REUNION ANUAL
CONJUNTA

IV REUNION ANUAL
SOCIEDAD DE BIOLOGIA CELULAR

XIV REUNION ANUAL
SOCIEDAD DE BIOQUIMICA DE CHILE

Termas de Catillo
30 de agosto al 1º de septiembre de 1990

CONFERENCIA "PROFESOR OSVALDO CORI"

"RNA EDITING" : UN NUEVO TIPO DE MODIFICACION POST-TRANSCRIPCIONAL EN MITOCONDRIAS DE PLANTAS. (RNA editing : a new post-transcriptional process in plant mitochondria). Litvak,S., Araya,A., Begu,D., y Graves,P.V. Laboratorio de Biologia Molecular Vegetal. IBCN-CNRS. Burdeos. Francia.

Uno de los principios básicos de la biologia molecular es que la secuencia del RNA refleja aquella del DNA del cual ha sido transcrito. El descubrimiento reciente del"RNA editing" modifica algo este concepto. Se puede definir el"RNA editing", de una manera amplia, como todo proceso que lleva a cambios en la secuencia nucleotídica del RNA respecto al DNA que sirvió como templado para su transcripción. Se ha descrito este fenómeno en mRNAs de kinetoplastos, en el caso de un mRNA de mamífero y en los paramyxovirus. En todos estos casos, gracias al"RNA editing", un transcrito no funcional se transforma en un mRNA traducible. Muy recientemente se ha encontrado también este proceso en mitocondrias de plantas. En el caso de varios genes mitocondriales de múltiples variedades vegetales se ha observado la aparición de grupos uridinas en el RNA en lugar de la citidina del DNA templado.

La contribución de nuestro laboratorio reside en la demostración de la funcionalidad del RNA editado al estudiar una proteina mitocondrial : la subunidad 9 de la ATPasa mitocondrial. Al comparar la secuencia del gen y la de la proteina misma observamos que algunos aminoácidos deducidos de la secuencia genómica no se encontraban en la proteina. Cabe señalar que se trata de la primera secuencia de una proteina mitocondrial vegetal. El cambio de un aminoácido por otro podria explicarse por un cambio C$\longrightarrow$U. Tanto la presencia de 8 casos de editing en este gen, determinados por secuencia del cDNA, como la determinación de la estructura primaria de esta proteina permitió mostrar la aparición de un triplete "stop" seis amino ácidos antes de lo propuesto por la secuencia del gen. La posible función y el mecanismo de este proceso serán discutidos.

CONFERENCIA SOCIEDAD DE BIOLOGIA CELULAR

En honor del profesor *Norbel Galanti*

FACTORES MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA INCORPORACION CELULAR DE HIERRO.(Molecular Factors Involved in Cell Iron Uptake). Núñez, M.T., Dept. Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

El hierro es un elemento traza esencial que participa en procesos de unión y transporte de oxígeno y en una gran variedad de reacciones enzimáticas involucradas fundamentalmente, aunque no únicamente, en procesos de óxido- reducción. En soluciones acuosas el hierro tiene dos estados de oxidación estables: $Fe(H_2O)_6^{2+}$ y $Fe(H_2O)_3^{3+}$.En condiciones fisiológicas estos compuestos octaédricos hidrolizan y polimerizan rápidamente: a pH 7,0, la solubilidad máxima del $Fe(H_2O)_6^{3+}$ es de 10^{-17} moles/L. Lo anterior genera un problema de disponibilidad del hierro para procesos biológicos.

En mamíferos y otros vertebrados el hierro, en estado de oxidación 3+, es transportado desde lugares de absorción y almacenamiento a lugares de utilización por la proteína plasmática transferrina. La unión de Fe^{3+} a transferrina ($K_{asoc.} = 10^{2.3}\ M^{-1}$) es termodinámicamente reversible, siendo la reacción de unión cinéticamente favorable. La disociación de hierro de transferrina es sin embargo lenta, por lo que han evolucionado mecanismos celulares específicos para disociar el metal de la proteína a velocidades suficientes para satisfacer las necesidades celulares.

En condiciones normales, las células obtienen su hierro mediante el proceso celular de endocitosis mediada por el receptor de la ferrotransferrina. En la vesícula endocítica la afinidad de Fe^{3+} por transferrina es drásticamente reducida por la acidificación del interior de la vesícula mediada por una H^+-ATPasa sensible a N-etilmaleimida. Este Fe^{3+},"labilizado" es entonces reducido a Fe^{2+} y posteriormente transportado hacia el citoplasma.

En esta conferencia se discutirán los eventos moleculares involucrados en la incorporación celular de hierro mediante el proceso de endocitosis mediada por receptor.

SIMPOSIO INTERNACIONAL FUNDACION ANDES Y FUNDACION CHILENA DE BIOLOGIA CELULAR.

Gene expression: Transcription factors and growth control.
En memoria del profesor Luciano Chiang.

Chairman: Dr. Arturo Yudelevich

INTERACTION OF ADENOVIRUS E1A AND TRANSCRIPTION FACTOR TFIID. Arnold J. Berk, Molecular Biology Institute, UCLA, Los Angeles, CA 90024-1570, USA.

Several observations led us to hypothesize that the large E1A protein of adenovirus stimulates transcription from early adenovirus promoters by increasing the activity of the general host cell transcription factor which binds to TATA-boxes, TFIID. Mutation of the E1B promoter TATA-box greatly diminishes its activation by E1A (1). Substitution of the E4 TATA - box for the E1B TATA-box greatly diminishes E1A activation of the hybrid promoter (2). TFIID activity in a protein fraction prepared by phosphocellulose chromatography is increased when it is prepared from Ad2 or Ad5 infected HeLa cells, but not from cells infected with viruses mutant in the large E1A protein (3). To test this model directly, we cloned a cDNA encoding human TFIID (4), allowing us to raise specific antiserum to human TFIID protein. Results of experiments to test direct and indirect interactions of E1A protein and TFIID will be presented.

1. Wu et al. (1987) Nature 326, 512-515.
2. Pei and Berk (1989) J. Virul. 63, 3499-3506
3. Leong et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 1765-1774.
4. Kao et al. (1990) Science 248, 1646-1650

Fos and Jun: Inducible Proto-Oncogen Transcription Factors. Tom Curran. Department of Molecular Oncology & Virology, Roche Institute of Molecular Biology, Roche Research Center, Nutley, NJ 07110 USA.

The proto-oncogenes c-*fos* and c-*jun* are members of the class known as cellular immediate-early genes. Although expressed at relatively low basal level in most cell types, they are induced rapidly and transiently by a variety of extracellular stimuli including mitogenic growth factors, differentiation provoking agents, neurotransmitters and specifc ion fluxes. Recent studies demonstrated that the proteins encoded by c-*fos* and c-*jun* (Fos and Jun, respectively) are components of transcription factor AP-1. Indeed, Fos and Jun form a dimeric complex that binds to the AP-1 recognition motif and stimulates transcription *in vivo* and *in vitro*. In a general sense, these inducible protein have been proposed to function in signal transduction processes by regulating expression of specific target genes. However, given the many and varied situations in which Fos and Jun are induced it is likely that different target genes are regulated in each cell type. The situation is made more complex by the fact that both c-*fos* and c-*jun* are members of gene families and several Fos and Jun-related proteins are co-induced. Furthermore, we recently showed that Jun can form heterodimers with the CRE binding protein CREBP-1 that bind to CRE sites. Thus, multiple protein complexes with similar DNA-binding specificities can be generated. We have carried out a detailed structure-function analysis of Fos and Jun. These studies indicate that dimerization is mediated primarily by the leucine zipper motif which is like a coiled-coil structure. DNA binding is mediated primarily by regions of each protein rich in basic aminoacids that comprise a bipartite DNA-binding domain. Analysis of proteins purified from *E.coli* has uncovered a novel mechanism that regulates Fos-Jun DNA-binding activity. This involves reduction of a conserved cysteine residue present in the DNA-binding domain. *In vitro* transcription studies have identified an acidic activator region in Fos and a pro-glu activator region in Jun that function synergistically in transcriptional activation. Fos and Jun also have regions that act negatively *in vitro*. These studies will be presented in the context of a general model for the function of cellular immediate-early transcription factors in signal transduction processes.

TALLER REGULACION DE LA EXPRESION GENICA

Coordinador: Dr. Aldo Solari

El núcleo del espermatozoide tiene snRNP (The sperm nuclei has snRNP)
Concha,I., Brito,M., Pessot,C., Urzúa,U., Zárraga,A.M. y Burzio,L.O. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile.

Estudios recientes de nuestro grupo han demostrado la presencia de RNA en el espermatozoide de rata y humano. El análisis electroforético del RNA extraido mostró bandas con idéntica movilidad que los RNAs U1 ,U2 , U4 , U5 y U6 de células HeLa. El RNA total de cabezas de espermatozoides separado por electroforesis y transferido a membranas de Nylon se hibridó a sondas oligonucleotídicas complementarias a los RNAs U1,U2 y U4. El análisis autoradiográfico reveló que las bandas hibridadas corresponden a los U-RNA de células HeLa . Consecuente con esto, se encontró que entre las proteinas del espermatozoide de rata existen proteinas inmunorreactivas al suero anti-Sm . Estas proteinas muestran pesos moleculares semejantes pero no iguales a los polipéptidos de snRNP de células HeLa . Inmunocitoquímica para M.E. con suero anti-Sm demostró que sólo el núcleo del espermatozoide es inmunorreactivo.

La presencia de snRNP en el núcleo del espermatozoide es difícil de conciliar con la función propuesta para este grupo de snRNP en el procesamiento de pre-mRNA. Siendo el espermatozoide transcripcionalmente inactivo , se sugeriría que estos snRNP son portados por el espermatozoide al huevo y que jugarían un rol activo en el procesamiento de RNA después de fertilización.**(DID-UACH, Fondecyt 0063-90 y Stiftung Volkswagenwerk).**

MECANISMO DE ACCION DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA DE HIV-1 : INTERACCION CON EL tRNA PARTIDOR.(Studies on HIV-1 reverse transcriptase : interactions with the specific primer tRNA). Litvak,S., Tarragó-Litvak,L., Cottin,L., Bordier,B., Andréola,M-L., y Tharaud,D. Laboratorio de la Replicación de Retrovirus. IBCN-CNRS. Burdeos.Francia.

La DNA polimerasa-RNA dependiente (reverse transcriptase,RT) del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1), agente causal del SIDA,es una enzima crucial en la proliferación del virus y como tal un blanco privilegiado en la búsqueda de inhibidores de este flagelo. Como todas las DNA polimerasas necesita un partidor que en este caso es el $tRNA^{Lys}$ de la célula huesped. No sólo la RT de HIV es capaz de iniciar la síntesis de cDNA a partir del tRNA partidor sino que gracias a su afinidad por este tRNA probablemente participa en la selección de este partidor y en su hibridación al genoma viral.

En una primera etapa demostramos la formación de un complejo entre el $tRNA^{Lys}$ animal y la RT de HIV recombinante producida en levaduras (en colaboración con P.J.Barr.Chiron Co.USA) utilizando diversas técnicas.La formación del complejo RT-tRNA se traduce en un cambio estructural importante de la enzima el cual fué seguido por espectrofluorometria y por proteolisis con quimotripsina. Al tratar de reconstituir un sistema de transcripción inversa in vitro utilizando la RT de HIV, un fragmento del RNA de HIV que contiene el sitio de unión del partidor y el $tRNA^{Lys}$,observamos que este último era un inhibidor muy fuerte de la RT de HIV cuando esta se encontraba en su forma heterodimérica (p66/p51). En cambio la enzima homodimérica $[(p66)_2]$,producida en una cepa de levadura deficiente en proteasas,es fuertemente estimulada por el $tRNA^{Lys}$. Las evidencias experimentales que muestran la importancia de la región del anticodón en este efecto serán mostradas. Nuestra hipótesis actual es que la forma homodimérica precursora de la RT participa em la selección y la hibridación del partidor y que la forma heterodimérica sólo actua en la elongación de la cadena de DNA.

Funcionalidad de los promotores de genes de rRNA de Thiobacillus ferrooxidans (Functionality of rRNA gene promoters from T. ferrooxidans). Orellana, O., Salazar, O., Takamiya, M., Vargas, D. y Cádiz, R. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

En trabajos previos de nuestro laboratorio se identificaron dos operones de genes de rRNA ($rrnT_1$ y $rrnT_2$) en la bacteria acidófila T. ferrooxidans. A partir de una genoteca genómica de T. ferrooxidans se identificó un plásmido recombinante (pTR-1) que contenía el extremo 5' terminal del operon $rrnT_2$.

Con el objeto de estudiar la posible presencia de los promotores de la transcripción de $rrnT_2$ en el plásmido pTR-1, se subclonó en pBR322 un segmento de 2 kb que contenía el segmento adyacente al gen del rRNA 16S, generándose el plásmido pAEB-1. Mediante un ensayo funcional para promotores, basado en la expresión en E. coli de la enzima cloramfenicol acetil transferasa, se identificaron dos subfragmentos presentes en pAEB-1, que eran activos como promotores. A través de la secuenciación del DNA clonado en pAEB-1, se confirmó la presencia del extremo 5' del gen del rRNA 16S y se localizaron varias secuencias promotoras de la transcripción. Se encuentran en desarrollo experimentos orientados a determinar la funcionalidad in vivo en T. ferrooxidans de los promotores identificados.

Financiado por PNUD, FONDECYT y Universidad de Chile.

CARACTERIZACION DE PROMOTORES DE TRANSCRIPCION DEL GENERO Thiobacillus Y SU UTILIZACION EN ESTUDIOS DE TRANSFERENCIA GENETICA. (Characterization of transcription promoters from Thiobacillus genus and its use in genetic transfer studies). Sánchez, H., Metz, C. y Venegas, A. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

La bacteria acidofílica quimiolitotrófica, Thiobacillus ferrooxidans es considerada como el microorganismo más importante en el proceso de biolixiviación de cobre y uranio. Como el T.ferrooxidans es un microorganismo quimiolitotrófico obligado, su manipulación genética es muy difícil. Hasta el momento todos los esfuerzos realizados han sido infructuosos. Es por esta razón que decidimos enfrentar el problema por etapas. En primer lugar nos dedicamos a estudiar la posibilidad de manipular especies relacionadas con *T.ferrooxidans* que compartan su habitat, tales como Thiobacillus intermedius y T.acidophilus, y que por ser heterótrofos, permiten ser cultivados en medios donde experimentos de transferencia de material genético pueden ser desarrollados con mayor facilidad.

Para la manipulación genética es necesario disponer de vectores adecuados. Estos deben contener un origen de replicación y marcadores genéticos que sean expresados en la célula receptora. Para que estos últimos sean reconocidos por la maquinaria biosintética, se requiere que posean promotores de transcripción funcionales. Es por esto que el objetivo principal de este trabajo ha sido el aislamiento y caracterización de promotores de T.acidophilus y T.ferrooxidans. Hemos logrado obtener cuatro promotores de T.ferrooxidans y cuatro de T.acidophilus, los cuales han sido secuenciados.

Con el fin de determinar la capacidad de ser expresados en distintos sistemas procarióticos, estos promotores han sido transferidos a otras especies bacterianas. Para ello primeramente fueron subclonados en un plásmido de amplio rango de hospedero. Uno de ellos ha sido transferido a T. intermedius y de éste a Ps.putida, siendo capaz de conferir resistencia a estreptomicina a la bacteria receptora (Ps.putida).

Financiado por PNUD/ONUDI CHI85/002 y CHI88/003.

POLIPEPTIDOS ESTRUCTURALES DE ROTAVIRUS ASOCIADOS A LA SINTESIS DE RNA.(Structural polypeptides involved on rotavirus RNA synthesis). Spencer E. Unidad de Virología, INTA, Universidad de Chile.

Rotavirus un miembro de la familia *Reoviridae* formado por al menos seis polipéptidos organizados en una doble cubierta que rodea a un core central, el cual contiene los once segmentos de RNA de doble hebra que coresponden al genómio viral. El virus transcribe tanto "in vivo" como "in vitro" los once genes en mRNA únicos que contienen un cap en el extremo 5'terminal. Se han identificado al menos cuatro actividades enzimáticas requeridas para la síntesis del mRNA, sin embargo resulta muy difícil asociar dichas actividades con los polipéptidos estructurales. Por medio de la modificación de la estructura viral con agentes caotrópicos hemos demostrado que la proteína Vp6, que compone la cubierta interna es requerida en la transcripción y el uso de anticuerpos monoclonales ha permitido identificar las zonas de VP6 relacionadas con su función. Además, el uso de nucleótidos y de sus análogos ha permitido identificar a la proteína VP3 del core, como un polipéptido que posee actividad de ATPasa y guanililtransferasa. La formación de intermediarios covalentes entre la enzima y los nucleótidos marcados ha sido el método más adecuado para asociar actividades a los polipéptidos virales, ya que al intentar purificar cada componente se pierden las actividades, lo que sugiere que la integridad de la partícula es necesaria para la transcripción del genómio viral. Se discuten otras posibles estratégias para identificar funcionalmente otros polipéptidos estructurales.

Financiado por Proyecto Fondecyt #1017-89

SISTEMA DE MODIFICACION-RESTRICCION DE Bacillus stearothermophilus V. CLONAMIENTO Y EXPRESION EN Escherichia coli. Vásquez, C. Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Talca.

Estudios realizados con B. stearothermophilus V., han demostrado la presencia en estas células de un sistema de modificación-restricción. La síntesis de las enzimas que lo componen: la endonucleasa de restricción (BstVI) y la DNA metilasa (m BstVI), estan sometidas a patrones de modulación diferentes. Mientras BstVI es expresada en forma constitutiva durante el ciclo de crecimiento bacteriano, m BstVI, lo es sólo en un estadio muy definido de la fase temprana de crecimiento exponencial.

Para abordar el estudio de los mecanismos regulatorios responsables de esta expresión génica diferencial, los genes que codifican para ambas enzimas han sido clonados en E. coli. Se han identificado varios clones recombinantes en los que se ha detectado la actividad correspondiente tanto a BstVI como a m BstVI. La expresión de ambos genes se realiza a partir de sus respectivos promotores termofilicos, los que son eficientemente reconocidos por la RNA polimerasa de E. coli. Esta expresión es altamente dependiente de la cepa de E. coli utilizada como receptora en los experimentos de transformación. La caracterización estructural de estos genes y experimentos de transcripción in vitro, aportarán valiosa información para la dilucidación de los mecanismos expresión génica involucrados.

Financiado por Fondecyt 003-89.

TALLER LA INMUNOLOGIA APLICADA EN BIOLOGIA CELULAR Y EN BIOQUIMICA

Coordinadora: Dra. Myriam Santos

APLICACION DE ALGUNAS TECNICAS INMUNOLOGICAS BASICAS EN ESTUDIOS BIOQUIMICOS Y MICROBIOLOGICOS. (The use of some basic immunological techniques in biochemical and microbiological studies). Arredondo, R. Alvarez, S., Amaro, A.M., Rojas, J., Peirano, I. y Jerez, C.A. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Se mostrarán resultados de la aplicación de anticuerpos policlonales peparados en el laboratorio y/u obtenidos comercialmente en 1) la diferenciación de cepas de bacterias, 2) la cuantificación específica, rápida y sensible de microorganismos, 3) identificación y cuantificación de proteínas específicas en distintas células y su posible ubicación celular y 4) detección de fragmentos de DNA transferidos a nitrocelulosa mediante la técnica de Southern.

Empleamos la inmunoprecipitación líquida de los antígenos radiactivos y su análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida. También se emplearon la técnica de DIMA (dot-immuno assay) y la de "Western blott" con dos anticuerpos, el segundo marcado con ^{125}I para su revelado autorradiográfico o con anticuerpos conjugados a enzimas para la detección por color. En el caso de la técnica de Southern, se empleó una preparación comercial de anticuerpo contra digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina.

Financiado por Proyectos FONDECYT 88-0074, PNUD/UNESCO CHI/ 88-003 y Universidad de Chile.

OCTADECIL SILICA: FASE SOLIDA PARA ENSAYOS INMUNORADIOMETRICOS E INMUNOPURIFICACION DE PROTEINAS (Silica octadecyl:a solid phase for immunoradiometric assays and protein immunopurification) Ferreira.A., Aguillón.J.C., Lavandero.S. y Chiong.M. Depto. Medic.Preventiva Animal, Fac.Cs. Veterinarias y Pec. Depto.Bioquímica y Biología Molec. Fac. Cs.Químicas y Farmac. U. de Chile.

Se propone el uso de octadecil sílica (SiC18), como fase sólida alternativa para ensayos inmunoradiométricos (IRMA) y para purificación de proteínas por inmunoafinidad. SiC18 y cloruro de polivinilo (PVC) fueron comparadas en su eficiencia para detectar una proteína sérica murina (S1p) en un IRMA. SiC18, es tan sensible como PVC, ya que S1p fue detectada en diluciones plasmáticas de 1/128000 y 1/64000 respectivamente.
En inmunopurificación, anticuerpos (Acs) o antígenos (Ags) fueron unidos por simple incubación a SiC18. Así, Acs radiomarcados difícilmente eluyen desde la SiC18, excepto con detergentes. Después de la unión de Acs o Ags, los sitios de unión libres remanentes fueron bloqueados con albúmina sérica bovina, la SiC18 se incubó con preparaciones crudas que contenían Ags o Acs, montándose luego una minicolumna con la matriz, Ags o Acs se eluyeron a pH ácido. Así se obtuvo proteínas de alta pureza, en un sólo paso, aún estando presentes en trazas dentro de una mezcla proteica compleja.

Financiado por:DTI M2901-8813,FONDECYT 191/88 UNDP/WORLD BANK/WHO 88198. S.L. y J.C.A. son becados de FUNDACION ANDES y CONICYT respectivamente.

LA INMUNOHISTOQUIMICA EN EL DIAGNOSTICO DE NEOPLASIAS HUMANAS (Imunohistochemistry in the diagnosis o human neoplasms). Ordenes.G.E., Rosenberg.D.,Leiva, C. Dpto. de Biología Celular y Genética, Fac. de Medicina, Universidad de Chile y Laboratorio de Cito-histopatología Rosenberg.

El desarrollo de métodos inmunohistoquímicos de alta sensibilidad ha permitido su empleo de rutina en el análisis de tejidos neoplásicos con fines diagnósticos. La posibilidad de determinar con exactitud el tipo histológico de una neoplasia tiene gran valor en el pronóstico y tratamiento de la enfermedad ya que el comportamiento biológico de los tumores es distinto según la variedad de células que lo constituye. Las células tumorales dependiendo de su diferenciación expresan, frecuentemente, proteínas y otros componentes antigénicamente similares a los que presentan sus análogas normales o los tejidos de los cuales derivan. Ello hace posible determinar el origen histogenético de un tumor primario o metastásico mediante la identificación inmunohistoquímica de sus marcadores específicos.En la actualidad se cuenta con numerosos anticuerpos mono o policlonales específicos para diversas sustancias que sirven como marcadores de células y tejidos. Entre los marcadores utilizados destacan los filamentos intermedios, varias enzimas, antígenos de membrana, antígenos de grupos sanguíneos, hormonas, numerosas proteínas citoplasmáticas no enzimáticas, inmunoglobulinas y los llamados antígenos oncofetales. Aunque la especificidad de los antisueros utilizados suele ser muy alta, se debe tener precauciones en su aplicación al diagnóstico, ya que es posible observar reacciones cruzadas, falsos negativos, unión inespecífica y otras fuentes de error. La información obtenida por inmunohistoquímica debe ser analizada en el contexto de las características histopatológicas y las manifestaciones clínicas de la enfermedad neoplásica. Proyecto Fondecyt 1183-90.

METODOS HISTOQUIMICOS BASADOS EN LA UTILIZACION DE LECTINAS Y GLICOSIDASAS ESPECIFICAS, Y TECNICAS INMUNOCITOQUIMICAS. (Lectin histochemical methods and immunocytochemical techniques).
Rodríguez, E.M. Instituto de Histología y Patología, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Se presentará y discutirá el protocolo, aplicaciones, ventajas y desventajas de los siguientes métodos inmunocitoquímicos : 1) Inmunofluorescencia; 2) Inmunoperoxidasa; 3) Inmunoperoxidasa-Metenamina de Plata; 4) Proteína A-oro.

Se describirán métodos para la detección de dos o más antígenos en una misma célula.

Se expondrán cuatro métodos para la detección de azúcares basados en el uso de : 1) lectinas marcadas con un rastreador; 2) lectinas, anticuerpos anti-lectinas, inmunocitoquímica; 3) complejos lectinas-anti-lectinas; 4) lectinas marcadas con peroxidasa-anti-peroxidasa-inmunocitoquímica. Se expondrá acerca del uso combinado de lectinas y exoglicosidasas específicas para : a) la identificación del azúcar; b) el establecimiento de la secuencia de los residuos de azúcares en la cadena hidrocarbonada.

Finalmente se comparará el uso de los métodos señalados con su aplicación a geles electrotransferidos a nitrocelulosa.

(Grants : S-89-01 Dir. Invest. U.A.Ch.; 88-0890 FONDECYT).

