

VARIACIONES DE LES PROTEÏNO-QUINASES CITOPLASMÀTIQUES EN LA  
REGENERACIÓ HEPÀTICA

M. Perez i E. Itarte

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

Abstract

Changes in the activity of cytosolic protein kinases during  
hepatic regeneration

Total histone kinase and casein kinase activities present in liver cytosol varied during hepatic regeneration. Cyclic AMP-stimulated histone kinase activity increased 1.5-2 fold with maximal activation occurring at 18 h. The cyclic AMP-independent histone kinase activity showed a peak at 12 h corresponding to an increase of 2.5-3 fold. On the other hand, casein kinase activity also increased 1.5 fold but the highest activity was observed at 6 h after partial hepatectomy. No changes in the ratio of casein kinase 1 relative to casein kinase 2 was observed indicating that the activity of both enzymes increased. The results suggest that casein kinases may also be involved in hepatic regeneration.

Introducció

Les cèl.lules animals contenen diversos tipus de proteïno-quinases amb diferent especificitat de substracte, sensibilitat a efectors i distribució subcel.lular (Cohen, 1982). Els canvis en l'activitat d'aquests enzims provoquen canvis en el grau de fosforilació de moltes proteïnes biològicament actives el que afecta a un gran nombre de processos, entre ells la proliferació i la transformació cel.lular.

D'entre els diversos tipus de proteïno-quinases la que ha estat més estudiada és la proteïno-(histono)quinasa dependent d'AMP-cíclic, havent-se descrit que la seva activitat està alterada en diversos tipus de tumors. Les caseïno-quinases són un altre tipus de fosfotransferases que es caracteritzen per fosforilar determinades proteïnes acídiques, tal com la caseïna, i no dependre d'AMP-cíclic ni de  $Ca^{2+}$  per a la seva activitat (Itarte et al., 1981). Endemés de la caseïna, les caseïno-quinases fosforilen diversos enzims claus de la regulació metabòlica, tal com la glicògeno sintasa, i proteïnes implicades a l'expressió genètica, tals com la HMG 14 (Martos et al., 1985), DNA-dependent RNA po-

limerasa II (Dahmus, 1981) i proteïnes ribosomals (Cobb i Rosen, 1983), el que recolça la idea de que estan implicades en el control de l'activitat cel.lular.

En anteriors estudis havíem observat que l'activitat histono- i caseïno-quinàsica estava alterada a les cèl.lules leucèmiques respecte als leucòcits normals el que suggeria un paper d'aquests enzims en la transformació neoplàsica (Pena et al., 1983; Martos et al., 1984). Amb la finalitat d'esbrinar si l'activitat caseïno-quinàsica també estava relacionada amb la proliferació cel.lular, en aquest treball hem estudiat les variacions d'activitat d'aquests enzims i de les histono-quinases dependents i independents d'AMP-cíclic a la regeneració hepàtica, havent-se observat en tots els casos canvis significatius en les primeres 24 h després de practicada l'hepatectomia parcial.

#### Materials i Mètodes

L'hepatectomia parcial fou practicada a rates mascle Sprague-Dawley de 200-250 g de pes segons el mètode descrit per Higgins i Anderson (1931). Dels extrems corresponents a la fracció soluble obtinguda després de centrifugar a 120.000 xg es van separar les histono- i les caseïno-quinases mitjançant cromatografia en fosfocel.lulosa, seguint el mètode descrit prèviament (Itarte et al., 1981).

L'activitat proteïno-quinàsica va ésser determinada seguint el mètode descrit anteriorment (Itarte et al., 1981). A la determinació de l'activitat proteïno-quinàsica dels extrems cel.lulars i de les fraccions no retingudes per la columna de fosfocel.lulosa les mostres es varen diluir prèviament 10 vegades amb la finalitat d'eliminar la interferència causada per la presència d'inhibidors (Bertomeu et al., 1981). Una unitat d'activitat histono- o caseïno-quinàsica es defineix com la quantitat d'enzim que catalitza la transferència de 1 nmol de  $^{32}\text{P}$  des del  $|\gamma\text{-}^{32}\text{P}| \text{ATP}$  a la histona (1 mg/ml) o a la caseïna (4 mg/ml) per minut. En alguns assajos, específicats en el text, s'ha utilitzat AMP-cíclic (20  $\mu\text{M}$ ).

