

Variacions de les proteïna quinases citoplasmàtiques en el desenvolupament del fetge de rata

M. Pérez i E. Itarte

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Barcelona.

Abstract

Changes in the activity of the cytosolic protein kinases during rat liver development

Differences in glycogen synthase, and cytosolic histone and casein kinase activities were observed at different days of rat liver development. Glycogen synthase increased markedly from day 16 and reached a maximum at day 24. Then, its activity decreased steadily until the values in adult rat. During fetal development glycogen synthase activity was essentially dependent on glucose-6P. Total casein kinase and histone kinase activities were higher before birth than in adult liver. At birth, both activities fell down markedly, and two days later they reached values close to those found in adult rat. The ratio between casein kinase 1 and casein kinase 2 did not vary during development, what indicates that the changes in total casein kinase activity observed were due to parallel changes in the levels of both casein kinases. The presence of high levels of casein kinases 1 and 2 on days 16-18 of fetal development, when glycogen synthase activity is highly dependent on glucose 6-P, suggests that both casein kinases may be potentially involved in the phosphorylation of glycogen synthase from the beginning of its expression.

Introducció

La fosforilació-defosforilació de proteïnes és un mecanisme important en el control de l'activitat cel.lular (Cohen, 1982). Els enzims capaços de catalitzar el procés de fosforilació s'anomenen proteïna quinases, entre les quals s'hi troben les histona quinases (dependents i independents d'AMP-cíclic) i les caseïna quinases (CK-1 i CK-2) que són independents d'AMP-cíclic.

En estudis anteriors havíem observat com les activitats histona- i caseïna-quinàsiques variaven durant la regeneració hepàtica suggerint que podien tenir un cert paper en el control de l'activitat cel.lular (Pérez i Itarte, 1985).

En aquest treball hem estudiat com varien les activitats histona- i caseïna-quinàsiques al llarg del desenvolupament fetal i postnatal, així com la de la glicogen sintasa, enzim substrat de les caseïna

quinases i de la proteïna quinasa dependent de AMP-cíclic (Huang et al., 1983).

#### Material i mètodes

En aquest treball es van utilitzar rates Sprague-Dawley que es van aparellar durant un vespre i al matí següent, que es va considerar com a dia 0 de la gestació, s'els hi va fer un frotis vaginal. Com a índex del desenvolupament es va controlar l'increment en el pes corporal i el del fetge del fetus. Els diversos grups d'animals es van sacrificar a diferents temps i es van preparar extractes de fetge a partir dels quals es va obtenir la fracció soluble després de centrifugar a 120000 xg, segons s'ha indicat anteriorment (Itarte et al., 1981). Les activitats histona- i caseïna-quinàsiques presents a la fracció soluble es van separar mitjançant cromatografia en fosfocel·lulosa (Itarte et al., 1981). La centrifugació en gradient de glicerol es va realitzar en tots els casos seguint el mètode descrit anteriorment (Martos et al., 1985). La determinació d'activitats proteïna quinasa i glicogen sintasa es va fer seguint mètodes estandaritzats (Itarte et al., 1981). Una unitat d'activitat histona- o caseïna-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, respectivament. En alguns assajos, especificats en el text, l'activitat es va determinar en presència d'AMP-cíclic (20  $\mu\text{M}$ ). La concentració de proteïna es va determinar segons el mètode de Bradford (1976) i la de glicogen pel mètode de l'antrona (Van Handel, 1965).

#### Resultats i discussió

La glicogen sintasa apareix el dia 16 de gestació. L'activitat total, mesurada en presència de glucosa-6P, augmenta marcadament fins dos dies després del part en que assoleix un valor d'aproximadament 3 vegades el de l'adult (Figura 1). A partir d'aquest dia l'activitat cau paulatinament fins assolir els valors normals a l'adult. Al llarg del

període fetal l'activitat glicogen sintasa independent de glucosa-6P no varia de forma paralela amb la de l'activitat total sino que presenta un màxim els dies 19-20. En tots els casos la relació d'activitats glicogen sintasa  $-/+$  glucosa-6P al llarg del desenvolupament fetal és menor que la de l'adult (0,4), assolint-se un màxim en el dia 20 (0,35). Cal destacar que en aquests dies hi ha una acumulació de glicogen que arriba fins a concentracions superiors als valors que es troben en adults, tal com han descrit altres autors (Margolis, 1985). D'acord amb els coneixements actuals sobre el control de l'activitat glicogen sintasa (Ciudad et al., 1984) el que l'enzim es presenti majoritàriament sota forma(es) dependent(s) de glucosa-6P ens indica que ha d'estar fosforilat.

