

INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS

ARXIU DE LA SECCIÓ DE CIÈNCIES, LXVII

JOAN J. GUINOVART  
ÀNGELS MOR  
EMILI ITARTE

De la Societat Catalana de Biologia

ESTUDI DE LES PROTEÏNO-QUINASES  
INDEPENDENTS D'AMP CÍCLIC  
DE FETGE DE RATA

*BORSA D'ESTUDI "SOCIETAT CATALANA  
DE BIOLOGIA", 1978*

BARCELONA  
1983



ESTUDI DE LES PROTEÏNO-QUINASES  
INDEPENDENTS D'AMP CÍCLIC  
DE FETGE DE RATA





INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS

ARXIU DE LA SECCIÓ DE CIÈNCIES, LXVII

JOAN J. GUINOVART

ÀNGELS MOR

EMILI ITARTE

De la Societat Catalana de Biologia

ESTUDI DE LES PROTEÏNO-QUINASES  
INDEPENDENTS D'AMP CÍCLIC  
DE FETGE DE RATA

*BORSA D'ESTUDI "SOCIETAT CATALANA  
DE BIOLOGIA", 1978*

BARCELONA

1983

L'EXCMA. DIPUTACIÓ PROVINCIAL DE BARCELONA  
HA CONTRIBUÏT GENEROSAMENT  
A L'EDICIÓ D'AQUEST VOLUM

ISBN 84-7283-042-X  
Dipòsit legal: B. 18.697 - 1983

© Joan J. Guinovart i Cirera, Barcelona  
La present edició és propietat de l'INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS

A proposta d'una ponència formada pels senyors Josep Alsina i Bofill i Pere Domingo i Sanjuan, membres de la Secció de Ciències de l'INSTITUT, el senyor Carles Bas i Peired, agregat a la mateixa Secció, i els senyors Ferran Calvet i Prats i Lluís Vallmitjana i Rovira, de la Societat Catalana de Biologia, l'INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS, en sessió plenària tinguda el dia 21 de desembre de 1978, acordà per unanimitat de concedir la Borsa d'Estudi "Societat Catalana de Biologia" de 1978 al senyor Joan J. Guinovart i Cirera per a dur a terme un estudi sobre *Les proteïno-quinases independents d'AMP cíclic de fetge de rata*. En la mateixa sessió el doctor Pere Domingo, membre de la Secció de Ciències de l'INSTITUT, fou designat ponent del dit treball.

En sessió plenària del 10 de febrer de 1982 l'INSTITUT prengué l'acord de publicar l'obra realitzada pel senyor Guinovart i els seus col·laboradors Àngels Mor i Emili Itarte. La publicació ha estat a cura del senyor Enric Casassas, membre de la Secció de Ciències.



## ABREVIATURES MÉS USUALS UTILITZADES EN AQUESTA OBRA

AMP	Adenosina 5'-monofosfat.
AMP cíclic	Adenosina 3',5'-monofosfat cíclic.
ATP	Adenosina 5'-trifosfat.
BSA	Albúmina sèrica bovina.
<sup>14</sup> C	Carboni 14.
Ci, mCi, μCi	Curie, mil·licurie, microcurie.
c.p.m.	Comptes per minut.
DEAE	Dietilaminoetil.
DTT	Ditiotreitòl.
EDTA	Etilendiaminotetraacetat.
EGTA	Etilenglicol-bis-(beta-aminoetilèter)-N,N,N',N'-tetraacetat.
x g	Gravetats.
G6P	Glucosa 6-fosfat.
M, mM, μM	Molar, mil·limolar, micromolar.
mS	Mil·lisiemens.
nm	Nanòmetre.
<sup>32</sup> P	Fòsfor 32.
PMSF	Fluorur de fenilmetilsulfonil.
PPO	2,5-difeniloxazole.
r.p.m.	Revolucions per minut.
SDS	Dodecilsulfat sòdic.
TCA	Àcid tricloroacètic.
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina.
Tris	Tris (hidroximetil) aminometà.
U	Unitats internacionals d'activitat enzimàtica
UDP-glucosa, UDPG	Uridina difosfoglucosa.
UTP	Uridina trifosfat.
V	Velocitat d'una reacció.
Vmàx.	Velocitat màxima.



## RESUM

Fins fa relativament poc temps hom acceptava que la fosforilació i la inactivació de la glicògeno-sintasa només eren catalitzades per la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic. Així, les hormones podien regular la síntesi de glicogen modificant els nivells intracel·lulars d'AMP cíclic que modificarien l'activitat de la proteïno-quinasa dependent d'aquest nucleòtid i, en conseqüència, també variarien el grau de fosforilació i activitat de la glicògeno-sintasa.

Estudis posteriors han demostrat, però, que en el fetge les catecolamines i la insulina afecten l'activitat de la glicògeno-sintasa sense modificar pràcticament els nivells d'AMP cíclic. D'altra banda, estudis en múscul de conill han demostrat la presència en aquest teixit d'una proteïno-quinasa (caseïno-quinasa), diferent de la dependent d'AMP cíclic, capaç de fosforilar i d'inactivar totalment la glicògeno-sintasa. Per tot això, hi ha un gran interès a detectar la possible presència d'aquesta activitat en fetge de rata.

En aquest treball ha estat confirmada l'heterogeneïtat de les proteïno-quinases hepàtiques, que s'han separat en histono- i caseïno-quinases. Les caseïno-quinases són les independents d'AMP cíclic, i les histono-quinases les dependents d'aquest nucleòtid o derivades d'elles. Per això, el nostre interès s'ha dirigit principalment vers l'estudi de les dues caseïno-quinases independents de l'AMP cíclic de fetge de rata.

Les dues caseïno-quinases obtingudes són diferents entre elles en l'estructura molecular, en les característiques cinètiques i en la sensibilitat al KCl. Ambdues quinases poden fosforilar la glicògeno-sintasa, però el grau màxim de fosforilació assolit per cada enzim és diferent. En tots dos casos, la fosforilació de la sintasa produeix la seva inactivació, i hi ha una relació semilogarítmica entre el grau d'inactivació i el nombre de fosfats incorporats a la glicògeno-sintasa.

En conclusió, el nostre treball ha demostrat la presència en fetge de rata de dues quinases de caseïno/glicògeno-sintasa que no són activades per l'AMP cíclic i que poden fosforilar i inactivar la glicògeno-sintasa. Això obre la possibilitat que la insulina i les catecolamines puguin actuar sobre el metabolisme del glicogen modificant l'activitat d'aquestes quinases, i serà l'objecte de futures investigacions.





## INTRODUCCIÓ

### 1.1. Característiques generals del metabolisme del glicogen i la seva regulació

La facultat dels organismes d'interrompre llur sistema d'alimentació es basa en la capacitat d'emmagatzemar energia, generalment en forma de molècules relativament simples, per tal d'utilitzar-la en el manteniment de llur activitat vital.

La cèl·lula animal obté l'energia mitjançant la captació, a partir del medi extern, de molècules energèticament riques. Aquesta captació d'energia a nivell d'organisme no és un procés continuat, puix que són sobradament coneguts els períodes de repòs. Això, no tan sols dóna lloc a l'existència de formes d'acumulació, sinó que també crea la necessitat de tot un sistema de regulació de la captació i la reserva d'aquests compostos energèticament rics.

D'altra banda, l'activitat de tota cèl·lula animal és fluctuant, i així, doncs, la utilització d'aquests compostos emmagatzemats es produeix amb una intensitat molt variable, i fa indispensable un sistema que controli la degradació, en el moment oportú, de les molècules donadores d'energia. El dipòsit que acumula glucosa per cedir-la quan calgui és el glicogen.

L'estructura del glicogen és altament ramificada, el seu pes molecular és elevat i és constituït únicament per molècules d'alfa-D-glucosa. La unió entre les unitats glucosíliques és preferentment del tipus alfa ( $1 \rightarrow 4$ ) amb unions del tipus alfa ( $1 \rightarrow 6$ ) en els punts de ramificació.

Aquesta estructura el fa molt apte per a ésser ràpidament mobilitzat en fases d'alt consum d'energia. L'estructura ramificada li confereix una elevada solubilitat i l'alt pes molecular fa que hi hagi una pressió osmòtica modesta al costat de la que produiria una quantitat comparable de glucosa lliure. La localització del glicogen a la cèl·lula és predominantment citoplasmàtica, formant granulacions de diàmetre variable entre 100 i 400 Å. En aquestes granulacions el glicogen és associat fortament a proteïnes, i especialment amb les que actuen com a enzims del seu metabolisme.

La quantitat de glicogen present en les cèl·lules vives varia àmpliament segons el teixit de procedència, com a conseqüència de l'alta especialització de les cèl·lules produïda en el desenvolupament evolutiu. Malgrat que el

glicogen és present a les cèl·lules de la major part dels teixits de l'organisme d'un mamífer, cal distingir-ne per llur major quantitat el fetge i el teixit muscular.

A la majoria dels teixits, dels quals hom ha pres com a model el múscul esquelètic per la seva importància quantitativa, el glicogen té una funció de reserva limitada de glucosa, mobilitzable per a l'ús particular de la cèl·lula que el conté, i no cap altra.

Ara bé, el fetge, òrgan amb un enorme potencial metabòlic, fa que la presència de glicogen revesteixi unes característiques especials i importantíssimes. La capacitat relativa del fetge per a acumular glicogen és molt elevada, a diferència dels altres teixits, i quan la glucosa i altres substrats glicogènics apareixen sobtadament a la sang després d'una ingesta, són transformats en glicogen i acumulats. El fetge té la possibilitat específica de degradar el seu glicogen fins a glucosa, la qual, vessada a la sang, arribarà als llocs que la reclamin; i així es converteix des d'ara en l'únic administrador de la reserva de glucosa per a tot l'organisme.

La glucosa que arriba a les cèl·lules animals per a ésser emmagatzemada és fosforilada per l'hexoquinasa amb consum d'ATP, formant la glucosa 6-fosfat. En el fetge aquesta reacció és catalitzada per la glucoquinasa. Aquest metabòlit és convertit a glucosa 1-fosfat en reacció catalitzada per la fosfoglucomutasa. És necessària, per a la seva incorporació al glicogen, la conjugació amb la uridina trifosfat, amb la qual, per acció de la UDP-pirofosforilasa, forma la uridina difosfoglucosa (UDPG), donadora de grups glucosil a la reacció de la glicògeno-sintasa, la qual els incorpora al glicogen.

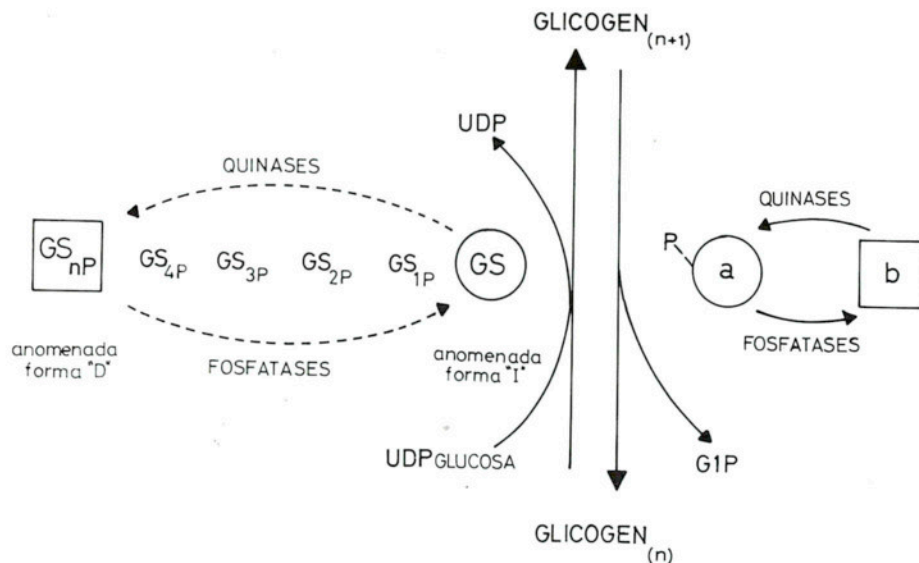
El procés degradatiu es basa en la separació d'unitats de glucosa 1-fosfat a partir de glicogen en la reacció que catalitza la glicògeno-fosforilasa.

Són la glicògeno-sintasa i la glicògeno-fosforilasa, respectivament, els enzims responsables directes del control de la síntesi i de la degradació del glicogen.

La glicògeno-sintasa i la glicògeno-fosforilasa són enzims regulables per canvis en llur grau de fosforilació, és a dir, en el nombre de fosfats units covalentment a la molècula proteica. Les formes de la glicògeno-sintasa actives fisiològicament són les menys fosforilades (formes I), mentre que les formes més actives de la fosforilasa són, precisament, les fosforilades (forma D) (esquema I). Els canvis en el grau de fosforilació poden ésser induïts per la presència d'hormones a l'entorn cel·lular.

Les hormones anomenades glicogenolítiques provoquen en molts teixits la fosforilació de la sintasa i de la fosforilasa mitjançant l'activació de proteïno-quinases, enzims que catalitzen aquest tipus de reacció. En conseqüència, la glicògeno-sintasa és transformada en formes més poc actives mentre que la glicògeno-fosforilasa és convertida a la forma activa. Hormones com la insulina poden provocar el fenomen invers, és a dir, la pèrdua dels fosfats lligats als enzims. El resultat d'una acció hormonal d'aquest



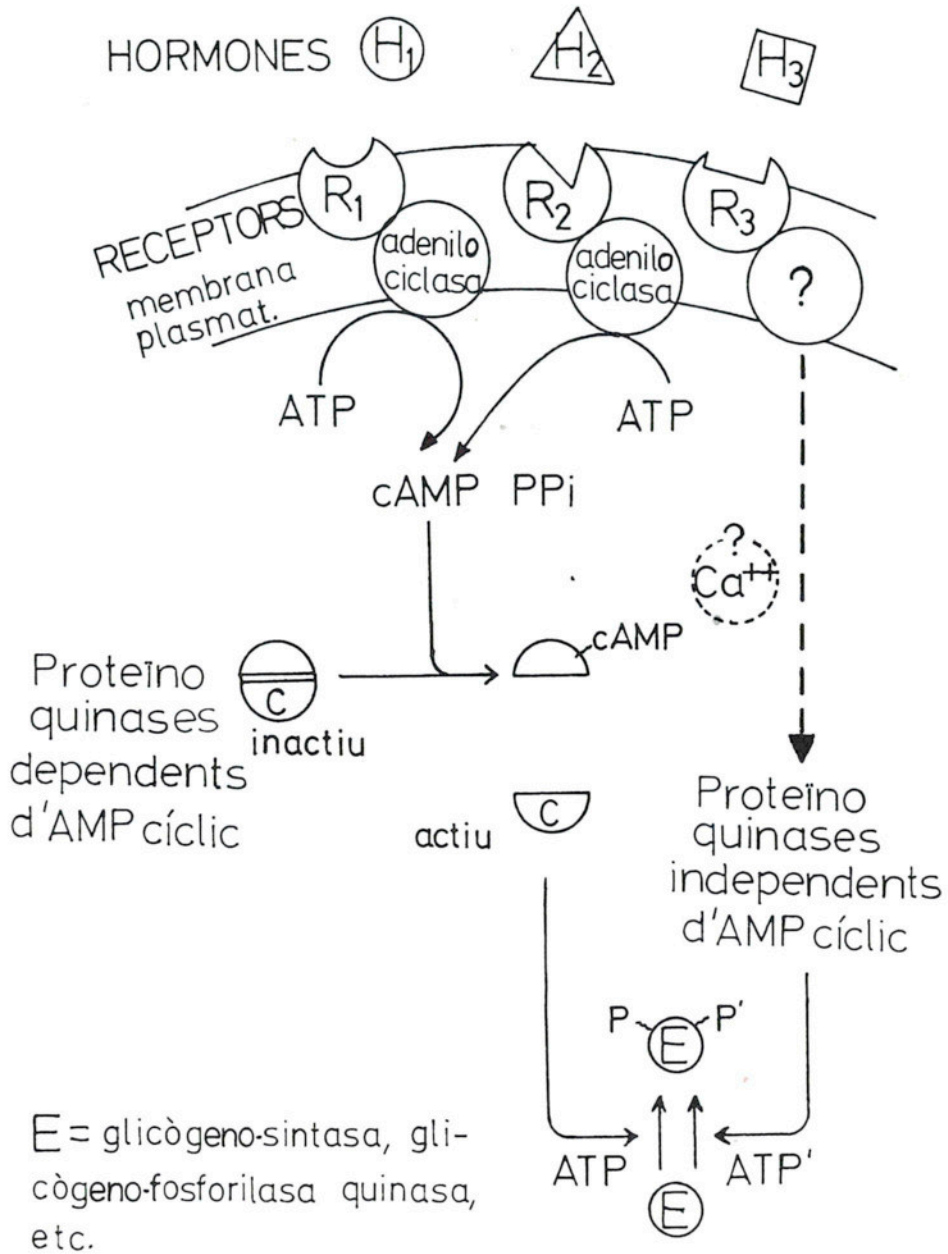


Esquema I. Interconversió dels enzims glicògeno-sintasa i glicògeno-fosforilasa.

tipus produiria l'activació de la sintasa i la inhibició de la fosforilasa, i la conseqüència global seria un increment de la síntesi del glicogen.