La centrifugació en gradient de glicerol es va realitzar en tots els casos seguint el mètode ja descrit (Martos et al., 1984).

### Resultats i Discussió

A les rates control el pes de fetge correspon a un 3 a 4% del pes corporal. Degut a l'hepatectomia parcial el pes de la massa hepàtica es va reduir marcadament, essent d'un 1,1% del pes corporal a les 6 h de l'operació. Aquest valor va augmentar a un 2% del pes corporal a les 24 h, el que indica que s'havia iniciat la regeneració hepàtica.

Les activitats histono- i caseïno-quinàsiques presents en els extrems cel·lulars variaven durant aquest procés, tal com s'indica a la Taula I

TAULA I. ACTIVITATS HISTONO- I CASEÏNO-QUINÀSIQUES EN EXTREMS CEL·LULARS

Temps	Unitats/g fetge		Relació d'activitats caseïno-quinasa/histono-quinasa
	Histono-quinasa (+cAMP)	Caseïno-quinasa (-cAMP)	
0	7,3±2,0	6,2±1,4	0,85
6 h	8,8±2,7	8,6±1,5	0,98
12 h	9,1±2,9	8,3±2,9	0,91
18 h	10,1±1,9	7,5±0,5	0,74
24 h	8,7±1,8	7,7±0,6	0,88

L'activitat histono- i caseïno-quinàsica és la present en els extrems o fracció sobrenedant de la centrifugació a 120.000 xg. Les dades corresponen a la mitjana±S.D. d'un nombre de mostres de 5 a 10. El temps 0 fa referència a animals control, als quals no s'els hi ha practicat l'hepatectomia.

En tots els casos l'activitat histono-quinàsica era estimulada (1,5 a 2 vegades) per la presència d'AMP-cíclic mentre que la caseïno-quinàsica no ho era. A la interpretació d'aquestes dades s'ha de tenir en compte que tant l'activitat histono-quinàsica com la caseïno-quinàsica són degudes a diverses proteïno-quinases i no a una única histono- o caseïno-quinasa. Per altra part alguns enzims amb activitat his-

tono-quinasa, tals com la proteïno-quinasa dependent d'AMP-cíclic, també tenen una certa activitat sobre la caseïna, el que interfereix en la determinació precisa de l'activitat de les caseïno-quinases pròpiament dites presents en els extrems cel·lulars.

En treballs anteriors havíem evidenciat que l'activitat histono-quinàsica dels extrems de fetge de rata es podia separar en dos components mitjançant cromatografia en fosfo-cel·lulosa (Itarte et al., 1981; Pena et al., 1983). La part d'activitat histono-quinàsica que no és retinuda per la columna correspon a la histono-quinasa estimulable per AMP-cíclic, mentre que l'activitat eluïda amb KCl 0,35 M és independent d'aquest nucleòtid cíclic. A la vegada, la cromatografia en fosfo-cel·lulosa permetia separar clarament l'activitat caseïno-quinàsica de la histono-quinàsica, eluïnt-se la caseïno-quinasa a l'aplicar forces iòniques altes (KCl

