

Resúmenes

**XXVI REUNIÓN ANUAL DE LA
SOCIEDAD DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR DE CHILE**

23-26 de Septiembre de 2003

Valle Dorado,
Villa Alemana, Chile

DIRECTORIO:

PRESIDENTA :	Luz María Pérez R.
PRESIDENTA ANTERIOR :	Pilar Carvallo de S.Q.
VICE PRESIDENTE :	Claudio Vásquez G.
SECRETARIA :	María Estela Andrés C.
TESORERA :	Victoria Guixé L.
DIRECTORES	
Santiago :	Patricio Arce
	Ma Antonieta Valenzuela
Concepción :	Marta Bunster
Valdivia :	Gloria León

AUSPICIADORES

INSTITUTO MILENIO DE ESTUDIOS AVANZADOS EN BIOLOGÍA CELULAR Y
BIOTECNOLOGÍA (CBB)

PABMB

CÁMARA DE LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA DE CHILE A.G. (CIF)

BIOS CHILE I.G.S.A.

FERMELO S.A.

GENESYS

SUDELAB

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Conferencias

CONFERENCIA SEVERO OCHOA

RECONOCIMIENTO MOLECULAR ENTRE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ELECTRONES. (Molecular recognition between electron-transporting proteins). **Gómez-Moreno C.** Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza.

Muchos de los procesos que ocurren en las células tienen lugar mediante la interacción de unas proteínas con otras. Es el caso de las reacciones de transporte de electrones que tienen lugar en la fotosíntesis, pero también en la respiración y en otras muchas reacciones de transferencia de electrones. En dichas reacciones las proteínas forman complejos de vida corta a través de los cuales se produce la reacción de transferencia de electrones desde una proteína a la otra. Dicho complejo permite que la reacción tenga lugar de una manera rápida y eficaz. Los mecanismos que hacen que una proteína cargada con uno (o dos) electrones reconozca a su pareja, a la que tiene que transferírseles, no se conocen y han sido objeto de estudio de nuestro grupo durante los últimos años.

Se ha escogido para nuestro estudio la enzima Ferredoxina NADP⁺ reductasa (FNR) de la cianobacteria *Anabaena*, que recibe electrones procedentes del Fotosistema I a través de la Ferredoxina (Fd). La Flavodoxina (Fld) sustituye a la Fd en esta reacción cuando la célula no dispone de hierro en el medio de cultivo para sintetizar la ferroproteína. Por este motivo también es capaz de interactuar con la FNR intercambiando electrones. Se dispone, pues, de un sistema donde una proteína (la FNR) reconoce a otras dos que son muy diferentes en tamaño, forma y naturaleza del grupo redox (la Fd y la Fld), pero que llevan a cabo la misma reacción. Constituyen, pues, un modelo muy útil para el estudio de los determinantes moleculares del reconocimiento molecular.

Mediante la construcción de mutantes específicos y el detallado estudio cinético de las reacciones que catalizan, hemos podido establecer como se produce el mecanismo de reconocimiento entre proteínas.

CONFERENCIA OSVALDO CORI

HISTORIA Y ACTUALIDAD DE LA PRODUCCIÓN DE FITOHORMONAS DITERPÉNICAS: EL HONGO *Gibberella fujikuroi*. (History and present of diterpene phytohormone production by *Gibberella fujikuroi*). **¹Rojas M.C., ²Tudzynski B. y ³Hedden P.** ¹Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. ²Instituto de Botánica, Universidad de Münster, Alemania. ³Rothamstead Research, Harpenden, UK.

Además de ser fitohormonas, las giberelinas (GAs) son producidas por algunos hongos. De hecho fueron descubiertas en el hongo *Gibberella fujikuroi*, productor de ácido giberélico (GA₃) y de otras giberelinas comerciales de interés agronómico. El sistema fúngico tuvo un rol decisivo en la historia de las GAs y la secuencia biosintética se dilucidó primero en este sistema que en las plantas, sin embargo la caracterización molecular no progresó significativamente hasta el descubrimiento reciente de los genes. Siete genes, que codifican para las enzimas responsables de las 15 etapas de la síntesis de GA₃, forman un "cluster" en el cromosoma IV de *Gibberella fujikuroi*. Cuatro corresponden a monooxigenasas dependientes del citocromo P450. En nuestro laboratorio hemos caracterizado la función de las enzimas codificadas por cada uno de los genes de la síntesis de giberelinas, tanto por disrupción génica como expresando los genes individuales en mutantes que carecen del "cluster". Para las 7 etapas iniciales, se requieren dos enzimas: P450-4 (*ent*-kaureno oxidasa) y P450-1 (GA₁₄ sintetasa). Ésta última presenta una versatilidad única ya que oxida varios centros carbonados en reacciones asociadas a distintas proteínas transportadoras de electrones. Las etapas finales, de remoción del carbono 20 y de hidroxilación en C13 son catalizadas por las monooxigenasas P450-2 y P450-3. Encontramos en *Gibberella fujikuroi* importantes diferencias con la biosíntesis de giberelinas en plantas, tanto a nivel químico, como bioquímico y genético. Esto indica que ambos sistemas han adquirido la capacidad de sintetizar giberelinas en forma independiente. Trabajo financiado por FONDECYT (1020140) y por el programa de cooperación internacional CONICYT/DAAD

CONFERENCIA

MODELADO ESTRUCTURAL DE GENES, GENOMAS Y COMPLEJOS (Comparative Protein Structure Modeling of Gene, Genomes and Assemblies) **Marti-Renom M.A.** University of California, San Francisco, U.S.A.

Structural genomics aims to determine or accurately predict 3D structure of most proteins. This aim is being achieved by a focused, large-scale determination of protein structures by X-ray crystallography and NMR spectroscopy, combined efficiently with accurate protein structure prediction. Comparative protein structure modeling will be discussed in this context. To allow large-scale modeling, we automated fold assignment, sequence-structure alignment, comparative model building, and model evaluation. These steps were implemented mostly in our MODELLER package, which is available on the web at <http://salilab.org>. The modeling pipeline has been applied to all of the approximately 730,000 protein sequences in the TrEMBL database, resulting in models for segments of approximately 330,000 proteins. These models are stored in the ModBase database, accessible over the web at <http://salilab.org/modbase>. In this context, several examples of how comparative modeling can be useful in the biological analysis of individual proteins as well as whole genomes will be described including an approach that combines comparative protein structure modeling of assembly subunits with their docking into low resolution electron density maps obtained by electron microscopy and its application to the yeast and *E. coli* ribosomes.

CONFERENCIA PABMB

***Trypanosoma cruzi*: TWO SPECIES OF THE SAME PARASITE?** **Zingales B.** Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo - Av. Professor Lineu Prestes, 748 CEP 05508-900 - São Paulo, Brasil - zingales@iq.usp.br

The protozoan *Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas disease, which affects 16-18 million people in South and Central America. *T. cruzi* is diploid, its mode of replication is predominantly asexual and therefore its strains represent independent clonal lineages. These clonal populations were shown to be divergent for various biological properties. In addition, the diversity of symptoms of Chagas disease: indeterminate, cardiac and digestive forms have been attributed to the interplay between the genetic characteristics of the parasite and the human host. A challenge in this field has been to find molecular markers of *T. cruzi* that could be correlated with the epidemiology of Chagas disease. In the last years, our laboratory has provided evidence based on independent DNA markers such as ribosomal RNA (rRNA) and mini-exon genes (Souto *et al.* 1996) and phylogenies of the 18S rRNA gene (Kawashita *et al.* 2001) indicating that *T. cruzi* clonal genotypes cluster into two major lineages, that were named as *T. cruzi* I and *T. cruzi* II. Epidemiological studies showed that *T. cruzi* I strains circulate in the sylvatic cycle, whereas *T. cruzi* II strains are related to the domestic cycle and have been isolated mainly from human chronic infections (Zingales *et al.* 1998; Breniere *et al.* 1998; Solari *et al.* 2001). Recently, our group and others have shown that hybrid genotypes occur in natural populations of *T. cruzi* II. We have been approaching the identification of molecular markers of *T. cruzi* isolates that may be correlated with the development of cardiac and indeterminate forms by DNA microarray technology. These putative markers could be used for the prediction or prognosis of Chagas disease manifestations. In addition, we are characterizing the molecular karyotype of *T. cruzi* aiming to infer genetic distances between parasite groups, based on chromosome size polymorphism, gene linkage groups and distribution of repetitive DNA sequences.
Support: FAPESP and CNPq.

Simposios

SIMPOSIO I

“Mecanismos Alternativos Potencialmente Vinculados Al Control De La División Celular”

Coordinadora:

Dra. María Imschenetzky

ROL DE UNA CISTEIN-PROTEASA EN EL CICLO CELULAR INICIAL POST-FECUNDACIÓN. (Role of a cysteine protease in the initial cell cycle post-fertilization.) **Imschenetzky M.**, Concha C., Morín V., Genevière* A.M. y Puchi M. Departamento de Biología Molecular, Universidad de Concepción, Chile y Laboratorio ARAGO, Universidad de Paris VI, Francia*.

Hemos identificado una cistein proteasa en cigotos de erizos de mar. Esta enzima esta presente en forma inactiva en óvulos, se activa post-fecundación y degrada selectivamente las histonas espermáticas (SpH) sin afectar las variantes de histonas de tipo materno (CS). Se determinó que esta enzima se localiza en núcleos tanto óvulos como en cigotos. Persiste en el núcleo durante la fase S del primer ciclo celular y colocaliza con el huso durante la primera mitosis. La inhibición de esta enzima por incubación de cigotos con E-64d, impide la normal proteólisis de SpH; inhibe la primera fase S y altera notablemente la primera mitosis, observándose focos multipolares de segregación cromosomal. Los efectos deletéreos de E-64 sobre el inicio y progreso de la primera onda de replicación de ADN no fueron observados en óvulos activados con ionóforo para Ca (II) A 23187, lo cual indica que E-64 d no tiene efecto directo sobre los mecanismos que gatillan tanto el ingreso a la primera fase S como su progreso. Paralelamente se determinó que la inhibición de la primera fase S por E 64d no altera la localización intracelular de ciclinas A y E, ni de la kinasa dependiente de ciclina Cdk2. En base a este conjunto de resultados se concluyó que los parámetros de control de fase S no son afectados por E-64d. En este escenario la persistencia de SpH post-fusión de ambos pronúcleos emerge como efecto fundamental del tratamiento de los cigotos con E-64d. Consecuentemente, postulamos que la degradación de SpH por esta cistein-proteasa es un requisito fundamental para un primer ciclo celular exitoso post-fecundación. GRANTS: FONDECYT: 1011703 y Proyecto ECOS Francia/CONICYT Chile.

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF A NEW SUBFAMILY OF HIGH MOLECULAR MASS CDC2-LIKE KINASES. Even Y., Durieux S., Géraud M. L., Lozano J.C., Peaucellier G., **Genevière A.M.** Laboratoire Arago, CNRS UMR7628/Université Paris VI, BP44, 66650 Banyuls-sur-Mer, France.

Cyclin-dependent kinases (Cdks) are protein kinases characterised by a conserved PSTAIRE or PSTAIRE-derived motif, CDC2 (Cdk1) being the most famous one. Their activity is regulated in part by the association of a cyclin partner that acts as a positive effector. Cdks are key regulators of cell proliferation: they drive the cell cycle transitions but also control gene expression through a direct regulation of RNA polymerase II (RNAPII) transcriptional activity. These kinases and their associated cyclins are molecular targets for novel anticancer drug discovery.

Recent results obtained in our laboratory, associated to genomic data have put in evidence a new subgroup of CDC2-like kinases (CDC2LK). A first cDNA was identified in sea urchin, *Sg-CDC2L5*, and the ortholog was cloned in human: *Hs-CDC2L5* (Marquès et al., 2000). Four more members of this subgroup are found in data banks, in *Caenorhabditis*, *Drosophila*, *M. sativa* as well as a second human gene: CRKRS. A phylogenetic analysis assemble these genes together in a clade close to the Cdk 9 containing one (Liu and Kipreos, 2000). The proteins display a conserved PITAI/VRE motif. This kinase subgroup is of particular interest because it includes unconventional CDC2LK of very high molecular mass in which the central kinase domain, highly similar to the Cdks, is surrounded by large sequences displaying conserved motifs encountered in proteins involved in transcription or RNA processing. The close structural relationship of these CDC2LK with Cdk9, the presence of SR motif in their aa-sequence as well as the colocalisation of CRKRS with splicing factor (Ko et al., 2001) argue in favour of a transcriptional/RNA splicing regulatory function.

CDC2L5 mRNAs are present in sea urchin during all the early development and the protein, localized in the nucleus, is expressed at least until gastrula. Human mRNAs are ubiquitously expressed in all the tissues we tested with a particular abundance in liver and placenta. The endogenous human protein is present in the nucleus of HEH 293, HeLa or U2 OS cells, a result is in agreement with the presence of a potential bipartite-NLS in the N-terminus of the protein. The cellular function of CDC2L5 in cell cycle, gene transcription and mRNA maturation on both models, sea urchin development and human somatic cells, will be discussed.

THE ROLE OF CENTROSOMES IN TUMORIGENESIS.

Doxsey S. Program in Molecular Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts 01605.

Centrosomes contribute to spindle organization, mitotic chromosome segregation and cellular architecture. We demonstrated that centrosomes are abnormal in nearly all human malignant tumors and that the centrosome protein pericentrin is elevated in these tumors. We showed that centrosome defects are present in early stage cancers, that they become more severe during tumor progression and that they correlate with increased genetic instability. More recently we showed that a proportion of precancerous lesions of the breast (DCIS), cervix (SIL) and prostate (PIN) had abnormal centrosomes (24-52%) and that these same lesions had chromosome instability. We have also investigated the molecular basis of centrosome defects. We have induced centrosome defects and increased centrosome numbers in cultured cells through the manipulation of centrosome protein levels. Elevated pericentrin levels induced centrosome defects and caused or exacerbated cancer-like features including cell proliferation, growth in soft agar, genetic instability, changes in cell and nuclear morphology and abrogation of the mitotic checkpoint. Mutant pericentrin constructs lacking certain domains did not induce centrosome defects or the tumor phenotype. We also altered the levels of another essential centrosome protein called centriolin. Overexpression or siRNA-induced silencing of this protein in cultured cells caused cytokinesis failure and generated aneuploid cells with supernumerary centrosomes. These cells ultimately arrest in G1. This arrest is p53-dependent and relies on input from certain signal transduction pathways involved in cellular stress that localize to centrosomes following centrosome dysfunction. These studies demonstrate that the centrosome proteins pericentrin and centriolin are important for centrosome integrity, cell cycle progression and genetic stability. In our current model, altered centrosome protein levels cause centrosome defects and abrogation of cell cycle checkpoints that contribute to tumorigenesis through the induction of genetic and cellular changes. We propose that centrosome defects could act as epigenetic modifiers of the genome and together with genetic mutations, provide a powerful driving force for increased genetic instability. This condition could accelerate accumulation of alleles carrying pro-oncogenic mutations and loss of alleles containing wild-type tumor suppressor genes, features characteristic of the most prevalent human cancers.

A FAMILY OF MITOCHONDRIAL CHIMERIC RNAS AND CELL PROLIFERATION.

Burzio L.O., Burzio V., Villegas J., Villota C., Santander M. and Martínez R. Bios Chile I.G.S.A., Fundación Ciencia para la Vida, Millennium Institute MIFAB, Avenida Marathon 1943, and Department of Biological Sciences, Universidad Nacional Andrés Bello, Republica 252, Santiago, Chile.

Normal human proliferating cells over-express a chimeric mitochondrial RNA (sense chRNA) consisting of a long inverted repeat (~700 nt) joined to the 5' end of the 16S mitochondrial rRNA. In normal cells (testis, spleen, small intestine, foreskin keratinocytes, endothelial cells, lymphocytes stimulated with PHA), an antisense RNA is also expressed (antisense chRNA). This non-coding RNA contains an inverted repeat of 187 to 365 nt bound to the transcript of the L-strand of the mtDNA. These transcripts are not expressed in non-proliferating cells. On the other hand, tumor cells (HeLa, SiHa, HL-60, Hep-G2, B cell lymphoma, melanoma and myeloma) or tumor cells in human biopsies (mammary, uterine, prostate, colon, lymphoma, etc.) over-express the sense chRNA but the antisense transcript is down-regulated. These results suggest a new method to differentiate normal proliferating cells from tumor cells. Depending on the cell type and besides mitochondria, these transcripts are localized in the cytoplasm, the nucleus or in the nucleolus. The synthesis of these transcripts occurs in the mitochondria but they are neither codified by the mtDNA nor by a pseudogene. The current hypothesis is that the synthesis is the result of a transplicing-like mechanism. Interference with the putative function of these RNAs by using antisense oligonucleotides induces a fast and effective apoptosis. If the interference is targeted to the antisense chRNA, only tumor cells undergo apoptosis but not normal proliferating cells or resting cells (Grants DI-0207 and DI-0202, Universidad Andres Bello, Chile).

SIMPOSIO II

Expresión Génica En Plantas En Respuesta A Factores Bióticos Y Abióticos

Coordinador:
Dr. Patricio Arce

SEÑALES DE TRANSDUCCIÓN EN RESPUESTA AL STRESS Y AL ACIDO ABSICICO. NUEVOS COMPONENTES DE LA VIA. (Abscisic acid signal transduction and stress responses; new pathways components). **Sánchez J.P.** Plant Molecular Biology, Rockefeller University, Box 162, 1230 NY10021 USA.

The plant hormone abscisic acid (ABA) is involved in the regulation of many aspects of plant growth and development. ABA also plays an important role in stress response. It has been shown to regulate the expression of numerous genes that are also regulated under stress conditions such as heat shock, low temperature, high salinity and drought. In order to understand the signal transduction that links ABA perception to the regulation of gene expression regulation and seed maturation, we have profiled the expression of ABA-responsive genes using microarray analysis (Affymetrix ATH1 chip, 24000 genes) to determine new components of the ABA signal response pathway and its relation to the stress response. These results may help us to understand the essential components that regulate the expression of the ABA- and stress-responsive genes and thereby develop applications to protect plants against low temperatures, high salinity and drought.

EXPRESIÓN DE LOS GENES NUCLEARES QUE CODIFICAN PARA EL COMPLEJO II DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL EN *Arabidopsis thaliana* (Expression of the nuclear genes encoding mitochondrial respiratory complex II in *Arabidopsis thaliana*) Elorza A., Gómez I., Roschztardt H., **Jordana X.** Depto de Genética Molecular y Microbiología, Fac Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile, Santiago

El complejo II (succinato deshidrogenasa) es el más simple de la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Contiene cuatro subunidades: una flavoproteína (SDH1), una proteína hierro-azufre (SDH2) y dos subunidades que lo anclan a la membrana (SDH3 y SDH4). Hemos demostrado que en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* las cuatro subunidades están codificadas en el genoma nuclear, tres de ellas por más de un gen.

En este trabajo se ha estudiado la expresión de los tres genes *SDH2*. Se ha confirmado por hibridación in situ que *SDH2-1* y *SDH2-2* se expresan fuertemente en tejidos florales, lo que puede estar relacionado con el hecho de que la esporogénesis en anteras es uno de los procesos que más energía requiere en plantas. Se ha determinado por diferentes métodos (hibridación por el método de Northern, RT-PCR, fusiones de promotores con GUS) que el gen *SDH2-3* se expresa en el embrión durante el desarrollo de las semillas, que los niveles de su mRNA son altos en semillas maduras y que decaen durante la germinación. Por el contrario, los niveles de mRNAs de *SDH2-1* y *SDH2-2* son bajos en semillas maduras y aumentan durante la germinación, lo que es consistente con el hecho de que la conversión de lípidos de reserva en azúcares requiere de la actividad del complejo II. Estos resultados muestran que los genes que codifican para la misma subunidad de un complejo de la cadena respiratoria se expresan en forma diferencial según el tejido y la etapa del desarrollo. Ello sugiere un papel fisiológico de esta expresión diferencial.

Financiado por Fondecyt 1020930 y 2000073 y PICS 2179

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL RETROTRANSPÓSÓN *TLCl.1* DURANTE EL DESARROLLO Y BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TABACO. (Analysis of the *TLCl.1* retrotransposon expression during development and under stress conditions. in tobacco transgenic plants). **Ruiz-Lara S.**, Salazar M., Verdugo I. y Cordero C. Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca, Talca, Chile.

Los retrotransposones LTRs corresponden a elementos genéticos móviles que están ampliamente distribuidos en vegetales. Este tipo de retroelemento presenta en sus extremos 5' y 3', secuencias repetidas directas denominadas LTR (*long terminal repeat*). Los LTRs proveen las secuencias reguladoras *in cis* requeridas para la transcripción de un RNA intermediario de la transposición. Lo pocos retroelementos de plantas transcripcionalmente activos caracterizados hasta ahora, han mostrado que su expresión es inducida bajo condiciones de estrés abiótico, cultivo celular o ataque de patógenos.