Ha passat una vintena d'anys d'ençà que la importància de l'adenosina monofosfat cíclic (AMP cíclic) en la regulació del metabolisme del glicogen fou reconeguda per primera vegada per l'equip de Sutherland (1, 2), uns quinze anys des que el grup de Larner demostrà l'existència de dues formes de la glicògeno-sintasa amb diferent activitat (3) i llur interconversió per una seqüència de reaccions de fosforilació i desfosforilació (4) i tan sols deu anys des que la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic fou descoberta al laboratori de Krebs (5). Amb aquestes troballes fou possible de bastir una teoria vàlida per a explicar la via per la qual l'epinefrina (adrenalina) estimula la degradació del glicogen al múscul esquelètic (6, 7) (esquema II), que posteriorment s'ha fet extensiva a altres teixits i altres hormones, les quals, com l'epinefrina, incrementen els nivells intracel·lulars d'AMP cíclic. Per exemple, el glucagó al fetge.

Fins fa poc temps, la colla d'esdeveniments que origina un increment d'AMP cíclic era l'únic mecanisme d'acció conegut de les hormones que controlen el metabolisme del glicogen sense penetrar a la cèl·lula. Actualment, però, hom n'està revelant d'altres. Tal com ha estat demostrat d'una manera concloent fa molt poc pel grup d'Exton (8,9), l'epinefrina no requereix induir la formació del nucleòtid per a dur a terme els seus efectes a la cèl·lula hepàtica. Actua gairebé exclusivament a través de receptors alfa-adrenèrgics que no estan relacionats amb la formació d'AMP cíclic en con-



Esquema II. Glicogenòlisi impulsada per hormones:

La via mediatitzada per l'adenilo-ciclasa i la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic, i la via independent d'AMP cíclic.

dicions normals, sinó que semblen lligats a canvis de la concentració intracel·lular de calci. Això indueix a postular una via glicogenolítica alternativa, en la qual intervindrien proteïno-quinases controlades no per l'AMP cíclic sinó per altres efectors com pot ésser el mateix calci (esquema II). De fet hom sap que l'activitat de la quinasa de la sintasa total present a molts teixits es comporta en la major part com a independent de l'AMP-cíclic (10) i ja han estat isolades diverses proteïnes amb activitat de la quinasa de la sintasa independent d'aquest nucleòtid (11,12,13).

## 1.2. Glicògeno-sintasa

La glicògeno-sintasa catalitza la formació d'enllaços  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) glucosílics entre l'extrem de les branques de la molècula de glicogen i les unitats de glucosa que contribueixen a allargar-les, i utilitza com a donador d'unitats glucosíliques la UDP-glucosa. El descobriment de l'enzim (14) representà la crisi del concepte segons el qual la fosforilasa era responsable tant de la síntesi com de la degradació del glicogen en condicions fisiològiques.

La reacció catalitzada per la glicògeno-sintasa constitueix la clau del control de la biosíntesi del polímer gràcies a les característiques especials de l'enzim. La regulació de la seva activitat es basa en el fet que es presenta en formes cinèticament distintes i convertibles les unes en les altres per processos de fosforilació i desfosforilació.

El descobriment de l'existència de formes de l'enzim cinèticament diferents (3) derivà d'estudis preliminars sobre l'efecte del tractament del múscul esquelètic amb insulina (15). Poc temps després, la glicògeno-sintasa fou aïllada en dues formes que presentaven diferències quant a la cinètica i al contingut de fosfat unit covalentment (4), i hom establí el concepte de l'existència d'una forma fosforilada, que fou anomenada glicògeno-sintasa D (dependent) pel fet d'ésser molt poc activa en absència de l'efector al·lostèric glucosa 6-fosfat, i d'una altra, la glicògeno-sintasa I (independent), activa àdhuc en absència de glucosa 6-fosfat i que no contenia pràcticament gens de fosfat. La forma D fou considerada fisiològicament inactiva, mentre que la I seria l'activa "in vivo" (16). La forma D era, a més, altament susceptible a la inhibició per nucleòtids d'adenina i per fosfat.

Sovint la glicògeno-sintasa és caracteritzada per la relació entre les activitats mesurades en absència i en presència d'una concentració elevada de glucosa 6-fosfat. Aquesta relació, expressada en forma de percentatge, és coneguda amb el nom de "percentatge de forma I". Ara bé, a causa del descobriment posterior de la possibilitat de fosforilació múltiple de l'enzim, hom considera actualment que els termes "forma I" i "forma D" de la glicògeno-sintasa són atorgables únicament a formes teòriques extremes de desfosforilació i fosforilació respectivament. Entre ambdues situacions hi ha



cabuda per a nombroses possibilitats de fosforilació parcial de la glicògeno-sintasa. Tenint en compte aquestes consideracions, i tal com han dit recentment Roach i Larner (17), el percentatge d'activitat I no ha d'ésser pres com una mesura de la fracció molar de forma I. Malgrat tot, la caracterització de l'enzim mitjançant aquest paràmetre encara és molt útil perquè hi ha una correlació entre aquest i el grau de fosforilació.

### 1.2.1. Interconversió de les formes I i D

Malgrat que alguns metabòlits presents al citoplasma afecten, almenys "in vitro", l'activitat de la glicògeno-sintasa, la condició més marcadament definitiva de l'estat actiu de l'enzim és el grau de fosforilació que presenta i que és determinant tant de la seva activitat intrínseca com de la susceptibilitat d'aquesta per a ésser modificada per efectors específics. Qualsevol canvi del grau de fosforilació mena l'enzim des d'unes formes a unes altres amb activitat diferent. Aquesta conversió, que en condicions fisiològiques és operada per passos específics de fosforilació i desfosforilació, és el fenomen que possibilita bàsicament el control de la velocitat de la reacció catalitzada.

#### 1.2.1.1. Fosforilació covalent de la glicògeno-sintasa

La primera descripció de la interconversió de formes de la glicògeno-sintasa per fosforilació covalent, al treball de Friedman i Larner (4), data de fa quinze anys. La introducció de fosfat en la molècula d'enzim provocava la pèrdua d'activitat quan aquesta era mesurada en absència de glucosa 6-fosfat: es produïa la conversió de I a D. D'aleshores ençà, i a la vista de la possibilitat que la fosforilació fos múltiple, és a dir, que s'incorporés més d'un fosfat per subunitat de la glicògeno-sintasa, l'interès d'una bona colla de grups de treball s'ha centrat en l'estudi de l'estequiometria total de la reacció de fosforilació i a discernir quines i quantes són les molècules de fosfat introduïdes per cadascuna de les proteïno-quinases dependents d'AMP cíclic i quinases de la glicògeno-sintasa que han anat essent descrites durant els darrers anys. La determinació dels centres específicament fosforilables per cada quinasa, la transcendència que cada un dels fosfats introduïts té en la modificació de les qualitats de l'enzim, i la funció fisiològica de cada estat de fosforilació, són altres fites cobejadíssimes per a l'avenç del coneixement del sistema de la glicògeno-sintasa.

Al treball original de Friedman i Larner (4) l'anàlisi de la incorporació de fosfat radiactiu a la glicògeno-sintasa purificada a partir del teixit muscular donà un valor de 5 fosfats per subunitat de 85.000 dàltons. Al mateix laboratori, analitzant el contingut en fosfats labilitzable per acció d'àlcali, hom ha obtingut el valor de 6 fosfats per subunitat de glicògeno-sintasa (18). Aquests valors són els més alts trobats per a l'enzim de múscul i foren

observats després d'incubacions molt prolongades a 4° C, amb concentracions elevades de MgATP i AMP cíclic, les quals rendien productes finals amb activitat glicògeno-sintasa essencialment nul·la en absència de glucosa 6-fosfat. Molt probablement eren el resultat de l'acció combinada de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic i de quinases de glicògeno-sintasa, desconegudes encara aleshores, que acompanyaven aquella en les seves preparacions parcialment purificades.

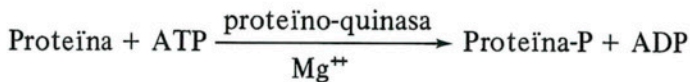
La quinasa de la glicògeno-sintasa descoberta i purificada recentment per Itarte i col·lab. (13) és capaç d'incorporar ella sola 4 mols de fosfat per mol de subunitat de glicògeno-sintasa, conduint-la vers la inactivació total en unes condicions experimentals en les quals la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic produeix un descens en la relació d'activitats fins a 0,40 després d'una incorporació màxima de 2 mols de fosfat per mol d'enzim (13).

A la glicògeno-sintasa procedent d'altres teixits també han estat observades fosforilacions múltiples que transformen formes de l'enzim "independents" en formes més o menys "dependents" (19, 20, 21).

Lluny encara de conclusions definitives sobre el tema, les dades descrites sostenen, si més no, les idees originals sobre la fosforilació covalent múltiple com a mecanisme convertidor de les formes més actives de la glicògeno-sintasa en les fisiològicament inoperants.

### 1.3. Proteïno-quinases

Les proteïno-quinases, anomenades també proteïno-fosfotransferases, catalitzen la transferència del fosfat gamma-terminal de l'ATP a una gran varietat de proteïnes de substrat, segons la reacció següent:



on el fosfat queda unit covalentment a la proteïna.

Per a una millor identificació hom les agrupa en funció de llur dependència d'AMP cíclic. Així, es classifiquen en dos grans grups: les proteïno-quinases dependents d'AMP cíclic, que necessiten la presència d'aquest nucleòtid per a ésser actives, i les proteïno-quinases independents d'AMP cíclic.

#### 1.3.1. Proteïno-quinases dependents d'AMP cíclic

L'existència de la primera proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic fou inicialment relacionada amb la degradació del metabolisme del glicogen, com a responsable de l'activació de la quinasa de la fosforilasa (22). Poste-



riorment Rosell-Pérez i Larner (23) demostraren que la inactivació de la glicògeno-sintasa era estimulada per l'AMP cíclic.

Foren Soderling i col·lab. (24) qui, anys més tard, demostraren que aquesta proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic, isolada per Walsh (5), podia fosforilar la glicògeno-sintasa.

La seva localització és predominantment citoplasmàtica al múscul esquelètic (5) i cardíac (25), al fetge i en altres teixits (26); hom ha trobat també que es presenta associada a la fracció membranosa. En el cas del cervell, hom ha trobat activitat proteïno-quinàsica dependent d'AMP cíclic en el mateix nucli cel·lular (25).

### 1.3.1.1. Estructura i característiques de les proteïno-quinases dependents d'AMP cíclic

Aquests enzims són una classe de quinases que són formades per dos tipus de subunitats: unes anomenades reguladores (R) i unes altres anomenades catalítiques (C). Les subunitats reguladores són les que fixen l'AMP cíclic, mentre que les catalítiques són les que contenen el centre actiu. L'activitat d'aquests enzims només té lloc quan la subunitat catalítica (C) és lliure, és a dir, quan el conjunt holoenzimàtic (RC) és dissociat per la fixació d'AMP cíclic a les subunitats reguladores:



Avui dia hom accepta l'existència de, com a mínim, dues activitats isoenzimàtiques d'aquesta proteïno-quinasa, denominades respectivament tipus I i II, perquè són separables per cromatografia en columnes de DEAE-cel·lulosa (27, 28); d'aquí en ve el nom. Cadascuna d'aquestes formes depèn de cada teixit, i varia segons l'espècie animal; fins i tot, han estat descrites diferències segons el tipus de cèl·lules.

Els substrats sobre els quals actuen són molt variats. Inicialment foren identificats com a substrats seus la quinasa de la fosforilasa, la caseïna, la protamina (5), certes histones, la fosvitina (29) i altres proteïnes enzimàtiques sotmeses a control per fosforilació, entre elles la glicògeno-sintasa.

### 1.3.1.2. Regulació de l'activitat de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic

És evident que són els nivells d'AMP cíclic en la cèl·lula els primers reguladors de l'activitat d'aquestes proteïno-quinases. Però no podem oblidar, i per això cal fer-ne esment, la transcendència que poden tenir sobre la regulació *in vivo* els efectes de l'inhibidor proteic específic (30) i també els efectes encara poc coneguts de l'autofosforilació del pic II (forma holoenzimàtica II).



L'inhibidor proteic de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic fou purificat per Walsh (30) a partir d'extractes crus de múscul de conill, i pot causar la inactivació de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic (30, 31). Aquest inhibidor es comporta com a proteïna termoestable i no afecta altres proteïno-quinases. La inhibició causada és de tipus no competitiu respecte a l'ATP, a l'AMP cíclic o al substrat proteic (30). Hom li ha estimat un pes molecular de 26.000 per filtració, per gel.

Encara són poques les dades que tenim per a arribar a conclusions sobre la transcendència fisiològica de l'inhibidor, però si les extrapolacions d'*in vitro* a *in vivo* són correctes, una bona part de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic que es troba dissociada pot ésser perfectament blocada pel seu inhibidor proteic.

L'autofosforilació del pic II de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic en presència de baixes concentracions d'ATP és un fet constatat (32, 33). D'altra banda no són fosforilades les subunitats catalítiques, i la incubació de la forma I en presència d'ATP donà resultats molt baixos d'autofosforilació (27). Estem lluny encara de determinar la importància fisiològica de l'autofosforilació. Hi ha acord general sobre el fet que l'autofosforilació facilita la dissociació de l'holoenzim, augmentant l'afinitat per l'AMP cíclic *in vitro* (27, 34). La possibilitat que l'autofosforilació sigui controlable *in vivo* per hormones compta amb uns certs resultats experimentals que hi presten suport (35), però falten encara moltes dades per a tenir-ne el convenciment.

### 1.3.2. Proteïno-quinases independents d'AMP cíclic

El coneixement de l'existència de quinases de la glicògeno-sintasa que fossin actives en absència d'AMP cíclic és un fet recent. L'any 1974 Nimmo i Cohen (11), incubant la glicògeno-sintasa en presència de l'inhibidor de la proteïno-sintasa, observaren la fosforilació de la glicògeno-sintasa. Partint d'aquest fet, aquests autors conclogueren que la nova activitat proteïno-quinàsica (anomenada quinasa-2 de la glicògeno-sintasa) determinada es diferenciava de la coneguda activitat proteïno-quinàsica dependent d'AMP cíclic principalment perquè: a) no era activable per la presència d'AMP cíclic; b) no era inhibida per l'inhibidor proteic abans esmentat, i c) fosforilava la glicògeno-sintasa sense aparent conversió de la forma I en la D. Cal esmentar que posteriorment rectificaren aquest últim punt, bo i apreciànt una conversió de la forma I en D en ésser fosforilada la glicògeno-sintasa en reacció catalitzada per la GSK-2 (36).

