

CASEÏNO-QUINASES DE CEL·LULES LEUCÈMIQUES

C. Martos, J.M. Pena, M. Plana, M.D. Guasch, A. Domingo i
E. Itarte

Departament de Bioquímica, Facultat de Ciències, Universitat
Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona.

Abstract

Casein kinases from human leukemic cells

Total casein kinase activity present in human leukemic cells from patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) and acute myeloblastic leukemia (AML) is higher than that in normal peripheral blood leucocytes. This effects seems to be due to a marked increase in both casein kinase 1 (CK-1) and casein kinase 2 (CK-2) activities. The apparent molecular weight and Km for ATP of the enzymes from CLL and AML cells were similar to that of CK-1 and CK-2 from normal leucocytes. On the contrary the Km for casein of CK-1 from leukemic cells was lower than that from normal cells, whereas that of CK-2 was similar in both normal and leukemic cells. The results show the presence in leukemic cells of a form of CK-1 with altered affinity for its protein substrate, in addition to an increase in the total activity of both CK-1 and CK-2.

Introducció

La fosforilació-defosforilació de proteïnes és un mecanisme important de control de l'activitat cel·lular (Cohen, 1982). Les cèl·lules de mamífers contenen diversos tipus de proteïno-quinases entre elles les histono- (dependents i independents d'AMP cíclic) i les caseïno-quinases independents d'AMP cíclic (CK-1 i CK-2) les quals actuen diferentment sobre diversos enzims i altres proteïnes biològicament actives. En estudis anteriors havíem demostrat que tant a les leucèmies mieloide aguda, mieloide crònica i limfoide aguda i limfoide crònica la relació d'activitats caseïno/histono-quinàsiques total és més elevada que en els leucòcits polimorfonuclears o en els limfòcits normals (Pena et al., 1983).

En el present treball hem aprofundit en l'estudi de les CK-1 i CK-2 aïllades de leucèmies mieloide aguda (LMA) i limfoide crònica (LLC) i hem observat canvis en l'afinitat pel substracte proteic de la CK-1 en la leucèmia.

Materials i Mètodes

La procedència dels reactius emprats en el treball així com l'aïllament de leucòcits a partir de mostres de sang humana normal i de pacients afectats de leucèmia (no tractats) està convenientment indicat en publicacions anteriors (Itarte et al., 1981; Pena et al., 1981; Pena et al., 1983).

L'obtenció dels extrems, del sobrenedant de centrifugar a 120.000 xg i la separació posterior de les histono- i les caseïno-quinases mitjançant cromatografia en fosfocel.lulosa, en la qual l'activitat caseïno-quinàsica és retinguda més fortament que la histono-quinàsica, es va realitzar essencialment seguint el mètode descrit prèviament (Pena et al., 1983).

L'activitat proteïno-quinàsica fou determinada en tots els casos tal com s'ha descrit prèviament (Itarte et al., 1981). Una unitat d'activitat caseïno-quinàsica es defineix com la quantitat d'enzim que catalitza la transferència de 1 nanomol de ^{32}P des del $|\gamma\text{-}^{32}\text{P}| \text{ATP}$ a la caseïna (4 mg/ml) per minut. La determinació de proteïna es va fer pel mètode de Bradford (1976).

Resultats i Discussió

En els extrems de leucòcits normals l'activitat caseïno-quinàsica present en la fracció eluïda al rentar la columna de fosfocel.lulosa amb KCl 1,2 M correspon a una barreja de dues caseïno-quinases (CK-1 i CK-2). L'activitat caseïno-quinàsica present a aquesta fracció està augmentada en els leucòcits de pacients afectats de LLC i LMA respecte a la present en leucòcits humans normals (Taula I).

Les CK-1 i CK-2 tenen pesos moleculars diferents i es separen fàcilment per centrifugació en gradients de glicerol. Els leucòcits de LLC i de LMA contenen aquests dos tipus de caseïno-quinases (Figura 1), els quals es comporten similarment als de leucòcits humans normals que tenen pesos moleculars aparents de 35.000 per la CK-1 i de 140.000 per la CK-2. A la figura 1 es pot veure també que l'increment d'activitat caseïno-quinàsica no és degut a un augment marcat d'una sola de les caseïno-quinases si no que la proporció en que es troben cadescuna d'elles és molt similar en els leucòcits normals i