El retrotransposón *TLCl.1* es un elemento activo aislado del tomate silvestre *Lycopersicon chilense*. El análisis de su LTR ha permitido aislar una secuencia promotora que contiene los dominios estructurales que previamente han sido identificados como elementos de respuesta a etileno y a ácido salicílico. Tales dominios, parecen ser las señales regulatorias responsables de la expresión del retrotransposón durante el desarrollo de la planta y frente a diferentes condiciones de estrés biótico y abiótico. La desarrollo de etileno o ácido jasmónico. Del mismo modo, ha sido posible estudiar cuales son las moléculas señales involucradas en la respuesta de defensa de la planta ante la infección de diferentes patógenos.

Financiamiento: Programa de Investigación DIAT-UTALCA. Centro de Investigaciones en Biotecnología Silvoagrícola.

RESPUESTA EN PLANTAS A LA INFECCIÓN VIRAL (Plant response to viral infection). Ehrenfeld, N., Stange, C., Serrano, C., Cañón, P., Matus, T., Medina, C., **Arce-Johnson, P.** Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Las plantas están expuestas al ataque de diversos patógenos entre los cuales los virus son los más abundantes. El establecimiento y desarrollo de una infección requiere de la interacción entre factores del virus y de la planta hospedera.

Nosotros estamos estudiando diversos aspectos de la infección viral utilizando como modelos plantas de *Arabidopsis* y de Tabaco, y dos cepas del Virus de mosaico del tabaco: TMV-U1 y TMV-Cg.

Es sabido que en plantas resistentes, el virus es inicialmente reconocido por el producto de un gen de resistencia desencadenando una respuesta de defensa local conocida como respuesta de hipersensibilidad (HR) que restringe el movimiento del patógeno al sitio de infección inicial. Nosotros hemos encontrado que las plantas sensibles a TMV (que no portan el gen de resistencia N), desarrollan una respuesta de tipo HR al ser infectadas con el virus TMV-Cg, sin embargo no son capaces de restringir el avance del patógeno. Esta respuesta se caracteriza por el depósito de callosa y muerte celular en el sitio de la infección. Adicionalmente hemos detectado un aumento en la expresión de proteínas relacionadas con patogénesis y de los transcritos de enzimas detoxificantes que son propias de la respuesta HR. Mediante la construcción de virus híbridos identificamos como elicitor de esta respuesta a la proteína de la cubierta del TMV-Cg. Mutaciones puntuales de esta proteína cambian el patrón de infección viral. Adicionalmente en las plantas sensibles hemos identificado y caracterizado un homólogo al gen de resistencia N.

Paralelamente, en estudios de movimiento viral en plantas de *Arabidopsis*, identificamos un ecotipo en que el movimiento sistémico de TMV-U1 se retrasa respecto al movimiento de este virus en otros ecotipos. Estudios histológicos nos hacen suponer que en estas plantas hay una restricción en la entrada del virus al sistema vascular y en el correcto ensamblaje de la partícula viral. Estos estudios contribuyen al conocimiento del tipo de interacciones que se establecen entre el virus y la planta durante la infección. Financiado por FONDEF G02S1001 y por becas CONICYT de apoyo a realización de tesis doctoral para NE y CS.

OXILIPINAS Y SU PAPEL EN EL METABOLISMO VEGETAL Y SU RESPUESTA A CONDICIONES DE ESTRÉS (Rol of oxipilinas in plant metabolism and responses to stress conditions). **Peña-Cortés H.** Centro de Biotecnología "D. Alkalay L." Universidad Técnica Federico Santa María. Valparaíso, Chile. hugo.pena@biotec.utfsm.cl

Los vegetales son organismos que constantemente están sometidos a la acción de diversas condiciones de estrés del medio ambiente, ya sea este de tipo biótico o abiótico, tales como: ataque por patógenos e insectos, deficiencia en los niveles nutricionales, disminución de la temperatura, exposición a la radiación ultravioleta (UV) y daño mecánico, entre otros. Las plantas han respondido a esta presión, desplegando una serie de mecanismos, que reconocen y contrarrestan estas situaciones adversas, tales como: i) la inducción de muerte celular programada; ii) el reforzamiento del tejido en el sitio de la infección; iii) producción de metabolitos antimicrobianos y iv) la activación de vías metabólicas determinadas, que modifican la expresión de diversos genes que participan en el proceso de defensa vegetal. La activación de una respuesta local en la zona directamente dañada es seguida por el establecimiento de una inmunidad secundaria a través de la planta, en las hojas vecinas al sitio del daño, lo que constituye la respuesta defensiva sistémica.

Los ácidos grasos y sus derivados pueden actuar en animales como mediadores intracelulares y señales extracelulares, las cuales controlan una serie de procesos durante la reproducción, la conducta social, el metabolismo, la defensa y la comunicación entre especies. De forma análoga, se ha demostrado que las moléculas derivadas del metabolismo oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados en plantas, denominadas oxilipinas, dan origen a un grupo de compuestos biológicamente activos, los cuales realizan una variedad de funciones durante el desarrollo y en la respuesta defensiva del vegetal frente a condiciones de estrés.

Las oxilipinas son metabolitos comunes en los organismos vegetales superiores y son derivados de los ácidos linoléico (18:3) y linoleico (18:2). Los productos finales de la vía de las oxilipinas juegan un papel importante en el mecanismo defensivo de las plantas así como en su desarrollo. Entre estos productos finales se encuentran algunos con propiedades organolépticas, antimicrobianas, formadores de los monómeros de la cutina y reguladores del crecimiento como la hormona reparadora del daño y el ácido jasmónico. La importancia de esta vía metabólica y su posible aplicación biotecnológica será discutida en la presentación.

SIMPOSIO III

“Utilización De Herramientas Computacionales En El Modelamiento De Proteínas”

Coordinador:
Dr. Jorge Babul

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DEL AGUA EN TORNO A PROTEÍNAS Y SU ROL EN LA INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA. (Water properties around proteins and its role in protein-protein interactions.). **González-Nilo, F. D.** Universidad Santiago de Chile, Facultad de Química y Biología, Departamento de Ciencias Químicas.

La formación y disociación de complejos proteicos es un evento fundamental en muchos procesos biológicos. Diversos estudios han demostrado que las características físico-químicas, que gobiernan la afinidad de unión y el proceso de reconocimiento molecular, están codificadas sobre la superficie de la proteína. Los métodos de complementariedad superficial han tenido un modesto éxito cuando los cálculos de predicción de estructura cuaternaria son realizados con las estructuras de las unidades proteicas cristalizadas como monómeros. En este trabajo se abordará la predicción de las zonas de contacto proteína-proteína a través del estudio teórico de las propiedades de las moléculas de aguas que rodean a una proteína aislada, estas propiedades son analizadas a partir de simulaciones de dinámica molecular y nos permite comprender como estas proteínas alteran las propiedades del agua. En específico, nuestros resultados demuestran que las regiones de contacto proteína-proteína poseen una baja solvatación local, esta propiedad disminuye el trabajo requerido para desolvatar esta región durante el proceso de acomplejación. Asimismo, también se observa solvatación local en las regiones aledañas a la zona de contacto, el solvente en estas regiones posee una baja difusión. La baja difusión del solvente podría guiar y facilitar la interacción entre las zonas de contacto específicas. Como resultado de este análisis se puede postular *a priori* la o las putativas zonas de contacto y, sobre la base de esta predicción, poder direccionar una eficiente búsqueda conformacional que permita predecir la estructura cuaternaria de complejos dimericos. Agradecimientos: F. ANDES C-13860, FONDECYT #1030760, DICYT 020141GN

PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS. (three-dimensional protein structure prediction), **Melo, F.** Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Ciencias Biológicas, Depto. Genética Molecular y Microbiología, Laboratorio de Bioinformática Molecular, Alameda 340, Santiago, Chile.

La secuencia primaria de una proteína determina su estructura en tridimensiones, y la estructura tridimensional determina su función. En la última década, gracias a los proyectos de secuenciación de genomas completos, cientos de miles de secuencias proteicas han sido determinadas. Por otra parte, sólo alrededor de 20.000 estructuras tridimensionales de proteínas han sido determinadas en el mismo período de tiempo gracias a un esfuerzo conjunto de múltiples laboratorios alrededor de todo el mundo. Esta enorme diferencia entre el número de secuencias y estructuras proteicas, la cual se debe principalmente a dificultades técnicas y los costos involucrados, ha fomentado el desarrollo de diversas técnicas computacionales para predecir la estructura tridimensional de una proteína a partir de su secuencia primaria a un bajo costo. Estos métodos, pese a presentar ciertas limitaciones y restricciones en su rango de aplicación, constituyen herramientas extremadamente útiles para el desarrollo de proyectos científicos y tecnológicos en el área biológica.

Basados en estos antecedentes, se hará una revisión de los distintos métodos existentes para la predicción de la estructura tridimensional de proteínas, su origen y contexto histórico, sus rangos de aplicación, sus limitaciones, y las futuras direcciones en esta área. También se discutirá el impacto y utilidad de estos desarrollos en el contexto de las áreas emergentes de genómica, transcriptómica, y proteómica. Finalmente, se hará referencia a los futuros desafíos en lo referente a la relación estructura/función en proteínas.

MODELAMIENTO POR HOMOLOGÍA Y SAXS PARA EL ESTUDIO DE CAMBIOS CONFORMACIONALES Y DE ESTRUCTURA CUATERNARIA EN LA FOSFOFRUCTOQUINASA-2 DE *E. coli*. (Homology modeling and SAXS for the study of conformational and quaternary structural changes in phosphofructokinase-2 from *E. coli*) **Cabrera, R.** Babul, J. y Guixé, V. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Un factor importante en la regulación de la actividad de las enzimas oligoméricas es el cambio en la disposición relativa de los dominios y las subunidades. En los casos en que esta disposición se extrapola desde las estructuras obtenidas por modelamiento por homología, es conveniente usar técnicas sensibles a cambios en la forma y el estado oligomérico de las proteínas, como la dispersión de rayos-X en ángulos bajos (Small Angle X-ray Scattering, SAXS), para refinar la estructura final generada por homología. La fosfofructoquinasa-2 de *E. coli* presenta inhibición de la actividad enzimática asociada a cambios en el estado de agregación como consecuencia de la unión de MgATP a un sitio alostérico. La unión de fructosa-6-P al sitio activo afecta la fluorescencia intrínseca y la resistencia de la enzima a la proteólisis. Para determinar los efectos de la unión de fructosa-6-P al sitio activo y de MgATP al sitio alostérico sobre la estructura terciaria y cuaternaria de Pfk-2, se utilizó modelamiento por homología combinado con datos de SAXS. La forma dimerica nativa de Pfk-2 se modeló a partir de la estructura cristalográfica de la riboquinasa de *E. coli* utilizando el programa MODELLER. Se colectaron datos de SAXS para la Pfk-2 en sus formas libre y unida a fructosa-6-P o MgATP. Se compararon las curvas SAXS experimentales con las calculadas a partir de modelos de Pfk-2 sobre los que se realizaron movimientos rígidos de los dominios dentro del dímero. Conformaciones abiertas de los dominios se ajustan con los datos SAXS de la proteína libre, en tanto que una conformación cerrada concuerda con el patrón de dispersión de la proteína unida a fructosa-6-P. Utilizando la misma estrategia se utilizaron los datos de SAXS de Pfk-2 en presencia de MgATP para modelar el empaquetamiento tetramérico de la enzima unida al nucleótido. Basándonos en estas observaciones, proponemos un mecanismo para el efecto inhibitorio de MgATP. Proyecto Fondecyt 1010645.

MODELAMIENTO Y DINÁMICA MOLECULAR DE PROTEÍNAS: CLAVES EN LA BÚSQUEDA DE RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN (protein modeling and molecular dynamics: keys to structure-function relationship) **Pérez-Acle, T.** Centro de Genómica y Bioinformática, CGB, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Las propiedades emergentes son propias de los sistemas complejos que están sometidos a presiones evolutivas, tales como los organismos vivos y sus biomoléculas. La función de las diversas proteínas es sólo uno de los ejemplos de este tipo de propiedades. Esta no puede ser completamente explicada a partir de la secuencia de aminoácidos que las conforman, ni por sus propiedades bioquímicas. Ni siquiera por la asociación tridimensional en la que se reúnen. Muy por el contrario, el conjunto de propiedades estructurales, bioquímicas e incluso cuánticas de los átomos que las conforman, les proveen de especificidad y funcionalidad propia, aún cuando la secuencia o la estructura sean relativamente similares. La acumulación de información, casi exponencial, en las bases de datos de secuencias y estructuras tridimensionales, ha permitido el desarrollo de descriptores numéricos -que integran características estructurales y bioquímicas- capaces de ser calculados usando programas de computador. De este modo, han sido concebidas técnicas bioinformáticas para el modelamiento tridimensional por similitud de secuencias, así como ecuaciones de campos de fuerza mecánico moleculares capaces de estudiar el comportamiento dinámico de las biomoléculas. Esta última metodología, denominada Dinámica Molecular, bajo ciertas condiciones representa el camino más corto para el estudio de la relación entre los componentes básicos de las proteínas, y su función. Una serie de estudios bioinformáticos de modelamiento y dinámica molecular desarrollados por el CGB darán cuenta de la utilidad de estas técnicas.

Incorporaciones

Incorporación I

PARTICIPACIÓN DE LA CITOCROMO P450 REDUCTASA EN LA BIOSÍNTESIS DE GIBERELINAS POR *Gibberella fujikuroi*. (Role of cytochrome P450 reductase in gibberellin biosynthesis by *Gibberella fujikuroi*). **Urrutia O.** y Rojas M.C. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Las oxidasas que catalizan la síntesis de giberelinas (GAs) en *Gibberella fujikuroi* son monooxigenasas P450 multifuncionales que oxidan distintas posiciones del esqueleto tetracíclico de estas fitohormonas. Los electrones requeridos para la oxidación provienen del NADPH o del NADH a través de proteínas transportadoras como la citocromo P450 reductasa (CPR) o el citocromo b5. En *Gibberella fujikuroi* hay una sola reductasa, codificada por el gen *cpr*. Demostramos, en mutantes que carecen de P450 reductasa o que tienen una reductasa truncada, que la cantidad de GAs producidas es diez veces menor que en la cepa silvestre. El análisis por GC/MS de las GAs así como la metabolización de precursores marcados con ¹⁴C, muestran que no se producen GAs hidroxiladas en las mutantes. La pérdida del carbono 20 que genera la función lactónica también está ausente y las GAs producidas son no hidroxiladas, con el C20 al estado de alcohol, aldehído o ácido carboxílico. La complementación de las mutantes con el gen *cpr* restauró la capacidad de sintetizar giberelinas de la cepa silvestre. Estos resultados indican que las reacciones de hidroxilación en C3 y C13 dependen en forma absoluta de la P450 reductasa en tanto que las reacciones de oxidación sobre C19, C7, C6 y C20 reciben electrones desde una fuente adicional. Las distintas actividades de las monooxigenasas P450-1 y P450-2, multifuncionales, difieren con respecto a la fuente de electrones, lo que confirmamos para P450-1 con preparados microsomales. La P450 reductasa es la principal proteína transportadora de electrones asociada a las monooxigenasas de giberelinas en *Gibberella fujikuroi*. Una proteína transportadora de electrones alternativa complementaría a la reductasa a nivel de la *ent*-kaureno oxidasa (P450-4), de la GA14 sintetasa (P450-1) y de la C20 oxidasa (P450-2). FONDECYT (1020140) y CONICYT/DAAD.

Incorporación II

DESARROLLO DE UNA VACUNA CONTRA *Piscirickettsia salmonis* BASADA EN UNA MEZCLA DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES. (Development of a vaccine against *Piscirickettsia salmonis* based on a mixture of recombinant proteins). **Wilhelm V.**, Miquell A., Jamett A., Parada G., Valenzuela S., Burzio L.O., Roseblatt M. y Valenzuela P.D. Fundación Ciencia para la Vida, Fundación Chile, Instituto MIFAB y BiosChile IGSA. Av. Marathon 1943, Santiago, Chile.

La bacteria intracelular *Piscirickettsia salmonis* es responsable de una de las enfermedades más serias de la industria salmonicultora chilena; el síndrome rickettsial del salmón (SRS), afectando a las especies salmonídeas cultivadas en el país. Debido a la inexistencia de esta enfermedad en otros países productores de salmón no ha habido un gran desarrollo de métodos eficientes de prevención de la enfermedad.

Nuestro laboratorio ha realizado la secuenciación del genoma de la bacteria *P. salmonis*. Mediante la comparación con otros genomas bacterianos hemos podido identificar cerca de 1.500 genes. A partir de esta información nos hemos concentrado en el aislamiento y expresión de aquellos genes que codifican para proteínas con una potencial participación en la interacción patógeno-huésped y en el desarrollo de inmunidad. Actualmente se han clonado y expresado 16 genes de *P. salmonis* que codifican para proteínas de membrana, algunos factores de virulencia y proteínas de estrés térmico. Las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* se purificaron e inyectaron en ratones, comprobándose que son altamente inmunogénicas, validando el estudio de estas proteínas para una posible vacuna contra *P. salmonis*. Cuatro mezclas que contenían 2 o 3 de las proteínas recombinantes fueron inyectadas en salmones para evaluar su capacidad de protección en un desafío realizado contra *P. salmonis*. Los resultados muestran que algunas de estas mezclas otorgan un alto grado de protección contra el patógeno y podrían ser consideradas para el desarrollo de una vacuna comercial contra *P. salmonis*.

Financiado en parte por Proyecto CORFO FDI PT-03.

Comunicaciones Libres

ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS Y ENZIMOLOGÍA I

INTERACCIÓN ENTRE SUBUNIDADES Y ESTABILIDAD DE LA FOSFOFRUCTOQUINASA-2 DE *E. coli*. (Subunit interactions and stability of phosphofructokinase-2 from *E. coli*). **Báez M.,** Guixé V. y Babul J. Facultad de Ciencias Universidad de Chile.

El modelamiento molecular de la fosfofructoquinasa-2 (Pfk-2) de *E. coli* predice que la interfase entre los monómeros del dímero de la proteína es importante para la estructura del sitio catalítico y para su función. Con el fin de determinar el rol de la interacción entre los monómeros en cuanto a la estabilidad y la actividad de la enzima, se realizaron experimentos de desnaturación al equilibrio utilizando cloruro de guanidinio (GdmCl). El desplegamiento y el repliegamiento de la enzima fue observado mediante deicroísmo circular, fluorescencia intrínseca, cromatografía de exclusión molecular y actividad enzimática. Las curvas de estabilidad de la enzima, realizadas con distintas concentraciones de proteína, indican que la disociación de los monómeros ocurre simultáneamente con la pérdida de la actividad enzimática, de la fluorescencia intrínseca y del 60% de la estructura secundaria de la proteína. El 40% restante de la estructura secundaria se puede atribuir a la acumulación de un intermediario inactivo monomérico que puede ser desplegado con concentraciones mayores de GdmCl. Las energías de estabilización calculadas para cada etapa del desplegamiento reversible de la Pfk-2, indican que el intermediario monomérico es 8 veces más inestable que la proteína dimerica, lo que sugiere que la interfase monómero-monómero es fundamental para la integridad estructural de la proteína, ya que el monómero intacto no es una especie estable en la vía del desplegamiento de la Pfk-2. Fondecyt 1010645.

ALTOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE ENDOXILANASAS DE *Penicillium purpurogenum* EN *Pichia pastoris*- (high-level expression of endoxylanases from *Penicillium purpurogenum* in *Pichia pastoris*). **Cortés P.,** Peirano A., Sigala C. y Eyzaguirre J. Laboratorio de Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Chile; Universidad Andrés Bello. Financiamiento: FONDECYT Líneas Complementarias N°8990004.

Las endoxilanasas A y B (XynA y XynB), pertenecientes a las familias 10 y 11 de las glicosil hidrolasas, respectivamente, son parte del sistema xilanolítico del hongo filamentososo *Penicillium purpurogenum*. Ellas degradan el esqueleto central del xilano, componente principal de hemicelulosas. Estas enzimas presentan un potencial biotecnológico, entre otros, en el proceso de bioblanqueamiento de la celulosa. Por esto, xilanasas de alta actividad, estabilidad y sin actividad celulásica son de un alto interés. Con el propósito de producir grandes cantidades de estas enzimas, se empleó la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, que es utilizada exitosamente para la producción de proteínas heterólogas. Se buscó el mejor medio de cultivo, medio intermedio con peptona y glicerol como fuente de carbono, en el cual se combina una alta actividad de las endoxilanasas con una mayor pureza de éstas. Al comparar la actividad específica de las enzimas producidas, tanto por el hongo como por la levadura, en sus mejores condiciones de cultivo, se observa que ésta es mayor para ambas enzimas al expresarlas en *P. pastoris*. La actividad específica de XynA y XynB expresadas por el hongo, corresponden a 61.2 y 39.6 U/mg proteína, respectivamente. Mientras que al ser expresadas por *P. pastoris*, se obtienen 2000 U/mg proteína para XynA y 450 para XynB.