DETECCION DE ANTICUERPOS POR RADIOINMUNO-PRECIPITACION. APLICACION EN EL DIAGNOSTICO DEL SIDA. (Antibody detection by radioimmunoprecipitation.AIDS diagnostic). Uribe, P. y Espejo, R. Unidad de Virología, Depto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

El diagnóstico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana se realiza normalmente por medio de la detección de anticuerpos séricos en los individuos infectados. Una de las formas más específica y sensible de detectar estos anticuerpos es midiendo la capacidad de un suero para precipitar las diferentes proteínas virales previamente marcadas radiactivamente y, posteriormente, identificando éstas por electroforesis en gel. Este ensayo se conoce como RIPA-SDS gel-electroforesis o simplemente RIPA y en esta presentación discutiremos los principales aspectos de esta técnica, de acuerdo a la experiencia lograda y los resultados obtenidos, después de casi dos años de realizarla sistemáticamente. El procedimiento consiste, en esencia, en la incubación del suero con antígenos virales marcados radiactivamente in vivo con 35S-cisteína; la posterior separación de los antígenos reaccionantes, precipitando los anticuerpos con proteína A-sefarosa; y la separación e identificación de los antígenos por electroforesis en gel de acrilamida-SDS y posterior autorradiografía. En esta forma es posible detectar los anticuerpos dirigidos contra diferentes clases de proteínas virales y estimar sus concentraciones relativas. En esta presentación se discutirán en forma particular los aspectos más relevantes con respecto a especificidad y sensibilidad de la técnica, como preparación del antígeno marcado y actividad específica, reacciones cruzadas y patrones de reacción.

TALLER RELACIONES ENTRE ESTRUCTURA MOLECULAR DE PROTEINAS, SU DESTINO Y FUNCION CELULAR

Coordinador: Dr. Nibaldo Inestrosa

ASOCIACION DIFERENCIAL DE PROTEOGLICANES DE HEPARAN SULFATO EN MEMBRANAS DEL APARATO DE GOLGI Y MEMBRANA PLASMATICA. (Differential association of rat liver heparan sulfate proteoglycan in membranes of the Golgi apparatus and the plasma membrane). Brandan E. Dept. Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile.

Los proteoglicanes (PGs) corresponden a macromoléculas compuestas de un esqueleto proteico y cadenas de glicosaminoglicanes sulfatados (GAGs) unidas de manera covalente. Estas macromoléculas pueden ser incorporadas en membranas celulares o bien ser secretadas al medio extracelular. La presencia de los PGs en cada compartimento dependerá de la existencia de dominios estructurales que determinan su destino. Hemos estudiado la asociación de PGs de heparán sulfato (PGHS) con membranas provenientes de organelos subcelulares purificados desde hígado de rata.

Los PGHS pueden ser moléculas intrínsecas (hidrofóbicas) o extrínsecas de membrana (hidrofílicas). Se encontraron las dos formas de PGHS en la membrana plasmática tanto de hígado de rata como en hepatocitos. Sin embargo, solo la forma hidrofóbica se encontró en el aparato de Golgi. Esta última se unió a columnas de Octil-Sepharose,no así la forma hidrofílica. Existe evidencia que sugiere que la forma hidrofílica deriva de la hidrofóbica y que el sitio subcelular de procesamiento sería la membrana plasmática. Una actividad procesadora, probablemente una proteasa de la membrana plasmática, ausente en el suero o en membranas del retículo endoplásmico, convierten la forma hidrofóbica en hidrofílica. Experimentos de pulso-caza utilizando (^{35}S)Na_2SO_4 demostraron que a tiempos cortos, la mayoría de los PGHS están en el aparato de Golgi y posteriormente estos migran a la membrana plasmática, el único sitio donde se encuentra la forma hidrofílica.

Estos resultados sugieren que en el hígado, el esqueleto proteico de los PGHS se sintetizan como una molécula hidrofóbica la cual posteriormente sufre modificaciones posttraduccionales en el aparato de Golgi. En cambio la forma hidrofílica del PGHS, sólo se encuentra en la membrana plasmática, lugar en el cual ocurriría el procesamiento.

(Financiado por National Science Foundation a C.B. Hirschberg y E. Brandan)

MECANISMOS DE DESTINACION DE PROTEINAS ESPECIFICOS DE CELULAS EPITELIALES POLARIZADAS. (Mecanism of protein sorting specific for polarized epitelial cells). González, A. Fac. de Medicina y Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Las células de epitelios polarizados poseen una superficie celular dividida por complejos de unión en dos dominios bioquímica, morfológica y funcionalmente distintos. Un dominio apical se especializa en funciones relacionadas con el medio externo y un dominio basolateral en el cual ocurren interacciones célula-célula, célula-matriz extracelular e interacciones con señales hormonales que integran el funcionamiento de los epitelios a la fisiología general del organismo.

Esta polaridad es, en su mayor parte, generada y mantenida por la segregación de diferentes proteínas específicas hacia uno u otro dominio de la membrana plasmática. Los mecanismos que efectúan esta destinación asimétrica de proteínas son desconocidos en muchos aspectos.

Hemos analizado el problema de la destinación apical de proteínas a la membrana plasmática de células exocrinas, infectando con virus influenza, células zimogénicas gástricas en cultivo primario, un modelo no explorado previamente. Por otro lado, se darán evidencias que indican la presencia de información determinante de una segregación apical en el antígeno de superficie del virus hepatitis B, estudiada transfectando su gen en células MDCK. Esta proteína es relativamente pequeña en comparación con otras proteínas normalmente estudiadas en la búsqueda de señales de destinación polarizada.

ASOCIACION DE LA ACETILCOLINESTERASA CON LA SUPERFICIE CELULAR. (Association of acetylcholinesterase with the cell surface).

Inestrosa, N.C. Unidad de Neurobiología Molecular, Dept. Biología Celular y Molecular, P. Universidad Católica de Chile.

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima clave del funcionamiento de la sinapsis colinérgica, por su capacidad de hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina, tanto en la unión neuromuscular como en el sistema nervioso central. La AChE muestra diferencias tanto en la distribución de sus formas moleculares como en el modo de anclarse a la superficie celular.

La asociación a la membrana se logra por modificaciones post-traduccionales de las subunidades catalíticas. Se han descrito tres mecanismos. El primero involucra la unión de 3 tetrámeros de subunidades a un tallo de tipo colagenoso (forma A_{12}) que interactúa con proteoglicanes de heparan sulfato en la matriz extracelular. Las otras dos modificaciones corresponden a anclajes hidrofóbicos a la membrana plasmática. En la forma dimérica (G_2) de la AChE, la región del diacilglicerol de una molécula de fosfatidilinositol unida al C-terminal de cada polipéptido, fija la enzima a la capa externa de la membrana. En el caso de la AChE tetramérica (G_4) del cerebro, la modificación involucra la unión covalente de un péptido hidrofóbico de 20 kDa a la membrana plasmática.
La regulación por procesamiento diferencial de ARN mensajeros permite la expresión selectiva de las formas globulares en la membrana plasmática y de las formas asimétricas en la matriz extracelular sináptica.

TRANSPORTE INTRACELULAR DE LAS GLICOPROTEINAS SECRETORIAS DEL ORGANO SUBCOMISURAL (OSC) Y SU PROCESAMIENTO INTRA Y EXTRA CELULAR.

Rodríguez,E.M., Hein,S., Nualart, F. Instituto de Histología y Patología, Universidad Austral de Chile.

El OSC es una glándula cerebral que secreta glicoproteinas al LCR donde éstas se "condensan" y forman una estructura fibrosa, la Fibra de Reissner (FR), que se extiende a lo largo del IV ventrículo y canal central de la médula espinal.

Anticuerpos específicos contra las glicoproteinas secretorias del OSC fueron utilizados para localizarlas a través de la vía secretoria y en la FR (inmunocitoquímica); y para identificarlas en "immunoblotting" de extractos de OSC y de FR. Concanavalina A y aglutinina del *Limax flavus* se utilizaron para establecer si los compuestos secretorios inmunoreactivos son pre-Golgi (RER) o post-Golgi (gránulos secretorios y FR). Ello permitió identificar tentativamente dos precursores y sus formas procesadas. Mayor evidencia se obtubo: i) mediante la obtención de anticuerpos contra cada precursor y, ii) mediante marcado biosintético.

En el OSC mismo existirían sólo dos formas procesadas, y al menos seis en la FR, indicando que habría un procesamiento post-liberación. El marcado biosintético indica que después de liberadas, las glicproteinas permanecen 1 h formando una película laxa sobre la superficie del OSC (procesamiento post-liberación?), para luego sufrir una gran condensación y formar un nuevo "trozo de FR", interviniendo puentes -S-S- y otros mecanismos desconocidos. Sorprendentemente existen dos "pools" de glicoproteinas secretorias: uno que se libera 1 h después de su síntesis y otro que permanece en el RER (como precursor?) hasta 4 ds, sugiriendo que glicoproteinas secretorias podrían liberarse al LCR desde el RER, haciendo un "by pass" al aparato de Golgi.

Financiado por: Dir.Inv. U.A.Ch., FONDECYT 0890-88 y Stiftung Volkswagenwerk.

MUTACIONES QUE AFECTAN LA BIOGENESIS NORMAL DE LOS PEROXISOMAS. (Mutations affecting peroxisome biogenesis).

Santos, M.J. Departamento Biología Celular y Molecular, P. Universidad Católica de Chile.

Los peroxisomas son organelos subcelulares esenciales, que participan en la β-oxidación de ácidos grasos, en la síntesis de plasmalógenos. Las proteínas peroxisomales son sintetizadas en ribosomas libres e importadas posttraduccionalemente al peroxisoma. Se ha postulado que estos organelos se originarían por división de peroxisomas preeistentes. Recientemente, se han identificado señales de destinación en las proteínas peroxisomales, tales como la señal Ser-Lis-Leu en la región del carboxilo terminal. A nivel del mecanismo de importación peroxisomal, se ha encontrado que éste requiere de ATP y de proteínas de la superficie organelar.

Existe una serie de afecciones genéticas humanas caracterizadas por compromiso de la función peroxisomal. Destaca entre ellas, el síndrome de Zellweger, que es una enfermedad letal. No existen peroxisomas en este sindrome y las enzimas peroxisomales se sintetizan en forma normal, pero permanecen en el citoplasma o son degradadas. Recientemente, hemos encontrado que en este sindrome existen proteínas de la membrana peroxisomal ensambladas en membranas vacías ("fantasmas peroxisomales"), lo que nos llevó a postular que este sindrome sería debido a una mutación que afecta la importación de los componentes peroxisomales (Santos et al., Science 239:1536, 1988). Estudios de complementación genética en esta afección revelan que existirían al menos 5 genes responsables del ensamblaje peroxisomal.

TALLER ESTRUCTURA Y FUNCION DE PROTEINAS

Coordinador: Dr. Jorge Babul

¿OPERAN IN VIVO LOS MECANISMOS REGULADORES DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA OBSERVADOS IN VITRO? (Do regulatory mecanisms of enzyme activity observed in vitro operate in vivo?). Babul, J. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

El control de la actividad catalítica de las enzimas es uno de los mecanismos responsables de la regulación del flujo metabólico. Sin embargo, las pruebas que muestran que los efectos observados in vitro son los responsables de la regulación in vivo son escasas.

El uso de mutantes bacterianas ha resultado ser de gran utilidad para comprender algunos aspectos fisiológicos del metabolismo. Así, es posible someter a prueba la función normalmente reconocida para una vía metabólica, estudiar el papel fisiológico de enzimas alostéricas, esclarecer la función de las isoenzimas en el metabolismo y conocer la importancia fisiológica de los estados de agregación de una proteína.

Una de las herramientas más utilizadas para determinar el rol estructural o funcional de algunos aminoácidos en una proteína, es cambiarlos por otros y examinar las propiedades de la proteína alterada. Antes del desarrollo de la tecnología del DNA recombinante estos cambios se efectuaban por medio de mutaciones fenotípicas generadas por mutágenos químicos o radiación UV. En estos casos se identifican y estudian solo aquellas mutaciones que producen un cambio específico en el comportamiento de la bacteria, por lo que es necesario poseer un ensayo que detecte las mutaciones que alteran la propiedad de la proteína en estudio. En la actualidad se han hecho más frecuente los estudios de mutagénesis dirigida del DNA que codifica a la proteína. La proteína alterada se expresa in vivo o in vitro y se estudian sus propiedades, eliminando el problema de selección de la mutagénesis química.

Adicionalmente, se dicutirán otras estrategias utilizadas para atravesar la barrera in vitro-in vivo, tales como las células permeabilizadas y las microinyectadas. (Financiado por Fondecyt).

COMENTARIOS ACERCA DEL PRESENTE Y FUTURO DE LA CINETICA ENZIMATICA. (Comments concerning the present and future of enzyme kinetics). Carvajal, N. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

Los estudios mecanísticos de las enzimas tienen como objetivo caracterizar, tanto estructural como cinéticamente, los intermediarios de la vía entre los sustratos y los productos. Para los estudios cinéticos se dispone, básicamente, de fundamentos teóricos sólidamente establecidos y de métodos que permiten una gran simplificación, precisión y confiabilidad en el análisis de los resultados. Se advierte, sin embargo, la necesidad de complementar los tradicionales estudios de velocidades iniciales y de inhibición con otro tipo de información. Al respecto, adquieren gran importancia los estudios de efectos isotópicos, de trazadores con sustratos radiactivos, el seguimiento del curso estereoquímico de las reacciones, los efectos producidos por modificaciones químicas específicas, los estudios espectroscópicos e, incluso, la información disponible acerca de la estructura tridimensional de la enzima. Se advierte, además, un interés por un mejor aprovechamiento de la información que pueden aportar las curvas de progreso de las reacciones, tanto para la estimación de parámetros cinéticos como para la diferenciación entre distintos mecanismos cinéticos.

Sin duda que los estudios cinéticos seguirán contribuyendo a la comprensión de la catalisis enzimática, no sólo desde un punto de vista básico sino también aplicado, con todas las consecuencias que ello implica. Sin embargo, un aspecto que, en mi opinión, merece mucho más atención de la que hasta ahora se le ha dado, es el empleo de la información cinética en relación con la función biológica de la enzima in vivo. El aproximar las condiciones de estudio a las esperadas en las células, abre un campo muy interesante y fructífero para los estudios cinéticos futuros.

USO DE ESPECTROSCOPIAS NMR, FT-IR Y FLUORESCENCIA EN LA DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA DE MACROMOLECULAS Y SUS INTERACCIONES. (Use of NMR, FT-IR and fluorescence spectroscopy to determine the structure of macromolecules and their interactions). Monasterio, O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Las diferentes áreas de investigación en Ciencias Biológicas han avanzado con la introducción de herramientas usadas habitualmente en Física y Fisicoquímica, como: hidrodinámica, espectroscopía, difusión y difracción. La tendencia hacia un carácter más interdisciplinario de estas ciencias, ha requerido de profundización en la aplicación de estas metódicas a la biología. Difracción de Rayos X ha sido durante mucho tiempo una herramienta que ha permitido determinar la estructura que adopta la cadena polipeptídica en una proteína. Sin embargo, las proteínas no son cristales rígidos sino más bien estructuras flexibles que en la mayoría de los casos cumplen su función a través de cambios conformacionales. Es aquí donde la Resonancia Magnética Nuclear permite realizar estudios de estructura y función. Ha sido costumbre determinar el contenido de estructura secundaria de alfa-hélice, beta-plegada y estructura al azar por dicroismo circular. Sin embargo, la espectroscopía infrarrojo nos abre nuevas perspectivas para conocer el contenido de estas estructuras que conforman una proteína. Para estudiar cambios conformacionales, interacción de ligandos y cinética de estos cambios, las herramientas más apropiadas son la fluorescencia intrínseca de las proteínas o el uso de sondas fluorescentes. La fluorescencia ha sustituido ya algunas técnicas hidrodinámicas a través de los estudios de polarización de fluorescencia.

El uso de estas espectroscopías, entre otras, es indispensable, por ejemplo, cuando se utiliza la bioingeniería para producir proteínas sintéticas funcionales.

MODIFICACION QUIMICA DE PROTEINAS. UN DESAFIO ACTUAL. (Chemical modification of proteins. An actual challenge). Slebe, J.C. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

La obtención de distintas formas de una proteína mediante modificación química, mutagénesis al azar y sitio dirigida, han posibilitado un gran progreso en la comprensión de la estructura de las proteínas y su función. Empero, el diseño de proteínas tiene aún dificultades: no se puede predecir el plegamiento y sólo se tiene un conocimiento parcial de la relación estructura-función.

El método de modificación química ha sido tradicionalmente utilizado para identificar los residuos de aminoácidos que participan en los sitios activo y regulatorios de enzimas. Esta técnica ha permitido estudiar la estructura y topografía de sitios de unión de ligandos, la localización de residuos de aminoácidos individuales en una proteína y su participación en la mantención de la conformación activa de la macromolécula. Asimismo, ha posibilitado la introducción de sondas fluorescentes, grupos cromóforos y paramagnéticos y núcleos que permiten el uso de resonancia magnética nuclear, para caracterizar a nivel molecular las alteraciones que ocurren en regiones específicas de proteínas. Entonces, la modificación química, en conjunto con métodos físicos y genéticos pueden conducir a la comprensión de la estructura y función de proteínas en solución.

Se analizarán las ventajas y desventajas del uso de la modificación química, y se presentarán algunos ejemplos que permiten comparar esta técnica con la de mutagénesis sitio-dirigida. (Proyectos: DID-UACH RS-89-37 y FONDECYT, 188/89.

TALLER CITOESQUELETO

Coordinador: Dr. Jaime Alvarez

REGULACION DE LOS MICROTUBULOS AXONALES. (Regulation of axonal microtubules) J.Alvarez, Unidad de Neurobiología Molecular. Universidad Católica, Santiago.

En axones de anfibios, reptiles y mamíferos la densidad microtubular presenta una relación inversa con el calibre; los valores son semejantes en el SNC y en nervios periféricos pero en las raíces espinales, caen a la mitad. Como los axones sensitivos y motores tienen dominios en SNC, raíz y periferie, su densidad microtubular varía a lo largo del trayecto. Los axones de tipo radicular conservan su bajo contenido microtubular cuando regeneran sobre su trayecto anatómico, pero lo aumentan al doble si regeneran en un nervio periférico. Esto indica que el citoesqueleto del axón es modulado por claves locales. Por efecto de la actinomicina-D, que destruye las células satélites del axón, estos emiten brotes y sus microtúbulos aumentan notoriamente, pero 4 mm por arriba o por debajo, el nervio tiene aspecto normal. Esto sugiere que la célula satélite está reprimiendo el citoesqueleto y la capacidad de dar brotes del axón.

Por otra parte, la hiperactividad eléctrica del axón determina en el corto plazo un incremento de los microtúbulos que se puede explicar por cambios en el equilibrio monómero-polímero; pero en el largo plazo, el aumento es del 100% lo que requiere expansión de la tubulina total en el axoplasma.

Se concluye que los microtúbulos, y por extensión el citoesqueleto del axón, están regulados por claves externas y por la propia actividad de la célula nerviosa.

BIOQUIMICA DE LA POLIMERIZACION DE TUBULINA. (Biochemistry of tubulin polymerization). O. Monasterio. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Para entender los mecanismos de polimerización de la tubulina en microtúbulos y otras estructuras, es necesario comprender el camino por el cual estas estructuras se forman a partir del dímero de tubulina. Los estudios de polimerización in vitro han demostrado que toda la información para la polimerización reside en la molécula de tubulina y que la forma de los polímeros depende de la naturaleza de metales divalentes presentes en el medio, entre otros cofactores. Así, Zn(II) induce la formación de láminas y Mg (II) de microtúbulos. Por otro lado, se ha encontrado que la población de dímeros de tubulina es heterogénea. Desde estos resultados han surgido la preguntas ¿Hay una distribución específica de isoformas de tubulina que induzcan la formación de polímeros característicos en cada tejido?. ¿Existen en un determinado tejido u órgano metales diferentes de magnesio, en concentración suficiente, para inducir otros polímeros además de microtúbulos?.

A partir de los estudios clásicos de Weisenberg en 1972 se conoce que el Ca^{2+} induce la despolimerización de microtúbulos. Sin embargo, aún no se sabe cual es el mecanismo que produce la despolimerización. Una pregunta aún de carácter más general es ¿por qué metales divalentes de una misma familia tienen efectos opuestos?.

En este momento se desarrolla una activa investigación para obtener información sobre la estructura de la tubulina y los sitios de acción de los diferentes cofactores. Sin embargo, desde un punto de vista biofísico aún queda mucho camino que recorrer para comprender la relación entre la estructura de la tubulina y el mecanismo de autoensamblaje.

REORGANIZACION DEL CITOESQUELETO Y SECRECION DE HCL EN CELULAS OXINTICAS DE AVE (Cytoskeletal reorganization and HCl secretion in avian oxyntic cells) Koenig C.S. y Debiké M. Dpto. Biol. Celular, P. Universidad Católica de Chile.

Las células oxínticas permiten estudiar en una célula polarizada el rol del citoesqueleto en un proceso secretor complejo. Al estimular la secreción de HCl, el polo luminal de estas células experimenta una notable reorganización de membranas y matriz citoesquelética, que tiene por objeto incorporar a la superficie secretora el sistema tubular de membranas, que contiene a la bomba de protones gástrica.

Para analizar la relación entre la reorganización del polo luminal, el citoesqueleto y la secreción de HCl, se comparan tanto las propiedades de membranas luminales aisladas, como la estructura de células oxínticas de pollo, en secreción de HCl estimulada por histamina y reposo inducido por cimetidina. Se usó fraccionamiento subcelular cuantitativo, microscopía electrónica, citoquímica e inmunocitoquímica.

Al estimular la secreción de HCl: se desplazan los complejos de unión hacia la base de la célula y se incorpora el sistema tubular a la membrana luminal, formándose un prominente polo secretor delimitado por profundos canalículos intercelulares ricos en prolongaciones; y se redistribuyen las proteínas citoesqueléticas, demostrándose un anillo de F-actina, miosina y filamina, unido a los complejos de unión, y un citoesqueleto de F-actina asociado a las membranas del polo secretor que excluye a miosina y filamina en las prolongaciones luminales de las células en secreción.

La estabilidad de las dos organizaciones de las membranas y citoesqueleto asociado, permite aislar fracciones subcelulares que conservan en parte propiedades estructurales y bioquímicas: vesículas derivadas del sistema tubular, pobres en actina, con actividad K-NPPasa alta y Mg-ATPasa baja; y fragmentos de prolongaciones del polo secretor, estrechamente asociadas a actina y a polipeptido de 28kD, con actividad K-NPPasa baja y Mg-ATPasa alta.

TALLER TRANSDUCCION DE SEÑALES

Coordinador: Dr. Tulio Núñez

REGULACIÓN DE LA TRANSDUCCIÓN POR INTERMEDIARIOS METABÓLICOS. ROL DE ACIL-CARNITINAS Y ACIL-COENZIMOS A EN LA EXPRESIÓN DE ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA KINASA C. (Regulation of transduction by metabolic intermediates. The role of acyl-Coenzyme A and acyl-carnitines in protein kinase C activity). M.Bronfman. Depto.Biol.Cel & Molec., Fac. Cien. Biol., P.Universidad Católica de Chile.

La proteína kinasa C tiene un rol fundamental en la regulación de importantes fenómenos fisiológicos como secreción, contracción, funciones a nivel de receptores de membrana, diferenciación celular y tumorigénesis. Depende para su actividad de Calcio, de fosfatidilserina (PS) y de un diglicérido (DAG), molécula que se libera al activarse el ciclo del fosfatidilinositol, y que es considerada un segundo mensajero para la enzima. La pkC esta localizada principalmente en el citosol y se transloca a la membrana al activarse, por un proceso cuyo mecanismo no se conoce. En nuestro laboratorio hemos demostrado que concentraciones fisiológicas de acil-Coenzimos A de ácidos grasos potencian la actividad de la enzima en presencia PS, DAG y de Calcio. El mecanismo de esta activación esta basado en una disminución del requerimiento de la enzima por fosfolípidos, mecanismo que hemos demostrado utilizando pkC de cerebro de rata e histona como sustrato y también pkC de plaquetas humanas y un sustrato fisiológico de la enzima. Por otra parte, hemos encontrado que ésteres del CoA de drogas hipolipidémicas que tienen además actividad tumorigénica y se forman *in vivo* en la celula potencian la actividad de la pkC por un mecanismo similar. En contraposición, las acil-carnitinas de ácidos grasos, moléculas que en la celula se encuentran en equilibrio con los acil-CoAs por intermedio de la carnitinas acil-CoA transferasas, tienen una actividad inhibitoria sobre la pkC, inhibición que hemos encontrado que se produce tanto *in vitro* como en plaquetas intactas. En la presencia simultanea de acil-CoAs y de acil-carnitinas, en razones fisiológicas, se observa que, a bajas concentraciones de ambos predomina la acción activadora de los acil-CoAs, mientras que a concentraciones altas (pero fisiológicas) de ambos predomina el efecto inhibidor de las acil-carnitinas. Estos resultados sugieren que la expresión de actividad de la pkC en células intactas podría estar regulada por la razón y concentracion de acil-CoAs y de acil-carnitinas. Por otra parte, los resultados utilizando acil-CoAs no naturales, derivados de drogas hipolipidémicas de uso clínico sugieren que la formación in vivo de estos derivados podría modificar este posible mecanismo regulatorio y explicar algunos de los efectos farmacológicos y las características de promotores de ellas.

