

ESTRUCTURA Y EXPRESION DE GENES

Coordinador: Manuel Krauskopf

SEASONAL ACCLIMATIZATION OF THE CARP FISH. IS DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION PART OF THE ADAPTATIVE RESPONSE? (Aclimatación estacional de la carpa. ¿la respuesta adaptativa implica expresión génica diferencial?). Krauskopf, M., Anthauer, R., Soicochea, O., León, G., Oñate, S., Vera, M.I. and Villanueva, J. Instituto de Bioquímica and Instituto de Embriología, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Eurythermal fishes exposed to seasonal temperature variations adapt physiologically by means of compensatory responses. A prime mechanism underlying the compensatory strategies may be found at the level of the gene expression process.

We have studied the gene expression behaviour during the acclimatization of the fish *Cyprinus carpio*. Ultrastructural observations of liver cells show that cold adaptation leads to a classic segregation of the nuclear components suggesting that RNA pol I transcription is seriously affected. Summer carp isolated hepatocytes are clearly more active in RNA and protein synthesis when compared to liver cells isolated from winter fish. In addition, transcription in the cold season is repressed beyond the level expected solely from a decrease in temperature (Q_{10}). More than just RNA pol I mediated transcription could be involved in the physiological adjustment required in connection with the ambient temperature. Thus, changes in the tRNA population occur upon acclimatization. Furthermore, expression of albumin appears to be also affected, suggesting that indeed, differential gene transcription constitutes part of the compensatory response towards the temperature changes. Construction of molecular probes, as well as cytochemical and immunohistochemical analyses are being currently used to assess these observations. The involvement of mitochondrial genomic activity is also being studied using carp mtDNA probes and RNase-gold complexes. Supported by grants from DID UACH RS83-52, FONDECYT 1042/85 and Graduate Program project of OAS.

REGULATION OF EUKARYOTIC GENE EXPRESSION BY cAMP. H. Miller, D. Schlichter, J. Williams and W.D. Wicks, Department of Biochemistry, University of Tennessee, Knoxville, TN 37996-0840 USA.

Transfection experiments have shown that the regulatory element in three genes subject to control by cAMP in animal cells is present in the 5' flanking region just upstream from the promoter. A consensus 12bp sequence lies in the middle of the regulatory region and is also present in other genes subject to control by cAMP. We have examined the ability of nuclear extracts from the livers of cAMP-treated and control rats to bind to restriction fragments from various regions of one of these genes, which encodes hepatic PEP carboxykinase (PEPCK). High affinity, protein dependent, specific binding was detected by nitrocellulose filtration of end-labeled fragments containing the putative regulatory element with extracts from cAMP-treated rats which was several times that observed with control extracts. A synthetic 50mer containing the consensus region exhibited similar differential binding with the nuclear extracts which could be competed away by unlabeled restriction fragments containing the regulatory region but not by those which did not.

The factor(s) present in the treated extracts was found to protect G residues in a 193BP PEPCK fragment from attack by dimethyl sulfate just upstream from the regulatory region. This region has been reported to be crucial for cAMP control in transfection studies with somatostatin and proenkephalin, consistent with a possible role for the factor we have identified.

Supported by NIH Grant GM 31538.

THE STRUCTURE AND EVOLUTION OF VERTEBRATE PROTAMINES. Krawetz, S.A.*, Connor, W. and Dixon, G.H., Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Calgary, Calgary, Alberta T2N 4N1 Canada.

A bull P1 protamine cDNA from a bull testis cDNA library has been isolated utilizing a series of oligonucleotide probes. Sequence analysis showed that the cloned mRNA insert extended 317 bp to the poly A tail. Within a 156 bp segment the 51 residue 6750 dalton protamine primary translated protein is encoded. The amino acid sequence coded was for a protamine of the P1 family and is homologous with P1 protamines of other mammalian sperms. The sequence differs from that previously reported for bull protamine P1 by the insertion of a tripeptide CRR at pos. 39-41. Consistent with a previous hybridization analysis, nucleotide sequence comparisons showed that trout protamine was more closely related to that of bull than mouse. However, the bull protamine P1 showed greatest sequence homology with mouse P1. A common nucleotide sequence of 30 bp is conserved between all three of these species.

Primer extension analysis revealed that, as with trout protamine mRNAs, the majority of the untranslated portion of the mRNA lies 3' to the coding segment. Comparisons of their mRNA secondary structures by computer modelling indicates that the mRNAs may fold back onto themselves producing similar, extensively hydrogen bonded, convoluted forms. These models support the view that translational regulation of protamine mRNA may be, partially, dependent on secondary structure. Southern analysis suggests that the bull protamine P1 gene is not sex-linked and is present as one (or relatively few) copy within the bovine genome.

(This work was supported by an M.R.C. operating grant to G.H.D. *S.A.K. is an AHFMR post-doctoral fellow.)

α -TROPOMYOSIN GENE ORGANIZATION: ALTERNATIVE SPLICING OF DUPLICATED "ISOTYPE-SWITCH EXONS" ACCOUNT FOR THE PRODUCTION OF SMOOTH AND STRIATED MUSCLE ISOFORMS. Ruiz-Opazo, N. and Nadal-Ginard, B. Section of Molecular Genetics, Boston University Medical School and Dept. of Cardiology, Harvard Medical School, Boston, MA USA

α -tropomyosin (α -TM) is composed of two subunits with approximate MW of 33,000 daltons each. This protein in conjunction with the troponin complex plays a central role in the Ca^{2+} -dependent regulation of muscle contraction. We have previously isolated and characterized cloned complementary DNAs (cDNAs) for striated and smooth muscle α -tropomyosin. These studies suggested that these two isoforms might be encoded by the same gene. Here we have determined the complete structure of the α -tropomyosin (α -TM) gene, establishing that a single gene with a sequence complexity of 28kb produces the smooth and striated muscle α -TM mRNA isoforms by differential splicing of a set of exchangeable "isotype-switch exons" involving alternative splicing pathways. The elucidation of the intron/exon organization of α -TM has revealed its evolutionary origin from a single ancestral gene encoding a discrete actin binding domain. Most interestingly, the examination of the intronic sequences has uncovered potential alternative intramolecular secondary structures (hairpin-loop structures) which might be involved in the tissue-specific expression of the duplicated and mutually exclusive α -TM "isotype-switch exons."

BIOQUIMICA DEL CITOCROMO P-450 Y "STRESS" OXIDATIVO

Coordinador: Lionel Gil

QUIMIOLUMINISCENCIA DE ORGANOS DE MAMIFEROS (Chemiluminescence of mammalian organs). Boveris, A. Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Los órganos de mamíferos *in situ* presentan una emisión espontánea medible con equipamiento adecuado; esta es, expresada en cps/cm²; hígado, 24 ± 2; pulmón, 12 ± 4; cerebro, 60 ± 8; músculo, 13 ± 1; e intestino, 11 ± 3. Esta emisión refleja el estado estacionario de oxy-radicales del tipo ROO[•]. Estos radicales originan en reacciones de terminación una serie de especies excitadas entre las que se cuentan ¹O₂ y compuestos carbonílicos. El espectro de emisión muestra un predominio (>85%) a longitudes de onda mayores que 600 nm, consistente con la emisión dimolecular del ¹O₂. La administración *in vivo* de DABCO produce un aumento de la emisión, es dependiente de oxígeno y se extingue en anoxia; aumenta en hiperoxia y por administración de drogas formadoras de radicales de carbono (Cl₄C). El aumento *in vivo* de la generación de radicales O₂⁻ (a) por autooxidación del metil viologeno, (b) por activación de la xantina oxidasa llevan a un aumento de la emisión. La administración previa de sustancias antioxidantes tipo vitaminas A y E o polifenoles disminuye la emisión iniciada por Cl₄C. La deficiencia doble en vitamina E y selenio depleciona (90%) de actividad de glutatión peroxidasa del hígado y causa aumento de emisión y posterior reacción. Se concluye que los productos de la reducción parcial del oxígeno producen *in vivo* centros de reacción (radicales libres) del oxígeno y del carbono que llevan a la formación de compuestos peroxilos y de compuestos excitados. El estado estacionario de centros de reacción de carbono parece regulado por el nivel de antioxidantes del tejido.

Con Subsidios de CONICET, SECYT y UBA.

CYTOCHROME P-450 SPIN STATE: REGULATION AND FUNCTIONAL SIGNIFICANCE. G.G. Gibson. Department of Biochemistry, Division of Pharmacology & Toxicology, University of Surrey, Guildford, GU2 5XH, England.

Cytochrome P-450 exists as an equilibrium mixture of both low and high spin forms, the relative amounts of which are controlled by both membrane components and substrates. Data will be presented demonstrating that liver microsomal cytochrome b₅ specifically interacts with a purified phenobarbital-induced isoenzyme of cytochrome P-450, forming a tight 1:1 complex (K_d = 275nM) in which the proportion of high spin haemoprotein was increased from 7 to 30%. This specific interaction between the two haemoproteins resulted in a decrease in the K_d for the substrate benzphetamine from 111µM to 40µM. Likewise, the presence of benzphetamine was shown to cause a decrease in the K_d for cytochrome b₅ binding to cytochrome P-450 from 275nM to 90nM. Furthermore, from experiments correlating changes in the rate of first electron reduction (fast phase) with the spin state of the haem-iron existing at pre-equilibrium, data will be presented consistent with a model for spin state control of cytochrome P-450 reduction wherein the high spin form is preferentially reduced. The above results will be discussed in terms of the regulation and functional significance of the cytochrome P-450 spin state.

CYTOCHROME P-450 CATALYZED BIOACTIVATION OF ARACHIDONIC ACID (Rol del citocromo P-450 en la bioactivación del ácido araquidónico). Capdevila, J., Snyder, G.D. and Falck, J.R. Departments of Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, UTHSCD, Dallas, Texas 75235 USA.

Microsomal Cytochrome P-450 actively catalyzes the oxygenated metabolism of arachidonic acid to generate products that include six isomeric cis/trans dienols (HETEs), four regioisomeric epoxyacids (EETs) as well as the corresponding 19 and 20 monohydroxy derivatives. Reconstitution of the oxygenase utilizing solubilized and purified components demonstrates a cytochrome P-450 isoenzyme regio specific oxygen insertion.

In addition to their vasoactive properties, the "Epoxygenase" products 5,6-; 8,9-; 11,12- and 14,15-epoxyeicosatrienoic acids are potent and selective *in vitro* stimuli for the release of several peptide hormones such as for ex. luteinizing hormone, growth hormone, vasopressin, insulin and glucagon.

Utilizing a combination of GC/MS techniques we have documented the presence of epoxyacids in samples extracted and purified from rat liver, kidney, brain and pituitaries thus establishing the Epoxygenase as a new member of the Arachidonate Cascade.

REGIO AND STEREOSELECTIVITY OF STEROID HYDROXYLATIONS CATALYZED BY CYTOCHROME P-450 MONOOXYGENASES (Regio y Estereoselectividad en las Hidroxilaciones de esteroides catalizadas por el sistema Citocromo P-450 Monooxigenasas Gil, L.; Orellana, M. and Valdés, E. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

The wide versatility of the P-450 monooxygenases system in hydroxylating endogenous and exogenous substrates, results from the presence of multiple forms of P-450 isozymes. Testosterone (T) is hydroxylated by rat liver P-450 mainly to positions 2α, 6β, 7α, 16α and 17β, and Androstenedione (A) to positions 2β, 6β, 7α and 16α. Some of these hydroxylations are catalyzed by specific P-450 isozymes, thus the identification of some steroid metabolites is an excellent tool to establish P-450 isozymes contributions to microsomal activities in different tissues. We have recently published an HPLC method to quantify the main products of P-450 catalyzed (T) oxidations (Analytical Letters 17, 883-889, 1984). We have used this method to study the influence of sex and nutritional status in the expression of (T) and (A) microsomal hydroxylases in rat liver. No significant differences have been found between males and females in total (T) oxidative activity, but large differences in the expression of some regio and stereoselective hydroxylases were observed. Nutritional status effects deeply total (T) oxidative activity as well as the expression of some but not all hydroxylases. 7α steroid hydroxylase (P-450a) which is not modified by nutritional status might play a key role in the metabolism of physiological P-450 substrates. These results suggest that sex and nutritional condition modify the proportion of some P-450 isozymes in the liver, which might explain the differences in the activity of some steroid hydroxylases.

Supported by proyect B: 1970-8635, DIB, U.de Chile and 8025 FONDECYT.

SOBRE LOS MECANISMOS DE HEPATOTOXICIDAD DEL LINDANO (On the mechanisms of lindane hepatotoxicity). Junqueira, V.B.C.* , Barros, S.B.M.** , Simizu, K.* y Videla, L.A.

* Instituto de Química y ** Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. *** Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Lindane, a pesticide widely used in Brazil, is metabolized by smooth endoplasmic reticulum cytochrome P₄₅₀-system and is able to induce the synthesis of enzymes linked to the metabolism of xenobiotic and endogenous substances. After acute treatment of rats with lindane, liver steatosis have been observed. This morphological change seems to be related with lipid peroxidation, which is proposed as a mechanism to explain other tissue injuries. Indeed, increased amounts of liver cytochrome P₄₅₀, as well as, increased generation of superoxide anion by liver microsomes were measured and can be associated to the high levels of hepatic lipid peroxidation. Also, in the liver of these animals, the activities of superoxide dismutase and catalase are decreased. This fact can contribute to exacerbate lipid peroxidation, in addition to the enhanced capacity of the liver to generate superoxide anion. The glutathione status of hepatocytes is also altered by lindane as demonstrated by the increased hepatic and biliary content of GSSG, with consequent decrease of cellular and biliary GSH/GSSG ratios. We suggest that lindane treatment of rats, leads to an oxidative stress in the liver which can not be overpassed by the common cellular defense mechanisms.

FLAVONOIDS AS CYTOPROTECTIVE AGENTS AGAINST OXIDATIVE STRESS: EFFECT OF SILYBIN DIHEMISUCCINATE ON LIVER LIPID PEROXIDATION. Alfonso Valenzuela. Lab. Bioquímica Farmacológica, INTA. Universidad de Chile.

Silybin dihemisuccinate is a water soluble form of silymarin, a flavonoid extracted from the milk thistle *Silybum marianum*. Silybin has been proved to be an effective protective agent against the hepatotoxicity of phalloidin, α -amanitin and carbon tetrachloride. Although the protective mechanism of the flavonoid has not been elucidated, it is generally accepted that exerts a membrane stabilizing action preventing or inhibiting lipid peroxidation. Phenylhydrazine has been known as a hemolytic and hepatotoxic agent capable of inhibit the function of liver microsomal cytochrome P-450 inducing lipid peroxidation. A single intraperitoneal dose of silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by the hydrazine on a hemoglobin-free rat liver perfusion system.