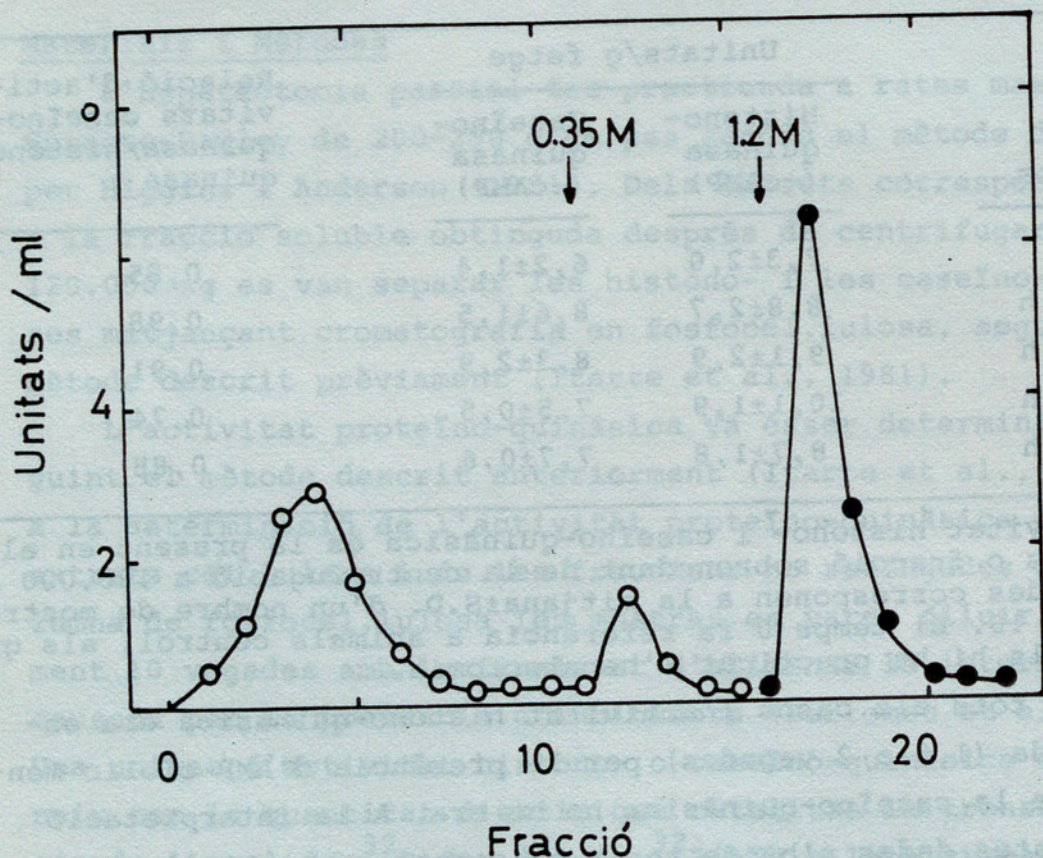


FIGURA 1. CROMATOGRÀFIA EN FOSFOCEL·LULOSA DE PROTEÏNO-QUINASES CITOPLASMÀTIQUES PRESENTS EN FETGE REGENERANT DESPRES DE 12 H DE L'HEPATECTOMIA PARCIAL

La columna es va eluir amb solucions que contenien les concentracions de KCl indicades a la gràfica. Les fraccions (2 ml) van ésser assajades per activitat histono-quinàsica en presència d'AMP-cíclic (20  $\mu$ M) (○), i per activitat caseïno-quinàsica en absència d'AMP-cíclic (●).

1,2 M). Aquesta tècnica ha estat aplicada a la separació de les activitats histono- i caseïno-quinàsiques procedents de fetge en regeneració, havent-se observat en tots els casos la presència de diversos pics d'activitat, tal com es mostra a la Figura 1, que correspon a les 12 h de practicada l'hepatectomia parcial.

Al comparar l'activitat eluïda en cadascun d'aquests pics a diversos temps després de practicada l'hepatectomia parcial, amb la present en rates control es va observar que hi havien canvis significatius en totes elles, si be les variacions no es produïen en tots els casos en el mateix temps. Tal com es pot observar a la Figura 2, l'activitat histono-quinàsica