Podemos concluir, que *Pichia pastoris* es un buen sistema de expresión heteróloga de endoxilanasas del hongo *Penicillium purpurogenum*.

Agradecimientos: P. Bull, D. Bustamante, A. Fuentes, G. Morales.

SIMULACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE 2 HEXAMEROS FICOCIANINA DE *Gracilaria chilensis*. (Simulation of the interaction between 2 phycocyanin hexamers from *Gracilaria chilensis*). **Figueroa, M.** y Bunster, M. Grupo de Biología Estructural, Laboratorio de Biofísica Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción

Ficocianina es una ficobiliproteína, uno de los principales componentes de los ficobilisomas, complejos multiproteicos cuya función es captar y conducir la luz hacia los centros fotosintéticos de algas rojas y cianobacterias. El alga roja *Gracilaria chilensis* presenta ficobilisomas compuestos por 3 tipos de ficobiliproteínas: aloficocianina, ficocianina y ficoeritrina. Debido a que la conducción de luz hacia los centros fotosintéticos presenta una eficiencia cuántica cercana al 100%, se hace muy interesante estudiar el modo interacción de estas ficobiliproteínas. Se simuló la interacción entre dos hexámeros de ficocianina de *Gracilaria chilensis* mediante la técnica de "docking", en condiciones ideales (*in vacuo*) con un paso angular de 15° utilizando el software ZDOCK, que asigna puntaje considerando el componente electroestático, complementariedad espacial y de solvatación. Se seleccionó 9 complejos por discriminación visual usando el software SPDBV de acuerdo a las evidencias experimentales disponibles. El estudio de las superficies de interacción permitió seleccionar el Complejo 1 como modelo de estudio. Este modelo corresponde al de mayor puntuación por ZDOCK, presenta una altura de 120 Å y un ancho de 110 Å. Además se caracteriza por presentar una rotación de 23° hacia la derecha una con respecto a la otra en el plano x,y y un ángulo de elevación en el eje z de 4° el que genera una mayor interacción en una zona de los hexámeros de ficocianina. Proyecto DIUC:202.31.91-1.0

ESPECIFICIDAD POR EL NUCLEÓTIDO DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRÚVICA DE *Saccharomyces cerevisiae*: ESTUDIO EXPERIMENTAL Y TEÓRICO- (Nucleotide specificity of *Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase: experimental and theoretical study). **Villarreal J.,** Bueno C., Jabalquinto A.M., Encinas M.V., Gonzalez-Nilo F. y Cardemil E. Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.

La enzima carboxiquinasa fosfoenolpirúvica (PEPCK), cataliza la descarboxilación reversible de oxaloacetato dependiente de nucleósidos trifosfato (usualmente ATP en microorganismos y plantas y GTP en organismos superiores).

Se estudió la especificidad por el nucleótido en la PEPCK de *Saccharomyces cerevisiae* desde el punto de vista cinético y termodinámico, y además se realizó un estudio teórico mediante dinámica molecular. Los parámetros cinéticos y termodinámicos indican especificidad por el nucleótido de adenina (ATP y ADP), seguidos por los de guanina, inosina, uracilo y citosina.

Se aprecia una mayor discriminación entre los nucleótidos de adenina y guanina en los datos cinéticos que en los datos termodinámicos ($V_{max}/K_m=2500$ (mg/mL)-1-min-1 y $K_d=4$ μ M para ATP y $V_{max}/K_m=69$ (mg/mL)-1-min-1 y $K_d=12$ μ M para GTP). La proteína fue modelada por homología, a partir de la PEPCK de *Escherichia coli*, y el modelo fue utilizado para identificar mediante cálculos de dinámica molecular las propiedades energéticas y estructurales que gobiernan las interacciones proteína-ligando. Financiado por los proyectos FONDECYT 1030760 y 3010004, y DICYT 020141GN

LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE FBPA EN HEPÁTICA ES MODULADA POR INSULINA Y GLUCOSA. (Subcellular localization of liver FBPA is modulated by insulin and glucose). ¹Bertinat, R., ²Yáñez, A.J., ³García-Rocha, M., ⁴Guinovart, J.J. y ⁵Slebe, J.C. ¹Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile, ²Institut de Recerca Biomèdica-Parc Científic de Barcelona, Universitat de Barcelona, España.

Hemos demostrado que en hepatocitos de rata la fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPA) se localiza en un compartimiento de la membrana plasmática y dentro del núcleo. Por otro lado, se conoce que la localización subcelular de enzimas glicolíticas varía en respuesta a condiciones metabólicas. Para estudiar el mecanismo que regula la localización subcelular de FBPA analizamos, por inmunofluorescencia y microscopía confocal, el efecto de glucosa, DHA, insulina y glucagón sobre la distribución de FBPA en cultivo primario de hepatocitos. Además, realizamos estudios de co-localización de FBPA con glucoquinasa (GK) y glicógeno sintasa (GS). Los resultados muestran que FBPA localiza principalmente en el citoplasma en ausencia de glucosa, pero su adición indujo la concentración de FBPA en el núcleo. En forma similar, la adición de insulina en ausencia de glucosa produjo un aumento de FBPA en el núcleo. En cambio, GK translocó desde el núcleo hacia el citosol por acción de glucosa, demostrando que los hepatocitos eran funcionales. Estos resultados sugieren que FBPA y GK utilizan señales metabólicas similares para regular su localización celular. Además, en presencia de altos niveles de glucosa y DHA, FBPA se recluta en la periferia celular y colocaliza con GS. Esta redistribución coordinada de FBPA y GS, inducida por glucosa, indicaría la capacidad de FBPA para modular la síntesis indirecta de glicógeno. En conjunto, estos resultados indican que la localización subcelular de FBPA puede ser modulada por el estado metabólico de la célula, representando un nuevo mecanismo de regulación de las vías gluconeogénica y gliconeogénica. (FONDECYT 1010720; DID-UACH 200302).

EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE MUTANTES DE ENDOXILANASA B DE *Penicillium purpurogenum* en *Pichia pastoris*. (Heterologous expression of *Penicillium purpurogenum* endoxylanase B mutants in *Pichia pastoris*). Sigala, L. C., Pérez, T., Peirano, A., Cortés, P., Eyzaguirre, J. Laboratorio de Bioquímica y Centro de Genómica y Bioinformática, Pontificia Universidad Católica de Chile; Universidad Andrés Bello. FONDECYT Líneas complementarias N°8990004.

Las endoxilanasas son enzimas que hidrolizan la cadena principal del xilano. En su estructura, la zona denominada "pulgar" posee una secuencia conservada de 5 residuos, que no tendrían relación directa con la catálisis. No obstante, se ha observado en otras endoxilanasas movimiento del "pulgar" y del sitio activo al unirse con el sustrato. En este trabajo se construyeron cuatro mutantes sitios dirigidos en la zona del "pulgar", con el fin de estudiar la importancia de ésta. Dos mutaciones fueron de eliminación de residuos (4 y 11, según modelos computacionales) y dos fueron puntuales en la secuencia consenso (pro?ala (mutante 4.2) y gly?phe (mutante 3.8)). Las mutantes se expresaron heterológicamente en el sistema de *Pichia pastoris* para estudiar el efecto de las mutaciones sobre la actividad específica. Sólo las mutantes puntuales presentaron actividad. Ambas, junto con la enzima nativa, fueron parcialmente purificadas con el objeto de realizar ensayos específicos de ellas. De éstos, se determinó que la mutante 4.2 tiene una actividad específica (804,1 U/mg prot) muy similar a la de la XynB (762,6 U/mg prot), pero la mutante 3.8 posee sólo un 19% de esta actividad. Para las tres enzimas se determinó temperatura y pH óptimo, termoestabilidad y estabilidad a pH. Sólo se detectó diferencias significativas en la estabilidad térmica, la que es menor en las mutantes. Se concluye que cambios en la zona del "pulgar" afectan en distinto grado la actividad de la XynB de *P. purpurogenum*.

Agradecimientos: A. Fuentes, P. Bull, Fundación Andes.

INTERACCIÓN DE ARGINASA HUMANA TIPO II CON MANGANESO Y EVIDENCIAS DE EFECTOS COOPERATIVOS Y ALOSTERICOS EN LA ENZIMA. (Interaction of human arginase II with manganese and evidence for cooperative and allosteric effects in the enzyme). López, V., Alarcón, R., Carvajal, N. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

En los mamíferos, se distinguen dos isoenzimas de arginasa (EC 3.5.3.1), identificadas como arginasas I y II, siendo la forma I la mejor caracterizada. Sólo en los últimos años se ha puesto atención en la arginasa II, al asociársela con varias funciones biológicas, entre las que se destaca su probable acción moduladora de la síntesis de óxido nítrico. Recientemente, esta enzima ha sido clonada y su secuencia de aminoácidos muestra la presencia de residuos cuyas funciones han sido definidas para la enzima tipo I. En este estudio, se describen algunas propiedades de la arginasa II. La cinética de hidrólisis fue hiperbólica a pH 9.0 y cooperativa a pH 7.0. A pH 7, cambió a hiperbólica en presencia del inhibidor competitivo agmatina. En cuanto a la interacción con arginina y agmatina, no se observaron diferencias entre especies silvestres y dos mutantes (H120N y H145N), resultantes del reemplazo de ligandos para el metal activador. Sin embargo, las mutantes fueron afectadas de manera diferente por el EDTA. Al dializarla contra el quelante, la H120N resultó ser inactiva y totalmente dependiente de la adición de Mn²⁺, mientras que la H145N fue parcialmente activa, aún en ausencia de Mn²⁺ agregado. Los resultados apoyan la existencia de iones Mn²⁺ con funciones catalíticas y moduladoras en la arginasa tipo II, y la expresión de efectos cooperativos y alostéricos, aparentemente independientes de la estabilidad de un centro bimetálico en la enzima.90

Beca CONICYT de Apoyo a Tesis Doctoral.

MODELO MOLECULAR DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE *Saccharomyces cerevisiae* Y ESTUDIO DE MUTACION SITIO DIRIGIDA DE LA ZONA DE CONTACTO. (Molecular model of *Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase and site-directed mutagenesis of the contact zone). Arenas, M. A., Vidaurre, S., Jabalquinto, A. M., González-Nilo, F. D., Cardemil, E. Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Química y Biología, Universidad Santiago de Chile.

La carboxiquinasa fosfoenolpiruvica (PEPCK) de *Saccharomyces cerevisiae* es una enzima homotetramérica, organizada por la asociación de dos dímeros. A partir de los datos cristalográficos de las PEPCK de *T. cruzi* (dímero) y *E. coli* (monómero), que presentan 51,6% y 48,2% de identidad con la enzima de *S. cerevisiae*, respectivamente, se generó un modelo por homología del homodímero de la PEPCK de *S. cerevisiae*. El modelo fue generado con los programas Homology y Modeller y refinado con Dinámica Molecular usando el programa Discover_3. La estructura obtenida fue validada con Procheck, con un factor G global de -0.04 y con un 98% de los residuos en zonas favorecidas en un gráfico de Ramachandran. En el modelo se puede visualizar los residuos involucrados en la zona de contacto proteína-proteína. Los residuos presentes en la región de contacto en *S. cerevisiae* van desde el residuo 36 al 61 y del 304 al 324. Recientes resultados en nuestro laboratorio han demostrado que la estructura cuaternaria no se relaciona con una mayor estabilidad conformacional. En base a mutaciones sitio dirigidas de los residuos F308 y A40 se estudian cuales son las propiedades estructurales que gobiernan la interacción entre las subunidades de la PEPCK de *S. cerevisiae* y cómo estas mutaciones afectan la actividad catalítica. Financiado por proyectos FONDECYT 1030760 y DICYT 020141GN

MISCELÁNEOS

IDENTIFICACIÓN DE LOS DETERMINANTES MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN DE LA GLURS DE *Bacillus subtilis* CON tRNAGLU. (Identification of the molecular determinants of the interaction of the GluRS from *B. subtilis* with tRNAGLU). **Inostroza, C.***, Salas, B.[&], Gonzalez, F.[&] y Orellana, O. * Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.[&] Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.

La GluRS de *B. subtilis* aminoacila *in vitro* el tRNAGln de *E. coli* y los tRNAGlu y tRNAGln de *B. subtilis* (todos de brazo D corto). El gen de la GluRS de *B. subtilis* (*gltX*) no se puede clonar en *E. coli*. Se supone que es tóxico por el carácter no discriminante de la GluRS que aminoacila con glutámico el tRNAGln. Una mutación que reemplaza la glutamina 373 de la GluRS de *B. subtilis* por una arginina permite que el gen *gltX* se clone en *E. coli*. El gen *gltX* de *B. subtilis* mutante complementa una mutación termosensible en *gltX* de *E. coli*, lo que implica que la GluRS de *B. subtilis* *in vivo* aminoacila con glutámico al tRNAGlu (brazo D largo). Experimentos *in vivo* en *E. coli* demostraron que la GluRS mutante no aminoacila el tRNAGln.

Estudios de dinámica molecular permiten analizar los modelos estructurales de los complejos GluRS (silvestre y mutante Q373R) de *B. subtilis* con el tRNAGlu de *E. coli*. Para generar los modelos por homología se utilizó como estructura de referencia los datos cristalográficos del complejo GluRS-tRNAGlu de *Thermus thermophilus* y los programas Modeller y Discover_3. Este análisis nos permite determinar las propiedades estructurales que gobiernan la especificidad de la interacción del tRNA con las GluRSs silvestre y mutante de *B. subtilis*.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT N° 1020087, DICYT-USACH (020141GN)

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL RECEPTOR DE PROLACTINA DE CARPA Y ESTUDIOS DE SU EXPRESIÓN ESTACIONAL. (Molecular characterization and seasonal expression of carp prolactin receptor). **San Martín, R.**, Molina, A., Alvarez, M., Vera, MI y Krauskopf, M. Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Universidad Andrés Bello. MIFAB.

La aclimatación estacional del pez *C. carpio* implica la modulación de la expresión génica en respuesta a los estímulos del ambiente. Es relevante determinar la señalización molecular que permite a este organismo generar una respuesta adaptativa que sustente la sobre vivencia en una nueva condición ambiental. La hormona prolactina (PRL) es uno de los mediadores de la respuesta compensatoria ya que su expresión, y la de factores de transcripción que la regulan, está claramente modulada estacionalmente. Por cierto el efecto de la hormona debe ser mediada por sus receptores específicos. Consecuentemente, hemos caracterizado dos cDNAs codificantes para el receptor de PRL (PRLR) de carpa, que representan la expresión de genes distintos. Ambas proteínas receptoras son similares a la forma larga del receptor descrita en mamíferos. La organización genómica de uno de ellos difiere de la de humano y rata pues no posee primeros exones alternativos. En riñón, agalla e intestino la cantidad de transcritos es significativamente mayor en invierno, contrastando con lo observado para la hormona. Inmunocitoquímica en cortes de riñón, correlacionan la mayor cantidad de transcritos con un mayor nivel de proteína receptora en invierno. A diferencia de lo observado en riñón, en hipófisis el nivel de receptores es mayor en verano, expresándose principalmente en células de la *pars intermedia* y en menor grado en la *rostral pars distalis*.

Proyecto DI-UNAB-9201.

EN ERIZOS DE MAR LA DEGRADACIÓN DE HISTONAS ESPERMÁTICAS NO REQUIERE DE FOSFORILACIÓN (Sperm histones degradation does not require phosphorylation). **Monardes A.**, Morín V., Puchi M., e Imschenetzky M. Departamento de Biología Molecular, Universidad de Concepción.

La degradación de histonas espermáticas (SpH) catalizada por SpH-cistein proteasa es un evento crucial para la formación del pronúcleo masculino en erizos de mar. La formación del pronúcleo se evidencia por un cambio de su morfología fusiforme inicial a redondeada final. Estos cambios han sido inhibidos *in vitro* por 6 dimetilamino purina (6-DMAP), inhibidor de protein quinasas. Con el objeto de investigar si los eventos gatillados por fosforilaciones son requeridos para la degradación de SpH, hemos investigado la pérdida de SpH en cigotos tratados con 6-DMAP. Los resultados obtenidos indican que a una concentración de 1 mM de 6-DMAP se altera la decondensación del pronúcleo masculino *in vivo*. La decondensación del pronúcleo masculino fue puesta en evidencia por tinción con Hoechst 333258. Adicionalmente, se observó que tanto la migración de ambos pronúcleos como su fusión no fue alterada significativamente por este tratamiento. La desaparición de SpH fue seguida de anticuerpos anti-SpH por western blots y por cito-inmuno-detección de SpH con anticuerpos anti-SpH. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con 6-DMAP no altera la degradación normal de SpH que ocurre durante la formación del pronúcleo masculino. Estos resultados indican que la proteólisis de SpH catalizada por SpH-proteasa no requiere de eventos de fosforilación que sean susceptibles a inhibición con 6-DMAP. Consecuentemente se concluye que los cambios morfológicos que acontecen durante la formación del pronúcleo masculino y la remodelación de cromatina espermática son eventos co-temporales pero no acoplados entre sí.

GRANTS : FONDECYT 1011063., DIUC : 200031088.

LA TRANSFORMACIÓN DE QUERATINOCITOS HUMANOS CON HPV 16 Y 18 INDUCE DRÁSTICOS CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE UNA NUEVA FAMILIA DE RNAS NO CODIFICANTES. (Transformation of human keratinocytes with HPV 16 and 18 induces drastic changes in the expression of a novel family of non-coding RNAs). **Burzio, V^{1,2}**, Villegas, J.^{1,2}, Villota, C.¹, Martínez, R.¹, Vera, M.I.², Villa, L.L.³, Boccardo, E.³ y Burzio, L.O.^{1,2} ¹Instituto Milenio MIFAB, ²BiosChile I.G.S.A., ³Fundación Ciencia Para La Vida, Av. Maratón 1943, ²Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile, y ³Ludwig Institute of Cancer Research, Sao Paulo, Brasil.

Las células normales en proliferación (linfocitos humanos estimulados con fitohemaglutinina) expresan un RNA no-codificante (RNA quimérico sentido) que contiene un largo repetido invertido (alrededor de 700 nt) unido al extremo 5' del RNA 16S mitocondrial. Estas células también expresan una familia de RNAs parcialmente complementarios al anterior. La secuencia de estos nuevos RNAs muestran la presencia de repetidos invertidos de variable longitud (187 a 365 nt) unidos al extremo 5' del RNA codificado por la hebra L del mtDNA (RNA quimérico antisentido). Queratinocitos normales de prepucio humano también expresan ambas familias de RNAs. Al transformar estas células con HPV 16 y 18 se induce un drástico cambio de expresión. Las células transformadas continúan expresando el RNA quimérico sentido, mientras que la expresión del RNA quimérico antisentido se reprime. Esta expresión diferencial es propia de células tumorales, como células SiHa (HPV 16) y HeLa (HPV 18). También se identificó un nuevo RNA sentido que no está presente ni en células normales ni tumorales, lo que podría constituir el primer marcador de células pre-cancerosas. Además, hemos encontrado que el RNA sentido se localiza en el nucleolo al transformar las células con HPV (Proy. P99-007, MIFAB y Proy. DI-02-02 y DI 02-02, Universidad Nacional Andrés Bello).

CONTRIBUCIÓN DE LAS APOLIPOPROTEÍNAS A-I Y A-II A LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA HDL PLASMÁTICA DE LA CARPA. (Contribution of apolipoproteins A-I and A-II to the antimicrobial activity of carp plasma HDL) **Castro, K.¹**, Bastías, A.¹, Amthauer, R.¹, Smith, V.J.² y Concha, M.I.¹ (1) Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. (2) Gatty Marine Lab. University of St. Andrews, Escocia, Reino Unido

Recientemente demostramos que la lipoproteína de alta densidad (HDL), correspondiente a la proteína plasmática más abundante de la carpa, presenta actividad antimicrobiana, lo que sugiere su participación en la inmunidad innata de peces teleosteos.