Liver microsomes are highly sensitive to lipid peroxidation when are incubated in the presence of NADPH and Fe²⁺-ADP or t-butyl hydroperoxide. In this situation, the addition of different concentrations of silybin dihemisuccinate to microsomes can inhibit only lipid peroxidation induced by NADPH-Fe²⁺-ADP, assessed as oxygen consumption, spontaneous chemiluminescence or malondialdehyde formation. The low inhibitory effect of the flavonoid observed in the t-butyl hydroperoxide induced peroxidation may be explained by the difference in the free radical species produced during microsomal lipid peroxidation. It is postulated that silybin acts directly by trapping $\cdot OH$ radicals formed during NADPH-Fe²⁺-ADP microsomal oxidation being incapable of scavenge the t-butoxy free radicals. These properties described for the flavonoid may be the basis of many of its experimental and therapeutical effects observed in the treatment of many liver diseases, were oxidative stress in an important component.

Supported by DIB. Grant B-2399-8613 and by Dr. Madaus GMBH & Co.

INFLUENCIA DE LA EDAD SOBRE LOS CAMBIOS EN LIPO PEROXIDACION (LP) HEPATICA INDUCIDOS POR LA INGESTA AGUDA DE ETANOL (E) EN RATAS. (Age-dependent changes in rat liver lipid peroxidation induced by acute ethanol ingestion). VIDELA, L.A. Unidad de Bioquímica, Dept. Ciencias Biológicas, Fac. Med. Div. Occidente, Universidad de Chile.

Acute E ingestion is able to induce LP in the liver of experimental animals. This effect of E has been shown to be influenced by fasting GSH depletion, iron overload, previous chronic E intake and treatment with antioxidants, and could also be affected by aging in which a free radical reaction mechanism seems to be involved.

The study of the influence of the age of the animals (13-53 weeks) on total liver thiobarbituric acid reactive substances (TBAR) content showed an increase which is maximal in rats of 39 weeks of age, followed by a diminution in the 53 weeks old group, compared to young animals (13 weeks). In this situation, the content of hepatic GSH was decreased with aging while that of GSSG was enhanced in the oldest group studied. Acute E treatment (5 g/kg for 6 hr) resulted in a marked increase in liver TBAR in young animals, together with a decline in GSH content and an enhancement in GSSG. These changes elicited by E were reduced with aging. It is suggested that E-induced oxidative stress in the liver is diminished with aging despite the progressive decrease in glutathione content observed in control animals, probably due to a diminution in the total oxidative activity of the tissue. In fact, *in vivo* E metabolism, total activity of alcohol dehydrogenase and microsomal E oxidation declined with age, concomitantly with a reduction in cytochrome P-450 content and microsomal functions related to oxidative free radical reactions (DIB, U. de Chile, B-1860).

METABOLISMO DE LIPIDOS

Coordinador: *Flavio Nervi*

INFLUENCE OF BILE ACIDS ON CHOLESTEROL AND TRIGLYCERIDE METABOLISM IN ISOLATED HEPATOCYTES.

Barth, C.A. and del Pozo, R., Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung, Bundesanstalt für Milchwissenschaft, Kiel, Germany.

In vivo evidence suggests a regulatory influence of bile acids on liver lipid dynamics. However, only isolated liver cell systems allow to determine whether these effects are exerted by direct influence within the hepatocyte (or merely a reflection of interference with intestinal lipid absorption).

Monolayer cultures proved to be particularly suitable because kinetics and cell biology of transcellular bile acid transport display in vivo characteristics (P.N.A.S. (USA) 79, 4985-4987(1982)). 10 μ M taurocholate inhibited HMG-CoA reductase (E.C.1.1.1.34) completely showing that there is a "direct intrahepatic" regulation of sterol synthesis by bile acids.

Moreover, 50-150 μ M taurocholate inhibited very low density lipoprotein triglyceride secretion from 30 to 87 % in freshly isolated hepatocytes within 180 min. Data will be presented which strongly suggest an interference with assembly and/or secretion of preformed lipoprotein particles. This effect caused by concentrations occurring physiologically in the portal vein, explains the hitherto poorly understood reciprocal relation between bile acid pool size and rate of secretion and concentration of serum triglycerides.

DROGAS HIPOLIPIDEMIANTES. UNA NUEVA HIPOTESIS SOBRE SU MODO DE ACCION. (Hypo-lipidemic drugs. A new hypothesis on their mode of action). Bronfaan, M. Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

A pesar de que el clofibrato y sus análogos, así como otras drogas hipolipidémicas son ampliamente usados en clínica, en la prevención de la arteriosclerosis, su modo de acción no se conoce. Aparte de su efecto hipolipidémico, estos compuestos producen toda una serie de efectos colaterales en animales de experimentación, los que incluyen hepatomegalia, proliferación peroxisomal y efectos metabólicos varios. Además, estos compuestos han sido propuestos como un nuevo tipo de cancerígenos químicos.

Recientemente hemos podido demostrar que tres drogas hipolipidémicas, el clofibrato y dos de sus análogos, son activados a acil-Coenzima A tioésteres tanto por fracciones microsomales de hígado de ratón, como por acil-coenzima A sintetasa purificada a partir de esa fracción subcelular, y que estos derivados son formados in vivo por el hígado. Estos hechos nos ha llevado a proponer que la activación de estas drogas a acil-coenzima A derivados sería la etapa fundamental en la acción de estos compuestos. En esta exposición, se resumirán las principales evidencias experimentales que apoyan esta hipótesis, que permitiría explicar, simultáneamente, los diversos y disímiles efectos metabólicos de las drogas hipolipidémicas.

(Financiado por Proyecto DIUC 82/86)

EFFECTO DE LOS ACIDOS GRASOS SOBRE LAS PROPIEDADES FISICAS DE LAS MEMBRANAS Y LA CINETICA ENZIMATICA. (Effect of fatty acids on the physical properties of membranes and the enzyme kinetics). Brenner, R.R., Soulages, J.L. and Castuma, C.E. Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), UNLP-CONICET, Fac.de Cs.Médicas, Universidad Nac.de La Plata, La Plata, Argentina.

Usando como modelo a la membrana del retículo endoplásmico del hígado de cobbya, se trató de investigar la relación existente entre la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos constituyentes, las propiedades dinámicas y estructurales de los mismos en la membrana y la cinética de la UDP-glucuronil transferasa. La modificación de la composición de los ácidos grasos se realizó con una dieta carente de grasa. Las propiedades físicas de la membrana y sus lípidos fueron monitoreadas midiendo la anisotropía de fluorescencia del difenilhexatrieno, y la polarización de fluorescencia del ácido parinárico. En ciertos experimentos se usó membranas microsomales y en otros retículo endoplásmico rugoso. Se observó que la dieta deficiente en grasas modificó la proporción relativa de ácidos no saturados y saturados disminuyendo el araquidónico y el linoleico e incrementando el oleico. El índice de dobles ligaduras fue disminuyendo pero no se alteró la proporción relativa de los diversos fosfolípidos y el colesterol. Los cambios de composición fueron acompañados por disminución de la difusión rotacional y lateral de las membranas y sus lípidos. Correlativamente con estos resultados la cinética de la UDP-glucuronil transferasa fue modificada de no micasiana a micasiana, los Kms de las reacciones componentes fueron aumentados y la velocidad máxima disminuida. En consecuencia la composición de los ácidos grasos de la dieta influye en la composición química del retículo endoplásmico modificando las propiedades físicas de la membrana y alterando la cinética de sus enzimas.

INTERACCION DE PEROXISOMAS Y MITOCONDRIAS EN LA OXIDACION DE ACIDOS GRASOS EN HEPATOCITOS.

(Peroxisome-mitochondria interaction in fatty acid oxidation by hepatocytes). Leighton, F., Nicovani, S., Manzano, M., Soto, U. y Necocchia, C. Departamento de Biología Celular, Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile.

Existe un número creciente de evidencias que señalan que los sistemas peroxisomal y mitocondrial interactúan en la oxidación de ácidos grasos por hepatocitos. Esta interacción se observa en la cetogénesis mitocondrial a partir de acetato y ácidos grasos cortos de origen peroxisomal. En el catabolismo peroxisomal de los ácidos carboxílicos hidrofóbicos que las mitocondrias oxidan mal, entre estos C22:1, ácidos saturados de cadena muy larga y ácidos poliinsaturados. En la reoxidación de NADH producido en la oxidación peroxisomal. En la participación de la palmitoil-carnitina transferasa mitocondrial externa en la regulación de la función peroxisomal y en la regulación de la proliferación peroxisomal inducida por drogas y, finalmente, en el requisito de ATP de origen mitocondrial para la oxidación de ácidos grasos en peroxisomas.

Recientemente hemos establecido que la velocidad de oxidación peroxisomal de ácidos grasos en hepatocitos aislados depende del contenido en ATP de estas células. Los inhibidores mitocondriales y otros que reducen los niveles de ATP, reducen paralelamente la oxidación peroxisomal mientras que la oxidación mitocondrial solo se afecta en condiciones de reducción severa. No está claro a qué nivel se ejerce este efecto, pero las evidencias experimentales descartan la activación de ácidos grasos.

Estas y otras observaciones indican que tal como se ha establecido para otros aspectos del metabolismo en células vegetales, los peroxisomas interactúan con mitocondrias también en células animales.

Financiado por proyectos DIUC 79/86 y FONDECYT 1181/85.

DETERMINANTES INTRAHEPATICOS DE LA EXCRECION BILIAR DE COLESTEROL (Intrahepatic determinants of biliary cholesterol excretion). Nervi, F., Marinović, I., Rigotti, A. y Ulloa, N. Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

El principal factor conocido capaz de modificar la excreción biliar de colesterol (C) es el flujo biliar de sales biliares. Estudios de este laboratorio han sugerido que la canalización metabólica del C libre a través de las vías de almacenamiento (C ester) o de excreción del hepatocito (C lipoproteico, síntesis de sales biliares) determinan la cantidad de C disponible para ser excretado a la bilis (B.B.A. 753:164, 83; J. Clin. Invest. 74:2226, 84). En este estudio hemos correlacionado las excreciones biliar y sinusoidal de C en ratas macho Wistar alimentadas con dietas que aumentan el C biliar (Diosgenina 1%) o la producción de lipoproteína VLDL (Fructosa 30%). Al agregar 30% Fructosa (Fr) a la dieta con 1% Diosgenina (D) el C biliar disminuyó de 595 ± 169 nmoles/h/g ($p < .001$). El flujo biliar, el débito de sales biliares y el de fosfolípidos no se modificaron. La secreción sinusoidal de C lipoproteico se estudió en el hígado aislado. La secreción de triglicérido en VLDL aumentó de 95 ± 26 a 414 ± 100 nmoles/h/g ($p < .001$) y la de C de 47 ± 9 a 90 ± 22 nmoles/h/g ($p < .02$) en ratas alimentadas con D+Fr. Se aisló además de los perfusados otra fracción de $d > 1.006$ g/ml, la secreción de C de esta fracción aumentó de 84 ± 19 a 209 ± 32 nmoles/h/g ($p < .001$) en el grupo D+Fr. La síntesis de sales biliares se midió en los mismos grupos con la técnica de depleción del pool de sales biliares. Este parámetro no se modificó. Se concluye que la canalización metabólica del C hepático a través de la vía lipoproteica sinusoidal modifica marcadamente la excreción biliar de C, independientemente de la excreción de sales biliares. Se sugiere además que el pool hepatocitario de C precursor del C de excreción lipoproteica y el de excreción biliar están metabólicamente relacionados a diferencia del pool de C precursor de la síntesis de sales biliares.

MECANISMOS DE ACCION DE ENZIMAS: METODOLOGIA CLASICA, DE FLUORESCENCIA Y NMR

Coordinadores: *Emilio Cardemil, Octavio Monasterio*

ENZIMAS Y MODELOS QUIMICOS EN LA BIOSINTESIS DE MONOTERPENOS CICLICOS (*Enzymes and chemical models in the biosynthesis of monoterpenes*). Cori, O.; Portilla, G. y Rojas, M.C. Depto. Química, Fac. de Ciencias, Univ. de Chile.

Las carbociclasas de *Citrus limonum* catalizan la síntesis de monoterpenos monocíclicos (Limoneno) y bicíclicos (y pineno) a partir de geranilbifosfato (GPP), nerilbifosfato (NPP) y linalilbifosfato (LPP). Requieren cationes bivalentes.

Estos mismos cationes (Mn^{2+} , Mg^{2+}) catalizan la solvólisis no enzimática de estos tres substratos con formación de prenoles e hidrocarburos cíclicos y acíclicos. El complejo bimetálico ($RPP-M_2^+$) es el complejo más reactivo. La adición de un nucleófilo (NaN_3) da lugar además a la formación de un azido-derivado. Cambios en el grupo saliente indican un mecanismo de pares iónicos ($R^+ \dots OPO_2M_2$).

En la formación enzimática de hidrocarburos los únicos substratos son los complejos bimetálicos de GPP, NPP o LPP ($RPP-M_2^+$).

Las carbociclasas forman solamente el hidrocarburo monocíclico limoneno a partir del enantiomero S del compuesto cíclico terpinilbifosfato. Esto demuestra que los terpenos bicíclicos (pinenos) se forman directamente por plegamiento de los precursores acíclicos, probablemente en una reacción concertada.

Se presentarán datos inéditos de M. Alarcón y V. Avalos. Financiado por DIB, Univ. de Chile y FONDECYT, Chile.

METAL ION ACTIVATION AND ACTIVE SITE STRUCTURE OF YEAST ENOLASE. Nowak, T.
Department of Chemistry, University of Notre Dame, U.S.A.

Enolase activation by $Mn(II)$ and enolase binding of $Mn(II)$ and of 2-phosphoglycerate (2-PGA) using EPR and proton relaxation rate enhancement (PRR) were measured as a function of pH. At pH > 7.0 steady state kinetics showed activation and metal inhibition. One $Mn(II)$ site per monomer was measured but in the presence of 2-PGA, 3 binding sites are observed. Below pH 6.6, $Mn(II)$ inhibition weakens and disappears and only 2 $Mn(II)$ binding sites are observed. The third site must be inhibitory. Binding sites I ($K_D=0.7-2.1 \mu M$) and II ($K_D=9-60 \mu M$) are nearly pH independent from pH 7.5 to 5.2. Activation by $Mg(II)$ elicits a higher V_m and has a greater K_m' than with $Mn(II)$. Kinetics at subsaturating $Mg(II)$ with the addition of micromolar $Mn(II)$ shows a hyperbolic decrease in activity to yield a specific activity as observed with only $Mn(II)$. An EPR study shows only one $Mn(II)$ site per monomer, $K_D=5.4 \mu M$, in the presence of 2-PGA and 0.5 mM $Mg(II)$. PRR titration studies with 2-PGA or with inhibitors indicate that the $Mn(II)$ binds at site I while $Mg(II)$ resides at site (II). Occupancy at site I, the catalytic site, determines the turnover rate. Both ^{31}P and 1H NMR studies of $E \cdot Mn \cdot S$ and $E \cdot Mn \cdot Mg \cdot S$ complexes, where S is substrate or inhibitor, confirm this.

The epoxide derivative of phosphoenolpyruvate (PEP) was synthesized and found to be an inhibitor of enolase but inhibition is reversed by hydrolysis at room temperature. Kinetics of inhibition and product identification are consistent with an active site carboxylate. Treatment with the phosphate derivative ferrate yields loss of activity with loss of 2 arg per monomer. In the presence of 2-PGA only 1 arg is lost. Binding studies of $Mn(II)$ and 2-PGA to modified enolase suggest modification at the active site.

