

# Aislamiento, purificación parcial y caracterización cinética de la glucoquinasa intestinal de rata. Comparación con la isoenzima hepática

BEATRIZ DE LA TORRE, OLGA DE MARCUCCI Y ANDRÉS CARMONA

Laboratorio de Bioquímica Nutricional y Metabolismo, Centro de Biología Celular  
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela  
Apartado 47114. Caracas 1041A, Venezuela. E-mail: ajcarmona@cantv.net

La glucoquinasa, enzima de alto  $K_s$  que fosforila a la glucosa y otros azúcares, pertenece a la familia de las hexoquinasa. En los animales superiores es ampliamente reconocida la presencia de glucoquinasa en el hígado y el páncreas. A pesar de reportes sobre su presencia en el intestino que datan de los años 70, en la literatura actual existen múltiples estudios de caracterización molecular, cinética y regulatoria de las isoenzimas hepática y pancreática, sin mención de la isoenzima intestinal. En este trabajo se reporta el aislamiento, purificación parcial y caracterización cinética de la isoenzima intestinal y se demuestra que posee propiedades similares a la hepática: cinética sigmoide y alto  $K_s$  por la glucosa y manosa, cinética hiperbólica para la fructosa, inhibición competitiva por la N-acetil-glucosamina e interacción con una proteína regulatoria que media la inhibición por fructosa-6-P y activación por fructosa-1-P. Estos hallazgos sugieren que el intestino se encuentra entre los tejidos que son sensores de la glucosa.

## Introducción

La fosforilación es el primer paso en el metabolismo de la glucosa y otros monosacáridos. En los tejidos animales existe una familia de isoenzimas que fosforilan a la glucosa y que reciben el nombre de hexoquinasa (1). La hexoquinasa IV, o glucoquinasa, se caracteriza por mostrar una cinética sigmoide para la glucosa con un elevado valor de  $K_s$  que fluctúa alrededor de 6-12 mM (2,3). Funcionalmente, esta cooperatividad probablemente incrementa la sensibilidad de esta enzima a las fluctuaciones plasmáticas de glucosa dentro del rango fisiológico (4)

La isoenzima hepática ha sido ampliamente caracterizada, es una proteína monomérica cuyo peso molecular es de 50 Kd (5). Además de fosforilar a la glucosa, también es activa frente a la manosa y la fructosa. Con la primera la cinética también es sigmoide (6) y un  $K_s$  mayor al de la glucosa. Para la fructosa, la cinética es hiperbólica y el  $K_m$  es muy alto (220 mM), pero la  $V_{máx}$  es el doble que con la glucosa (7). La galactosa no es un sustrato para la glucoquinasa. Por su parte, la N-acetil-glucosamina es un inhibidor competitivo que aumenta el  $K_s$  para la glucosa sin afectar la  $V_{máx}$  (6).

Van Schaftingen y Vandercammen (8) observaron que la fructosa incrementaba la afinidad de la glucoquinasa por la glucosa sin modificar su

velocidad máxima. En ensayos realizados con sobrenadantes obtenidos a alta velocidad, a partir de extractos crudos provenientes de células hepáticas, la fructosa-1-fosfato (1mM) fue capaz de estimular hasta dos veces más la fosforilación de la glucosa, en comparación a los ensayos realizados su ausencia. Por el contrario, al realizar la prueba con glucoquinasa parcialmente purificada, este efecto no se reprodujo. La modulación por la fructosa-1-P se encontró era mediada por una proteína regulatoria de 62 Kd que, en presencia de fructosa-6-P, se une a la glucoquinasa y la inhibe. La fructosa-1-P desplaza a la fructosa-6-P de su sitio de unión en la proteína regulatoria, causando que ésta se separe de la glucoquinasa (9).

En este trabajo se reporta el aislamiento y purificación de las glucoquinasas intestinal y hepática y se comparan sus propiedades cinéticas y regulatorias.