Financiado por Fondecyt 802/90

TRANSDUCCION DE SEÑALES EXTRACELULARES: MECANISMOS HOMOLOGOS PARA RESPUESTAS DIVERSAS. *(Transduction of extracellular signals: homologous mechanisms for diverse responses.)* *C. Connelly. Depto. Biología Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.*

Hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento interactúan con receptores específicos en la membrana plásmica e inician una serie de reacciones que lleva a una respuesta celular. Aunque existen un gran numero de diferentes efectores para transmitir información es evidente que existe grandes familias de proteínas que realizan funciones similares en distinctas células. Entre los grupos de proteínas involucradas en transducción de señales estan los receptores transmembránicas, las proteínas G y las enzimas que generan segundos mensajeros. Las proteínas G cumplen papeles esenciales en la regulación de adenilil ciclasa, fosfolipasa C, canales ionicos y visión. Muy recientemente la homología en estos sistemas se hizo mas evidente en las células quimiosensibles (epitelio de células alfactorias y de la lengua) donde se ha demostrado que proteínas G específicas interactuan con adenilil ciclase para regular canales ionicos con mecanismos muy similares a los de neurotransmisores y de la rodopsin. Es interesante notar que hay evidencia para la coordinación entre diferentes sistemas donde los products de una vía modulan la respuesta de otra vía ("diálogo" entre receptores).

Estudios de nuestro laboratorio sobre los mecanismos moleculares que participan en la inducción de la maduración meiótica en oocitos de X. laevis indican que estas células responden a varias señales extracelulares (progesterona, insulina, acetilcolina) y que existen vías paralelas para inducir la maduración. El enfoque actual abarca una análisis de la estructura de los genes de proteínas involucradas en este proceso.

RECEPTORES DE INOSITOL TRISFOSFATO EN MEMBRANAS DE RETICULO SARCOPLASMATICO AISLADO DE MUSCULO ESQUELETICO DE ANFIBIO. (Inositol trisphosphate receptors in sarcoplasmic reticulum membranes isolated from amphibian skeletal muscle). Hidalgo, C. y Rojas, C. Centro de Estudios Científicos de Santiago y Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Se ha postulado que el inositol trisfosfato (IP3) actúa como mensajero químico en el proceso de acoplamiento excitación contracción en músculo esquelético. Existen numerosas evidencias que apoyan este modelo; entre ellas se ha demostrado que el IP3 abre los canales de calcio del retículo sarcoplasmático (RS). Por tal motivo, hemos investigado si estas membranas poseen receptores a IP3, encontrando una densidad de receptores de 1-3 pmoles por mg de proteina, con un Kd de 0.1-0.2 uM.

Se ha demostrado que los canales de calcio poseen sitios de unión a ryanodina, por lo cual se investigó si los receptores de ryanodina aislados y altamente purificados unén IP3. Se encontró que los receptores a IP3 no copurifican con los receptores a ryanodina, indicando que los canales de calcio sensibles a IP3 son diferentes a los modulados por ryanodina. Estos resultados demuestran que las membranas de RS poseen al menos dos tipos diferentes de canales de calcio. Se discutirá la proyección de estos resultados en términos de los modelos posibles de acoplamiento.

Financiado por FONDECYT 972, NIH GM35981

ONCOGENES Y PROLIFERACION CELULAR. (Oncogenes and cell proliferation). Santos, M. Depto. Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Las células normales pueden dividirse o permanecer en reposo proliferativo pues cuentan con mecanismos específicos que regulan su proliferación. Tales mecanismos se encuentran alterados en las células tumorales, lo que determina que éstas se multipliquen y den lugar a la formación de tumores. En los últimos años se han acumulado evidencias que sugieren que los genes que codifican para muchas si no todas las proteínas reguladoras de la proliferación celular corresponden a proto-oncogenes. Mutaciones puntuales o reordenamientos cromosómicos que afecten a los proto-oncogenes, pueden activarlos convirtiéndolos en oncogenes, con los consiguientes cambios en la estructura, función o niveles celulares de las proteínas correspondientes (oncoproteínas). La transformación celular resulta de la acción concertada de oncoproteínas particulares que interfieren con la funcionalidad de, al menos, dos compartimientos subcelulares claves en la regulación de la proliferación celular, como es el caso de la membrana plasmática y del núcleo. En consecuencia, la proliferación de las células tumorales adquiere una antonomía que prácticamente las independiza de la acción de factores externos y las hace capaces de iniciar un nuevo ciclo de división inmediatamente después de finalizar el precedente. En este contexto, cabe destacar la homología estructural y funcional existente entre algunas oncoproteínas y algunos elementos participantes en la transducción de señales conducentes a un sólo ciclo de división. En efecto, entre las oncoproteínas se ha encontrado símiles activados de factores de crecimiento, de receptores para los mismos, de proteínas transductoras tipo G, de quinasas, etc., todos los cuales, de una forma u otra determinan o contribuyen a que una célula transformada o cancerosa permanezca en contínua proliferación.

Proyecto FONDECYT 1183/90.

TALLER INTERRELACIONES METABOLICAS ENTRE LAS PLANTAS Y SU ENTORNO

Coordinadora: Dra. Luz María Pérez

RESPUESTAS DE LAS PLANTAS A CONDICIONES DE ESTRES. (Plant responses to stress conditions) Cardemil, L. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Las plantas, al igual que todos los organismos vivos, responden a condiciones de estrés con síntesis de nuevas proteínas. Entre éstas debemos mencionar a las proteínas universales de estrés térmico de 70 kDa y a la ubiquitina. Esto es lo que ocurre en dos plantas chilenas Prosopis chilensis y Araucaria araucana, donde los niveles de mRNA para ambas proteínas aumentan en forma significativa, con síntesis de novo de la proteína de 70 kDa y aumento de ubiquitina. Ambas proteínas protegen a la planta otorgándole termotolerancia al calor. La ubiquitina marca a las proteínas que han perdido su conformación debido a la condición de estrés térmico, permitiendo que sean reconocidas por proteasas y degradadas. Por lo tanto, libera a la planta de moléculas incapaces de cumplir su función, quedando en las células sólo las proteínas que tienen la estructura terciaria o cuaternaria adecuada para su funcionalidad.

En ningún caso, las plantas sometidas a estrés térmico sufren de una degradación masiva de proteínas. Tal degradación es un proceso extremadamente bien regulado en las plantas. Cualquier señal de estrés del medio ambiente que pueda significar peligro de sobrevivencia para la planta, induce la síntesis de un péptido pequeño que es inhibidor de proteasas. La presencia de tal inhibidor se debe a síntesis de novo de la molécula, provocada por señales químicas de metabolitos secundarios volátiles como es el ácido jasmónico.

RESPUESTAS METABOLICAS DE LA CEBADA AL ESTRES HIDRICO Y BAJAS TEMPERATURAS. (Metabolic responses of barley to water and cold stress). Corcuera, L.J., Zúñiga, G.E. y Alberdi, M. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile; Instituto de Botánica, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

La escasez de agua y las bajas temperaturas son algunos de los factores ambientales más limitantes para el crecimiento de las plantas en el mundo. A pesar de su importancia, los mecanismos moleculares de resistencia a la sequía y al frío son aún poco comprendidos. En este trabajo se pretende discutir algunos de los cambios metabólicos que ocurren en las plántulas de cebada (*Hordeum vulgare*) sometidas a estos dos factores limitantes.

Plántulas bajo estrés hídrico acumularon prolina, glicil-betaína, glucosa y lípidos polares. Plantas tratadas a baja temperatura, en cambio, no acumularon prolina ni betaína, pero sí lípidos polares. La proporción del ácido linolénico en varias fracciones de lípidos polares varió significativamente. Este y otros cambios metabólicos observados parecen tener importancia en la adaptación al estrés. Sin embargo, plantas sometidas a estrés hídrico se hicieron susceptibles al ataque de áfidos. Glicil-betaína podría ser el factor susceptibilizante, pues aumentó la reproducción de los insectos alimentados con una dieta artificial.

Financiado por FONDECYT 1126-89 y 0897-88/DIC-UACH

DEGRADACION DE LIGNINA POR HONGOS Y BACTERIAS (Lignin degradation by fungi and bacteria). González,B. Laboratorio de Bioquímica. Facultad de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile. Casilla 114-D. Santiago, Chile.

La celulosa, la hemicelulosa y la lignina son los componentes poliméricos principales de las estructuras vegetales. La lignina está formada por monómeros del tipo fenilpropanoico unidos por distintos tipos de enlace. Por ser insoluble y estereoirregular es difícilmente atacada por insectos y microorganismos, lo que le confiere a esta macromolécula un rol protector de la célula vegetal. A pesar de ello, la lignina es degradada biológicamente, proceso en el que ciertos grupos de hongos juegan un rol fundamental.

Evidencia bioquímica obtenida recientemente indica que los hongos ligninolíticos poseen un conjunto de enzimas extracelulares capaces de atacar diversas preparaciones de lignina. Por su parte, las bacterias filamentosas degradan preferentemente lignocelulosas de plantas anuales, produciendo intermediarios del tipo ligninoso. Finalmente, existen varios grupos de bacterias capaces de utilizar subestructuras de la lignina como única fuente de carbono y energía. Entre estas subestructuras están las del tipo arilglicerol-β-ariléter que contienen el enlace β-O-4, el más abundante de la lignina. Estos compuestos de bajo peso molecular son liberados por la acción de los hongos en ambientes en los que está ocurriendo la ligninolisis. De esta manera, bacterias y hongos actuarían conjuntamente en la transformación completa de lignina a CO_2.

INTERACCION PLANTA-FITOPATOGENO: UN MODELO DE DEFENSA DEL TEJIDO VEGETAL. (Plant-phytopathogen interaction: the plant tissue defense model). Pérez, L. M. Dep. Bioq. Biol. Molec., Fac. Cs. Quím. Farm., Univ. de Chile.

Los tejidos vegetales se encuentran expuestos al ataque de fitopatógenos. Para defenderse de esta agresión, poseen la información génica que les permite sintetizar entre otros, a metabolitos secundarios, de bajo peso molecular, llamados fitoalexinas.

La especificidad para el ataque de un patógeno parece estar dada por factores de reconocimiento que involucran la presencia de glicoproteínas, tanto en la superficie del patógeno como de la planta.

La secreción de enzimas hidrolíticas le permiten al patógeno disolver la pared celular vegetal, pero a su vez permiten generar fragmentos de pared celular que actúan como inductores de la respuesta defensiva de la planta.

El conjunto de factores involucrados en el reconocimiento del fitopatógeno y la planta, junto con los mecanismos defensivos que ésta induce, se plantean en un modelo que puede ser resuelto experimentalmente. El modelo es aplicable al mejoramiento genético de plantas sensibles al ataque por patógenos.

Financiado por FONDECYT (157/88) y DTI (B 2950-8923).

TALLER IMPACTO DE LA BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR EN EL DESARROLLO DE LA BIOMEDICINA

Coordinador: Dr. José Minguell

LA FIBROSIS QUISTICA: UNA ENFERMEDAD PARA UN ESFUERZO CONJUNTO. Eguiguren, A.L., Vergara, L., Hidalgo, J., Riquelme,G., Liberona, J.L., Barros,F., Caviedes,R., Riveros,N., Orellana,O., Valenzuela,C., Largo,I., Avendaño,I., Latorre,J.C., Wolff,D. y Stutzin,A. (Proyecto Multidisciplinario en Fisiopatología Molecular). Deptos. de Medicina Experimental, Fisiología y Biofísica, Bioquímica y Biología Facultad de Medicina. U. de Chile,Centro de Estudios Científicos de Santiago(CECS), Depto. de Genética, Enfermedades Respiratorias y Anatomía Patológica Hosp. Calvo Mackenna y Fac.de Ciencias Universidad de Chile.

La fibrosis quística(FQ) es la enfermedad genética recesiva letal mas frecuente en la población caucásica, con una frecuencia de 1/1800 en EEUU y 1/4000 en Chile. Esta enfermedad, descrita como una entidad patológica independiente en 1938, constituye hoy uno de los mayores desafíos para la medicina moderna, debido a su elevada frecuencia y costo vital. La sobrevida promedio actual en Chile bordea los dos años, y la edad promedio de diagnóstico es similar. El cuadro clínico se caracteriza por un compromiso multi-orgánico, afectando esencialmente las glándulas exocrinas. La causa de muerte en la mayoría de los casos se debe a cuadros respiratorios terminales. El defecto básico responsable de la expresión fisiopatológica parece ser una alteración en la permeabilidad de la membrana celular al cloruro. Con el clonamiento del gen de la FQ en 1989, ha comenzado una nueva etapa en la exploración de la enfermedad, en lo que se refiere a diagnóstico de certeza prenatal, identificación de o de las proteínas mutadas, manejo terapéutico y terapia genética. La convergencia de las diferentes disciplinas biológicas,básicas y clínicas es sin duda el camino que nos permitirá resolver este problema. El rol que juegan la biología celular y la biología molecular, orientadas hacia la fisiopatología molecular es crucial. Es nuestra intención demostrar la factibilidad de proyectos multidisciplinarios orientados a resolver problemas biomédicos de primera magnitud.(Financiado por FONDECYT 0448-88 y Cystic Fibrosis Found.)

INTERACCIONES CELULA-CELULA Y CELULA-MATRIZ EXTRACELULAR: IMPLICACIONES EN LA BIOLOGIA DEL TRASPLANTE DE MEDULA OSEA (Cell interactions and bone marrow transplantion). Minguell, J.J. Biología Celular, INTA. Universidad de Chile.

Una de las etapas primarias en la iniciación del proceso hematopoyético, es el reconocimiento mutuo entre célula progenitora hematopoyética y estroma o microambiente medular. Este proceso implica finalmente que la célula progenitora se ubica (homing) en un lugar preciso y recién allí es capaz de iniciar los procesos de proliferación y diferenciación celular. El mecanismo de homing implica a lo menos dos procesos: uno mediado por proteínas de anclaje, del tipo de lectina C que interactuan con manosil y galactosil glicoconjugados y otro mediado por proteoglicanos de superficie que interactuan con dominio tipo heparina en fibronectina. La acción concertada de estos procesos de adhesión determina especificidad e intensidad de adhesión. La posibilidad de manipular experimentalmente estos mecanismos en "cosechas" de médula ósea humana (manejo ex-vivo) permitiría mejorar la capacidad de las células progenitoras de "repoblar" mejor y mas precozmente la médula, al ser transfundidas (trasplantes de médula ósea) a pacientes con alteraciones hematológicas o con tumores sólidos.

En este taller se revisaran conceptos de interacciones celulares adhesivas, su modulación por drogas y la potencialidad de estos tratamientos en terapias reconstitutivas de la función hematopoyética, por medio de trasplantes de médula ósea, en su variedad autóloga o alogénica.

Financiado por Proyectos FONDECYT y Programa Académico Avanzado, Universidad de Chile.

CITOLISIS MEDIADA POR CELULAS Y SU APLICACION TERAPEUTICA. (Cell mediated cytolisis and its therapeutic application). Miranda, D[1], Gaggero, A.[2], Sepúlveda,C.[3], Puente, J[1] Depto. Bioquímica y Biología Molecular. Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas[1]. Depto. Microbiología[2] y Laboratorio de Inmunología[3]. Hospital Clínico, Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

La Citolisis mediada por células NK o células "agresoras naturales" es espontánea y se caracteriza por lisar células tumorales, transformadas por virus y bacterias. Por esta razón, se les ha asignado un papel dentro de los mecanismos defensivos contra neoplasias e infecciones virales y bacterianas.

Diferentes hormonas y factores de crecimiento pueden estimular esta actividad citolítica lo que adquiere gran relevancia por las posibilidades terapéuticas de las patologías ya mencionadas en las cuales la actividad citolítica es muy baja o nula. La linfoquina interleukina-2 (IL-2) es capaz de inducir una nueva actividad citolítica más amplia y más eficiente. En esto se basa la inmunoterapia adoptiva (anti-neoplásica) que utiliza linfocitos sanguíneos periféricos (PBL) o linfocitos que infiltran el tumor (TIL) del paciente, se tratan in vitro con IL-2 y posteriormente se administran nuevamente.

Nuestro interés se ha centrado en el estudio de los mecanismos bioquímicos involucrados en la citolisis y en la futura aplicación de este abordaje terapéutico.

Proyecto FONDECYT 90-1115.

PATOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR DE LA LITIASIS BILIAR POR CALCULOS DE COLESTEROL. (Cellular and Molecular Pathology of cholesterol gallstones). Rigotti, A., Miguel, J.F. y Nervi, F. Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina, P. Universidad Católica de Chile.

Las enfermedades de la vesícula biliar son frecuentes en Chile. Los cálculos de colesterol afectan a 35% de la población mayor de 20 ā, de preferencia a mujeres (45%). Representan la causa de cirugía más común, y son el principal factor de riesgo de cáncer vesicular. Las fases críticas de la enfermedad son: 1. exceso de secreción biliar de colesterol; 2. nucleación o cristalización del colesterol en la bilis; 3. crecimiento de cristales y aglomeración en cálculos. El colesterol se secreta en la bilis solubilizado en vesículas bilamelares de lecitina. Existen en la bilis al menos 15 proteínas (la mayoría también en plasma) que aceleran o retardan la nucleación. El mecanismo de secreción biliar de lípidos es poco conocida. Trabajos en colaboración (Dr. Garrido) demostraron el transportador vesicular de lípidos dentro del canalículo biliar (Hepatology 1987; 7: 235), y otros (Dr. Brandan) demuestran la existencia de glicoproteínas asociadas a estas vesículas (Gastroenterology 1990; 98:A124). Hemos demostrado que tanto la esterificación hepática de colesterol como la producción y secreción sinusuoidal de VLDL, modulan recíprocamente la cantidad de colesterol secretada a la bilis (J.Clin.Invest.1988;82:1818). En estudios recientes se ha determinado que las leguminosas aumentan la saturación biliar de colesterol (Gastroenterology 1989; 96: 825; J.Lipid Res.1989; 30:1041) y por tanto, podrían ser un factor de riesgo de estas enfermedades.

En este taller discutiremos protocolos experimentales en uso, relacionados con secreción y nucleación de colesterol.

TRABAJOS DE INCORPORACION

ESTUDIOS DEL MECANISMO DE DEGRADACION DE FOSFATIDILINOSITOL (4) FOSFATO EN MEMBRANAS DE OOCITOS DE X. LAEVIS. (Studies on the mechanism of degradation of phosphatidylinositol(4)phosphate in X. laevis oocyte membranes) *Jacob, G. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. (Patrocinio: J. E. Allende)*

El oocito de X.laevis es un modelo experimental que permite el estudio de mecanismos de acción de hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento. Los oocitos responden frente a algunas señales y además la microinyección de mRNA aislado de diversos tejidos conduce a la expresión funcional de una serie de receptores de membrana. Esto ha motivado el estudio del sistema de transducción de señales externas que involucra la activación de fosfolipasa C, con la generación a partir de fosfatidilinositol(4,5)bisfosfato de los segundos mensajeros inositol(1,4,5)trifosfato y diacilglicerol. Esto ocurre con un aumento del recambio de fosfoinosítidos y nuestro interés se ha centrado en el estudio de las vías de síntesis y degradación de fosfatidilinositol(4)fosfato. En este trabajo se identifica una actividad fosfomonoesterasa en membranas aisladas de oocitos que hidroliza al fosfatidilinositol(4)fosfato a fosfatidilinositol y fosfato, y que es inhibida en un 100% por fructosa(1,6)bisfosfato (6 mM) y α-glicerol fosfato (10 mM) y parcialmente por fructosa-(2,6)bisfosfato y fosfatidilglicerol. Por otra parte, se demuestra la presencia de una actividad tipo fosfolipasa C que actúa sobre fosfatidilinositol con la generación de inositol(1)fosfato y que no utiliza fosfatidilinositol(4)fosfato. Por último también se encontró en el sistema fosfomonoesterasas que catalizan la hidrólisis de inositol tri, di y monofosfato.

Apoyado por FONDECYT, The Council for Tobacco Research y la Universidad de Chile.

CARACTERIZACION DEL DOMINIO CARBOXILO TERMINAL DE TUBULINA POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CON LA SONDA 4',6 DIAMIDINO-2-FENILINDOL. (Fluorescence spectroscopic characterization of the C-terminal domain of tubulin with 4',6 diamidino-2-phenylindol as a probe). **Ortiz, M., y Monasterio, O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.**

La tubulina, un heterodímero de dos subunidades α y β, posee un sitio de unión de alta afinidad para magnesio localizado en el sitio intercambiable del GTP (sitio E). Las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) que estimulan la polimerización, y posiblemente calcio, que la inhibe, se unen a la región carboxilo terminal.

Con el propósito de caracterizar el sitio de unión de la sonda fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y determinar la influencia de la región carboxilo terminal sobre la estructura y función de la tubulina, se realizaron estudios de fluorescencia de la sonda en presencia de tubulina nativa y de los productos principales de la digestión de tubulina con subtilisina unida a agarosa. La distancia entre los sitios de unión de DAPI y Co^{+2} en el sitio E se estimó en 83 Å, a diferencia de los 35 Å determinados en forma preliminar. El máximo de emisión a 465 nm de DAPI libre en solución, experimentó un corrimiento hacia el rojo con el aumento de la constante dieléctrica del solvente. El máximo de emisión de la sonda en presencia de tubulina tuvo un corrimiento hacia el azul desde 465 nm a 452 nm, indicando que la sonda en el complejo DAPI-tubulina se encontraría en un microambiente hidrofóbico de polaridad semejante al isobutanol con algún grado de exposición al solvente. Producto de la hidrólisis parcial de tubulina con subtilisina-agarosa, se aislaron dos fracciones de péptidos, una de mayor masa molecular que contenía la región amino terminal (S-tubulina) y otra los péptidos carboxilo terminal de aproximadamente 3 KDa provenientes de las subunidades alfa y beta. La cinética de digestión de la tubulina seguida por SDS-PAGE fue al menos bifásica. Las constantes de velocidad para la primera fase de la digestión de las subunidades y fueron 1,31 x 10^{-2}/min y 3,35 x 10^{-2}/min, respectivamente. La misma conducta con valores similares para las constantes de velocidad fue encontrada cuando se cuantificó la disminución de la intensidad de fluorescencia o el corrimiento hacia el rojo del máximo de unión de DAPI en presencia de la mezcla de tubulina y sus productos a diferentes tiempos de digestión. El espectro de emisión de DAPI en presencia de S-tubulina mostró un máximo de emisión a 460 nm y una intensidad menor que la del complejo con tubulina. La adición de la fracción carboxilo terminal a la sonda sólo produjo un aumento de la fluorescencia en presencia de S-tubulina.

Se concluye que el sitio de unión de la sonda se localiza en la S-tubulina y es de carácter hidrofóbico, y que los péptidos carboxilo terminal interactúan con la S-tubulina.

Financiado por proyectos FONDECYT 1133-89 y DTI.

EFECTOS BIOLOGICOS DEL ACEITE DE PESCADO EN SUJETOS NORMALES Y DISLIPIDEMICOS. ESTUDIO DOSIS RESPUESTA. (Biological Effects of Fish Oil in Normal and Dyslipidemic Subjects. A Dose Effect Study). **Skorin C., Arteaga A., Villanueva C.L., Guasch V., Acosta A.M. y Leighton F. P.U. Catolica de Chile.**

Estudios epidemiológicos en esquimales sugieren que aceites de pescado, ricos en ácidos grasos w3, tendrían un importante rol en la prevención de la cardiopatía coronaria arterioesclerótica. Acidos grasos w3 se incorporan a membranas y se sabe que modifican una serie de parámetros bioquímicos. Se estudió el efecto biológico y los posibles mecanismos bioquímicos de acción con aceite de pescado nacional en sujetos normales y dislipidémicos que recibieron 2, 4 y 6g diarios de ácidos grasos w3. Se evaluaron fundamentalmente parámetros que, de acuerdo a las teorías vigentes participarían en la formación de placas aterogénicas: niveles de lípidos circulantes, producción de eicosanoides, stress oxidativo y función peroxisomal. Los resultados muestran que EPA y DHA se incorporan a fosfolípidos en suero y membrana a la dosis más baja utilizada (2g). Se observan cambios en lípidos circulantes con 4 y 6g de w3, el más importante de éstos es una disminución de casi un 50% en los triglicéridos totales o de VLDL. TxB2 en suero y LTB4 liberado por células polimorfonucleares, disminuyen cuando la dosis de w3 es de 4 o 6g diarios. La capacidad antioxidante del plasma disminuyó con el consumo de aceites poliinsaturados, sin embargo los niveles séricos de vitamina E no se modifican. No se observó efecto del aceite de pescado en la producción de acetato o de cuerpos cetónicos.

(Financiado por Fondecyt 250/88 y PNUD CHI/88/017).

