de nucleótidos en estas regiones.

Proyecto financiado por DIUC.

ESTUDIOS ESPECTRALES DE LA DESNATURALIZACION DE PEROXIDASA DE RABANO. (Spectral studies of horseradish peroxidase denaturation). González, G., Brunet, J. y Sotomayor, C. Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso.

Se investigó la influencia del grupo heme sobre la estabilidad de la peroxidasa del rábano frente a diversos agentes desnaturizantes. Muchos grupos prostéticos ejercen influencias estabilizadoras al unirse a sus respectivas apoproteínas. Esta estabilización se ha examinado para comprender mejor la naturaleza de los cambios conformacionales en la apoproteína como resultado de la unión específica. Este estudio se efectuó utilizando la fluorescencia del único triptófano de la proteína y el difracción circular a 295 nm para seguir la desnaturalización de la peroxidasa y la apoperoxidasa por pH ácido, guanidina y temperatura. Se observó que las propiedades espectrales de la peroxidasa cambian con la desnaturalización y que la transición es compatible con un proceso cooperativo. La apoperoxidasa sufre transiciones a temperatura y concentración de desnaturizantes más bajas que la peroxidasa y los resultados no muestran un proceso cooperativo. Estos hallazgos son interpretados como una indicación que la apoperoxidasa es menos resistente a la desnaturalización que la holoenzima y que el cambio conformacional que ocurre al remover el grupo heme resulta en una estructura menos cooperativa que la desplegada por la enzima nativa.

MUTAGENESIS SITIO-ESPECIFICA DEL GEN DE PIRUVATO QUINASA DE LEVADURA. E. González, I. Gómez, M. Urdea, P. Valenzuela y A. Venegas. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Portugal 35, Santiago, Chile.

La enzima piruvato quinasa de levadura participa en una de las etapas claves de la regulación de la ruta glicolítica celular. Su estructura primaria ha sido deducida recientemente a partir de la secuencia del gen que la codifica. Un análisis de ella ha revelado la existencia de posibles sitios funcionales de la proteína interesantes de estudiar en detalle. Así, en las posiciones 18-22 se ubica una posible señal de fosforilación y en la posición 337 se encuentra un residuo de lisina probablemente implicado en el mecanismo catalítico de esta enzima. Usando técnicas de mutagénesis dirigida mediante oligonucleótidos sintetizados químicamente, se han introducido modificaciones en la codificación del gen de piruvato quinasa, de modo que ella se traducen en los siguientes cambios de aminoácidos: Thr 21 por Ala, Ser 22 por Asp y Lys 337 por Arg. Aquí comunicamos la construcción de estos mutantes y su clonamiento en un vector apropiado para su posterior evaluación por transformación de una cepa de levadura deficiente en piruvato quinasa y comparación con los resultados que se obtienen al transformar con el gen tipo silvestre.

Financiado por DIUC (Universidad Católica) y PNUD-UNESCO

UNA PROTEINA DE OVARIO DE *Xenopus laevis* CON CAPACIDAD INHIBITORIA DE LA FOSFODIESTERASA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS ACTIVADA POR DIFERENTES COMPUESTOS. (A protein from *Xenopus laevis* ovaries which has the capacity of inhibiting cyclic nucleotide phosphodiesterase activated by different compounds.) Jedlicki, E., Connelly, C. y Allende, J. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina y Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

En oocitos de *Xenopus laevis* existe una actividad fosfodiesterásica de nucleótidos cíclicos (FDE I) capaz de ser activada por el complejo calmodulina- Ca^{2+} ($CaM-Ca^{2+}$), por fosfolípidos y por tratamiento con tripsina. Se ha logrado aislar por cromatografía en DEAE-celulosa de extractos de ovario, un inhibidor que antagoniza estos tres tipos de activaciones. Este inhibidor se ha purificado hasta aparente homogeneidad y se ha identificado como una proteína de peso molecular 94.000, formada por 2 subunidades aparentemente iguales de peso molecular 44.000 cada una. Esta proteína inhibitoria antagoniza específicamente la activación de la FDE I, tanto por calmodulina de cerebro de bovino como por calmodulina de ovario, sin afectar la actividad basal de la enzima ni la forma enzimática independiente de CaM . La inhibición de la activación de FDE I por $CaM-Ca^{2+}$ o fosfolípidos es reversible, puesto que un incremento de la concentración del agente activador revierte la inhibición. La acción de la proteína inhibitoria se refleja en un descenso en los valores de V_{max} de la reacción. Experimentos de cromatografía en columna de afinidad de CaM -sefariosa sugieren que el inhibidor es capaz de interactuar con calmodulina en presencia de iones Ca^{2+} . Los resultados de inhibición de la FDE I activada por digestión parcial con tripsina sugieren, por otra parte, que la proteína inhibitoria sería capaz de unirse a la enzima. Un complejo de este tipo ha sido detectado en columna de afinidad de CaM -sefariosa. (Trabajo financiado por PNUD/Unesco CHI/81/001, OEA y Universidad de Chile.)