## 1. Aislamiento y purificación de las isoenzimas intestinal y hepática.

A fin de poder obtener las glucoquinasas intestinal y hepática, libre de hexoquinasa, se procedió a realizar una purificación parcial basada en la observación que la glucoquinasa se separa de las demás hexoquinasa de bajo  $K_m$  por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex (10).

Tabla I. Resumen de la purificación de la glucoquinasa hepática e intestinal de rata

Tejido		Fracción		
		Sobrenadante 100.000xg	Precipitación 42-68%	DEAE- Sephadex
Hígado	Volumen (ml)	30	15	9
	Proteína (mg)	24,6	1,65	0,08
	A.T (mU)	0,467	0,313	0,216
	A.E. (mU/mg)	0,019	0,19	2,7
	Rendimiento (%)	100	67	46,2
	Purificación	1	10	142,1
Intestino	Volumen (ml)	25	10	8
	Proteína (mg)	20,1	2,08	0,1
	A.T (mU)	0,246	0,21	0,11
	A.E. (mU/mg)	0,012	0,101	1,1
	Rendimiento (%)	100	85,4	44,7
	Purificación	1	8,4	91,6

Precipitación con sulfato de amonio. A.T: actividad total (mU). A.E.: Actividad específica (mU/mg de proteína)

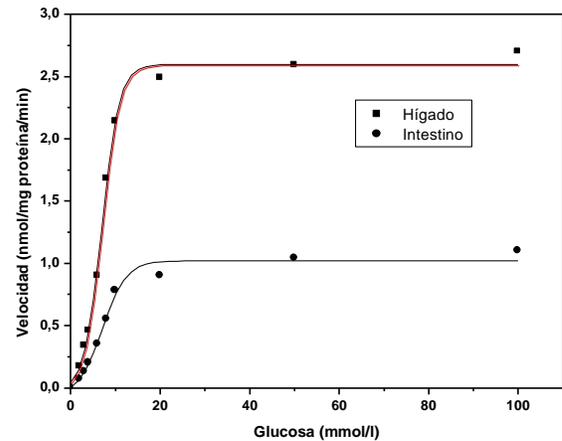
La aplicación de este protocolo permitió una purificación de 142,1 veces, con un rendimiento del 46,2% para la glucoquinasa hepática. Para la isoenzima intestinal el rendimiento fue de 44,7%, con una purificación de 91,6 veces. En las fracciones recogidas en esta última etapa, no se detectó actividad enzimática de hexoquinasas de bajo Km para la glucosa. Los resultados obtenidos son comparables con otros reportados en la literatura (11,12). Grossman y colaboradores (11) reportaron rendimientos de un 25% y una purificación de 196 veces para la glucoquinasa hepática, con un protocolo similar al utilizado aquí.

## 2. Caracterización cinética de las isoenzimas parcialmente purificadas.

En la Figura 1 se muestran las curvas de actividad de las isoenzimas intestinal y hepática, cuando el sustrato es glucosa. La glucoquinasa hepática mostró una velocidad máxima de 2,7 mU/mg con un valor de Km, S<sub>0,5</sub>, cercano a 7,1 mM y un coeficiente de Hill de 1,7. Estos resultados concuerdan con los reportados por otros autores (13,14). Por su parte, la isoenzima intestinal mostró una velocidad máxima de 1,1 mU/mg, con un valor de S<sub>0,5</sub> cercano a 8 mM y un coeficiente de Hill de 1,6. Ambas isoenzimas presentan una cinética de tipo sigmoidal con una cooperatividad positiva en presencia de glucosa.

Hasta ahora ha sido difícil explicar esta cooperatividad en términos clásicos, en virtud de que la glucoquinasa es una enzima monomérica (15) con un solo sitio de unión para la glucosa y sin evidencias de sufrir oligomerización. Este fenómeno ha sido explicado sobre la base de un modelo "memorístico", en el cual la enzima "recuerda" la conformación de mayor actividad cuando está en presencia de su sustrato (9).

Figura 1. Curva de actividad de las glucoquinasas intestinal y hepática en presencia de glucosa.