Un any més tard foren aïllades les primeres proteïno-quinases independents d'AMP cíclic (37, 38). Huang i col·lab. (12) identificaren una fosfotransferasa capaç de fosforilar la glicògeno-sintasa independentment de la presència d'AMP cíclic. El nombre de mols de fosfat per subunitat de

85.000 dàltons de la glicògeno-sintasa que incorporava aquesta fosvitino-quinasa era d'un.

Posteriorment Nimmo i col·lab. (37) aïllaren la quinasa-2 de la glicògeno-sintasa, que és localitzada d'una manera relativament específica al complex glicogen-proteïna de les fibres de múscul de conill. Segons aquests autors, la quinasa-2 de la glicògeno-sintasa incorporava un mol de fosfat per cada mol de subunitat de glicògeno-sintasa. Aquesta quinasa no és capaç de transformar totalment la forma I de la glicògeno-sintasa en forma D. La incubació conjunta de les dues quinases (quinasa-2 de la glicògeno-sintasa i proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic) porta a una quasi total transformació de la forma I en D, amb la incorporació de dos mols de fosfat per cada mol de subunitat de glicògeno-sintasa. Molt posteriorment aquests autors reconegueren que aquesta GSK-2 aïllada (37) no era l'anteriorment identificada i anomenada GSK-2 (11). Conegut això, la quinasa de la glicògeno-sintasa aïllada (37) fou anomenada GSK-3 (39). Molt recentment la GSK-2 (11), un cop aïllada i parcialment purificada, ha estat identificada i és la quinasa de la fosforilasa (36).

Al començament de l'any 1977, Itarte i col·lab. (13) identificaren, purificaren i caracteritzaren, a partir de múscul esquelètic de conill, una proteïno-quinasa independent d'AMP cíclic que era capaç de fosforilar la glicògeno-sintasa I convertint-la totalment a forma D. Aquesta proteïno-quinasa, anomenada quinasa de la glicògeno-sintasa (P-3), purificada mitjançant una columna de cromatografia de fosfocel·lulosa, es diferenciava de les proteïno-quinases dependents d'AMP cíclic perquè: a) presentava diferent especificitat per al substrat; b) no era dependent dels nivells d'AMP cíclic; c) no veia afectada la seva activitat per la presència de l'inhibidor proteic de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic, i d) el nombre de mols de fosfat incorporat per subunitat de 85.000 de la glicògeno-sintasa era de quatre.

Aquests mateixos autors deixen entendre clarament que aquesta quinasa de la glicògeno-sintasa P-3 és diferent de l'esmentada l'any 1975 per Huang (37).

La possible importància *in vivo* d'aquestes proteïno-quinases independents d'AMP cíclic en el metabolisme del glicogen es féu evident.

Schlender i Reimann (10) demostraren amb un extens estudi l'existència de quinases de la glicògeno-sintasa independents d'AMP cíclic en nombrosos teixits i òrgans de rata, i asseguraren que la proporció d'activitat de la quinasa de la glicògeno-sintasa deguda a quinases independents dels nivells d'AMP cíclic era del 97 % al ronyó, del 91 % al fetge, del 87 % al cervell, del 85 % al cor i del 38 i 33 %, respectivament, al teixit adipós i al múscul esquelètic.

L'àmplia distribució, l'elevada concentració i, en algun cas conegut (13), la capacitat per a catalitzar la total conversió de la glicògeno-sintasa I en D, fan pensar que aquests tipus de quinases de la glicògeno-sintasa inde-



pendents tenen un paper fisiològic important i formen part de sistemes de control de la síntesi del glicògen independentment dels nivells d'AMP cíclic.

També han fet estudis amb aquests tipus de proteïno-quinasa, utilitzant com a substrat la glicògeno-sintasa, Soderling i col·lab. (40) i Brown i col·lab. (41). Tant els uns com els altres aconseguixen conversions parcials de la glicògeno-sintasa de I en D, incorporant un mol de fosfat per subunitat d'enzim, en reacció catalitzada per proteïno-quinases independents d'AMP cíclic.

### 1.3.2.1. Estructura i característiques de les quinases de la glicògeno-sintasa independents d'AMP cíclic

Tot i que són diverses les quinases de la glicògeno-sintasa independents conegudes, les caracteritzades són poques. La purificada per Itarte i col·lab. (13) ha estat recentment caracteritzada (42). Per determinació en filtració per gel i per centrifugació en gradient de glicerol hom li calculà un pes molecular aproximat de 34.000 unitats de massa atòmica, d'estructura monomèrica i que utilitza ATP i no GTP com a substrat (43). És una quinasa capaç de fosforilar també la caseïna i la fosvitina. No fosforila la histona. La seva activitat de quinasa de la sintasa és inhibida a altes concentracions de NaCl o KCl, però no és afectada per la presència de glucosa 6-fosfat, ni per la UDP-glucosa (substrat de la glicògeno-sintasa). La  $M_{0,5}$  per ATP és de  $12 \mu\text{M}$  i de  $0,15 \text{ mM}$  per  $\text{Mg}^{++}$ .

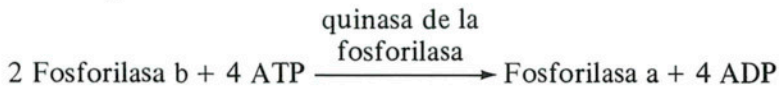
Respecte a la glicògeno-sintasa-2 esmentada per Cohen i col·lab. (11), cal dir que recentment ha estat identificada pels mateixos autors com la ja coneguda quinasa de la fosforilasa (36).

L'avenç dels estudis sobre quinases de la glicògeno-sintasa ha d'aclarir una sèrie important de qüestions referents tant a la natura dels processos de fosforilació de la glicògeno-sintasa com als mecanismes de control hormonal que són mediatitzats per aquests enzims.

### 1.3.3. Quinasa de la fosforilasa

En iniciar aquest apartat hem parlat de dos tipus de proteïno-quinases, les dependents d'AMP cíclic i les independents d'aquest nucleòtid cíclic, manera arbitrària d'agrupar la gran varietat d'aquests enzims. Veiem per un altre costat que aquesta classificació inclou la gran majoria de proteïno-quinases, però en són conegudes també d'altres que no s'inclouen dins aquests dos grans grups.

La quinasa de la fosforilasa és un enzim que forma part de la cadena de degradació del glicògen. La quinasa de la fosforilasa de múscul (44) catalitza la reacció següent:



La fosforilasa muscular en fosforilar-se s'activa i passa d'una forma anomenada b (no fosforilada) a una forma a (fosforilada). La fosforilasa a, forma activa *in vivo*, és la responsable de la degradació del glicogen.

La quinasa de la fosforilasa de múscul esquelètic ha estat purificada fins a homogeneïtat i caracteritzada amb molt de detall. Es presenta també en dues formes, una de fisiològicament activa (forma a) i una altra d'inactiva (forma b), que poden ésser distingides l'una de l'altra *in vitro* per l'activitat que presenten a pH 6,8. En presència de  $\text{Ca}^{++}$  i de concentracions òptimes de Mg-ATP, la forma b presenta molt poca activitat a pH 6,8 en comparació amb la que presenta a pH 8,2. La relació de l'activitat a pH 6,8 respecte a la de pH 8,2 de la forma b és de 0,01 a 0,02. La forma a presenta, per contra, una relació d'activitats de 0,3-0,4 de 50 a 100 vegades més actives que la forma b (45, 46).

La glicògeno-sintasa havia estat descrita per Friedman i Larner (47) com un enzim no fosforilable per la quinasa de la fosforilasa. Molt recentment han estat publicats una sèrie de treballs relacionats amb aquest fet. Inicialment hom descriví una proteïna dependent de calci capaç d'estimular la fosforilació de la glicògeno-sintasa (39,48), però Roach i col·lab. observaren per primera vegada que la quinasa de la fosforilasa catalitza la fosforilació de la glicògeno-sintasa (48).

Mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida amb SDS la quinasa de la fosforilasa es resol en quatre components anomenats  $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  amb uns pesos moleculars de 145.000, 140.000, 128.000 i 45.000 dàltons respectivament (45).

Cohen i col·lab. han demostrat recentment que la quinasa de la fosforilasa és composta de quatre, i no de tres, subunitats diferents. El pes molecular total ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ )<sub>4</sub> és de 1.340.000 unitats de massa atòmica. La subunitat delta té un pes molecular de 17.000 i és present en la molècula de quinasa de la fosforilasa en una concentració equimolecular amb les subunitats alfa, beta i gamma.

Molt recentment aquests mateixos autors han observat una completa similitud entre la subunitat delta i el modulador proteic dependent de calci (anomenat *calmodulina*) segons els criteris següents: estabilitat a la calor, cromatografia d'intercanvi iònic, mobilitat electroforètica, composició d'aminoàcids, espectre d'absorció i, fins i tot, en l'activació de la quinasa de la fosforilasa; activació que d'altra banda pot ésser comparada amb la produïda per la troponina-C. Aquesta proteïna i la subunitat delta esmentada mostren un 50 % d'aminoàcids en idèntica seqüència i ambdues són activables amb concentracions micromolars de calci (50).

Posteriorment Roach i col·lab. (51) suggeriren que l'estimulació de l'activitat de la quinasa de la fosforilasa per addició de calmodulina és directament relacionada amb l'habilitat de la quinasa a acoblar-se amb aquest component. Aquesta activació, que es perd per proteòlisi amb tripsina, és

un procés diferent al de l'activació per calci sol, ja que en aquest cas l'activació es manté després de la proteòlisi amb tripsina. Vist això, conclouen que el calci pot estimular la quinasa de la fosforilasa: a) directament, per interacció amb una subunitat encara no completament identificada, i b) mitjançant l'addició de calmodulina.

També ha estat descrita una proteïno-quinasa de múscul esquelètic que, d'una manera similar a la fosfodiesterasa dependent de calci (52), és activable pel modulador proteic dependent de calci i és també independent d'AMP cíclic. Aquesta quinasa és capaç de fosforilar la quinasa de la fosforilasa i produir la seva activació.





## MATERIALS I MÈTODES

### 2.1. Reactius i productes utilitzats

Els reactius i productes utilitzats en aquest treball i la firma comercial de procedència són els següents:

#### 2.1.1. *Reactius generals*

SIGMA CHEMICAL Co.:

ATP, sal disòdica; AMP cíclic, àcid; albúmina bovina; blau de bromofenol; caseïna, tipus Hammarsten; DTT; EDTA; EGTA; fosvitina; glicerol; glicogen, de fetge de conill; glucosa 6-fosfat, sal monosòdica; histona II A; TEMED; persulfat amònic; PMSF; Tris; UDP-glucosa, sal disòdica, de llevat; UTP, sal disòdica, de múscul equí.

MERCK:

Clorur magnèsic; clorur potàssic; reactiu de fenols de Folin-Ciocalteus; fosfat monopotàssic; beta-glicerofosfat sòdic; sulfat cúpric; tartrat sòdic-potàssic.

CARLO ERBA:

Acetat sòdic, sulfat amònic.

BIO RAD LABS:

Acrilamida, N,N'-dimetil-bis-acrilamida, SDS.

BAKER:

Àcid tricloracètic, àcid acètic.

KOCK-LIGHT:

PPO.

#### 2.1.2. *Productes radioactius*

RADIOCHEMICAL CENTER, AMERSHAM:

Alfa-D(U-<sup>14</sup>C)-glucosa; UPD-(U-<sup>14</sup>C)-glucosa; àcid <sup>32</sup>P-ortofosfòric; (gamma-<sup>32</sup>P)ATP.

### 2.1.3. Reactius per a cromatografia

PHARMACIA FINE CHEMICALS:

Sepharosa 4 B.

WHATMAN:

Fosfocel·lulosa (P-11).

BIO-RAD LABS:

Bio-gel A-1,5 m.

GELMAN INSTRUMENT Co.:

Paper cromatogràfic ITLC tipus SG.

## 2.2. Animals utilitzats

Per a dur a terme aquest treball foren utilitzades rates Wistar adultes de 200-300 g de pes i de 10-15 setmanes d'edat, alimentades amb dieta ordinària de laboratori (Sanders i Panlab) i aigua *ad libitum*.

Els animals eren mantinguts en una cambra amb temperatura controlada i estaven sotmesos al ritme normal de llum-obscuritat.

## 2.3. Determinació de l'activitat proteïno-quinàsica

La mesura d'activitat de les diferents proteïno-quinases fou determinada en tots els casos pel mètode de Huang i Robinson (53). Aquest mètode es basa en la determinació de la transferència del grup fosfat terminal de l'ATP marcat amb ( $\gamma$ - $^{32}$ P)ATP a les proteïnes utilitzades com a substrat, i la separació de la proteïna fosforilada amb  $^{32}$ P del ( $\gamma$ - $^{32}$ P)ATP lliure mitjançant la precipitació àcida de les proteïnes i posterior cromatografia en capa fina.

La solució d'assaig per a la determinació d'activitat de les proteïno-quinases independents d'AMP cíclic es componia de: beta-glicerofosfat sòdic 25 mM pH 7,0, DTT 1 mM, EDTA 0,5 mM, EGTA 0,5 mM, acetat magnèsic 10 mM i ( $\gamma$ - $^{32}$ P)ATP 0,125  $\mu$ M, amb una radioactivitat específica que oscil·lava entre 80 i 200 c.p.m./pmol. Per a la determinació d'activitat de les proteïno-quinases dependents d'AMP cíclic, s'hi afegia AMP cíclic a una concentració de  $2 \times 10^{-5}$  M. La concentració de proteïna substrat era generalment de 4 mg/ml.

Per a la realització de l'assaig hom seguia l'esquema operatiu següent: hom disposava 40  $\mu$ l de la solució d'assaig en un tub i es deixava temperar durant uns minuts en un bany a 30° C. Tot seguit s'hi afegien 10  $\mu$ l de la solució enzimàtica a valorar, es sacsejava enèrgicament i la mescla era deixa-



da en incubació a 30° C durant el període de temps que hom estimava necessari perquè es transformés com a màxim el 10 % del substrat present (generalment eren 10 minuts). Per aturar la reacció, hom afegia 10 $\mu$ l d'àcid acètic a cada tub i agitava enèrgicament els tubs.

El (gamma-<sup>32</sup>P)ATP que no havia reaccionat se separava de la proteïna fosforilada amb <sup>32</sup>P mitjançant una cromatografia ascendent en paper ITLC, tipus SG. Aquest paper era tallat en tires de 1,5 × 10 cm i s'hi dipositaven 30  $\mu$ l de la mescla de reacció a 1,5 cm de l'extrem inferior. Les tires eren col·locades immediatament en un recipient que contenia una solució de KCl 0,2 M en TCA al 5 % com a líquid cromatogràfic. El TCA precipitava la proteïna i el KCl facilitava la separació del (gamma <sup>32</sup>P)ATP lliure que pujava amb el front.

Un cop desenvolupada la cromatografia ascendent (uns 5 minuts), els papers es deixaven assecar durant 30 minuts sota l'acció de radiació infraroja en una vitrina de gasos. Seguidament hom tallava un tros de 2,5 cm de cada tira (1,5 cm per sobre i 1,0 cm per sota de la ratlla d'aplicació) que era introduït en un vial que contenia 10 ml de toluè amb PPO al 5 %, i hom mesurava la radioactivitat que presentava amb un comptador de centelleig líquid, model Isocap/300 (Nuclear Chicago).

#### 2.4. Determinació de l'activitat glicògeno-sintàsica

L'activitat de l'enzim glicògeno-sintasa fou mesurada mitjançant la incorporació de (<sup>14</sup>C)-glucosa al glicogen a partir d'uridina difosfo(<sup>14</sup>C)-glucosa, seguint el mètode descrit per Thomas i col·lab. (54).

