

Departamento de Enzimología
Centro de Investigaciones Biológicas
Madrid

Hexokinasa del páncreas*

por

Carlos Villar-Palasi

(Recibido para publicar el 8 de agosto de 1957)

Las hexokinasas de cerebro, corazón y algunos otros órganos, han sido intensamente estudiadas por SOLS y CRANE (4, 8). No obstante, nada se sabía acerca de la del páncreas, pese a la importancia de este órgano en la regulación del metabolismo de los hidratos de carbono. Y recientemente se ha hecho más patente la conveniencia de caracterizar el enzima, o enzimas, responsable de la fosforilización de hexosas en el páncreas. En efecto, BHATTACHARYA (2, 3, 7) encontró que un nivel alto de glucosa, manosa o fructosa en sangre puede proteger a la rata contra la acción de dosis normalmente diabetógenas de aloxana. Y formuló la hipótesis de que la acción diabetógena de la aloxana radicaba en una destrucción de la hexokinasa de los islotes de Langerhans del páncreas. La capacidad protectora de la hiperglucemia ha sido confirmada en el perro por ARTETA (1).

En una comunicación anterior (9) hemos mostrado que si bien la glucosa es capaz de proteger parcialmente contra la aloxana *in vitro* la actividad hexokinásica de extractos de páncreas, las características cuantitativas de esta protección no soportan la hipótesis de BHATTACHARYA.

En el presente trabajo se expone la purificación y caracterización de la hexokinasa del páncreas del perro.

* Este trabajo ha sido parcialmente sostenido por un «grant» de los Lilly Research Laboratories puesto a disposición del Dr. Sols.

Material y métodos

Los páncreas fueron obtenidos de perros aparentemente normales, salvo la excepción indicada más adelante.

El adenosintrifosfato y el tris(hidroximetil)-aminometano (Tris) fueron obtenidos de la Sigma Chemical Co. El etilendiaminotetraacetato (EDTA), de la Bersworth Chemical Co. La glucosa, manosa, fructosa, galactosa y L-sorbose, de la Pfanstiehl Chemical Co. La N-acetilglucosamina, de la Nutritional Biochemical Co. La alosa y el 1,5-sorbitan fueron donativo del doctor N. K. Richtmyer. Y la 2-deoxiglucosa, del doctor F. B. Cramer.

Las centrifugaciones hasta $23.000 \times g$. fueron realizadas en una centrífuga Servall SS-1. Para $100.000 \times g$. se utilizó la ultracentrífuga preparativa Spinco modelo L.

Los métodos de valoración de actividad hexokinásica empleados fueron: consumo de sustrato, «indicador fotométrico» (4) y formación de cetosa (8). Las proteínas se determinaron por el método de Lowry (6).

Resultados

Los homogenados de páncreas de perro tienen una actividad hexokinásica, con glucosa como sustrato, de unos 10 micromoles/gramo fresco/15 minutos/ 30° . Esta actividad es comparable, aunque inferior, a la observada por LONG (5) en páncreas de rata. No hemos observado diferencias apreciables entre la actividad hexokinásica de homogenados de páncreas de perros normales y la de perros diabéticos por aloxana.

La mayor parte de la actividad de los homogenados permanece en el sobrenadante tras centrifugación a $23.000 \times g$. durante media hora. Que al menos la mayor parte de la hexokinasa del páncreas es genuinamente soluble, se desprende de que el sobrenadante de $23.000 \times g$. centrifugado a $100.000 \times g$. durante una hora dió un sedimento con actividad insignificante; asimismo, el sobrenadante de $23.000 \times g$. tratado con sulfato amónico al 50 % de saturación dió un abundante precipitado con actividad hexokinásica inferior a la del sobrenadante.

A la vista de estos resultados decidimos proceder al intento de purificación a partir de extractos utilizando la centrifugación de los homogenados como primera etapa de purificación. Sin duda este proceder entraña la posibilidad de perder un tipo de hexokinasa, caso de que en el páncreas hubiese

una fracción genuinamente asociada a partículas. Pero no hemos observado ningún indicio en favor de esta posibilidad. Y por otra parte la posibilidad de acabar con sólo un componente de lo que originalmente pudo ser una mezcla de dos enzimas análogos es inherente a todos los procesos de purificación.

PURIFICACIÓN

Los perros fueron muertos por desangramiento, sin anestesia, extrayendo inmediatamente el páncreas y enfriándolo con hielo picado. Las demás operaciones fueron realizadas en un laboratorio refrigerado a 2-4°. Los páncreas fueron troceados y homogenizados en un Waring Blendor durante un minuto con 4 partes de una solución de fosfatos 0,05 M-EDTA 0,005-M pH 7,2. Los homogenados se centrifugaban a 23.000 × g. durante una hora. A los sobrenadantes se les agregaba un volumen igual de solución de sulfato amónico saturada a 0°, pH 7,5, dejando la mezcla en reposo varias horas y separando el abundante precipitado formado por centrifugación a 23.000 × g. durante una hora. A los sobrenadantes se les agregaban 176 g. de sulfato amónico por litro para dar una concentración final del 75 % de saturación; después de varias horas se recogía el precipitado por centrifugación a 14.000 × g. durante 20 minutos, se suspendía en el mínimo volumen posible de EDTA 0,005 M, y se dializaba contra EDTA 0,005 M que se renovaba varias veces durante un día. En la tabla I se recogen los resultados de un protocolo típico.

TABLA I
Purificación de la hexokinasa del páncreas

	Actividad total %	Actividad específica (1)	Volumen ml.
Homogenado	100	—	132
Sobrenadante 23.000 × g. . .	42	0,07	93
Fracción 50-75 sat.	14	0,25	6

(1) Micromoles/mg. proteína/15 minutos/a 30°.