COPOLIMEROS DE ACIDO GLUTAMICO Y TIROSINA SON INHIBIDORES POTENTES DE LA CASEINAQUINASA II DE OOCITOS DE X. laevis (Copolymers of glutamic acid and tyrosine are potents inhibitors of casein kinase II from X. laevis oocytes.) Téllez, R. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. (Patrocinio: Dra. Catherine Connelly).

Polipéptidos ricos en aminoácidos ácidos inhiben la actividad de la caseínaquinasa II de oocitos de X. laevis. La presencia de tirosina en estos polipéptidos aumenta en forma notable su capacidad inhibidora. Esto ocurre tanto usando caseína como un péptido sintético, RRREEETTTEEEE, como sustratos. La proporción de tirosina en el polipéptido es importante y se observó que el mejor inhibidor de la enzima es el poliglu:tir (4:1), el cual tiene un I_{50} de 20 nM. Este valor es de 250 veces inferior al I_{50} del homopolímero de ácido glutámico de peso molecular semejante.

La inhibicion por poliglu:tir (4:1) es de tipo competitivo con respecto a caseína como sustrato y puede ser revertida completamente aumentando la fuerza iónica.

La capacidad inhibidora relativa de los polipéptidos analizados es, en orden descendiente: poliglu:tir (4:1) > poliglu:tir (1:1) > poliglu > poliglu:fenilala (4:1)>poliglu:ala (6:4) > poliglu:leu (4:1).

El mayor efecto inhibidor de poliglu:tir (4:1) se observa también sobre la actividad de caseínaquinasa II de otros origenes, por lo cual parece ser un efecto común sobre este tipo de enzimas.

Apoyado por FONDECYT, The Council for Tobacco Research y la Universidad de Chile.

COMUNICACIONES LIBRES

LAS PROTEINAS NO HISTONICAS MATERNALES SE LOCALIZAN EN LA REGION APICAL DE LAS LARVAS PLUTEUS DE Tetrapygus niger. (Maternal non histones chromosomal proteins are clustered in the apical region of Tetrapygus niger plutei larvas). Abuter, E., Puchi, M., Imchenetzky, M. Depto. Biología Molecular, Universidad de Concepción.

Las proteínas cromosomales no históncias (PCNH) en eucariontes son muy heterogeneas y tejido específicas. A la fecha se desconoce el destino de las PCNH de ovocitos post-inseminación (p.i.) y su distribución diferencial en el embrión. Con el objeto de investigar este problema en el erizo de mar Tetrapygus niger, se aislaron PCNH desde ovocitos obteniéndose anticuerpos anti PCNH en conejos. Los sueros obtenidos fueron utilizados para detectar la prevalencia de las PCNH de ovocitos en estados larvales de desarrollo por técnicas de Western Blot e inmunocitoquímicas. El sistema de detección utilizado fue el de streptavidina-biotinilada unida a peroxidasa como enzima marcadora.

Los resultados obtenidos utilizando Western Blot demuestra la prevalencia de la mayoría de las PCNH maternas hasta etapas larvarias de desarrollo. Mediante el uso de técnicas inmunocitoquímicas se verificó la presencia de PCNH provenientes de ovocitos solamente en núcleos de embriones. Con la técnicas permeabilización de los embriones enteros se logró determinar la localización preferencial de PCNH de ovocitos en la zona apical de la larva de 72 horas p.i.

Se discuten estos resultados en función del posible rol de las PCNH de ovocitos en la determinación del linaje celular.

Financiado por Proyectos 20.31.17 y 20.31.35, Universidad de Concepción y FONDECYT 0789/88.

DETECCION DE AGENTES GENOTOXICOS DIRECTOS E INDIRECTOS EN EXTRACTOS DE MATERIAL PARTICULADO DEL AIRE DE SANTIAGO, MEDIANTE EL TEST DE AMES(Assay of direct and indirect genotoxic agents in organic extracts from Santiago air borne particles,by Ames test)Adonis,M.,Silva,M., Gallardo, F.,Cardenas,S.and Gil,L. Departamento de Bioquímica,Facultad de Medicina, Universidad deChile.

Hidrocarburos aromáticos policíclicos(HPAs) y nitro aromáticos(NA) han sido identificados como compuestos responsables de la mutagenicidad de extractos de aire de diferentes ciudades del mundo. Diversos estudios han señalado a los HPAs como pre-mutágenosya que requieren ser activados por el sistema endógeno de las monooxigenasas P-450. En cambio los NA podrían considerarse como mutágenos directos, ya que no requieren de activación metabólica. Este estudio ha estado destinado a determinar la mutagenicidad bacteriana y la contribución de HPAs yNA en la la mutagenicidad de extractos particulados obtenidos del aire de Santiago de Chile, entre Febrero y Junio de 1990 de un área de alta concentración de partículas (Plaza Italia). Los estudios de mutagenicidad se realizaron con *Salmonella typhimurium* TA98, TA98NR(deficiente en nitroreductasa) y TA 98/1,8DNP(deficiente en esterificación hidroxilamina); según el protocolo de Ames y col. Los estudios de mutagenicidad bacteriana revelaron un potencial mutagénico alto en todos los extractos analizados, obteniendose una respuesta positiva con la cepa TA98 con y sin activación metabólica; siendo mayor la respuesta con activación metabólica(+S9). Estos resultados indican la presencia de HPAs en los extractos y nos sugieren la presencia de NA.Los resultados obtenidos con la cepa TA98NR, nos indicaron que la respuesta positiva con la TA98(-S9) puede deberse a compuestos aromáticos nitro.

Financiado por los proyectos FONDECYT 0863/88 y de la OEA.-

Recuperación de Lactasa de Kluyveromyces fragilis por permeabilización celular y su caracterización. (K. fragilis B-galactosidase: extraction by cellular permeabilization and characterization). Aguirre,C., Curotto,E., O'Reilly,S., Cortés,Y. y Mancilla,C. Instituto de Química. Universidad Católica de Valparaíso. (Patrocinio : G. González L.).

La lactasa (E.C.: 3.2.1.23) de la levadura K. fragilis presenta un pH óptimo adecuado para la hidrólisis de leche y suero dulce, además es un sistema sanitario compatible de ser utilizado en alimentos. El objetivo de esta investigación es la permeabilización de K. fragilis para la extracción de la B-galactosidasa intracelular y su caracterización. Posteriormente se pretende inmovilizarla para la elaboración de un catalizador sólido utilizable en la industria láctea. La permeabilización celular se realiza con alcohol isoamílico (A.I.), se estudia el efecto de la concentración de éste, el tiempo de agitación, lavado de células y la concentración celular. Se analiza la difusión de la lactasa en función del tiempo a dos concentraciones de A.I. De acuerdo a los resultados obtenidos se observa permeabilización inmediata a baja concentración de A.I. (2% v/v). El lavado de las células disminuye el % de recuperación de la enzima, aumentando la estabilidad de ésta en el crudo. Con este sistema es posible permeabilizar células a concentraciones entre 0.5-200 gr/L, sin lisis, obteniéndose una relación lineal entre actividad enzimática y concentración celular. En cuanto a la velocidad de difusión de la lactasa se observa una dependencia con la concentración de A.I.. La enzima presente en el crudo es activada por Mn^{+2}, presentando un pH óptimo de 6.6 y una temperatura de mayor actividad a 37°C, Km 2.2mM y Vmax. 30.93 mM/min (ONPG); Km 16.56 mM y Vmax. 14.45 mM/min (lactosa). Se observa un aumento en la estabilidad en presencia de ditioeritritol en el almacenamiento (7°C) y pérdida de la actividad entre 40-50°C a diferentes pHs en tiempos no mayores de 4 horas.

Proyecto FONDECYT: 0288-89.

CARACTERIZACION INICIAL DE UN SISTEMA *IN VITRO* PARA MEDIR TRANSPORTE DE HIERRO NO ASOCIADO A TRANSFERRINA. (Initial characterization of an *in vitro* system to determine non-transferrin iron transport). *Ahumada, A. y Núñez, M.T. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

El proceso de transporte de Fe en reticulocitos comprende cuatro pasos fundamentales: 1) Unión de Fe-Transferrina (Fe-Tf) a su receptor (R) de membrana; 2) Endocitosis del complejo ternario R-Fe-Tf; 3) Disociación del Fe del complejo ternario por acidificación intravesicular y; 4) Reducción del hierro y transporte al citoplasma para su incorporación en el grupo Hem de la hemoglobina. Esta última etapa implica transporte de Fe independiente de Tf. En este trabajo nosotros definimos un sistema modelo "*in vitro*" para estudiar el transporte de Fe no asociado a Tf.

Se prepararon fantasmas de reticulocitos por lisis hipotónica y centrifugación en gradiente de sacarosa. Los fantasmas se sellaron por incubación en salino con 1 mM Mg^{2+}. Como prueba de sellamiento se determinó la permeabilidad de albúmina de bovino marcada con 1 ^{25}I y la accesibilidad de la gliceraldehido 3-P-deshidrogenasa.Los fantasmas sellados fueron examinados por microscopía de luz y electrónica de barrido y se hicieron medidas cinéticas de incorporación de ^{59}Fe. Los resultados indican que i) se cuenta con fantasmas sellados que tienen un sistema de transporte de Fe^{2+}, ii) la interacción de Fe con los fantasmas es saturable, y iii) el sistema de transporte es asimétrico respecto a la dependencia a temperatura.

Financiado por FONDECYT 1003-88 y D.T.I. B-2200.
*Becario CONICYT.

GRUPOS SULFHIDRILOS EN LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE S. cerevisiae. (Sulfhydryl groups in S. cerevisiae phosphoenolpyruvate carboxykinase). Alvear, M., Encinas, M. V, Jabalquinto, A. M. y Cardemil, E. Departamento de Química, Universidad de Santiago de Chile.

La carboxiquinase fosfoenolpirúvica de levaduras (oxaloacetato + ATP === ADP + CO_2 + fosfoenolpiruvato), al igual que la enzima de otras fuentes, es fuertemente inactivada por reactivos de grupos sulfhidrilos.

Mediante el empleo de DTNB, se puede demostrar que esta enzima posee sus 10 cisteínas/subunidad como grupos SH libres, y al menos dos residuos reactivos en el sitio de unión del nucleótido. Estos dos grupos se encuentran próximos, ya que puede demostrarse la formación de un ditiol (-S-S-), inducido por DTNB. Además, la enzima es inactivada por diversos reactivos específicos para grupos SH vecinos, y la modificación con pireno-iodoacetamida (aprox. 2 moles/mol subunidad) conduce a la emisión de fluorescencia característica de un excímero. La marcación con pireno-maleimida (1 mol/mol subunidad), y la detección de dos péptidos fluorescentes luego de digestión tríptica, indican que en este caso se produce la marcación mutuamente excluyente de dos grupos SH reactivos. A través de estudios de apagamiento de la fluorescencia y de tiempos de vida, se deduce que estos grupos presentan distinta exposición al solvente, indicando una distinta orientación para ellos.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la enzima de levaduras (tetrámetro, dependiente de ATP), presenta dos sulfhidrilos vecinos, igualmente reactivos, en el sitio de unión del nucleótido. Este hecho constituye una diferencia importante con la enzima de hígado de rata (monómero, dependiente de GTP), que presenta un sólo grupo SH reactivo en la zona equivalente. Por comparación de las secuencias primarias de diversas carboxiquinasas fosfoenolpirúvicas dependientes de ATP y de GTP, se sugiere que uno de los grupos SH reactivos de la enzima de levaduras sería la Cis-286. Financiado por FONDECYT 88-1060, DICYT-USACH y TWAS-BC-898-119.

UN PROTEOGLICAN DE LA MATRIZ EXTRA CELULAR MUSCULAR, SIMILAR A DECORINA, AUMENTA LUEGO DE DENERVACION. (A muscle extra cellular matrix proteoglycan, decorin-like, increase after denervation). Andrade W. y Brandan E. Unidad de Neurobiología Molecular, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

El control de la expresión de macromoléculas presentes en la matriz extracelular (MEC) es un problema complejo y atractivo. Hemos demostrado que la denervación de músculo esquelético produce un aumento en la síntesis de proteoglycanes (PGs) presentes en la MEC. En este trabajo hemos caracterizado los PGs de MEC de músculo esquelético de rata y se identificó de ellos la especie que aumentaba con la denervación.

La caracterización de los PGs presentes en la MEC de músculo esquelético de rata, revela la presencia de PGs de heparán, condroitín y de dermatán sulfato de diferente tamaño. La síntesis del PG de dermatán sulfato aumentó notoriamente tras la denervación del músculo. La caracterización de éste reveló un peso molecular de entre 80-110 Kda., el cual presenta un esqueleto proteico de 39-43 Kda. Tanto el análisis de los carbohidratos, como del esqueleto proteico a través de tratamiento con proteasas, sugieren que el PG de dermatán sulfato se parece a decorina, un PG sintetizado y secretado por fibroblastos. La principal diferencia entre el PG muscular y decorina, radica en que este último tiene un peso de 110-120 Kd. Análisis de las cadenas de glicosaminoglycanes (GAGs) revelan que la cadena del PG de decorina es de mayor tamaño que las provenientes del PG de dermatán sulfato del músculo.

Estos resultados sugieren que la denervación del músculo esquelético produce principalmente un aumento en la síntesis de un PG de dermatán sulfato, el cual presenta similitud a decorina sintetizada por fibroblastos. Estamos identificando a nivel molecular este PG, así como también el tipo celular responsable de su síntesis en el tejido muscular.

Financiado por Fondecyt 569-89 e IFS 1407/1 .

CARACTERIZACION DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL CONTRA EL RECEPTOR DE FIBRINOGENO EN PLAQUETAS HUMANAS (Characterization of a monoclonal antibody against human platelets fibrinogen receptor). Araneda, L.A.; y De Ioannes, A.E. Unidad Inmunología, Fac. Cs. Biol., P. Universidad Católica de Chile.

El receptor (rcp) de fibrinógeno (fg) en plaquetas humanas es un dominio del complejo formado por las glicoproteinas IIb y IIIa. Su expresión depende de la activación plaquetaria por diversos agonistas, de los cuales el más importante es el ADP. Además, la formación de este complejo y su rol como rcp son dependientes de calcio.

La unión del fg a las plaquetas es determinante en la formación del tapón plaquetario: la primera barrera que impide el sangramiento al romperse un vaso sanguíneo. Pacientes con Trombastenia de Glanzmann son deficientes en el complejo IIb/IIIa y, por lo tanto, son incapaces de unir fg y formar el tapón plaquetario.

Desarrollamos anticuerpos monoclonales (AMC), inmunizando ratones Balb/c con plaquetas humanas (PH). De 133 AMC que se unen a PH (por IFI y ELISA) sólo 14 se unen al complejo IIb/IIIa (por ELISA con antigeno capturado). Tres de los 14 impiden parcialmente la agregación plaquetaria en forma dosis-dependiente, y uno (3C10) la impide totalmente. El AMC 3C10, de isotipo IgG2a, acoplado a sefarosa 4B purifica, a partir de un lisado plaquetario, dos polipéptidos de pesos moleculares aparentes de 130 y 92 KD en condiciones no reductoras, y de 120 y 100 KD en condiciones reductoras. La migración de estos polipéptidos es similar a la reportada para las glicoproteinas IIb y IIIa.

Estos resultados sugieren que el epitope que reconoce el AMC 3C10 en plaquetas humanas sería el rcp del fibrinógeno o un sitio muy cercano a éste.

El objetivo a largo plazo de este trabajo es caracterizar el rcp en cuanto a su dependencia de calcio y agonistas de activación, usando el AMC 3C10. Además, permitirá cuantificar el receptor y hacer el diagnóstico de pacientes con Trombastenia de Glanzmann.

Financiado parcialmente por FONDECYT y P.U.Católica.

EFECTO DE LA ADMINISTRACION NEONATAL DE MPTP/MPP+, KEDQ Y 6-OHDA EN EL SISTEMA DOPAMINERGICO ESTRIATAL DE LA RATA. (Effects of the neonatal administration of MPTP/MPP+, KEDQ and 6-OHDA in the striatal dopaminergic system of the rat). Arqueros, L.y Murrin, L.C. Serv. de Fisiopatología, Fac. Medicina; Univ. de Chile y Dept. of Pharmacology, Univ. Nebraska Medical Center NE, USA. (Patrocinio: N.C. Inestrosa).

Se investigó la destrucción selectiva de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales mediante diversos neurotóxicos en ratas recien nacidas.

A ratas de 2 días se administró:1) Neurotóxico dopaminérgico 1-metil4-fenil, 1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP) o su metabolito activo 1-metil,4-fenilpiridinium (MPP+) por vía intracerebral (i.v., 30-360 ug) o s.c. (10-30 mg/Kg). 2) DMI (20mg/Kg) y el neurotóxico monoaminérgico de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) 50 ug i.v. en cada hemisferio. 3) el inactivador irreversible de receptores N-etoxicarbonil 2-etoxil 1,2-dihidroquinolina (KEDQ) 10-20 mg/Kg i.p. Se determinó Dopamina (DA), DOPAC, norepinefrina (NA) y receptores D1 y D2 estriatales a los 4-60 días.

El MPTP i.v. o s.c. no causó alteraciones en los niveles DA y DOPAC. El MPP+ 30-60ug i.v. reduce el contenido de DA y DOPAC a 24-27% y 47-50%. Dosis mayores son letales. Administración s.c. de 20-25 mg/Kg durante 7 días disminuyen la DA (21%) y DOPAC (15%). La 6-OHDA produce entre los 4-60 días disminución del 99% del contenido de DA y DOPAC. La NA en el hipocampo no fue afectada y se reduce en 30-40% en el estriado. Los receptores D1 en números no cambian a los 4 días pero están reducidos en 30% a los 15 y 30 días. Los receptores D2 en número no se modifican. El KEDQ causa una reducción en receptores D1 y D2 (60% y 45%) con un aumento de DA y DOPAC estriatal.

Estos datos indican que la 6-OHDA y KEDQ pueden utilizarse para determinar la importancia del terminal dopaminérgico y/o neuronas intra estriatales en el desarrollo de los sistemas neuronales estriatales.

ACEITE DE PESCADO Y FUNCION PEROXISOMAL. ACCION SINERGICA CON DROGAS HIPOLIPIDEMIANTES. Fish Oil and Peroxisomal Function. Synergism with Hypolipidemic Drugs. Barriga,C., Miquel,A., Necochea,C., Solis de Ovando,F., Vera,G.*, Leighton,F. P. Universidad Católica de Chile y *Universidad de Chile.

Se estudió si los peroxisomas participan en la respuesta biológica a los aceites de pescado (AP) suministrados en la dieta. Los AP son ricos en ácidos grasos w3 que son buenos sustratos peroxisomales. Se utilizó ratas alimentadas con 10% o 18% de aceite en la dieta y, a la vez, razones w3/w6 variables por mezcla de AP y aceites vegetales. Se hicieron observaciones en fracciones subcelulares, en hepatocitos aislados y en animal entero. Observamos que la oxidasa peroxisomal de ácidos grasos es inducida selectivamente tanto por dietas ricas en w3 como por la droga hipolipidemiante bezafibrato, y que existe sinergismo. En hepatocitos aislados se detectó aumento de la función de Px en respuesta al incremento de w3/w6 en la dieta. Se midió con varios sustratos la generación de H_2O_2 y acetato libre (actividad de Px) y de cuerpos cetónicos (actividad mitocondrial). Por ser los ácidos dicarboxílicos sustratos de Px, en animal entero se estudió la velocidad de metabolización del ácido dodecanedioico, encontrándose que aumenta en función del incremento de w3/w6.En ratas tratadas con aceite y, o, bezafibrato se encontró una elevación significativa en los niveles basales de acetato libre plasmático, caída de cuerpos cetónicos y aumento de los ácidos dicarboxílicos cortos. Concluimos que, por primera vez, se detecta en animales normales la actividad peroxisomal de ß-oxidación y su modificación experimental; y que el aceite de pescado y las drogas hipolipidémicas aumentan la ß-oxidación peroxisomal, existiendo sinergismo entre ambos.
(Financiado por FONDECYT 250/88 y PNUD CHI/88/017)

PROTEINAS SECRETADAS POR *Trichoderma harzianum* (Proteins secreted by *Trichoderma harzianum*). Bravo, R., Chiong, M., Pérez, L.M.. Dep. Bioq. Biol.Mol.,Fac. Cs. Quím. Farm., Univ.de Chile.

Uno de los mecanismos involucrados en la infección fúngica de las plantas, es la secreción de enzimas que hidrolicen los componentes de la pared celular vegetal.

Se estudió la secreción de pectinasa (aPGA), endoglucanasa (aCMC) y celulasa total (aPF) por el hongo *T. harzianum* crecido en los siguientes medios de Mandels adicionados con: a) pectina cítrica, ó b) celulosa microcristalina ó c) pectina cítrica + celulosa microcristalina. Se analizó además,el perfil de proteínas excretadas en cada condición por PAGE-SDS mediante tinción directa con azul de Coomassie ó mediante PLIS blot (glicoproteínas).

La aPGA se detectó solamente en los medios que contenían pectina, mientras que las aCMC y aPF se detectaron solamente en los medios que contenían celulosa. La combinación de inductores, modificó los niveles de actividad de las enzimas excretadas, estimulando la aPGA. El perfil de las proteínas excretadas en cada situación difiere entre sí, aún cuando la mayoría dió una reacción positiva al ser analizadas por PLIS blot (glicoproteínas).

Los resultados permiten concluir: a) un medio (c) similar en composición a la pared celular vegetal, induce principalmente a la aPGA, b) la excreción de la mayoría de las proteínas en la forma de glicoproteínas facilitaría su anclaje a los polisacáridos del tejido vegetal, durante la hidrólisis de la pared celular.
Financiado por FONDECYT (157/88) y DTI (B 2950-8923).

PRODUCCION DE PROTEASAS EN CULTIVO DE TEJIDOS DE *CARICA candamarcensis* (Production of proteases in tissue culture of *C. candamarcensis*). Bustos, R y Zúñiga, G. E. Departamento de Química, Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile, Casilla 5659-2 Santiago. (Patrocinio: E. Cardemil)

Las proteasas constituyen un grupo de enzimas de amplio uso por el hombre. Mediante la técnica del cultivo de tejidos vegetales es posible obtener estas enzimas. Sin embargo, su actividad esta regulada por diversos componentes del medio de cultivo. En este trabajo se describen los efectos de algunos componentes del medio de cultivo sobre la actividad de proteasas de callos de *C. candamarcensis*.

Los callos fueron obtenidos a partir de peciolos de plantas adultas, utilizando el medio NN suplementado con ácido naftalenácetico y cinetina (1:5 p/p). Se estudiaron los efectos del contenido de nitrógeno, sacarosa, vitaminas y fitorreguladores sobre el crecimiento de los callos y su actividad proteolítica. La actividad enzimatica fue evaluada determinando la cantidad de caseína degradada, mediante el método de Bradford (limite 0.1 µg/ml).

La actividad proteolitica del medio control fue superior a la actividad de enzimas comerciales como papaína tipo IV (SIGMA) y quimopapaína. Al disminuir el contenido de sacarosa del medio (2,5 al 0,5%), se obtuvo una actividad enzimática mayor que en el control. El resto de los componentes no tuvieron un efecto por sobre el control.

Los resultados demuestran que callos de *C. candamarcensis* son capaces de producir enzimas proteolíticas *in vitro*, cuya actividad depende de los componentes del medio de cultivo. Esta capacidad sugiere el potencial de esta técnica en el desarrollo de biorreactores para la producción continua de estos metabolitos.
Financiado por Universidad de Santiago de Chile, DICYT

EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL SE ASOCIA AL CITOESQUELETO EN GLANDULAS GASTRICAS AISLADAS DE RATA. (Epidermal growth factor receptor associates to the cytoskeleton of isolated rat gastric glands). Calderón, F., y González, A. Depto. de Inmunología Clínica y Reumatología. Fac. de Medicina y Depto. de Biología Celular y Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile.

El factor de crecimiento epidermal (EGF) además de su acción mitógenica, que ejerce sobre una gran variedad de células con capacidad proliferante, inhibe la secreción gástrica de HCl, efecto que implica una acción sobre las células parietales del estómago. Estas células son altamente diferenciadas, no proliferan, y su ciclo secretor se acompaña de cambios morfológicos que afectan al polo apical e involucran la intervención de elementos del citoesqueleto celular. Hemos demostrado previamente que el EGF es capaz de inhibir estos cambios y planteado que la función del citoesqueleto de las células parietales podría ser afectada por este factor (González y cols. 1981.J. Cell Biol. 88;108-114).

El receptor de EGF (R-EGF) es una proteína de PM 170 kDa que atravieza la membrana plasmática, exponiendo un dominio extracelular que une EGF y un dominio citoplasmático con actividad tirosina kinasa. En este trabajo damos evidencias, mediante inmunoblot cuantitativo, que este receptor se asocia al citoesqueleto de glándulas gástricas aisladas de rata. En efecto, sólo un 30-50% del R-EGF es extraído de las glándulas incubadas en soluciones de baja fuerza iónica conteniendo 0,1 - 1,5% Tritón X-100. (Financiado por FONDECYT #0249/87).