This research is supported by NIH Grant AM17049.

ESTRUCTURA Y MECANISMO DE LA ENZIMA GABA TRANSAMINASA
Jorge E. Chruichich, Departamento de Bioquímica,
Universidad de Tenn, Knoxville, Tenn, USA

La enzima aislada del cerebro contiene una molécula de cofactor por dímero de proteína.

Estudios hidrodinámicos demostraron que la enzima de un peso molecular de 100,000 posee un tiempo de correlación de 65 nanosegundos. Usando resonancia magnética nuclear se demostró que la señal del cofactor no cambia cuando el pH se varía de 6 a 7.5.

El grupo fosfato del cofactor está en contacto con aminoácidos de carga positiva. La secuencia de un péptido del centro activo ha revelado que el cofactor está unido a una región de la enzima cuya secuencia es diferente de la secuencia de la aspartato aminotransferasa.

La reacción de la enzima con los substratos 3-alanina y 4-aminobutirato fue estudiada usando técnicas espectrofotométricas. Los parámetros K_{CAT} y K_m fueron determinados usando métodos cinéticos clásicos. La constante de primer grado correspondiente a la conversión de piridoxal-5-P a piridoxamina-5-P fue determinada usando técnicas espectrofotométricas rápidas. Se encontró que K_I es idéntica a K_{CAT} . La cinética de la reacción de la enzima con gabaculina, un inhibidor específico, fue estudiada con métodos espectroscópicos.

TIROSINQUINASAS EN ORGANISMOS FOTOSINTETICOS. (Tyrosine kinases in photosynthetic organisms). Vallejos, R.H.

Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CONICET, F.M. Lillo, Universidad Nacional de Rosario) Suipacha 531, Rosario, Argentina.

La regulación metabólica por fosforilación-desfosforilación de enzimas es un mecanismo bien conocido y de creciente complejidad. Recientemente se ha encontrado en tejidos animales un grupo de proteinquinasas que fosforilan específicamente en tirosina y que están asociadas con la regulación del crecimiento celular y con oncogenes. Algunas proteínas transformantes retrovirales son tirosinquinasas y hay homología en su secuencia con los receptores de insulina y EGF.

L. Holuigue estudió la fosforilación de proteínas en la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum*. Analizando los fosfoaminoácidos presentes encontró, trabajando junto con H.A. Lucero y M. Torruella, la presencia de fosfotirosin proteínas tanto en experimentos in vitro utilizando ATP (γ - P^{32}) como en experimentos in vivo usando P_i^{32} . La existencia de tirosinquinasas(s) en *R. rubrum* fue confirmada utilizando sustratos exógenos y mediante la purificación parcial de un extracto libre de células por cromatografía de afinidad.

Comprobada la existencia de tirosinquinasas en una bacteria fotosintética nos preguntamos si estarían presentes también en plantas superiores. El uso de sustratos exógenos específicos para tirosinquinasas nos permitió comprobar su actividad en plántulas de arveja. La purificación por electroforesis de fosfopolipéptidos seguida del análisis de fosfoaminoácidos corroboró su presencia.

Resultados recientes obtenidos por M. Torruella han permitido caracterizar cinéticamente la tirosinquinasas(s) de arveja e identificar a uno de los sustratos endógenos como un polipéptido de 58,5 kDa mediante el uso de anticuerpos anti fosfotirosina.

ORGANIZACION DEL METABOLISMO

Coordinador: *Tito Ureta*

MEASUREMENTS OF TIME PATTERN CONVERSIONS IN GLYCOLYSIS. Markus, M., Müller, S.C. and Hess, B. Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie, Rheinlanddamm 201, D-4600 Dortmund 1, FRG

Theoretical work [1,2] has shown that glycolysis acts as a converter of one time pattern into another: a constant substrate input flux brings about a constant or a periodic response, while a periodic input flux yields different types of periodic, quasiperiodic and chaotic responses.

Measurements were performed with glycolyzing yeast extracts. As input, glucose was injected using a computer controlled pump. As response, the fluorescence of NADH was recorded. A constant input flux yielded constant or periodic responses as expected. For a sinusoidal input flux, 104 response traces were measured at different input amplitudes and frequencies. 74 of these responses were periodic, the periods being 1,2,3,4,5,7, or 9 times the input period. 19 responses were quasiperiodic (sums of periodic oscillations). 11 responses were chaotic, i.e. oscillations were obtained having unpredictable amplitudes and frequencies. Several techniques, including stroboscopic plots and determination of the maximum Liapunov exponent, were applied to show that these responses were indeed chaotic.

Regions containing the different types of responses could be outlined on the plane defined by the input amplitude and the input frequency. The location of these regions is in good agreement with the theoretical predictions.

- [1] Markus, M. and Hess, B., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 81, 4394-4398 (1984)
 [2] Markus, M. and Hess, B., Arch.Biol.Med.Exp. 18, 261-271 (1985)

AMBIGUITOUS ENZYMES: A DYNAMIC ASPECT OF CELLULAR ORGANIZATION. John E. Wilson, Department of Biochemistry, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824 U.S.A.

Cellular location (e.g., "mitochondrial", "nuclear", etc.) is sometimes thought of as an invariant property of enzymes, or more generally, of proteins. Though in many cases such a static view is warranted, in others it clearly is not, and the disposition of a protein within the cell has been found to be influenced markedly by the status of cellular metabolism. It now appears that physical translocation of macromolecular components should be considered as an important factor in regulation of a number of metabolic processes. The word "ambiguitous" has been suggested to denote those enzymes whose intracellular distribution may vary in response to altered cellular metabolism. Brain hexokinase has been proposed as one example of an ambiguitous enzyme. Originally, the enzyme was envisaged to vary in its distribution between a mitochondrially-bound form and a cytoplasmic location, the mitochondrially-bound form being more active and hence change in intracellular distribution being a regulatory mechanism. Though the essentials of this original proposal may be correct, the actual situation now appears to be somewhat more complex, and extensive release of the enzyme into the cytoplasmic compartment probably does not occur under normal circumstances. However, more marked movement between cellular compartments has been observed with several other enzymes (e.g., CTP: phosphocholine cytidyltransferase, protein kinase C) and thus the concept of ambiguitous behavior merits continued consideration as a potential regulatory mechanism in cellular metabolism. A conceptually analogous situation is the movement of glucose transporters between the plasma membrane and intracellular reservoirs, which appears to be of significance in governing glucose transport capability in certain tissues. (Work with brain hexokinase has been supported by NIH Grant NS09910).

THE ORGANIZATION OF GLYCOLYSIS. (Organización de la glicólisis). Ureta, T. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

A fair amount of data exists purporting to show that most glycolytic enzymes do not float freely in the cytoplasm. Instead, the enzymes seem to be reversibly bound to specific proteins of the cytoplasmic matrix or of some membranes. Experiments from several laboratories which show that aldolase, phosphofructokinase and glyceraldehyde 3-P dehydrogenase (among other enzymes) are reversible bound to muscle actin will be described. Also, the reversible binding of glyceraldehyde 3-P dehydrogenase, phosphofructokinase and phosphoglycerate kinase to protein Band 3 of red cell membranes, will be summarized. The functional significance of these interactions, as shown by the fact that several relevant metabolites can affect the binding and also by observations that allosteric properties may differ in the free, as opposed to the bound enzyme, will be given special emphasis.

A few observations from the author's laboratory will be presented: in the frog oocyte isotopic dilution by hexose phosphates of glycogen deposition is observed only if labeled glucose is supplied as extracellular substrate as opposed to microinjected glucose, in which case no isotopic dilution by hexose phosphates occur. Thus, the mode of entry of glucose affects the intracellular path to be followed suggesting extensive compartmentation of glucose metabolism. (Supported by Departamento de Investigación y Bibliotecas, Universidad de Chile).

Simposio

NEUROBIOLOGIA

Coordinadores: *Hugo F. Maccioni, Fernando Orrego*

EL AMBIENTE MEMBRANACEO DEL RECEPTOR COLINERGICO NICOTINICO (The membrane environment of the nicotinic acetylcholine receptor) Barrantes, F.J. Instituto de Bioquímica, Universidad Nacional del Sur y CONICET, 8000 Bahía Blanca, Argentina.

In spite of the wealth of biochemical and electrophysiological data which have made the acetylcholine receptor the best characterized neurotransmitter receptor protein, the lipid matrix in which the latter is embedded has received much less attention. Biochemical and biophysical studies conducted in our laboratory are aimed at defining the structural and dynamic properties of the AChR membrane. Lipid compositional studies have been conducted in three *Torpedinidae* species in parallel with metabolic studies using radio-labelled precursors. Unsaturation is characteristically found in most major phospholipids, except for phosphatidylcholine. Long-chain polyunsaturated fatty acids constitute more than 50% of the population. Among these, docosahexaenoate makes up more than 70% in *T. marmorata*. Nitroxide spin labels of stearate (the major fatty acid in PC), as well as cholesterol- and phospholipid-spin probes sense fluid and immobilized lipid populations in AChR membranes. Lipid lateral diffusion appears to be a free process as sensed by fluorescence photobleaching recovery techniques, a property which probably reflects the above-mentioned compositional features of the membrane. Extraction of non-receptor, peripheral proteins is accompanied by depletion of certain minor phospholipid classes, a process which is manifested in changes of AChR dynamic properties: lateral diffusion, rotational correlation time (as measured by phosphorescence anisotropy decay), and distribution of the molecule in the plane of the membrane. The bulk physical properties of the AChR membrane lipids can account for the modifications of the AChR dynamic properties; the exact nature of the protein-lipid interactions remains to be explored.

BIOSINTESIS Y EXPRESION DE GANGLIOSIDOS DURANTE LA DIFERENCIACION NEURONAL (Biosynthesis and expression of gangliosides during neuronal differentiation). Maccioni H.J.F., Panzetta P. y Landa C.A. CIQUIBIC (UNC-CONICET) Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, 5016 Córdoba, Argentina.

Los gangliosidos (G) son un grupo heterogéneo de lípidos ricos en carbohidratos y que contienen ácido siálico. Están presentes en las membranas celulares de cordados y particularmente concentrados en el Sistema Nervioso Central (SNC). Se los ha involucrado en la regulación del ciclo celular, en interacciones celulares, transformación y regeneración celular, etc., pero el rol biológico no está establecido. Durante el desarrollo embrionario del SNC de aves y mamíferos los oligosacáridos de los gangliosidos cambian. Mientras que en estadios tempranos el oligosacárido al cual se unen los ácidos siálicos es un residuo lactosil (G simples), en estadios avanzados es un residuo galactosil-N-acetilgalactosaminil - lactosil (G complejos). Estudios realizados en retina de embrión de pollo en nuestro laboratorio indican que el cambio mencionado a) resulta de la modulación durante el desarrollo de la actividad de G glicosiltransferasas claves que determinan la disminución de G simples y el aumento de G complejos; b) es reproducible en retinas o células retinales de embriones tempranos "desarrolladas" en cultivo; c) ocurre en células neuronales; d) está determinado tempranamente; e) es independiente de contactos celulares histotípicos y del aporte continuo de factores embrionarios; d) es contemporáneo con la transición entre el estado proliferativo y no proliferativo de las neuronas retinales. Se considera posible que la aparición de gangliosidos complejos en la membrana neuronal contribuya al mantenimiento del estado diferenciado de las células neuronales.

DOMINIOS LIPIDICOS EN LA INTERACCION DE LA ACETILCOLINESTERASA CON LA MEMBRANA PLASMATICA NEURONAL (Lipidic domains in the interaction of acetylcholinesterase with the neuronal plasma membrane). Inestrosa, N.C. Grupo de Neurobiología Molecular. P. Universidad Católica de Chile, Santiago.

Las proteínas integrales de membrana están ancladas a ella por interacciones entre la bicapa lipídica y secuencias de aminoácidos hidrofóbicos localizados en los extremos COOH o NH₂- terminal. Estudios recientes indican, sin embargo, que algunas proteínas usan dominios lipídicos para anclarse a la membrana (VSG del *T. brucei*; Thy-1; Acetilcolinesterasa (AChE)).

En el caso del dímero de la AChE del órgano eléctrico de *Torpedo*, éste puede ser liberado de la membrana por una fosfolipasa c específica para fosfatidil inositol (PI) y luego de ser purificado tiene en su C-terminal un dominio lipídico de 3 kDa, rico en etanolamina, glucosamina, PI y ácidos grasos saturados y no saturados.

En el cerebro de los vertebrados, las formas tetraméricas de la AChE son las más abundantes, sin embargo éstas no son liberadas por fosfolipasa c. Esto nos llevó a marcar el dominio de la enzima que se asocia a la membrana, con un reactivo de afinidad iodinado que al ser fotooxidado se une a las regiones hidrofóbicas de la AChE. Se ha establecido la presencia de un fragmento de 7 kDa que contiene ácidos grasos pero no PI glucosamina y etanolamina.

Podemos concluir que la AChE dependiendo del estado molecular en que se encuentre (dímero o tetramero) usa para su interacción con la membrana neuronal dominios lipídicos distintos.

Financiado por FONDECYT (1015/85) y NIH (NS-16577).

ASPECTOS MOLECULARES DE LA "ANSIEDAD": n-BUTIL CARBOLINA 3 CARBOXILATO, UN LIGANDO ENDOGENO DEL RECEPTOR A LAS BENZODIAZEPINAS (Molecular aspects of 'anxiety': n-butyl carboline 3 carboxylate, an endogenous ligand of the benzodiazepine receptor). Medina, J. H., Peña, C., Novas, M.L., Paladini, A.C., De Robertis, E. Instituto de Biología Celular, Facultad de Medicina (UBA) Paraguay 2155 e Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Junín 956, Buenos Aires, Argentina.

El cerebro de los mamíferos contiene sitios receptores específicos para benzodiazepinas (BDZ) que median las acciones ansiolíticas, anticonvulsivantes, sedativas y miorelajantes de estas drogas. La existencia de sustancias endógenas que interactúan con los receptores BDZ en condiciones fisiológicas ha sido una cuestión de creciente relevancia biológica y fuente de considerables especulaciones, particularmente en relación con su probable participación en la fisiopatología de la "ansiedad".

Recientemente, a partir de cerebros bovinos hemos aislado, purificado e identificado al n-butyl carbolina 3 carboxilato (n-CCB) como un componente natural y genuino del SNC. Este compuesto presenta las siguientes propiedades y características:

1. Compite específica y selectivamente por los receptores BDZ ($K_i = 3 \text{ nM}$) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4952, 1986)
2. Su administración intraperitoneal (30 mg/kg) o intracerebroventricular (40 µg) a ratones disminuye el umbral a las convulsiones inducidas por ácido 3 mercaptopropiónico. Este efecto proconvulsivante es bloqueado por el antagonista específico de BDZ RO 15-1788.
3. En el test conductual de actividad exploratoria en un medio ambiente desconocido posee efectos opuestos (dosis dependiente) a aquellos provocados por la administración de BDZ.
4. Sus niveles aumentan selectivamente en la corteza cerebral de animales sometidos a una situación aguda de stress. Este incremento se previene con la administración previa de diazepam.