Se evaluó la actividad antimicrobiana de las apolipoproteínas purificadas de HDL, (ApoA-I y A-II), por un ensayo de dilución en microplaca empleando *Planococcus citreus* como bacteria susceptible. Se obtuvo una IC50 de 0,4 y 1,8 μ M para ApoA-I y ApoA-II, respectivamente. Al igual que algunos péptidos antimicrobianos, la estructura secundaria de ApoA-I sería esencialmente α -helicoidal y anfipática. Por ello se sintetizó un péptido anfipático y catiónico correspondiente al dominio carboxilo terminal de ApoA-I de carpa. Dicho péptido manifestó actividad antimicrobiana (IC50= 6 μ M) contra *P. citreus* y adicionalmente mostró sinergismo con lisozima en ensayos inhibitorios de difusión radial.

Mediante análisis de Western demostramos que el extremo carboxilo-terminal de ApoA-I asociada a HDL plasmática, es susceptible a proteólisis parcial, liberando diversos péptidos.

En conjunto los resultados obtenidos, sugieren que la actividad antimicrobiana de HDL de la carpa estaría mediada al menos en parte por sus apolipoproteínas A-I y A-II y posiblemente por uno o más péptidos liberados por alguna proteasa.

Proyecto DID-UACH S-2002-11

IgGs EN CAPA GERMINAL DE QUISTES HIDATÍDICOS DE *Echinococcus granulosus*. AFINIDAD, LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y RELACIÓN CON LA FERTILIDAD DE LOS QUISTES (IgGs in germinal layer of *E. granulosus* hydatid cysts. Affinity, subcellular localization and relationship with the fertility of the cysts). Paredes, R., Cabezón, C. y Galanti, N. Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La hidatidosis es una parasitosis causada por el estado larval (quiste) de *Echinococcus granulosus*. Los quistes hidatídicos presentan una capa germinal interna que forma protoescólices, estado del parásito infectiva para cánidos. Por otra parte, existen quistes con capa germinal que no producen protoescólices (infértiles). El mecanismo que induce la infertilidad de los quistes es desconocido.

Por Western blot y microsecuenciación aminoacídica se demostró presencia de inmunoglobulinas del hospedero en la capa germinal, tanto de quistes hidatídicos fértiles como infértiles. La capa germinal de quistes infértiles presenta mayor cantidad de IgGs. Mediante extracción de proteínas de la capa germinal con concentraciones crecientes de NaCl y de agentes caotrópicos, se observó dos fracciones de Igs, una débilmente y otra fuertemente unida. Por fraccionamiento subcelular, estas IgGs se encontraron mayoritariamente en el núcleo celular. Estos resultados sugieren que una subfamilia de IgGs, unida con alta afinidad a la capa germinal y con la propiedad de ingresar a las células, participaría en la determinación de la infertilidad de los quistes hidatídicos. Financiamiento: Proyectos FONDECYT N° 1010817; APT N°403032 CONICYT-Chile y SIDA/SAREC Network.

IDENTIFICACIÓN DE PIAS γ COMO COMPAÑERO DE INTERACCIÓN DE NURR1. (Identification of PIAS γ as an interaction partner of Nurrl) **Alvarez, K.**, Ojeda, V., Gómez, A. y Andrés, M.E. Depto. Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Nurrl es un miembro de la familia de receptores nucleares tipo huérfano. Estudios previos demostraron que Nurrl es esencial para el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio. Sin embargo, los mecanismos bajo los cuales este factor de transcripción trabaja son aun desconocidos. En la búsqueda de mecanismos regulatorios de la función de Nurrl, identificamos a PIAS γ como un compañero de interacción. Ambas proteínas co-localizan en el núcleo de células transfectadas y su interacción fue demostrada in vitro e in vivo, por GST-pulldown y co-inmunoprecipitación respectivamente. Un estudio más detallado, por medio de doble híbrido en levadura, de los dominios de Nurrl que son necesarios para la interacción con PIAS γ arrojó a parte del AF1, el DBD y parte del AF2, lo que fue corroborado por GST-pulldown. Además, encontramos evidencia de la co-existencia de Nurrl y PIAS γ en varios núcleos del sistema nervioso central de roedores. En conclusión, identificamos un compañero de interacción de Nurrl, PIAS γ , el cual podría actuar como un regulador fisiológico de la actividad transcripcional de Nurrl. FONDECYT # 1030496

IMPRINTING DEL GEN PEG-1 EN EL GENOMA DUPLICADO DE *typanoctomys. barrerae* (Rodentia, Octodontidae).

(Imprinting of the peg1 gene in the duplicated genome of *typanoctomys. barrerae* (Rodentia, Octodontidae)). Bacquet, C.¹, Imamura, T.*; Paldi, A.*; Kausel, G.#; Gallardo, M.¹. ¹Instituto de Ecología y Evolución, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. [#]Laboratorio de Epigenética, Patología y Desarrollo, Institut Jacques Monod, Paris, France. ^{*}Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. gkausel@uach.cl

El imprinting consiste en una represión alélica que depende del origen parental de un locus. Estas modificaciones epigenéticas del ADN cumplen importantes roles regulatorios durante el desarrollo y al estado adulto. En mamíferos, el gen Peg1 posee imprinting y se expresa desde el alelo paterno. Mediante análisis de sus secuencias se indagó la expresión de Peg1 en *Tympanoctomys barrerae*, un roedor con duplicación genómica. Para ello se extrajo ADN genómico de una hembra preñada y sus dos embriones. Se amplificó por PCR un fragmento de 300 pb de Peg1 y mediante el análisis de las secuencias encontradas se caracterizaron cuatro alelos del gen mencionado. El origen paterno de los alelos en los embriones se infirió por comparación con las secuencias génicas de la madre. La expresión embrionaria del gen se estudió por RT-PCR. La caracterización de los alelos respectivos indicó que tres de ellos no son funcionales debido a la presencia de codones de finalización en la región codificante. Aparentemente, la presencia de alelos no funcionales en Peg1 está ligada al origen híbrido de la especie y su forma de represión alélica está relacionada con los ajustes genómicos que aseguran la homeostasis orgánica de *T. barrerae*.

Parcialmente financiado por FNC 1010727 y ECOS /CONICYT C01B02.

ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS Y ENZIMOLOGÍA II

CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRÚVICA DE *Saccharomyces cerevisiae*: EFECTO DE ALTERACIONES DEL MICROENTORNO DE LISINA 213 EN LA CATALISIS (*Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase: effect of alterations in the microenvironment of lysine 213 in catalysis). **Yévenes, A.** y Cardemil, E. Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Química y Biología, U. de Santiago de Chile.

La estructura cristalina de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica de *Escherichia coli* muestra que la Lis213 es un ligando de Mn²⁺ (Tari, L. W., Matte, A., Goldie, H., and Delbaere, L. T. J. *Nat. Struct. Biol.* 4, 990-994, 1997). La coordinación directa de Mn²⁺ al Nε de Lis213 es interesante y sugiere que su microentorno (presencia de residuos hidrófobos y de cargas positivas) es capaz de bajar el pKa de este grupo. Un análisis teórico realizado en la enzima de *Saccharomyces cerevisiae* (47 % de identidad de secuencia con la enzima de bacteria) arrojó un pKa de 5,9 para Lis213 y se determinó que Fen216 y Fen416 contribuyen a modular el pKa del grupo Nε de Lis213 (Yévenes, A., González, D. F. y Cardemil, E. *Biol. Res.* 35, 990-994, 2002). Para evaluar el papel de Fen216 y Fen416 en las características catalíticas de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica de *S. cerevisiae*, se empleó PCR para realizar aisladamente los cambios Fen216Tir y Fen416Tir. El análisis cinético de las carboxiquinasas mutadas indicó una ligera disminución en Vmax para ambas enzimas. Sin embargo, tanto para las enzimas conteniendo las mutaciones Fen216Tir como Fen416Tir se encontraron aumentos en Km de Mn²⁺ de 3 y 6 veces, respectivamente, en relación a la enzima silvestre. Estos resultados sugieren que una disminución del carácter hidrófobo del microentorno de Lis213 disminuye la afinidad del metal a la enzima, lo que está de acuerdo con lo que se podría esperar para un aumento en el pKa del grupo ε-amino de Lis213.

Financiado por proyectos FONDECYT 1030760 y 2010041.

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE UNA NUEVA ACETIL XILANO ESTERASA (AXE III) DE *Penicillium purpurogenum* (purification and characterization of a new acetyl xylan esterase (AXE III) from *Penicillium purpurogenum*.) **Fuentes, A.,** Peirano, A., Eyzaguirre, J. Laboratorio de Bioquímica, Pontificia U. Católica de Chile; U. Andrés Bello. Financiamiento: proyecto FONDECYT Líneas complementarias N° 8990004.

El mayor componente de las hemicelulosas es el xilano. Su degradación está dada por enzimas xilanolíticas producidas por hongos como *P. purpurogenum*. Estas enzimas incluyen esterasas, las acetil xilano esterasas (AXEs), feruloil esterasas (FEs) y cumaroil esterasas (CEs). En este trabajo se purificó una enzima con actividad acetil esterásica (AE) mediante: ultrafiltración y fraccionamiento con sulfato de amonio, unión a celulosa, cromatografía de intercambio catiónico (CMC50), cromatografía de interacción hidrofóbica (fenilagarosa), cromatoforfoque y cromatografía de exclusión molecular (G 75). Se determinó por especificidad de sustrato que la enzima purificada corresponde a una AXE, distinta a las dos ya encontradas en el hongo y que además, tendría actividad FE. Esta AXE III fue caracterizada, determinándose temperatura y pH óptimos (20°C y 5,3, respectivamente), estabilidad a pH en un rango de 5,3 - 7,0, y estabilidad a temperatura entre 12-35 °C. Además, se determinó que el peso molecular en condiciones desnatantes es de 90 kDa, y el punto isoelectrónico observado en isoelectrofoque es cercano a pH 6,0. Por digestión con Endo H, se encontró que esta enzima presentaba N-glicosilación. Conjuntamente, durante el proceso de purificación, se descubrió una nueva actividad acetil esterásica visualizada en zimogramas, corroborando así la amplia gama de enzimas xilanolíticas producidas por el hongo *Penicillium purpurogenum*.

Agradecimientos: J Diaz, F Gordillo, C Arredondo y Dra P Bull.

DELECCIONES DEL EXTREMO CARBOXILO TERMINAL DE LA CISTEINA SINTASA DE *Geobacillus stearothermophilus* V: IMPLICANCIAS PARA LA UNIÓN DEL COFACTORY PARA LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA. (Deletions of the carboxyl end of the cysteine synthase of *Geobacillus stearothermophilus* V: role in coenzyme binding and enzyme activity). **Saavedra, C.,** Pérez, J.M.; Encinas, M.V.; Araya, M.A.; Fuentes, D. y Vásquez, C. Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.

La cisteína sintasa (CysK) cataliza el último paso en la biosíntesis de cisteína y se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. Nuestro grupo demostró que esta enzima participa en la resistencia de *G. stearothermophilus* V a telurito de potasio. El gen *cysK* fue clonado y sobreexpresado en *Escherichia coli* y la proteína fue purificada a homogeneidad. Se trata de una proteína termoestable, homodimérica y requiere piridoxal 5'-fosfato (PLP) para su actividad. CysK mutantes, a las que se eliminó 40 y 60 aa del extremo C terminal son inactivas y no unen el cofactor. Se construyó, clonó y sobreexpresó un gen *cysK* carente de 30 nt de su extremo 3'. La enzima CysKΔY298 resultante fue purificada y caracterizada. La proteína trunca es inactiva pero reconocida por anticuerpos anti-CysK y su estructura cuaternaria sigue siendo homodimérica. Análisis espectroscópicos de la CysKΔY298 mostraron que la enzima une PLP y que en presencia de O-acetyl-L-serina (OAS) forma el intermediario αα-aminoacrilato. A diferencia de la CysK silvestre, en ausencia de sulfuro este intermediario es estable a 50°C. La Kd para Cys de la CysKΔY298 es 40 y 10 veces mayor que la de la enzima silvestre a 20°C y a 50°C, respectivamente. La absorción y emisión la base de Schiff protonada presenta variaciones, lo que sugiere cambios en la orientación del PLP. La enzima trunca es más sensible tripsina, lo que puede ser interpretado como cambios conformacionales importantes. En conclusión, la CysKΔY298 une PLP, carece de actividad cisteína sintasa y liasa y forma α-aminoacrilato en presencia de OAS. Financiado por Fondecyt 1030234 y Dicyt, USACH.

EFECTO DE LAS MUTACIONES PUNTUALES D212G Y Q38N SOBRE LA HIDRÓLISIS DE GTP Y LA POLIMERIZACION DE FtsZ DE *E. coli*. (Effect of D212G Y Q38N point mutations in the GTP hydrolysis and polymerization of *E. coli* FtsZ). **Nova, E.,** Lagos, R. y Monasterio, O. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

La FtsZ es el componente principal del anillo Z, estructura que participa en la división celular bacteriana. Es una GTPasa, homóloga a la tubulina y polimeriza en presencia de GTP. La estructura de un dímero de FtsZ de *E. coli* (EcFtsZ) construido con el programa MODELLER mostró que en el sitio activo del nucleótido (GTP o GDP) participa el residuo glutamina 38, que está a 5 Å del fosfato gamma de GTP. Este residuo está conservado en todas las proteínas que unen GTP y participa en el mecanismo de hidrólisis. En el dímero se observa que el aspártico 212 del "loop" T7 de un monómero interacciona con el fosfato gamma del otro monómero. Este residuo se encuentra conservado en las FtsZ estudiadas. Con el objeto de determinar la participación de estos residuos en el mecanismo molecular de hidrólisis de GTP, se construyeron las mutantes de EcFtsZ Q38N y D212G, se secuenció su DNA hasta un 97%, y se purificaron y caracterizaron *in vitro*. La EcFtsZ Q38N mostró una Km de 97 μM para GTP y una concentración crítica de polimerización (Cr) de 10 μM, valores 3 y 4 veces mayores que los de FtsZ tipo silvestre, respectivamente. Las curvas de progreso de la actividad GTPásica y la cinética de polimerización mostraron un período de latencia que fue inversamente proporcional a la concentración de proteína. El valor de la Km para GTP de la mutante D212G fue 450 μM y la polimerización fue menor que la silvestre con una Cr de 10 μM. La Km y la Cr fueron alrededor de 12 y 4 veces mayores que los de la proteína silvestre, respectivamente. Estos resultados permiten concluir que el residuo D212 es importante para la conformación FtsZ-GTP, que polimeriza y que la mutación Q38N desfavorece la hidrólisis de GTP dando estabilidad a los polímeros formados. Financiado por el proyecto Fondecyt N° 1010848.

ESTUDIOS DE CINÉTICA DE ESTADO ESTACIONARIO EN LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRÚVICA DE *Trypanosoma brucei*. (Steady-state kinetics studies in the phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Trypanosoma brucei*). Pérez E. y Cardemil E. Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.

La carboxiquinasa fosfoenolpirúvica (PEPCK) cataliza una importante reacción del metabolismo de los hidratos de carbono, y se ha propuesto que podría ser un blanco para el desarrollo de inhibidores enzimáticos con potencial farmacológico en el tratamiento de ciertas enfermedades. En este trabajo se muestran resultados de un estudio del mecanismo cinético de la PEPCK de *Trypanosoma brucei* en el sentido de la formación de oxaloacetato, utilizando técnicas cinéticas de estado estacionario. Las mediciones en velocidad inicial fueron analizadas para probar los tres mecanismos básicos (en secuencia ordenada, en secuencia al azar y ping pong), y los datos se ajustaron mayoritariamente a un mecanismo en secuencia ordenada para los tres sustratos (fosfoenolpiruvato (PEP), ADP y CO₂). Los valores de K_m verdaderos obtenidos fueron 262 ± 66 μM para PEP, 58 ± 8 μM para ADP y 24 ± 4 mM para HCO₃⁻. La evaluación de la inhibición por productos realizada con ATP con respecto a PEP, mostró inhibición competitiva, con K_i = 17 ± 4 μM.

Estos resultados fueron interpretados en términos de un mecanismo en secuencia ordenada. De acuerdo al mecanismo propuesto, PEP es el primer sustrato en unirse a la enzima, seguida por ADP y HCO₃⁻ en un orden no determinado. El último producto en abandonar la enzima es ATP. Se propone que análogos del ATP y de PEP podrían ser buenos inhibidores de esta enzima.

Financiado por FONDECYT 1000756.

LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE FICOCIANINA DE *Gracilaria chilensis* A 2.16 Å DE RESOLUCIÓN. (The 3D structure of Phycocyanin from *Gracilaria chilensis* at 2.16 Å resolution). Carlos Contreras-Martel¹, Carola Bruna², Jorge Ríos³, Germán Poo⁴, José Martínez-Oyanedel⁵ y Marta Bunster⁶. Instituto Pasteur, París¹, Argonne National Lab, Illinois², Universidad del Bío-Bío³, y Grupo de Biología Estructural, Universidad de Concepción⁴.

Ficocianina es una de las proteínas que forman el complejo auxiliar de captación de energía luminosa, el Ficolibisoma. Fue purificada desde la macroalga *Gracilaria chilensis*. Se obtuvieron cristales de la proteína (18 mg/ml) mediante la técnica de la gota sentada usando sulfato de amonio como agente precipitante. Los datos fueron recolectados en una línea del sincrotrón IMCA-CAT (1 Å). La proteína cristalizó en el grupo espacial P2₁ con parámetros de celda: a = 105.75 Å, b = 173.78 Å, c = 151.99 Å; α = β = γ = 90°. Para la obtención de la fase se utilizó Reemplazo Molecular (Molde: 1cpc) mediante el programa AmoRe en el paquete CNS 1.0. El modelo se refinó hasta R_{cryst} = 0.195 y un R_{free} = 0.24.

La estructura básica de esta proteína son las subunidades α (164 residuos, Ficocianobilina en C⁸⁴) y β (172 residuos, 2 ficocianobilinas en C⁸² y C¹⁵³). Ambas subunidades presentan estructuras helicoidales e interactúan para formar un monómero muy estable (αβ). Seis de éstos se asocian para formar un hexámero (αβ)₆ arreglo que les permite apilarse para formar parte de las varillas de los ficobilisomas y efectuar la función de conducción de luz.

En este reporte se informa además la secuencia de la proteína y un análisis comparativo con las secuencias y estructuras de ficocianinas de cianobacterias.

Proyecto DIUC:202.31.91-1.0

ESTUDIOS SOBRE EL MECANISMO DE INHIBICIÓN DE FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA POR FRUCTOSA 2,6-BISFOSFATO Y POR EXCESO DE SUSTRATO. (Studies on the mechanism of inhibition of fructose 1,6-bisphosphatase by Fru 2,6-P₂ and high substrate concentration). Asenjo, J., Yáñez, A.J., Droppelmann, C., Ludwig, H., Cárcamo, J.G. y Slebe, J.C. *Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile.*

La actividad catalítica de la enzima gluconeogénica fructosa 1,6-bisfosfatasa es modulada por los inhibidores AMP y fructosa 2,6-bisfosfato (Fru 2,6-P₂). La inhibición de la enzima tetramérica por Fru 2,6-P₂ es aún controvertida. Asimismo, se desconoce el mecanismo de inhibición de la enzima por altas concentraciones de sustrato (> 50 μM). La naturaleza competitiva de la inhibición y los estudios de cristalografía sugieren que Fru 2,6-P₂ se une al sitio activo. Sin embargo, estudios cinéticos y de modificación química realizados en nuestro laboratorio sugieren que la enzima tiene un "dominio de unión de fructosa-bisfosfatos", que puede acomodar tanto al sustrato como al Fru 2,6-P₂, pero en el que cada ligando ocupa distintos determinantes de unión. En este trabajo se usaron enzimas mutantes, generadas previamente, las cuales tienen un único residuo de triptófano en la posición 219 o 232. Los estudios de fluorescencia mostraron que la mutante F219W fue capaz de sensar la unión de sustrato a concentraciones catalíticas, pero no la unión de Fru 2,6-P₂. Como era de esperar, el Fru 2,6-P₂ fue competidor de la unión del Fru 1,6-P₂. Por otra parte, la mutante F232W sensó la unión de sustrato a concentraciones inhibitorias y, además, la unión de Fru 2,6-P₂; sorprendentemente, los cambios no fueron excluyentes. Los datos indican que Fru 2,6-P₂ y el sustrato a concentraciones inhibitorias se unen simultáneamente a la enzima. Se discutirá si el mecanismo de inhibición por Fru 2,6-P₂ y por exceso de sustrato implica asimetría intrínseca para la unión de los ligandos bisfosfatos a la enzima tetramérica. (FONDECYT 1010720; MECESUP AUS 0006).