La solució d'assaig contenia UDP(<sup>14</sup>C)-glucosa 6,67 mM, glicogen 10 mg/ml, KF 25 mM, EDTA 20 mM i tris-HCl 50 mM (pH 7,8). La radioactivitat específica de la UDP(<sup>14</sup>C)-glucosa oscil·lava entre 80.000 i 200.000 c.p.m./ $\mu$ mol quan hom volia mesurar l'activitat de la forma I. Per a la determinació de l'activitat de la forma total hom addicionava a la mescla glucosa 6-fosfat 10 mM.

Per tal de dur a terme l'assaig hom seguia l'esquema operatiu següent: es disposaven 40  $\mu$ l de la solució d'assaig en un tub i es deixaven atemperar durant uns minuts en un bany a 30° C. Tot seguit s'hi afegien 20  $\mu$ l de la solució enzimàtica a valorar i la mescla es deixava incubant a 30° C durant el període de temps que hom estimava necessari perquè es transformés com a màxim el 10 % del substrat present.

Per aturar la reacció hom prenia 50  $\mu$ l de la dita mescla i els dipositava sobre un quadrat de 2 × 2 cm de paper de filtre Whatman, tipus 31 ET, que tot seguit era submergit en etanol al 66 % fred. El glicogen, que precipita en etanol al 66 %, restava atrapat dins la trama de paper, mentre que els altres components de la mescla de reacció eren eliminats per rentats successius de

10, 30 i 30 minuts amb etanol al 66 %. El paper era submergit finalment en acetona, que facilitava l'assecat, el qual era dut a terme sota l'acció de radiació infraroja.

El paper, ben sec, era introduït en un vial que contenia 10 ml de toluè amb PPO al 0,5 % i hom mesurava la radioactivitat que presentava amb un comptador de centelleig líquid, model Isocap/300 (Nuclear Chicago).

## 2.5. Regeneració i equilibrament de fosfocel·lulosa (P-11)

Tots els intercanviadors iònics-cel·lulòsics han d'ésser rentats convenientment abans d'ésser utilitzats. Això és degut al fet que, a part de la possible contaminació deguda al procés de fabricació, hi poden haver productes de la degradació oxidativa de la fosfocel·lulosa, procés que té lloc lentament, però que és continuat al llarg de l'emmagatzemament. A més de l'eliminació d'impureses, el rentat, conduint a la hidratació de la matriu cel·lulòsica, augmenta l'accessibilitat dels llocs ionitzats a les molècules que s'hi absorbeixen.

La fosfocel·lulosa seca era dipositada en un vas de precipitats que contenia NaOH 0,5 - 1 N, i hom la deixava sedimentar després d'una forta agitació. La relació pes/volum era 1/20, a fi que tota la cel·lulosa quedés coberta amb NaOH. El sobrenedant, generalment de color grogós i amb abundant nombre de partícules petites no sedimentades, era eliminat per decantació o centrifugació. Aquest rentat amb NaOH es repetia dos cops.

Ajudats d'un embut de vidre filtrant i aplicant el buit hom duia a terme dos o tres rentats amb aigua destil·lada fins a la neutralització del líquid de rentat. Un cop així, la fosfocel·lulosa era submergida en aigua i hom li addicionava HCl a poc a poc fins a assolir un pH de 5 - 6; tot seguit, i després d'una forta agitació, hom hi afegia més HCl fins a aconseguir un pH de 2 - 2,2. Un cop ben agitat, hom la rentava de nou amb aigua destil·lada igual que abans. Després de filtrar, hom la resuspenia en NaOH 0,5 - 1 N, la filtrava de nou i la rentava amb aigua destil·lada fins que el líquid de rentat deixava d'ésser alcalí. Per a acabar hom la rentava amb àcid acètic 0,5 M, i n'eliminava posteriorment l'acidesa rentant-la amb aigua fins a la neutralització del líquid de rentat. Posteriorment hom deixava la fosfocel·lulosa submergida amb el tampó adequat per a l'equilibrat de la columna a 4° C i amb agitació durant 8 o 10 hores. Passat aquest temps, la fosfocel·lulosa està preparada per a ésser empaquetada a la columna corresponent.

## 2.6. Preparació de Sepharosa-caseïna

Per a la preparació de la columna d'afinitat de Sepharosa 4B-caseïna hom seguí el mètode de Farron-Furstental i col·lab. (55), que és basat en les



modificacions fetes per David i Reisfeld (56) del mètode de Cuatrecasas (57).

### 2.6.1. Preparació de la caseïna

A causa de la dificultat de solubilització de la caseïna seguirem el mateix procés. Partíem de 4 g de caseïna que es dissolien en 60 ml d'aigua i la posàvem a bullir en un bany maria durant uns 10 minuts. Tot seguit hi afegíem NaOH 1 N fins a obtenir un pH de 9 - 9,5. Un cop ben fred, ajustàvem el pH a 5,9 amb àcid acètic 1 N i, després d'una ràpida centrifugació, ens quedàvem amb la part sobrenedant com a solució de caseïna a utilitzar.

### 2.6.2. Procés de còpula de la Sepharosa 4B amb la caseïna

Agafàvem una quantitat de Sepharosa-4B tal que en centrifugar a 700 x g durant 15 minuts proporcionés un sediment de 200 ml de gel.

La rentàvem amb força quantitat d'aigua repetides vegades. Finalment la resuspeníem en un volum de 200 ml d'aigua i la col·locàvem en un bany amb gel en constant agitació. L'ajustàvem a pH 11,0 amb unes gotes de NaOH al 10 %. Seguidament hi adicionàvem 50 grams de BrCN polvoritzat, i manteníem el pH del medi entre 10,8 i 11,2 mitjançant l'addició de NaOH al 10 % fins a l'estabilització total del pH. Aquest procés té una durada aproximada de 20 a 30 minuts. Alhora cal mantenir la temperatura a 20° C amb l'addició de gel d'aigua destil·lada. Un cop estabilitzat el procés, cal refredar-lo fins a 4° C afegint-hi més gel d'aigua destil·lada.

La Sepharosa activada era rentada ràpidament en un embut de vidre filtrant, amb 2 o 3 litres d'una solució de fosfat sòdic 0,01 M (pH 7,5) amb clorur potàssic 0,1 M, mitjançant una succió amb una bomba de buit. Un cop neta, la Sepharosa activada passava a un erlenmeyer amb 200 ml del mateix tampó que contenia dissolts 3 grams de caseïna. Això era deixat en agitació durant 16 hores a 4° C.

Seguidament hom la filtrava i comprovava l'eficàcia de l'acoblament, bo i determinant la quantitat de proteïna existent en el filtrat en rentar el gel amb el mateix tampó d'acoblament. Després del rentat, la Sepharosa 4B-caseïna era resuspensa en una solució composta de fosfat sòdic 0,01 M (pH 7,5) i etanolamina 0,2 M, i hom la deixava a 4° C durant 3 o 4 hores.

Finalment hom la filtrava de nou i la resuspensia en la solució d'equilibrat, que era composta de: Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), PMSF 0,1 mM, ditiotreitòl 1 mM i glicerol al 5% (solució A). Hom la rentava diverses vegades amb aquest tampó i la conservava en fred entre 0° i 4° C.

Un cop utilitzada, la columna pot ésser regenerada amb successius rentats amb clorur potàssic 2 M i reequilibrant-la de nou amb el tampó convenient. Així es pot aprofitar per a 4 o 5 processos de purificació.

## 2.7. Altres tècniques determinatives

### 2.7.1. Determinació de proteïna

Per a les determinacions quantitatives de proteïna hom utilitzà el mètode de Lowry i col·lab. (58).

Hi ha una sèrie de productes que produeixen interferències que donen falsos resultats en aquest mètode. Entre ells hom coneix alguns productes que formen part dels nostres tampons, i per això adaptarem les modificacions de Bensadown i col·lab. (59). La modificació es basava a precipitar prèviament la proteïna amb TCA al 6,6 % en presència de desoxicolat sòdic al 0,002 % i eliminar posteriorment el sobrenedant per centrifugació a  $4.000 \times g$  durant 30 minuts a  $4^\circ C$ .

El precipitat era dissolt en 1 ml d'una solució de: tartrat sòdic 1 mM, sulfat cúpric 0,4 mM, carbonat sòdic 0,2 M i NaOH 0,1 M. Després de 10 minuts s'hi afegien 0,1 ml de reactiu de Folin, i l'extinció del complex colorat que es formava era llegida al cap de 30 minuts a 750 o 660 nm. Totes les determinacions es comparaven amb solucions de concentració coneguda d'albúmina.

Per tal de determinar la concentració de proteïna de les mostres eluïdes de les columnes, hom mesurava llur absorció a 280 nm en un espectrofotòmetre Beckman DB-GT, prenent 1,0 com el valor d'absorció corresponent a una concentració de 1 mg/ml. Les mostres eren diluïdes en tampó A per tal que l'absorció fos més petita que 1,0 en tots els casos.

### 2.7.2. Determinació de pesos moleculars

Hom féu la determinació de pesos moleculars per filtració i per gel per electroforesi en gels de poliacrilamida en presència de SDS.

La filtració per gel fou duta a terme en una columna de  $1,5 \times 90$  cm de Bio-gel A 1,5 m equilibrada amb solució A amb KCl 0,4 M. El volum buit ( $V_0$ ) fou determinat amb blau dextrà i hom calibrà la columna amb proteïnes patró de pes molecular (PM) conegut, i en determinà el volum d'elució ( $V_e$ ).

Els valors obtinguts foren els següents:

	PM	$V_e/V_0$
Aldolasa	150.000	1,76
Alcohol deshidrogenasa	125.000	1,79
BSA	67.000	2,04
Ovoalbúmina	44.000	2,14
Quimotripsinogen A	25.700	2,44

Per càlculs de regressió lineal, hom determinà l'equació següent:



$$\text{Log PM} = - 1,14 \text{ Ve/Vo} + 7,15$$

Aquesta equació ens permeté de calcular el pes molecular de les ca-seïno-quinases en determinar llur volum d'elució.

Per a la determinació de pesos moleculars per electroforesi hom seguí el procediment descrit per Laemli (60). Els gels utilitzats eren de poliacrilamida al 5 % (P/V) amb una relació acrilamida/bisacrilamida de 30/1 (P/P) en presència de SDS.

Les mostres problema que hom aplicava a cada gel eren prèviament incubades durant 3 minuts a 100° C amb una solució que era composta de: tampó fosfat 0,01 M (pH 7,2), SDS a l'1 % (P/V), mercaptoetanol a l'1 %, glicerol al 20 % (V/V) i blau de bromofenol al 0,002 % (P/V).

Els gels foren calibrats amb proteïnes de pes molecular conegut i llur mobilitat relativa (MR) fou referida a la del blau de bromofenol utilitzat com a front. Les proteïnes utilitzades foren:

	PM	MR
BSA	67.000	0,32
Ovoalbúmina	44.000	0,51
Inhibidor de tripsina	20.100	0,95

L'equació obtinguda en representar aquestes dades fou la següent:

$$\text{Log PM} = - 0,82 \text{ MR} + 5,08$$

Així, en conèixer la mobilitat relativa de les quinases, podíem determinar-ne el pes molecular.

## 2.8. Purificació de la glicògeno-sintasa I

La glicògeno-sintasa I fou purificada a partir de múscul esquelètic de conill segons el mètode desenvolupat per Smith i col-lab. (61), i posteriorment modificat per Takeda i col-lab. (62), que és el que permet d'obtenir un enzim més homogeni i amb una activitat específica més alta.

## 2.9. Purificació de la glicògeno-fosforilasa b i de la calmodulina

La glicògeno-fosforilasa b fou purificada segons el mètode de Fisher i Krebs (63) partint de múscul esquelètic de conill.

La calmodulina fou preparada a partir de la quinasa de la fosforilasa b de múscul de conill segons el mètode descrit per Shenolikar i col-lab. (64).

### **2.10. Preparació de l'inhibidor de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic**

La preparació d'aquesta proteïna inhibidora fou duta a terme d'acord amb el mètode de Walsh i col·lab. (30) a partir de múscul de conill, però solament fins al pas que inclou la precipitació amb àcid tricloracètic.

## RESULTATS

### 3.1. Separació i caracterització de les proteïno-quinases de fetge de rata

#### 3.1.1. *Extracció i separació de les quinases*

Els fetges obtinguts de les rates acabades de sacrificar per decapitació eren rentats amb una solució composta de Tris 50 mM (pH 7,5), DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM i glicerol 5 % (solució A) i eren homogeneïtzats en un "Potter-Elvehjem" amb un èmbol de tefló amb 2 volums de tampó A per gram de fetge. L'homogenat obtingut era centrifugat a 10.000 x g durant 20 minuts a 4° C i l'activitat quinasa era recuperada al sobrenedant, que era ultracentrifugat a 100.000 x g durant 90 minuts a 4° C i aleshores hom recollia el sobrenedant.

#### 3.1.1.1. *Precipitació amb sulfat amònic*

El sobrenedant obtingut, un cop filtrat, es mantenia entre 0° i 4° C en un bany de gel i aigua. Lentament hom hi afegia sulfat amònic sòlid fins a arribar al 60 % de saturació. Hom recuperava el precipitat per centrifugació a 10.000 x g durant 20 minuts a 4° C i una posterior resuspensió en solució A. Aquesta resuspensió era feta amb el mínim volum possible, i tot seguit hom la sotmetia a un procés de diàlisi d'una durada de 18 hores en front de la mateixa solució (tot fent tres canvis de líquid).

#### 3.1.1.2. *Columna de fosfocel·lulosa*

Un cop separat el sulfat amònic, el líquid obtingut de la diàlisi era aplicat a una columna (4 x 10 cm) de fosfocel·lulosa (P-11) que prèviament havia estat equilibrada amb solució A. La preparació i l'equilibrat de la fosfocel·lulosa són molt crítics, i la seva descripció ha estat detallada a l'apartat 2.5.

La velocitat d'aplicació de la mostra era de 100-150 ml/hora. Hom la rentava amb 200 ml de la solució A suara esmentada, i continuava amb successius rentats de 200 ml de KCl 200 mM en solució A i de 250 ml de KCl 350 mM en la mateixa solució. Tot seguit hom aplicava a la columna un gradient de clorur potàssic de 350 mM fins a 1 M en un volum total de 300 ml, sempre en solució A. Finalment hom passava 100 ml de KCl 1 M en

la mateixa solució. En aquesta columna cromatogràfica, tal com podem veure en la fig. 1, s'aconseguia una completa separació entre les proteïno-quinases dependents d'AMP cíclic i les proteïno-quinases independents d'aquest nucleòtid cíclic. Les fraccions recollides al llarg de la cromatografia eren de 5 ml, i hom hi assajava l'activitat quinàsica emprant com a substrats: a) histona amb presència d'AMP cíclic a la concentració de  $2 \times 10^{-5}$  M, i b) caseïna en absència d'aquest nucleòtid cíclic. Hom hi observava quatre pics d'activitat quinàsica: dos d'histono-quinasa i dos de caseïno-quinasa anomenats, segons l'ordre d'elució, PC-I (histono-quinasa dependent d'AMP cíclic), PC-II (histono-quinasa independent d'AMP cíclic), PC-III i PC-IV (caseïno-quinases independents d'AMP cíclic). Hom determinà també l'absorció a 280 nm i la conductivitat d'una de cada cinc fraccions.

La fixació de les proteïno-quinases dependents d'AMP cíclic en la fosfo-cel·lulosa és pràcticament nul·la, ja que surten immediatament després del seu volum buit, mentre que la fixació de les proteïno-quinases independents d'AMP cíclic és molt forta.

PC-III i PC-IV són les fraccions que correspondran posteriorment a les anomenades caseïno-quinasa-1 i caseïno-quinasa-2 (CK-1 i CK-2), amb les quals han estat duts a terme tots els estudis posteriors, car són les proteïno-quinases típicament independents d'AMP cíclic.