Se determinó (no mostrado) que el pH óptimo para ambas enzimas correspondió a 7,2, similar al reportado para la glucoquinasa pancreática (6).

Tabla II. Parámetros cinéticos para las glucoquinasas intestinal y hepática de rata con varios azúcares

Tejido	S	Km (mM)	v/V glucosa %	Coefficiente de Hill
Hígado	Glc	7,1	100	1,7 ± 0,15
	Man	8,6	87	1,5 ± 0,22
	Fru	220	174	1,1 ± 0,1
	Gal			No hay actividad
	MG			3 %
Intestino	Glc	7,6	100	1,6 ± 0,2
	Man	5,6	81	1,5 ± 0,13
	Fru	137	136	1,08 ± 0,1
	Gal			No hay actividad
	MG			5,6%

El valor relativo v/V glucosa fue obtenido utilizando valores de V<sub>máx</sub> para cada uno de los azúcares y relacionándolos con la V<sub>máx</sub> para la glucosa a concentraciones saturantes. Los valores reportados son S<sub>0,5</sub> cuando la cinética es sigmoidal (n<sub>H</sub> > 1). MG = Metil- $\alpha$ -glucopiranosido (500 mM)

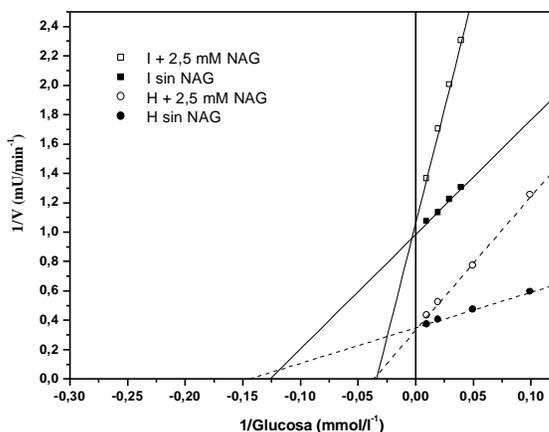
El comportamiento de ambas isoenzimas frente a varios azúcares fue similar. Como se puede observar en la Tabla II, tanto la D-glucosa como la D-manosa

son buenos sustratos para ambas glucoquinasas; estos resultados concuerdan con los reportados por otros (11,16), obteniéndose para ambos azúcares una cinética sigmoideal y un  $S_{0.5}$  más alto para la manosa que para la glucosa. La fructosa ( $K_m = 220$  mM) es también un sustrato para las glucoquinasas; la velocidad máxima fue mayor a la observada cuando el sustrato es glucosa. Resultados similares han sido reportados por otros (7). Cuando se empleó como sustrato galactosa, no se registro actividad enzimática; siendo la glucosa y la galactosa epímeros, se cree que la orientación del grupo hidroxilo del carbono 4 es crítica para el proceso de fosforilación.

La actividad de las glucoquinasas con metil- $\alpha$ -glucopiranosas (500 mM) fue menor del 6% con relación a la actividad desarrollada con una solución 100 mM de glucosa. Esto sugiere que el grupo hidroxilo del carbono 1 es crítico para la unión del azúcar y su posterior fosforilación.

En cuanto a la cooperatividad (Tabla II), las isoenzimas exhibieron cooperatividad positiva cuando los sustratos fueron glucosa y manosa (coeficientes de Hill  $>1$ ), mientras que para la fructosa no se evidenció el fenómeno de cooperatividad. Los resultados anteriores son similares a los reportados para la enzima hepática (7,16). Cárdenas y colaboradores (7), han postulado que las diferencias en cuanto a cooperatividad son debidas a las diferentes velocidades con las que se dan los cambios conformacionales en la enzima, cuando la misma reacciona con estos sustratos, en concordancia al "modelo de transición lenta" postulado por estos autores.