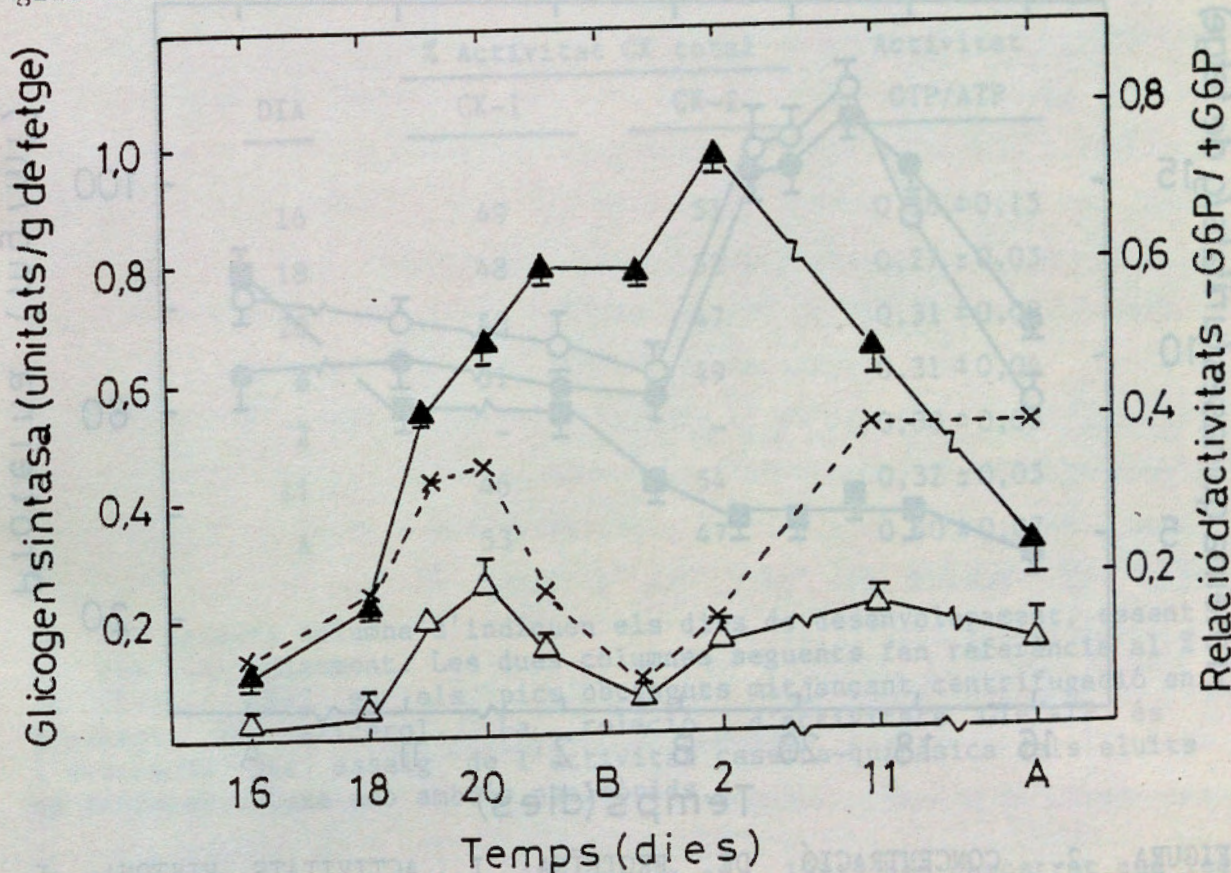


FIGURA 1. ACTIVITAT GLICOGEN SINTASA DELS EXTRACTES CEL·LULARS

L'activitat glicogen sintasa independent (△) i dependent (▲) de glucosa-6P i la relació d'activitats  $-/+$  glucosa-6P (x) van ser assajades en diversos dies del desenvolupament fetal i postnatal.