A partir d'aquest punt, el procés que cal seguir és exactament el mateix per a una quinasa (CK-1) que per a l'altra (CK-2) però, evidentment, per separat.

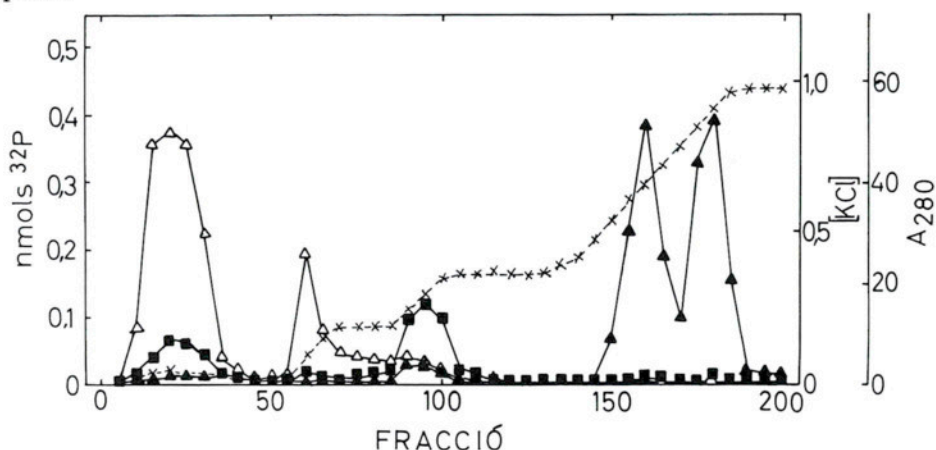


Figura 1. Cromatografia en fosfo-cel·lulosa de les proteïno-quinases de fetge de rata.

Les condicions experimentals d'aquesta columna són descrites al text. Els símbols utilitzats representen: proteïna, com a absorció a 280 nm ( $\Delta$ ), activitat d'histono-quinasa en presència d'AMP cíclic  $2 \times 10^{-5}$  M ( $\blacksquare$ ), activitat de caseïno-quinasa en absència d'AMP cíclic ( $\blacktriangle$ ) i concentració de KCl (M) calculada segons la conductivitat de les mostres (X).



3.1.2. *Purificació posterior de les proteïno-quinases independents d'AMP cíclic*

3.1.2.1. *Columna d'afinitat en Sepharosa 4B-caseïna*

Cadascuna de les dues fraccions separades a la fosfocel·lulosa està contaminada de l'altra. Per a aconseguir una completa separació ens valguérem de la columna d'afinitat en Sepharosa 4B-caseïna. La preparació d'aquesta columna és explicada detalladament a l'apartat 2.6.

El volum de mostra recollit de cada pic és dialitzat extensament durant unes 10 a 12 hores en front de la solució A fins que disminueix la conductivitat de la mostra per sota de 5 mS.

Les dimensions de la columna de Sepharosa-caseïna eren de 4 x 10 cm, estava equilibrada amb el mateix tampó A i la velocitat de flux era de 180-200 ml/hora. Després d'aplicada la mostra, hom la rentava amb 150 ml de solució A i tot seguit hi aplicava un gradient de clorur potàssic fins a 1 M en un volum total de 500 ml. Per a acabar hom passava per la columna 200 ml de KCl 1 M en la mateixa solució A.

Com podem observar en la fig. 2, el comportament de les dues quinases

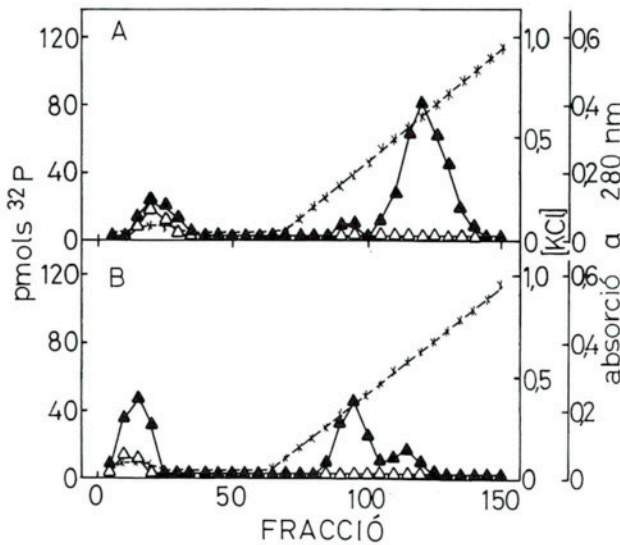


Figura 2. Cromatografia d'afinitat en Sepharosa 4B-caseïna.

Les condicions experimentals són descrites a l'apartat 3.1.2.1. Els símbols representen: proteïna, com a absorció a 280 nm ( $\Delta$ ), activitat de caseïno-quinasa en absència d'AMP cíclic ( $\blacktriangle$ ) i concentració de KCl (M) calculada segons la conductivitat de les mostres (X).

La figura 2 A representa els valors obtinguts per a la CK-1 i la 2 B els valors per a la CK-2.

fou diferent. Així, mentre la caseïno-quinasa-1 era fortament retenguda a la Sepharosa-caseïna, la caseïno-quinasa-2 no ho era tant. Per a deslliurar la CK-1 era necessària una concentració aproximada de 0,65 M de KCl en la solució de rentat (40 mS de conductivitat), mentre que solament calia una concentració aproximada de 0,3 M de KCl en la solució de rentat (20 mS de conductivitat) per a deslliurar la CK-2 de la Sepharosa-caseïna. Aquesta cromatografia d'afinitat permet la separació de possibles contaminacions encruades entre les esmentades quinases, a més d'eliminar altres proteïnes contaminants.

### 3.1.2.2. Concentració de la mostra final

Seleccionades les fraccions amb activitats de caseïno-quinasa procedents de la columna de Sepharosa-caseïna, hom les dilueix amb l'addició de solució A fins a reduir llur conductivitat a l'entorn de 15 mS. Posteriorment hom les fa passar a través d'una nova columna (1 x 4 cm) de fosfocel·lulosa prèviament equilibrada amb la mateixa solució, i en recull fraccions de 20-25 ml. La columna és rentada amb 10 ml de solució A amb 200 mM de KCl, i hom l'elueix amb 10 ml de KCl 1 M en la mateixa solució. Durant el

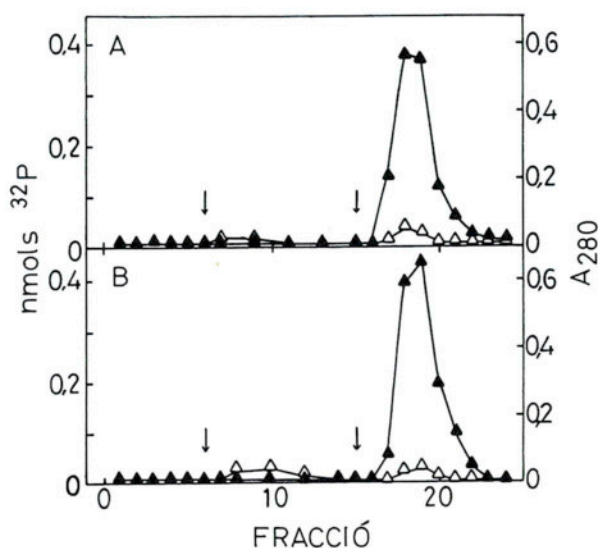


Figura 3. Recromatografia en fosfocel·lulosa

Hom determinà l'activitat caseïno-quinàsica ( $\blacktriangle$ ) de les fraccions eluïdes de les columnes de fosfocel·lulosa i l'absorció a 280 nm ( $\triangle$ ).

Les fletxes indiquen la fracció en què començà l'addició de KCl 0,2 M i de KCl 1 M en tampó A.

La fig. 3 A representa els valors obtinguts per a CK-1, i la 3 B els de CK-2.

rentat i l'elució de les quinases hom en recull fraccions de 1 ml; l'elució dona pics de màxima activitat (fig. 3). Les preparacions enzimàtiques obtingudes són dialitzades extensament en front de la mateixa solució A i hom les guarda congelades a  $-40^{\circ}\text{C}$ .

Tant les preparacions enzimàtiques de CK-1 com les de CK-2 obtingudes per aquest procés mantenen molt alta llur activitat durant molts mesos, a  $-40^{\circ}\text{C}$ .

Les principals característiques d'aquestes quinases de la glicògeno-sintasa són resumides a la Taula 1, on podem observar unes activitats específiques de 198 U/mg de proteïna i de 58 U/mg de proteïna per a la CK-1 i la CK-2, respectivament. Una unitat és el nombre de nmols de  $^{32}\text{P}$  incorporats a caseïna per cada minut d'incubació. El grau de purificació obtingut fou de

FRACCIÓ	Act. específica				
	Proteïna total (mg)	Substrat endogen	Caseïna	Purificació	Recuperació
Extret cru	15.317	0,06*	0,11'	1	100
Sobrenedant 100.000 x g	9.880	0,10*	0,14*	1,3	82,1
Precipitat 60 % s. amònic	5.781	0,15*	0,18*	1,6	61,8
Fosfocel·lulosa:					
PC-I	2.598	0,05*	0,07*	0,6	10,8
PC-II	686	0,13	0,15	1,4	6,1
PC-III	24	2,2	16,05	145,9	22,9
PC-IV	13	2,9	22,37	203,4	17,3
Sepharosa-caseïna:					
CK-1	1,3	0,0	93,0	845,0	7,2
CK-2	1,6	0,0	36,2	329,0	3,5
2. <sup>a</sup> Fosfocel·lulosa:					
CK-1	0,12	0,0	198,7	1.806,0	1,5
CK-2	0,60	0,5	58,4	531,0	2,1

Taula 1. Resum de la purificació de les caseïno-quinases de fetge de rata.

Hom determinà l'activitat de caseïno-quinasa en condicions estàndard amb un temps d'incubació de 10 minuts. En els casos indicats amb (\*) l'activitat fou determinada en una dilució 1/10 de les mostres amb solució A.

L'activitat específica és expressada en nanomols de  $^{32}\text{P}$  incorporats al substrat per minut i per mg de proteïna.

1.800 vegades per a la CK-1 i de 500 vegades per a la CK-2, amb unes recuperacions d'activitat de l'1,5 % i del 2,1 %. La fosforilació endògena era nul·la en el cas de la CK-1 i només d'un 1 % en el cas de la CK-2, respecte a la fosforilació de la caseïna.

### 3.2. Caracterització de les caseïno-quinases CK-1 i CK-2

#### 3.2.1. Determinació del pes molecular de CK-1 i CK-2

Aquestes determinacions foren dutes a terme mitjançant una filtració per gel i per electroforesi en presència de SDS, tal com hem explicat a l'apartat 2.8.2.

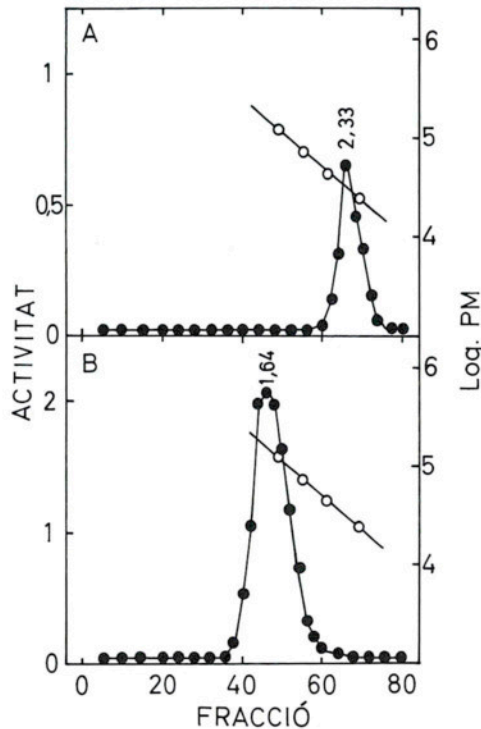


Figura 4. Filtració per gel en bio-gel A-1,5 m de les caseïno-quinases.

Hi han estat representades les dades obtingudes amb les quinases CK-1 (A) i CK-2 (B) en ésser sotmeses a filtració per gel. Les fraccions recollides eren de 2 ml, i hom hi determinà l'activitat caseïno-quinàsica (●). Els nombres indicats a les gràfiques fan referència al volum d'elució relatiu ( $V_e/V_o$ ) de cada enzim.

El volum d'elució de les proteïnes patró enfront del logaritme de llur pes molecular és representat (○). L'activitat caseïno-quinàsica és representada en unitats per ml.



La filtració per gel fou duta a terme en una columna d'1,5 x 90 cm de Bio-Gel A 1,5 m equilibrada amb solució A amb 0,4 M KCl. Hom aplicava 2 ml de la solució enzimàtica, rentava la columna amb la mateixa solució i recollia fraccions de 2 ml. Posteriorment era analitzada la seva activitat caseïno-quinàsica.

Com podem observar a la fig. 4, ambdues quinases sortiren de la columna en un sol pic d'activitat i llurs volums d'elució foren diferents. Això ens confirma l'absència de contaminació d'una quinasa amb l'altra.

El pes molecular calculat per a les quinases fou de 35.000 unitats de massa atòmica per a CK-1 i de 190.000 per a CK-2.

Per electroforesi en gels de poliacrilamida, hom veié que les preparacions de CK-1 i CK-2 no eren absolutament homogènies (fig. 5). CK-1 donà diverses bandes molt difuses i una de més densa, i CK-2 donà diverses bandes difuses i 5 o 6 de més denses.

El pes molecular calculat per a la banda més densa de CK-1 és de 33.000 unitats de massa atòmica, i 56.000, 49.400, 43.000, 34.300, 25.100 i 23.000 són els calculats per a les bandes de CK-2.

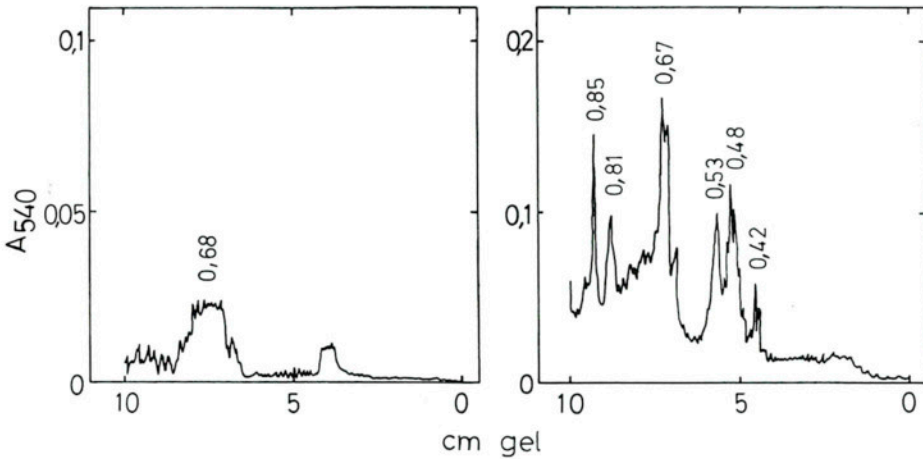


Figura 5. Electroforesi de les caseïno-quinases en presència de SDS.

En aquesta figura han estat representades les dades d'absorció a 540 nm de les bandes obtingudes en revelar els gels de poliacrilamida de CK-1 i CK-2 (A i B, respectivament). Els nombres indicats a les gràfiques dels diferents pics fan referència a la mobilitat relativa de les bandes.

Comparant les dades obtingudes per ambdós mètodes, podríem postular que la CK-1 deu tenir una estructura monomèrica de pes molecular 34.000, però la gran diferència en els pesos moleculars de les bandes de CK-2 sembla indicar que té una estructura polimèrica.