ISOAPIRASAS DE *S.tuberosum* VAR ULTIMUS (Isoapirases of *S.tuberosum* var. *Ultimus*) Kettlun, A. M., Urra, R., Mancilla, M., Valenzuela, M.A. y Traverso-Cori, A. Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Se purificó parcialmente apirasa (pifosfohidrolasa) de *S.tuberosum* (var. *Ultimus*) con un cociente ATPasa/ADPasa de 3 que se mantuvo constante a través de varias etapas de purificación. De la etapa de filtración en una columna de Sephadex G-100 eluyó un solo máximo de actividad ATPasa-ADPasa con un PM correspondiente a 47000.

Este único máximo de actividad enzimática proveniente de un Sephadex G-100 se resolvió en tres picos de actividad apirásica al realizar cromatografías de intercambio (CM-Sephadex) o afinidad (azul de Cibacron-agarosa). Uno de los picos de actividad fué de cociente ATPasa/ADPasa de 8, otro de 1.0 y uno pequeño de 2.

La preparación apirasa G-100 después de un electroenfoque también se resolvió en tres fracciones proteicas con actividad apirásica de pI 6,4 (ATPasa/ADPasa alto); pI 5,7 (ATPasa/ADPasa=bajo) y pI 7,6 (ATPasa/ADPasa intermedio).

Se caracterizaron las isoenzimas de cociente alto y bajo en cuanto a pH óptimo y efecto de metales no encontrándose grandes diferencias entre ellas.

Financiado por el DDI (U.de Chile) proyectos B-1144-8333 y B-1144-8444.

ACTIVIDAD FOSFATASICA ACIDA Y ALCALINA EN *TRYPANOSOMA CRUZI*. (Acid and alkaline phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi*). Letelier M.E., Aldunate, J., Repetto, V., y Morello, A. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Casilla 6671- Santiago 7, Chile.

Trypanosoma cruzi es el parásito causante de la enfermedad de Chagas. Las fosfatasas ácidas y alcalinas son un grupo de enzimas cuya significancia biológica podría estar relacionada con procesos digestivos, transporte o ruptura de algunos componentes celulares.

Se estudió la actividad fosfatásica en la forma epimastigota de *T. cruzi*, cepa Tulahuén, con el sustrato p-nitrofenilfosfato, cuantificando la velocidad de producción del producto p-nitrofenol a 410 nm.

Hemos podido establecer los parámetros cinéticos para esta actividad *in vivo* (epimastigotes intactos) Km 22.2 mM y Vmax: 1.60 nmoles/min/mg proteína, siendo tal actividad inhibida por KCN 10 mM y EDTA 5 mM. La actividad en homogenizado total tiene una Km de 4.9 mM y una Vmax de 4.7.

Se ha realizado fraccionamiento subcelular y determinado la actividad ácida (pH 5) y alcalina (pH 9) en mitocromos y fracción soluble. Se ha establecido en estas fracciones parámetros cinéticos y comportamiento frente a inhibidores similares a los descritos *in vivo*.

El estudio de vías metabólicas del parásito contribuye al diseño racional de nuevos agentes quimioterapéuticos.

Financiado por CONICYT-CHILE; UNDP/WB/WHO/TDR; y Depto. Desarrollo de la Investigación, Universidad de Chile, Grant B-1854.

SUPRESION DE LA TERMINACION DE LA TRANSCRIPCION POR EL FAGO P4. (Suppression of transcription termination by phage P4). Lagos, R., Beckwith, J. y Goldstein, R. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, y Departamento de Microbiología y Genética Molecular, Harvard Medical School.

P4 ha sido clasificado como un bacteriófago defectivo que depende de un "helper" como es el colifago P2 para su desarrollo lítico. P4 codifica para varias funciones génicas, a una de las cuales se le ha atribuido propiedades antiterminadoras de la transcripción porque suprime polaridad asociada con mutaciones ámbar en operones policistrónicos del "helper" P2. Recientemente se descubrió que P4 puede propagarse como un plasmidio, lo cual permitió realizar un estudio más acabado de esta función antiterminadora.

Para este propósito, se construyeron fagos-plasmidios derivados, que poseían gran parte de las funciones regulatorias de P4 y las funciones necesarias para su replicación (fragmento AD de Eco RI). Este fragmento se ligó a un gen de kanamicina, para facilitar la selección del plasmidio. Para probar la actividad antiterminadora de P4, se usó la cepa bacteriana X8605, la cual tiene fusionado el operón del triptófano con el operón de la lactosa. En esta cepa el terminador del triptófano está intacto y parte del promotor de la lactosa está ausente, siendo el fenotipo lac⁻, pues la transcripción termina en el terminador del triptófano y no puede ser reiniciada en el operón de la lactosa, aún cuando los genes estructurales de este operón están intactos. Al transformar estas células con el plasmidio P4-kanamicina, no hay terminación de la transcripción en el terminador del operón del triptófano (rho-dependiente), y esta cepa se convierte en lac⁺. Estudios genéticos con plasmidios derivados de diversas mutantes de P4, mostraron que el producto génico responsable de esta actividad antiterminadora, en trans en el cromosoma bacteriano, es psu.