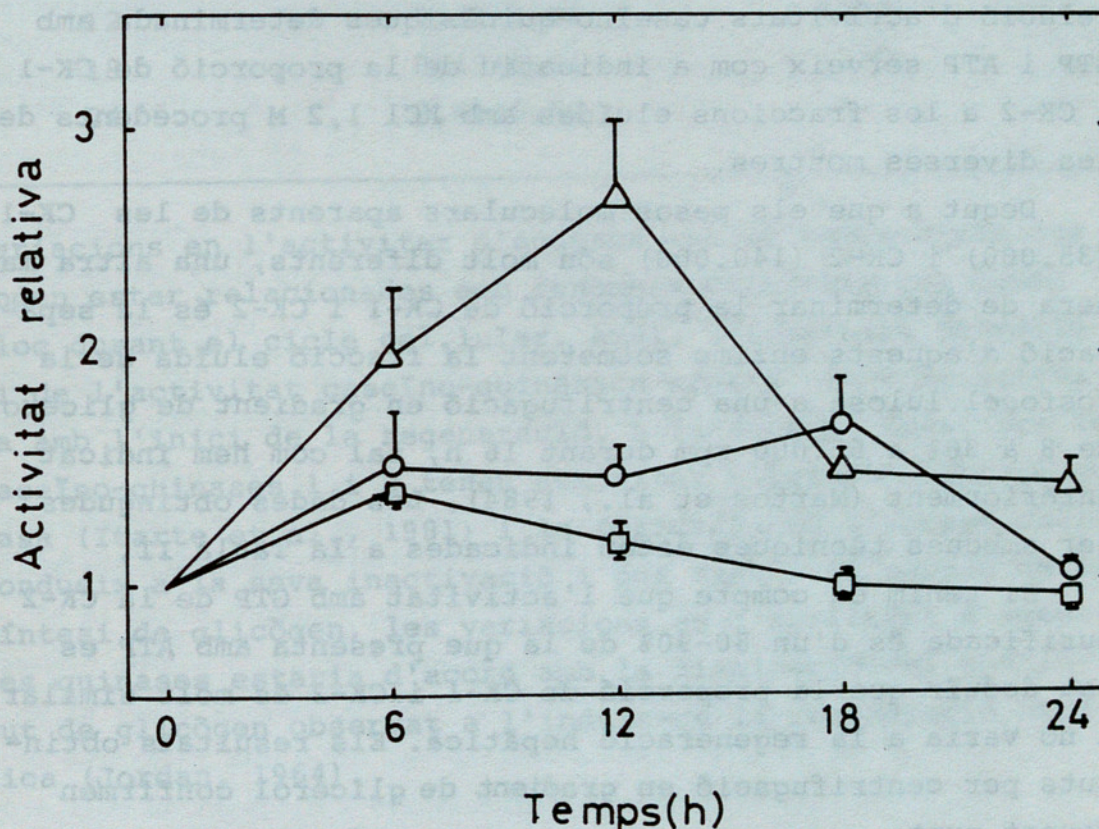


FIGURA 2. ACTIVITAT RELATIVA DE LES PROTEÏNO-QUINASES RESPECTE AL CONTROL A DIFERENTS TEMPS DESPRÉS DE PRACTICADA L'HEPATECTOMIA PARCIAL

Les diverses proteïno-quinases es varen separar per cromatografia en fosfocel·lulosa com s'indica a la Fig. 1. La histono-quinasa dependent d'AMP-cíclic (○) va ésser determinada en presència d'AMP-cíclic 20  $\mu$ M mentre que la histono-quinasa independent d'AMP-cíclic (△) i la caseïno-quinasa (□) es van assajar en absència d'aquest nucleòtid cíclic.

dependent d'AMP-cíclic augmentava a les 6 h i es mantenia elevada fins a les 18 h en que tornava als valors basals. L'augment relatiu més marcat s'observava amb l'activitat histono-quinàsica eluïda amb KCl 0,35 M que s'incrementava fins a un màxim de 2,5-3 vegades a les 12 h. L'activitat caseïno-quinàsica també augmentava significativament (1,5 vegades) però el màxim d'activitat s'observava a les 6 h de la intervenció.

Es sap que l'activitat caseïno-quinàsica és deguda a dos enzims, denominats caseïno-quinases 1 i 2 (CK-1 i CK-2) diferents cinètica i molecularment. Una de les característiques diferencials de la CK-2 de fetge de rata és que endemés d'ATP pot utilitzar GTP com a substracte, mentre que la CK-1 no l'utilitza (Martos et al., 1985). Per tant, la relació d'activitats caseïno-quinàsiques determinada amb GTP i ATP serveix com a indicatiu de la proporció de CK-1 i CK-2 a les fraccions eluïdes amb KCl 1,2 M procedents de les diverses mostres.

Degut a que els pesos moleculars aparents de les CK-1 (35.000) i CK-2 (140.000) són molt diferents, una altra manera de determinar la proporció de CK-1 i CK-2 és la separació d'aquests enzims sotmetent la fracció eluïda de la fosfocel.lulosa a una centrifugació en gradient de glicerol de 8 a 30% a 55.000 rpm durant 16 h, tal com hem indicat anteriorment (Martos et al., 1984). Les dades obtingudes per ambdues tècniques estan indicades a la Taula II.

Si tenim en compte que l'activitat amb GTP de la CK-2 purificada és d'un 80-90% de la que presenta amb ATP es pot deduir que la proporció de CK-1 i CK-2 és molt similar i no varia a la regeneració hepàtica. Els resultats obtinguts per centrifugació en gradient de glicerol confirmen aquest punt.