### 3.2.2. Especificitat de substrat i efectes de l'AMP cíclic i de l'inhibidor de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic

Tant CK-1 com CK-2 fosforilen preferentment les proteïnes de tipus acídic (caseïna i fosvitina) i actuen molt poc sobre les proteïnes bàsiques (histona i protamina), tal com ho podem veure a la Taula 2. Ambdues quinases poden fosforilar la forma I de la glicògeno-sintasa. Si comparem les velocitats de fosforilació de caseïna i glicògeno-sintasa en les mateixes condicions, veiem que la glicògeno-sintasa és tan bon substrat com la caseïna per a CK-1 i CK-2.

A la mateixa taula podem observar que l'activitat d'aquestes quinases no és estimulada per l'AMP cíclic a concentracions en què activa la proteïno-quinasa dependent d'aquest nucleòtid.

D'altra banda, l'activitat de CK-1 i CK-2 sobre la caseïna no fou inhibida per concentracions elevades de proteïna inhibidora de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic (Taula 2).

Proteïna substrat	Concentració mg/ml	Activitat <sup>c</sup>					
		CK-1			CK-2		
		- cAMP	+ cAMP <sup>a</sup>	+ cAMP <sup>a</sup> + inhibidor <sup>b</sup>	- cAMP	+ cAMP <sup>a</sup>	+ cAMP <sup>a</sup> + inhibidor <sup>b</sup>
Caseïna	4,0	601	476	516	528	564	488
Fosvitina	4,0	376	336	408	572	580	532
Histona II A	4,0	12	8		16	8	
Protamina	4,0	0,4	1,2		0	0	
Albúmina bovina	4,0	0	2,8		2	1,6	
Caseïna	0,1	72			66		
Glicògeno-sintasa	0,1	63	39	67	54	42	62

Taula 2. Especificitat de substrat i efectes de l'AMP cíclic i de la proteïna inhibidora sobre l'activitat de CK-1 i CK-2.

Hom determinà l'activitat de CK-1 i CK-2 fent servir diverses proteïnes substrat, tant en presència com en absència d'AMP cíclic  $2 \times 10^{-5}$  M (a) o de proteïna inhibidora de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic a la concentració de 0,5 mg/ml (b). En tots els casos les dades s'expressen en picomols de <sup>32</sup>P incorporats per minut i per ml de barreja de reacció (c).

### 3.2.3. Estudi cinètic de les proteïno-quinases independents d'AMP cíclic

Per tal de determinar les constants cinètiques d'ambdues quinases hom utilitzà la representació de Lineweaver-Burk, variant la concentració dels substrats o dels efectors.

Tal com és indicat a la Taula 3, els valors obtinguts amb CK-1 i CK-2 per a l'ATP són molt similars. D'altra banda, la  $S_{0,5}$  per a la caseïna de CK-2 és unes dues vegades més gran que la de la CK-1. La  $S_{0,5}$  d'ambdós enzims per a la glicògeno-sintasa I és molt semblant i sempre més petita que les  $S_{0,5}$  per a caseïna i fosvitina.

Els valors de  $M_{0,5}$  del  $Mg^{2+}$  mostren que CK-1 té una afinitat 2,5 vegades més gran que CK-2 per aquest catió.

Constant cinètica	Caseïno-quinasa			
	CK-1		CK-2	
	mg/ml	$\mu M$	mg/ml	$\mu M$
$S_{0,5}$ caseïna	0,3	15	0,6	28
$S_{0,5}$ fosvitina	0,5	12	0,2	5
$S_{0,5}$ glicògeno-sintasa	0,15	0,44	0,13	0,4
$S_{0,5}$ ATP		16		13
$M_{0,5}$ $Mg^{2+}$		800		2 000

Taula 3. Constants cinètiques de les caseïno-quinases de fetge de rata.

Les constants cinètiques foren calculades fent servir la representació de Lineweaver-Burk, utilitzant 0,5 U/ml de CK-1 o CK-2. Les concentracions de proteïnes substrat variaven entre 0,1 i 4,0 mg/ml per a la caseïna i la fosvitina, i entre 0,01 i 0,18 mg/ml per a la glicògeno-sintasa. En aquests casos les concentracions d'ATP i  $Mg^{2+}$  eren 0,125 mM i 8,0 mM, respectivament. Quan les concentracions de  $Mg^{2+}$  variaven entre 0,1 i 8,0 mM, les concentracions de caseïna i ATP eren 4,0 mg/ml i 0,125 mM, respectivament.

### 3.2.4. Efecte de la concentració de KCl sobre l'activitat de CK-1 i CK-2

L'activitat de les proteïno-quinases independents d'AMP cíclic de fetge de rata resulta molt afectada per variacions en la concentració de KCl en la solució d'assaig (fig. 6). D'altra banda, l'efecte del KCl sobre l'activitat d'ambdós enzims varia segons la proteïna substrat. Així, amb caseïna com a substrat, l'activitat de la CK-1 és estimulada per concentracions creixents de sal, amb un màxim a la concentració de 0,3 M. En augmentar la concentració entre 0,3 i 0,5 M, l'activitat de CK-1 disminueix, però era més gran que la basal, en absència de KCl. Al contrari, l'activitat de CK-2 sobre caseïna només era estimulada per concentracions de sal fins a 0,25 M, amb un màxim d'activació a 0,1 M KCl.



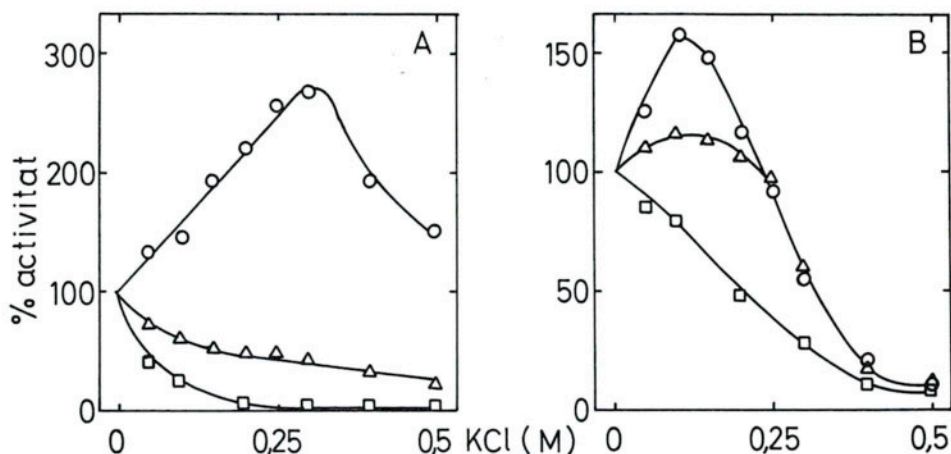


Figura 6. Efecte del KCl sobre l'activitat de les caseïno-quinases.

A la gràfica hi ha representats els valors obtinguts en determinar les activitats de CK-1 (A) i CK-2 (B) sobre caseïna (○), fosvitina (△) i glicògeno-sintasa I (□) en presència de concentracions creixents de KCl. En tots els casos les dades fan referència als valors corresponents als obtinguts en absència de KCl, que són representats com a valor 100.

Si hom utilitzava fosvitina com a substrat, l'activitat de CK-2 era estimulada per concentracions de KCl que inhibeixen la CK-1. Per això, la relació d'activitat sobre caseïna respecte a l'obtinguda sobre fosvitina per ambdues quinases varia àmpliament segons la concentració de KCl a l'assaig, tal com és indicat a la Taula 4.

El KCl també afecta la fosforilació de la glicògeno-sintasa I per ambdues quinases, i és sempre inhibidor de l'activitat de la quinasa de la glicògeno-sintasa, bé que aquesta inhibició és més marcada en el cas de la CK-1.

### 3.3. Fosforilació de la glicògeno-sintasa I per les proteïno-quinases CK-1 i CK-2

En apartats anteriors hem vist que la glicògeno-sintasa I pot actuar com a substrat fosforilable per les proteïno-quinases independents d'AMP cíclic de fetge, d'una manera tan eficaç com la caseïna. També hem indicat que la seva fosforilació no és estimulada per l'AMP cíclic ni inhibida per l'inhibidor de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic, però sí que és afectada pel KCl. També ha estat descrit que l'afinitat de CK-1 i CK-2 per la glicògeno-sintasa I és molt similar.

En aquest apartat hom indica els resultats obtinguts sobre l'estequiometria de la fosforilació de la glicògeno-sintasa I per ambdues quinases, i com la fosforilació afecta l'activitat de l'enzim.



Concentració KCl mM	Relació d'activitats caseïna/fosvitina	
	CK-1	CK-2
0	1,59 (1,0)	0,92 (1,0)
50	2,89 (1,8)	1,04 (1,1)
100	3,78 (2,4)	1,26 (1,4)
150	5,76 (3,6)	1,20 (1,3)
200	7,10 (4,5)	1,00 (1,1)
250	8,27 (5,2)	0,88 (1,0)
300	9,91 (6,2)	0,83 (0,9)
400	9,38 (5,9)	0,90 (1,0)
500	8,94 (5,6)	0,93 (1,0)

Taula 4. Efecte del KCl sobre la variació de la relació de fosforilació de caseïna/fosvitina per les caseïno-quinases.

Hom ha determinat la relació de fosforilació de caseïna respecte a la de fosvitina per CK-1 i CK-2 en presència de concentracions creixents de KCl. Les dades entre parèntesis indiquen la magnitud de la variació si assignem un valor d'1 al valor d'aquesta relació en absència de KCl.

### 3.3.1. Estequiometria de la fosforilació de la glicògeno-sintasa I per CK-1 i CK-2

Tant CK-1 com CK-2 poden fosforilar la glicògeno-sintasa I, però hi ha una gran diferència en la quantitat total de fosfat que li poden incorporar. Com podem veure a la fig. 7, la fosforilació màxima de la glicògeno-sintasa assolida per CK-1 és el doble de la que produeix la CK-2. La fosforilació en tots dos casos és dependent del temps d'incubació. El temps necessari per a la incorporació de la meitat del nombre de fosfats ( $t_{1/2}$ ) és de 60 minuts per a CK-1 i de 40 minuts per a CK-2 en les mateixes condicions.

La diferència en el grau de fosforilació màxima de la glicògeno-sintasa no depèn de la concentració d'aquest enzim a l'assaig.

Tal com indiquem a la Taula 5, la incorporació màxima de fosfats assolida per CK-1 és de 3,8 mols de fosfat per mol de subunitat de 85.000 unitats de massa atòmica, i de només 1,8 en el cas de la CK-2.

### 3.3.2. Variació de l'activitat de la glicògeno-sintasa amb la fosforilació

A la fig. 7 podem veure que el grau d'independència de la glicògeno-sintasa del seu efector al·lostèric glucosa 6-P (RI) disminueix en ésser fosforilada per les proteïno-quinases estudiades. En comparar els canvis màxims produïts en aquest paràmetre per fosforilació per ambdues quinases hom

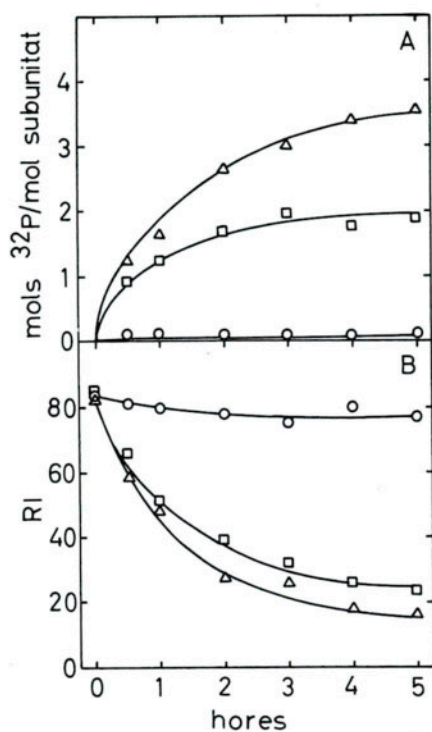


Figura 7. Fosforilació i variació del grau de dependència de glucosa 6-P de la glicògeno-sintasa per les proteïno-quinases CK-1 i CK-2.

Hom estudià la cinètica de la fosforilació (A) i de la variació de la dependència de glucosa 6-P (B) de la glicògeno-sintasa per actuació de les quinases CK-1 (Δ) i CK-2 (□). Paral·lelament hom féu un control de la variació d'aquests paràmetres en incubar la glicògeno-sintasa en absència de quinasa (○).

Proteïno-quinasa	Conc. glicògeno-sintasa mg/ml	nmols $^{32}\text{P}$ /ml	mols $^{32}\text{P}$ /sub. 85.000
CK-1	0,089	3,76	3,6
	0,135	6,05	3,8
CK-2	0,089	1,85	1,8
	0,135	2,96	1,9

Taula 5. Efecte de la concentració de glicògeno-sintasa sobre el seu grau màxim de fosforilació per les caseïno-quinases.

Hom determinà el grau màxim de fosforilació assolit per CK-1 i CK-2 sobre la glicògeno-sintasa I en variar la concentració d'aquest enzim.

veu que les diferències entre elles són petites. Així CK-1 baixa el RI fins a 15, i CK-2 fins a 23.

Si representem el logaritme de RI enfront del nombre de fosfats incorporats (fig. 8) podem veure que hi ha una relació lineal entre aquests paràmetres, de manera que en augmentar-ne un, l'altre disminueix. A més, aquesta relació és similar tant si la fosforilació ha estat produïda per la CK-1 com per la CK-2.

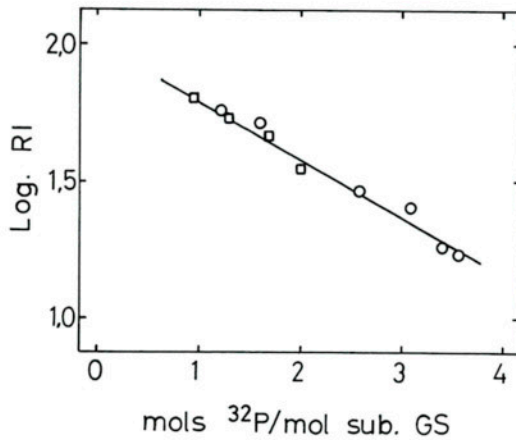


Figura 8. Relació entre el grau de fosforilació de la glicògeno-sintasa i la seva dependència de glucosa 6-P.

Són representades en forma semilogarítmica les dades obtingudes sobre la variació de la dependència de la glicògeno-sintasa per la glucosa 6-P (RI) enfront del seu grau de fosforilació per les caseïno-quinases CK-1 (○) i CK-2 (□).

### 3.3.3. Estabilitat a la calor

Les incubacions a 50° C han estat fetes servir com a criteri per a la caracterització de l'activitat de les proteïno-quinases enfront de diferents substrats. En incubar CK-1 i CK-2 a 50° C en solució A, les activitats d'ambdós enzims sobre la caseïna i la glicògeno-sintasa disminueixen paral·lelament (Taula 6). Això confirma la teoria que les activitats de la quinasa de la glicògeno-sintasa, i de la caseïno-quinasa de CK-1 i CK-2, resideixen en ambdós casos en un mateix enzim.

Temps d'incubació (minuts)	Activitat			
	CK-1		CK-2	
	Caseïna	Glicògeno-sintasa	Caseïna	Glicògeno-sintasa
0	100	100	100	100
10	17	15	25	27
20	9	11	21	19
60	5	7	14	12

Taula 6. Estabilitat de CK-1 i CK-2 a 50° C.

Foren incubades mostres de CK-1 i CK-2 (2 U/ml) a 50° C en solució A, i hom en determinà l'activitat de la quinasa sobre la caseïna (4 mg/ml) i la glicògeno-sintasa (0,1 mg/ml) als temps indicats.