GLUTAMATE AS A BRAIN CORTEX NEUROTRANSMITTER.
Orrego, F., Miranda, R., Doria de Lorenzo, M.C.,
Riveros, N., Fiedler, J. and Villanueva, S.
Laboratory of Neurochemistry, Dept. of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine, Universidad de Chile.

We first studied, in 1975, whether exogenously added ^3H -glutamate (Glu) could be released by selective electrical stimulation of rat brain cortex slices in vitro. The results were negative, possibly because exogenous Glu is taken up mainly by glial cells. Similar results were obtained later, when endogenous Glu was labelled with ^{14}C -U-glucose, probably because of insufficient labelling of the transmitter pool. We then turned to study the presence of excitatory substances in isolated, purified brain cortex synaptic vesicles (SV), and found that they contain substantial amounts of an endogenous ligand for kainic acid (KA) receptors. Such ligand was found to be glutamate. Next, using highly purified SVs, and a sensitive radioreceptor assay for endogenous Glu, that uses high specific activity ^3H -KA as a ligand, we were able to estimate that each single glutamatergic brain cortex SV, contains 3600 Glu molecules. This value compares well with the number (6,000) of acetylcholine molecules in a quantum.

These findings, taken together with the presence of well defined glutamate receptors in the brain cortex, provides firm proof that Glu is a bona fide cerebrocortical neurotransmitter.

Supported by Projects DIB B 1590, Univ. de Chile; and Fondecyt N° 1018.

ENFERMEDAD DE CHAGAS: BIOQUIMICA DEL *TRYPANOSOMA CRUZI*

Coordinadores: *Juan J. Cazzulo, Nórbel Galanti*

HETEROGENEITY OF *Trypanosoma cruzi* SURFACE ANTIGENS DETECTED BY MONOCLONAL ANTIBODIES. Alves, M.J.M., Abuin, G., Gonçalves, M.F., Kuwajima, V.V. and Colli, W.

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 20780, São Paulo, Brasil.

Qualitative and quantitative heterogeneities were detected on the surface of several strains and clones of epimastigote forms of *T. cruzi* as judged by their agglutinability with lectins and a monoclonal antibody that recognizes two surface polypeptides of molecular weight 55,000 and 59,000. Two other monoclonal antibodies, specific for the trypomastigote stage which partially inhibit (50-70%) *T. cruzi* invasion of cell monolayers and recognize a surface glycoprotein of molecular weight 85,000 (Tc-85), were also able to immunoprecipitate, from metacyclic trypomastigotes, three polypeptides with molecular weights different from 85,000 (82,000 - 78,000 - 74,000) thus showing a variability in the molecular size of Tc-85.

Such phenotypic heterogeneity displayed on the surface of *T. cruzi* could be a reflection of a genetic heterogeneity in the parasite populations. However, some of the variations observed could be explained by modulation of antigen expression due to particular physiological conditions. Differences in molecular weight could also be due to post-translational modification of proteins and/or to highly antigenic epitopes common to otherwise completely different proteins.

Supported by UNDP/World Bank/WHO, FAPESP, CNPq and FINEP.

FERMENTACION AEROBICA DE LA GLUCOSA POR AMASTIGOTES DEL *TRYPANOSOMA CRUZI* DURANTE EL CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION A EPIMASTIGOTES (Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* amastigotes during growth and differentiation to epimastigotes). Engel, J.C., Franke de Cazzulo, B.M., Stoppani, A.O.M., Cannata, J.J.B. y Cazzulo, J.J.

Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chaben", Ministerio de Salud y Acción Social, Argentina; Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar; Cátedra de Química Biológica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires y Centro de Investigaciones Bioenergéticas, CONICET, Argentina.

Los amastigotes de cultivo axénico de *Trypanosoma cruzi* desarrollados a 28°C, alcanzan la fase estacionaria después de dos generaciones, se diferencian a epimastigotes y en ese momento reanudan el crecimiento. Los amastigotes fermentan la glucosa hasta succinato y acetato y no excretan NH₃; presentan actividades altas de hexoquinasa y PEP-carboxiquinasa y muy baja de citrato sintasa. El citocromo *c* está ausente y el citocromo tipo *b* está presente en muy bajo nivel. Los amastigotes catabolizan la glucosa y producen succinato y acetato a velocidades considerablemente menores. Presentan niveles más bajos de hexoquinasa y PEP-carboxiquinasa y mucho más altos de citrato sintasa y citocromos *c* y tipo *b*. Excretan NH₃ al medio, lo cual es índice del catabolismo de amino ácidos. Estos resultados sugieren que los amastigotes tienen un metabolismo esencialmente glucolítico, y que adquieren la habilidad de oxidar sustratos como los amino ácidos solo después de diferenciarse en epimastigotes.

ACTIVIDADES PROTEOLITICAS EN *TRYPANOSOMA CRUZI* (Proteolytic activities in *Trypanosoma cruzi*). Cazzulo, J.J. y Bontempi, E.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar e Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chaben", Buenos Aires, Argentina.

Trypanosoma cruzi contiene actividad proteolítica sobre diversos sustratos, entre ellos proteínas solubles del propio parásito. Hemos purificado hasta homogeneidad proteica, a partir de epimastigotes de la cepa Tulahuén 2, una proteasa ácida, que degrada seroalbumina bovina, hemoglobina y proteína soluble de *T. cruzi* (pH óptimo de 3 a 4) y caseína (pH óptimo de 5). La enzima es una glicoproteína monomérica, de peso molecular 60,000, que es retenida por Con A-Sepharosa y eluida con α -metil-D-manósido y α -metil-D-glucósido. Es fuertemente inhibida por reactivos de tioles (fluoresceína mercuriacetato y p-cloromercuribenzoato), tosil lisil clorometil cetona y leupeptina; el fenilmetilsulfonil fluoruro y el EDTA no la afectan. El β -mercaptoetanol y el glutatión reducido activaron la proteasa y revertieron la inhibición por organomercuriales. La enzima es particulada, con una latencia del 40% en fracciones obtenidas por mortereado, y presenta un perfil de solubilización por digitonina similar al de la α -manosidasa. Los datos experimentales sugieren que se trata de una proteasa lisosomal, con propiedades similares a las de la Catepsina B.

ACCION DE SUSTANCIAS TRIPANOCIDAS SOBRE SINTESIS DE PROTEINAS "IN VITRO" EN TRIPANOSOMATIDOS. (Effect of trypanocidal drugs on protein biosynthesis "in vitro" by trypanosomatids). González, Néilda S. y Cazzulo, Juan José.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Univ. de Buenos Aires (Argentina).

Las drogas tripanocidas efectivas contra el *Trypanosoma cruzi* usadas actualmente en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, son dos nitroheterociclododerivados: nifurtimox (N_f) y benzimidazol (B₂). Stoppani, Riche y col., han demostrado que, entre otros efectos, estas drogas inhiben la incorporación de precursores a macromoléculas (DNA, RNA y proteínas) "in vivo".

Hemos estudiado el efecto de drogas tripanocidas en la síntesis proteica "in vitro". Para ello se aislaron polisomas, enzimas activantes y factores tanto de *T. cruzi* como de *Crithidia fasciculata* cosechados en fase exponencial temprana, midiendo la incorporación de S³⁵-metionina a material insoluble en ácido tricloroacético, en ausencia o presencia de la droga. Tanto N_f como B₂ fueron inactivos hasta una concentración de 0.8 mM. En cambio, otras drogas efectivas contra la tripanosomiasis africana, pero no contra la enfermedad de Chagas, como Berenil (Be), Antricyde (Ant) y Suramina (S) fueron fuertemente inhibitorios a concentraciones más bajas (0.2 mM).

Paralelamente se estudió el efecto de esas sustancias en la distribución polisomal de lisados obtenidos en presencia de las drogas. En este caso, N_f y B₂ promovieron la degradación de polisomas, no así Be, Ant y S. Estos resultados sugieren que N_f y B₂ no tienen efecto primario sobre la síntesis de proteínas sino que alterarían algún otro evento metabólico indirectamente relacionado.

EFFECTOS DE ANTIOXIDANTES QUIMICOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA CADENA RESPIRATORIA DEL TRYPANOSOMA CRUZI. (Effects of chemical antioxidants over the growth and the respiratory chain of T. cruzi).

Morello, A., Aldunate, J., Ferreira, J., Repetto, Y. y Letellier, M.E. Departamento de Bioquímica y Química. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Casilla 70086 Santiago - 7 Chile.

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo T. cruzi. Este mal es endémico en Centro y Sudamérica; en Chile afecta aproximadamente a 400 mil personas. Las drogas actualmente en uso no son satisfactorias. El estudio de las diferencias bioquímicas entre parásito y huésped ha contribuido a explicar el modo de acción de drogas en uso y experimentales.

Se realizaron experimentos con epimastigotes intactos de T. cruzi (cepa Tulahuen). Los antioxidantes usados fueron tert-butil-4-hidroxianisol (BHA), 2,6-di-tert-butil-p-cresol (BHT), ácido gálico y sus propil y metil ésteres, catequina y ácido ascórbico.

El BHA y el BHT fueron los mejores inhibidores del crecimiento de T. cruzi a concentraciones bajo 0,5 mM, seguidos por el ácido gálico y sus ésteres y la catequina. El ácido ascórbico no tuvo efecto.

El consumo de oxígeno de epimastigotes fue inhibido en un 90% por 1 mM BHA o BHT. El ácido gálico y sus ésteres inhibieron el consumo en menor proporción. Al estudiar los cambios de los niveles redox en la cadena respiratoria (NAD(P), citocromos b, c y a) por efecto de estos inhibidores se comprobó que el NAD(P) se redujo y todos los citocromos se oxidaron. Esto indicaría que estos compuestos químicos actúan inhibiendo la cadena respiratoria en el segmento NAD(P)-citocromo b.

Experimentos realizados con tripomastigotes de Trypano soma brucei indican que BHA inhibe el consumo de oxígeno y actuaría en forma similar a como lo hace sobre T. cruzi. Financiado por UNDP/WB/WHO/TDR, por CONICYT-CHILE y por la Universidad de Chile (grant. B-1854).

Simposio

ENSEÑANZA DE LA BIOQUIMICA I

Coordinador: *Arnaldo Foradori*

ORGANIZACION DE UN SISTEMA DE DIVULGACION CIENTIFICA MASIVA (Organization of a system for providing scientific information to the general public). Belocopitow E.

Centro de Divulgación Científica y Técnica.
Sede: Instituto de Investigaciones Bioquímicas.
Patricias Argentinas 435. 1405 Buenos Aires.
Se encara la concientización de los argentinos sobre la necesidad de un mayor uso de la ciencia y su producto, la tecnología. Se propone la introducción de esta temática en los medios de comunicación social (Diarios, revistas, radio y TV) en forma intensiva. Se concluyó que el mejor hacedor de la información a introducir en dichos medios, sería una simbiosis, de investigador científico, quien proveería la información, y de periodista quien la procesaría para hacerla entendible, atractiva y capaz de penetrar en los medios masivos.

Esta asociación de investigador científico y periodista operaría en las instituciones en que desarrollan su trabajo los investigadores, las que normalmente cuentan con una buena biblioteca, constantemente actualizada.

Este sistema fue ensayado y sus resultados serán expuestos.

Se prevee la extensión del sistema ensayado a otros centros de concentración de investigadores científicos de nuestro país.-

LA ENSEÑANZA DE PREGRADO DE BIOQUIMICA EN LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA P.U.C. (Pregrade Biochemistry Teaching at the Medical Faculty of the P.U.C.).

Dr. Foradori A. Depto de Hematología/Oncología y UDA de Laboratorios clínicos - Fac. Medicina - Pontif. Univ. Católica - Santiago (Chile).

La estructura curricular para la enseñanza de la Medicina en la facultad de la Univ. Católica contempla 3 etapas de Formación e Información: 1.- Básico (corresponde a la Docencia de Asignaturas como Matemática, Física, Química General y Orgánica, Biología general y Citología etc), esta entregada a las Facultades ad hoc y en la Facultad de Medicina se completa el Estudio de la Biología del Hombre normal y la preparación científica básica (6 semestres); 2.- Patología y sus agentes (corresponde al estudio intensivo de los Agentes de las Enfermedades y las características morfológicas incluye Microbiología, Patología General Especial). En esta etapa además se analizan las drogas y fármacos vigentes (2 semestres); 3.- Clínica (se aplican los conocimientos previos a la persona enferma y se delinea la estrategia de recuperación de Salud (8 semestres con 4 de práctica inclusiva). La Bioquímica prop. tal se estructura en el tercer semestre y su contenido curricular se caracteriza por la integración de conocimientos de Química General y Orgánica con fenómenos Biológicos Relevantes (Biomoléculas, Metabolismo Intermedio, Biología Molecular e Hidrosalino. Se destaca la Metodica de auto aprendizaje con clases expositivas de refuerzo realizados por un grupo de Médicos Bioquímico. En forma periódica (aprox. c/2 semanas) se realizan seminarios de discusión y análisis de publicaciones relevantes o casos de interés que refuerzen el contenido a las clases. También es relevante la entrega previa a las clases expositivas del material gráfico que se usa en las clases. Lamentablemente la actividad experimental se ha suprimido (sólo se mantiene en forma optativa). Se presenta el modelo de docencia de la macromolécula de Hemoglobina y transporte de Oxígeno.

MUCHO SE PUEDE HACER ANTES QUE LLEGUEN LAS COMPUTADORAS. (Much can be done before the computers arrive). *Saffran, M.* Department of Biochemistry, Medical College of Ohio, Toledo, Ohio 43699 USA.

Computers are potentially great aids to learning and teaching. Until computers become available some of the characteristics of the computer can be reproduced by other teaching methods. (1) Student participation in learning can be achieved through classroom discussions and by the preparation of audiovisuals and examination questions by students. (2) Game-playing can be achieved by contests in biochemical knowledge and problem solving among individuals and between teams. (3) Instant feedback and evaluation are achieved by various forms of objective examinations. (4) Repetition and drill, especially in algebraic manipulations (e.g. buffers, enzyme kinetics), can be achieved with nomograms and slide rules. (5) A Computer Game can be used to combine most of the characteristics by having an instructor or even a student play the role of the computer, while other students take turns as "users". The rest of the class are spectators and learn through the efforts of the participants, while they wait for their own turn to play the game. The Computer Game prepares instructors and students for the coming of computers by teaching the steps used in developing and using computer-assisted instructional programs. (6) Some of the graphic power of computers can be approached by conventional audiovisual methods, particularly the overhead projector.

ENSEÑANZA DE LA BIOQUIMICA II

Coordinador: *Luis Izquierdo*

ENSEÑANZA DE POSTGRADO EN BIOQUIMICA EN CHILE. EL PROGRAMA DE DOCTORADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE. (Postgraduate teaching in Biochemistry in Chile. The doctorate program of the Faculty of Sciences of the University of Chile).