FOSFORILACIÓN DEL INSERTO L DE CK1 α L DE PEZ CEBRA (*Danio rerio*) POR LA PROTEÍNA QUINASA DEPENDIENTE DE CAMP (PKA) (Phosphorylation of the L insert of CK1 α L of Zebrafish by the cAMP-dependent protein kinase (PKA)) **Budini, M.**, Jacob, G., Burzio, V., Allende, C.C. y Allende, J.E. Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

La proteína quinasa CK1 es una enzima altamente ubicua, encontrándose desde la levadura hasta el hombre, y que conforma una subfamilia aparte dentro de la gran familia de las proteínas quinasas. Existen varias isoformas para esta enzima y en mamíferos se han encontrado siete variantes denominadas CK1 α , CK1 β , CK1 γ 1, γ 2, γ 3, CK1 δ y CK1 ϵ , codificadas por genes distintos. Mediante procesamiento alternativo, la isoforma CK1 α puede generar cuatro variantes (subisoformas), dependiendo de la presencia o ausencia de dos insertos. El inserto "L" está formado por 28 aminoácidos y se ubica en el medio del dominio catalítico, mientras que el inserto S, que posee 12 aminoácidos, se ubica en el extremo C-terminal de la proteína. De esta manera se obtienen las subisoformas CK1 α , CK1 α L, CK1 α S y CK1 α L.S. Recientemente estas variantes han sido clonadas y caracterizadas en pez cebra (*Danio rerio*), encontrándose que la presencia de estos insertos, principalmente del inserto "L", le confieren a estas variantes características bioquímicas y celulares distintivas (Burzio et al. J. Cell Biochem. 86:805-814 (2002). Estudios de la secuencia de aminoácidos del inserto "L" de CK1 α L de pez cebra revelaron un sitio putativo para la fosforilación por la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA). Estudios con las subisoformas CK1 α y CK1 α L recombinantes expresadas en bacterias permitieron determinar que la PKA fosforila eficientemente a CK1 α L y no a CK1 α . Mediante el clonamiento, expresión y purificación del inserto "L" como proteína de fusión a GST, así como también a través del desarrollo, clonamiento, expresión y purificación de una mutante puntual de CK1 α L, a la cual se le cambió la serina blanco para la fosforilación por PKA por alanina (CK1 α LS164A), se pudo determinar que el inserto "L" de CK1 α L de pez cebra es fosforilado *in vitro* por la PKA en el sitio predicho. A raíz de este resultado, se están haciendo estudios para comprobar si esta fosforilación afecta la actividad de la enzima, y además, en un futuro se verificará si esta fosforilación es observada también *in vivo*. Apoyado por FONDECYT y The Wellcome Trust.

PROPIEDADES CINÉTICAS DE LA AGMATINASA DE *Escherichia coli* (Kinetic properties of *escherichia coli* agmatinase) **Orellana M. S.**, Enríquez P., Uribe E., López V., Salas M. y Carvajal N. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

La agmatinasa (E.C. 3.5.3.11) cataliza la hidrólisis de la agmatina en putrescina y urea. Por el tipo de reacción que cataliza, la estructura de su sustrato y su secuencia de aminoácidos, se la incluye en la familia de las arginasas. De acuerdo a nuestros estudios, al igual que la arginasa, requiere de Mn²⁺ para su acción catalítica y, en su estado de máxima activación, contendría un centro binuclear metálico. Además, nuestros estudios de modificación química, mutagénesis sitio-dirigida y modelaje molecular, muestran una estrecha analogía en las estructuras de los sitios activos de ambas enzimas. En este trabajo, hemos analizado las propiedades cinéticas de la agmatinasa de *E. coli*.

Al pH óptimo (9,5), la putrescina y la guanidina, empleada como análogo estructural de la urea, inhibieron en forma competitiva lineal; estudios de doble inhibición indicaron la formación de un complejo enzima-putrescina-guanidina, que consideramos análogo al complejo enzima-putrescina-urea generado en el curso de la reacción de hidrólisis. Sugerimos que la salida de los productos es al azar y en equilibrio rápido. A pH 7,5, y sólo en presencia de putrescina, se observaron efectos cooperativos para el sustrato. A este pH, la inhibición por putrescina fue parabólica. Se sugiere la presencia de un sitio alostérico (para putrescina ?) en el sitio activo de la agmatinasa de *E. coli*; cambios conformacionales generados por la unión de un ligando a este sitio, explicarían la expresión de efectos cooperativos para el sustrato. Proyecto Fondecyt 1030038

BIOLOGÍA MOLECULAR I

LA TRANSFERENCIA DE GENES DESDE LA MITOCONDRIA AL NÚCLEO DURANTE LA EVOLUCIÓN DE LAS PLANTAS: EL EJEMPLO DE RPL5 y RPS14 EN MONOCOTILEDÓNEAS. (Gene transfer from the mitochondrion to the nucleus during plant evolution: the example of RPL5 and RPS14 in monocots.) **Clément, P.**, Sandoval, P., León, G., Gómez, I., Carmona, R., Figueroa, P. y Jordana, X. Lab. de Bioquímica, Dep. de Genética Molecular y Microbiología, Fac. Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

La transferencia génica desde la mitocondria al núcleo es un fenómeno que está aún en marcha en plantas. Luego de ocurrida la transferencia, el gen mitocondrial debe adquirir las señales necesarias para su correcta expresión y para la destinación de la proteína a la mitocondria. Para comprender mejor esta transferencia, se estudió la evolución del locus mitocondrial RPL5-RPS14 en monocotiledóneas. En el genoma mitocondrial de trigo RPL5 es funcional y RPS14 es un pseudogen, mientras que en maíz la mitocondria carece de estos genes. En trigo y en maíz el gen RPS14 funcional se encuentra en el núcleo, dentro del intrón del gen SDH2, y requiere para su expresión del "splicing" alternativo de un transcrito SDH2-RPS14. Durante la germinación, la expresión de este locus aumenta, obteniéndose un patrón de inducción similar para los dos transcritos alternativos. Nuestros datos permiten concluir que la transferencia de RPS14 ocurrió antes de la divergencia de trigo, maíz y arroz, y que RPL5 fue transferido recientemente, y en forma independiente, en maíz y trigo. La transferencia en trigo resultó una sorpresa por cuanto significa que en esta especie coexisten dos copias funcionales de RPL5, una mitocondrial y otra nuclear, lo que constituye probablemente una etapa intermedia en el proceso de transferencia.

Financiado por Fondecyt 1020930, 7020930, 3010040 y por PICS 2179.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS DIFERENTES MÉTODOS PARA EL CÁLCULO DE LAS TEMPERATURAS DE HIBRIDIZACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE ADN, (comparative assessment of melting temperature calculation methods for short DNA sequences), **Panjovich A.** y Melo, F. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Ciencias Biológicas, Depto. Genética Molecular y Microbiología, Laboratorio de Bioinformática Molecular, Alameda 340, Santiago, Chile.

La implementación exitosa de las técnicas de PCR múltiple y de microarreglos de ADN tiene requerimientos muy estrictos en términos de temperaturas óptimas de hibridización. En estas técnicas, un gran número de oligonucleótidos hibridizan de manera simultánea bajo idénticas condiciones experimentales, que envuelven parámetros altamente relevantes tales como la temperatura y la concentración de sales. En estos casos las exigencias de precisión en el cálculo de las temperaturas de hibridización se hacen muy relevantes. Existen tres métodos para calcular la temperatura de fusión de oligonucleótidos de ADN: uno denominado 'básico' que sólo considera la longitud de la secuencia y su composición de bases nitrogenadas; otro denominado 'ajustado por sal' en el cual se aplica una corrección que considera la concentración de sales en solución; y otro método más complejo basado en parámetros termodinámicos obtenidos experimentalmente, el cual se denomina 'vecinos cercanos' (nearest neighbors). El objetivo principal de este trabajo ha sido comparar los valores de temperaturas de hibridización obtenidos al utilizar los distintos métodos y parámetros publicados, analizar sus similitudes y diferencias en un espacio definido y concertado en términos de longitud y contenido de CG, y evaluar su correlación con datos publicados de las temperaturas de hibridización para una serie de oligonucleótidos que han sido obtenidos experimentalmente. Este trabajo ha sido financiado por FONDEF #G02S1001.

EL PRODUCTO DEL GEN *ISCS* DE *Geobacillus stearothermophilus* V CONFIERE RESISTENCIA A TELURITO DE POTASIO (K2TEO3) EN *Escherichia coli* (The product of the *iscS* gene from *Geobacillus stearothermophilus* V mediates resistance to potassium tellurite in *Escherichia coli*). **Vásquez, C.**; Araya, M.A.; Saavedra, C.; Pérez, J.M.; Fuentes, D.; Calderón, I.; González, D. y Tantaléan, J.C. Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.

Los mecanismos de resistencia bacteriana a K2TeO3 no son bien conocidos. La idea actual es que vías del metabolismo primario podrían estar participando en el fenómeno. Interesados en estudiar el tema construimos genotecas de *G. stearothermophilus* V (naturalmente resistente a K2TeO3) y se transformó con ellas *E. coli* (sensible a K2TeO3) seleccionando por adquisición directa de resistencia (TelR). Uno de estos clones TelR contiene 3.461 pb clonados en pSP72. Tres marcos de lectura abiertos (ORFs): ORF1 (687pb), ORF2 (1200 pb) y ORF3 (963 pb), que especifican respectivamente una metalopeptidasa, una cisteína desulfurasa y una aminopeptidasa fueron identificados en el inserto. Se demostró que el ORF2 es el único responsable de conferir resistencia a K2TeO3 en *E. coli*. El producto de este gen (*iscS*) es una cisteína desulfurasa (IscS) PLP-dependiente que fue sobreexpresada y purificada a homogeneidad. La proteína nativa es un homodímero (45 kDa/subunidad) y el fenotipo TelR es dependiente de su actividad. Otra evidencia que indicó una relación entre la expresión de este gen y resistencia a K2TeO3 provino de la complementación de cepas *E. coli iscS*- (hipersensibles a K2TeO3). La introducción del gen *iscS* del bacilo a estas células resultó en un fenotipo TelR y en la recuperación parcial del fenotipo de crecimiento lento de esta cepa. Por otro lado, cepas de *E. coli* mutantes en SOD también adquirieron resistencia a K2TeO3 cuando fueron transformadas con el gen *iscS*, sugiriendo que la toxicidad del telurito podría estar relacionada a un daño oxidativo. Financiado por Fondecyt 1030234 y Dicyt, USACH.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN DE NUCLEOLINA DEL PEZ *Cyprinus carpio*. (Isolation and characterization of carp nucleolin gene). **Quezada, C.**, Navarro, C. Alvarez, M., Molina, A y Vera M.I. Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Universidad Nacional Andrés Bello. MIFAB.

Nucleolina, la proteína más abundante del nucléolo, participa en numerosas etapas de la biogénesis ribosomal tales como la regulación de la transcripción del rRNA, procesamiento del precursor, ensamblaje de las partículas ribosomales y su transporte hacia el citoplasma. Hemos determinado que una expresión elevada de nucleolina está directamente relacionada con la segregación de los componentes nucleolares observada en células de carpa adaptadas a las condiciones de invierno lo que implica una inactivación temporal de la expresión de los genes ribosomales. Para reconocer los posibles elementos implicados en la regulación de la expresión diferencial de nucleolina en este pez, hemos aislado y caracterizado el gen de nucleolina de carpa. Este alcanza 8,8 Kb y, a diferencia de lo descrito en mamíferos, está organizado en 16 exones y en algunos intrones están codificados los pequeños RNA nucleolares snoRNA U20, U23 y U82. Los snoRNA U20 y U82 mantienen una zona de perfecta complementariedad con el rRNA 18S de carpa. El promotor de este gen carece de una caja TATA consenso y posee características de genes constitutivos tales como cajas C/G, cajas ricas en pirimidinas e islas CpG. Hemos identificado dos cDNAs distintos que codifican para nucleolina de carpa, los cuales no corresponden a la secuencia del clon genómico, implicando la existencia de múltiples genes. El análisis de las proteínas derivadas desde estos cDNAs indican la presencia de dominios ácidos adicionales a los descritos en mamíferos. Proyecto DI-UNAB-9301.

OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO PARA UN RNA NO CODIFICANTE INDUCEN APOPTOSIS SELECTIVA EN CÉLULAS TUMORALES. (Antisense oligonucleotides to a non-coding RNA induce selective apoptosis of tumor cells). **Villegas, J.**^{1,2}, Burzio, V.¹, Villota, C.¹, Santander, M.¹, Martínez, R.¹ y Burzio, L.O.^{1,2}. ¹Instituto Milenio de Biología Fundamental y Aplicada (MIFAB), ¹BiosChile I.G.S.A., ¹Fundación Ciencia Para La Vida, Av. Maratón 1943, y ²Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello, República 252, Santiago, Chile.

Hemos caracterizado un nuevo RNA (RNA antisentido) no codificante en células humanas en proliferación, el cual contiene un repetido invertido que varía entre 187 y 365 nucleótidos unido covalentemente al RNA 16S mitocondrial antisentido o transcrito de la hebra L del mtDNA. Esta familia de RNAs se expresa en células normales en proliferación (linfocitos estimulados con fitohemaglutinina) a un nivel semejante al RNA quimérico mitocondrial, el cual contiene un largo repetido invertido unido el RNA ribosomal 16S mitocondrial (RNA sentido). En contraste, células tumorales (HL-60, HeLa, SiHa, Hep-G2, Hep-2, linfoma B, melanoma, células leucémicas y mieloma) expresan el RNA sentido pero muy pocas copias del RNA antisentido. La expresión diferencial de estos transcritos permite distinguir claramente una célula normal de una tumoral. El tratamiento de células tumorales con oligonucleótidos complementarios al RNA antisentido inducen apoptosis en más del 90% de ellas y en un periodo de alrededor de 6 h. El tratamiento con los oligos induce fragmentación nuclear, vacuolización del citoplasma, fragmentación del DNA y activación de caspasas. La inducción de apoptosis es específica pues no se induce apoptosis en células normales en proliferación o en células no proliferantes. (Proy. P99-007, MIFAB y DI-02-02 y DI 02-02, Universidad Nacional Andrés Bello).

PROCESAMIENTO ALTERNATIVO DE RNA MENSAJEROS DE GENES DE CAROTENOGÉNESIS EN *Xanthophyllomyces dendrorhous*. (Alternative splicing of messenger RNAs of carotenogenesis genes in *Xanthophyllomyces dendrorhous*). **Lodato, P.**; Alcaíno, J.; Niklitschek, M.; Barahona, S.; Retamales, P. y Cifuentes, V. Lab. de Genética, Depto de Cs. Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

El estudio genético de la ruta de biosíntesis de astaxantina de *X. dendrorhous*, nos ha conducido a clonar los cDNA de sus genes. Durante el proceso de clonación del cDNA de los genes *crtI* y *crtYB*, además del cDNA sintetizado a partir de un mRNA maduro, se obtuvieron clones cuyo cDNA que se habría sintetizado a partir de mensajeros procesados en forma alternativa. El análisis de la secuencia del cDNA proveniente del mRNA alternativo del gen *crtI*, indica que este último se habría procesado en un sitio 3' aceptor (AG) alternativo de procesamiento ubicado dentro del primer intrón, generando el mensajero que conserva 80 nucleótidos de este intrón. Por otra parte, el cDNA alternativo del gen *crtYB*, se originó de un mRNA que se habría procesado en un sitio 5' (GT) no esperado dentro del primer intrón y un sitio 3' aceptor (AG) alternativo de procesamiento ubicado dentro del segundo exón. El mensajero alternativo del gen *crtYB* habría conservado 55 nucleótidos del primer intrón y perdido 111 nucleótidos del segundo exón. Adicionalmente, en estos tipos de mensajeros se originan codones de término de la traducción. Sin embargo, al interior de ambos transcritos se reestablece un nuevo marco de lectura generando un producto que carece, en el extremo N-terminal, de los primeros 81 aa de la fitoeno desaturasa (*crtI*) y 153 aa de la fitoeno sintasa-licopeno ciclasa (*crtYB*). La relación entre mRNA maduro y mRNA alternativo sugiere que el procesamiento alternativo podría regular la concentración celular de estas proteínas. Agradecimiento: DAAD y Fundación María Ghilardi Venegas.

CARACTERIZACIÓN DE PHACGY-1, UN RETRO-TRANSPOSÓN DE LA FAMILIA GYPSY, DEL BASIDIOMICETE *Phanerochaete chrysosporium*. (Characterization of Phacgy-1, a gypsy-like retrotransposon from the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*). **Larrondo, L.F.1,** Cullen, D.2 y Vicuña, R.1. 1Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile and Millenium Institute for Fundamental and Applied Biology. 2USDA Forest Products Laboratory, Madison, Wisconsin 53705, USA

La secuenciación del genoma del basidiomicete *Phanerochaete chrysosporium*, reveló la existencia de variados elementos móviles. En este trabajo describimos la presencia en el doceavo intrón del gen *mco3* de Phacgy-1, un retrotransposón clase I perteneciente a la familia Gypsy. Phacgy-1 (8,1 kb) posee elementos repetidos terminales (LTRs) de 336 nt los cuales están flanqueados por duplicaciones de 5 nt en el sitio de inserción. *mco3*, codifica para una oxidasa multicobre y se encuentra en el extremo distal de un cluster de 25 kb de 4 genes *mco*. Phacgy-1 esta presente en solo uno de los alelos para *mco3*, y la alta homología de secuencia entre ambos alelos así como la presencia de transcrito, sugiere su inserción reciente. El análisis *in silico* del genoma de *P. chrysosporium* mostró la presencia de 16 secuencias coincidentes con el LTR de Phacgy-1. La mayoría se ubica como *solo* LTRs, en los extremos de los scaffolds, lo cual sugiere problemas en el ensamblaje debido a la alta homología de las numerosas copias para retrotransposón. Esto se ve confirmado por el análisis por Southern blot de *P. chrysosporium*, el que sugiere la existencia de múltiples copias de este elemento. Uno de los *solo* LTRs efectivamente corresponde a una secuencia individual y no a parte de un retroelemento intacto, tal como se pudo comprobar mediante su clonamiento. Dicho LTR se encuentra presente en el promotor (-300) de un gen para un citocromo p450, y al igual que lo observado para *mco3*, solo interviene uno de los alelos. Se discutirá la posible significancia e impacto de los retroelementos en la evolución de los genomas fúngicos, así como su posible rol en la generación de familias multigenicas. Este trabajo fue financiado por MIFAB y FONDECYT 2000076 y 1030495.

SPH-PROTEASA ES INCAPAZ DE DEGRADAR HISTONAS ESPERMATICAS ORGANIZADAS EN NUCLEOSOMAS. (SpH-protease is unable to degrade sperm histones when this histones are organized as nucleosomes). **Irribaren C.,** Morín V., Puchi M., e Imschenetzky M. Departamento de Biología Molecular , Universidad de Concepción.

La degradación de histonas espermáticas (SpH) catalizada por SpH-proteasa es un evento fundamental para la formación del pronucleo masculino post-fecundación. Esta proteasa digiere selectivamente la histonas espermáticas (SpH) sin afectar las histonas de origen materno (variantes CS). Hemos determinado previamente que tanto la polyADPRibosilación de variantes CS como la fosforilación de SpH2B y SpH1 que caracteriza los estados intermedios de remodelación de cromatina espermática, protege estas histonas frente a la acción de SpH-proteasa. Basados en esta evidencias hemos elaborado un modelo representativo de los eventos que determinan la remodelación de cromatina espermática post-fecundación. En este escenario hay aspectos aun no resueltos pues se desconoce si SpH- proteasa es capaz de degradar las SpH organizadas en nucleosomas o si es necesario que las SpH sean desplazadas de ADN previo a su proteólisis. Con el objeto de abordar este problema se purificó SpH-proteasa desde cigotos y se probó su acción *in vitro* sobre nucleosomas aislados de espermatozoides. La purificación de SpH proteasa fue realizada por su extracción inicial desde núcleos y su purificación parcial por gradiente de sacarosa seguida de filtración en Sephadex G-100. Los nucleosomas espermáticos fueron obtenidos por digestión de cromatina con nucleasa micrococcal. Los resultados obtenidos indican que las histonas organizadas como nucleosomas no son degradadas por SpH proteasa. Paralelamente, se determinó que ADN libre es capaz de inhibir la actividad de SpH-proteasa *in vitro*. En base a estos resultados se postula que para la proteólisis de SpH se requiere que estas proteínas que liberen de cromatina en forma previa a su degradación.

GRANTS : FONDECYT 1011063. DIUC : 200031088.