### 3.4. Demostració de l'absència d'activitat de la quinasa de la fosforilasa en les preparacions de CK-1 i CK-2

#### 3.4.1. Efecte del Ca<sup>2+</sup> i de la calmodulina

Les activitats de CK-1 i CK-2 sobre la caseïna i la glicògeno-sintasa I no eren estimulades per la presència de ions Ca<sup>2+</sup> en la barreja d'assaig (Taula 7). Hom tampoc no detectà cap mena d'activitat de la quinasa de la

Proteïno-quinasa	Proteïna substrat	cap	+ EDTA + EGTA	Ca <sup>2+</sup>	Calmodulina	Calmodulina + Ca <sup>2+</sup>
		pmols/min/ml d'assaig				
CK-1	Caseïna	242,8	285,7	230,0	210,0	190,6
	Glicògeno-sintasa	21,4	29,6	19,6	20,6	19,9
	Fosforilasa b	0	0,4	0	0,5	0,2
CK-2	Caseïna	300,5	372,6	251,4	305,4	303,1
	Glicògeno-sintasa	65,8	65,6	65,3	65,0	66,3
	Fosforilasa b	1,5	1,3	0	1,5	0

Taula 7. Efecte del Ca<sup>2+</sup>, la calmodulina, EGTA i EDTA sobre l'activitat de CK-1 i CK-2.

Hom assajà l'activitat quinàsica utilitzant EDTA (0,5 mM) i EGTA (0,3 mM) a la barreja d'assaig només quan és indicat. Les concentracions de Ca<sup>2+</sup> i de calmodulina eren de 0,5 mM i 10 mg/ml, respectivament. Quan el substrat era la caseïna (4 mg/ml), el temps de reacció era de 10 minuts; i quan hom utilitzava glicògeno-sintasa I (0,1 mg/ml) o glicògeno-fosforilasa b (4 mg/ml), era de 30 minuts.



glicògeno-fosforilasa en incubar glicògeno-fosforilasa purificada de múscul de conill amb les preparacions de CK-1 i CK-2, ni tan sols en presència de ions  $Ca^{2+}$ . La falta d'estimulació pel ió  $Ca^{2+}$  no era deguda a la presència de nivells saturants de  $Ca^{2+}$  endògens, puix que les activitats de CK-1 i CK-2 no disminuïen en presència d'EGTA i EDTA a la mescla d'assaig.

3.4.2. *Efecte de la caseïna i de la fosforilasa b sobre la inactivació de la glicògeno-sintasa per CK-1 i CK-2*

Schlender i Remann (10) descriviren com la fosforilació de la glicògeno-sintasa per la quinasa de la fosforilasa era inhibida per l'addició de fosforilasa b a la barreja d'assaig. Per tal de demostrar que les nostres preparacions de CK-1 i de CK-2 no estaven contaminades amb quinasa de la fosforilasa assajarem la capacitat de la glicògeno-fosforilasa per les quinases, ja que actuarien com a substrat alternatiu.

A la taula 8 podem veure que l'addició de fosforilasa b (4 mg/ml) no variava el grau d'inactivació de la glicògeno-sintasa. Per contra, amb la caseïna a la mateixa concentració sobrevenia la inactivació quasi total en el cas de la CK-1, i parcial en el cas de la CK-2.

Així la caseïna, però no la fosforilasa b, podia interferir en la capacitat de la glicògeno-sintasa d'ésser modificada per la CK-1 o la CK-2, com hau-

Proteïno-quinasa	Addicions	RI		
		20 min	40 min	60 min
--	--	77	75	80
	caseïna	74	78	75
	fosforilasa b	76	78	76
CK-1	--	43	35	22
	caseïna	74	73	70
	fosforilasa b	45	36	24
CK-2	--	46	35	29
	caseïna	61	47	43
	fosforilasa b	48	36	31

Taula 8. Efecte de la caseïna i la glicògeno-fosforilasa sobre la conversió de la glicògeno-sintasa I en D.

Hom incubava la glicògeno-sintasa I (0,1 mg/ml) amb 0,8 U/ml de CK-1 o CK-2 en presència i absència de caseïna (4 mg/ml) o fosforilasa b (4 mg/ml).

Les dades són la mitjana de dos experiments amb dues preparacions diferents de cada proteïno-quinasa.

ríem d'esperar si, en ambdós casos, les activitats de les quinases de la caseïna i de la glicògeno-sintasa residien en una mateixa quinasa, diferent de la quinasa de la fosforilasa b.



## DISCUSSIÓ

### 4.1. Heterogeneïtat de les proteïno-quinases de fetge de rata

Els resultats obtinguts en aquest treball confirmen l'existència de diversos tipus de proteïno-quinases en fetge de rata, principalment de les denominades caseïno-quinases.

La major part de l'activitat caseïno-quinàsica present en fetge de rata és deguda a proteïno-quinases independents d'AMP cíclic, fàcilment separables de les histono-quinases mitjançant una cromatografia en fosfocel·lulosa. Diversos autors han emprat aquest mètode de separació (65,66), però les condicions utilitzades en aquest treball ens han permès d'observar i separar una histono-quinasa independent d'AMP cíclic no detectada anteriorment i que creiem que pot derivar de les proteïno-quinases dependents d'AMP cíclic.

La cromatografia en fosfocel·lulosa permet la separació dels diferents tipus de proteïno-quinases, però no pot separar-les d'altres proteïnes endògenes que poden actuar com a substrat i que hi estan fortament associades. La separació d'aquests substrats endògens de les caseïno-quinases CK-1 i CK-2 es pot aconseguir fàcilment mitjançant una cromatografia d'afinitat en Sepharosa 4B-caseïna.

Amb el mètode de purificació descrit en aquest treball, ha estat possible l'obtenció de preparacions de caseïno-quinases (CK-1 i CK-2) amb un grau de purificació de 1.800 i 500 vegades, respectivament, i amb una activitat específica més alta que l'obtinguda per altres autors.

Bé que la recuperació d'activitat d'aquestes quinases (1,4% per a CK-1 i 2,2% per a CK-2) és molt petita, cal tenir en compte que les dades sobre recuperació d'activitat i de purificació són referides al conjunt d'activitats caseïno-quinàsiques presents a l'extret cru i no a cadascun dels enzims separatament.

La diversitat de proteïno-quinases presents al fetge apunta la possibilitat que la regulació de diversos processos metabòlics, en els quals actuïn enzims regulables per fosforilació i desfosforilació, sigui duta a terme per diverses quinases. Això planteja no tan sols la possibilitat de l'existència d'especificitat estricta de substrat fisiològic per a cadascuna d'aquestes quinases, sinó també la possibilitat que, fosforilant un mateix enzim, ho facin

en llocs que influeixin diferentment sobre les seves propietats cinètiques. També és possible que la fosforilació per una de les quinases modifiqui la capacitat d'un enzim multifosforilable d'ésser fosforilat posteriorment per altres quinases, o d'ésser desfosforilat per una proteïno-fosfatasa, tal com s'esdevé amb la quinasa de la glicògeno-fosforilasa (67).

## 4.2. Caracterització de les caseïno-quinases CK-1 i CK-2

Les preparacions enzimàtiques obtingudes de CK-1 i CK-2 no presentaven fosforilació de substrats endògens; això permet d'estudiar-ne les propietats cinètiques sobre substrats exògens, en especial sobre la glicògeno-sintasa I.

### 4.2.1. Estructura molecular

Si considerem els resultats obtinguts per filtració per gel i electroforesi en presència de SDS, podem deduir que CK-1 presenta una estructura monomèrica d'un pes molecular de 34.000 unitats de massa atòmica. Això lliga perfectament amb les dades obtingudes per altres autors sobre la presència d'una caseïno-quinasa de característiques moleculars similars en múscul de conill (43) i en nuclis de fetge de rata (68).

Per contra, les dades referents a CK-2 semblen indicar que aquest enzim presenta una estructura oligomèrica de pes molecular al voltant de 190.000 unitats de massa atòmica. Estudis duts a terme per diversos autors en altres teixits han indicat la presència d'una caseïno-quinasa de pes molecular similar al de la CK-2 descrita en aquest treball, la qual presenta una estructura oligomèrica constituïda per subunitats de pesos moleculars 42.000, 38.000-39.000 i 24.000-26.000 unitats de massa atòmica (43,69). La presència d'una caseïno-quinasa composta de subunitats de 35.000 i 25.000 unitats de massa atòmica també ha estat descrita en eritròcits humans (70). Totes aquestes dades suggereixen que, d'entre les sis bandes observades en l'electroforesi en presència de SDS de CK-2 de citoplasma de fetge de rata, les corresponents a pesos moleculars 43.000, 34.300 i 23.000-25.000 poden correspondre a subunitats diferents de l'enzim, però hom desconeix si les altres bandes també corresponen a subunitats enzimàtiques o a proteïnes contaminants.

### 4.2.2. Característiques cinètiques

Les caseïno-quinases citoplasmàtiques de fetge de rata tenen una especificitat molt elevada per a proteïnes "àcides" respecte a les "bàsiques". Així, si considerem 100 llur activitat sobre caseïna, la facilitat amb què CK-1 fosforila les proteïnes substrat és: caseïna (100) > fosvitina (61) >



histona II A (2) > protamina (0,1), i per a CK-2 aquests valors són: fosvitina (110)  $\geq$  caseïna (100) > histona II A (3) > protamina (0).

Tanmateix, ambdues quinases són diferents en les constants cinètiques per a caseïna i fosvitina, ja que l'afinitat de la CK-1 per la caseïna és més gran que la de la CK-2, mentre que l'afinitat d'aquesta última per la fosvitina és més gran que la de la CK-1. També hi ha diferències entre la  $M_{0,5}$  pel  $Mg^{2+}$  d'ambdós enzims, essent la que correspon a CK-2 unes 2,5 vegades més gran que la de la CK-1.

A més de les diferències en les constants cinètiques i en el pes molecular, ambdues quinases són clarament diferents en llur sensibilitat al KCl. Així, la fosforilació de la caseïna per la CK-1 és estimulada per KCl, amb un màxim a una concentració de sal de 0,3 M. A aquesta mateixa concentració, per contra, l'activitat de la CK-2 sobre caseïna és clarament inhibida. Al contrari, l'activitat de la CK-1 sobre la fosvitina és més sensible a la inhibició per KCl que la de la CK-2. Aquest efecte del KCl fa que la relació de fosforilació de caseïna/fosvitina per la CK-1 o la CK-2 variï amb la concentració de sal. Per a la CK-1, el grau d'aquesta variació és màxim a concentracions de 0,3 M KCl, augmentant 6 vegades el valor de la relació. Amb CK-2 el valor d'aquesta variació varia molt poc, i presenta un lleuger augment al voltant de 0,1 M KCl.

El comportament de CK-1 i CK-2 de citoplasma de fetge de rata respecte al KCl concorda amb les observacions fetes en múscul de conill per Itarte i Huang (42), on la relació de fosforilació de caseïna/fosvitina per la CK-1 augmentava unes 3 vegades a concentracions de sal de 0,3 M KCl. També ha estat descrit recentment un comportament de les caseïno-quinases nuclears de fetge de rata N I i N II (68) molt similar al que hem observat en enzims citoplasmàtics.

L'activitat de CK-1 i de CK-2 sobre qualsevol dels substrats assajats no és estimulada per l'AMP cíclic ni inhibida pel factor proteic inhibidor de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic. Per això cal descartar la possibilitat que aquestes quinases corresponguin o derivin de subunitats de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic.

#### 4.3. Fosforilació de la glicògeno-sintasa I per les proteïno-quinases CK-1 i CK-2 de fetge de rata

A més de la caseïna i la fosvitina, CK-1 i CK-2 també poden fosforilar la forma I de la glicògeno-sintasa amb una velocitat similar. La  $S_{0,5}$  per a la glicògeno-sintasa (0,13-0,15 mg/ml) és fins i tot més petita que la  $S_{0,5}$  per a la caseïna (0,3 i 0,6 mg/ml). Això indica que la glicògeno-sintasa I és, com a mínim, tan bon substrat com la caseïna per a ambdues quinases.

D'altra banda, la fosforilació de la glicògeno-sintasa I per CK-1 o CK-2

conduïx a una disminució de la seva relació d'independència respecte a la glucosa 6-P (RI). Aquesta variació és funció, en ambdós casos, del nombre de fosfats introduïts, i hi ha una relació inversa entre el logaritme del RI i el contingut en fosfats/subunitat. Tanmateix, hi ha una clara diferència entre la fosforilació i la variació produïdes per cadascuna d'aquestes quinases. Així, CK-1 introdueix fins a 3,8 mols de fosfat/mol de subunitat de la glicògeno-sintasa, i CK-2 només 1,9 mols.

Bé que altres autors havien detectat prèviament la presència de caseïno-quinases en fetge de rata (65,71), cap d'ells no hi havia trobat un significat fisiològic. Per això, les nostres evidències que ambdós enzims poden actuar com a quinases de la glicògeno-sintasa d'una manera similar a les quinases de la glicògeno-sintasa dependents d'AMP cíclic muscular (i tenint en compte la gran importància del metabolisme del glicogen hepàtic com a regulador de la glucèmia), ens permeten de suggerir que la funció fisiològica, o una de les funcions fisiològiques, de les caseïno-quinases hepàtiques pot ésser la de modular la síntesi de glicogen, afectant el grau d'activitat de l'enzim responsable de la seva síntesi, la glicògeno-sintasa.

La presència de proteïno-quinases no estimulables per l'AMP cíclic permet de postular una hipòtesi sobre el mecanisme d'actuació de diverses hormones sobre el metabolisme del glicogen hepàtic. Se sap que la insulina afecta la glicògeno-sintasa hepàtica tot disminuint l'activitat de la quinasa de la glicògeno-sintasa en condicions en què no varien els nivells d'AMP cíclic (72). D'altra banda, les catecolamines sembla que actuen sobre el metabolisme del glicogen a través d'un mecanisme  $\alpha$ -adrenèrgic que no implica canvis en els nivells intracel·lulars d'AMP cíclic (73,74). A més, fa poc que ha estat demostrat que una de les proteïnes, la fosforilació de la qual augmenta per via d'un mecanisme independent d'AMP cíclic, té un pes molecular que correspon al de la subunitat de la glicògeno-sintasa (75). Aquests resultats indiquen que el mecanisme d'actuació de les catecolamines sobre el metabolisme del glicogen no deu implicar canvis en l'activitat de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic, tal com hom ho cregué inicialment.

En estudis recents ha estat demostrat que la quinasa de la glicògeno-fosforilasa muscular pot fosforilar la glicògeno-sintasa i que l'activitat d'aquesta quinasa és estimulada pel  $\text{Ca}^{2+}$  (76). Hom podria pensar que aquest seria el mecanisme implicat en l'actuació de les hormones que no modifiquen els nivells d'AMP cíclic. Però encara que existís aquest mecanisme, cal tenir en compte que el grau màxim de fosforilació induït per la quinasa de la fosforilasa sobre la glicògeno-sintasa és més petit que 1 mol de fosfat/subunitat. Tanmateix, la fosforilació de la caseïna i de la glicògeno-sintasa I no és estimulada per la presència de  $\text{Ca}^{2+}$  ni és inhibida per l'EGTA; això fa descartar la possibilitat que l'acció de les hormones sobre les proteïno-quinases independents d'AMP cíclic s'efectuï per canvis en la concentració del  $\text{Ca}^{2+}$ .



Si considerem que tant CK-2 com CK-1 poden incorporar un nombre de fosfats 2 i 4 vegades més gran que l'assolit per la quinasa de la fosforilasa, i que aquesta fosforilació produeix una inactivació més gran de la glicògenosintasa, podem pensar que aquestes quinases poden tenir un paper molt important en l'expressió dels efectes de les hormones mencionades sobre el metabolisme del glicogen, però el mecanisme encara no ha pogut ésser determinat.



