

## PERFIL ISOENZIMÁTICO DE HEXOQUINASA Y ENOLASA EN TEJIDOS NEURALES

E. G. Delicado\*, M. Torres\*, A. Millaruelo\* & M. T. Miras-Portugal\*

Recibido: diciembre 1985

### SUMMARY

#### Isoenzymatic profile of hexokinase and enolase in neural tissues

Tissues derived from the neural crest showed a characteristic distribution and activity for each glycolytic isoenzyme.

The hexokinase activity in chromaffin tissue, pheochromocytoma and melanoma was associated with the particulate fraction of the homogenate as previously described for brain hexokinase. The experimental values obtained were 1, 2.1 and 1.68 U/g respectively, corresponding to type I isoenzyme (neural isoenzyme).

In spite of the hexokinase, the enolase activity in these tissues was found in the cytosolic fraction. The activities were 13, 25 and 110 U/g for chromaffin tissue, pheochromocytoma and melanoma, respectively, corresponding to the  $\alpha\gamma$  hybrid form. In melanoma some traces of the  $\alpha\alpha$  form, a non neural isoenzyme, could be detected.

**Keywords:** Isoenzymes, hexokinase, enolase.

### RESUMEN

Los tejidos derivados de la cresta neural presentan una actividad y distribución típica en isoenzimas glicolíticas.

Las actividades hexoquinasa determinadas son 1, 2,1, y 1,68 U/g en tejido cromafín, feocromocitoma y melanoma, respectivamente. En los tres casos se encuentran asociadas a fracciones particuladas del homogenado, como ocurre en cerebro. El isoenzima presente en estos tejidos es el isoenzima I, típicamente neural.

La actividad enolasa presente es de 13, 25 y 110 U/g para tejido cromafín, feocromocitoma y melanoma, respectivamente. En contraposición con la hexoquinasa, la enolasa es un enzima citosólico, no asociado a partículas subcelulares. A diferencia del cerebro ( $\gamma\gamma$ ) el isoenzima presente en los tres tejidos es el híbrido  $\alpha\gamma$ , aunque en el caso de melanoma hasta un 20% corresponde a la forma  $\alpha\alpha$  no neural.

**Palabras clave:** Isoenzimas, hexoquinasa, enolasa.

### INTRODUCCIÓN

El estudio de la distribución de los isoenzimas es un instrumento valioso para llegar a comprender el origen y metabolismo de un determinado tejido, pues permite establecer las diferencias con sus homólogos tumorales (MÖSS, 1982). En el caso de la hexoquinasa (E.C. 2.7.1.1) y enolasa (E.C. 4.2.1.11), dos enzimas claves en la ruta glicolítica, existen varios isoenzimas característicos de cada tipo de

tejido y con una distribución peculiar. El isoenzima I de la hexoquinasa se encuentra fundamentalmente en cerebro (CRANE & SOLS, 1953; GROSSBARD & SCHIMKE, 1966), junto con pequeñas cantidades del isoenzima II. La enolasa se caracteriza por la combinación de tres tipos de subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , asociadas dos a dos, siendo la combinación  $\alpha\alpha$  esencialmente glial y  $\gamma\gamma$  esencialmente neural (MARANGOS *et al.*, 1978; KATO *et al.*, 1983). La presencia en plasma de este isoenzima neural ha sido em-

\* Departamento de Bioquímica, Facultad de Biología, Universidad de Murcia.

pleada como parámetro diagnóstico en tumores de esta naturaleza (ISHIGURO *et al.*, 1983; KATO *et al.*, 1983).

Los tejidos neurales se caracterizan por el empleo de glucosa como sustrato energético fundamental, metabolizándose principalmente a través de la vía glicolítica y del ciclo de Krebs (SOKOLOFF, 1981). En trabajos anteriores realizados en nuestro Departamento se han estudiado las distintas vías metabólicas de utilización de la glucosa en un tejido neural puro «sin glía» como es el tejido cromafín, su derivado tumoral el feocromocitoma y otro tejido tumoral también de origen neural, el de melanoma Harding-Passey. Todos estos tejidos tienen su origen en la cresta neural (LE DOUARIN, 1980) y actualmente se engloban bajo el concepto de «*paraneurona*» (FUJITA & KOBAYASHI, 1979). Todos ellos se caracterizan por tener una alta capacidad glicolítica, así como una muy activa vía de las pentosas fosfato y una intensa incorporación del carbono de la glucosa a lípidos y proteínas, mostrando con ello claras diferencias con respecto al tejido cerebral (DELICADO *et al.*, 1985; MILLARUELO *et al.*, 1986).