IMPORTANCIA DE UN RESIDUO DE ARGININA EN EL SITIO ACTIVO DE β-LACTAMASA DE Shigella flexneri (Importance of an arginine residue on the active site of β-lactamase from Shigella flexneri).

Campos, M., Alarcón, M., González, H., Sánchez, R. y Carvajal, N. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Concepción.

Para determinar el mecanismo de resistencia bacteriana a antibióticos de gran utilidad como las penicilinas y cefalosporinas, es vital dilucidar el sitio activo de β-lactamasas. Este estudio se basa en la posible función de un residuo de Arg en la acción de la β-lactamasa de Shigella flexneri UCSF-129, cepa patógena, causante de graves estados diarreicos en la población infantil. Se trabajó con enzima purificada por cromatografía de afinidad en geles de agarosa-ácido fenilborónico. Se modificó químicamente la enzima con fenilglioxal, en una relación molar de 1/830, inactivándose en los primeros 20 minutos de la reacción, en presencia de fosfato sódico 50mM pH 8,3, con una constante de inactivación de 0.91 min^{-1}. Por electroenfoque se constató su modificación, ya que se detectó una disminución en el pI, equivalente a la pérdida de una carga positiva. Esta fue protegida por cefradina, lo que indicaría que la modificación de arginina se llevó a cabo en su sitio activo. Se constató, por espectroscopía diferencial, que el proceso no conllevó cambios conformacionales. Resultados similares se obtuvieron con 2,3 butanodiona. Esto implicaría que un residuo de arginina sería crítico para la actividad de esta β-lactamasa, probablemente como estabilizador del sustrato que tiene la carga negativa de un grupo carboxílo en posición C-3 ó C-4, según si es penicilina o cefalosporina, respectivamente.

Financiado por el Proyecto N°20.13.84 de la D.I. de la Universidad de Concepción.

MODIFICACION QUIMICA DE LA FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA CON FENILGLIOXAL (Chemical modification of fructose-1,6-bisphosphatase with phenylglioxal).

Cárcamo, J.G., Reyes, A. y Slebe, J.C. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

La fructosa-1,6-bisfosfatasa es inhibida alostéricamente por AMP (I_{50} = 20 μM). La modificación reversible de la enzima con 2,3-butanodiona produce un derivado activo que es menos sensible al nucleótido; en estas condiciones se modificaría un residuo arginina por subunidad (Marcus, Biochemistry 15, 3505, 1976). La formación de un derivado estable de la enzima constituye un paso obligado para identificar el residuo modificado. En este trabajo se caracterizó la modificación de la enzima de riñón de cerdo con fenilglioxal, agente que forma un aducto estable con argininas a pH ácido (Takahashi, J. Biol. Chem. 243, 6171, 1968).

El tratamiento de la enzima con un exceso molar de 1.100 veces de fenilglioxal sobre subunidad de enzima por 30 min, a 30° C en amortiguador borato 60 mM pH 7,8 y en presencia de fructosa-1,6-bisfosfato 10 mM, permite obtener un derivado con una baja sensibilidad al nucleótido (I_{50} ≈ 200 μM). Otras propiedades cinéticas de la enzima, como eficiencia catalítica o activación por cationes monovalentes, no se alteran como consecuencia de la modificación. La cinética de la alteración del I_{50} es de seudo-primer orden y el derivado aislado es estable en amortiguador fosfato 0,1 M pH 7,5. En estas condiciones de modificación se incorpora 1 mol de [^{14}C]fenilglioxal por mol de subunidad de enzima.

Los resultados muestran que existe un residuo de arginina por subunidad, comprometido en la sensibilidad de la enzima al nucleótido. Asimismo, fenilglioxal bloquea selectivamente y en forma irreversible a este residuo. (Financiado por: DIC-UACH, RS-89-37 y FONDECYT 188/89).

REQUERIMIENTOS ESTRUCTURALES DE LAS ACIL-CARNITINAS COMO INHIBIDORES DE PROTÉINA KINASA C. (Structural requirements of acyl-carnitines as protein kinase C inhibitors).

Cárdenas.L., Morales, M.N y Bronfman, M. Depto. Biol. Cel.&Molec., Fac.Cien.Biol., P.Universidad Católica de Chile.

Se han descrito varias moléculas capaces de activar o inhibir la proteína kinasa C (pkC). De estas, resultan de particular interés dos familias de intermediarios metabólicos, los acil-coenzimos A y las acil-carnitinas de ácidos grasos, como activadores e inhibidores respectivamente. Los estudios de la acción inhibitoria de las acil-carnitinas sobre pkC contempla unicamente acil-carnitinas homólogas de ácidos grasos. La acción de los acil-CoA de ácidos grasos como activadores de pkC se ha estudiado en nuestro laboratorio (1). Además hemos descrito la formación de acil-CoAs de drogas hipolipidemiantes y promotoras de tumorigénesis que resultaron también ser potentes activadores de la pkC (2). Estas observaciones plantean la posibilidad que las acil-carnitinas de estas drogas actuen como inhibidores de la pkC. Con el objeto de verificar esta posibilidad y evaluar que tan general resulta el concepto de que un acil-CoA encuentra su contrapartida respecto de la actividad de pkC en su acil-carnitina homóloga, se sintetizaron químicamente las acil-carnitinas de dos drogas hipolipidémicas, el nafenopin y el ciprofibrato. El efecto de estos compuestos sobre la actividad de pkC se ensayo *in vitro*, utilizando enzima purificada de cerebro de rata. Se encontró una inhibición del orden del 10% relativa a la palmitoil-carnitina. Estos resultados sugieren una mucho mayor especificidad en términos de requerimientos estructurales del residuo acil en el caso de la acción inhibitoria de acil-carnitinas respecto al requerimiento de residuo acil en la acción activadora de los acil-CoAs. (1) B.B.R.C., 152: 987-992 (1988); (2) B.B.R.C. 159:1026-1031 (1989). Financiado por Fondecyt 802/90.

POLI ADP-RIBOSILACION DE HISTONAS Y SU RELACION CON EL PROCESO DE DIFERENCIACION CELULAR EN EMBRIONES DEL ERIZO DE MAR Tetrapygus niger. (Relationship between histones poli ADP-ribosylation and diferentiation of sea urchin Tetrapygus niger embryos).

Carrasco, L., Montecino, M., Puchi, M., Imschenetzky, M. Departamento de Biología Molecular, Universidad de Concepción, CHILE.

La poli ADP-ribosilación de histonas se ha relacionado con procesos de diferenciación en cultivos celulares, sin embargo, no existe información sobre este tipo de modificación post-traduccional y su potencial función durante el desarrollo embrionario.

Con el objetivo de comprender mejor la relación entre la poli ADP-ribosilación de histonas y la diferenciación celular durante la embriogénesis se analizó la presencia de histonas poli ADP-ribosiladas en diferentes estados del desarrollo embrionario del erizo de mar Tetrapygus niger mediante la técnica de Western Blot, los cuales fueron revelados con suero anti poli ADP-ribosa obtenido en conejos. Paralelamente se determinó in vivo el efecto de la nicotinamida (como inhibidor de la poli ADP-ribosa sintetasa), sobre el desarrollo embrionario.

Los resultados obtenidos indican que existiría una notable poli ADP-ribosilación para una proteína básica de 58 KDa y para la histona H1. Se detectó además una reacción débil con el suero anti poli ADP-ribosa en la región en que migran las histonas del core nucleosomal.

El tratamiento de embriones con nicotinamida detiene la morfogénesis y al analizar las histonas purificadas de estos embriones se constata una alteración en la migración de H1 y H4.

Financiado por proyectos FONDECYT 0789/88, 20.31.35 y 20.31.17 de la Universidad de Concepción.

ALGUNAS PROPIEDADES DE LA ARGINASA DE RIÑON HUMANO. (SOME PROPERTIES OF HUMAN KIDNEY ARGINASE). Carvajal,N. Echeverría, V., Godoy, M., Silva, P.) Departamento de Biología Molecular, Universidad de Concepción.

A diferencia de la arginasa hepática la enzima renal ha sido muy poco estudiada debido, fundamentalmente, a que no se cuenta con una preparación razonablemente purificada y estable. En este trabajo, se describe un procedimiento de purificación que permite obtener una preparación altamente purificada, activa y estable. Para ello, hemos aprovechado que la enzima se retiene muy fuertemente en una columna DEAE-celulosa a pH 6.5 en Tris-maleato 20 mM, $MnCl_2$ 2 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM. En una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, la preparación obtenida presenta una banda principal (Mr = 37.500) y una o dos bandas contaminantes menores. En un gel nativo, se detecta sólo una especie con actividad arginásica. Al ser analizada por filtración en Sephadex G-200 a pH 7.0 la enzima aparece como una proteína de peso molecular (Mr) de 120.000; al remover el metal activador con EDTA, la enzima se disocia en subunidades inactivas de Mr = 35.000 - 40.000. Los gráficos de dobles recíprocos de resultados obtenidos entre pH 7.0 y 9.5, presentan una doble pendiente. En presencia de lisina, los resultados sugieren la presencia de dos tipos de sitios en los cuales el aminoácido se comporta como un inhibidor competitivo con respecto a la arginina. La diferencia aparente de afinidad entre los dos tipos de sitios desaparece al incluir KCl o NaCl 100 mM o al utilizar fosfato de potasio o de sodio como amortiguador.

Estos resultados contrastan con los obtenidos para la enzima del hígado.

Financiado por Proyecto FONDECYT 90/0261.

METABOLIZACION DE COMPUESTOS MODELO DE LIGNINA DEL TIPO ARILGLICEROL-β-ARILETER POR PSEUDOMONAS ALCALIGENES. (Metabolism of lignin model compounds of the arylglycerol-β-arylether type by *P.alcaligenes*). Catalán,L., Rüttimann,C., Rodriguez,M., González,B. y Vicuña,R. Laboratorio de Bioquímica. Facultad de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile. Casilla 114-D. Santiago, Chile.

La lignina es un componente principal de la madera y otros tejidos vegetales. Debido a su complejidad estructural, ha sido necesario el uso de modelos moleculares para estudiar la biodegradación de esta macromolécula. Al respecto, se han descrito bacterias capaces de utilizar compuestos modelo de lignina como única fuente de carbono. Nuestro grupo ha aislado y caracterizado dos cepas -*Pseudomonas acidovorans* y *P.fluorescens*- que crecen eficientemente en guaiacilglicerol-β-guaiaciléter, un modelo β-O-4. A la fecha, nadie ha purificado la enzima que cataliza la ruptura reductiva que ocurre en el enlace éter intermonomérico de estos modelos.

Hemos aislado recientemente, mediante cultivos de enriquecimiento en un modelo β-O-4, una cepa que hemos identificado tentativamente como *P.alcaligenes* V1. La vía bioquímica involucrada resultó similar a las otras dos cepas. Sin embargo, a diferencia de las anteriores, células de *P.alcaligenes* V1 crecidas en medio rico mantienen la capacidad de degradar modelos β-O-4. En este trabajo se describen, además, los esfuerzos realizados en la búsqueda de la la actividad "β-eterásica", responsable de la reacción reductiva. El efecto de algunos inhibidores en la actividad degradativa de las tres *Pseudomonas* será también analizado.

Este trabajo es financiado por el Proyecto FONDECYT 0218/88

ACTIVACION DEL PROPEPTIDO NATRIURETICO AURICULAR EN GRANULOS DE AURICULA DE RATA. (Pro-ANP processing in atrial secretory granules). **Corthorn, J., Thibault, G. y Cantin, M. Clinical Research Institute of Montreal, Montreal, Canada y Servicio Fisiopatología, Facultad de Medicina; Universidad de Chile. (Patrocinio J.F. Ferreira).**

Diversos métodos bioquímicos e inmunocitoquímicos han demostrado que el propéptido natriurético auricular (Pro-ANP) se almacena en forma intacta en los gránulos secretorios auriculares. El procesamiento del propéptido en los fragmentos ANP(1-98) y ANP(99-126) debería ocurrir durante la exocitosis o en el espacio extracelular.

El objetivo de este estudio es verificar si los gránulos pueden contener una enzima que procese el pro-péptido. Se incubaron gránulos lisados y la transformación del propéptido se siguió a través de RIA e inmunoblot usando tres antisueros. Los antisueros eran específicos para el C-, el N-terminal o la región (94-103). La maduración del propéptido debiera resultar en una rápida desaparición de la inmunoreactividad para la región 94-103 sin disminución de la inmunoreactividad para C- y N-terminal. La incubación de gránulos intactos en Sacarosa 0.25 M por 4 h a 37° C no resultó en degradación del propéptido. Cuando los gránulos fueron lisados (por Triton X-100, shock osmótico o sonicación), tampoco se detectó una disminución específica de la región 94-103. Sólo se detectó una degradación no-específica de pro-ANP probablemente debido a una contaminación por proteasas lisosomales sin formación de ANP (1-98) y ANP (99-126). Este sistema in vitro fue validado por adición de trombina exógena que produjo rápida desaparición de la inmunoreactividad de 94-103. Estos datos sugieren que los gránulos auriculares no juegan un papel en el procesamiento de pro-ANP y que la maduración debe ocurrir a un nivel extracelular.

EXPRESION DEL GEN DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE S. cerevisiae EN UNA CEPA DE LEVADURA DEFICIENTE EN LA ENZIMA. (Expression of the S. cerevisiae phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in an enzyme-deficient yeast strain). Chiffelle, I., Castillo, A. y Cardemil, E. Departamento de Química, Universidad de Santiago de Chile.

La carboxiquinasa fosfoenolpirúvica (PEPCK) de levadura cataliza la descarboxilación del oxaloacetato en presencia de ATP y Mn^{2+} para dar fosfoenolpiruvato, ADP y CO_2, y constituye una de las etapas reguladoras de la biosíntesis de glucosa a partir de precursores de 3 y 4 átomos de carbono. Trabajos de nuestro grupo (Alvear y col., esta Reunión) sugieren la presencia de grupos -SH vecinos en el sitio de unión del ATP, pudiendo uno de ellos corresponde a la Cis-286. En esta comunicación, se informan los primeros resultados obtenidos en un proyecto a mayor plazo, tendiente a efectuar mutación sitio-dirigida para reemplazar este aminoácido.

El gen de la enzima, clonado en el vector YEp352 [Stucka et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16, 10926], fue incorporado a la cepa mutante S. cerevisiae pUK-38, α ura3 adel pck1, a través de la técnica de transformación con acetato de litio. Se hicieron cultivos de S. cerevisiae (salvaje, mutante y transformada) en condiciones gluco-neogénicas con piruvato como fuente de carbono, analizándose la producción de PEPCK en extractos. A las 18 hrs. de crecimiento, se lograron actividades específicas de 0,071, 0,001 y 0,175 U/mg para las cepas salvaje, mutante y transformada, respectivamente. A partir de la cepa transformada, se purificó a homogeneidad la PEPCK, obteniéndose un rendimiento de 1,8 mg de enzima por gramo de células húmedas en comparación con un valor de aproximadamente 0,7 mg/g para la cepa salvaje. La enzima producida presentó idénticas características electroforéticas e inmunológicas que la enzima nativa, con una a.e. de 39 U/mg.

Estos resultados indican que el gen clonado codifica para la enzima nativa, lo cual hace factible realizar mutagénesis sitio-dirigida.

ASCORBATO Y NADH COMO AGENTES REDUCTORES DE FERRICIANURO Y Fe^{3+} UNIDO A TRANSFERRINA (Tf). (Ascorbate and NADH as reducing agents for ferricyanide and transferrin - iron). Escobar, A. y Núñez, M.T. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La incorporación celular de Fe^{3+} unido a Tf es un proceso secuencial en el cual la acidificación de la vesícula endocítica promueve la disociación de Fe^{3+} el que posteriormente es reducido y transportado al citosol.

Estudiamos la etapa de reducción de Fe^{3+} en vesículas endocíticas que contenían en su interior ferricianuro o ^{59}Fe-Tf, utilizando como donantes de electrones ascorbato o NADH agregados en el medio extravesicular. Ambos fueron capaces de reducir ferricianuro e inducir la salida de ^{59}Fe desde el interior de la vesícula. La reducción mediada por NADH fue inhibida por adriamicina, un inhibidor de la NADH-aceptor oxidoreductasa de membrana, y la reducción mediada por ascorbato fue inhibida por glucosa. Se observó un efecto aditivo sobre las constantes de velocidad de reducción y salida de ^{59}Fe cuando ambos sustratos se agregaron en conjunto.

Concluimos que NADH y ascorbato pueden estar involucrados en la reducción *in situ* del hierro labilizado de Tf, el primero como sustrato de un sistema transmembrana de transporte de electrones y el segundo mediante un sistema de transporte y reducción no-enzimática.

Financiado por FONDECYT 1003-88 y D.T.I. Universidad de Chile, B-2200.

CLONES DE SECUENCIA UNICA DE DNA DE *Renibacterium salmoninarum*. Specific DNA clones from *Renibacterium salmoninarum*. Etchegaray, J.P., Martínez, M.A., Krauskopf, M., León, G. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia. La enfermedad bacteriana del riñón (BKD) constituye una de las patologías infecciosas que más daño provocan en acuicultura de salmonídeos. Para poder detectar ovas infectadas intracelularmente, se requiere de métodos de detección rápidos y específicos. Con el fin de obtener las sondas que permitirán diseñar kits diagnósticos, se ha construído una genoteca de secuencias únicas a partir del genoma de *Renibacterium salmoninarum*. El clonamiento selectivo de secuencias presentes sólo en el genoma de *R.salmoninarum* implicó utilizar la técnica de reasociación competitiva acelerada por fenol con el propósito de absorber todas las secuencias génicas comunes con otros microorganismos. Realizada la ligación al vector pUC19 se transformaron células de *E.coli* DH5α. La identificación de los recombinantes se realizó por inducción del gen que codifica para β-galactosidasa del vector, con IPTG en el medio de cultivo conteniendo además el cromógeno X-gal. De los clones obtenidos, se seleccionaron 4 a los que se aisló el DNA y se digirió con una mezcla de las enzimas de restricción Eco R I e Hind III, con el objeto de conocer el tamaño del inserto. Por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% se comprobó que en todos los casos el inserto no era superior a 150 pb. Se estudió la especificidad de los recombinantes, sembrando por el sistema en gota en papel de nitrocelulosa, diferentes cantidades de DNA cromosomal extraído de distintas bacterias que también producen enfermedades en peces y de otras enteropatógenas. Como sonda de hibridación se utilizó el DNA plasmidial de cada clon marcado con fotobiotina. Al menos por este método, las sondas resultaron ser específicas; no obstante, ello se está comprobando además por hibridación en Southern utilizando el inserto purificado como sonda. Paralelamente se determinó la secuencia nucleotídica del DNA de los 4 recombinantes seleccionados por el método de Sanger. Con estas sondas se está rastreando otra biblioteca genómica de *R. salmoninarum*. Así se espera aislar clones específicos de mayor tamaño que servirán para montar un procedimiento de detección en base a PCR. Financiado por Proyecto Fondecyt 120/89.

CARACTERIZACION DE LAS GLICOPROTEINAS DE LA ZONA PELUCIDA DE HAMSTER (Characterization of hamster zona pellucida glycoproteins). Giacaman, A., Meléndez, J., Becker, M., Barros, C., De Ioannes, A.E. Labs. Inmunología y Embriología, Fac. Ciencias Biol. P. Universidad Católica.

En el proceso de fecundación de los mamíferos, las glicoproteínas que componen la zona pelúcida (zp) juegan un papel relevante en la unión y penetración del espermatozoide a través de ella. Con el objetivo a largo plazo de estudiar la función de acrosina -una enzima acrosomal- sobre los receptores de la zp, hemos iniciado la caracterización de los componentes de la zp de hamster mediante anticuerpos monoclonales (AMC). Con este propósito, se inmunizaron ratones Balb/c machos con un extracto de zp de hamster. Con el ratón de mejor título de anticuerpos séricos, medido mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) con zp de hamster, se realizó una fusión somática para obtener hibridomas, la selección de los cuales se realizó mediante IFI con zp obtenidas de ovocitos de hembras de hamster inducidas a superovular.

Se obtuvo un panel de 8 AMC que reconocen epitopos de la zp de hamster, la mayoría de isotipo IgG. Al estudiar si existe reacción cruzada con otras especies de mamíferos, se encontró que los anticuerpos 2D1 y 2H10 reconocen epitopos presentes en la zp de humanos y de ratón, respectivamente. Se estudió el efecto de los AMC en el sistema de fecundación *in vitro* de hamster y se encontró que el anticuerpo 5C8 no afecta la penetración de los espermatozoides a través de la zp; los anticuerpos 7D9, 3F6 y 2H10 la afectan parcialmente y los anticuerpos 4E11 y 2D1 la afectan drásticamente. Actualmente se está caracterizando inmunoquímicamente los componentes de la zp de hamster reconocidos por estos AMC.

Financiado por FONDECYT: 577/89 y 495/89.

SECRECION APICAL DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B(HBsAg) EN CELULAS MDCK TRANSFECTADAS. (Apical secretion of hepatitis B surface antigen from transfected MDCK cells). González, A., Juica, F., y Bull, P. Depto. de Inmunología Clínica y Reumatología, Facultad de Medicina y Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile.

Los mecanismos que utilizan las células epiteliales polarizadas para destinar distintas proteínas a su superficie apical o basolateral no han sido totalmente dilucidados. Hepatocitos infectados con el virus de la hepatitis B secretan basolateralmente hacia el compartimiento sanguíneo tanto viriones como partículas subvirales compuestas por el antígeno de superficie y lípidos derivados de la célula. Con la finalidad de determinar si este antígeno posee señales de destinación que determinen su secreción polarizada, se transfectó un vector de expresión conteniendo el gen viral S en células MDCK derivadas de riñón de perro, y se examinó la polaridad de su secreción cultivando estas células en cámaras Millicell.

Se observó, inesperadamente, que la proteína viral es secretada preferencialmente hacia el polo apical de las células MDCK, es decir, con una polaridad opuesta a la de los hepatocitos, reflejando las profundas diferencias entre la maquinaria exocítica de estos dos tipos de células. Esta proteína se puede utilizar como un nuevo modelo donde buscar señales peptídicas de destinación apical, que además podrían ser importantes en la biología del virus.

(Financiado por FONDECYT#1468/86).

CLONAMIENTO Y EXPRESION EN *Escherichia coli* DEL SISTEMA DE MODIFICACION-RESTRICCION DE *Bacillus stearothermophilus V*. CARACTERIZACION ESTRUCTURAL. González, E., Lobos, C., Padilla, C., Saavedra, C. y Vásquez, C. Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Talca.

Los genes que codifican para las enzimas del sistema de modificación-restricción. de *B. stearothermophilus V* (m BstVI y BstVI), han sido clonados en *E. coli* JM107. Se han aislado varios clones recombinantes en los que se ha detectado la presencia de un plasmidio híbrido, correspondiente al vector utilizado y un inserto de DNA termofílico de 4.4 Kb. El fragmento clonado contiene ambos genes del sistema de modificación-restricción, como lo indica el hecho que en los clones recombinantes, se ha detectado la actividad enzimática correspondiente tanto a BstVI como a m BstVI. La expresión de estos genes se realiza a partir de sus respectivos promotores termofílicos.

La caracterización estructural de estos genes ha involucrado la confección de un mapa de restricción, secuenciación nucleotídica parcial y subclonamiento de varios subfragmentos del inserto original. Lo anterior ha permitido configurar un esquema de la organización de ambos genes en el fragmento de DNA clonado. Experimentos actualmente en curso, se orientan hacia la identificación de las regiones que controlan la expresión de estos genes.

Financiado por Fondecyt 003-89.

CAMBIOS EN EL ENTORNO DE LOS TRIPTOFANOS DE LA PREALBUMINA DURANTE SU INTERACCION CON LA TIROXINA. (Tryptophan environmental changes of prealbumin in its interaction with thyroxine). González, G. y Tapia, G. (Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso).

La prealbúmina es una proteína plasmática que transporta la hormona tiroxina. La distribución de los residuos de aminoácidos en su estructura tridimensional muestra que los dos únicos triptófanos están localizados en diferentes entornos. Se demuestra por técnicas fluorescentes que en la interacción tiroxina prealbúmina se producen fluctuaciones conformacionales que significan cambios en los entornos que rodean a los triptófanos. El apagamiento de los triptófanos por la tiroxina aumenta a longitudes de onda más bajas. Esto implica que la emisión de la prealbúmina está compuesta de espectros superpuestos y que las emisiones individuales son apagadas en grados distintos por la tiroxina. La adición de acrilamida resulta en un máximo de emisión desplazado a 348 nm indicando que la acrilamida apaga el residuo de triptófano menos expuesto. En presencia de tiroxina este máximo se desplaza a 355 nm. El espectro de excitación es desplazado hacia el azul cuando se une la tiroxina. Esto es consecuencia del apagamiento por la tiroxina del triptófano menos expuesto. En presencia de acrilamida el espectro de excitación se corre hacia el rojo por apagamiento del triptófano más expuesto. Estos resultados demuestran que la tiroxina produce cambios conformacionales en la prealbúmina al asociarse a ella.