## CONCLUSIONS

1. Ha estat evidenciada la presència en fetge de rata de diferents tipus de proteïno-quinases, dues de les quals, CK-1 i CK-2, han estat caracteritzades i són típicament independents d'AMP cíclic.
2. La separació entre les proteïno-quinases dependents i independents d'AMP cíclic ha estat aconseguida mitjançant una cromatografia en fosfocel·lulosa que, a més, permet de separar els dos tipus de proteïno-quinases independents d'AMP cíclic estudiades.
3. Les proteïno-quinases CK-1 i CK-2 estudiades corresponen clarament a enzims del tipus caseïno-quinases, representant la primera un 45 %, i la segona un 36 %, de l'activitat caseïno-quinasa total present en fetge de rata.
4. Hem aconseguit unes preparacions de proteïno-quinases independents d'AMP cíclic idònies per a fosforilar *in vitro* la glicògeno-sintasa, ja que en condicions òptimes d'assaig presentaven una fosforilació endògena molt reduïda i pràcticament no existien activitats encreuades.
5. Mitjançant cromatografia d'afinitat en una columna de Sepharosa-caseïna, hem aconseguit la completa separació entre les quinases de la caseïna i de la glicògeno-sintasa independents d'AMP cíclic utilitzades en aquest treball (CK-1 i CK-2), puix que en les nostres condicions la CK-2 es deslliura de la columna de Sepharosa-caseïna a una conductivitat aproximada en el líquid d'elució de 20 mS, mentre que la CK-1 elueix quan la conductivitat és aproximadament de 40 mS.
6. La caseïno-quinasa CK-1 sembla que té una estructura monomèrica de pes molecular 34.000 i la CK-2 una estructura oligomèrica de pes molecular holoenzimàtic 190.000.
7. La preferència de substrat de CK-1 és caseïna (100) > fosvitina (61) > histona II A (2) > protamina (0,1); i la de CK-2 és fosvitina (110) ≥ caseïna (100) > histona II A (3) > protamina (0). L'activitat d'ambdós enzims no és estimulada per l'AMP cíclic ni inhibida per la proteïna inhibidora de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic.
8. L'afinitat de la CK-1 per la caseïna ( $S_{0,5} = 15 \mu\text{M}$ ) és més gran que la de la CK-2 ( $S_{0,5} = 28 \mu\text{M}$ ), mentre que la seva afinitat per la fosvitina

( $S_{0,5} = 12 \mu\text{M}$ ) és més petita que la de la CK-2 ( $S_{0,5} = 5 \mu\text{M}$ ). Ambdós enzims tene a més una  $M_{0,5}$  pel  $\text{Mg}^{2+}$  diferent (0,5 mM la CK-1 i 2 mM la CK-2), en canvi la  $S_{0,5}$  per l'ATP és semblant (13-16  $\mu\text{M}$ ).

9. El KCl a la concentració de 0,3 M estimula la fosforilació de la caseïna per la CK-1 però inhibeix l'activitat d'aquest enzim sobre la fosvitina. Això comporta que la relació de fosforilació de caseïna/fosvitina per la CK-1 augmenti al voltant de 6 vegades a aquesta concentració salina respecte al control en absència de KCl. Pel que fa a la CK-2, el KCl afecta d'una manera molt similar la seva activitat sobre ambdues proteïnes substrat; per això, exceptuant concentracions de sal de 0,1 M en què augmenta lleugerament (1,4 vegades), la relació de fosforilació de caseïna-fosvitina es manté pràcticament constant. D'altra banda, el KCl a concentracions de 0,3 M és sempre inhibidor (40-50 %) de l'activitat de la quinasa de la caseïna/fosvitina de CK-2.
10. A més de fosforilar la caseïna i la fosvitina, CK-1 i CK-2 també fosforilen la glicògeno-sintasa I. Quan s'assaja en condicions similars, la glicògeno-sintasa I és tan bon substrat com la caseïna per a ambdues quinases. A més, la  $S_{0,5}$  per a la glicògeno-sintasa és fins i tot lleugerament inferior que la corresponent a la caseïna per a ambdós enzims.
11. L'activitat de les dues quinases estudiades sobre la glicògeno-sintasa no és estimulada per l'AMP cíclic ni inhibida per la proteïna inhibidora de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic. Per contra, l'activitat sobre aquest substrat és inhibida en ambdós casos pel KCl.
12. El grau màxim de fosforilació de la glicògeno-sintasa catalitzat per la CK-1 és de 3,8 mols de fosfat/mol de subunitat, i el catalitzat per la CK-2 de només 1,9 mols de fosfat/mol de subunitat.
13. La fosforilació de la glicògeno-sintasa per qualsevol de les dues quinases utilitzades provoca un decrement en l'afinitat de l'enzim per l'activador al·lostèric (glucosa 6-P), i hi ha una relació de tipus invers entre el logaritme de la relació d'independència de la glicògeno-sintasa respecte a la glucosa 6-P i el seu contingut en fosfats.
14. L'estabilitat a la calor de l'activitat quinàsica de CK-1 i CK-2 és la mateixa que als substrats caseïna i glicògeno-sintasa I, la qual cosa demostra que l'activitat quinàsica per a ambdós substrats resideix en un mateix enzim tant per a CK-1 com per a CK-2. A més, la caseïna inhibeix la inactivació de la glicògeno-sintasa, ja que ambdós substrats competeixen pel mateix enzim.
15. Aquestes quinases purificades no són estimulades per  $\text{Ca}^{2+}$  ni per la calmodulina ni tenen cap tipus d'activitat de la quinasa de la glicògeno-fosforilasa.



## BIBLIOGRAFIA

1. RALL, T.W. i SUTHERLAND, E.W. (1957) *J. Biol. Chem.* **232**, 1065-1076.
2. SUTHERLAND, E.W. i RALL, T.W. (1957) *J. Biol. Chem.* **232**, 1077-1091.
3. ROSELL PÉREZ, M., VILLAR PALASÍ, C. i LARNER, J. (1962) *Biochemistry* **1**, 763-768.
4. FRIEDMAN, D.L. i LARNER, J. (1963) *Biochemistry* **2**, 669-675.
5. WALSH, D.A., PERKINS, J.P. i KREBS, E.G. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 3763-3765.
6. BROSTROM, M.A., REIMAN, E.M., WALSH, D.A. i KREBS, E.G. (1970) *Adv. in Enz. Regulat.* **8**, 191-203.
7. WALSH, D.A. i KREBS, E.G. (1973) *The Enzymes*, 3.<sup>a</sup> ed. (P. Boyer editor) *Academic Press*, Nova York, pp. 555-581.
8. EXTON, J.H. i HARPAR, J.C. (1975) *Advances in Cycl. Nucl. Res.* vol. 5 (P. Greengard i G.A. Robinson ed.) *Raven Press*, Nova York, pp. 519-532.
9. HUTSON, N.J., BRUMLEY, F.T., ASSIMACOPOULOS, F.D., HARPER, S.C. i EXTON, J.H. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 5200-5208.
10. SCHLENDER, K.K. i REIMANN, E.H. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 2384-2389.
11. NIMMO, H.G. i COHEN, P. (1974) *FEBS Lett.* **47**, 162-166.
12. HUANG, K.P., HUANG, F.L., GLINSMANN, W.H. i ROBINSON, J.C. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**, 1163-1169.
13. ITARTE, E., ROBINSON, J.C. i HUANG, K.P. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 1231-1234.
14. LELOIR, L.F. i CARDINI, C.E. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 6340-6341.
15. VILLAR PALASÍ, C. i LARNER, J. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* **390**, 171-173.
16. PIRAS, R., ROTHMAN, L.B. i CABIB, E. (1968) *Biochemistry* **7**, 56-66.
17. ROACH, P.J. i LARNER, J. (1976) *Trends in Bioch. Sci.* **1**, 110-112.
18. SMITH, C.H., BROWN, N.E. i LARNER, J. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* **242**, 81-88.
19. LIN, D.C. i SEGAL, H.L. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 7007-7011.
20. McVERRY, P. i KIM, K.H. (1974) *Biochemistry* **13**, 3505-3511.
21. LARNER, J., VILLAR PALASÍ, C. i BROWN, N.E. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* **178**, 470-479.
22. KREBS, E.G., GRAVES, D.J. i FISHER, E.H. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**, 2867-2873.
23. ROSELL PÉREZ, M. i LARNER, J. (1964) *Biochemistry* **3**, 81-88.
24. SODERLING, T.R., HICKENBOTTOM, J.P., REIMANN, E.M., HUNKELLER, F.L., WALSH, D.A. i KREBS, E.G. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 6317-6328.
25. MAENO, H., JOHNSON, F.M. i GREENGARD, P. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 134-142.
26. WRAY, H.L., GRAY, R.R. i OLSSON, A. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 1469-1478.

27. HOFMANN, F., BEAVO, J.A., BECHTEL, P.J. i KREBS, E.G. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 7795-7801.
28. CORBIN, J.D., KEELEY, S.L. i PARK, C.R. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 218-225.
29. LANGAN, T.A. (1968) *Science* **162**, 579-581.
30. WALSH, D.A., ASHBY, C.D., GONZALEZ, C., CALKINS, D., FISHER, E.H. i KREBS, E.G. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 1977-1985.
31. APPELMAN, M.M., BIRNBAUMER, L. i TORRES, H.N. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 39-43.
32. ROSEN, O.M. i ERLICHMAN, J. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 7786-7794.
33. ERLICHMAN, J., RODENFELD, R. i ROSEN, O.M. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 5000-5003.
34. ERLICHMAN J., RUBIN, C.S. i ROSEN, O.M. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 7607-7609.
35. KNIGHT, B.L. (1975) *Biochem. J.* **152**, 577-582.
36. SHENOLIKAR, S., COHEN, P.T.W., COHEN, P., NAIRN, A.C., PERRY, S. i VICTOR (1979) *Eur. J. Biochem.* **100**, 329-337.
37. NIMMO, H.G., PROUD, C.G. i COHEN, P. (1976) *Eur. J. Biochem.* **68**, 31-44.
38. SCHLENDER, K.K. i REIMANN, E.R. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 2197-2201.
39. RYLAH, O.B., EMBI, N. i COHEN, P. (1979) *FEBS-Lett.* **98**, 76-80.
40. SODERLING, T.R., JETT, M.F., HUTSON, N.J. i KHATRA, B.S. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 7517-7524.
41. BROWN, J.H., THOMSON, B. i MAYER, S.E. (1977) *Biochemistry* **16**, 5501-5508.
42. ITARTE, E. i HUANG, K.P. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 4052-4057.
43. HATAWAY, G.H. i TRAUGH, J.A. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 762-768.
44. KREBS, E.G. i FISHER, E.H. (1956) *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 150-157.
45. COHEN, P. (1973) *Eur. J. Biochem.* **34**, 1-14.
46. BROSTROM, C.O., HUNKELLER, F.L. i KREBS, E.G. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 1961-1967.
47. FRIEDMAN, D.L. i LARNER, J. (1965) *Biochemistry* **4**, 2261-2264.
48. ROACH, P., DE PAOLI ROACH, A.A. i LARNER, J. (1978) *J. Cyclic Nucleotide Res.* **4**, 245-257.
49. COHEN, P., BURCHELL, A., FOULKES, J.G., COHEN, P.T.W., VANAMAN, T.C. i NAIRN, A.C. (1978) *FEBS Lett.* **92**, 287-293.
50. COHEN, P., PICTON, C. i KLEE, C.B. (1980) *FEBS Lett* **104**, 25-30.
51. DE PAOLI ROACH, A.A., GIBBS, J.B. i ROACH, P. (1979) *FEBS Lett.* **105**, 321-324.
52. CHEUNG, W.Y. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 2859-2869.
53. HUANG, K.P. i ROBINSON, J.C. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 593-599.
54. THOMAS, J.A., SCHLENDER, K.K. i LARNER, J. (1968) *Anal. Biochem.* **25**, 486-492.
55. FARRON-FURSTENTAL, F. i LIGHTHOLDER, J.R. (1977) *FEBS Lett.* **84**, 313-316.
56. DAVID, G.S. i REISFELD, R.A. (1974) *Biochemistry* **13**, 1014-1021.
57. CUATRECASAS, P. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 3059-3065.
58. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. i RANDALL, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

59. BENSADOWN, A. i WEINSTEIN, D. (1976) *Anal. Biochem.* **70**, 241-250.
60. LAEMLI, U.K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
61. SMITH, C.H., VILLAR PALASÍ, C., BROWN, N.E., SCHLENDER, K.K., ROSENKRAUS, A.M. i LARNER, J. (1972) *Methods Enzymol.* **28**, 530-539.
62. TAKEDA, Y., BREWER, H.B. i LARNER, J. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 8943-8950.
63. FISHER, E.H. i KREBS, E.G. (1958) *J. Biol. Chem.* **231**, 65-71.
64. SHENOLIKAR, S., COHEN, P.T.W., COHEN, P., NAIRM, A.C. i PERRY, S.V. (1979) *Eur. J. Biochem.* **100**, 329-337.
65. CLARI, G., PINNA, L.A. i MORET, V. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **451**, 484-490.
66. MARAGOUidakis, M.E. i HANKIN, H. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **480**, 122-136.
67. COHEN, P. i ANTONIW, J.F. (1973) *FEBS Lett.* **34**, 43-47.
68. THORBURG, W., GAMO, S., O'MALLEY, A.F. i LINDELL, T.J. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* **571**, 35-44.
69. THORNBURG, W. i LINDELL, T.J. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 6660-6665.
70. BOIVIN, P. i GALAND, C. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **89**, 7-16.
71. MATSUMURA, S. i TAKEDA, M. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* **289**, 237-241.
72. MILLER, T.B. Jr. i LARNER, J. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 3483-3488.
73. EXTON, J.H., ROBINSON, G.A., SUTHERLAND, E.W. i PARK, C.R. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 6166-6177.
74. CHERRINGTON, A.D., ASSIMACOPOULOS, F.D., HARPER, S.C. i EXTON, J.H. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 5209-5218.
75. GARRISON, J.C. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 7091-7100.
76. EMBI, N., RYLATT, D.B. i COHEN, P. (1979) *Eur. J. Biochem.* **100**, 339-347.





## TAULA

RESUM .....	9
1.- INTRODUCCIÓ .....	11
1.1.- Característiques generals del metabolisme del glicogen i la seva regulació .....	11
1.2.- Glicògeno-sintasa .....	15
1.3.- Proteïno-quinases .....	17
2.- MATERIALS I MÈTODES .....	25
2.1.- Reactius i productes utilitzats .....	25
2.2.- Animals utilitzats .....	26
2.3.- Determinació de l'activitat proteïno-quinàsica .....	26
2.4.- Determinació de l'activitat glicògeno-sintàsica .....	27
2.5.- Regeneració i equilibrament de fosfoce.lulosa (P-11) .....	28
2.6.- Preparació de Sepharosa-caseïna .....	28
2.7.- Altres tècniques determinatives .....	30
2.8.- Purificació de la glicògeno-sintasa I .....	31
2.9.- Purificació de la glicògeno - fosforilasa b i de la calmodulina .....	31
2.10.- Preparació de l'inhibidor de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic .....	32
3.- RESULTATS .....	33
3.1.- Separació i caracterització de les proteïno-quinases de fetge de rata ..	33
3.2.- Caracterització de les caseïno-quinases CK-1 i CK-2 .....	38
3.3.- Fosforilació de la glicògeno - sintasa I per les proteïno - quinases CK-1 i CK-2 .....	42
3.4.- Demostració de l'absència d'activitat de la quinasa de la fosforilasa en les preparacions de CK-1 i CK-2 .....	46
4.- DISCUSSIÓ .....	49
4.1.- Heterogeneïtat de les proteïno-quinases de fetge de rata .....	49
4.2.- Caracterització de les caseïno-quinases CK-1 i CK-2 .....	50
4.3.- Fosforilació de la glicògeno-sintasa I per les proteïno-quinases CK-1 i CK-2 de fetge de rata .....	51
5.- CONCLUSIONS .....	55
6.- BIBLIOGRAFIA .....	57





ACABAT D'IMPRIMIR  
A LA IMPREMTA ROMARGRAF, S.A.  
DE L'HOSPITALET DE LLOBREGAT,  
EL DIA 22 D'ABRIL DE 1983