BIOMEDICINA

INCIDENCIA DE MUTACIONES EN LOS GENES BRCA1 Y BRCA2 EN MUJERES CHILENAS CON CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO. (BRCA1 AND BRCA2 (Mutation status in Chilean women with hereditary breast cancer) **IRubio L;** ¹Gallardo M; ¹Silva A; ¹Palma L; ¹Salinas M; ¹Faúndez P; ¹Alvarez C; ²Alvarez M; ¹Carvallo P. ¹Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, ²Centro de Cáncer, Facultad de Medicina. Pontificia U. Católica de Chile

Se estima que un 5 a 10% de los cánceres mamarios tienen un componente hereditario. Los genes BRCA1 y BRCA2, han sido identificados como los genes más importantes en la predisposición al cáncer de mama y/u ovario hereditario. Estudios realizados alrededor del mundo han revelado la presencia de casi 3000 mutaciones para ambos genes. La frecuencia de familias que presentan mutaciones en uno u otro gen, varía según el origen étnico de la población analizada. En este trabajo se realizó un análisis molecular de ambos genes, en 45 familias chilenas con cáncer de mama, por medio de las técnicas de SSCP, heterodobletes, ensayo de proteína trunca (PTT) y secuenciación del DNA. Se detectaron en total tres mutaciones en BRCA1, dos de las cuales no habían sido descritas (308insA, 3936C/T) y una tercera mutación ya descrita en la población Judía Ashkenazi (185delAG). Para el caso de BRCA2 se encontraron 4 mutaciones, una descrita para la población Judía Ashkenazi (6174delT), 2 mutaciones descritas en familias españolas (6857delAA, 5373delGTAT) y una nueva mutación no descrita (4970insTG). Estos resultados revelan que en Chile existe un 8,8% de las familias que presentan mutaciones en BRCA1 y un 11% presenta mutaciones en BRCA2. Se puede concluir que los genes BRCA1 y BRCA2 dan cuenta de alrededor de un 20% de los casos de cáncer de mama y/u ovario familiar en Chile y que es necesario investigar sobre otros genes responsables de esta patología. (Financiado por FONDECYT 1011076).

ANÁLISIS DE NEUROTROFINAS Y FGF-2 EN PACIENTES CON PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL (Neurotrophins and FGF-2 in patients with tropical spastic paraparesis). **Kettlun¹, AM,** Albrecht¹, D. Cartier², L. García¹, L. Collados¹, L. Valenzuela¹, MA. ¹Depto Bioquímica y Biología Molecular, Fac Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Univ. de Chile; ²Depto Ciencias Neurológicas, Fac Medicina, Univ. de Chile.

La Paraparesia Espástica Tropical (TSP/HAM) es una neuromiopatía progresiva con pérdida de los haces corticoespirales que presentan algunos individuos infectados con el virus HTLV-I. Se observa un engrosamiento de los vasos sanguíneos del SNC y meninges. El daño axonal podría relacionarse con cambios en la expresión o reincorporación de factores tróficos, lo que podría detectarse en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y cortes de médula espinal.

Utilizando anticuerpos mono y policlonales mono-específicos, se midieron los niveles de NGF, NT-3, NT-4/5, BDNF, GDNF, CNTF y FGF-2 en el LCR de pacientes con TSP/HAM y controles, y además se realizó un estudio de NGF y FGF-2 en muestras de anatomía patológica de médula espinal de TSP/HAM y controles. Se observaron sólo diferencias significativas en los niveles de NGF y FGF-2 en LCR de los pacientes con TSP/HAM comparado con los controles. Los estudios de inmuno-histoquímica mostraron una mayor inmunoreactividad de NGF en neuronas, oligodendrocitos y astrocitos, y asimismo, un aumento de FGF-2 en células motoras y gliales.

Los niveles elevados de estos dos factores tróficos podrían atribuirse a alteraciones en sus respectivos receptores impidiendo su ingreso a la neurona y su correspondiente transporte retrógrado hacia el soma, o bien a un aumento de su síntesis producido como respuesta del hospedero para contrarrestar el daño viral y intentar la regeneración axonal.

Financiado con Proyecto Fondecyt 1000-874

REGULACIÓN DE LAS VÍAS TRANSDUCCIONALES ASOCIADAS A NEUROPROTECCIÓN EN HIPOCAMPO DE RATA INDUCIDAS POR VARIACIONES EN LOS NIVELES DE GLUCOCORTICOIDES. (Regulation of signal transduction pathways associated with neuroprotection in the rat hippocampus induced by variations in glucocorticoids level). **Andrés, S. ¹,** Parra, C. ², Bravo, J. ¹, Lara, HL. ¹, Morales, P. ³, Fiedler, JL. ¹. ¹Laboratorio Neurobioquímica. Depto. Bioquímica y Biología molecular. Fac.Cs. Químicas y Farmacéuticas. U.Chile. ² Dirección Cs Básicas UNICIT. ³ Programa de Farmacología. ICBM.Fac.Medicina.U.Chile.

Estudios clínicos sugieren que los niveles elevados y persistentes de glucocorticoides (GCs) afectan las capacidades cognitivas y emocionales, mediante alteraciones funcionales del hipocampo. Alzas en los GCs inducen apoptosis en la región CA3 del hipocampo de rata, mientras que la reducción en los GCs, causada por adrenalectomía (ADX), induce un aumento en la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, sugiriendo que los GCs inhiben vías de transducción asociadas a neuroprotección. En el presente trabajo se evaluaron los efectos de los GCs sobre la vía MAPK-Erk1/2, la cual induce fosforilación e inactivación de la proteína pro-apoptótica BAD. Para esto se adrenalectomizaron ratas, las que se mantuvieron durante 5 días con o sin reposición de corticosterona. Mediante la técnica de Western Blot se midieron los niveles de Erk(p44/p42) y BAD, observando un aumento en el patrón de fosforilación de ambas proteínas. En el caso de Erk sólo se vio un aumento en p44. Estos resultados darían cuenta de la influencia de los GCs sobre estas vías de señalización celular a nivel del hipocampo.

Memorias2003, CEPEDQ 2002, UNICIT B-010-0312

REGULACION DE LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DEL RECEPTOR OPIOIDE KAPPA POR NURR1. (Regulation of the kappa-opioid receptor promoter by Nurr1) **Fuentealba, J. A.,** Barría, M. I. y Andrés, M. E. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

La neurotransmisión dopaminérgica mesolímbica es regulada en forma directa por agonistas del receptor opioide kappa (KOR). La administración aguda de agonistas opioides kappa produce una disminución en los niveles extracelulares de dopamina (DA) en el Núcleo Accumbens (Nacc), un efecto contrario al que producen las drogas de abuso como cocaína. Por otra parte, la administración crónica de agonistas kappa produce un fenómeno de sensibilización de este sistema. Nurr1 es un factor de transcripción de la familia de los receptores nucleares huérfanos. Se ha determinado que el ratón deficiente en Nurr1 carece de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas. Además, Nurr1 regula la expresión de proteínas características del fenotipo dopaminérgico como son la tirosina hidroxilasa y el transportador de DA. Es importante destacar que el transportador de DA colocaliza con KOR en las terminales dopaminérgicas en el Nacc (Svingos et al., 2001). El objetivo de este trabajo es determinar si la expresión de KOR es regulada por Nurr1. Con este fin, se clonó un kilobase del promotor de KOR en el gen reportero pGL3b (pGL3-KOR) y se cotransfectó en células PC12 junto a distintas concentraciones del vector de expresión pCGN Nurr1. Los resultados muestran un aumento dosis dependiente en la expresión del gen reportero pGL3-KOR por Nurr1. Para proyectar este trabajo se determinará que elementos del promotor subyacen a la regulación ejercida por Nurr1.

Fondecyt # 103-0496. J. A. F. es becario CONICYT.

DEHIDROLEUCODINA: INHIBIDOR DE PROLIFERACIÓN Y POSIBLE INDUCTOR DE APOPTOSIS EN *Trypanosoma cruzi*. (Dehydroleucodine: Proliferation inhibitor and possible apoptosis inductor in *Trypanosoma cruzi*) **Jiménez, V.** Paredes, R., y Galanti, N. Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La enfermedad de Chagas es una endemia que se extiende por América Latina, afectando a 24 millones de individuos, con una población de riesgo que comprende a niños, embarazadas e inmunocomprometidos.

Su agente causal es un protozoario parásito, el *Trypanosoma cruzi*, que se transmite por picadura de insectos hematófagos, transfusiones sanguíneas, trasplante de órganos y por vía transplacentaria. Hemos estudiado el efecto de un sesquiterpeno lactona, la dehidroleucodina (DhL), sobre epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial y cultivos sincronizados, demostrando que concentraciones de 2.5 µg/ml de este agente, tienen un efecto antiproliferativo sobre los parásitos, sin afectar su viabilidad. Este efecto es reversible a bajas concentraciones; sin embargo, la mortalidad aumenta de manera notoria con concentraciones mayores de DhL.

El efecto antiproliferativo de la DhL se acompaña de una marcada disminución en la síntesis de proteínas y DNA, observándose también la presencia de núcleos apoptóticos detectados por la técnica de TUNEL y activación de efectores apoptóticos del tipo de las caspasas.

La DhL y otras moléculas del grupo de las sesquiterpeno lactonas podrían representar una novedosa alternativa farmacológica para combatir la enfermedad de Chagas, que aún no cuenta con una terapéutica eficaz.

ACTIVIDADES MMPásicas y TIMPs EN FLUIDO CREVICULAR GINGIVAL DE PACIENTES CON PERIODONTITIS. (MMPase activities and TIMPs in gingival crevicular fluid from patients with periodontitis) **Pozo^{1,2}P,** Gamonal³J, Melej⁴C, Chávez²P, Collados¹L, Kettlun¹AM, Valenzuela¹MA. ¹Depto Bioquímica y Biología Molecular, Fac Cs Quím y Farmacéuticas, U Chile; ²Centro de Biotecnología y Biología Molecular, U Antofagasta; ³Depto Odontología Conservadora, Fac Odontología, U Chile; ⁴Depto Odontología, Fac Cs Salud, U Antofagasta.

La periodontitis implica la destrucción de matriz extracelular (MEC) producida por periodontopatógenos, encontrándose en el fluido crevicular gingival (FCG) un aumento de citoquinas y de metaloproteinasas (MMPs). Las MMPs son secretadas hacia el FCG por los fibroblastos gingivales (MMP-2) y neutrófilo (MMP-8 y MMP-9). En condiciones fisiológicas estas MMPs se encuentran asociadas a sus inhibidores tisulares (TIMPs).

Los propósitos del presente trabajo fueron: 1) determinar actividades MMPásicas utilizando dos métodos: zimografía y fluorimétrico. El primero detecta la actividad gelatinolítica puesto que los geles de SDS/PAGE (en condiciones no reductoras) se polimerizan en presencia de gelatina lo que permite detectar las actividades de MMP-2 y MMP-9. El segundo mide la actividad MMPásica total utilizando un péptido fluorogénico que al ser hidrolizado aumenta su fluorescencia. 2) Además determinar las distintas formas de MMP-8 (immunowestern blot) y niveles relativos de TIMP-1 y -2 mediante análisis inmunológico.

Se encontró una mejor correlación entre la severidad de la enfermedad (profundidad de sitio) y la actividad MMPásica seguida por el método fluorimétrico, que con las mediciones de MMP-9 por zimografía. En los sitios de mayor severidad se encontró presente las formas de MMP-8 activadas (menor PM) y finalmente, TIMP-1 se encontró disminuido en los sitios de mayor profundidad, no variando los otros TIMPs.

Financiado por Proyecto Fondecyt 102 0100.

APOPTOSIS Y FERTILIDAD DE QUISTES HIDATÍDICOS DE *Echinococcus granulosus*. (Apoptosis and fertility of *Echinococcus granulosus* hydatid cysts). **Paredes, R.,** Jiménez, V. y Galanti, N. Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La hidatidosis es una zoonosis causada por el estado larval (quiste hidatídico) de *Echinococcus granulosus* en hospederos intermedios. Afecta a herbívoros y al hombre. Los quistes hidatídicos presentan una capa germinal interna que puede formar protoescolices, estado del parásito infectivo para hospederos definitivos, usualmente el perro (quistes fértiles). En algunos hospederos intermediarios, se encuentran quistes con capa germinal que no producen protoescolices (infértiles). No se conoce el mecanismo que induce la infertilidad de los quistes hidatídicos.

Por fraccionamiento subcelular y Western blot se ha detectado IgGs del hospedero en el núcleo de células de la capa germinal de los quistes. Mediante TUNEL, además de la observación de núcleos picnóticos y de cuerpos apoptóticos, se ha encontrado que la capa germinal de quistes infértiles presenta mayor número de células en apoptosis que la de quistes fértiles. Las células en apoptosis de quistes infértiles se encuentran distribuidas en parches.

Adicionalmente, se ha encontrado presencia de caspasa 3 activa en la capa germinal de quistes infértiles; esta forma de la enzima no se encuentra en capa germinal de quistes fértiles.

Se propone que en hospederos portadores de quistes infértiles se encuentra presente una subfamilia de IgGs con la propiedad de ingresar al núcleo de las células de la capa germinal de los quistes hidatídicos e inducir infertilidad por activación de apoptosis.

Financiamiento: Proyectos FONDECYT N° 1010817 y SIDA/SAREC Network.

BIOLOGÍA MOLECULAR II

CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO TRANSCRIPCIONAL DE PC-FET3, UN GEN DE *Phanerochaete chrysosporium* QUE CODIFICA PARA UNA OXIDASA MULTICOBRE INVOLUCRADA EN LA HOMEOSTASIS INTRACELULAR DE HIERRO. (Characterization and transcriptional study of *Pc-fet3*, a *Phanerochaete chrysosporium* gene encoding for a multicopper oxidase involved in intracellular iron homeostasis). **Canessa P.**, Larrondo L. F. y Vicuña R. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile and Millenium Institute for Fundamental and Applied Biology.

El hierro es un elemento traza esencial, que en altos niveles se vuelve tóxico para la célula, de manera que mecanismos eficientes y controlados que regulen su captación, son fundamentales. En levaduras y otros ascomicetes se ha descrito la presencia de Fet3, una oxidasa multicobre unida a membrana que posee una fuerte actividad ferroxidasa. Fet3 cumple un papel esencial oxidando Fe(II) a Fe(III) para su subsecuente entrada a la célula a través de la permeasa Ftr1. Previamente hemos descrito en *P. chrysosporium* la existencia de Mco1, una oxidasa multicobre extracelular con una fuerte actividad ferroxidasa. Aunque Mco1 presenta características similares a las Fet3s, carece del dominio de transmembrana característico de este grupo. Con el fin de descartar la posibilidad que Mco1 codifique para el ortólogo de Fet3, buscamos en el genoma de *P. chrysosporium* la presencia de dicho gen, clonándose y secuenciándose *Pc-fet3*. Éste codifica para una proteína de 628 aa con una homología a otras Fet3s cercana al 40%. Al igual que todos los miembros de dicha familia, presenta un dominio de transmembrana localizado en el extremo C-terminal. *Pc-fet3* se encuentra a solo 0,8 kb del ortólogo del gen *ftr1*, cuyo cDNA fue también caracterizado. Estudios transcripcionales muestran que, al igual que lo descrito en otros sistemas, la expresión de *Pc-fet3* es fuertemente regulada por hierro. Esta constituye la primera descripción de secuencias para *fet3* y *ftr1* en basidiomicetes. Estudios actuales están concentrados en la caracterización fisiológica de *Pc-Fet3* así como a su interrelación transcripcional con *Pc-ftr1*. Este trabajo fue financiado por MIFAB y FONDECYT 2000076 y 1030495.

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA A ESTRÉS EN VIDES UTILIZANDO MICROARRAYS DE *Arabidopsis thaliana* (Stress defense gene expression in grapevines using *Arabidopsis thaliana* microarrays) **Merabachvili G.**, & Somerville S. y Holuigue L. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. & Carnegie Institution of Washington, Department of Plant Biology, Stanford, California.

En diversas especies vegetales se ha descrito que el ácido salicílico (SA) es esencial para la activación de mecanismos de defensa a estrés, como la infección por patógenos. Gran parte de los estudios realizados para determinar el papel del SA en defensa se han realizado en plantas de tabaco y de *Arabidopsis thaliana*. En estas especies se ha descrito que el SA activa la transcripción de un grupo de genes de defensa, entre ellos genes con función destoxificante y antimicrobiana. Dentro del proyecto de genómica de vides que se está desarrollando en nuestro laboratorio, se busca identificar genes importantes para la defensa a estrés en esta especie. Para ello se desarrollaron ensayos de hibridación heteróloga de cDNA de vides contra micromatrices de *A. thaliana*. Se obtuvieron muestras de tejido foliar de plantas de *Vitis vinifera* var. Carmenère tratadas por distintos tiempos con SA y agua como control. Se obtuvo cDNA de estas muestras y se hibridaron con micromatrices que contenían una colección de 15.500 cDNAs de *A. thaliana*. Los resultados obtenidos hasta la fecha nos han permitido determinar que en plantas de vides tratadas con SA se activa la expresión de genes relacionados con defensa a estrés.

REGULACIÓN DIFERENCIAL DE GENES LIGNINOLÍTICOS EN PRESENCIA DE MANGANESO Y COMPUESTOS AROMÁTICOS EN EL HONGO BASIDIOMICETE *Ceriporiopsis subvermispora*. (Differential regulation of ligninolytic genes in the presence of manganese and aromatic compounds in the basidiomycete fungus *Ceriporiopsis subvermispora*) ^{1,2} **Manubens A.**, ¹Canessa P., ¹Folch C., ²Lobos S., ¹Salas L., ¹Vicuña R. y ²Seelenfreund D. 1. Laboratorio de Bioquímica, Depto. de Genética Molecular y Microbiología. Fac. Ciencias Biológicas. P. U. Católica. 2. Laboratorio de Bioquímica. Depto. de Bioquímica y Biología Molecular. Fac. Ciencias Químicas y Farmacéuticas. U. de Chile.

El sistema ligninolítico del hongo basidiomicete *Ceriporiopsis subvermispora* está compuesto por dos tipos de enzimas secretadas al medio. La primera es una manganeso peroxidasa (MnP), la cual oxida Mn²⁺ a Mn³⁺, oxidando residuos fenólicos de la lignina. La segunda, es una fenoloxidasa (lacasa o Lcs). En nuestro laboratorio hemos identificado tres genes de *mnp* y uno de *lcs*. En experimentos realizados en cultivos líquidos, hemos visto que la actividad de MnP aumenta a medida que se incrementa la concentración de Mn²⁺ en el medio. En estudios mediante Northern y RT-PCR, encontramos que el Mn²⁺ afecta los niveles de mRNA de manera diferente en cada uno de los genes *mnp*. Para *mnp2* en cultivo con Mn²⁺, los niveles de mRNA aumentan entre los días 10 y 14 de cultivo, mientras que, los niveles de mRNA de *mnp1*, caen drásticamente. No se detectó presencia de mRNA-*mnp3* en ninguna condición de cultivo. Por su parte, en presencia de Mn²⁺, la actividad de la lacasa aumenta, pero los niveles de mRNA disminuyen con respecto a cultivos sin Mn²⁺. Finalmente, se observó que el ácido síringico, un compuesto aromático derivado de la lignina, causó un aumento en los niveles de mRNA de *mnp1* y *lcs* en ausencia de Mn²⁺. Estos resultados sugieren que existe una relación compleja entre los niveles de mRNA de los genes ligninolíticos y la actividad enzimática correspondiente.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 8990004, Instituto Milenio de Biología Fundamental Aplicada y Beca Apoyo Tesis Doctoral CONICYT 2002

EL GEN *SDH2-3* DE *Arabidopsis thaliana* SE EXPRESA ESPECÍFICAMENTE DURANTE EL DESARROLLO DE LAS SEMILLAS. (*Arabidopsis thaliana SDH2-3* gene is specifically expressed during seed development) **Elorza A.**, Gómez I., Roschzttardt H. y Jordana X. Depto. Genética Molecular y Microbiología. Fac. Ciencias. P. Univ. Católica de Chile.