En el presente trabajo se estudia los isoenzimas de la hexoquinasa y la enolasa presentes en los tejidos citados anteriormente, a fin de poder establecer posibles analogías y diferencias tanto con respecto al tejido cerebral como entre ellos, que nos permitan explicar algunas de sus peculiaridades metabólicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La médula adrenal se obtuvo por disección de las glándulas suprarrenales bovinas procedentes del matadero Mercamurcia. Estas glándulas se recogieron unos 20-30 minutos después de la muerte del animal y se trasladaron hasta el laboratorio a 4 °C. En los casos en que no se utilizaron inmediatamente, se conservaron congeladas a -70 °C.

Los feocromocitomas humanos procedían de la Residencia Sanitaria de la Seguridad Social «Nuestra Sra. del Rosell» de Cartagena, siendo congelados en nitrógeno líquido después de su extracción.

Los tumores de melanoma Harding-Passey procedían del Institute of Cancer Research, Royal Cancer Hospital de Londres. La obtención de tumores se efectuó por trasplante mediante inyección subcutánea de 10<sup>6</sup> células en ratones hembras C<sub>57</sub>/Bl. Estos tumores se diseccionaron y utilizaron 15 días después del trasplante.

## DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Todas las actividades enzimáticas se determinaron

en extractos de los tres tejidos, médula adrenal, feocromocitoma y melanoma.

La actividad hexoquinasa se valoró según el método de BERGMAYER *et al.* (1974) en el sobrenadante 10.000 × g. Para ello las glándulas y tumores se homogenizaron en tampón fosfato 5 mM, EDTA 5 mM y mercaptoetanol 5 mM pH 7.0 (1/10 P/V) en un potter mecánico con pistón de teflón y posteriormente se centrifugaron a 10.000 × g durante 20 minutos a 4 °C. Cuando se utilizaron tejidos congelados, la homogenización se realizó en un homogenizador POLITRON (Kinematica GmbH) a velocidad media en las condiciones citadas anteriormente.

La actividad enolasa se determinó en el sobrenadante 100.000 × g (fracción citosólica) según el método de MARANGOS *et al.* (1976). Las glándulas y tumores se homogenizaron en Tris-fosfato 50 mM, EDTA 1 mM y mercaptoetanol 1 mM pH 7.5 (1/4, P/V) en un potter mecánico o POLITRON como se ha descrito anteriormente y finalmente se centrifugaron a 100.000 × g durante 1 hora a 4 °C.

Una unidad de actividad enzimática (U) es la cantidad de enzima que transforma un μmol de sustrato por minuto. Todas las determinaciones de actividad enzimática se realizaron a 25 °C.

## CARACTERIZACIÓN DE ISOENZIMAS

Los isoenzimas de hexoquinasa se separaron por cromatografía en DEAE celulosa según el método de GROSSBARD & SCHIMKE (1966). 20 g de tejido se homogenizaron en 100 ml de tampón fosfato 10 mM pH 7.0, en presencia de mercaptoetanol 5 mM, EDTA 5 mM y glucosa 10 mM. Este homogenado se centrifugó a 100.000 × g durante 30 minutos. El sobrenadante se aplicó sobre una columna de DEAE celulosa (0.8 × 30 cm), previamente equilibrada con el tampón de homogenización. Dicha columna se lavó primeramente con 100 ml del mismo tampón para eliminar las proteínas no adsorbidas y finalmente se eluyó con un gradiente lineal de KCl (0 a 0.6M) en el mismo tampón. Se recogieron fracciones de 4 ml y se determinó la actividad hexoquinasa en cada fracción.