EFFECTO DE ANALOGOS DEL ISOPROTERENOL SOBRE LA SINTESIS DE POLIPÉPTIDOS EN GLÁNDULA PAROTIDA DE RATÓN. (Effect of isoproterenol analogs on polypeptide synthesis in mouse parotid glands). López Solís, R.O., Miranda, D. y Castillo, L. Dpto. de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El agonista beta adrenérgico isoproterenol (1(3,4-dihidroxifenil)-2-isopropilamino etanol) induce la síntesis de una familia de al menos cinco polipéptidos en glándula parótida de ratón. Se desconoce el mecanismo por el cual el isoproterenol produce esta inducción, la relación que tiene esta respuesta metabólica con otras respuestas celulares que el isoproterenol provoca en glándula parótida (secreción, síntesis de DNA, hipertrofia) y las características estructurales del isoproterenol necesarias para la inducción de los polipéptidos.

En este trabajo se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS el efecto de 15 análogos estructurales del isoproterenol respecto de la inducción de los polipéptidos. Estos análogos difieren entre sí en grupos químicos particulares de los dominios catecol, etanol o isopropilamino y en las respuestas provocadas en glándula parótida.

Todos los análogos empleados provocan secreción pero sólo algunos de ellos síntesis de DNA o hipertrofia. La síntesis de los polipéptidos analizados ocurre sólo cuando un análogo particular provoca hipertrofia y en este caso son siempre los mismos cinco polipéptidos los inducidos. Por otra parte, la capacidad de inducción de los polipéptidos se mantiene en aquellos análogos que en relación al isoproterenol difieren: a) en el número o posición de grupos OH en el dominio catecol y b) en el tamaño del radical alquilamino lateral. La sustitución de grupos en el dominio etanol del isoproterenol elimina la propiedad inductiva de polipéptidos en los análogos.

PROYECTO B1651-8423, DIB, UNIVERSIDAD DE CHILE.

OBTENCION DE ANTICUERPOS CONTRA APIRASA DE *S. tuberosum* (Development of antibodies against apyrase of *S. tuberosum*) Mancilla, M., Anich, M., Kettlun, A.M., Valenzuela, M.A. y Traverso-Cori A. Departamento de Bioquímica, Fac. de Ciencias Básicas y Farmacéuticas. Univ. de Chile.

La apirasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces pirofosfóricos. Con el fin de cuantificarla o bien efectuar estudios de inmunofluorescencia en el tejido de papa, se inmunizó conejos con apirasa purificada hasta la etapa de azul de Cibacrón, la cual presentaba cuatro bandas por electroenfoque.

El título de anticuerpos se midió por inmunodifusión y fue de 1/8, también se determinó por la técnica de ELISA y el valor fue 1/213.

Para determinar la especificidad de los anticuerpos se ensayó una apirasa semipurificada, con diluciones crecientes de suero inmune y se observó una franca disminución de las actividades ATPasa-ADPasa. Esto demuestra que el suero reconoce una apirasa similar a la que se utilizó para sensibilizar los conejos.

Con el fin de obtener un patrón de separación antigénico, se electroenfocaron muestras de apirasa azul de Cibacrón y apirasa G-100 (menos purificada) y se siguió paralelamente la actividad apirásica y la respuesta inmune por ELISA.

Además, se encontró interacción del suero inmune con otras apirásas como: la de brote var. Desirée, la de tubérculo var. Pimpernel y una isoenzima de la var. Ultimus.

Financiado por el DDI (U. de Chile) proyectos B-1144-8444 y B-1144-8333.

UN MODELO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA DE FRUCTOSA DIFOSFATASA, DE RIÑÓN DE CERDO. (A model for the secondary structure of pig kidney fructose bisphosphatase). Martínez, J., Cid, H. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Facultad de Ciencias Biológicas y Recursos Naturales. Universidad de Concepción.

La Fructosa 1-6 difosfatasa, (EC.3.1.3.11), es una enzima tetramérica, con subunidades idénticas. Es una enzima alostérica, inhibida por AMP, regulada por proteólisis y requiere de un catión divalente para su actividad.

Se realizó la predicción de estructura secundaria, para la enzima de riñón de cerdo, de la cual sólo se conoce su estructura primaria. Se propone una ubicación de los sitios activo y regulatorios en el modelo.

La predicción se hizo por los métodos de perfiles de hidrofobicidad y método de Chou y Fasman modificado, que permite la asignación del sentido (paralelas o antiparalelas) de las zonas de estructura β . La ubicación de los sitios activo y regulatorios, se hizo por homología de secuencia con la enzima de hígado de conejo.

La predicción realizada indica 38,2% de estructura β , 21,5% de hélices y 3,5% de vueltas. El modelo presenta dos dominios unidos por una hebra flexible. El dominio I, incluye los residuos 1 al 140, y el dominio II, los residuos 157 al 335. El dominio I presenta los sitios para la unión de AMP y regulación por proteólisis. El dominio II presenta el sitio activo. La superposición de ambos dominios permite la proximidad del sitio de unión de AMP, sitio activo y el grupo SH hipereactivo.