Les dades obtingudes en aquest treball indiquen que a la regeneració hepàtica varia no sols l'activitat histono-quinasa dependent i independent d'AMP-cíclic sino que també canvia la de les caseïno-quinases 1 i 2. No obstant les

TAULA II. RELACIÓ D'ACTIVITATS DE LES CASEÏNO-QUINASES 1 I 2 ALS ELUITS DE LA FOSFOCEL.LULOSA AMB KCl 1,2 M

La columna I indica la relació d'activitats amb GTP respecte a la determinada amb ATP i la II fa referència a la relació de pics corresponents a CK-1 i CK-2 obtinguts per centrifugació en gradient de glicerol. El temps 0 correspon a animals control als que no s'ha practicat l'hepatectomia

Hores	Relació d'activitats caseïno-quinàsiques	
	I	II
	GTP/ATP	CK-2/CK-1
0	0,44±0,03	1,10
6	0,41±0,07	--
12	0,39±0,05	1,03
18	0,43±0,01	1,00
24	0,41±0,02	--

variacions en l'activitat d'aquests enzims suggereixen que poden estar relacionades amb fenòmens diferents que tenen lloc durant el cicle cel.lular. Així, l'increment transitori de l'activitat caseïno-quinàsica sembla estar relacionada amb l'inici de la regeneració. A la vegada, donat que les caseïno-quinases 1 i 2 tenen activitat glicògeno sintasa quinasa (Itarte et al., 1981) i la fosforilació d'aquest enzim condueix a la seva inactivació i per tant a la parada de la síntesi de glicògen, les variacions en l'activitat d'aquestes quinases estaria d'acord amb la disminució del contingut de glicògen observat a l'induir-se la regeneració hepàtica (Jordan, 1964).

Agraïments

Aquest treball ha estat subvencionat en part pels ajuts concedits a E.I. per la C.A.I.C.Y.T. (0339/81) i la C.I.R. I.T. (AR 83-87).

ser de tots aquests carbohidrats el més significatiu. Aquest té importants funcions (Schauer 1982 a) i és el responsable de donar carga negativa a la superfície de les cèl.lules influint de manera decisiva en el seu comportament (Schauer 1982 b). A més en molts teixits cancerosos humans així com en hepatomes induïts experimentalment els nivells d'aquest sucre es troben incrementats respecte els teixits normals d'on provenen (Abercrombie et al. 1962; Otha et al. 1968). Succeeix el mateix amb els nivells d'activitat de les sialiltransferases (Berge et al. 1984). No obstant en diverses línies cel.lulars els nivells d'aquest monosacàrid es troben disminuïts (Vilaren et al. 1981).

Per tant degut a la gran implicació de l'àcid siàlic en diversos processos proliferatius sembla molt interessant estudiar els nivells d'aquest sucre durant la fase prerreplicativa de la regeneració hepàtica i després de la infusió intravenosa de la solució T.A.G.H.

#### Material i mètodes

S'han emprat rates Sprague-Dawley d'un pes aproximat de 200-250 gr. i de 8 a 10 setmanes d'edat sotmeses a 12 hores de llum i 12 de foscor cada dia.

L'hepatectomia parcial s'ha fet segons el mètode de Higgins i Anderson (1931) i sempre entre les 8 i les 10 hores del matí. S'han utilitzat rates laparatomitzades com a control.

La infusió de la solució T.A.G.H. formada per 100 mg de 3-3'-5 triiodotironina, 130-150 mg d'hidrolitzat de caseïna, 1mg de glucagó i 100 U.S.P. d'heparina en 0.15 M de ClNa a un pH=7.2 i en un volum final de 10 ml., es realitza per la vena de la cua a un flux constant de 3.3 ml./H. Els controls es realitzen a partir de la injecció de solució salina única i exclusivament.

La subfracció de la membrana plasmàtica derivada de la regió sinusoïdal de l'hepatòcit s'ha obtingut per el mètode de Wisner i Evans (1975).

Per a quantificar el contingut proteic de cada mostra s'ha utilitzat la tècnica de Lowry (1951).

La quantificació del contingut d'àcid siàlic unit a la membrana plasmàtica de la regió sinusoïdal durant els dos processos proliferatius s'ha fet seguint la tècnica d'Aminoff (1961).

La tècnica emprada per mesurar l'activitat sialidasa associada