Babul, J. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Las universidades chilenas ofrecen actualmente cinco programas de Magíster y cuatro de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular. El Programa de Doctorado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile es el más antiguo y se inició en 1971. Depende administrativamente de la Escuela de Postgrado de esa Facultad, sin embargo cuenta con la colaboración de numerosos investigadores de otras facultades, tanto de la Universidad de Chile como de otras universidades del país.

La actividad fundamental del Plan de Estudios es la realización de la tesis, pero además incluye cursos, seminarios (bibliográficos, de investigación, de avances de tesis) y unidades de investigación. Finalizados los cursos recomendados, se debe aprobar un Examen de Calificación en el que se exige la presentación de una revisión bibliográfica crítica. Posteriormente, se debe presentar un proyecto de tesis bajo el patrocinio de un profesor. El trabajo de tesis se evalúa anualmente (avances de tesis). La defensa de tesis es una presentación oral ante una comisión ad hoc. El Examen de Grado es un acto público donde el candidato muestra su trabajo a la Comisión de Postgrado y a la comunidad académica. Desde 1971 ingresaron 78 alumnos (60% Bioquímicos, 14% Licenciados en Biología, 13% Químicos Farmacéuticos), 26 se graduaron (73% Bioquímicos, 20% Licenciados en Biología) y 30 se retiraron (50% por cambio a otro Programa). El promedio de duración de la residencia es de 5,5 años. El 70% de los graduados se desempeña en universidades chilenas.

EL PROGRAMA DE POSGRADO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DEL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD DE SAO PAULO. (The graduate program at the Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of Sao Paulo. A study case). Chaimovich, H. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

The aim of this presentation is to describe the evolution of the graduate program at the Department of Biochemistry of the Institute of Chemistry at the University of São Paulo (QBQ). The program. Leading to MSc and PhD degrees, started in 1970 placing a heavy emphasis in research for both degrees. The evolution of scientific production, as measured by the total number of publications from the QBQ, shows a rapid increase from 1970 up to 1978 where a (slow rising) plateau was reached. In the last five years publications amount to ca. 1.4/research advisor/year and the value of the parameter [publications/(MSc + PhD)] is ca.4. These figures show a good correlation with the initial investment made in the Department by a Project-oriented program judged, by an international panel on a merit basis. After 15 years, the adolescence problems of the program, including expansion, redefinition of goals, new investments, areas of interest are begging to be felt. The problems of the graduate program will have to be solvent within the framework of the Brazilian Policy for Science and Technology for the next decade which includes, as one of its major goals, a ten-fold increase in the number of scientists involved in Biotechnology, including Biochemistry.

METABOLISMO DE OLIGO Y POLISACARIDOS I

Coordinador: *Horacio G. Pontis*

POLISACARIDOS SOLUBLES DE ALGAS. (Soluble polysaccharides from seaweeds). Matsuhiro, B. Departamento de Química, Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile.

Los polisacáridos de interés económico de macroalgas de las divisiones Phaeophyta y Rhodophyta localizados en la pared celular o en la matriz intercelular, pueden extraerse con agua a diferentes pH.

Poco se conoce sobre las rutas bioquímicas y biofísicas de la síntesis, transporte, secreción y ordenamiento extracelular de los mismos.

Las estructuras químicas de estos polisacáridos varían desde estructuras irregulares a otras más regulares con menor número de monosacáridos constituyentes con la evolución de las algas.

Los polisacáridos extraídos de especies de las familias Gigartinales y Gelidiales (Rhodophyta) se estudiaron por hidrólisis total, metanálisis, fraccionamiento, metilación, cromatografía gas-líquido y espectrometría de masas. De los resultados obtenidos y de otros de literatura, se concluye que todos los polisacáridos de algas rojas, carragenanos, irideanos y agaranos son mezclas de galactanos con diferente grado de sulfatación y diferente contenido de 3,6-anhidrogalactosa.

Interesantes resultados, que no concuerdan con algunos descriptos en la literatura se han encontrado para los polisacáridos provenientes de diferentes fases del ciclo de vida de *Chondrus canaliculatus*, *Iridaea membranacea*, *I. ciliata* e *I. laminarioides*.

De *Lessonia trabeculata* (Phaeophyta) por extracción secuencial se obtuvieron diferentes polisacáridos cuyas estructuras corresponden a laminarano, fucanos y ácido alginico.

GLYCOGEN SYNTHESIS IN THE MICROINJECTED FROG OOCYTE. (Síntesis de glicógeno en oocitos microinyectados de rana). Radojković, J. and Ureta, T. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Stage VI frog oocytes metabolize glucose mainly for glycogen synthesis inasmuch as neither glycolysis nor gluconeogenesis are operative at this stage because of the absence of phosphofructokinase and fructose-1,6-bisphosphatase activities. Thus, these cells serve as a convenient model for the study of polysaccharide deposition from glucose.

Unlabeled microinjected glucose 6-P, glucose 1-P, fructose 6-P or UDPglucose do not dilute the incorporation of microinjected labeled glucose even at a ten-fold excess. On the other hand, CO₂ production is markedly depressed by the intermediates with the only exception of UDPglucose. A rather drastic change can be observed if the intermediates are microinjected in cells incubated in a medium containing labeled glucose. Under these conditions, isotopic dilution was observed with the exception of fructose 6-P.

The results suggest that a classic pathway of glycogen synthesis operates in amphibian oocytes incubated in a glucose-containing medium. However, microinjected glucose seems to follow a different pathway which does not involve glucose 6-P, glucose 1-P or UDPglucose. The participation in this pathway of amylo-1,6-glucosidase seems unlikely. A few preliminary experiments suggesting the participation of triose-P in the suggested pathway will be presented. (Supported by the Departamento de Investigación y Bibliotecas, Universidad de Chile).

SUCROSIL OLIGOSACARIDOS: SU ROL COMO SUBSTANCIAS PROTECTORES FRENTE A FENOMENOS ADVERSOS EN PLANTAS. UNA VISION GENERAL. (Sucrosyl oligosaccharides: its role as protecting substances against adverse conditions in plants. An overview.) Pontis, H.G. Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, y Centro de Investigaciones Biológicas (F.I.B.A.), Casilla de Correo 1348, 7600 Mar del Plata.

Los sucrosil oligosacáridos, o sea aquellos basados en la molécula de sacarosa, constituyen un grupo importante dentro de los oligosacáridos primarios. Se encuentran libres en las células vegetales en cantidades significativas. Son el resultado de que en algún momento de la evolución de las plantas se "inventaron" actividades enzimáticas capaces de sintetizar oligosacáridos adicionando restos glicosilos, ya sea a la mitad glucosa o a la mitad fructosa de la sacarosa. Se encuentran ampliamente distribuidos y cumplen una función no solamente de reserva sino que también aparecen como cumpliendo una función protectora frente a algunas situaciones de stress, en particular fría.

Esta función está bien estudiada para los oligosacáridos de la familia de rafinosa donde se ha demostrado la dependencia con la temperatura y además con el fotoperíodo. En el caso de la familia de fructanos, se ha determinado una correlación entre la temperatura del suelo y el nivel de cada término de una serie de fructanos presentes en tubérculos de *Helianthus tuberosus*, mientras que en aquellas plantas como trigo, donde la parte aérea está expuesta a las distintas condiciones climáticas, se observa una acumulación de polímeros después de un shock de frío. Este último sistema se usa para determinar cómo se afectan las distintas actividades enzimáticas al producirse la situación de stress y su cese.

Apoyado por CONICET y CIC.

FOSFORILASA EN AMILOPLASTOS DE TUBERCULO DE PAPA. (Phosphorylase in potato tuber amyloplasts). Tandecarz, J.S., Moreno, S. y Cardini, C.E. Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Se han descripto en células de plantas superiores múltiples formas de fosforilasa separables por métodos cromatográficos o electroforéticos. Steup y Laszko (Planta 145, 69, 1979) lograron definir claramente fosforilasas citosólicas y plastidiales en tejidos fotosintéticos. Se ha postulado que amiloplastos y cloroplastos están ontogénicamente relacionados. Sin embargo, es probable que los mecanismos que operan en la formación y degradación de almidón de reserva en amiloplastos sean diferentes de los que operan en la asimilación de almidón en cloroplastos, donde el control se ejercería vía el translocador de fosfato. Por medio de técnicas inmunológicas, Schneider y col. describieron la localización de fosforilasa exclusivamente en amiloplastos de tubérculo de papa durante el período de acumulación de almidón, sugiriendo que la enzima podría desempeñar también un papel en la síntesis y no sólo en la degradación del polisacárido.

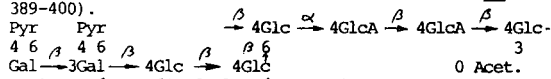
Se estudió el perfil de fosforilasa de amiloplastos de tubérculo de papa y se encontró una forma molecular principal capaz de sintetizar "in vitro" un α -glucano unido a proteína en ausencia de polisacárido exógeno. Se encontró que esta enzima, al igual que la fosforilasa de cloroplastos, tiene menor afinidad por los glucanos aceptores que la citosólica de hoja de espinaca y que la fosforilasa I de papa. Se hace un estudio comparativo de las propiedades estructurales y cinéticas de las enzimas plastidiales y citosólicas.

METABOLISMO DE OLIGO Y POLISACARIDOS II

Coordinador: *Rodolfo Ugalde*

BIOSINTESIS DE EXOPOLISACARIDOS EN RHIZOBIUM TRIFOLII. (Exopolysaccharide biosynthesis in *Rhizobium trifolii*) Dankert, M.A., Bossio, J.C. and Iñón de Iannino, N. Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA y CONICET, Buenos Aires, ARGENTINA.

Los exopolisacáridos (EPS) producidos por los rizobios parecen desempeñar un papel crítico en la etapa de infección a la raíz de las leguminosas. Las estructuras de muchos de estos EPS han sido aclaradas, pero se sabe poco de su biosíntesis. *Rhizobium trifolii* infecta y no dula trebol rojo y produce un EPS con la siguiente estructura (Robertsen et al. (1981) Plant Physiol. 67, 389-400).



Se está estudiando la síntesis in vitro de este EPS utilizando células permeabilizadas con EDTA como fuente de enzimas y UDP-Glc, UDP-GlcA, UDP-Gal, PEP y Acetyl CoA, indistintamente radiomarcados, como dadores de azúcares y de piruvato y acetato respectivamente. En una primera etapa se ha estudiado la síntesis de precursores lipídicos y se ha logrado aislar una serie de compuestos con las propiedades esperables: son solubles en cloroformo-metanol-agua (1:2:0,3); por tratamiento a pH2, 10', 100°C liberan distintos oligosacáridos; en medio al calino producen los respectivos ésteres fosfóricos cíclicos, y por reducción con H₂Pt liberan los difosfóricos, etc. Fraccionados por cromatografía en columnas de DEAE celulosa se obtienen dos grupos de compuestos. En la fracción I se ha podido caracterizar al trisacárido GlcA $\xrightarrow{\beta}$ 4GlcA $\xrightarrow{\beta}$ 4Glc y a su derivado acetilado (por hidrólisis y reducción total y parcial, permetilación, degradación enzimática, etc.) Dentro de la fracción II se ha logrado identificar, por criterios similares, al octasacárido correspondiente a la unidad repetitiva y a su derivado mono o dipiruvilado.

ROLE OF POLYSACCHARIDES IN PLANT INFECTION BY RHIZOBIUM AND AGROBACTERIUM. (Rol de polisacáridos en la infección de plantas por *Rhizobium* y *Agrobacterium*). R. Ugalde, A. Zorreguieta, S. Cavaignac, R. Geremia and A. Coira. Instituto de Investigaciones Bioquímicas, F.C.E. y N., Fundación Campomar and CONICET, Buenos Aires, Argentina.

Plant infection by *Rhizobium* or *Agrobacterium* leads to the formation of nitrogen fixing nodules or tumors. Bacterial polysaccharides have been proposed to have a role in plant infection by these bacteria. In *R. meliloti* we have described a cell wall polysaccharide containing galactose and galacturonic acid that leads to increased competitiveness. This effect was attributed to faster nodulation. *Rhizobium* and *Agrobacterium* form β 1-2 cyclic glucan, through a protein linked intermediate. This protein intermediate is a 235 K inner membrane protein. Avirulent attachment defective mutants of *A. tumefaciens* do not form β 1-2 glucans due to the absence of the 235 K protein. A *R. meliloti* mutant which induces formation of pseudonodules was found not to form β 1-2 glucans and like the avirulent mutants of *A. tumefaciens* not to have the 235 K inner membrane protein. These results suggest a role for β 1-2 glucans in plant infection by *Rhizobium* and *Agrobacterium*.

Simposio

GLICOPROTEINAS

Coordinador: *Federico Leighton*

SINTESIS Y UTILIZACION DE NUEVAS SONDAS FOTOREACTIVAS DE RIVADAS DE NUCLEOTIDOS DE PIRIMIDINA (Synthesis and use of new photoreactive probes derived from pyrimidine nucleotides) C. Abeijón⁺, J.M. Capasso⁺, D. Tal, W.F. Vann y C.B. Hirschberg. ⁺Depto. Biología, FCEyN (UBA) Buenos Aires Argentina y Dept. of Biochem. St. Louis University, St. Louis, MO. 63204.

La técnica de marcado por fotoafinidad ha sido exitosamente utilizada para identificar un gran número de proteínas que interactúan con ATP y GTP, mediante sus azido derivados. Desafortunadamente se ha carecido hasta ahora de derivados fotoreactivos de nucleótidos pirimidínicos.

Nosotros hemos conseguido sintetizar 3'-O-(4-Benzoil) Banzoil-Citidina 5'-nucleótidos, tanto con tres fosfatos (BB-CTP), como con uno (BB-CMP). La estructura de los mismos ha sido confirmada por: 1) Cromatografía de intercambio iónico, 2) Cromatografía en capa delgada de celulosa, 3) Análisis de productos después de hidrólisis química y enzimática, 4) Comportamiento cromatográfico después de irradiación con UV, 5) Análisis espectrofotométrico y 6) Espectrometría de ¹H-NMR.

El BB-CTP resultó ser sustrato de enzima CMP-Ac. Siálico sintetasa; y el BB-CMP un potente inhibidor competitivo del transportador de CMP-Ac. Siálico del Golgi, lo cual demuestra que el grupo fotoreactivo no altera la interacción de estas moléculas con los centros activos de las proteínas correspondientes.

Cuando una preparación cruda de la enzima CMP-Ac. Siálico sintetasa de *E. coli* fue irradiada en presencia de BB-CTP y fraccionada en geles de poliacrilamida, una sola banda pudo ser detectada por radioautografía, en medio de un gran número de ellas que son detectadas por tinción con plata, lo cual demuestra la sensibilidad y especificidad de las nuevas sondas.

DETERMINANTES DEL FENOTIPO EN CELULAS EPITELIALES: ESTUDIO EMPLEANDO GENES NATIVOS Y MODIFICADOS DE GLICOPROTEINAS VIRALES. González, A., Rizzolo, L., Gottlieb, T. y Sabatini, D.D.