El modelo propuesto se ajusta a una serie de restricciones estructurales, es termodinámicamente estable y permite explicar el comportamiento enzimático de la proteína.

Proyecto de Investigación 20.33.16 de la Dirección de Investigación. Universidad de Concepción.

EFFECTO DE CATIONES SOBRE LA CINÉTICA DE POLIMERIZACIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS MICROTUBULOS. (Cations effect on the kinetic of polymerization and structure of microtubules) Monasterio, O. y Timasheff S.N. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile y Graduate Department of Biochemistry, Brandeis University.

Los efectos de tres cationes sobre la polimerización *in vitro* de tubulina de cerebro de bovino, purificada por el método de Weisenberg y col. (Biochemistry 7 (1968), 4466-4479) modificado por Lee y col. (J. Biol. Chem. 248 (1973), 7253-7262), fueron investigados en amortiguador fosfato a pH 7,0. Los valores para las concentraciones críticas obtenidos en presencia de potasio a diferentes concentraciones de magnesio siempre fueron menores que en presencia de sodio. Así, para 12 mM magnesio en presencia de 10 mM sodio o potasio los valores fueron 10,7 y 7,5 μ M respectivamente. El valor de la constante aparente de crecimiento del microtúbulo cambió desde $8,1 \times 10^5$ a $5,7 \times 10^5$ L/M entre 20 y 113 mM sodio. El efecto con potasio fue menor. La cinética de polimerización fue más lenta a altas concentraciones de ambos cationes monovalentes. Microscopía electrónica de los productos de polimerización a bajas concentraciones de estos cationes mostró principalmente una mezcla de hojas y microtubulos. Un aumento de la concentración de éstos eliminó fundamentalmente la presencia de hojas. Análisis termodinámico de la unión de magnesio al dímero de tubulina utilizando la teoría de la función de unión de Wyman (Adv. Protein Chem. 19 (1964), 224-286) mostró un valor de Δv cercano a uno a fuerza iónica constante en presencia de ambos cationes monovalentes. Concluimos que: Concentraciones de potasio y sodio cercanas a las fisiológicas favorecen la formación de microtubulos, potasio favorece la elongación de los microtubulos, y se produciría la unión de un mol de magnesio por mol de tubulina en el proceso de polimerización. Financiado por NIH Grants Nos. GM 14603 y CA 16707.

ACTIVIDAD DE ACIDO CLAVULANICO SOBRE β -LACTAMASA DE *STREPTOMYCES* UCSM-104 Y DE *SHIGELLA* FLEXNERI UCSF 129. (Activity of Clavulanic Acid upon β -lactamase from *Streptomyces* UCSM 104 and *Shigella flexneri* UCSF 129) Mondaca, M., Ríos, M., Ruiz, J., Campos, M. y Zemelman, R. Departamento de Microbiología y de Química, Universidad de Concepción.

El ácido clavulánico es un inhibidor con buena actividad sobre β -lactamasas plasmidiales preferentemente. En este trabajo se ha estudiado el perfil de sustratos de las β -lactamasas de *Streptomyces* UCSM-104* y de *Shigella flexneri* UCSF 129 y la inhibición de ellas por ácido clavulánico. Para los perfiles de sustratos se usó bencipenicilina, ampicilina, cefaloridina y cloxacilina. Se preincubaron las enzimas con diferentes concentraciones de ácido clavulánico. Los perfiles de sustratos, determinados por un método iodométrico fueron similares para ambas enzimas, pero la β -lactamasa de *Streptomyces* UCSM-104 presentó un I₅₀ de 5.5 mientras que la de *Shigella flexneri* UCSF 129 de 0.33. Se concluye que, aunque ambas enzimas tienen una codificación genética diferente, presentan una actividad similar sobre los antibióticos β -lactámicos y que son bastante diferentes en su susceptibilidad al ácido clavulánico. Esta diferencia puede ser causada por diferencias en los sitios activos de ambas β -lactamasas. Se concluye también que el ácido clavulánico puede inhibir β -lactamasas de tipo cromosomal.

Se agradece a la Universidad de Concepción y a Beecham Pharmaceuticals (U.K.) por el apoyo prestado.

* Reinicke, K. Tesis para optar al grado de Bioquímico, Universidad de Concepción, (1978).

" γ -GLUTAMILTRANSEPTIDASA DE GLANDULA MAMARIA". (γ -GLUTAMYLTRANSEPTIDASE FROM MAMMARY GLAND). Morales, O., Puente, J. y Sapag-Hagar, M. Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

La γ -glutamyltranspeptidasa es una enzima de membrana cuya principal función está relacionada al transporte de aminoácidos. Cataliza dos tipos de reacciones: transpeptidación e hidrólisis. En el presente trabajo se purificó esta enzima de glándula mamaria en lactancia y se estudiaron sus propiedades.

La actividad se determinó con L- γ -glutamylpantotato y D-glutamato como donadores del grupo γ -glutamilo y glicilglicina y L-aminoácidos como aceptores. Se estudió el efecto modulador de su actividad que ejerce el ácido maleico y la cinética de inactivación frente al marcador de afinidad 6-diazo-5-oxonorleucina (DON).