La glicogen sintasa pot ésser fosforilada "in vitro" per diverses proteïna quinases, d'entre elles les caseïna quinases 1 i 2 (Itarte et

al., 1981; Ciudad et al., 1984). L'activitat caseïna-quinàsica així com la histona-quinàsica present en el citosol de fetge de rata varien al llarg del desenvolupament fetal i postnatal (Figura 2). Les activitats histona- i caseïna-quinàsiques són presents el dia 16 de gestació en quantitats que corresponen a 0,75 i 1,1 vegades, respectivament, les del fetge adult. Ambdues activitats augmenten en els dies següents, essent l'activitat caseïna-quinàsica en els dies 16 i 18 del període fetal més elevada que la de la histona quinasa, fet que desapareix a partir del dia 19 i s'inverteix clarament després del part. En el dia del part (dia 22) hi ha una caiguda pronunciada (al voltant del 50%) d'ambdues proteïna quinases, que assoleixen valors pròxims als de l'adult.

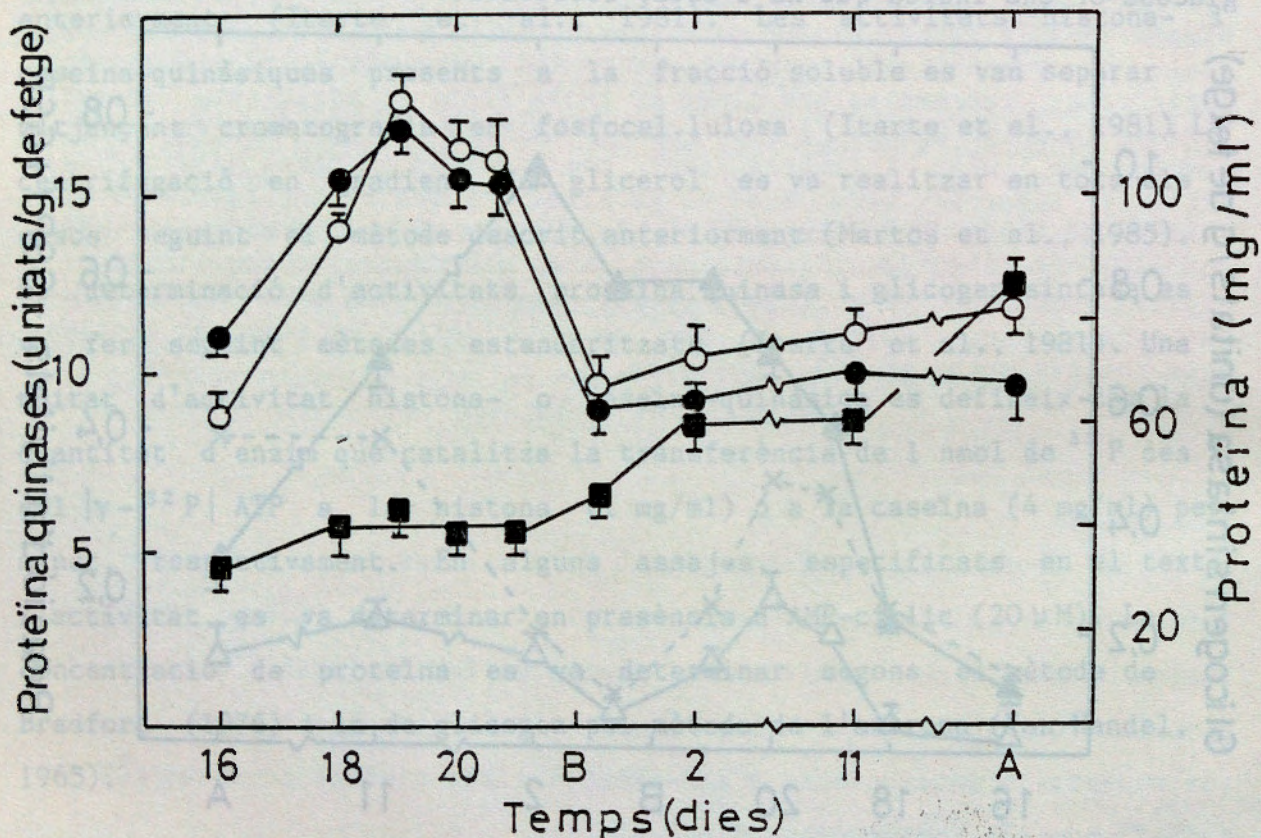


FIGURA 2. CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNA I ACTIVITATS HISTONA- I CASEÏNA-QUINÀSIQUES DELS EXTRACTES CEL·LULARS.

L'activitat histona-quinàsica es va assajar en presència d'AMP-cíclic 20  $\mu$ M (O) mentre que l'activitat caseïna-quinàsica (●) es va determinar en absència d'aquest nucleòtid. El dia 0 és el dia del frotis vaginal i B correspon al dia del part (dia 22).

Cal indicar que a la Figura 2 els valors d'activitat són

referits a pes de fetge i no a mg de proteïna. De fet, com que la concentració de proteïna augmenta al llarg del desenvolupament la diferència entre l'activitat proteïna quinasa hepàtica (expressada en unitats per g de proteïna) en els fetus de 18-21 dies i la de l'adult és fins i tot més gran.

En tots els casos l'activitat histona-quinàsica era estimulada (aproximadament 1.7 vegades) per la presència d'AMP-cíclic mentre que la caseïna-quinàsica no ho era.