Depto. Biología Celular, NYU MED CTR, USA, y Fac. Medicina, P. Universidad Católica de Chile.

Las células de epitelios transportadores poseen polos apicales y basolaterales funcional y morfológicamente diferentes, separados por uniones estrechas. Este fenotipo parece ser mantenido dinámicamente por un sistema que seleccionaría y transportaría glicoproteínas específicas desde el Golgi a la membrana plasmática de uno u otro polo. Las ideas básicas sobre este tráfico vectorial de proteínas, cuyo mecanismo es desconocido, han surgido de estudios en células MDCK infectadas con virus que poseen envoltura. En esta línea celular, derivada de riñón de perro, la yemación del virus influenza ocurre preferencialmente por el polo apical, en cambio, la del virus de la estomatitis vesicular se produce por el polo basolateral. En ambos casos, este proceso es precedido por la acumulación de las respectivas glicoproteínas de la envoltura viral, hemaglutinina (HA) y proteína G, en el dominio correspondiente de la membrana plasmática. Estas proteínas exhiben segmentos citoplásmicos, intramembranosos y extracelulares con respecto a la bicapa.

En el actual trabajo hemos utilizado un conjunto de técnicas de DNA recombinación y de transfección de genes en células eucariotas para analizar los determinantes moleculares del tráfico intracelular de estas proteínas. Las evidencias sugieren que la HA y la proteína G contienen en su estructura la información necesaria para su inserción asimétrica en distintos polos de las células MDCK, independientemente de otras proteínas virales. Para que esta información sea efectiva serían necesarios sus segmentos intramembranosos y citosólicos. La proteína G contendría, además señales que la incorporarían a la vía endocítica.

ENZIMAS LISOSOMALES. SINTESIS Y TRANSLOCACION HACIA LOS LISOSOMAS. (Lysosomal enzymes. Synthesis and targeting to lysosomes).

*Couso, R., Lang, L. y Kornfeld, S.

The Washington University School of Medicine. Department of Internal Medicine and Biological Chemistry. *Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Antonio Machado 151, (1405) Buenos Aires, ARGENTINA

La síntesis y transporte de las enzimas lisosomales hacia los lisosomas en células de mamíferos, ha sido objeto de un intensivo estudio en esta última década. Las enzimas lisosomales sintetizadas "de novo" adquieren en los oligosacáridos residuos fosfomanosa que actúan como marcador de reconocimiento que media la unión a receptores específicos (receptores de manosa-6P) y "targeting" hacia los lisosomas.

Si bien se conocía que organismos eucarióticos simples poseen enzimas lisosomales, no se sabía si los mismos utilizaban el "pathway" de la manosa-6P para la translocación de las mismas hacia los lisosomas. En este estudio se demuestra que la ameba del suelo *A. castellanii* y la ameba vegetativa del "slime mold" celular *D. discoideum* poseen una enzima que, utilizando como sustrato UDP-GlcNAc, transfiere glucosamina-1P a oligosacáridos de alta manosa. La especificidad de sustrato de las enzimas de ambas amebas se estudió en paralelo con la ya conocida UDP-GlcNAc: enzima lisosomal N-acetil glucosamina fosfotransferasa de Golgi de hígado de rata, primera enzima responsable de la síntesis del marcador de reconocimiento (manosa-6P) en mamíferos. La enzima de *A. castellanii* es similar a la enzima de mamíferos en cuanto a que es capaz de reconocer el determinante proteico común presente en las enzimas lisosomales. Por el contrario la transferasa del *D. discoideum* no posee dicha propiedad.

TOPOGRAFIA DE LA GLICOSILACION EN EL APARATO DE GOLGI Y RETICULO ENDOPLASMICO (Topography of glycosylation in the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum) Carlos B. Hirschberg, Claudia Abeijón, Juan Capasso, Susan L. Deutscher, Mary Perez and Naziha Nuwayhid. Department of Biochemistry, St. Louis Univ. School of Medicine, St. Louis, Missouri, USA.

La glicosilación y sulfatación de proteínas y glicosaminoglicanos ocurre en el lumen del retículo endoplásmico (RE) y aparato de Golgi (AG). Dado que los donantes de azúcares y sulfato en dichas reacciones (nucleótidos azúcar y PAPS) se sintetizan en el citosol, surge la pregunta: ¿De qué manera estos sustratos son transportados hacia el lumen de los anteriores organelos? Utilizando enfoques bioquímicos, de biología celular y genéticos, hemos demostrado que en la membrana del AG existen transportadores específicos de nucleótidos azúcar y PAPS. Estos sustratos serían transportados desde el citosol hacia el lumen a través de un intercambio con el nucleósido mono fosfato correspondiente.

Por otro lado, en el RE, la N-glicosilación se inicia con la adición de la N-acetilglucosamina, manosa y glucosa al dolicol fosfato. Hemos demostrado en la membrana del RE la presencia de transportadores de UDP-GlcNAc y UDP-glucosa pero no de GDP-manosa, lo cual sugiere que la síntesis de dolicol-oligosacáridos ocurre asimétricamente con respecto a la membrana del RE.

Podemos concluir que la glicosilación de macromoléculas presenta una topografía diferencial con respecto a la membrana de distintos organelos.

THE MECHANISM OF PROTEIN N-GLYCOSYLATION IN TRYPANOSOMATIDS. Parodi, A.J. Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar", A. Machado 151, 1405 Bs.As. N-glycosylation in eucaryotes is initiated by the transfer of an oligosaccharide (Glc₁Man₉GlcNAc₂) from P-P-dolichol to asparagine residues in incompleated polypeptide chains. Once transferred, the oligosaccharide moieties are processed (removal and addition of monosaccharides) to yield high mannose-, hybrid- or complex-type saccharides. We have previously reported that, depending on the species, trypanosomatids synthesized and transferred to proteins "in vivo" P-P-dolichol-linked Man_{6,7} or Man₉GlcNAc₂. We have now conducted a cell-free characterization of the enzymatic defects responsible for this phenotype: all species tested were defective in the formation of Glc-P-dolichol, the donor of glucoses in the complete oligosaccharide. Species that "in vivo" transferred Man₆GlcNAc₂ or Man₇GlcNAc₂ were devoid of the 7th., 8th., and 9th. mannosyltransferases or of the 8th. and 9th. transferases, respectively. On the other hand we have observed in the pathogen *Trypanosoma cruzi* another so far unique feature in protein N-glycosylation: the modification of the oligosaccharide transferred upon differentiation. Whereas in epimastigotes (insect vector stage) and in amastigotes (mammalian intracellular stage) the sole compound transferred was Man₉GlcNAc₂, in trypomastigotes (bloodstream stage, infective form) both Man₉GlcNAc₂ and Man₇GlcNAc₂ were transferred. The structure of Man₇GlcNAc₂ formed by processing of protein-linked Man₉GlcNAc₂ was different from that of Man₇GlcNAc₂ transferred from the P-P-dolichol derivative. Supported by WHO and CONICET.

RECEPTOR DE HORMONA DE CRECIMIENTO (HC): ESTRUCTURA, BIOSÍNTESIS Y PURIFICACION DE LA GLICOPROTEINA. (Growth hormone receptor: structure, biosynthesis and purification of the glycoprotein). Szecówka, J. Dept. of Physiol., U. Massachusetts Med. Center y Depto. de Ciencias Fisiol., P. U. Católica de Chile.

¹²⁵I-HC se ligó con receptores específicos en la membrana celular de adipocitos de rata. Esta unión se hizo covalente con sustrato de succinimidato. Usando electroforesis en condiciones reductoras, el producto principal de estas reacciones se identificó como un complejo de un peso molecular (PM) de 130 kDa (receptor + ¹²⁵I-HC).

La lectina de trigo (100 nM) inhibe el ligamen específico de HC. Para obtener claras evidencias que el receptor es una sialoglicoproteína, se realizaron experimentos con dos glicosidasas: Con neuraminidasa (5 U/ml) el PM del receptor disminuyó 10 kDa, y con endoglicosidasa F 20 kDa. Para dilucidar las vías de biosíntesis y la importancia de carbohidratos en el receptor, se realizaron experimentos con dos inhibidores de la glicosilación de proteínas: Con swainsonina el PM del receptor sintetizado "de novo" disminuyó 10 kDa, y con tunicamicina 20 kDa. Sin embargo, aquellas formas del receptor, incompletamente glicosiladas, se incorporan en la membrana celular y conservan su capacidad del ligamen específico de HC.

El Triton X-100 solubilizó el receptor, preservando su especificidad y afinidad. El carácter sialoglicoprotéico del receptor permitió su purificación a homogeneidad en dos subsecuentes cromatografías de afinidad: 1- con la lectina de trigo, 2- con HC. El receptor purificado tiene PM aproximado de 500 kDa y está formado por cuatro proteínas, aparentemente unidas con puentes disulfuros, de PM: 180, 130, 105 (la subunidad del ligamen) y 80 kDa.

PROTEINAS CROMOSOMALES:
 PROLIFERACION Y DIFERENCIACION CELULARES

Coordinador: *María Imschenetzky*

DOMINIOS ESTRUCTURALES DE PROTEINAS INVOLUCRADAS EN COMPLEJOS NUCLEOPROTEICOS DEL NUCLEO CELULAR. (Estructural domains of proteins involved in nucleoprotein complexes of the nucleus). Bach, M., Parera, M. y Palau, J. Depto. Biología Molecular, Centro de Investigación y Desarrollo, C.S.I.C., Barcelona, España.

Los cambios conformacionales en complejos nucleoproteicos facilitan con toda seguridad el funcionamiento de diversos procesos celulares, entre los que cabe incluir la proliferación y la diferenciación. Nuestro laboratorio ha venido estudiando la conformación del grupo de proteínas HMG de alto peso molecular -M. Carballo et al., *Embo J.* 2, 1759(1983), M. Carballo et al., *Embo J.* 3, 1255(1984). En estos trabajos se demuestra que existe una función diferenciada de los diversos dominios que incluye la interacción con el DNA y la interacción con la histona H1. En la actualidad se ha procedido a establecer una regionalización de la interacción con la histona H1 y se ha demostrado que el dominio C-terminal de la histona H1 es la región más idónea para interactuar con el dominio C-terminal de la proteína HMG. Estos resultados sugieren la existencia de mecanismos de enlajamiento en la cromatina que facilitan los cambios de compactación originados en diversos procesos biológicos. Otra proteína estudiada (el antígeno nuclear SS-B) está relacionada con el transporte de ácidos nucleicos de pequeño tamaño (SN RNA). Los resultados indican que en la molécula de SS-B existe un dominio estructural de 30KD que está fosforilado a distintos niveles y presenta interacción máxima con los conjuntos de RNA. Existen además otros 2 dominios de 17 y 6 KD que probablemente están implicados en la función de transporte en la célula de un flujo muy diverso de ácido ribonucleico.

ATYPICAL CHROMOSOMAL PARTICLES DURING EARLY EMBRYOGENESIS OF SEA URCHINS. M. Imschenetzky, M. Puchi, and R. Massone. Departamento de Biología Molecular, Universidad de Concepción, Chile.

During early developmental stages of sea urchins three sets of genes are sequentially expressed: those genes coding for CS chromosomal proteins; those coding for early histone variants (α type) and those coding for late variants (α, β, γ , and ϵ types). This differential gene expression determines shifts in nucleosome populations that have been demonstrated by nuclease digestion studies. At present the nature of the very early nucleoparticles is unknown.

To obtain information about the protein components that are forming the very early nucleoparticles we have isolated and characterized the CS chromosomal proteins by conventional methods. The results obtained revealed that, unlikely the typical histone complement, seven major proteins are found, specified CSA; CSB; CSC; CSD; CSE; CSF and CSG. The electrophoretic migration of these proteins is consistent with histones but their amino acid compositions are markedly different. In addition each one of these major fractions is electrophoretically heterogeneous in two dimensional gels.

To obtain a direct evidence on the involvement of CS chromosomal proteins in nucleoparticles present in very early cleavage cells, the isolation of particles derived from nucleases digestion was performed on 1% agarose gels and their protein content was analyzed by PAGE/SDS gels. The results obtained indicate that seven major proteins are forming these particles, these fractions comigrate with the CS chromosomal proteins isolated by classical methods.

Taking all these data together it seems clear that during early developmental stages the chromatin is arranged into particles different from the nucleosomes. The term embryosomes is proposed to nominate these particles. (Proyectos: 20.31.06, 2031.11. U. de Concepción. 1082/85 FONDECYT).

STUDIES ON SPERMIOGENESIS, FERTILIZATION AND DEVELOPMENT WITH *Choromytilus chorus*. (Estudios sobre espermiogénesis, fertilización y desarrollo en *Choromytilus chorus*) L.O. Burzio, M. Brito, J. Carcano, A.M. von Christar, I. Concha, J. Figueroa, E. Gutiérrez and J.C. Vera. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

In the sperm of most animals the DNA is associated with basic proteins, which vary significantly in each particular species. Three major basic polypeptides were identified in the sperm of *Ch. chorus*. They were purified using selective solubilization with acetic acid and HCl, and by chromatography on Sephacryl S-200 equilibrated with 10 mM HCl and 6 M urea. The most abundant polypeptide has a MW of 4,500 and the amino terminal residue is Pro. More than 50% of the amino acids correspond to Lys plus Arg. This characteristics are typical of protamine-like proteins. The other two components shared several properties of histones H1. Several evidences suggest that these polypeptides could be used as differentiation markers during spermiogenesis in *Ch. chorus*.

The optimal conditions for fertilization and development of *Ch. chorus* embryos were established (oocytes:sperm ratio to avoid polyspermy; incubation temperature; salinity and number of embryo per ml). At 72 h post fertilization more than 70% of the fertilized oocytes developed the primary shell. The different development stages have been used to study the switch of histones during the differentiation process. (Supported by Grants S-85-10; FONDECYT 1039-85; Graduate Program Project of OAS).

SUBCELLULAR LOCALIZATION OF HUMAN HISTONE mRNA AND THE INVOLVEMENT OF THE 5' LEADER SEQUENCE IN HISTONE mRNA STABILITY (Localización subcelular de RNAm de histona humana y la relación de la secuencia "leader" 5' en la estabilidad del RNAm de histona). Stein, G. and Stein, J. University of Florida, College of Medicine, Gainesville, FL. USA.

It is well established that cell cycle dependent human histone mRNA is selectively destabilized when DNA synthesis is terminated. Mechanisms accomplishing this selective destabilization may require specific targeting sequences or structures within the mRNA itself. In addition, the microenvironment in which the histone mRNAs reside contribute to the ability of the cell to modulate histone mRNA stability in conjunction with DNA synthesis.

To identify destabilization targeting sequences or structures in a cell cycle dependent human H₃ histone mRNA, we have constructed fusion genes in which fragments of the histone mRNA coding region are fused to fragments of genes not expressed in a cell cycle dependent manner. Two of these fusion constructs suggest that the first twenty nucleotides of the H₃ histone mRNA leader region are sufficient to couple histone mRNA stability with DNA replication.