La enzima es, en cuanto a especificidad de aminoácidos, inactivación por DON y peso molecular, similar a la de riñón; sólo se diferencia en cuanto a la modulación por ácido maleico, diferencia que sería de significación fisiológica en cuanto al manejo del amonio.

Financiado por Proyecto B 1138 - 8444 U. de Chile y Proyecto CHI - 81/001 PNUD - UNESCO.

CARACTERIZACION DE LA INHIBICION POR FENOTIAZINAS DE LA OXIDACION PEROXISOMAL DE ACIDOS GRASOS

(Characterization of the phenothiazine mediated inhibition of fatty acid oxidation in peroxisomes). Nicovani, S., Persico, R., Necochea, C. y Leighton, F., Departamento de Biología Celular, U. Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile.

Hemos establecido previamente que derivados de fenotiazinas inhiben selectivamente la oxidación de ácidos grasos en peroxisomas, sin afectar la producción de cuerpos cetónicos, una indicación de oxidación mitocondrial (B.B.R.C. 120: 505, 1984). Cuando se utiliza palmitato (C₁₆) como sustrato, los hepatocitos de rata tratada con Nafenopin, un inductor de proliferación peroxisomal, clorpromazina 0.2 mM inhibe más de 80% la oxidación peroxisomal sin afectar la mitocondrial. Este efecto es menor si se usa laurato (C₁₂). El efecto inhibitorio es aparente ya a los 5 min y se mantiene por 20 o más. El efecto no se detecta al agregar fenotiazinas "in vitro" a fracciones subcelulares u homogeneizado, cuando se mide la vía peroxisomal a nivel de la oxidasa de ácidos grasos o la hidroxilación de CoA deshidrogenasa. Ya que no parece ser un efecto directo de las fenotiazinas sobre las primeras enzimas de la vía oxidativa peroxisomal, se evaluaron algunos posibles mecanismos indirectos. En particular, labilización de membrana de peroxisomas y labilización de membrana de hepatocitos. Además, empleando numerosos antioxidantes, se exploró la posible participación de radicales libres que, es sabido, se generan en presencia de fenotiazinas. Los resultados descartan estos como posibles mecanismos del efecto de fenotiazinas sobre peroxisomas. Actualmente estamos evaluando la participación de otras enzimas de la vía y de posibles componentes reguladores.

Financiado por proyecto DIUC 55/84

FLUJOS METABOLICOS DE ACIDOS GRASOS EN HEPATOCITOS. ROL DE PEROXISOMAS. (Metabolic fluxes of fatty acids in hepatocytes. The role of peroxisomes). Orellana, A., Morales M.N., y Bronfman, M. Laboratorio de Citología Bioquímica, Departamento de Biología Celular, P. Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile.

La β -oxidación de ácidos grasos en hepatocitos y otras células animales se realiza en mitocondrias y peroxisomas. El proceso peroxisomal es incompleto y sus productos serían acetilcarnitina y derivados acil-carnitina de cadena media y corta. Con el objeto de evaluar la importancia y especificidad relativa de la vía peroxisomal, se estudió la incorporación de marca a productos de degradación en hepatocitos aislados de ratas controles y tratadas con Nafenopin (para inducir proliferación peroxisomal) utilizando como sustratos, simultáneamente, ácidos acético, butírico, láurico y palmítico, uno de ellos marcado con ¹⁴C en el carbono 1, por vez. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con Nafenopin induce un marcado aumento del flujo de marca desde ácido láurico a productos de oxidación, mientras que disminuye la incorporación desde ácido butírico, sugiriendo que los peroxisomas oxidan preferencialmente ácido láurico y confirmando estimaciones previas de la especificidad del sistema. Se estudió además el efecto de la Clorpromazina, inhibidor específico de la β -oxidación peroxisomal (1), en la incorporación de marca desde ácido palmítico U-¹⁴C a productos de oxidación. Esta droga inhibe en un 30-40% la incorporación de marca a acetilcarnitina sin efecto apreciable en la incorporación de marca a cuerpos cetónicos, que evalúan la función mitocondrial. Esta observación sugiere que, bajo estas condiciones, una parte importante de la oxidación de palmitato se lleva a efecto en peroxisomas.

(1) Leighton, F., Persico, R., and Necochea, C. Biochem. Biophys. Res. Comm., 120, 505-511 (1984)

Financiado por proyecto DIUC 76/82

HIPOXILACION DE TESTOSTERONA IN VITRO EN RATAS NORMALES Y CON DESNUTRICION PROTEICO-ENERGETICA PRETRATADAS CON β -NAFTOFLAVONA. (Hydroxylation of Testosterone in normal and protein-energy malnourished rats pretrated with β -Naphthoflavone). Orellana, M., Mancilla, J. y Gil, L. Departamento de Bioquímica, Fac. de Medicina, Universidad de Chile.