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO A ALTA RESOLUCION PARA LA SEPARACION DE INTERMEDIARIOS DEL METABOLISMO DE GLUCOSA EN OOCITOS DE RANA. (High performance-anion exchange chromatography for the separation of intermediates glucose metabolism in frog oocytes). **Guixé, V., Preller, A. y Ureta, T., Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.**

Recientemente Dionex ha introducido la serie de columnas BioLC para la separación y detección de carbohidratos. El método se basa en el uso de resinas peliculares de intercambio iónico que aumentan notablemente la eficiencia en la separación de azúcares. Nuestro interés en la cuantificación de intermediarios producidos durante la utilización de glucosa nos llevó a explorar una columna de intercambio iónico Dionex Carbo Pac PA1 conectada a un HPLC y a un contador de centelleo en línea que, a pH 13, permite una buena separación de hexosas fosforiladas. La columna se calibró con |U-^{14}C|glc, |U-^{14}C|glc 1-P, |U^{14}C|glc 6-P, |U^{14}C|fru-6-P y |U^{14}C|fru-1,6 bisP, cromatografiadas por separado o en mezcla.

Se prepararon extractos perclóricos de oocitos de rana microinyectados con 0,5 nmoles de |U^{14}C|glc e incubados a diferentes tiempos bajo atmósfera de O_2. Se midió incorporación de radiactividad en glicógeno, CO_2 e intermediarios. A los 30 min de incubación sólo un 1% de la radiactividad aparece en CO_2 y el 99% restante corresponde en partes iguales a glicógeno e intermediarios. La cromatografía de los extractos perclóricos desprovistos de glicógeno permitió separar numerosos intermediarios. Comparando el tiempo de retención de ellos con los estándares correspondientes y por tratamiento con enzimas específicas, se pudo identificar glc, glc-1-P, glc-6-P, fru-6-P, 6-P-gluconato y fru-1,6-bisP. Además hay algunos picos cuya identidad desconocemos hasta el momento.

Financiado por FONDECYT (1267/88) y la Fundación Volkswagen, Alemania.

ANALISIS DE PARTICULAS NUCLEOPROTEICAS CROMOSOMALES. (Chromosomal nucleoparticles analysis). Gutiérrez, S., Imschenetzky, M., Puchi, M. Departamento de Biología Molecular, Universidad de Concepción.

A diferencia de las células somáticas, en ovocitos del erizo de mar *Tetrapygus niger* los nucleosomas son atípicos, tanto en el tamaño del ADN involucrado (131 pb) como en las proteínas que la conforman (variantes de histonas, CS); las características estructurales de estas partículas son hasta la fecha desconocidas.

Con el fin de obtener mayores precisiones sobre la organización estructural de los nucleosomas atípicos de ovocitos se describen diferentes métodos de aislamiento y análisis de núcleopartículas utilizando los polinucleosomas derivados de eritrocitos de pollo como patrón. Estas técnicas fueron aplicadas a nucleopartículas derivadas de ovocitos.

Los resultados obtenidos de la separación en gradiente de sacarosa demuestran la existencia de dos poblaciones de núcleopartículas de diferente densidad; una de ellas corresponde a la fracción mono-nucleosomal mientras que la de más alta densidad correspondería a una estructura de orden superior estable. Estas núcleopartículas pueden ser posteriormente analizadas por geles de agarosa mono y bidimensional, los cuales permiten separar poblaciones de mono, di, tri y hasta hexonucleosomas los que pueden ser analizados posteriormente en cuanto a su contenido de ADN y proteínas. Al aplicar este análisis a nucleopartículas purificadas de ovocitos se constató sus diferencias estructurales con respecto a las nucleopartículas purificadas de eritrocitos

Proyectos FONDECYT 0789/88; 20.31.17 y 20.31.35, Universidad de Concepción.

MORFOLOGÍA Y ULTRAESTRUCTURA DE LOS MASTOCITOS EN CONOS EFERENTES Y EPIDÍDIMO DE RATA. (Ultrastructure and morphology of mast cells in rat efferent ducts and epididymis). Heyn, R. y Morales, B.A. Depto. Morfología Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Los mastocitos (MC), componentes frecuentes del tejido conectivo intersticial (TCI) ovárico, presentan cambios morfológicos y cuantitativos cíclicos en respuesta al peak ovulatorio de LH; por ello, resultó de interés estudiar este tipo celular en el macho, y posteriormente proyectar su rol en la funcionalidad testicular.
Se extrajeron testículos, conos eferentes y epidídimos de ratas Donjou adultas, los que fueron procesados para M.O. y M.E.T.; además, se realizó un recuento de los MC del TCI de estos órganos en cortes longitudinales seriados, consignando nº, ubicación y relaciones espaciales.
El TCI testicular presenta muy escasos MC (0 a 1 x campo), de ubicación libre intersticial o peritubular y en grupos perivasculares. En el epidídimo el nº de MC varía según la región ductal (más en cabeza y cuerpo, escasos en cola); su ubicación es preferentemente perivascular y en menor grado peritubular. Su forma es oval, con un tamaño de 15 a 20um, algunos filopodios en la superficie y gránulos citoplasmáticos PAS+ de 0,5 a 0,7um de diámetro, matriz homogénea y rodeados por una membrana.
Esto concuerda con el tipo de MC "conectivo" descrito para otras especies. El hallazgo de numerosos mediadores químicos en los MC (Pg, Serotonina y VIP), su mayor concentración en los conos eferentes y su ubicación perivascular, sugieren un posible rol como intermediarios neuroendocrinos y paracrinos en la respuesta hormonal testicular.

β-GLUCOSIDASA DE *Penicillium purpurogenum:* PURIFICACION Y PROPIEDADES.(β-Glucosidase from *Penicillium purpurogenum*:Purification and Characterization) Hidalgo, M., Steiner, J., y Eyzaguirre, J. Lab. Bioquímica, U.Católica, y Lab. Microbiología, U. de Chile, Santiago

La degradación de la celulosa es un proceso importante en la naturaleza. Este proceso es llevado a cabo por la acción secuencial de un grupo de enzimas colectivamente llamadas "celulasas", producidas tanto por hongos como por bacterios. La enzima participante en la última etapa de esta hidrólisis es la β-glucosidasa, que corta celobiosa, generando glucosa. Se creció *P. purpurogenum* en un medio que contenía como fuentes de carbono paja y salvado, ambos de trigo, y licor de maíz como fuente de nitrógeno. En estas condiciones se logró obtener, al cabo de 13 días de cultivo, sobrenadantes con una actividad de 2,5 U/ml de β-glucosidasa. Se tomó los sobrenadantes, concentrándolos por medio de ultrafiltración y precipitación con sulfato de amonio. La enzima se purificó por filtración en gel (Bio-Gel P-300),cromatografía de intercambio iónico (DEAE Bio-Gel A) y filtración en gel (Bio-Gel P-100). La enzima es un monómero de 90.000 Da. Su pI es 4,2. Ella presenta cinética de tipo Michaelis-Menten hacia p-nitrofenil-B-D-glucopiranosido (PNPG) y celobiosa, con valores de Km de 85 μM y 0,8 mM, respectivamente. Glucosa inhibe competitivamente la actividad hacia PNPG con una Ki de 1,4 mM, mientras que gluconolactona es un inhibidor mixto respecto al mismo sustrato, con una Ki de 0,067 μM. La enzima muestra máxima actividad para hidrolizar PNPG a pH 3,5, teniendo una temperatura "optima" de 60 º. No se detectó la presencia de isoenzimas. Trabajo financiado en parte por proyectos FONDECYT 89-580 y 90-822.

POTENCIACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PROTEÍNA KINASA C POR ACIL-COENZIMOS A. EFECTO DEL TIPO DE INSATURACION Y ACTIVIDAD COMPARATIVA DE SERIES ω-6 Y ω-3. (Acyl-Coenzyme A potentiation of protein kinase C. Effect of unsaturation and comparative activity of ω-3 and ω-6 series) Hidalgo, P., Morales, M.N., y Bronfman, M. Depto. Biol. Cel. & Molec., Fac. Cien. Biol., P.Universidad Católica de Chile.

Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que el palmitoyl-CoA y otros acil-CoA son activadores de la proteína kinasa C. El efecto requiere de fosfatidilserina (u otros fosfolípidos acídicos), de Calcio, y de diacilglicerol o un ester de forból. El efecto se produce a concentraciones fisiológicas tanto de Calcio como de acil-CoAs (1,2). Dada la variedad de ácidos grasos presentes en la célula, que depende principalmente de la composición de dieta, se consideró de interés estudiar comparativamente el efecto de diversos acil-CoA sobre la actividad de la pkC, utilizando enzima purificada de cerebro de rata. Los resultados muestran que los acil-CoA de ácidos grasos saturados con largos de cadena superiores al palmítico (C16:0) mantienen una alta actividad potenciadora de la pkC, en comparación con el palmitoil-CoA, hasta un largo de cadena de 24 átomos de carbono, donde la capacidad potenciadora cae. Comparativamente, los ácidos monoinsaturados y con dos insaturaciones son más activos que los saturados, especialmente el acil-CoA del ácido erúsico (C22:1). Los isómeros *trans* resultaron ser relativamente más activos que los *cis*. Los ácidos poli-insaturados de la serie ω-6 tienen una alta capacidad potenciadora de la pkC relativa al palmitoil-CoA, especialmente el araquidonil-CoA. En contraste, la actividad potenciadora de los ácidos poli-insaturados de la serie ω-3(eicosapentaenoico y docosahexahenoico) es menor que la del palmitoyl-CoA y notablemente más reducida que la serie ω-6. (1) B.B.R.C., 152:987-992 (1988); (2) Eur.J.Biochem, en prensa. Financiado por Fondecyt 802/90.

Actividad insecticida de cepas locales de Bacillus thuriengiensis (Insecticidal activity of local strains of Bacillus thuriengiensis). **E. Hubert, J. Sáez, G. Vizcarra, P. Espinoza, R. Herrera, L. Meza-Basso. Programa de Biología Vegetal, Universidad de Talca.**

Se ha descrito la existencia de una gran variedad de microorganismos del suelo patógenos a insectos. El de mayor éxito es Bacillus thuringiensis (B.t.); la cepa kurstaki HD-1 se vende comercialmente para el control de algunos lepidópteros en su estadío de larva. Se intenta, en el presente trabajo, la búsqueda de cepas locales B.t. con actividad insecticida diferente a la cepa comercial.
Las muestras de suelo en diluciones adecuadas se sembraron en placas de agar nutriente conteniendo lisozima, penicilina G y sulfato de polimixina. Se seleccionaron aquellas bacterias gram positiva con colonias con características morfológicas definidas, las que se crecieron en caldo J y posteriormente se dejaron esporular a temperatura ambiente. Se utilizaron diversos criterios de selección que incluyen: tinción del cuerpo parasporal, microscopía electrónica de los cristales, inmuno-dots, electroforesis de las proteínas de los cristales y western blottings y la capacidad insecticida de las cepas contra larvas de Heliothis zea.
Se han aislado 10 cepas locales de B.t. cuyas toxinas difieren en P.M. ap. y con toxicidad diferente a la cepa control HD-1. Se trabaja en el aislamiento de los plasmidios codificadores de las toxinas y en el análisis de éstos con enzimas de restricción.
Financiado por PNUD/UNESCO RLA 83/003/009

FLAVONOIDES COMO ESTABILIZADORES DE ACEITES DE PESCADO. UNA ALTERNATIVA AL USO DE ANTIOXIDANTES SINTETICOS.(Flavonoids as Stabilizers of Fish Oil. An Alternative to the Use of Synthetic Antioxidants).Leighton F., Rojas S., *Morales, G., *Loyola, L. y Cols. Universidad Católica de Chile, *Universidad de Antofagasta.

Los Flavonoides constituyen una gran familia de compuestos naturales. Estos entre sus muchas propiedades, presentan una alta afinidad para unirse a polímeros biológicos e iones de metales pesados; catalizan el transporte de electrones y actúan como atrapadores de radicales libres. Dadas estas características, su liposolubilidad y observaciones preliminares que demostraron que son capaces de reducir hidroperóxidos, es que se estudió la factibilidad de utilizarlos como antioxidantes en aceites poliinsaturados, específicamente, aceites de pescado. Se evaluaron algunos flavonoides comerciales conocidos y otros de plantas nativas chilenas.
Entre los flavonoides comercialmente disponibles estudiados, quercetina mostró el mayor efecto antioxidante en aceite de pescado que contenía aproximadamente un 30% de ácidos grasos w3. Tres de los flavonoides aislados de plantas nativas presentaron un potente actividad antiperoxidativa, comparable o mejor que la de DL-alfa-tocoferol. Se encontró, al hacer mezclas, un marcado sinergismo entre DL-alfa-tocoferol y algunos flavonoides y, también entre diferentes flavonoides. Estos resultados indican que una vez hechos los estudios fisicoquímicos y toxicológicos, estos compuestos podrían ser usados como antioxidantes naturales en reemplazo de los compuestos sintéticos utilizados actualmente. (Financiado por Fondecyt 250/88, PNUD CHI/88/017 y Prog. Estudios Avanzados U. de Chile, A.V.).

PURIFICACION Y PROPIEDADES DE UNA AGARASA EXTRACELULAR DE UNA BACTERIA MARINA (Purification and properties of an extracellular agarase from a marine bacterium). León, O., Quintana, L. y Slebe, J.C. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. Valdivia.

Varias cepas de bacterias aisladas de muestras de agua de mar de las Regiones VIII y IX muestran actividad agarolítica, que se observa por la formación de depresiones y orificios en la superficie del agar, en placas de cultivo.

Con el objeto de estudiar las enzimas extracelulares que intervienen en la degradación de agar por estas bacterias , en este trabajo se realizó la purificación y caracterización de una agarasa de un a un bacilo Gram negativo de caracteristicas similares a las del género vibrio.

La purificación se efectuó a partir de un sobrenadante libre de células utilizando precipitación con sulfato de amonio y cromatografías en DEAE-celulosa y en Sephadex G-75. La actividad de la enzima se determinó por el aumento del poder reductor al utilizar agar como sustrato (Dygert S. y col. Anal. Biochem. 13, 367-374, 1965).

La agarasa purificada presenta una banda principal (> 90 %) en geles de poliacrilamida con SDS, que corresponde a un peso molecular de 66.000. Posee un pH óptimo de 6,3 y, a diferencia de las agarasas previamente descritas, es marcadamente inhibida por la adición de diversas sales. Asimismo, esta enzima es inactivada a temperaturas superiores a 30° C y presenta una actividad específica (200 U/mg) mayor que la obtenida para agarasas purificadas de otras bacterias.

Estos resultados sugieren que la enzima purificada es distinta a las agarasas provenientes de otras especies. (Financiado por los proyectos DIC-UACH S-90-02 y FONDECYT 99/ 0051).

NIVELES VARIABLES DE RECEPTORES DE EGF EN MUCOSA GASTRICA NORMAL Y TUMORAL CUANTIFICADOS POR INMUNOBLOT. (Variable levels of EGF receptors in normal and tumoral gastric mucosa quantified by immunoblot). Manzano, M., Vollrath, V., Chianale J.,y González, A. Depto. de Inmunología Clínica y Reumatología, Departamento de Gastroenterología. Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile.

El Factor de crecimiento epidermal (EGF) y su receptor han sido involucrado en la patogenia del cáncer. Se ha descrito un aumento en la expresión de los receptores de EGF (R-EGF) en cáncer gástrico comparados con la mucosa normal y en algunos casos una correlación con la malignidad. Sin embargo, existe una gran heterogeneidad en los niveles de receptores cuantificados mediante unión de 1251-EGF a preparaciones crudas de membrana, e incluso en algunos casos no se detectan.

El cáncer gástrico tiene una frecuencia mayor en Chile que en otros países. En este trabajo estudiamos los niveles de R-EGF en la mucosa gástrica normal y tumoral en 18 pacientes, mediante inmunoblot cuantitativo, utilizando un anticuerpo policlonal preparado contra R-EGF purificado de placenta humana. En todas las muestras de membrana analizadas en cada caso en relación a proteínas totales y a actividad 5'nucleotidasa se detectó R-EGF. La cantidad observada fue variable tanto entre mucosas normales como entre tumores, no encontrándose correlación con el tipo de tumor. Además, se detectó mayor cantidad de R-EGF en 7 muestras de mucosa normal respecto de la tumoral y sólo en 5 tumores comparado con la mucosa normal. La causa de las divergencias con otros estudios podrían residir en el método de detección utilizados en diferencias propias de esta población.
(Financiado por FONDECYT #0249/87)

ESTUDIOS DE INVASION LEUCEMICA EN MEDULA OSEA DE RATON. (Studies of leukemic invasion in murine bone marrow). Martínez, J., Peirano, A. y Fernández, M. Unidad de Biología Celular, INTA, U. de Chile.

La invasión leucémica de la médula ósea es un proceso por etapas en que la célula transformada se adhiere al estroma de la médula ósea a través de interacciones específicas que involucran moléculas de matriz extracelular (ME) e interacciones célula-célula. Producto de esta interacción, la célula expresa actividades hidrolíticas que desorganizan estructuralmente el estroma y producen un declinamiento de la hematopoiesis normal.

Trabajos previos de nuestro grupo han permitido caracterizar una colagenasa unida a membrana, específica para colágenos intersticiales y activable por tripsina, cuya actividad se correlaciona con la digestión parcial del estroma medular.

Los estudios que ahora comunicamos sugieren que el fenómeno de adhesión a ME (específicamente a Fibronectina) podría constituir un mecanismo posible de inducción de esta actividad colagenolítica en un proceso mediado por receptores celulares del tipo integrinas.

Se discute la posibilidad de que la interacción célula leucémica- fibronectina constituya un mecanismo de transducción de señales entre la superficie celular y el núcleo, que medie el fenómeno invasivo.

Financiamiento: FONDECYT 89-990.

EFECTO SOBRE LA SINTESIS PROTEICA DE LA "IMPLANTACION" in vitro.
(Effect on protein synthesis of in vitro "implantation"). Mayor, R., Baiza, L. e Izquierdo, L. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Cultivando blastocistos de ratón in vitro en medios enriquecidos puede observarse una "implantación" caracterizada por la extensión y adhesión sobre el sustrato de plástico y por la diferenciación de diversos tejidos. Utilizando metionina-35S hemos estudiado el efcto que tiene la "implantación" sobre la síntesis de proteínas, para lo cual comparamos embriones que se "implantan" con otros cuya "implantación" se impide por una capa de agarosa sobre el plástico. En los embriones impedidos de implantar se observa la pérdida de zona pelúcida y el colapso de la cavidad blastocélica igual que en los normales.

Las proteínas sintetizadas, tanto almacenadas como secretadas, aumentan notablemente en los embriones "implantados" y muy escasamente en los impedidos de implantar. También se observan en geles diferencias cualitativas. El efecto inhibitorio sobre la síntesis proteica en embriones impedidos de implantar es irreversible, aunque dichos embriones implantan rápidamente en cuanto se elimina la capa de agarosa. Nuestros resultados revelan un efecto estimulante de la "implantación' in vitro sobre la síntesis proteica, sin embargo dicho efecto no se manifiesta cuando la "implantación' in vitro es diferida por la capa de agarosa.
Financiado por Fondecyt y U. de Chile.

ESTIMULACION DE LA NUCLEOLOGENESIS POR HIPOMETILACION DEL DNA EN CELULAS MERISTEMATICAS DE A. CEPA L. (Stimulation of nucleologenesis by DNA hypomethylation in meristematic cells). MERGUDICH,D.; Leyton,C.; Sans,J. Dpto. Biol. Cel. y Gen. Fac. Med. U. de Chile.

Entre los procesos que ocurren al final de la mitosis, se produce la reorganización nucleolar (nucleologénesis). Este evento, es dependiente de la activación de cistrones ribosomales. En estudios previos, hemos visto, en células meristemáticas sincrónicas de raíces de Allium cepa L, que tratamientos con 5-AzaC (análogo de la citidina, y agente hipometilante del DNA), que involucren fundamentalmente la primera mitad del periodo replicativo del DNA, aceleran la nucleologénesis.

En el presente trabajo se estudia si la aceleración de este proceso, inducida por 5-AzaC, se relaciona con el efecto hipometilante de este análogo. Con este fin, se determinó mediante HPLC el contenido de citosina y metilcitosina en el DNA, después de distintos tratamientos con 5-AzaC. Además, se analizaron cambios en el patrón de corte, en sectores particulares del genoma (cistrones ribosomales), con los esquizómeros Hpa II y Msp I.

Los resultados muestran que 5-AzaC provoca una caída en alrededor del 25% en el contenido de 5metil citosina del DNA. Esta caída se asocia con un incremento importante de citosina. DNAs obtenidos de células tratadas con 5-AzaC presentan un patrón de corte diferente con las dos enzimas de restricción, detectado mediante hibridación con una sonda heteróloga de 1.7 Kb correspondiente al rDNA 18 S de rábano.

Estos resultados sugieren que la aceleración de la nucleologénesis, provocada por 5-AzaC, estaría relacionada con hipometilación de un sector de los cistrones ribosomales.

Proyecto FONDECYT 89-812.

INTERRELACION ENTRE REPLICACION DEL GENOMA Y TRADUCCION DE GENES PARA HISTONAS EN EMBRIONES DE Tetrapygus niger. (Relationship between ADN replication and translation of histone genes in embryos of the sea urchin Tetrapygus niger). Merino, V., Inostroza, D., Puchi, M., Imschenetzky, M. Departamento de Biología Molecular, Universidad de Concepción.

En células somáticas la expresión de genes para histonas está acoplada a la replicación del genoma. Durante el desarrollo embrionario de erizo de mar, tres grupos de genes para histonas son secuencialmente expresados: las variantes atípicas CS particulares de los estados de segmentación, las variantes α mayoritarias hasta la eclosión de las larvas y las histonas tardías similares a histonas somáticas que predominan en estados larvarios del desarrollo. Las variantes tipo CS dependen de la replicación solo a nivel de su traducción, pero se desconoce la eventual interdependencia entre replicación y expresión de histonas tardías.

Con el objeto de abordar este problema se investigó la relación entre síntesis de histonas y replicación en etapas de eclosión y larvarios de desarrollo embrionario. Se determinó la replicación del genoma por incorporación de [3H] timidina a ADN y la neosíntesis de histonas por fluorografía de [3H] histonas obtenidas a partir de cultivos incubados con una mezcla de [3H] aminoácidos. En experimentos paralelos se utilizó α amanitina como inhibidor de ADN polimerasa y emetina como inhibidor de traducción.

Los resultados obtenidos indican que la expresión de genes de histonas no está acoplada a la replicación del genoma en la etapa de eclosión y sí lo está en etapas larvarias de desarrollo embrionario.

Proyecto FONDECYT 0789/88: 20.31.17 y 20.31.35, Universidad de Concepción.

CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LA PROTEINA QUINASA C MAMARIA DE RATA. (Biochemical characterization of protein kinase C from rat mammary gland).
Moncada, E., Lavandero, S. Sapag-Hagar, M.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Interesados en la participación de la proteína quinasa C (PK-C) en el complejo mecanismo de transducción de señales en los procesos de proliferación y diferenciación celulares en el tejido mamario, se procedió a purificarla parcialmente a través de cromatografía de intercambio iónico (DEAE celulosa), y de afinidad (fenilsefarosa).

La posterior caracterización de la PK-C mamaria indicó que al igual que las descritas en otros tejidos, su actividad es dependiente de calcio y fosfolípidos, con una constante de afinidad (Ka) de 0,44 uM para calcio; Km de 66 ug/ml para histona; Km de 10 uM para ATP.

Para cerebro se han informado Km de 50 ug/ml y de 6 uM para histona y ATP, respectivamente. El estudio de la especificidad para distintos sustratos indicó que: histona≫protamina> caseína>α-lactalbúmina. Respecto a la acción de distintos metales divalentes sobre la actividad de la enzima se tuvo: Mg^{2+} presentó un efecto activador (conc. óptima: 10mM), Mn^{2+} fue menos efectivo y el Zn^{2+} la inhibió totalmente.

El estudio demostró que tanto la actividad como la distribución subcelular de la enzima (membrana celular-citosol) varían en relación al período del ciclo lactogénico. En resumen, nuestros resultados indican que la PK-C mamaria de rata presenta un comportamiento similar al descrito para otras PK-C de diferentes tejidos, permitiendo asignarle un papel importante en los complejos mecanismos de transducción molecular, responsables del desarrollo y función de la glandula mamaria de rata.
(S.L. es becario de Fundación Andes. FONDECYT 88-0872).

INHIBICION DE LA REPLICACION DEL GENOMA POR EFECTO DE 3-AMINOBENZAMIDA EN EMBRIONES DE Tetrapygus niger. (Inhibition of DNA replication by 3-amine-benzamide in sea urchin embryos)

Montecino, M., Puchi,M.,Imschenetzky, M. Depto. Biología Molecular, Facultad Ciencias Biológicas y Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

La poli ADP-ribosilación representa uno de los mecanismos más importantes de regulación de eventos celulares como la diferenciación, replicación y reparación del DNA.

Al inicio del desarrollo embrionario del erizo de mar, se suceden rápidos ciclos celulares, donde destaca como evento principal la replicación del genoma. Es por esto que la cromatina en estos cigotos debe adaptarse estructuralmente para responder a estos requerimientos.