TAULA I. ACTIVITAT DE LES CASEÏNO-QUINASES PRESENTS EN LEUCOCITS NORMALS I LEUCEMICS

		Unitats / 10^9 cèl.lules	mg proteïna/ 10^9 cèl.lules	Unitats / 10^9 cèl.lules
Leucòcits totals	(5)	1,6±0,6	13,5±4,2	0,12±0,04
LLC	(9)	3,9±1,5	12,2±3,3	0,31±0,08
LMA	(3)	6,4±1,4	23,6±8,5	0,28±0,05

L'activitat caseïno quinàsica és la present en els eluïts de fosfofel.lulosa al rentar amb KCl 1,2 M. Les dades sobre proteïna fan referència a la proteïna total soluble present en els sobrenedants de la centrifugació a 120.000 xg. Els números en parèntesi indiquen el número de mostres assajades. Les dades corresponen a la mitjana±S.D.

leucèmics. En l'estudi de les diverses mostres s'ha observat que la CK-1 correspon a un 40-50% i la CK-2 a un 50-60% del total de l'activitat caseïno-quinàsica present en la fracció eluïda de la fosfofel.lulosa amb KCl 1,2 M.

Al determinar les propietats cinètiques de les CK-1 i CK-2 procedents de leucòcits normals i de LLC i LMA, es va observar que la Km per a ATP dels enzims procedents de cèl.lules normals i leucèmiques era similar (Taula II). Pel contrari la Km per a caseïna de la CK-1 de LLC i sobretot de LMA era significativament inferior a la de l'enzim procedent de leucòcits normals. En el cas de la CK-2 els canvis en el valor de Km per a caseïna eren menors i no significatius.

En conseqüència, sembla que els canvis en l'activitat caseïno-quinàsica observats a la leucèmia no es restringeixen a un augment de l'activitat caseïno-quinàsica total sino que, endemés, comporten l'aparició d'una forma de la CK-1 amb major afinitat pel seu substracte proteic.

La implicació fisiològica d'aquest fet és desconeguda. No obstant, tenint en compte la gran varietat de proteïnes que són substractes "in vitro" de la CK-1, entre les que s'inclouen enzims tals com la glicògeno-sintasa (Itarte et al., 1981) la glicògen fosforilasa quinasa (Singh et al., 1982), la RNA polimerasa II i proteïnes biològicament actives tals com les proteïnes nuclears no histones (Hathaway i Traugh, 1982) i la