La proteína hierro-azufre (SDH2) del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial es codificada por tres genes nucleares en *Arabidopsis thaliana*. Mientras *SDH2-1* y *SDH2-2* se expresan en todos los tejidos y etapas del desarrollo de la planta, hemos encontrado que el gen *SDH2-3* se expresa principalmente a partir de la fase de maduración del desarrollo embrionario, alcanzando su máximo nivel en semillas maduras. Durante la germinación y crecimiento post-germinativo, su transcrito disminuye considerablemente. Al fusionar el promotor de *SDH2-3* con el gen reportero GUS se observa una buena correlación entre la actividad GUS y el nivel de transcritos de *SDH2-3* durante el desarrollo embrionario, sugiriendo que la regulación de *SDH2-3* es transcripcional en esta etapa. Por el contrario, la actividad GUS permanece elevada durante la germinación, cuando el transcrito de *SDH2-3* ha disminuido, lo que sugiere una regulación post-transcripcional de *SDH2-3* en esta etapa del desarrollo. La expresión de GUS desaparece sólo en el primer par de hojas verdaderas, mostrando que el promotor de *SDH2-3* ya no es activo. Por último, mediante deleciones seriadas del promotor, identificamos una región de éste (-250pb a -90pb respecto al sitio de inicio de la transcripción) responsable de la expresión en semillas. En conjunto, estos resultados muestran que uno de los genes que codifica para la subunidad hierro-azufre de la succinato deshidrogenasa es regulado en forma tejido y desarrollo específica, expresándose durante la maduración de las semillas y en la primeras etapas de la germinación.

Financiado por FONDECYT 2000073, 1020930 y PICS 2179

RESISTENCIA A TELURITO DE POTASIO (K₂TeO₃) EN *Escherichia coli*: PARTICIPACION DE LA ENZIMA SUMT DE *Geobacillus stearothermophilus* V EN EL PROCESO. (Resistance to potassium tellurite in *Escherichia coli*: participation of the enzyme SUMT from *geobacillus stearothermophilus* V in the process. **Araya M.A.**, Tantaleán J.C., Saavedra C., Fuentes D., Calderón I., Pérez J.M., Navarro C. y Vásquez C. Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile).

Con la finalidad de identificar y aislar determinantes de resistencia a telurito de potasio (Ter) en *G. stearothermophilus* V construimos genotecas de esta bacteria a partir de las cuales hemos aislado clones de *E. coli* Ter, seleccionando directamente por adquisición de resistencia a K₂TeO₃. Uno de estos clones (1VH) contiene un inserto de 3,8 kb que fue secuenciado totalmente. Se identificaron tres marcos de lectura abiertos (ORFs) de 780, 399 y 600 nt en el fragmento clonado. La comparación de estos con secuencias disponibles en bases de datos permitió determinar que el primero codifica para una proteína que presenta un 80% de similitud con la enzima BtuR de *Bacillus megaterium*; el segundo codifica para una proteína que presenta un 54% de similitud con una metiltransferasa relacionada con la biosíntesis de esteroides en *Pyrococcus abyssi*; y el tercero, para una proteína con 77% de similitud con la uroporfirina-III metiltransferasa (SUMT) de *B. megaterium*.

Los tres ORFs fueron amplificados independientemente por PCR y clonados en el vector de expresión pET21b. Estos experimentos de subclonamiento permitieron identificar que el ORF de 780 pb es el responsable de la resistencia a K₂TeO₃ exhibida por *E. coli*. En este trabajo se presentará evidencia de la participación del producto de este gen en el fenómeno de resistencia a este tóxico. Financiado por Fondecyt 1030234 y Dicyt, USACH.

EFFECTO DEL NÚMERO DE SITIOS DE UNIÓN A XlnR Y PRESENCIA DE CAJAS CREA EN EL PROMOTOR DE LA ENDOXILANASA B DE *Penicillium purpurogenum*. (Effect of the number of XlnR binding sites and presence of CreA boxes in the endoxylanase B promoter of *Penicillium purpurogenum*). **Díaz J.**, Amenábar F., Santis P., Larrondo L., Eyzaguirre J. y Bull P. Laboratorio Bioquímica. P.Universidad Católica de Chile.

El hongo *Penicillium purpurogenum* secreta al medio enzimas que degradan xilano, un componente de la madera. El promotor de una de ellas, la endoxilanasas B (*xynB*), contiene cajas de unión a factores de transcripción CreA y XlnR. CreA reprime la expresión de xilanasas en presencia de glucosa, y XlnR induce la expresión de los genes de xilanasas cuando xilano está presente como única fuente de carbono en el medio de cultivo. En este trabajo estudiamos el efecto del número de cajas XlnR y la presencia de cajas CreA en el promotor.

Los fragmentos del promotor utilizados fueron, A: con 4 cajas CreA y 8 cajas XlnR, B: solamente con 8 cajas XlnR y C: una caja XlnR. Estos, se insertaron río arriba del gen de la beta-galactosidasa en el plásmido pAN49-1 y con las quimeras resultantes se transformó *Aspergillus nidulans*. Los clones recombinantes fueron cultivados en presencia de xilano o glucosa como fuente de carbono, y se analizó la actividad en extractos tras lisar los micelios obtenidos.

La actividad β -galactosidasa depende de: 1) Número de cajas XlnR en el promotor; a mayor número de cajas mayor actividad. 2) La presencia de la cajas CreA; sin ellas, no hay represión.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT Líneas Complementarias 8990004.

PIASy REPRIME LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL INDUCIDA POR EL RECEPTOR NUCLEAR NURR1. (PIASy represses the transcriptional activation induced by the nuclear receptor Nurr1) **Vecchiola A.**, Galleguillos D. y Andrés M.E. Departamento de Biología Celular y Molecular, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Nurr1 es un factor transcripcional esencial para el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas ventrales. En la búsqueda de mecanismos regulatorios de la función de Nurr1, encontramos a la E3-SUMO ligasa PIASy como compañero de interacción. La co-expresión de PIASy y Nurr1 resultó en una potente represión de la activación transcripcional dependiente de Nurr1 en un reportero NBRE artificial, así como también, en un reportero manejado por el promotor nativo de la Tirosina hidroxilasa. Identificamos dos sitios consenso ψ KXE de sumoilación en Nurr1. La sustitución de la lisina 91 por arginina en el primer sitio sumo aumentó la actividad transcripcional de Nurr1, mientras que la sustitución de la lisina 577 por arginina en el segundo sitio, disminuyó la actividad transcripcional dependiente de Nurr1. Sin embargo, la represión inducida por PIASy no requirió de los sitios de sumoilación debido a que es capaz de reprimir a las mutantes tan eficientemente como a la proteína Nurr1 nativa. Además, las mutaciones no alteraron la localización nuclear de Nurr1. En resumen, nuestro estudio identificó a PIASy como un regulador transcripcional de la actividad de Nurr1.

Proyecto FONDECYT # 1030496

AI SLAMI EN TO Y CARACTERIZACION INICIAL DE PROTEINAS NUCLEARES QUE RECONOCEN ELEMENTOS DISCRETOS EN EL PROMOTOR DEL GEN *Cs-mnp2B* DE *Ceriporiopsis subvermispora*. (Isolation and initial characterization of nuclear proteins that recognize discrete elements in the promoter of the gene *Cs-mnp2B* from *Ceriporiopsis subvermispora*) ¹**Agredo M.**, ^{1,2}**Polanco R.**, ¹**Castro A.**, ¹**Seelenfreund D.**, ²**Vicuña R.** y ¹**Lobos S. I.**, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. 2, Departamento de Genética Molecular y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile. Patrocinio: Dra. Daniela Seelenfreund.

El sistema ligninolítico del basidiomicete de pudrición blanca *C. subvermispora* está constituido por las enzimas Lacasa (lcs) y Manganese peroxidasa (mnp), cuyos genes y secuencias 5' regulatorias han sido clonados y secuenciados por nuestro grupo. Con objeto de caracterizar los posibles factores transcripcionales que se unen al promotor del gen *mnp2b* se efectuaron ensayos de retardo en gel (EMSA) y footprinting con extractos nucleares del hongo. Para esto se dividió la región promotora en cuatro fragmentos, los cuales fueron inicialmente analizados mediante EMSA. Posteriormente, al realizar footprinting de uno de estos fragmentos (denominado β 1), se encontró una región protegida de 48 nts. Para analizar en detalle este sitio de unión, se generó un subfragmento (β 1A) de 74 pb, que contenía a dicha secuencia. β 1A también fue analizado mediante EMSA, mostrando la formación de un complejo proteína-DNA específico. Para lograr dilucidar cuantas proteínas están formando el complejo con el fragmento β 1A, éste fue purificado desde el gel de retardo y resuelto mediante SDS-PAGE, observándose una proteína mayoritaria de aproximadamente 65 kDa. La secuenciación N-terminal de esta proteína permitirá su caracterización.

Financiado por: FONDECYT 1030495, 2000088 y MIFAB

POSTERS

CALCULO TEORICO DE LA VIA PREFERENCIAL DE TRANSMISION DE LUZ EN FICOCIANINA DE *Gracilaria chilensis* (A theoretical calculation of the light transmission preferential pathway in *Gracilaria chilensis*' Phycocyanin) **Almonacid D.^a**; Matamala A.^a y Bunster M.^b a, Laboratorio de Química Teórica y Computacional, Facultad de Ciencias Químicas, y b, Laboratorio de Biofísica Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción

Utilizando la Ecuación de Förster para estudiar el mecanismo de Transferencia de Energía por Fluorescencia en Resonancia entre los cromóforos de una Ficobiliproteína, se han determinado las vías preferenciales de transmisión de luz al interior de un hexámero de Ficocianina de *Gracilaria chilensis*. Las constantes de transferencia de energía entre pares de cromóforos dador-aceptor son fuertemente dependientes de la orientación relativa entre los momentos dipolares de los cromóforos y, su determinación en trabajos anteriores, se ha hecho bajo suposiciones no bien justificadas. Utilizando el método semiempírico PM3 se ha establecido un protocolo preciso para la determinación de los momentos dipolares de cada cromóforo, y de esta manera, las constantes de transferencia de energía entre ellos.

Haciendo uso de las coordenadas de un complejo entre dos hexámeros de Ficocianina, obtenido con el programa ZDOCK, la transmisión de luz entre Ficocianinas en una varilla del Ficobilisoma de *Gracilaria chilensis* ha sido también evaluada señalando a los cromóforos unidos a las cisteínas en la posición 82 de las cadenas beta como los responsables de esta transmisión.

Proyecto DIUC: 202.31-91-1

SECUENCIACION DEL GENOMA DE UN AISLADO CHILENO DE GFLV Y EXPRESION DE SU PROTEINA DE LA CAPSIDE. (Sequencing of a Chilean isolate of GFLV and expression of the viral coat protein). **Arredondo V.**, Engel E., Martínez R., Fiore N., Burzio L.O. y Valenzuela P.D. Fundación Ciencia para la Vida e Instituto Milenio MIFAB. Av. Marathon 1943, Santiago, Chile.

Una de las más importantes y diseminadas enfermedades virales de la vid es causada por el GFLV (Virus de hoja en abanico de la vid). Su genoma está compuesto de dos fragmentos de RNA de hebra simple de sentido positivo. El RNA1 codifica para todas las funciones requeridas en la replicación y por su parte, el RNA2 lo hace para funciones requeridas en el ensamblaje y movimiento del virus.

La detección de virus que infectan vides en Chile, es necesaria en programas de mejoramiento sanitario, cuyo propósito es la propagación de material de plantas libre de virus. Es por ello que en el presente trabajo, realizamos el análisis molecular de distintos aislados de GFLV, de las regiones metropolitana, V y VI.

Se obtuvo RNA viral a partir de vides infectadas, el cual fue amplificado mediante RT-PCR y luego clonado en bacterias. Con ello se logró obtener la secuencia completa del genoma de GFLV-Ch80 y de segmentos de interés de los otros aislados. Comparaciones preliminares de las secuencias obtenidas muestran una identidad de 92% a nivel aminoácido y 89% a nivel nucleotídico. Esto reafirma la importancia del trabajo ya que a pesar de haberse detectado algunos de estos virus en Chile con metodologías desarrolladas para aislados europeos, nada se conoce sobre la variabilidad de los aislados nacionales.

Las principales proteínas virales, en particular las correspondientes a la cubierta viral, están siendo expresadas en *E.coli*, para su posterior purificación. Con esto se pretende el desarrollo de anticuerpos monoclonales destinados a diseñar métodos de inmunodiagnóstico. Parcialmente financiado por Proyecto FONDEF G02S1001.

DISTRIBUCION SUBCELULAR DE GFP-FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA EN LÍNEAS CELULARES DE RIÑÓN. (Subcellular distribution of GFP-Fructose-1,6-bisphosphatases in kidney cell lines). **Calderón F.**, Droppelmann C., Bertinat R., Slebe J. C. y Yáñez, A. J. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

La regulación de la glicólisis y la gluconeogénesis es importante y compleja en riñón. Hemos establecido que la isoenzima hepática de fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) se expresa en diversos tejidos, pero principalmente en hígado y riñón. Esta isoenzima se localiza junto con otras enzimas gluconeogénicas (PEPCK) en las células del túbulo proximal del nefrón. A nivel subcelular, demostramos que FBPasa se encuentra en el citosol, en un compartimiento en la periferia apical, e interesadamente dentro del núcleo. Por otro lado, se ha demostrado que la distribución subcelular de algunas enzimas glicolíticas es dinámica, dependiendo de las condiciones metabólicas. Para estudiar el efecto de glucosa sobre la localización celular de la FBPasa en riñón, clonamos la enzima de hígado de rata y de riñón de cerdo para preparar proteínas de fusión con la proteína verde fluorescente (GFP). El análisis confocal mostró que GFP-FBPasa de riñón de cerdo y de hígado de rata, isoenzimas hepáticas, se localizan en compartimientos subcelulares similares en las líneas de riñón COS-1, HEK-293 y LLCPK-1. Mientras que ambas FBPasas fueron detectadas solo en el citosol de las células COS-1 y HEK-293, en las células LLCPK-1 FBPasa se encuentra presente en núcleo, citosol y región perinuclear. La razón de distribución subcelular (núcleo/citosol) de estas isoenzimas de FBPasa, sugiere que ellas contienen señales diferentes de localización nuclear. Estos resultados confirman la capacidad de FBPasa para translocar al núcleo y sugieren que la localización subcelular podría depender del tipo celular y/o de su condición metabólica. (FONDECYT 1010720; DID-UACH 200302; CONICYT AT-403167).

MUTAGÉNESIS SITIO ESPECÍFICA DE LAS CISTEÍNAS 238 Y 295 DE FOSFOFRUCTOQUINASA-2 DE *E. coli*. **Caniuguir A.**, Cabrera R., *Vásquez C., Babul J. y Guixé V. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y * Departamento de Química y Biología, Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile.

La unión de MgATP al sitio alostérico de la Pfk-2 de *E. coli* se relaciona con la inhibición de la actividad enzimática y la tetramerización de la enzima dimerica. La inhibición por el efector alostérico es revertida por concentraciones altas de fructosa-6-P (1 mM). Experimentos de modificación química de la Cys 238 con pireno maleimida convierten a la enzima en un monómero, en tanto que la modificación de la Cys 295 con eosina maleimida genera una enzima dimerica e inactiva. Para evaluar el papel de estos residuos en la actividad enzimática y en la mantención de la estructura dimerica de Pfk-2, realizamos mutagénesis sitio específica de ellos. La mutante C238F posee parámetros cinéticos semejantes a los de la enzima silvestre, es un dímero en ausencia de ligandos y tetrameriza en presencia de MgATP. Sin embargo, la inhibición por el efector alostérico es sólo parcialmente revertida por un aumento en la concentración de fructosa-6-P. La mutante C295F presenta una disminución en la *k_{cat}* y un aumento en las *K_m* para fructosa-6-P y MgATP. La enzima presenta inhibición de la actividad enzimática a concentraciones altas y bajas de fructosa-6-P, es un dímero en ausencia de ligandos y tetrameriza parcialmente en presencia de MgATP. Los resultados sugieren que la cisteína 238 no es un determinante estructural en la mantención de la estructura dimerica y que la cisteína 295 está relacionada con la unión de los sustratos, la catálisis y el cambio conformacional que impide la inhibición por MgATP a altas concentraciones de fructosa-6-P. Fondecyt 1010645

MINERIA DE DATOS BIOLÓGICOS Y RECONOCIMIENTO DE PATRONES: PARAMETRIZACIÓN DE ALGORITMOS GENÉTICOS QUE EVOLUCIONAN ECUACIONES MATEMÁTICAS CON FINES DE CORRELACION Y CATEGORIZACION. (Biological data mining and pattern recognition: parametrization of a genetic algorithm that evolves mathematical expressions to be used in correlation and categorization). **Conrads J.**^{1,2}, Soto A.² y Melo F.¹ Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Ciencias Biológicas, 1, Depto. Genética Molecular y Microbiología, Laboratorio de Bioinformática Molecular, Alameda 340, Santiago, Chile. 2, Facultad de Ingeniería, Depto. Ciencias de la Computación, Avda. Vicuña Mackenna 4860, Santiago, Chile.

En este trabajo se presenta el desarrollo e implementación de un algoritmo genético para la selección de patrones sensibles y específicos de alto poder predictivo. Este algoritmo genético evoluciona ecuaciones matemáticas, las cuales son utilizadas directamente en el caso de correlación, o como transformadas lineales y no-lineales en el caso de categorización. Las ecuaciones matemáticas son codificadas en cadenas numéricas lineales, siguiendo una estrategia de notación polaca para la decodificación o evaluación numérica de éstas.

Existen múltiples variables o parámetros que forman parte de un algoritmo genético, los cuales incluyen: tamaño de la población, longitud máxima de cromosomas (o número de genes), tasa de recombinación, tipo de recombinación, tasa de mutación, sistema de selección, sistema de evaluación, presencia o ausencia de elitismo, número de iteraciones, número de corridas independientes, etc. En este trabajo se presentan también algunos resultados parciales del estudio de dependencia de la performance de este algoritmo según el problema en cuestión y los parámetros utilizados.

Financiado por proyectos FONDECYT #1010959 y #1030336.

PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ELECTRONES ASOCIADAS A LA MONOOXIGENASA P450-1 DE GIBBERELINAS EN *Gibberella fujikuroi*. (Electron transport proteins associated to the gibberellin P450-1 monooxygenase in *Gibberella fujikuroi*). **Cruz C.**, Urrutia O, Toro B. y Rojas M.C. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile

La monooxigenasa P450-1 es una enzima multifuncional que cataliza 4 etapas en la síntesis del ácido giberélico. Presenta una versatilidad única entre los citocromos P450 ya que genera 12 productos a partir del ácido *ent*-kaurenoico, oxidando los carbonos C7, C6, C3 y C18 de este precursor. Caracterizamos las proteínas transportadoras de electrones asociadas a P450-1, estudiando las distintas reacciones catalizadas por esta monooxigenasa en microsomas de la cepa silvestre ACC917 y de una mutante de disrupción en el gen de la P450 reductasa (*?cpr*). Encontramos que la reacción de hidroxilación en la posición 3, que define la vía principal de síntesis de giberelinas en el hongo, depende en forma absoluta de NADPH en tanto que las reacciones de oxidación en C7, C6 y C18 pueden recibir electrones desde el NADPH o del NADH. La velocidad es mayor en presencia de NADPH, el nucleótido utilizado por la citocromo P450 reductasa. En microsomas de *?cpr* sólo están presentes las reacciones de oxidación dependientes de NADH, sobre los carbonos 7, 6 y 18, evidenciando una segunda proteína transportadora de electrones asociada a la monooxigenasa P450-1. La interacción de P450-1 con ambas proteínas transportadoras fue caracterizada a través del efecto de sales, de iones bivalentes y de nucleótidos de flavina sobre las distintas actividades enzimáticas detectadas en los microsomas.

Trabajo financiado por FONDECYT (1020140) y por el programa de cooperación internacional CONICYT/DAAD

TRANSFORMACION DE *Pinus radiata* CON LOS GENES CBF DE *Arabidopsis thaliana* (Transformation of *Pinus radiata* with *Arabidopsis thaliana* CBF genes). **Gamboa C.**, Engel E., Krauskopf E., Arce P. y Valenzuela P.D. Fundación Ciencia para la Vida, Pontificia Universidad Católica de Chile e Instituto Milenio MIFAB. Av. Marathon 1943, Santiago, Chile.

La capacidad de adaptación que muestran las plantas frente a las bajas temperaturas está íntimamente ligada a la expresión de ciertos genes denominados CBF (c-repeat binding factor), que actúan como activadores transcripcionales, regulando la expresión de otros genes río abajo que confieren a la planta tolerancia al frío y al estrés producido por la falta de agua o por alta salinidad. Hasta el momento se han descrito cuatro genes CBF (CBF1, 2, 3 y 4) en *Arabidopsis thaliana* cv *Landsberg* y su sobreexpresión ha dado como resultado una mayor tolerancia al frío y al estrés producido por falta de agua.

Uno de los cultivos forestales de mayor importancia a nivel mundial y de gran impacto económico en la productividad de nuestro país, es *Pinus radiata* ya que es la principal especie cultivada en Chile.