Nos interesó determinar si la inhibición de la poli ADP-ribosilación in vivo, mediada por 3-aminobenzamida (3-AB), presentaba efecto sobre la replicación, medida por la incorporación de (^{3}H) timidina al DNA genómico. Simultáneamente se analizó la presencia de esta modificación en proteínas histónicas tipo CS, obtenidas de cigotos incubados en presencia de este inhibidor. Esto se llevó a cabo mediante técnica de Western inmuno Blot, con anticuerpos anti poli ADP-ribosa obtenidos en conejos.

Los resultados indican que la presencia de 3-AB en el medio de cultivo se traduce en una disminución dosis dependiente en la incorporación de (^{3}H) timidina.Al mismo tiempo, se observa una inhibición solo transitoria a una concentración de 10 mm de 3-AB.

Por otro lado las histonas tipo CS extraídas de cigotos cultivados en presencia de 3-AB, no presentan niveles detectables de poli ADP-ribosilación, en contraste con la modificación ciclo dependiente observada en los cultivos controles.

Financiado por Proyectos FONDECYT 0789/88, Universidad de Concepcion 20.31.17 y 20.31.35.

ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO Y ULTRAESTRUCTURAL DE LA HIPÓFISIS DE OCTODON degus-MOLINA-. (Ultrastructural and immunocytochemical study of Octodon degus-Molina- pituitary).

Morales, B.A. y Sánchez, G. Depto. Morfología Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El Octodon degus es un roedor silvestre que presenta ciclos reproductivos estacionales con períodos de Reposo y Actividad gonadal, ciclos en los que interviene la hipófisis (H). La falta de conocimientos sobre esta glándula en esta especie nos motivó a estudiarla.

Machos y hembras adultos, hembras gestantes y machos inyectados con LHRH fueron sacrificados, disecándose rápidamente las H y fijándolas: una mitad en Bouin alcohólico (técnica corriente y PAP-Dr.E. Rodríguez, Valdivia-) y la otra en Glutaraldehido 6% (M.E.T.).

En la adenohipófisis (ADH), por sus características citológicas e inmunocitoquímicas (Ac anti rata) se pudo reconocer células ACTH, STH, TSH, FSH y LH; estas dos últimas se ubicaron en un mismo tipo celular, apareciendo hiperestimuladas con LHRH. La célula Prl sólo se reconoció ultraestructuralmente, siendo más evidentes en las hembras gestantes. La neurohipófisis (NH) presenta Pituicitos y axones; en éstos se detectó mediante PAP: Neurofisina I y II (NPHI y II), Vasopresina (AVP) y Oxitocina (Ox).

Las células de la ADH de O.degus son similares a la M.E.T. a las descritas para otros mamíferos. Las variaciones estacionales en estas poblaciones celulares podrían ser mejor detectadas con la técnica inmunocitoquímica. La ausencia de tinción de las células Prl con Ac antirata hace necesaria la obtención de Ac específicos anti-Prl de Octodón. La presencia de NPHI y II, AVP y Ox en NH es similar a otras especies.

EFECTO DE PALMITOYL-COA EN LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PROTEÍNA KINASA C EN PLAQUETAS PERMEABILIZADAS (The effect of palmitoyl-CoA on the subcellular localization of protein kinase C in permeabilized platelets).

Nuñez, L., Orellana, A., y Bronfman, M. Depto. Biol. Cel. & Molec.., Fac. Cien. Biol., P.Universidad Católica de Chile.

La proteína kinasa C es una enzima que requiere de Calcio y de fosfolípidos, en especial fosfatidilserina (PS). Fisiologicamente es activada por diacilglicerol (DAG), segundo mensajero generado en la membrana celular por hidrólisis de fosfatidilinositoles fosfato. La pkC es una enzima con una localización preferentemente citosólica, que al activarse por DAG se transloca a la membrana donde estan sus sustratos. El mecanismo y los factores que regulan la cantidad de enzima unida a membrana no se conocen. En nuestro laboratorio hemos encontrado que los ácidos grasos de cadena media y larga unidos al Coenzimo A (acil-CoAs) son capaces de potenciar la actividad de la enzima en presencia de PS y de DAG. El mecanismo de esta activación parece resultar de una disminución inducida por acil-CoA en el número de moléculas de PS necesarios para activar la enzima (1). Este resultado sugiere que los acil-CoAs podrían estar regulando la cantidad de enzima unida a membrana ya que aumentan en forma aparente la afinidad de la enzima por PS, molécula que se encuentra en la membrana. Con el objeto de estudiar esta hipótesis, plaquetas humanas se permeabilizaron con digitonina y se determinó la salida de pkC en presencia y ausencia de palmitoil-CoA. Los resultados obtenidos por medición directa de la actividad enzimática y por determinaciones utilizando anticuerpo monoclonal contra la enzima sugieren que el palmitoil-CoA induce una mayor unión de la enzima a membranas.

(1) Eur. J. Biochem., en prensa. Financiado por Fondecyt 802/90

PROTEINAS CROMOSOMALES DEL TIPO HMG EN OVOCITOS Y EMBRIONES DE ERIZO DE MAR Tetrapygus niger. (HMG like chromosomal proteins in unfertilized eggs and embryos of the sea urchin Tetrapygus niger).

Oñate, E., Gamboa, S., Puchi, M., Imschenetzky, M. Departamento de de Biología Molecular, Universidad de Concepción.

Las proteínas de alta movilidad electroforética (HMG) se encuentran asociadas al ADN y juegan un rol importante, tanto en la estructura de la cromatina como en la regulación de la expresión del genoma. Actualmente no existe información acabada sobre la presencia de proteínas similares a HMG en gametos femeninos y en estados tempranos de desarrollo embrionario.

Con el objeto de investigar la presencia de proteínas HMG en gametos femeninos y embriones del erizo de mar Tetrapygus niger, se obtuvieron proteínas a partir de cromatina por su solubilidad diferencial en ácido perclórico 5% (p/v). Las proteínas extraídas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo diferentes condiciones denaturantes. La semejanza de estas proteínas con HMG típicas fue determinada por Western Blot con sueros anti HMG de timo de ternera obtenidos en conejos. Adicionalmente se realizó una detección de modificación post-traduccional de estas proteínas con suero antipoli-ADP ribosa.

Los resultados obtenidos indican que existen cuatro proteínas tipo HMG en ovocitos y en estados tempranos del desarrollo embrionario. La proteína de mayor peso molecular da reacción positiva con anticuerpos anti HMG de timo de ternera y con anticuerpos antipoli ADP-ribosa.

Financiado por Proyectos FONDECYT 0789/88, 20.31.35 y 20.31.17 de la Universidad de Concepción.

ANTIGENO TUMORAL MAYOR Y REPLICACION DEL DNA EN CELULAS TRANSFORMADAS POR SV40. (Large tumor antigen and DNA replication in SV40-transformed cells). Ordenes,G.E.; Corvalán,A.; Pérez,I.y Santos,M. Dpto. Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

El antígeno tumoral mayor (ag-T), se localiza fundamentalmente en el núcleo de las células transformadas por SV40. Mediante la técnica citoquímica de la inmunoperoxidasa se ha demostrado que el patrón de distribución intranuclear del ag-T varía según la ubicación de las células en el ciclo proliferativo. Así, se han definido dos patrones: homogéneo (células G1) y heterogéneo (células en S,G2). Se ha postulado que las áreas con reactividad positiva para ag-T en las células en etapa S podrían corresponder, al menos parcialmente, a sitios de replicación del DNA. Se ha obtenido dos tipos de evidencias que apoyan tal hipótesis. Si las células con patrón heterogéneo son sometidas a extracción diferencial con NP-40 y con DNAasa-NaCl 2 M se observa que la extracción de la mayor parte del ag-T requiere el tratamiento con enzima y sales, lo que sugiere que está directa o indirectamente asociado con el DNA. Por otra parte, al someter células que han incorporado Bromodeoxiuridina (Br-dU) a una doble reacción de inmuno-fluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos anti-ag-T y anti-Br-dU seguidos de un segundo anticuerpo marcado con isotiocianato de fluoresceina y con rodamina respectivamente, se ha podido establecer una co-localización entre el ag-T y sitios en que el DNA se está replicando. Estos antecedentes sumados a ciertas características funcionales del ag-T (ej. actuar como helicasa), permiten especular que esta proteina viral podría formar parte de los complejos replicativos en el núcleo de las células transformadas por SV40.

Financiado por Proyecto Fondecyt 1183/90.

EFECTO DE DROGAS HIPOLIPIDEMIANTES EN EL NIVEL DE FOSFORILACION DEL RECEPTOR DE EGF. (Effect of Hypolipidaemic Drugs in the Phosphorilation Level of the EGF-Receptor). Orellana A., Holuigue, L., Gonzalez, A., y Bronfman M. Dpto. Biol. Cel. & Molec., Fac. Cien. Biol. P.Universidad Católica de Chile.

El factor de crecimiento epidermal (EGF) ejerce su acción en la célula por intermedio de un receptor localizado en la membrana plásmica (R-EGF). Este receptor, al unir al EGF estimula una actividad tirosina quinasa, que provoca la autofosforilación del receptor en un residuo de tirosina. Además, se ha planteado que R-EGF estaría relacionado con fenómenos de transformación celular puesto que un oncogen codifica una forma truncada del receptor. Por otro lado, R-EGF es sustrato de la proteína quinasa C (pkC), enzima que ha sido involucrada en mecanismos de transducción de señales y además en fenómenos tumorigénicos. En nuestro laboratorio hemos estado interesados en el mecanismo de acción de las drogas hipolipidemiantes, un tipo de xenobióticos que entre sus muchas actividades producen tumores hepáticos en roedores. Recientemente hemos descrito que estas drogas, en la célula pueden ser transformadas en ésteres del coenzimo A formando drogas-CoA (1). Además hemos encontrado que estas drogas-CoA producen una estimulación de la actividad de pkC in vitro (2). En base a estos antecedentes nos ha interesado estudiar el efecto que tienen las drogas hipolipidemiantes en la fosforilación del R-EGF de hígado de rata. Los resultados muestran que en hepatocitos aislados de rata las drogas modifican el nivel de fosforilación del R-EGF, sin embargo las drogas o sus derivados del coenzimo A no afectan la actividad tirosina quinasa. Lo anterior sugiere una modulación en la actividad del R-EGF por parte de las drogas, mediada por pkC. (1) Biochem. J., 239: 781-784 (1986). (2) B.B.R.C. 159:1026-1031 (1989). Financiado por Fondecyt 802/90.

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD ATPásica-ADPásica PRESENTE EN PLACENTA DE RATA. (Characterization of ATPase-ADPase activity of rat placenta). Pieber, M., Valenzuela, M.A., Kettlun A.M., Mancilla, M. y Traverso-Cori, A. Depto. Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas. Univ. de Chile.

Una de las funciones propuestas para la apirasa, enzima que hidroliza ATP y ADP en presencia de Ca^{2+}, es inhibir la agregación plaquetaria, por su actividad ADPásica, lo que contribuiría a la fluidez sanguínea para la adecuada irrigación del feto.

La actividad ATPásica-ADPásica se encontró ligada a membranas en la placenta, al igual que en otros tejidos de rata.

La caracterización bioquímica de una fracción microsomal de placenta mostró que: a) hidroliza a la misma velocidad el ATP y el ADP a pH 8,0; el AMP lo hidroliza a un tercio de esta velocidad, y que el PP, G1P y p-nitrofenilfosfato lo hidroliza a un décimo de ella ; b) el Ca^{2+} es el catión más efectivo con ATP y ADP, le siguen Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+} y Co^{2+}; c) los valores de Km para ATP y ADP, son 59 uM y 33 uM respectivamente. Se probó además el efecto de diversos inhibidores de ATPasas como azida, ouabaína, vanadato, DES, fluoruro, DCCD, Ap5A y oligomicina. Se encontró un efecto inhibidor notorio con el vanadato, DES, azida y fluoruro. La enzima solubilizada con octilglucósido tiene una masa molecular de 67 kDa.

En conclusión, podemos decir que hay presente en tejido placentario una verdadera actividad apirásica ligada a membrana semejante a la encontrada en otros tejidos animales.

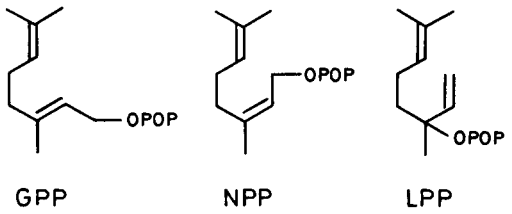
Financiado por Proyecto FONDECYT 90-1006.

ASPECTOS MECANISTICOS DE LA BIOSINTESIS DE MONOTERPENOS CICLICOS. (Mechanistics aspects of the biosynthesis of cyclic monoterpenes). PORTILLA, G., Lab. Bio-Orgánica, Departamento de Química, Fac. Ciencias, Universidad de Chile.

Se presentan el estudio y las conclusiones obtenidas en la dilucidación de parte del mecanismo por el que se biosintetizan algunos hidrocarburos cíclicos.

Previamente se había demostrado que el sistema enzimático de *C. limonum*, utiliza [1^{-3}H]GPP, [1^{-3}H]NPP y [1^{-3}H]LPP y que la preparación contiene tres enzimas de diferentes masas moleculares.

Nuestras observaciones sobre reactividad de los difosfatos orgánicos, apoyan la hipótesis de que al utilizar GPP habría formación de un carbocatión, el que rotaría para lograr la conformación apropiada para la ciclación. Descartamos un mecanismo de isomerización previa de GPP a LPP.



Parte de este trabajo se realizó con el apoyo del D.T.I., Universidad de Chile, (Proyecto Q-1818).

INDUCCION DEL SISTEMA CITOCROMO P450-MONOOXIGENASAS DE HIGADO POR CONTAMINANTES AMBIENTALES DE SANTIAGO. (Induction of hepatic Citochrome P450-Monooxygenases System by environmental contaminants of Santiago).

Quiñones, L.S., Illesca, H., y Salazar, I. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El sistema Citocromo P450-Monooxigenasas cataliza el metabolismo oxidativo de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH) contaminantes ambientales, conocidos agentes mutagénicos y carcinogénicos e inductores de las isoenzimas Citocromo P450-IA_1.

En el presente trabajo, se estudió en ratas normales y en ratas con desnutrición proteica, el efecto in vivo de extractos orgánicos del material particulado del aire de una zona de Santiago Centro, sobre el sistema Citocromo P450-Monooxigenasas de microsomas de hígado.

Con extractos del 80% de los días analizados, se observó 48 Hrs. después de la inyección intraperitoneal, en ambos tipos de animales tratados: desplazamiento del máximo de absorción del complejo Citocromo P450-CO, así como aumentos significativos en el contenido de Cit. P450 y en las actividades NADPH-Cit. P450-reductasa, Benzopireno hidroxilasa y Etoxicumarina-O-desetilasa; en cambio la actividad Aminopirina-N-desmetilasa se mantuvo en niveles control.

Estos resultados indicarían que en el material particulado que contamina el aire de Santiago, existen PAHs que inducen específicamente las isoenzimas P450-IA_1 del sistema Monooxigenasas de hígado.

Financiado por FONDECYT, Proyecto 0863.

ESTUDIOS CINETICOS DE LA FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA CON FRUCTOSA-1-FOSFATO COMO SUSTRATO (Kinetic studies of fructose-1,6-bisphosphatase with fructose 1-phosphate as substrate).

Reyes, A., Bravo, N. y Slebe, J.C. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

La fructosa-1,6-bisfosfatasa hidroliza fructosa-1,6-bisfosfato (Fru-1,6-P_2) a fructosa-6-fosfato más P_i, y es inhibida alostéricamente por AMP. Asimismo, es inhibida por fructosa-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P_2), por un mecanismo que es controversial; la cinética de la inhibición usando Fru-1,6-P_2 es compleja. Puesto que la enzima renal de cerdo también usa fructosa-1-fosfato (Fru-1-P) con una eficiencia y afinidad menores, (Colombo y Marcus, FEBS Lett. 38, 153, 1974), nos pareció de interés investigar las propiedades cinéticas de esta enzima con Fru-1-P, analizando en especial las características de su inhibición por el Fru-2,6-P_2.

La actividad fructosa-1-fosfatásica se midió fotocolorimétricamente por la producción de P_i o espectrofotométricamente a 500 nm acoplando la reacción de desfosforilación de Fru-1-P con las de la nucleósido-fosforilasa y de la xantina-oxidasa, en presencia de inosina y iodonitrotetrazolio.

La cinética de saturación de la enzima con Fru-1-P entre 0,3 y 17 mM es hiperbólica (K_m = 3,2 mM; μ = 0,125 M), sin indicios de la característica inhibición por exceso de sustrato cuando se une Fru-1,6-P_2. Con Fru-1-P, K^+ inhibe a la enzima en forma competitiva (K_i = 24,3 mM), probablemente por acción en el sitio activo, mientras que el inhibidor alostérico AMP muestra una inhibición mixta. La inhibición por Fru-2,6-P_2 también es mixta, con un claro componente incompetitivo (K_{ic} = 0,22 µM y K_{iu} = 0,67 µM). Este resultado sugiere que el Fru-2,6-P_2 actúa sobre la enzima mediante un sitio alostérico. Se concluye que el empleo de Fru-1-P clarifica el mecanismo de la inhibición de la enzima por el Fru-2,6-P_2. (Financiado por: DIC-UACH, RS-89-37 y FONDECYT 188/89).

INTRODUCCION DE UNA SONDA FLUORESCENTE EN LA CISTEINA-128 DE LA FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA (Introduction of a fluorescent probe on cysteine-128 of fructose-1,6-bisphosphatase).

Reyes, A., y Slebe, J.C. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

La fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón de cerdo es una proteína tetramérica que es inhibida por fructosa-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P_2). El bloqueo selectivo de la cisteína 128 de la enzima con N-etilmaleimida la insensibiliza a esta inhibición (Reyes et al., J. Biol. Chem. 262, 8451, 1987). Nos propusimos marcar este residuo con una sonda fluorescente, para probar la polaridad del entorno de la cisteína y su accesibilidad a agentes colisionales en el medio externo.

Por modificación química de la enzima (2 mg/mL) con pireno-maleimida (PM, 0,1 mM) se obtuvo un derivado activo, que tiene un grupo PM por subunidad y es prácticamente insensible al Fru-2,6-P_2. El inhibidor protegió contra la reacción de modificación. Estos hechos sugieren que PM se une específicamente a la cisteína 128. El fluoróforo se excitó a 344 nm y los apagadores acrilamida y nitrometano se usaron en el intervalo de concentraciones de 0,01 a 0,9 M.

Los espectros de fluorescencia muestran que el residuo de cisteína 128 se encuentra en un entorno apolar, que no se altera por la presencia de ligandos de la enzima. El estudio del apagamiento de la fluorescencia del PM unido muestra que el fluoróforo se encuentra protegido de colisiones con la acrilamida, pero es accesible al nitrometano, sugiriendo que PM se ubica en una hendidura de la proteína. La adición del inhibidor alostérico AMP produce un mayor apagamiento en la emisión del fluoróforo por nitrometano, lo que sugiere un cambio conformacional; otros ligandos de la enzima (Fru-1,6-P_2, K^+) no muestran este efecto.

La sonda permitirá caracterizar la posición relativa de este residuo en la estructura terciaria de la proteína (Financiado por: DIC-UACH, RS-89-37, FONDECYT 188/89 y Fundación Andes, C-11050).

EVIDENCIAS DE UN POLIPEPTIDO DE 110-KD ASOCIADO A VESICULAS TRANSPORTADORAS DE LIPIDOS BILIARES. (Evidence of a 110-KD polypeptide associated to native biliary vesicles

Riggoti, A., Marzolo, M.P., Brandán, E., Amigo, L. y Nervi, F. Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina y Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica, Santiago, Chile.

Una cantidad importante de colesterol biliar se transporta en liposomas (vesículas) de lecitina, tanto en bilis de rata como humana. Aunque hay al menos 14 proteínas en la bilis nativa, incluídas apoproteínas del plasma, no existen evidencias hasta ahora de alguna interrelación entre las vesículas transportadoras de lípidos en la bilis (lecitina y colesterol libre) y proteínas específicas. Nuestro objetivo fue la búsqueda de asociaciones entre proteínas y el transportador vesicular de lípidos en bilis nativa de rata.

Usamos bilis de grupos de ratas alimentadas con diosgenina (inductor de la secreción biliar de colesterol), en las que > 68% del colesterol biliar se encuentra en fracciones ricas en vesículas. El colesterol biliar se marcó con H^3-colesterol y las fracciones vesiculares se aislaron por ultracentrifugación en Metrizamida al 7%. Las vesículas se purificaron a través de 2 cromatografías en columna usando 150 mM NaCl, 50 mM Tris y 1.5 mM EDTA a pH 8. Primero, las vesículas se excluyeron en el volumen de exclusión con Ultrogel Aca-34, se concentraron por ultrafiltración en Amicon YM-30 y luego se incluyeron en una columna CL-2B-300. La integridad de las vesículas se confirmó con una tercera columna de exclusión. La tinción con Ag de las fracciones vesiculares demostraron un polipéptido de 110 kD después de purificadas. Se excluyó la posibilidad de contaminación con sangre, demostrando la misma asociación vesícular lípido-péptido en vesículas obtenidas de hígado aislado. Los resultados sugieren que los transportadores de lípidos biliares son lipoproteínas.

RESPUESTA DE PLANTULAS DE Citrus limonum FRENTE AL ATAQUE POR HONGOS. (Citrus limonum seedlings response to fungal attack). Roco, A., Fanta, N., Pérez, L. M. Dep. Bioq. y Biol. Mol., Fac. Cs. Quím. y Farm., Univ. de Chile.

Las plantas superiores pueden defenderse de la agresión producida por microorganismos patógenos, a través de la expresión de genes de defensa.

Las plántulas de C. limonum sometidas a las siguientes condiciones: a) infección directa por Alternaria chlamydospora, ó b) tratamiento con pectinasa obtenida del mismo hongo ó c) tratamiento con azúcares oligoméricos, respondieron aumentando significativamente las actividades de PAL (fenilalanina amonio liasa) y CH (cinamato hidroxilasa), enzimas de la vía fenilpropanoide.

Sin embargo, los tiempos requeridos para obtener la máxima inducción dependieron del tipo de tratamiento. La inducción enzimática no se produjo cuando los tratamientos se realizaron en presencia de inhibidores de la síntesis proteica.

Los resultados sugieren la existencia de una secuencia en el proceso de infección del tejido vegetal: germinación de las esporas —> secreción de pectinasa —> hidrólisis de pared celular vegetal —> generación de fragmentos de pared (azúcares oligomericos) —> activación de la vía fenilpropanoide. Por lo tanto, los verdaderos inductores de la respuesta de la planta serían los fragmentos de pared celular vegetal.

Financiado por FONDECYT (157/88) y DTI (B 2950-892).

SINTESIS Y LOCALIZACION DE PROTEOGLICANOS ASOCIADOS A MEMBRANA PRODUCIDOS POR CELULAS DE SERTOLI: (Sinthesis and location of membrane-associated proteoglycans produced by Sertoli cells). Rodríguez, J.P. y Minguell, J.J. Unidad de Biología Celular, INTA, U. de Chile.

Las células somáticas testiculares en cultivo incorporan 3H-glucosamina en proteoglicanos (PG), los cuales se encuentran tanto asociados a la membrana celular como en la matriz extracelular (ME). En el testículo, la función de los PG asociados a membrana no ha sido dilucidado. En este trabajo se utilizan células de Sertoli, que producen activamente PG y están en estrecha asociación con las células germinales, para estudiar el posible rol que tienen los PG asociados a membrana en el proceso espermatogénico.

Al analizar los PG por DEAE-Sephacel se puede observar la aparición de un proteoglicano mixto de heparan y condroitin sulfato (PG-HS/CS) y un proteoglicano de condroitin sulfato (PG-CS), que eluyen a la misma concentración de sal que las especies producidas por cultivos de células testiculares. Sin embargo, la razón entre el PG-CS y PG-HS/CS es mayor que la observada para el caso de los cultivos de largo término. El análisis cromatográfico de los PG, luego de tratar las células de Sertoli en cultivo con condroitinasa ABC, muestra la elución solo del proteoglicano de condroitin sulfato. La desaparición selectiva de uno de los PG indicaría que mientras el PG mixto se encuentra accesible a la enzima y posiblemente libre de interacciones, el PG-CS podría estar participando en interacciones con otras células de estroma o bien con otras moléculas de ME.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 89 - 990

SITIOS DEL NUCLEOTIDO EN CARBOXIQUINASAS FOSFOENOLPIRUVICAS DEPENDIENTES DE GTP Y ATP. (Nucleotide Sites of GTP and ATP-dependent phosphoenolpyruvate carboxykinases). Rojas, M. C., Encinas, M. V. y Cardemil, E. Departamentos de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile.

La carboxiquinasa fosfoenolpirúvica (PEPCK), cataliza la formación de PEP a partir de oxaloacetato y un nucleótido, que puede ser GTP o ATP según la fuente de la cual se obtenga la enzima. Así, la PEPCK de rata utiliza GTP, en cambio la de levadura sólo utiliza ATP como sustrato. EL sitio que une al nucleótido en la enzima de ambas fuentes, contiene un par de SH vecinos y en la PEPCK de rata, uno de estos tioles es extremadamente reactivo a pH 7.0.