Los preparados purificados en la forma descrita no tenían actividad fosfatásica significativa, siendo adecuados para la caracterización de la especificidad de sustrato. La actividad hexokinásica es máxima en la zona de pH 7-8 (buffer fosfatos-Tris).

ESPECIFICIDAD DE SUBSTRATO

Distintos azúcares y derivados se ensayaron como substratos del preparado purificado de hexokinasa de páncreas. El método preferentemente empleado en estas determinaciones fué el indicador fotométrico (4). Se valoró la constante de Michaelis (Km) y las velocidades máximas relativas de los principales substratos. Como las Km de glucosa, manosa y 2-deoxiglucosa resultaron demasiado pequeñas para permitir su medida directa, se recurrió a calcularlas a partir del efecto inhibitor producido por la N-acetilglucosamina, después de comprobar que éste era del tipo competitivo y de determinar su constante de inhibición por la magnitud de su efecto sobre la fosforilación de la fructosa.

En la tabla II se resumen los resultados obtenidos con los principales substratos e inhibidores.

TABLA II

Especificidad de substrato de la hexokinasa pancreática

Substrato	Velocidad máxima relativa (%)	Constante de Michaelis moles/l	Coefficiente de fosforilación
Glucosa	1,0	1×10^{-5}	1,00
Manosa	1,0	1×10^{-5}	1,00
Fructosa	1,5	1×10^{-3}	0,015
2-Deoxiglucosa	+	2×10^{-5}	*
N-Acetilglucosamina	—	3×10^{-4}	<0,003
1,5-Sorbitán	+	*	*
Alosa	+	*	*

(*) Un signo + en esta columna indica fosforilación positiva.
 * No determinado.

No se apreció en el preparado purificado actividad fosforilante sobre la galactosa ni sobre sorbosa, ambas a una concentración 0,02 M.

Discusión

Los resultados obtenidos muestran que el páncreas de perro posee una hexokinasa soluble, similar, en especificidad y afinidad por los distintos substratos ensayados, a las restantes hexokinasas animales conocidas.

La relación de las afinidades de la hexokinasa pancreática por glucosa, manosa y fructosa resulta ser 100 : 100 : 1, res-

pectivamente. Esta relación difiere notablemente de la supuesta por BHATTACHARYA (3), 100 : 45 : 15, suposición que fué clave en la hipótesis de la destrucción de la hexokinasa pancreática por la aloxana. La marcada discrepancia entre protección *in vivo* y afinidad relativa de la hexokinasa por estos azúcares, junto con la relación entre concentración de glucosa y protección de la hexokinasa *in vitro* (9), permiten descartar a la hexokinasa como el punto débil en la sensibilidad de los islotes de Langerhans a la aloxana.

* * *

Queremos manifestar nuestro agradecimiento al Dr. Sols por sus valiosos consejos y crítica.

Resumen

La actividad hexokinásica del páncreas de perro se encuentra en su mayor parte en la fracción soluble. Se ha obtenido un preparado de hexokinasa libre de los principales enzimas interferentes. El espectro de especificidad de sustrato es similar al de otras hexokinasas animales incluida una relación de afinidades glucosa:fructosa del orden de 100 : 1, que contrasta con las capacidades relativas de protección contra la instauración de la diabetes aloxánica. No se ha encontrado diferencia entre la actividad hexokinásica de páncreas de perros normales y diabéticos por aloxana.

Summary

Pancreas hexokinase

The hexokinase activity of dog pancreas appears to be mainly in the soluble fraction. It does not sediment by centrifugation at $100,000 \times g$ during one hour. By ammonium sulfate fractionation of high-speed supernatants it has been obtained a preparation of hexokinase free of phosphatase activity. The preparation can phosphorylate glucose, fructose, mannose, 2-deoxyglucose, allose and 1,5-sorbitan. For the first three substrates the following relative maximal rates and Michaelis constants were obtained: glucose 1.0, 1×10^{-5} M; fructose 1.5, 1×10^{-5} M; mannose 1.0, 1×10^{-5} M. Galactose and L-sorbose are apparently inert. N-acetyl-glucosamine is a competitive inhibitor ($K_i = 3 \times 10^{-4}$ M). These results indicate that the pancreas has an hexokinase with a spectrum of substrate specificity similar to that of other animal hexokinases. The ratio of affinities glucose : fructose is very different from the relative protective abilities toward the onset of diabetes by alloxan. No significant differences have been

found between the hexokinase activity of pancreas of normal and alloxan-diabetic dogs.

Bibliografía

- (1) ARTETA, J. L., y CARBALLIDO, A. : *J. Endocrin.*, **10**, 342, 1954.
- (2) BHATTACHARYA, G. : *Science*, **117**, 230, 1953.
- (3) BHATTACHARYA, G. : *Science*, **120**, 841, 1954.
- (4) CRANE, R. K., y SOLS, A. : Animal tissue hexokinases, en *Methods in Enzymology*, ed. por S. P. Colowick y N. O. Kaplan. Vol. I, Academic Press, Nueva York, 1955.
- (5) LONG, C. : *Biochem. J.*, **50**, 407, 1952.
- (6) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., y RANDALL, R. J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
- (7) SEN, P. B., y BHATTACHARYA, G. : *Indian J. Physiol. and Allied Sci.*, **6**, 112, 1952.
- (8) SOLS, A. : *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 144, 1956.
- (9) VILLAR-PALASÍ, C., CARBALLIDO, A., SOLS, A., y ARTETA, J. L. : *Nature*, **180**, 387, 1957.