TAULA I. RELACIÓ D'ACTIVITATS CASEÏNA QUINASA 1 (CK-1) I CASEÏNA QUINASA 2 (CK-2) EN EL DESENVOLUPAMENT HEPÀTIC.

DIA	% Activitat CK total		Activitat GTP/ATP
	CK-1	CK-2	
16	49	51	0,38 ± 0,15
18	48	52	0,27 ± 0,03
20	53	47	0,31 ± 0,08
B	51	49	0,31 ± 0,04
2	-	-	0,38 ± 0,03
11	46	54	0,32 ± 0,05
A	53	47	0,40 ± 0,07

En la primera columna s'indiquen els dies de desenvolupament, essent B el dia del naixement. Les dues columnes següents fan referència al % de CK-1 i CK-2 en els pics obtinguts mitjançant centrifugació en gradient de glicerol. La relació d'activitats GTP/ATP és l'obtinguda per assaig de l'activitat caseïna-quinàsica dels eluïts de fosfocel.lulosa amb ambdós nucleòtids.

En treballs anteriors (Itarte et al., 1981) hem demostrat que les activitats histona- i caseïna-quinàsiques poden separar-se per cromatografia en fosfocel.lulosa, el que permet una quantificació més correcta de l'activitat caseïna-quinàsica. Per altra part, es sap que l'activitat caseïna-quinàsica es deguda a la presència de dos enzims diferents cinètica i molecularment, la caseïna quinasa-1 (CK-1) i la caseïna quinasa-2 (CK-2), que tenen pesos moleculars de 35.000 i 140.000, respectivament. Aquesta diferència en el pes

molecular permet separa-les mitjançant una centrifugació en gradient de glicerol (Martos et al., 1985), tècnica que s'ha utilitzat per a quantificar la proporció de cada un d'aquests enzims en els eluïts de fosfocel·lulosa. També es pot obtenir un índex de la proporció de CK-1 i CK-2 determinant la relació d'activitat caseïna-quinàsica utilitzant ATP i GTP com a donador de fosfats ja que la CK-2 pot utilitzar ambdós nucleòtids mentre que la CK-1 sols pot utilitzar l'ATP. Les dades obtingudes per aquestes dues tècniques són reflexades en la Taula I i ens indiquen que la proporció entre la CK-1 i la CK-2 no varia al llarg de l'ontogènia.