El reactivo fluorescente específico para SH: 1,5-I-AEDANS, reaccionó selectivamente con un residuo de la PEPCK de rata, como lo demuestra la obtención de un único péptido tríptico fluorescente a partir de la enzima modificada. Las características fluorescentes del AEDANS unido a la enzima, evidencian un entorno de polaridad equivalente a la del etanol y accesibilidad restringida del solvente al sitio del fluoróforo. La PEPCK de levadura (ATP) modificada con el mismo reactivo, evidencia una polaridad menor en el sitio equivalente y similar accesibilidad al solvente. Determinaciones de la anisotropía de fluorescencia, muestran diferencias en el grado de libertad rotacional del fluoróforo en las PEPCKs dependientes de GTP y ATP.

Trabajo financiado por FONDECYT proyecto 88-1060 y DICYT-USACH.

EVALUACION DE LA ASOCIACION DE PEROXISOMAS Y MICROTUBULOS. (Association between peroxisomes and microtubules) Santos, M.J. Departamento Biología Celular, P. Universidad Católica de Chile.

La localización de los organelos subcelulares membranosos en una célula dependen de interacciones de ellos con elementos del citoesqueleto. Se han acumulado evidencias que muestran la asociación de microtúbulos con lisosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, mitocondrias y vesículas en general. Existe otro organelo membranoso -el peroxisoma-, que recientemente se ha demostrado su ubicuidad y su esencialidad para funciones celulares metabólicas. Entre ellas destaca la B-oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga y la síntesis de plasmalógenos.

No existen estudios que evalúen la asociación de microtúbulos y peroxisomas. Con este fin, realizamos estudios de inmunofluorescencia en fibroblastos humanos, mediante doble marcación. Para ello utilizamos simultáneamente anticuerpos policlonales contra proteínas de la membrana peroxisomal y anticuerpos monoclonales contra tubulina.

Los resultados indican que no habría asociación entre microtúbulos y peroxisomas en condiciones normales ni en situaciones de desensamblaje de microtúbulos. Esto indicaría que los peroxisomas, a diferencia de los otros organelos membranosos, interactuarían con otros elementos del citoesqueleto.

CAMBIOS MORFOLOGICOS Y MOLECULARES INDUCIDOS EN Thiobacillus ferrooxidans EN RESPUESTA A LA HAMBRUNA DE FOSFATO. (Morphological and molecular changes induced in Thiobacillus ferrooxidans in response to phosphate starvation).

Seeger, M. y Jerez, C.A. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Thiobacillus ferrooxidans es una bacteria de importancia industrial que participa en la bioextracción de metales. El fosfato es uno de los nutrientes esenciales para este microorganismo y puede llegar a ser limitante en su entorno natural, lo que podría afectar seriamente la capacidad biolixiviante de la bacteria. Hemos estudiado los mecanismos moleculares de respuesta y adaptación de estas bacterias frente a la carencia de fosfato.
Las bacterias se crecieron en presencia (0.22 mM) o en ausencia de fosfato y con o sin $Na_2{}^{14}CO_3$. Se analizaron las proteínas sintetizadas mediante electroforesis mono y bidimensional y se determinó la actividad de fosfatasas. La microscopía electrónica fue de transmisión y con tinción negativa.
En ausencia de fosfato, las células crecieron muy lentamente, mostrando un alargamiento de hasta diez veces el tamaño normal. Se observó además la inducción de varias proteínas básicas de alto peso molecular y aparentemente la de una fosfatasa periplasmática de peso molecular 26,000 kDa. La falta de fosfato no constituye una respuesta similar al stress térmico, ya que en ausencia de este compuesto no se indujo la proteína hsp 70. Nuestros datos indican que T. ferrooxidans posiblemente posee un sistema para la captación extracelular de fosfato del tipo regulón, similar al de E. coli

Financiado por Proyectos FONDECYT 88-0074, PNUD/UNESCO CHI/ 88-003 y Universidad de Chile.

SECRECION DE ESTRADIOL (E2) Y PROGESTERONA (P) EN UNA LINEA CELULAR DE GRANULOSA HUMANA EN CULTIVO CONTINUO. EFECTO DE FSH EN LA PRODUCCION DE E2. (Estradiol and progesterone release in a human granulosa cell line in continuous culture. FSH effect on estradiol Production)

Sepúlveda,M., Romero,C. y Caviedes,R. Laboratorio de Bioquímica, Dep. Obstetricia y Ginecología, Hospital J.J. Aguirre. Lab. cultivo de tejido, Dep. Fisiología, Facultad de Medicina, U. de Chile.

Debido a la dificultadad de obtener material humano para la investigación en el estudio de la función ovárica, nos interesó la obtención de una línea celular de granulosa humana, que mantuviera la capacidad esteroidogénica de aquellas células obtenidas de folículos pre-ovulatorios. La línea fue establecida por técnicas comunicables previamente (R.Caviedes y col. Arch. Biol. y Med. Exp.22: R - 242,1989) y ha sido propagada por más de 40 subcultivos y sometida a periodos de criopreservación a -90°C, sin cambio funcional aparente. Las células de la monocapa muestran estructura epitelial a la microscopía de fase y conservan inhibición por contacto.

El objetivo de este trabajo es el de estudiar la secreción de E2 y P en esta línea celulr, mediante incubaciones cortas de dos horas a 37°C con 95% O2 y 5% CO2, en medio M-199 y F12-D, en presencia y en ausencia de los sustratos respectivos(testosterona y pregnenolona); así como tambien en presencia de FSH. . La medición de E2 y P se realizó por Radioinmunoenálisis, con reactivos y métodos de la O.M.S. El estudio de viabilidad se realizó antes y después de cada incubación por el test de exclusión con azul tripán al 0.2%, obteniendose entre 75-79% de viabilidad.

Los resultados muestran que las células de granulosa humana de esta línea celular, aún conservan su capacidad para producir E2 y P en presencia de sustrato y al agregar FSH al medio de incubación hay un aumento en la producción de E2. Estos hallazgos demuestran que estas células mantienen su capacidad esteroidogénica y sugieren la presencia de receptores a FSH.

PARTICIPACION DE ACROSINA EN LAS INTERACCIONES ESPERMATOZOIDE-HUEVO (Role of acrosin in sperm-egg interactions)

Sepúlveda, M. S. (*), Becker, M.I., Barros, C. y De Ioannes, A. Fac. Cs. Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Acrosina es una serina proteasa que se encuentra como zimógeno en el acrosoma de los espermatozoides de mamíferos y que se transforma en su forma activa durante la reacción acrosómica.

Su actividad proteolítica se ha relacionado con la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida. Pero, nuestros estudios sobre fecundación in vitro en hamster, utilizando anticuerpos monoclonales (AMC) anti-acrosina o inhibidores específicos de serinas proteasas, muestran que no sólo se inhibe la penetración sino también la unión de los espermatozoides a la zona pelúcida.

El objetivo de este trabajo es estudiar la participación de un sitio de unión a fucosa, presente en acrosina, que podría estar involucrado en la unión del espermatozoide al huevo. Con este propósito, nos interesa seleccionar AMC dirigidos contra el sitio de unión a fucosa desde un panel de 20 AMC anti-acrosina humana.

Se realizaron ensayos de competencia entre los AMC y polisacáridos por su unión a acrosina, mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta y ELISA. De 12 AMC analizados, al menos 3 muestran inhibición por fucoidano, un heteropolisacárido de fucosa sulfatada.

Estos AMC servirán como herramienta para estudiar un rol recientemente propuesto para acrosina, el de participar en la unión espermatozoide-huevo.

Financiado por Fondecyt (495/89 y 577/89).
(*): becaria Fundación Rockefeller.

CLONAMIENTO Y DETECCION DE DETERMINANTES DE ADHESIVIDAD E INVASIVIDAD DE Salmonella typhi Ty2. (ESTUDIOS PRELIMINARES). (Cloning and detection of *Salmonella typhi* Ty2 adhesion and invasion determinants).

Solís, A., Cachicas, V., Hinrichsen, V., Vásquez, A., Meller, C., Yudelevich, A. Laboratorio de Bioquímica. Departamento de Biología Celular y Molecular. Pontificia Universidad Católica de Chile.

La capacidad de bacterias enteropatógenas de adherirse y en algunos casos, además, invadir células de la mucosa gástrica es un elemento muy importante en el proceso de infección.

Con el objeto de caracterizar a nivel molecular los genes involucrados, y las características del proceso de adhesión e invasión estamos estudiando este proceso en *Salmonella spp.* Para ello estamos utilizando la cepa *Salmonella typhi* Ty2, agente etiológico de la fiebre tifoidea, enfermedad que es endémica en Chile.

A fin de identificar las funciones involucradas en estos procesos de adhesión y/o invasión, se ha construido en *E. coli* VCS257 un banco de genes de *Salmonella typhi* en el cosmidio pHC79. Para ello hemos utilizado una cepa aislada de una muestra clínica. Este banco ha sido utilizado para identificar clones en *E. coli* que han adquirido la capacidad de adherirse o invadir *in vitro* cultivos de células HeLa crecidas en monocapa. El estudio de la genoteca permitió aislar dos clones denominados T3 y T4 que adquirieron la capacidad de adherirse e invadir a células HeLa.

Análisis del DNA presente en estos clones indica que además de la presencia del cosmidio pHC79 poseen un inserto de 43 Kb.

Estudios morfológicos de las bacterias y las células, realizados mediante microscopía electrónica de barrido, permitieron demostrar cambios en la superficie del clon T3 así como alteraciones en la superficie de las células HeLa durante los eventos estudiados. Las evidencias preliminares sugieren la participación de una estructura tipo fimbria en la adhesión resistente a la inhibición por manosa. La microscopía electrónica de transmisión permitió visualizar y demostrar la invasión de las células HeLa por el clon T3.

Financiamiento proyecto FONDECYT 398-88.

ESTIMULACION POR Ca^{+2} DE LA HIDROLISIS DE GTP INTERCAMBIABLE EN LA TUBULINA. (Hydrolysis stimulation by calcium of the exchangeable GTP in tubulin). *Soto, C., De la Cerda, M. y Monasterio, O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La tubulina un heterodímero de masa molecular 110 kDa, posee dos sitios para GTP, uno de los cuales intercambia el nucleótido (sitio E). Durante la polimerización el GTP intercambiable se hidroliza liberando Pi. La colchicina que inhibe la polimerización, induce la hidrólisis de este nucleótido.

Para investigar si el mecanismo de inhibición de la polimerización por Ca^{+2} esta relacionado con la hidrólisis de GTP en el sitio E, se midió la velocidad de liberación de Pi en una solución de tubulina en ausencia y en presencia de calcio, utilizando como sustrato (γ-P^{32})-GTP. La tubulina de cerebro de pollo se purificó por el método de Weisenberg (Weisenberg, R.C., y Timasheff, S.N. (1970) Biochemistry 9, 4110-4116) y se filtró a través de Sephacryl S-300 para eliminar agregados. La velocidad de hidrólisis de GTP en ausencia y presencia de Ca^{+2} 2 mM fue de 0,18 $\pm$ 0,03 nmoles y 0,46 $\pm$ 0,01 nmoles de GTP/mg de tubulina/min, respectivamente. El incremento de 2,56 veces en la velocidad de hidrólisis producido por Ca^{+2} fue directamente proporcional a la concentración del metal entre 0,2 mM y 4,0 mM, lo cual a su vez se correlaciona con las concentraciones donde el Ca^{+2} inhibe la polimerización de tubulina. Controles con metales monovalentes y con Mg^{+2} a las mismas concentraciones de Ca^{+2}, no presentaron ningún efecto sobre la actividad GTPásica. Los resultados indican que el ión Ca^{+2} estimula la actividad GTPásica de la proteína en solución. Este efecto podría estar relacionado con el mecanismo de inhibición de la polimerización por Ca^{+2}, pues para que se formen microtúbulos es imprescindible la presencia de GTP en el sitio E de la tubulina.

Financiado por proyectos FONDECYT 1133-89 y DTI.
*Becario Fundación Andes.

FOSFOFRUCTOQUINASAS DE E. coli CON PROPIEDADES CINETICAS DIFERENTES NO MUESTRAN EL MISMO GRADO DE CICLO DE SUSTRATOS. (E. coli phosphofructokinases with different kinetic properties do not show the same rate of substrate cycle). Torres, J.C. y Babul, J. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La fosfofructoquinasa (Pfk) y la fructosa bisfosfatasa (Fbp) catalizan reacciones opuestas de la vía glicolítica y gluconeogénica y se ha postulado que su acción es regulada por varios efectores de modo que no se produzca un ciclo de sustratos y que el flujo neto de metabolitos ocurra en el sentido requerido. En este trabajo se estudia el control de estas enzimas de E. coli utilizando un modelo in vitro con fosfofructoquinasas que poseen propiedades cinéticas diferentes. Pfk-1 presenta una función de saturación sigmoidea con respecto a fructosa-6-P, es inhibida por P-enolpiruvato y activada por ADP. Pfk-2 y su versión mutada, Pfk-2*, presentan una función hiperbólica y no son afectadas por esos compuestos. Debido a una mutación estructural, Pfk-2* no es inhibida por ATP y cepas que contienen esta enzima crecen muy lentamente en fuentes de carbono gluconeogénicas.

En el modelo in vitro se acopló el ensayo de Pfk y Fbp usando sistemas de enzimas auxiliares que reducen NAD u oxidan NADH, de modo que la absorbancia a 340 nm indique el balance entre la actividad de Pfk y Fbp.

Al usar condiciones iniciales que simulan las del crecimiento en condiciones gluconeogénicas, la tasa de ciclo de sustratos más baja fue la del par Pfk-1/Fbp, mientras que la de Pfk-2*/Fbp fue la más alta, siendo intermedia la de Pfk-2/Fpb. Estos resultados se pueden explicar por la inhibición de Pfk-1 por P-enolpiruvato y de Pfk-2 por ATP. Debido a que Pfk-2* no es inhibida por ATP, se produce un ciclo fútil que determina el lento crecimiento de las cepas que contienen a esta enzima. Las predicciones de este modelo se someterán a prueba mediante mediciones in vivo.

Financiado por Fondecyt, Proyecto 1120-89.

LA INHIBICION DE LA SULFATACION AFECTA LA MOVILIDAD DE LARVAS VELIGERAS DE C. concholepas.
(Inhibition of sulfation affects the mobility of C. concholepas veligers larvae). Urrea, R. y Brandan, E. Unidad Neurobiología Molecular, Departamento Biología Celular y Molecular, Fac. Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Se ha demostrado que las moléculas sulfatadas son de gran importancia en el desarrolo de invertebrados marinos. Recientemente hemos demostrado que tanto la movilidad de larvas veligeres de Concholepas concholepas como el grado de sulfatación de macromoléculas dependen de la concentración de sulfato en el agua de mar. Para estudiar la especificidad del efecto del sulfato, hemos usado un inhibidor especifico de la sulfatación, clorato y evaluado su efecto a nivel de sulfatación y movilidad larval.

El clorato a una concentración 10 mM inhibió en un 80% la incorporación de sulfato a macromoléculas precipitables por TCA, mientras que la incorporación de metionina y fosforo a proteinas no se afectó en más de un 10%. La inhibición de la sulfatación presenta un tiempo medio de 20 minutos, sugiriendo que el pool intracelular de PAPS, la molécula donante de sulfato es muy pequeño. El clorato además de inhibir la sulfatación, afectó fuertemente la movilidad de las larvas. Ambos fenómenos resultaron ser reversibles. El análisis de los proteoglicanes sulfatados en columnas de intercambio iónico, reveló que aquellos provenientes de larvas incubadas con clorato presentan un grado menor de sulfatación en comparación a los controles.

Estos resultados sugieren que la sulfatación está directamente involucrada con la movilidad de las larvas y probablemente es de vital importancia para el desarrolo de estos organismos. Actualmente estamos determinando el tipo de molécula (s) sulfatadas que participaria en este fenómeno.

Financiado por IFS 1407/1 y FONDECYT 3502/89.

ACTIVIDAD ATPásica-ADPásica DE UTERO DE RATA. (ATPase-ADPase activity of rat uterus). Valenzuela, M.A., Collados, L., Lara, H., Kettlun, A.M., Mancilla, M. y Traverso-Cori, A. Depto. Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas. Univ. de Chile.

Hemos demostrado la existencia de apirasa, ligada a membranas, en útero de rata, cuyos niveles disminuyen durante la preñez. Entre las funciones propuestas están su participación en la coagulación (actividad ADPásica) y de glicosilación de proteínas (actividad NDPásica).

Este trabajo tiene dos objetivos : correlacionar su localización con estas funciones y su posible regulación. El primero se llevó a cabo con un fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa. En éste se encontró que el 80% de la actividad ATPásica-ADPásica está asociada a retículo endoplásmico, un 16% a membrana plasmática y sólo un 4% al aparato de Golgi.

Para el segundo objetivo se siguió la actividad apirásica en ratas durante el ciclo estral y además en ratas implantadas con dosis de estradiol equivalente al proestro(7 días). Durante el ciclo estral no hubo diferencias significativas de la actividad apirásica en los homogeneizados de útero, sin embargo, en las ratas implantadas con estradiol se observó un aumento de un 30% de dicha actividad. En estas condiciones el aumento total de proteínas fue de sólo un 5%.

La distribución subcelular de la apirasa en el útero concuerda con sus dos funciones propuestas. El efecto de estradiol confirma el posible control hormonal de esta enzima según las condiciones fisiológicas del tejido.

Financiado por Proyecto FONDECYT 90-1006

CONCENTRACIONES DE HIDROCARBUROS POLICICLICOS AROMATICOS QUE CONTAMINAN EL AIRE DE SANTIAGO.
(Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in the air particulate material of Santiago).

Vásquez, H. y Gil, L.
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Es reconocido el hecho que un alto porcentaje de cáncer en humanos, está relacionado con la exposición a compuestos químicos. Dentro de estos compuestos, los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs), que se encuentran presentes en partículas contaminantes del aire de las ciudades, son metabolizados por el sistema P-450 de oxidasas de función mixta. Con el objeto de estudiar los efectos metabólicos de los HPAs que contaminan Santiago, se analizáron muestras diarias del aire de varias zonas del centro.

Por HPLC se identificó y cuantificó los HPAs presentes en los extractos orgánicos de partículas que se recogieron en filtros de fibra de vidrio, a través de los cuales pasó alrededor de 2000 m^3 de aire.

La mayoría de las muestras contiene Benzo(a)pireno, benzoantraceno, benzo(b)fluoranteno, dibenzoantraceno, benzo(k)fluoranteno y criseno. Todos los cuales son potentes cancerígenos. Las concentraciones de estos compuestos varía ampliamente en los distintos días. Esto podría deberse a una serie de factores cambiantes tales como: temperatura y humedad ambiental, precipitaciones, vientos, etc.

Estos resultados experimentales se discuten con respecto a algunos de los parámetros mencionados.

Financiado por FONDECYT, Proyecto 0863.

EVIDENCIAS A FAVOR DE AUSENCIA DE METILACION EN EL DNA KINETOPLASTIDICO DE T. CRUZI. (Evidence in favor of the absence of methylation of the kinetoplast DNA in T. cruzi).

Venegas, J., Muñoz, S. y Solari, A. Depto. Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La metilación del DNA ha sido descrita en un amplio rango de tipos celulares. Estudios en algunos sistemas nucleares eucarióticos, han evidenciado una clara correlación entre metilación del DNA y regulación de la expresión génica.

Algunas investigaciones realizadas en protozoos estrechamente relacionados a T. cruzi (T. brucei y T. equiperdum) han revelado la existencia de metilación en regiones específicas del DNA cromosomal. Sin embargo, no se entrega información sobre lo que sucede con el DNA mitocondrial o DNA kinetoplastídico (kDNA) en estas especies de parásitos.

Con el objeto de estudiar el estado de metilación del kDNA de T. cruzi se procedió a analizar 8 muestras de kDNA purificado de parásitos que cubren un gran espectro de poblaciones de T. cruzi. Cada kDNA fué sometido a digestion con dos pares de enzimas de restricción o isoesquisomeros (reconocen la misma secuencia aunque una de ellas corta a pesar de estar presente una base metilada). Para tal objeto se uso los pares Mbo I-Sau 3a y el par MspI-HpaII, que permiten la detección de metilación en la base adenina (secuencia GATC) y citocina (CCGG) respectivamente.

El análisis de los kDNA mostró que no se observaron diferencias entre los perfiles de restricción de los kDNA obtenidos con cada par de isoesquisomeros. Por lo tanto, estos resultados sugieren fuertemente la ausencia de metilación en el DNA mitocondrial de T. cruzi.

REGULACION DEL GEN DE CADENA LIVIANA DE LA MIOSINA CARDIACA DE POLLO POR EL ONCOGEN c-fos. (c-fos Regulation of the chicken cardiac myosin light chain gene)

Zárraga, A.M., Mascareño, E.*, Martin, M.E.* y Siddiqui, M.A.Q.* Instituto de Bioquimica, Fac. de Ciencias, Universidad Austral, Valdivia. *Anatomy and Cell Biology Department, SUNY-HSC, BROOKLYN, N.Y., USA.

La diferenciación de las células musculares cardíacas de pollo constituye un sistema muy ventajoso para el estudio de inducción de genes embrionarios. En etapas tempranas del desarrollo, 24 horas después del inicio de la segmentación del huevo, las células presuntivas cardiacas ya están programadas para diferenciarse a mioblastos cardiacos, aún cuando fenotipicamente son indistinguibles respecto al resto de las células. Hemos aislado y determinado la secuencia del gen de la cadena liviana fosforilable de la miosina, MLC2. Su promotor fue identificado por mapeo con nucleasa S1, extensión de oligonucleotido con transcriptasa inversa y ensayos de expresión transientes en cultivos primarios y establecidos de células cardiacas. Análisis computacional de la secuencia nucleotidica de la región 5'-nocodificante indica la presencia de elementos CAT y TATA y de secuencias conservadas que son reconocidas por proteinas reguladoras de transcripción tales como hsp 70, SP1 y AP-1 entre otras. El proto-oncogen *c-fos* codifica para proteinas que forman un complejo que regula transcripción en promotores que contienen secuencias reconocidas por AP-1. Por tanto, a objeto de determinar si la oncoproteina *c-fos* ejerce alguna actividad reguladora sobre la expresión del gen para MLC2, hemos hecho cotransfecciones de células cardiacas en cultivo primario con los plasmidios que expresan cloranfenicol acetil transferasa (CAT) controlada por el promotor de MLC2, la proteina *c-fos* controlada por su mismo promotor y luciferasa regulada por el promotor de SV40. La sobreproducción de la oncoproteina se determinó por ensayos de Western revelados con anticuerpos monoclonales anti-*c-fos* marcados con ^{125}I. Los resultados indican que el producto de *c-fos* interactuaria con la región 5' del gen MLC2 inhibiendo su actividad promotora y por tanto bloqueando la producción de CAT. Se discute la probable implicancia de oncogenes en procesos de diferenciación celular.

SIMPOSIO INTERNACIONAL

Chairman: Dr. Arturo Yudelevich

INITIATION OF TRANSCRIPTION AT CLASS II PROMOTERS

Danny Reinberg. Department of Biochemistry, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Robert Wood Johnson Medical School. Piscataway, New Jersey.

The mechanisms operating to regulate initiation of transcription are complex. Two kind of elements, general (TATA and initiator motifs) and variable, constitute and regulate activity of a defined promoter. Six different factors (TFIIA, -IIB, -IID, IIE, -IIF and -IIG) in addition to RNA polymerase II operate via the TATA and initiator motifs. The roles that each of these factors play during transcription will be discussed.

CELLULAR TRANSCRIPTION FACTORS INTERACT WITH IMMOBILIZED ADENOVIRUS E1A.

Kathleen A. Maguire, Xiao-Ping Shi, Martin Rosenberg, Jay Rappaport, and Roberto Weinmann. The Wistar Institute, Philadelphia, PA 19104-4268, USA.

The mechanism of adenovirus E1A-mediated trans-activation of viral promoters is not yet understood. One of the suggested models predicts that the E1A protein interacts and somehow alters cellular transcription factor activity resulting in promoter activation. We have studied the interaction between bacterially produced E1A linked to Sepharose and various DNA binding proteins present in HeLa cell extracts. Nuclear extract incubated with immobilized E1A was assayed for transcriptional and DNA binding activity. RNA polymerase II-directed transcription was reduced in the unbound fraction while RNA polymerase III-directed transcription continued unabated. DNA binding activities and cross-reactive polypeptides corresponding to an activating transcription factor/cAMP-responsive element and an activator protein 1/Jun transcription factor were bound to the E1A column. In contrast, NF1 and AP2 DNA binding activities were not retained by E1A. Finally, *in vitro* translated Jun and retinoblastoma proteins were shown to interact with the immobilized E1A The results presented here demonstrate that immobilized E1A sequesters cellular transcription factors. The role of these interactions in the mechanism of E1A-mediated trans-activation and repression is discussed.