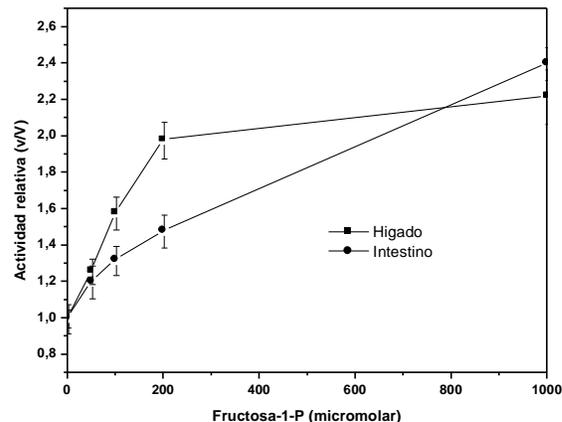
Figura 2. Efecto inhibitorio de la N-acetilglucosamina (NAG) sobre la isoenzima hepática (H) e intestinal (I).



La N-acetilglucosamina es un efectivo inhibidor competitivo de la glucoquinasa produciendo un fuerte incremento del  $S_{0.5}$  de 7,1 a 35 mM en el caso de la isoenzima hepática y de 7,6 a 30 mM para la isoenzima intestinal. El  $K_i$  fluctuó alrededor de 0,7 mM (Figura 2). Este azúcar además presenta la interesante propiedad de reducir el coeficiente de Hill a uno, cuando el sustrato es la glucosa. Aparentemente, la N-acetilglucosamina se une a la enzima e impide los cambios necesarios para que se pueda desarrollar el fenómeno de cooperatividad (17).

La enzima aislada del intestino presenta el comportamiento descrito por diversos autores para las glucoquinasas hepática y pancreática y en consecuencia se demuestra la existencia de este tipo de enzima en el intestino. La demostración definitiva de la expresión de la glucoquinasa en el intestino se buscó estudiando el efecto de la Fructosa-6-P y fructosa-1-P que, a través de su interacción con la proteína regulatoria, inhiben y activan a las glucoquinasas hepática y pancreática (9).

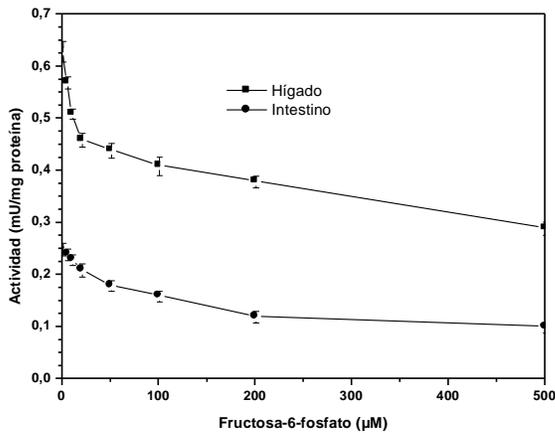
Figura 3. Efecto de la fructosa-1-P sobre la actividad de las glucoquinasas intestinal y hepática incubada con glucosa 5 mM.



La actividad relativa  $v/V$  se calculó dividiendo la actividad a cada concentración de Fructosa-1-P entre aquella obtenida en su ausencia.

En la figura 3 se observa que, al utilizar homogenatos de intestino e hígado, a medida que se va aumentando la concentración de fructosa-1-P, la actividad de la enzima se va incrementando hasta llegar a duplicarse cuando la concentración de fructosa-1-P fue de 1 mM, en comparación a la actividad que se obtiene cuando ésta no estaba presente en el medio de reacción. La actividad de las hexoquinasas de bajo  $K_m$ , no fue modificada por la fructosa-1-P (no mostrado).

Figura 4. Efecto de la fructosa-6-P sobre la actividad de las glucoquinasas intestinal y hepática incubada con glucosa 5 mM.



Al realizar ensayos con extractos crudos tanto hepáticos como intestinales en presencia de fructosa-6-fosfato (0,5 mM) se observó que ambas enzimas fueron inhibidas, llegando a una disminución de un 54% en el caso del hígado y un 60% para la isoenzima intestinal (Figura 4). Estos resultados confirman que en el intestino no sólo está presente la glucoquinasa, sino también la proteína regulatoria que constituye, junto a la primera una unidad funcional en términos de la regulación del metabolismo de la glucosa.