En nuestro grupo de trabajo se ha implementado la transformación estable de tejido embrionario de *Pinus radiata* con genes diferentes a los CBF, método mediante el cual se realizó la transformación de tejido embrionario con el gen CBF3 de *Arabidopsis thaliana*. Para esto se clonó el gen CBF3 en el vector binario pBIN19 entre el promotor y terminador del virus del mosaico de la coliflor (promotor 35S y terminador CAMV) con el que se transformó *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101, finalmente se infectó el tejido embrionario de *Pinus radiata* con el cultivo de *Agrobacterium* conteniendo el gen de interés.

Además se confeccionó una genoteca a partir de ADN complementario de *Pinus radiata* sometido a condiciones de stress térmico, desde la que se está rastreando la presencia de los genes CBF ya descritos en *Arabidopsis*.

GLUTATION Y VITAMINA C EN LA DEFENSA CONTRA EL ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS (Role of glutathione and vitamin C against oxidative stress in human endothelial cells) **Guzmán P.**, Montecinos V.P., Escobar E. y Vera J.C. Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

La vitamina C y el glutatión son antioxidantes solubles presentes en las células en elevadas concentraciones que juegan un papel central en los mecanismos celulares de defensa contra estrés oxidativo. Aunque estudios *in vitro* e *in vivo* indican que la acumulación de vitamina C sería dependiente de glutatión, se desconoce la existencia de una relación funcional entre estos dos compuestos en la protección contra el estrés oxidativo. Utilizando células endoteliales de cordón umbilical y de amígdalas humanas, y la línea celular ECV304, normales y deprivadas de glutatión, realizamos ensayos de captación de vitamina C y de estrés oxidativo inducido por H₂O₂. Observamos que, dependiendo estrictamente del tipo celular analizado, el glutatión afecta la acumulación de vitamina C. Análisis del contenido intracelular de glutatión de estas células mostró concentraciones de 2 a 4 mM. La exposición al H₂O₂ de células deprivadas de glutatión afectó considerablemente la viabilidad celular, resultado que fue revertido al suplementar estas células con vitamina C antes del tratamiento con H₂O₂. Examinando el efecto protector del glutatión y de la vitamina C frente al estrés inducido por H₂O₂, observamos que la vitamina C, a concentraciones en el rango observado en células y tejidos normales, protege a concentraciones bajas de H₂O₂ mientras que el glutatión ejercería su efecto antioxidante a concentraciones elevadas de H₂O₂.

Proyecto FONDECYT 1020451 y Proyecto DIUC-GIA 206.034.00006-1,4.

SÍNTESIS DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE VIRUS ANDES EN *E. coli*. (Synthesis of glycoproteins of Andes virus in *E. coli*). **Lisbona F.**, Tischler N., Roseblatt M. y Valenzuela P.D. Fundación Ciencia para la Vida e Instituto MIFAB. Av. Marathon 1943, Santiago, Chile.

El virus Andes pertenece a la familia de los *Bunyaviridae* y su genoma posee 3 hebras de RNA de sentido negativo que codifican 4 proteínas. Dos de ellas corresponden a las glicoproteínas G1 y G2, las cuales forman la envoltura, las otras dos proteínas son la nucleoproteína y la RNA polimerasa.

Aquí se presentan los resultados de la expresión y purificación de las glicoproteínas del virus Andes CHI99-7913. Para esto se hicieron varias construcciones génicas que se insertaron en el plasmidio pET32a para la producción de proteínas fusionadas a tioreductasa en *E. coli* BL21. Una corresponde a la proteína G1 completa desde Met1 a Val651; una región amino terminal (G1?) desde Met1 a Val353 y una región carboxilo terminal (G1?) desde Phe338 a Val651. La glicoproteína 2 se expresó completa desde Met1 a Val495, una región amino terminal (G2?) desde Met1 a Cys219 y una región carboxilo terminal (G2?) desde Pro182 a Val491. Además, una porción de 30kDa de G1 se expresó *in vitro* usando un sistema de transcripción y traducción acoplados a partir de la secuencia insertada en el plasmidio pIVEX2.4c.

La expresión de las proteínas recombinantes fue visualizada por electroforesis en geles de poliacrilamida y por análisis de Western blots usando anticuerpos monoclonales. Estas proteínas están siendo purificadas para la obtención de anticuerpos monoclonales, el estudio de la respuesta humoral en pacientes y para otros ensayos relacionados con el estudio de la biología del virus Andes.

ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE NUCLEÓTIDOS MONO-, DI- Y TRI-FOSFATO UNIDOS A PROTEÍNAS, (conformational analysis of mono-, di- and tri-phosphate nucleotides in their bound state to proteins), **Martínez V.** y Melo F. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Ciencias Biológicas, Depto. Genética Molecular y Microbiología, Laboratorio de Bioinformática Molecular, Alameda 340, Santiago, Chile.

El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar el estado conformacional adoptado por los nucleótidos mono-, di-, y trifosfato unidos a proteínas. Para ello se utilizó la base de datos ProBiSite, la cual contiene las coordenadas atómicas tridimensionales de todos los ligandos presentes en la base de datos del Protein Data Bank (PDB). La conformación de los diferentes nucleótidos fue caracterizada en base a dos ángulos dihedros o de torsión, los cuales consideran las rotaciones existentes entre la base nitrogenada y la ribosa, y entre la ribosa y la cola de grupos fosfatos. Los resultados muestran que los diferentes nucleótidos presentan un número limitado de rangos discretos preferenciales para cada ángulo estudiado, y que éstos son muy conservados entre los diferentes nucleótidos.

Además, también se estudió la preferencia de pliegues proteicos, según la anotación de la base de datos CATH, que presentan los distintos nucleótidos. Los resultados de este análisis muestran que no sólo existen múltiples pliegues capaces de unir a estas moléculas, sino que también se observan un gran número de distintas arquitecturas, las cuales incluyen barriles, sandwiches de dos, tres (alfa-beta-alfa y beta-beta-alfa) y cuatro capas, arquitecturas complejas, haces ortogonales, y cilindros. Esta diversidad de estructuras capaces de unir a los diferentes nucleótidos sugiere que será extremadamente difícil predecir sitios de unión en proteínas a estas moléculas a partir de la secuencia primaria o de descripciones estructurales de baja resolución.

Proyecto financiado por FONDECYT #1010959.

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS GENES DE PIT-1 DEL GENOMA DUPLICADO DE *Cyprinus carpio*. (Differential expression of Pit-1 genes in the duplicated genome of *Cyprinus carpio*.) **Salazar M.**, Kausel G., Castro L. y Figueroa J., Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Chile, gkausel@uach.cl

La respuesta adaptativa a los cambios estacionales de su medio ambiente natural implica la variación de la expresión génica de una red de factores del eje hipotálamo-hipofisario en el ectotermo euritermal *Cyprinus carpio*. El factor de transcripción Pit-1 está involucrado en la regulación de la expresión de prolactina, hormona de crecimiento y su propio gen, entre otros, y su transcripción aumenta significativamente en carpas aclimatizadas a verano respecto a invierno. Las secuencias génicas obtenidas de los dos genes Pit-1 del genoma duplicado de *C. carpio* permiten el estudio por RT-PCR copia específica. Aquí mostramos claramente la expresión de ambos genes por RT-PCR. Los resultados preliminares indican que hay 1,7 veces más transcritos del gen-I que del gen-II. Aislamos y caracterizamos las regiones promotoras de ambos genes Pit-1. Las secuencias promotoras muestran regiones idénticas y otras francamente diferentes. En las regiones conservadas se ubican sitios de unión de CREB, AP-1 y Pit-1 que sugieren su participación en la regulación de los dos genes. El sitio +1 se determinó unos 29nt río abajo del TATA-box. La región entre el sitio +1 y ATG del primer exón es diferente en los dos genes y podría jugar un rol en la regulación específica de cada copia. Esta región la estudiaremos en más detalle por su posible interacción con proteínas hipofisarias de carpas adaptadas a verano e invierno. El análisis por RT-PCR relacionado con ensayos de ChIP (chromatin immune precipitation) de Pit-1 copia específica permitirá revelar efectos epigenéticos en las regiones promotoras *in vivo* en carpas durante la climatización.

Financiado por DID-UACH 2002-18.

ORGANIZACIÓN GENÓMICA ESTRUCTURAL DE LOS GENES DE LA CAROTENOGÉNESIS EN *Xanthophyllomyces dendrorhous*. (Structural genomic organization of the carotenogenesis genes in *X. dendrorhous*) **Niklitschek M.**; Lodato P.; Barahona S.; Sepúlveda D.; Carmona M.; Lozano C.; Retamales P. y Cifuentes V. Lab. de Genética, Depto de Cs. Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura basidiomicete carotenogénica, cuyo pigmento principal y de gran interés biotecnológico es la astaxantina. La ruta de biosíntesis ha sido determinada a partir del análisis químico de sus intermediarios. Estudios genéticos de mutantes de carotenogénesis indican la participación de 5 genes estructurales que codifican las enzimas isopentenil pirofosfato isomerasa (*idi*), geranilgeranil pirofosfato sintasa (*crtE*), fitoeno sintasa-licopeno ciclasa (*crtYB*), fitoeno desaturasa (*crtI*) y astaxantina sintetasa (*atx5*). En nuestro laboratorio, a partir de una genoteca de DNA total de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, hemos clonado y secuenciado dichos genes. El análisis de restricción de los clones recombinantes, permitió determinar que los insertos de DNA que contienen los genes *idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtI*, tienen tamaños de 12,5 kb, 12 kb, 18 kb y 18,5 kb respectivamente. Paralelamente, hemos clonado parcialmente el gen *atx5* en un fragmento de 3,45 kb. El análisis de hibridación asociado al cariotipo electroforético de la levadura, muestra que los genes se ubican en la 1ª y 2ª banda cromosómica. Sin embargo, el gen *crtYB* fue localizado en dos bandas cromosómicas diferentes. Por otra parte, hemos clonado y secuenciado los cDNAs de los respectivos genes, y la comparación de sus secuencias con la de los genes genómicos permitió determinar que el gen *idi* posee 5 exones y 4 intrones, el gen *crtE* 6 exones y 5 intrones, el gen *crtYB* 5 exones y 4 intrones y el gen *crtI* 12 exones y 11 intrones. Adicionalmente, análisis de los mensajeros, indican que el nivel de expresión de estos genes varía en el ciclo de crecimiento y algunos podrían estar regulados por glucosa.

INTERACCIÓN DE FLAVONOIDES Y METILXANTINAS CON EL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA, GLUT1. (Interaction flavonoids of methylxantines interactions with the glucose transporter GLUT1). **Ormazábal V.**, Godoy A., y Vera J.C.. Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

El transportador de glucosa GLUT1 transporta glucosa en forma facilitada en un proceso saturable e independiente de la hidrólisis de ATP. Sin embargo, estudios de fotomarcaje han revelado la interacción directa entre GLUT1 y ATP, estableciendo que GLUT1 es una proteína capaz de unir nucleótidos. Utilizando células de leucemia humana (HL-60), las cuales expresan únicamente GLUT1, hemos analizado la interacción de este transportador con inhibidores de tirosina quinasa (flavonoides) y fosfodiesterasa (metilxantinas), los que corresponden a moléculas que interactúan directamente con sitios de unión de nucleótidos. Nuestros resultados muestran que metilxantinas y flavonoides inhiben de manera dosis dependiente el transporte de glucosa. Aunque el mecanismo de inhibición fue de tipo competitivo para flavonoides y no competitivo para metilxantinas, ensayos de inhibición mixta utilizando ambos tipos de compuestos simultáneamente, revelan que el efecto de los metilxantinas y flavonoides con GLUT1 es aditivo. Nuestros resultados sugieren que metilxantinas y flavonoides interactúan en un mismo sitio estructural en GLUT1 el cual correspondería a un sitio de unión a nucleótido.

Proyecto FONDECYT 1020451 y DIUC-GUIA 206.034.006-14

DIVERSIDAD FUNCIONAL EN LA UNIÓN DE INHIBIDORES AL TRANSPORTADOR DE HEXOSAS GLUT1 (Functional diversity in the binding of inhibitors to the hexose transporter GLUT1). **Pérez A.** y Reyes, A.M.. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia. (areyes@uach.cl).

GLUT1 es una proteína integral que facilita el transporte de D-hexosas a través de la membrana plasmática en células animales. Este transportador muestra dos estados conformacionales, uno con el sitio de unión accesible por la cara externa (exofacial) y otro con el sitio para hexosas accesible por el lado interno (endofacial). Inhibidores como la flavona quercetina, la isoflavona genisteína y la tirfostina B46 son aparentemente capaces de unirse a esta proteína en su superficie exofacial, mientras otros como tirfostina A47 lo hacen por la cara endofacial. En esta comunicación probamos si estos inhibidores compiten con la unión del sustrato natural, D-glucosa, siguiendo la fluorescencia intrínseca del transportador en membranas aisladas, o bien usando el transportador purificado y reconstituido, y mediante ensayos cis-infinito de salida en eritrocitos humanos. Quercetina y las tirfostinas A47 y B46 promueven el apagamiento por yoduro de la fluorescencia de GLUT1. En cambio, genisteína y D-glucosa protegen del efecto de yoduro. Por otra parte, solo genisteína altera la afinidad de D-glucosa en el sitio externo, mientras los otros compuestos no tienen efecto. En conjunto, los datos sugieren que la mayoría de estos inhibidores se unen a GLUT1 en un lugar distinto al sitio de unión de glucosa. Genisteína es un caso especial pues bloquea parcialmente la unión del azúcar. (Financiado por FONDECYT 1020908).

ESTUDIOS DE LA SUBESTRUCTURA DE LOS COMPLEJOS COLECTORES DE LUZ DEL ALGA ROJA *Gracilaria chilensis*. (Studies of the Substructure of Light Harvesting Complexes in the Red Algae *G. chilensis*). **Pouchucq L.** Bruna C. y Bunster M. Grupo de Biología Estructural, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

El principal sistema colector de luz en algas rojas está formado por complicados complejos proteicos que recubren la cara estromática de las membranas fotosintéticas (ficobilisomas), también presentes en cianobacterias. Su función es coleccionar energía luminosa en un rango determinado de longitudes de onda dentro del visible y transferirla preferentemente al fotosistema II para dar energía a la fotosíntesis. Dichos complejos se componen de una serie de proteínas que poseen grupos tetrapirrólicos lineales anclados covalentemente a residuos conservados de cisteína (ficobiliproteínas) involucradas directamente en la captación y transferencia de la energía luminosa, y de proteínas que no poseen grupos prostéticos semejantes, pero cumplen una importante función estructural.

La subestructura de estos complejos es mejor conocida en cianobacterias que en algas rojas, y dentro de estas últimas, en macroalgas de mayor complejidad ha sido muy pobremente estudiada. En el presente trabajo presentamos un estudio de la subestructura de ficobilisomas de la macroalga roja *G. chilensis* como modelo estructural. Los estudios de subestructura fueron realizados mediante disociación parcial de complejos aislados desde talos de *G. Chilensis*. Las subestructuras producto de esta disociación fueron estudiadas mediante análisis espectroscópicos, cromatográficos y electroforéticos para dar lugar a un modelo de la disposición espacial de sus componentes.

Proyecto DIUC: 202.31.91-1.0

UN MODELO PARA EL MECANISMO DE LA INHIBICIÓN POR GOSSYPOL DEL TRANSPORTADOR DE HEXOSAS GLUT1 (A model for the mechanism of inhibition by gossypol of the hexose transporter GLUT1). **Sánchez C.**, González-Nilo D. y Reyes A.M. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia y Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago, Santiago.

Gossypol es un sesquiterpeno natural que bloquea eficazmente el transporte de hexosas facilitado por GLUT1. Para caracterizar el mecanismo de la inhibición desarrollamos ensayos de transporte de D-glucosa en eritrocitos humanos en condiciones infinito-cis y estudios de perturbación de la fluorescencia intrínseca del transportador en membranas aisladas y en preparaciones del transportador purificado y reconstituido en proteoliposomas. Gossypol apaga la fluorescencia de GLUT1, a la vez que promueve el apagamiento de la fluorescencia del transportador inducido por yoduro, una sonda hidrofílica. Estos efectos de gossypol fueron saturables. Por otra parte, los ensayos de transporte muestran que gossypol no altera la afinidad del sitio externo para D-glucosa. Para intentar identificar el sitio de unión realizamos un cálculo de reconocimiento molecular ("docking") de gossypol sobre un modelo de GLUT1 basado en el modelo estructural te_rico descrito por Zúñiga *et al.* (*J. Biol. Chem.* 276, 44970, 2001) y relajado por dinámica molecular. Este análisis identifica un posible sitio de unión accesible exofacialmente, en el entorno de Lys114, diferente al sitio de unión externo para D-glucosa. Se propone que gossypol rigidiza la estructura del transportador mediante su unión a este sitio exofacial. (Financiado por FONDECYT 1020908)

EVALUACIÓN DE MODELOS TRIDIMENSIONALES DE PROTEÍNAS EN GRAN ESCALA: APLICACION A GENOMAS COMPLETOS. (Large-scale protein structure model assessment: application to whole genomes) **Santander V.** y Melo, F. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Ciencias Biológicas, Depto. Genética Molecular y Microbiología, Laboratorio de Bioinformática Molecular. Alameda 340, Santiago, Chile.

Gran parte de los modelos tridimensionales de proteínas que se construyen mediante modelamiento comparativo automatizado poseen errores y/o se encuentran incompletos. Para modelos de mediano y gran tamaño (>200 aminoácidos), los parámetros estructurales que utilizan los métodos de evaluación (Z-score, compactibilidad, etc.) permiten discriminar con escaso error entre modelos correctos o incorrectos. Sin embargo, este error aumenta significativamente en el caso de los modelos pequeños. El objetivo de este trabajo ha sido la generación y extracción de rasgos estructurales específicos y diferentes a los actualmente utilizados, los cuales contribuyan a inferir la calidad de un modelo pequeño con un bajo error. Con este fin se construyó un conjunto con alrededor de 2,000 modelos comparativos que tuvieran una longitud total inferior a 150 aminoácidos y que no presentaran una homología extremadamente alta con la proteína molde utilizada en su construcción. Para cada uno de estos modelos, basándose en el alineamiento y en la proteína molde, se extrajeron tanto las zonas conservadas del core de la proteína como también las inserciones y deleciones. Estas estructuras se utilizarán como referencia para la extracción de rasgos complementarios a aquellos presentes en los modelos. Mediante el uso de algoritmos genéticos se diseñará un clasificador óptimo que permita discriminar adecuadamente entre modelos pequeños correctos e incorrectos. Este trabajo ha sido financiado por FONDECYT #1010959.

REACTIVIDAD DE SUEROS DE PACIENTES CON LA NUCLEOPROTEÍNA Y LAS GLICOPROTEÍNAS RECOMBINANTES DE VIRUS ANDES: DETECCIÓN DE INFECCIONES POR VIRUS HANTA. (Reactivity of patient sera with the nucleoprotein and the glycoproteins of Andes virus: detection of Hantavirus infections). **Tischler N.**, Lisbona F., Rosemblatt M. y Valenzuela P.D. Fundación Ciencia para la Vida e Instituto MIFAB.

El virus Andes produce en humanos el Síndrome Pulmonar del Hanta (HPS) del cual se han detectado desde el año 1993 220 casos en Chile y 523 en Argentina, con una mortalidad promedio de 39%. Este virus pertenece al género de los virus Hanta de la familia *Bunyaviridae* conteniendo un genoma trisegmentado de RNA de hebra simple negativa que codifica 4 proteínas: la nucleoproteína, la RNA polimerasa y las glicoproteínas 1 y 2. Para diagnosticar infecciones por virus Hanta, el uso de la nucleoproteína en ELISA o inmunoblots ha sido establecido como un parámetro estándar, debido a la aparición de anticuerpos contra esta proteína en la fase temprana de la infección. Al contrario, durante el transcurso de la enfermedad la presencia de anticuerpos contra las glicoproteínas esenciales para la neutralización del virus no ha sido bien establecida. Con el presente trabajo se muestra que 100% de 46 sueros de pacientes reaccionaron en ELISA con la nucleoproteína de virus Andes expresada en *E.coli* mientras que de 101 sueros controles, 100 produjeron lecturas negativas. Además, mediante este ELISA se ha podido identificar 7 de 8 ratones potencialmente infectados. Estos resultados muestran que la nucleoproteína recombinante es apropiada para diagnosticar infecciones por virus Andes tanto en pacientes como en roedores. Paralelamente, se estudió la reactividad de 29 sueros de pacientes con las glicoproteínas de virus Andes expresadas en *E.coli*. De estos sueros, 4 reaccionan con la mitad amino terminal de G2 y 6 sueros con la mitad carboxilo terminal de G2. Los resultados preliminares indican que solo una minoría de los sueros de pacientes reaccionan con las glicoproteínas recombinantes.