To assess the possible relationship between the microenvironment of the histone mRNAs and the regulation of histone mRNA levels, we have examined the subcellular distribution of histone mRNA. The distribution of histone mRNAs on free and membrane bound polyosomes was examined as well as the association of histone mRNA containing polyosomes with the cytoskeleton. Histone mRNAs were localized predominantly on the free polyosomes. In addition, histone mRNAs were found on the cytoskeleton fraction which suggests that the histone mRNA containing polyosomes are associated with the cytoskeleton.

PROTEINAS CROMOSOMALES EN TRYPANOSOMA CRUZI (Chromosomal proteins in *Trypanosoma cruzi*). Toro, C.; Morales M. y Galanti, N. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Trypanosoma cruzi es un protozoo hemoflagelado, agente causal de la enfermedad de Chagas. Presenta tres formas: amastigote (intracelular y replicativa), epimastigote (extracelular y replicativa) y tripomastigote (extracelular, no replicativa e infectiva). En este trabajo se describe la presencia de histonas y de proteínas cromosomales de alta movilidad electroforética (HMG) en *T. cruzi*.

Se obtuvo cromatina de epimastigote en cultivo y se extrajo histonas en H_2SO_4 0.4 N y proteínas HMG en ácido perclórico 0.75 M. Las proteínas cromosomales dializadas y liofilizadas se analizaron en geles de poliacrilamida en una y en dos dimensiones.

Se demostró la presencia de 6 proteínas básicas de bajo peso molecular y carentes de triptofano, con características de migración similares a histonas de espermios de erizo de mar, hígado de rata y timo de ternera. La electroforesis en dos dimensiones mostró la presencia de variantes en la mayoría de las histonas de *T. cruzi*. Por solubilidad en ácido tricloroacético 5%, en ácido perclórico 0.75 M y en diferentes concentraciones de NaCl, una de estas proteínas presentó características similares a H_4 .

Por otra parte, se encontró proteínas con características de solubilidad y de movilidad electroforética que corresponden a las HMG de timo de ternera.

En consecuencia, la cromatina de *T. cruzi* presenta constituyentes proteicos similares a los descritos para eucariontes superiores, aunque existen diferencias evidentes. Estos resultados permitirán estudiar la eventual participación de estas proteínas cromosomales en procesos de proliferación y diferenciación de *T. cruzi*. (Proyectos B-2365/8613 D.I.B.; FONDECYT y UNDP/WB/WHC/ TDR ID 820599).

INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

Coordinadores: Carlos Jerez, Alejandro Venegas

AVANCES RECIENTES EN LA SINTESIS DE DNA Y RNA. SINTESIS QUIMICA DE GENES, CLONAMIENTO, EXPRESION. (Recent developments in DNA/RNA synthesis. Chemical gene synthesis, cloning and expression). Alvarado Urbina, G.^a, Chiarello, R.^b, Crea, R.^c. a-Meigenetics Research Corporation, 1716 Woodward Dr. Ottawa, Canada. b-IGB Products Ltd., 14310 Catalina St. San Leandro, CA 94577 USA. c-Creative Biomolecules Inc. 35 South St. Hopkinton, MA 01748 USA.

El desarrollo reciente de la síntesis automatizada de ácidos nucleicos sobre soporte polimérico ha permitido la construcción de oligonucleótidos en forma eficiente y rápida, como resultado la síntesis total de genes es factible. Ejemplos de diseños y de síntesis de genes de 455 a 1600 pares de bases serán presentados. Estrategias de diseño de genes de tipo 'cassette' serán analizadas, conjuntamente con la expresión en *Escherichia Coli*, mediante vectores diseñados para alto nivel de expresión. Obtención de análogos- mutagénesis sitio-específica. La síntesis automatizada de fragmentos de 15 a 52 bases se efectuó utilizando diversos soportes poliméricos con la activación *in situ* de fosforamidas (1). El sintetizador automático es controlado por un computador personal- IBM o Commodore-64. La descripción completa del aparato, como asimismo diferentes programas serán presentados.

Análisis completo de los fragmentos sintéticos, métodos de purificación, ligamiento, clonamiento y expresión serán presentados. La comprobación de estructuras se efectuó por secuenciación del DNA mediante los métodos de Sanger y de Maxam y Gilbert.

(1). Alvarado Urbina G., et al. (1986) Biochem. Cell Biol. Vol. 64, 548-555.

MECANISMO Y VELOCIDAD DE MUTACION DEL DNA MITOCONDRIAL DEL *TRYPANOSOMA CRUZI*. SU UTILIZACION EN EPIDEMIOLOGIA. (Mechanism and rate of evolution of the mitochondrial DNA in *Trypanosoma cruzi*. Its uses in epidemiology.). C. Ibanez, R. Macina, J.L. Affranchino y A.C.G. Frasch. "Fundación Campomar", A. Machado 151, 1405 Buenos Aires, Argentina

Resultados obtenidos en diferentes laboratorios sugieren que uno de los dos componentes del DNA mitocondrial de los tripanosomatidos, los minicírculos, varían rápidamente en su secuencia. En el caso del parásito sudamericano *Trypanosoma cruzi*, nuestro grupo demostró que stocks de laboratorio poseen clases diferentes de minicírculos (FEBS Lett. 169:139, 1984 y Mol. Biochem. Parasitol. 11:169, 1984), constituidos cada uno de ellos por grupos de moléculas casi homogéneas (Biochim. Biophys. Acta 782:26, 1984) que difieren aún entre clones de parásitos obtenidos de un mismo aislamiento (Mol. Biochem. Parasitol. 16:61, 1985). Para conocer el mecanismo molecular que genera esta diversidad se secuenciaron tres moléculas pertenecientes a una misma clase de minicírculos. En cada molécula se acumulan independientemente mutaciones puntuales (1/64 pares de bases), principalmente transiciones (19/23). La velocidad de mutación fue estudiada analizando una clase de minicírculos en 11 subclones obtenidos a partir de un clon del parásito luego de 600 generaciones de crecimiento continuo (791 días). Dos sitios polimórficos (TaqI y HaeIII) fueron detectados, lo que permitió calcular una velocidad de mutación preliminar y mínima de 2×10^{-8} sustituciones por par de bases por generación. La utilización de moléculas clonadas como marcadores genéticos demostró que existe un número limitado de parásitos en la naturaleza y que parásitos obtenidos de humanos y triatomas en regiones alejadas de Argentina y Chile son similares.

USO DEL BACTERIOFAGO *Mu* COMO HERRAMIENTA GENETICA. (Use of bacteriophage *Mu* as a genetic tool). de Mendoza, D.¹, Gramajo, H.C.¹ y Viale, A.M.². Departamento de Microbiología y CEFOS². Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531, 2000 Rosario, República Argentina.

El bacteriófago *Mu* es un transposon gigante encerrado en la cubierta de un virus que utiliza la transposición como estilo de vida. Los fagos mini-*Mu* son derivados del bacteriófago *Mu* que poseen delecciones internas y que carecen de las funciones líticas del fago parental. Cuando se induce la replicación de los mini-fagos cada réplica es producto de un proceso de transposición y durante la replicación puede promover reordenamientos genómicos tales como fusión de replicones y transposición de genes a plásmidos.

Nuestro grupo de trabajo utilizó estas últimas propiedades de mini-*Mu* para realizar experimentos *in vivo* tales como: mutación de genes clonados en cósmidos, fusión de operones, construcción de bibliotecas genéticas y expresión regulada de genes.

ARENAVIRUSES HAVE AN 'AMBISENSE' CODING STRATEGY. Víctor Romanowski. Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

The Arenaviridae family comprises some 13 immunologically related enveloped viruses. Some of them cause severe although not widely spread human diseases such as Lassa fever and Bolivian and Argentinian haemorrhagic fevers.

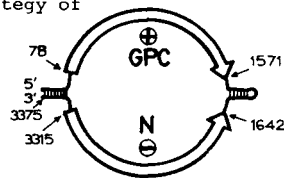
The genetic information of arenaviruses is contained in two species of single-stranded RNA designated L and S. Genetic and biochemical analyses have demonstrated that L RNA codes for a large polypeptide (RNA polymerase?) and the S RNA codes for the nucleocapsid N protein and the GPC polypeptide, an intracellular precursor for the envelope glycoproteins G1 and G2.

Complementary DNA cloning and sequencing of arenavirus S RNA confirmed these coding assignments, and showed a novel coding strategy.

A GPC protein translated from a viral sense mRNA (5' half of S RNA) and a N protein translated from a viral-complementary mRNA (3' half of S RNA) are the basic features of the 'ambisense' coding strategy of arenavirus S RNA.

Subgenomic RNA species with the size and polarity predicted for the N and GPC mRNAs have been found in infected cells.

The structure of the S RNA of LCM arena virus is depicted on the diagram (nucleotide numbers are indicated).



ELEMENTOS CIS QUE REGULAN LA EXPRESION DE LOS LSP1 GENES EN *Dros. melanogaster*. (Cis-acting elements that regulate the expression of the LSP1 genes in *Dros. melanogaster*). Sunkel, C.E., Delaney, S.J. and Glover, D.M. Cancer Research Campaign, Department of Biochemistry, Imperial College, LONDON SW7 2AZ, England.

The Larval Serum Protein 1 genes (LSP1) have been used as a model system for the study of developmental gene regulation in Eukaryotes. The 3 genes are located in different chromosomes, are expressed coordinately during the 3rd larval instar and only in the fat body. We set out to characterize the 5' end cis-acting elements that regulate these genes. The 5' end of all 3 genes was sequenced and the data analyzed using computer analysis. The biological assay defined to study the cis-elements involved the use of whole organism transformation techniques. A chimeric gene containing 5' end sequences from LSP1 a or b directing the expression of a marker gene CAT (chloranphenicol acetyl transferase) was introduced in embryos and stable lines established of the different chimeric genes.

The results of the sequence analysis revealed that the structure of all 3 genes is very similar. Within the coding region a and b share the closest homology which breaks down outside it. 5' end shows only two small regions of homology between all 3 genes located within the first 400bp. These could be related to cis-acting controlling elements which have been maintained even though the genes have been dispersed. Other regions of homology were found. They included the TATA box, the CAP site and a probable protein secretion signal located within the coding region. The results of the whole organism transformation indicate that temporal and tissue specific control signals are contained in 5' end regions of 388bp for LSP1a and 480bp for LSP1b. Although tissue and temporal expression is retained, the level drops considerably. Temporal and tissue specific expression is abolished when only 80bp of 5' end sequence are used and the level of expression is very low.

ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LAS PROTEINAS

Coordinador: Jorge Babul

EL ESTADO PLEGADO DE LAS PROTEINAS: FORMACION, ESTABILIDAD Y SU RELACION CON LA FUNCION. (The folded state of proteins: acquisition, stability and its relation with function).

Babul, J., Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Las proteínas adoptan conformaciones plegadas complejas y, pese a su diversidad en arquitectura molecular, tienen propiedades comunes que constituyen una "imagen de consenso". El 90% de los residuos de aminoácidos de la mayoría de las proteínas participa en hélices α (38%), láminas β (20%) y dobleces (32%). En las proteínas de gran tamaño se observan dos o tres unidades estructurales globulares o dominios.

No se conocen los mecanismos que determinan el estado plegado, pero se sabe que son determinantes la secuencia de aminoácidos y la proporción relativa de residuos polares y no polares. Aún cuando existe suficiente flexibilidad en los principios que relacionan la secuencia con el plegamiento, sólo una fracción muy pequeña de los polipéptidos posibles es capaz de plegarse en una conformación estable. La estabilidad está dada principalmente por el gran número de interacciones débiles presentes simultáneamente y la estructura del solvente acuoso.

Una estrategia útil para separar las variables estructurales y funcionales es producir por mutación génica el cambio de uno o pocos aminoácidos que provoque diferencias funcionales. Se presentará el caso de una mutante de fosfofructoquinasa-2 que produce un defecto en el crecimiento de *E. coli*. La enzima contiene un cambio en uno o dos aminoácidos y difiere de la enzima normal en su estabilidad, orden de interacción con los sustratos y productos, susceptibilidad a la inhibición por MgATP y en el efecto de los sustratos sobre la estructura cuaternaria.

Financiado por DIB-Universidad de Chile, Fondecyt, PNUD-UNESCO CHI 81-001 y OEA.

PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA SECUNDARIA. UNA HERRAMIENTA ÚTIL PARA EL CRISTALOGRAFO DE PROTEINAS.

(Secondary structure prediction. A useful tool for a protein crystallographer). Hilda Cid, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

La determinación de la estructura terciaria de una proteína requiere de la obtención de cristales de buena calidad de la enzima nativa y de sus derivadas de átomos pesados, proceso que puede demorar varios años. En el intertanto, importante información acerca de la configuración espacial de la enzima y de su sitio activo puede obtenerse por una combinación de estudios químicos y predicción de estructura secundaria, a partir de la secuencia.

Esta idea ha sido desarrollada a través de varios años en el laboratorio de Biofísica de la Universidad de Concepción, donde se ha desarrollado un método de predicción y se ha aplicado en combinación con el método de Chou y Fasman en las siguientes proteínas: diversas protaminas de peces, fructosa 1,6-bisfosfatasa, neurotoxinas de venenos de serpientes, proteínas salivales ricas en prolina y B-lactamasas obtenidas de diversas fuentes.

En la totalidad de estos casos ha sido posible proponer un modelo estructural capaz de explicar los datos experimentales disponibles y sugerir nuevos experimentos para su verificación.

Dado que se trabaja con una predicción, y no una de terminación, se complementa la estructura propuesta con medidas de parámetros físico-químicos, como difracción circular y determinación de radio de giro por medidas de fluorescencia. Se propone utilizar cálculo de energías conformacionales mínimas para ajustar zonas de predicción dudosas.

CONFORMATIONAL TRANSITION OF POLYMER CHAINS IN DILUTE SOLUTION. (Transición conformacional de cadenas poliméricas en solución diluida). Gargallo, L.^a, Radić, D.^a, Hernández-Fuentes, I.^b, Horta, A.^b. a) Laboratorio de Físico-Química Molecular, Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile. b) Universidad Complutense de Madrid, España.

The viscometric and dielectric behaviour of poly(dibenzyl itaconate) (PDB₂) in 1-4 dioxane as a function of the temperature were studied. The viscometric relationships in 1-4 dioxane at different temperatures were established. The viscometric results show discontinuities in the intrinsic viscosity $[\eta]$, specific viscosity η_{sp}/c and Mark-Houwink-Sakurada exponent. Dielectric constant (ϵ) measurements were carried out as a function of temperature from 16 to 33°C (see figures 1 and 2).

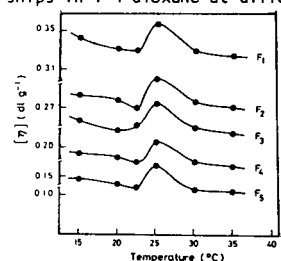


Figure 1

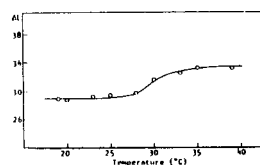


Figure 2

The results from the dielectric behaviour agree with the viscometric results. For PDB₂ in 1-4 dioxane, an anomalous behaviour of intrinsic viscosity (coil volume) and dielectric constant (chain polarity) occurs around 25°C.