Los mecanismos bioquímicos para la regulación órgano-específica de la actividad de la glucoquinasa, parecen haber evolucionado de tal forma que la enzima sirve como *sensor* de la glucosa plasmática no solo a nivel de las células beta-pancreáticas, como ya se sabe, sino al parecer en otras células tales como: hepatocitos, neuronas hipotalámicas especializadas y enterocitos. De hecho, colectivamente estas células podrían ser conceptualizadas como un sistema integrado de órganos que contienen glucoquinasa, en donde la homeostasis de la glucosa plasmática se obtiene gracias a la integridad del sistema y de su compleja red de intercomunicación hormonal.

*Agradecimientos:* Se agradece el financiamiento a través del proyecto CDCH UCV, 09-12-4451-02

#### Referencias

1. **Middleton R. J.** (1989) Hexokinases and glucokinases. Biochemical Society Transactions. Vol:18 180-183
2. **Storer y Cornish-Bowden** (1977) Biochem J. **165**: 61-67
3. **Cárdenas, M.L.; Rabajille, E. y Niemeyer, H.** (1979) Arch. Biol. Med. Exp. **12**: 571-580
4. **Bontemps, F.; Hue, L. y Hers, H. G.** (1978) Phosphorylation of glucose in isolated rat hepatocytes. Sigmoidal kinetics explained by the activity of glucokinase alone. Biochem. J. **174**: 603-611

5. **Printz R; Magnuson M y Granner D** (1993) Mammalian glucokinase. Annu. Rev. Nutr. **13**: 463-496
6. **Zhong Xu L., Weber I., Harrison R.W., Gigh-Jain M., y Pilkis S.** (1995) Sugar specificity of human  $\beta$ -cell glucokinase: Correlation of molecular models with kinetic measurements. Biochemistry **34**: 6083-6092
7. **Cárdenas, M.L.; Rabajille, E. y Niemeyer, H.** (1984) Fructose is a good substrate for rat liver glucokinase (hexokinase D). Biochem. J. **222**: 363-370
8. **Van Schaftingen E. y Vandercammen, A.** (1989) Stimulation of glucose phosphorylation by fructose in isolated rat hepatocytes. Eur. J. Biochem. **179**: 173-177
9. **Van Schaftingen E., Detheux M., y Veiga D. M.** (1994) Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein. FASEB J. **8**: 414-419
10. **González, C. U.; Sánchez, R. y Niemeyer, H.** (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. **16**: 374-352
11. **Grossman S. H.; Dorn C. y Potter V.** (1974) The preparation and characterization of pure rat liver glucokinase. Biol. Chemistry. **10**: 3055-3060
12. **Vandercammen A. y Van Schaftingen E.** (1993) Species and tissue distribution of the regulatory protein of glucokinase. Biochem. J. **294**: 551-556
13. **Niemeyer H; Cárdenas M y Rabajille E.** (1975) Sigmoidal kinetics of glucokinase. Enzyme **20**: 321-333
14. **Matschinsky, F.** (2002) Regulation of Pancreatic  $\beta$ -Cell glucokinase from basics to therapeutics. Diabetes. **51**(Suppl.3):S394-S404.
15. **Holroyde, M. J.; Allen, M. B.; Storer, A.C. y Walker, D.G.** (1976) Biochem. J. **153**: 363-373
16. **Tiedge, M., Krug, U. y Lenzen S.** (1997) Modulation of human glucokinase intrinsic activity by SH reagents mirrors post-translational regulation of enzyme activity. Biochim. Biophys. Acta **1337**: 175-190
17. **Neet, K.E.; Keenan, R.P. y Tippett S.** (1990) Observation of a Kinetic Slow Transition in Monomeric Glucokinase. Biochemistry **29**: 770-777