Testosterona (T) un sustrato natural del sistema de monooxigenasas es oxidada en diferentes posiciones por las isoenzimas P-450 las cuales presentan regio y esteo selectividad. Se ha postulado que las oxidaciones de (T) en determinadas posiciones podrían estar catalizadas por isoenzimas que presentarían una restringida regioselectividad de manera que la producción de ciertos metabolitos podría dar una estimación de la composición de las diferentes isoenzimas P-450 en microsomas.

La oxidación de (T) por microsomas de hígado fue estudiada en ratas normales y desnutridas tratadas con (β -NF). Los productos de la oxidación de (T) se separaron por HPLC (Mancilla, Gil, Anal. Letters, 1984. In Press). En animales que no fueron tratados con (β -NF) se observó que la desnutrición disminuyó en 46% el metabolismo total de (T). La producción de algunos metabolitos disminuyó entre 40 y 60%, mientras que la de otros permaneció inalterada. El tratamiento con (β -NF) incrementó en ambos grupos la producción de 2- α OHT y 7- α OHT, disminuyó en ambos grupos la Androstenediona y aumentó en ratas normales la producción de 6 β -OHT pero la decreció en ratas desnutridas. Estos resultados sugieren que la desnutrición proteico-energética altera la composición de las isoenzimas citocromo P-450 y que la (β -NF) puede inducir selectivamente ciertas especies de citocromo P-450 dependiendo del estado nutricional del animal.

Financiado por proyectos: B-1970-8415 de la Universidad de Chile y del Fondo Nacional de Ciencias.

CARBOXIMETILACION DE PROTEINAS DE *Thiobacillus ferrooxidans*. POSIBLE RESPUESTA QUIMIOTACTICA. (Protein carboxy methylation in *T. ferrooxidans*. A possible chemotactic response). Peirano, I. y Jerez, C.A. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La biolixiviación de minerales sulfurados de cobre y otros metales por *T. ferrooxidans* es de gran interés industrial. Estas bacterias flageladas probablemente se adhieren a minerales específicos, por lo cual deberían tener receptores sensoriales para la quimiotaxis. Es sabido que en las bacterias entéricas estos receptores son proteínas metilables de la membrana. Hemos estudiado la presencia de receptores de este tipo en bacterias quimiolitotróficas y acidófilas, como el *T. ferrooxidans*.

Las células se crecieron en medio 9K y posteriormente se incubaron en presencia de cloramfenicol y (metil-³H) metionina. De esta manera se inhibe la síntesis proteica y se incorporan grupos metilo sólo a las cadenas laterales de las proteínas. Las proteínas metiladas se detectaron por electroforesis en geles de poliacrilamida y ulterior autoradiografía.

Encontramos proteínas aparentemente carboximetiladas con pesos moleculares de entre 55 y 65 kilodaltons y por lo tanto similares a las proteínas quimiotácticas metilables (MCP's) de *E. coli*. Atrayentes o repelentes descritos para enterobacterias actuaron de manera totalmente diferente en *T. ferrooxidans*.

Es posible por lo tanto que las bacterias lixiviantes posean mecanismos quimiotácticos para reconocer sustancias atrayentes y repelentes, las que será necesario identificar.

Financiado por CONICYT, Proyecto 1147/83 y Universidad de Chile, Proyecto B-1972-8414.

REDUCCION DE AZUL DE NITROTETRAZOLIO EN PRESENCIA DE NAD⁺ O NADP⁺ Y ALCOHOLES DE ESTRUCTURA ISOPRENICA, POR UN SISTEMA ENZIMATICO DE *Citrus sinensis* (Reduction of nitrotetrazolium blue in the presence of NAD⁺ or NADP⁺ and prenyls, by an enzyme system from *Citrus sinensis*) Quaaas, A., Pérez, L.M. Dep. de Bioquímica, Fac. de Ciencias Básicas y Farmacéuticas. Univ. de Chile.

La formación de sesquiterpenoides de conformación Z puede realizarse por condensación directa entre geranilpicrofosfato (GPP) e isopentenilpicrofosfato (IPP) ó a través de un mecanismo de isomerización redox a partir de E-farnesilpicrofosfato (E-FPP). El mecanismo de isomerización involucraría la participación de deshidrogenasas.

Una preparación libre de células reduce al azul de nitrotetrazolio, en presencia de NAD ó NADP y de alcoholes primarios de estructura isoprenica. El etanol también puede ser utilizado como sustrato, pero solamente en presencia de NAD.

La velocidad de reacción es proporcional a la concentración de enzima, la que es estable hasta por una semana.

La reducción de azul de nitrotetrazolio estaría acoplada a la actividad de una prenil deshidrogenasa, aún cuando hasta el momento no ha sido posible identificar los productos de la reacción.

Proyecto B-1127 U.Chile; CHI 81/001 y 1014-83 Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología

DETERMINACION DE MASA MOLECULAR DE ENZIMAS DE CITRUS LIMONUM POR RADIACION IONIZANTE (Molecular mass of enzymes from *Citrus limonum* by ionizing radiation) Portilla, G., Rojas, M.C. y Cori, O. Dep. de Química y de Bioquímica. Fac. de Ciencias Básicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

Las carbociclasas catalizan la formación de los hidrocarburos α pineno, β pineno y limoneno a partir de geranil, neril o linalilpicrofosfato (GPP, NPP, LPP). Hay evidencias de que se trata de varias enzimas. La preparación contiene además fosfatasa.