Les dades obtingudes en aquest treball indiquen que les activitats histona-quinases i la de les caseïna-quinases 1 i 2 varien al llarg del desenvolupament fetal i postnatal així com l'activitat de la glicogen sintasa, enzim que és substrat de les caseïna quinases. Els alts nivells d'activitat proteïna quinasa en els primers dies del desenvolupament fa que la glicogen sintasa que apareix en el dia 16 sigui marcadament fosforilada. A l'aparèixer glicogen sintasa fosfatases en el dia 18 (Bashan et al., 1979), es contrarresta en part l'acció de les proteïna quinases, el que dóna lloc a la defosforilació parcial de la glicogen sintasa, obtenint-se un màxim d'activitat independent de glucosa-6P en els dies 19 i 20. Per altra banda, donat que el nivell de proteïna quinases es manté molt elevat fins el moment del part, la glicogen sintasa sempre es troba majoritàriament fosforilada.

Les caseïna quinases són enzims multipotencials capaços de fosforilar a un gran número de proteïnes tals com la proteïna ribosomal S6 (Cobb i Rosen, 1983), la proteïna cromosomal no histona HMG14 (Walton i Gill, 1983; Martos et al., 1985) i la DNA-dependent RNA polimerasa II (Dahmus, 1981), entre altres, endemés de la glicogen sintasa pel que és possible que els canvis en la seva activitat donin lloc a canvis en els nivells de fosforilació d'altres proteïnes substrat el que podria estar relacionat amb els canvis en l'activitat cel·lular que tenen lloc en el desenvolupament hepàtic.

### Bibliografia

- BASHAN, N., GROSS, Y., MOSES, S. i GUTMAN, A. (1979). Rat liver glycogen metabolism in the perinatal period. Biochem. Biophys. Acta. 343, 510-518.
- 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.
- CIUDAD, C., CAMICI, M., AHMAD, Z., WANG, Y., DePAOLI-ROACH, A. A. i ROACH, P. J. (1984). Control of glycogen synthase phosphorylation in isolated rat hepatocytes by epinephrine, vasopressin and glucagon. Eur. J. Biochem. 142, 511-520.
- COBB, M. M. i 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.
- DAHMUS, M. E. (1981). Phosphorylation of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerase. J. Biol. Chem. 256, 3332-3339.
- ITARTE, E., MOR, M.A., SALAVERT, A., PENA, J.M., BERTOMEU, J.F. i GUINOVART, J.J. (1981). Purification and characterization of two cyclic AMP-independent casein/glycogen synthase kinases from rat liver cytosol. Biochem. Biophys. Acta 658, 334-347.
- HUANG, K. P., AKATSUKA, A., SINGH, T. J. i BLAKE, K. R. (1983). Phosphorylation and inactivation of rat liver glycogen synthase by cAMP-dependent protein kinase and cAMP-independent synthase(casein) kinase-1. (1982). J. Biol. Chem. 258, 7094-7101.
- MARGOLIS, R. N. (1985). Glycogen synthase in prenatal rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 126, 1215-1221.
- MARTOS, C., PLANA, M., GUASCH, M. D. i ITARTE, E. (1985) Effect of starvation, diabetes and insulin on the casein kinase 2 from rat liver cytosol. Biochem. J. 225, 321-326.
- PEREZ, M. i ITARTE, E. (1985). Variacions de les proteïno-quinases citoplasmàtiques en la regeneració hepàtica. Biol. Desenv. 3, 27-34.
- VAN HANDEL, E. (1965). Stimulation of glycogen in small amounts of tissue. Anal. Biochem. 11, 256-263.
- WALTON, G. M. i GILL, G. N. (1983). Identity of the in vivo phosphorylation site in high mobility group 14 protein in HeLa cells with the site phosphorylated by casein kinase II in vitro. J. Biol. Chem. 258, 4440-4446.