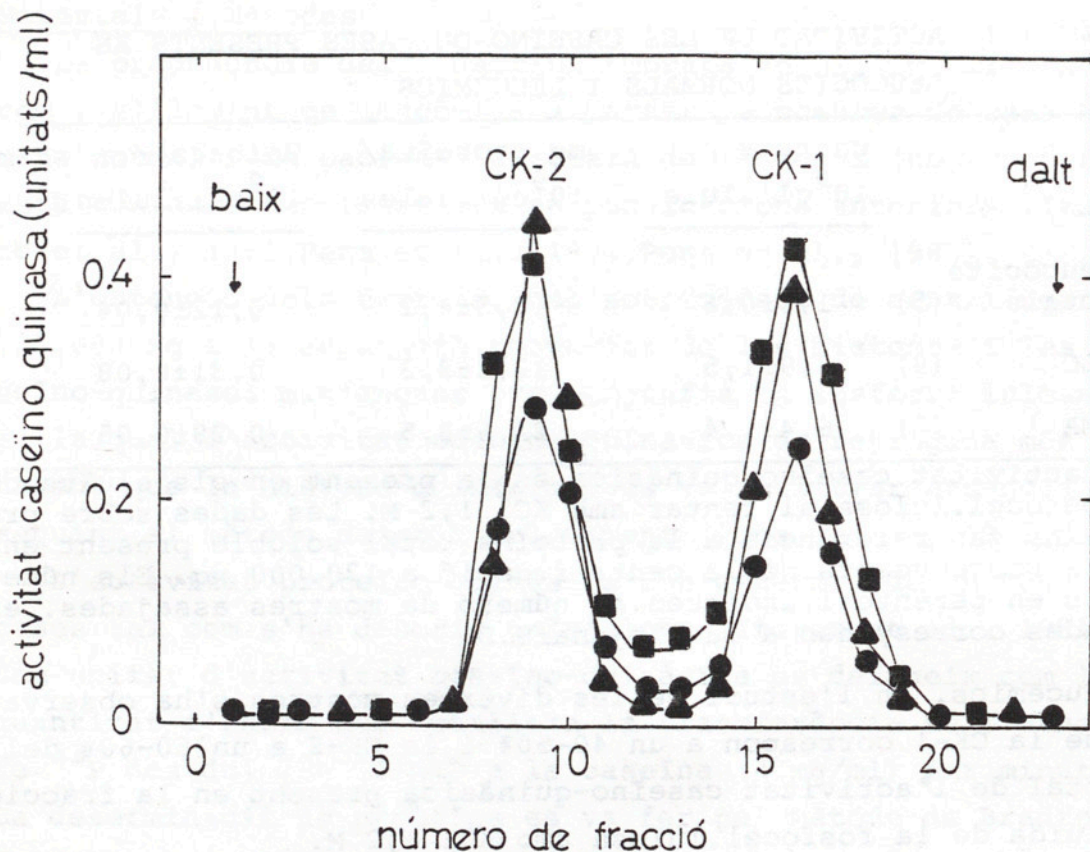


FIGURA 1. CENTRIFUGACIÓ EN GRADIENT DE GLICEROL

Mostres (0,1 ml) corresponents als eluïts de la columna de fosfoel.lulosa amb KCl 1,2 M es varen aplicar sobre un gradient (4,3 ml) de 8-30% glicerol i es va centrifugar a 55.000 rpm durant 16 hores. Els símbols corresponen a leucòcits normals (●), de LLC (▲) i de LMA (■).

TAULA II. CARACTERÍSTIQUES CINÈTIQUES DE LES CASEÏNO-QUINASES

	CK-1		CK-2	
	Km caseïna (mg/ml)	Km ATP (μ M)	Km caseïna (mg/ml)	Km ATP (μ M)
Leucòcits normals	(4) 0,52 \pm 0,12	24,2 \pm 5,4	0,62 \pm 0,12	12,1 \pm 1,8
LLC	(4) 0,17 \pm 0,04	26,5 \pm 2,5	0,48 \pm 0,09	10,1 \pm 0,5
LMA	(3) 0,35 \pm 0,04	23,5 \pm 4,1	0,54 \pm 0,11	11,6 \pm 1,5

Les dades corresponen a la mitjana \pm S.D. Els números en parèntesi indiquen el número de mostres assajades.

subunitat ribosomal S6 (Cobb i Rosen, 1983) és de preveure que l'alteració observada en la CK-1 deguda a la leucèmia afecti també la seva activitat sobre algun dels seus substractes "in vivo" i, junt amb l'increment total d'activitat de la

CK-1 i la CK-2 observat en la leucèmia, fora una de les causes d'algunes de les alteracions produïdes en la transformació maligna dels leucòcits.

Agraïments

Aquest treball ha estat subvencionat en part pels ajuts concedits a E.I. per la CAICYT (0339/81) i la CIRIT.

Bibliografia

- BRADFORD M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- COBB M.M., ROSEN O.M. (1983) Description of a protein kinase derived from insulin-treated 3T3-L1 cells that catalyzes the phosphorylation of ribosomal protein S6 and casein. J. Biol. Chem. 258, 12472-12481.
- COHEN P. (1982) The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. Nature 296, 613-620.
- HATHAWAY G.M., TRAUGH J.A. (1982) Casein kinases-Multipotential protein kinases. Curr. Top. Cell. Regul. 21, 101-127.
- ITARTE E., MOR A., SALAVERT A., PENA J.M., BERTOMEU J.F., GUINOVARTE J.J. (1981) Purification and characterization of two cyclic AMP-independent casein/glycogen synthase kinases from rat liver cytosol. Biochim. Biophys. Acta 658, 334-347
- PENA J.M., ITARTE E., DOMINGO A., CUSSO R. (1983) Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate dependent and -independent protein kinases in human leukemic cells. Cancer Res. 43, 1172-1175.
- PENA J.M., CUSSO R., ITARTE E. (1981) Cyclic AMP-independent casein/glycogen synthase kinases from pig polymorphonuclear leucocytes. Biochem. J. 193, 829-837.
- SINGH T.J., AKATSUKA A., HUANG K.-P. (1982) Phosphorylation of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase by a cyclic nucleotide- and Ca^{2+} -independent protein kinase. J. Biol. Chem. 257, 13379-13384.