La radiación gama inactiva las enzimas. La dosis requerida para obtener 37% de actividad residual es función de la masa molecular e independiente de la pureza de las proteínas.

Se irradiaron ampollas selladas al vacío con 200 μ g de proteína liofilizada en una fuente de ⁶⁰Co de actividad 1.200 Ci (energía 1,17 y 1,33 Mev) y dosis hasta 33 Mrad en 140 horas.

Las masas moleculares de las carbociclasas y fosfatasa resultaron muy semejantes, del orden de 60.000 Da. Por filtración en gel se obtuvo MM de 50.000 Da para la GPP ciclasa. La irradiación no modificó las Km de las enzimas ni la relación entre los hidrocarburos y alcoholes formados.

Se concluye que las diferentes actividades carbociclicas se deben a enzimas de MM semejante o bien a una sola enzima. Esta última hipótesis nos parece poco probable.

Proyectos B-1127 del D.I.B. y 1014-83 del FNCT. Agradecemos la valiosa colaboración de la Comisión Chilena de Energía Nuclear donde se realizó la irradiación.

SEPARACION Y CUANTIFICACION DE ESTEROIDES POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION. (Separation and quantification of steroids by HPLC). Sylvia A. Ramírez, P. Zúñiga, L. Valladares y A.M. Pino. División Ciencias Básicas. INTA. Universidad de Chile.

La medición de hormonas esteroideas y sus metabolitos, por un método sensible y rápido, es uno de los problemas que se debe enfrentar en estudios endocrinológicos. Actualmente el método de elección, dada la baja concentración en que se encuentran estos compuestos, es el radioinmunoensayo, el cual puede resultar inapropiado para el caso en que los compuestos presenten reacción cruzada.

La cromatografía líquida de alta presión (CLAP) permite tanto la separación de los compuestos desde una mezcla, como la detección de los componentes. En este trabajo presentamos nuestra experiencia en el análisis de varios compuestos esteroideos por CLAP en fase reversa, utilizando una columna u Bondapak C18. El solvente utilizado fue acetonitrilo: agua (40:60) o bien una gradiente discontinua de acetonitrilo: agua (35:65)-acetonitrilo: agua (40-60); esta gradiente permitió separar androstenediona de 17 hidroxiprogesterona. Los estrógenos se detectaron a 206 nm y los andrógenos y progestágenos a 254 nm.

La absorción lineal en el UV permitió la detección de estradiol y testosterona, en el rango de 0.2 a 20 ng. Alternativamente mediante el uso de precursores radioactivos, la cuantificación se hizo por recolección de las fracciones eluidas y medición de la radioactividad recuperada. Este procedimiento se utilizó para la medición de la enzima 17 α -hidroxilasa en células de Leydig, utilizando la separación y cuantificación de metabolitos intermediarios en la formación de testosterona a partir de progesterona. Los resultados se comparan con los obtenidos por separación en cromatografía en placa fina.

Financiado por DIB. Proyecto B-1513-8322. U. de Chile.

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA DE HIGADO DE HAMSTER (Purification and characterization of hamster liver fructose 1,6-bisphosphatase). Reyes, A., Díaz, V., Hubert, E., Slebe, J.C. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

Se ha postulado que en mamíferos la regulación de la gluconeogénesis a nivel de la fructosa 1,6-bisfosfatasa difiere entre especies hibernantes y no-hibernantes. Como una manera de estudiar las posibles bases moleculares de esta regulación diferencial, estudiamos las propiedades reguladoras de la fructosa 1,6-bisfosfatasa de hígado de hamster (mamífero hibernante).

Una preparación homogénea de la enzima se obtuvo por un procedimiento de purificación de cuatro etapas, extracción a pH 7,5, calentamiento a 55°, fraccionamiento con sulfato de amonio y cromatografía en fosfo-celulosa. La purificación fue 150 veces y la actividad específica fue de 30 U/mg de proteínas; por electroforesis en poliacrilamida en SDS la preparación mostró una banda, que correspondía a un PM de 37.000. La enzima nativa mostró ser tetramérica y poseer un pH óptimo neutro (pH 7,5). Como otras fructosa 1,6-bisfosfatasas, la enzima de hamster presentó inhibición alostérica por AMP, inhibición por fructosa 2,6-bisfosfato y por altas concentraciones de fructosa 1,6-bisfosfato, activación por cationes monovalentes (K^+ , NH_4^+) y requerimiento de un catión divalente (Mg^{2+} , Mn^{2+}) para su actividad.

Un estudio comparativo de la enzima de hamster con la de hígado de rata (mamífero no-hibernante), mostró que difieren en propiedades estructurales, como PM de las subunidades, pI y estabilidad térmica. Sin embargo, sus propiedades reguladoras no difieren significativamente. Nuestros resultados no apoyan la idea de una regulación diferencial de la gluconeogénesis, a nivel de la fructosa 1,6-bisfosfatasa, entre estos mamíferos. (Financiado por proyectos: RS-82-36, Dirección de Investigación, UACH; CHI 81/001, PNUD-UNESCO).