In conclusion, a conformational transition of polymer chain is probably responsible.

PREDICIONES SOBRE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO, BASADAS EN LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS Y EN MODIFICACIONES QUIMICAS. (Predictions on the growth hormone three-dimensional structure, based on its amino acid sequence and chemical modifications.) Santomé, J.A., Ermacora, M., Rivero, L., Nowicki, C., Wolfenstein-Todel, C., Cascone, O. y Biscoglio de Jimenez Bonino, M.J.

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (UBA - CONICET).

En nuestro laboratorio se han modificado, con distintos reactivos químicos, los residuos de triptofano, tirosina, lisina, metionina, arginina, histidina y ácidos aspártico y glutámico de las hormonas de crecimiento de mamíferos - en condiciones que no provocaron modificaciones conformacionales detectables por difracción circular.

La cinética de las reacciones se siguió determinando el grado de modificación de cada residuo, previo fraccionamiento enzimático de la molécula y aislamiento de los péptidos que los contenían.

Se individualizaron, así, segmentos de la cadena polipeptídica cuyos distintos residuos de aminoácidos reaccionaron fácilmente frente a los respectivos reactivos específicos, y otros, con residuos que lo hicieron parcialmente o que no reaccionaron. Podría deducirse que esos segmentos son, respectivamente, total, parcialmente y no accesibles al solvente.

Con esta información, sumada a la resultante de determinar: a) la distancia entre tirosinas y lisinas mediante reactivos bifuncionales, b) la estructura secundaria con métodos predictivos y c) la hidrofobicidad e hidrofiliencia de las distintas regiones de la cadena polipeptídica - se propone un modelo tridimensional de la hormona de crecimiento bovina.

AVANCES RECIENTES EN EL ESTUDIO DE RECEPTORES Y PROCESOS DE TRANSDUCCION

Coordinador: *Pedro Labarca*

FOTOTRANSDUCCION EN UN FOTORECEPTOR DE INVERTEBRADO. (Phototransduction in an invertebrate photoreceptor). Bacigalupo, J., Johnson, E. Lisman, J. Depto. Biología, Fac. Ciencias, U. de Chile y Dept. of Biology Brandeis Univ. Waltham, MA, E.E.U.U.

La fototransducción involucra una cadena de eventos que culmina con un cambio de actividad de canales iónicos. Nuestro interés está enfocado a entender las últimas etapas de la transducción. Hemos caracterizado los canales activados por luz haciendo registros de patch clamp en célula (*J. Gen. Physiol* 87: 73; 1986). En registros obtenidos durante un estímulo luminoso se pueden distinguir 2 tipos de eventos unitarios, con conductancias de 15 y 40 pS. Ambos tienen un potencial de inversión entre 0 y 10 mV y una probabilidad de apertura marcadamente dependiente del potencial. Con el objeto de estudiar los canales en condiciones más definidas que en la célula, retiramos la pipeta del fotorreceptor dejando el lado intracelular de la membrana expuesto al baño. El baño se perfundió con diversas soluciones conteniendo como ión principal K y distintas concentraciones de Ca libre. El Ca participa en la adaptación del receptor a la luz inhibiendo la conductancia activada por luz. En 10^{-7} M Ca observamos una alta actividad del canal de 15 pS, que en estas condiciones perdió la dependencia de la luz. 10^{-6} M Ca inhibieron el canal. Esto indica que una acción directa del Ca sobre el canal podría producir la adaptación. Estudios dirigidos a identificar el transmisor responsable de la excitación son ahora posibles en este sistema y los estamos llevando a cabo.

Proyecto NSF INT-8610625.

TRANSDUCCION Y RESONANCIA ELECTRICA EN CELULAS CILIADAS DEL SISTEMA VESTIBULO-AUDITIVO. (Transduction and electrical resonance in hair cells from the vestibulo-auditory system). Robles, L. Departamento de Fisiología y Biofísica, Fac. de Medicina, Univ. de Chile.

El proceso de transducción mecano-eléctrica en el sistema vestibulo-auditivo de los vertebrados se lleva a cabo en las células ciliadas del oído interno. Estas células, ubicadas en estructuras especializadas en la transmisión de vibraciones mecánicas, se caracterizan por poseer en su superficie apical un haz de pseudo-cilios (estereocilios) que se mueven siguiendo al estímulo mecánico. Estudios recientes, utilizando la técnica de "patch-clamp" en células ciliadas vestibulares completas de rana (*Hudspeth, A. J., Science* 230, 745) y de pollo (*Ohmori, H., J. Physiol* 359, 189), muestran que el desplazamiento del haz de cilios en la dirección de su eje de simetría produce una modulación de la corriente de transducción que entra a la célula. Estímulos calibrados de alrededor de 1 μ m de amplitud máxima dan una relación sigmoidea entre corriente y desplazamiento, con la corriente máxima al mover los estereocilios en el sentido de los más largos y la mínima al moverlos en el sentido opuesto. Análisis de ruido indica que el aumento de la corriente de transducción se produce por la apertura de unos 300 canales, de alrededor de 13 pS de conductancia, ubicados en la superficie apical de cada célula ciliada. Por otra parte, cuando estas células se estimulan con pulsos de corriente depolarizante muestran oscilaciones amortiguadas del potencial de membrana a frecuencias que son características de cada célula. Esta resonancia eléctrica podría ser explicada por la interacción entre canales voltaje dependientes de Ca^{++} y canales de K^{+} activados por Ca^{++} que han sido identificados en la superficie basolateral de las células. En estos animales y en la tortuga la resonancia eléctrica de las células ciliadas actúa como un filtro que reduce la amplitud de las respuestas a estímulos de frecuencias diferentes a la frecuencia característica de cada célula ciliada.

EXPRESION DE RECEPTORES EN OOCITOS DE XENOPUS. (Expression of receptors in oocytes of *Xenopus*). Inestrosa, N.C. Grupo de Neurobiología Molecular, P. Universidad Católica de Chile, Santiago.

El sistema del oocito de *Xenopus laevis* ofrece grandes ventajas para estudiar la traducción de RNA mensajeros. En efecto, el oocito posee una gran eficiencia en la traducción de mRNAs exógenas, junto a una gran fidelidad en la producción de proteínas maduras. En 1981, Barnard y Miledi describieron por primera vez la aplicación de este sistema a un problema neurobiológico. Después de microinyectar mRNA obtenido del órgano eléctrico de *Torpedo* a oocitos, estos sintetizaron e incorporaron a su membrana, receptores colinérgicos nicotínicos, los cuales eran funcionalmente activos ya que respondían con una depolarización de la membrana a la aplicación de acetilcolina y la respuesta era eliminada en la presencia de alfa-bungarotoxina.

Considerando que aparte del receptor colinérgico la mayoría de los otros receptores se encuentran en el cerebro donde es muy difícil estudiarlos, es que el oocito de *Xenopus* aparece como un excelente sistema para analizar receptores de interés neurobiológico. Entre los receptores ya expresados en oocitos tenemos los de Serotonina, Glutamato, Glicina y GABA. Los mRNAs utilizados fueron obtenidos de cerebro de distintos animales, incluyendo: pollo, rata y hombre. Las respuestas del oocito a los agonistas son rápidas (1 seg) o lentas (10 seg), las corrientes pueden ser o no oscilatorias y los potenciales reversos varían entre 0mV y -20mV. De los receptores estudiados el que se expresa más eficientemente es el de Serotonina.

Financiado por DIUC y Stiftung Volkswagenwerk

EPITHELIAL RESPONSES OF MAMMALIAN TONGUE AND THEIR INVOLVEMENT IN TASTE TRANSDUCTION. Simon, S.A. Departments of Physiology and Anesthesiology, Duke University Medical Center Durham, North Carolina 27710.

The responses of mammalian tongue, placed in a modified Ussing chamber, to salt (KCl), NaCl, NH_4Cl , TEACl, sweetener (D-Glucose, Sucrose) and bitter-tasting quinine were investigated. These experiments were conducted to further explore the new paradigm of taste transduction that correlates the electrical behavior of lingual epithelium with neural responses under symmetric ionic conditions. The epithelial responses are inhibited by ouabain and removal of oxygen, demonstrating that the tongue is an actively transporting epithelium. When increases in short circuit current, for rabbit tongue, induced by hyperosmotic concentrations of several salts were compared, the following sequence was found: $KCl > NH_4Cl > NaCl > TEACl$. These results are consistent with previously published integrated chorda tympani responses as well as behavioral studies which showed that rabbits prefer KCl to NaCl. In comparison, the sequence for dog tongue was $NaCl > NH_4Cl > KCl > TEACl$. Pharmacological studies using ouabain and amiloride suggest that K^+ , Na^+ and H^+ all traverse the tongue through different pathways. Different responses to NaCl and Sucrose between the front and the rear regions of the tongue, as determined neurophysiologically or psychophysically, are also found in isolated epithelium.

BIOLOGIA, IDEOLOGIA Y SOCIEDAD

Coordinador: *Ennio A. Vivaldi*

EL CARACTER SOCIAL DEL QUEHACER CIENTIFICO.
(The Social Character of Scientific Practice).
Echeverría, R. Instituto de Sociología, Universidad Católica de Chile.

Los desarrollos producidos en las ciencias biológicas han representado avances significativos en el reconocimiento de determinantes biológicos de la conducta humana, incluyendo el comportamiento social. Con ello se ha replanteado la relación entre lo biológico y lo social, lo que se ha traducido en diversos esfuerzos desde las ciencias biológicas de explicación de fenómenos que previamente parecían reservados a disciplinas como la sociología. La sociobiología representa tan sólo un esfuerzo, entre muchos otros, en esta dirección.

En esta nueva compenetración entre la biología y las ciencias sociales, la primera es la que ha modificado los términos previos de la relación, al producir resultados que despiertan un interés creciente entre los científicos sociales. Sin embargo, una vez que los sociólogos dirigen su atención hacia la biología —más allá de la discusión que pueda establecerse sobre los usos y abusos que socialmente se hagan de sus resultados— no siempre se comprueba un adecuado reconocimiento de parte de los biólogos sobre el carácter social de todo quehacer científico, el biológico incluido, y, por lo tanto, de los determinantes sociales que inciden en dicho quehacer. Se trata, en consecuencia, de insistir en el condicionamiento al que se halla sometida la práctica investigativa de las ciencias biológicas, desde el punto de vista de factores sociales diversos, como lo son los ideológicos y los institucionales.

¿ EXISTE FUNDAMENTOS BIOLÓGICOS PARA EXPLICAR LA AGRESIÓN?.

L. Valladares. Unidad de Biología de la Reproducción, INTA, Universidad de Chile.

En 1915, E.O. Wilson publicó su libro "Sociobiología: la nueva síntesis". En esta obra Wilson trató de presentar, basándose tanto en los hechos como en la teoría, una visión panorámica acerca de la naturaleza y fundamentos biológicos del comportamiento animal social, la sociobiología. La reacción inicial del libro fue muy favorable, sin embargo, al cabo de algunos meses se produjo un furibundo ataque, por parte de un grupo de notables científicos que se autodenominaron "Grupo de Ciencia para el Pueblo dedicado al Estudio de la sociobiología". No solo las ideas de Wilson fueron atacadas, sino que se acusó al propio autor de estar aliado con los pensadores políticos más reaccionarios. A partir de ese instante se inició uno de los más interesantes y polémicos desafíos de la ciencia biológica de los últimos años. Creemos que es provechoso someter a consideración la controversia de la sociobiología, y para esto he tomado como modelo la agresión.

El estudio de los orígenes del comportamiento agresivo, criminal y antisocial es uno de los aspectos del proceder humano que continuamente ha absorbido el interés de los científicos. Es mi intención examinar qué argumentos pueden esgrimirse a favor de la sociobiología de la agresión y cuales en contra de ella; la controversia de la sociobiología es una controversia biológica y debe, por tanto ser analizado desde un punto de vista de esta ciencia.

¿ HAY FACTORES GENÉTICOS QUE CONDICIONAN EL ACCESO DIFERENCIAL A LOS ESTRATOS SOCIOECONÓMICOS ? .
Valenzuela C.Y. Departamento de Biología Celular y Genética. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Existe un gradiente socioeconómico en Chile. Los estratos socioeconómicos altos presentan frecuencias de grupo sanguíneo A y Rh(-) superiores. La hipótesis que sustentábamos y parecía explicar este gradiente se basaba en dos factores histórico-culturales: a) La particular miscegenación inicial de la población chilena y su relación con la estratificación social y b) El matrimonio discriminado por estrato socioeconómico. Los métodos de contrastación de estas hipótesis son los estudios de muestras de dadores de sangre clasificados según la estratificación propuesta por el Prof. O. Sepúlveda y las técnicas normadas de marcadores genéticos o los estudios de muestras de individuos tomados de grupos de estratos conocidos. Nuestras hipótesis se han revelado insuficientes para explicar los siguientes resultados: 1) Se encontró el mismo gradiente sociogenético para ABO en Inglaterra. 2) El estrato más alto chileno tiene frecuencias genéticas más altas de los alelos A y Rh(-) que las poblaciones europeas. 3) El gradiente interactúa con el sexo en Chile e Inglaterra. 4) No se encontró el gradiente para el alelo B que debería comportarse igual que el A.

PRI 831040279 DIB U. de Chile.

EL DETERMINISMO BIOLÓGICO . (Biological determinism).
Vivaldi, E.A. Departamento de Fisiología y Biofísica. Fac. de Medicina, Universidad de Chile.

Un sistema social debe reproducir sus propias condiciones de existencia no solo para su mantención a futuro, sino como requisito para su estabilidad presente. La práctica social de sus integrantes debe generar la aceptación de un conjunto de convicciones acerca del carácter de variantes de los determinantes de la organización social. Estos determinantes pueden ubicarse fuera de los seres humanos, o ser considerados parte de su naturaleza intrínseca. En este último caso, la organización social existente puede ser explicada como el resultado necesario e inmutable, la compleja expresión fenotípica, de una realidad biológica previamente presente en sus individuos.

Conceptos como evolución, adaptación y selección natural han inspirado entusiastas especulaciones sociobiológicas que hacen aparecer el presente como una optimización insuperable. A veces, simples analogías entre rasgos de sociedades humanas y de otros seres vivos, han servido de fundamento para sostener un determinante biológico común. Sin embargo, las bases neurales del comportamiento humano socialmente relevante, así como la especificación genética de esas bases neurales, son áreas del conocimiento cuyo desarrollo actual está lejos de permitir el reduccionismo pretendido. Ciertamente, son insuficientes para declarar obsoletos conceptos como libertad humana o cambio social.

Si bien las interpretaciones biológicas del quehacer social parecen infundadas, ellas ofrecen un interesante campo para interpretaciones sociológicas del quehacer biológico. En particular, para estudiar la influencia que sobre los biólogos ejercen tanto el sistema de poder político en que su quehacer se inserta, como aquellas ideas que la sociedad tiene sobre sí misma y que contribuyen a su propia estabilidad.