EFFECTO IN-VIVO DE AFIDICOLINA SOBRE EL CICLO CELULAR EN MERISTEMAS RADICULARES (In vivo effect of aphidicolin on the cell cycle of root meristems). Sans, J. Depto. Biol. Cel. y Gen., Fac. de Med., Univ. de Chile.

La afidicolina es una toxina fungica que inhibe específicamente a la DNA polimerasa alfa. Recientemente se ha propuesto a esta droga como un eficiente agente inductor de crecimiento sincrónico, tanto en células animales como en vegetales. Algunos autores han sugerido que este compuesto bloquearía a las células en la transición $G_1 - S$. Sin embargo, ultimamente se ha publicado que también produciría acumulación de células en la fase G_2 del ciclo.

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto in-vivo de afidicolina en poblaciones de células meristemáticas asincrónicas y sincrónicas de la raíz de *Allium cepa* L., a fin de analizar el efecto de esta droga sobre las distintas fases del ciclo proliferativo.

Los estudios realizados en células asincrónicas muestran que afidicolina 60 μ M en tratamiento continuo, bloquea transitoriamente a las células durante la fase S, sin presentar preferencia por momento particular alguno del período replicativo.

El estudio realizado en células meristemáticas sincrónicas confirma el hecho que afidicolina inhibe específicamente la progresión de las células durante el período S.

(Proyectos B1651-8423 U. de Chile; Convenio U. de Chile - C.S.I.C. España.

ESTUDIOS PRELIMINARES DE LA INTERACCION A ALTA TEMPERATURA ENTRE RNA POLIMERASA DE T.THERMOPHILUS Y UN PROMOTOR HOMOLOGO. (Preliminary studies on the interaction at high temperature of *T.thermophilus* RNA polymerase and a thermophilic promoter). Yañez, L., Davagnino, J., González, E. y Venegas, A. Laboratorio de Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Trabajos previos han permitido aislar y caracterizar un gen de $tRNA^{Ser}$ de *T. thermophilus*. Además, se ha purificado la RNA polimerasa de esta bacteria y se ha desarrollado un sistema de transcripción in vitro.

Con el objeto de comprender el proceso de expresión génica a altas temperaturas termofílicas, se ha iniciado un estudio preliminar del paso inicial de la transcripción, el reconocimiento y la interacción de la RNA polimerasa con un promotor termofílico.

El análisis de esta etapa se basa en el ensayo de retención del complejo RNA polimerasa-DNA en filtros de nitrocelulosa, utilizando un fragmento de 900 pb que contiene íntegro el gen de $tRNA^{Ser}$ y que ha sido previamente marcado in vitro con 3H -GTP y DNA polimerasa I de *E. coli*. Los ensayos de unión se realizaron a 60°C y usando una razón molar enzima: DNA de 50:1.

Se determinó que la unión de la enzima al DNA es rápida y permanece estable hasta por 30 minutos. La especificidad de la interacción se ensayó incubando con KCl 100mM y analizando la estabilidad del complejo en presencia de Rojo Congo, para discriminar interacciones no específicas. Un análisis preliminar para acotar la región del DNA que interactúa con la enzima se logró por microscopía electrónica y un enfoque más preciso por uso de enzimas de restricción que cortan en la región del promotor. Se observó que la unión está dirigida específicamente a la región del promotor del gen de $tRNA^{Ser}$. Se sugiere un factor iónico en esta interacción, existiendo características similares a la unión de la enzima mesofílica, aunque la estabilidad del complejo a alta temperatura es marcadamente diferente. Financiado por DIUC (U. Católica), Consejo Superior de Ciencias (CONICYT) y PNUD-UNESCO.

COMPARACION NO EVOLUTIVA DE CITOCROMOS C. (Non evolutive comparison between cytochrome C of different species). María Pieber. Biofísica. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Universidad de Chile.

Se evalúa y compara el número de diferencias aminoacídicas de varios citocromos C con respecto al citocromo C del hombre con las distancias de disimilitud química aminoacídica y de codones. De esta comparación resulta una correlación lineal similar, tanto a nivel de sustituciones aminoacídicas como de codones. La pendiente de las rectas indica que los cambios aminoacídicos observados y aquellos más probables a nivel de codones son en promedio cinco veces más disimilares, que si todas las sustituciones observadas hubiesen sido exacta y químicamente más similares. La constancia con la calidad química promedio para las sustituciones observadas y la de codones estimada a lo largo de todas las especies de citocromos analizados, no permite visualizar un mecanismo evolutivo molecular para el citocromo. Más aún, si los diferentes citocromos C se comparan en términos de la similitud química global de toda la secuencia lineal, se puede establecer claramente que estas diferencias no correlacionan con el número de diferencias, con respecto al citocromo hombre sino más bien con el número de residuos que constituyen los diferentes citocromos. Esta nueva correlación plantea la posibilidad de generación independiente de citocromos.