Los isoenzimas de la enolasa presentes en estos tejidos se identificaron mediante estudios de inactivación térmica, por lo que se midió la actividad enolasa en presencia o en ausencia de MgSO<sub>4</sub> 5 mM a diferentes tiempos de incubación a 50 °C y en presencia o ausencia de KCl o KBr 0.5 M a 37 °C (MARANGOS *et al.*, 1978).

## FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

Los distintos tejidos se homogenizaron en sacarosa 0.3 M (1/6, P/V). Este homogenado se centrifugó a 600 × g durante 15 minutos. El precipitado resultante de esta centrifugación se desechó y el sobrenadante se centrifugó a 10.000 × g durante 20 minutos. El precipitado se resuspendió en sacarosa 0.3 M y el sobrenadante (10.000 × g) se centrifugó a 100.000 × g

durante 1 hora. El precipitado resultante se resuspendió también en sacarosa 0'3 M.

Finalmente se determinó la actividad enolasa y hexoquinasa en todas las etapas de este fraccionamiento (precipitados y sobrenadantes).

Las proteínas se determinaron según el método de LOWRY *et al.* (1951).

Todos los reactivos utilizados eran de grado analítico (SIGMA O MERCK).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las actividades hexoquinasa determinadas fueron  $1 \pm 0'3(6)$ ,  $2'1 \pm 0'7(6)$ ,  $1'68 \pm 0'2(6)$  U/g en tejido cromafín, feocromocitoma y melanoma respectivamente. Estos valores de actividad son notablemente más bajos que los establecidos para cerebro de otras especies (EL-HASAN *et al.*, 1981).

Como puede observarse en la tabla I, de la actividad hexoquinasa total presente en el homogenado inicial, el 53% se encontró en el precipitado de la centrifugación a  $10.000 \times g$ . Esto nos indica que la enzima se encuentra asociada a las fracciones particuladas del homogenado, como había descrito para la hexoquinasa de cerebro (CRANE & SOLS, 1953 y KATZEN *et al.*, 1970). Por cromatografía en columna de DEAE celulosa se determinó que el isoenzima presente en estos tejidos es principalmente el isoenzima tipo I, el cual eluye a 0'15 M de KCl (fig. 1), aunque también se observaron pequeñas trazas del isoenzima tipo II, eluyendo a 0'24 M de KCl.

La Km aparente de este isoenzima tipo I para la glucosa es de 60,16 y 14  $\mu$ M para tejido cromafín, feocromocitoma y melanoma, respectivamente. Estos valores concuerdan bien con los descritos en la bibliografía para cerebro de rata (COLOWICK, 1973 y URETA, 1982), aunque en el caso de los tejidos tumorales, la afinidad es sensiblemente superior para el mismo

tipo de isoenzima. Esta enzima también puede utilizar como sustrato un análogo no metabolizable de la glucosa, 2 desoxiglucosa pero con menor afinidad, siendo los valores de Km aparente 150 y 100  $\mu$ M para feocromocitoma y melanoma, respectivamente, que representan un orden de magnitud superior y permiten explicar por qué la relación de fosforilación de glucosa a 2-desoxiglucosa es del orden de 10 veces superior (DELICADO *et al.*, 1985).

Estos datos a su vez están de acuerdo con la relación obtenida por CRANE & SOLS (1953) para la hexoquinasa tipo I de cerebro de rata, según la cual la 2-desoxiglucosa es utilizada a una velocidad 10 veces menor. A su vez Sokoloff tuvo en cuenta este parámetro para cuantificar la utilización de glucosa en tejidos cerebrales, estudiando el acúmulo de 2-desoxiglucosa radioactiva (SOKOLOFF, 1981). Es necesario señalar que la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, presente en estos tejidos, no tiene afinidad alguna por la 2-desoxiglucosa-6-fosfato (DELICADO *et al.*, 1985), lo que permite su acúmulo.

La actividad enolasa es  $13 \pm 2(6)$ ,  $25 \pm 4(6)$  y  $110 \pm 6(6)$  U/g para tejido cromafín, feocromocitoma y melanoma, respectivamente. Es necesario destacar la elevada actividad presente en melanoma, contrastando significativamente con la establecida para tejido cromafín no tumoral y a su vez superior a la descrita en la bibliografía para cerebro de diversos mamíferos (MARANGOS *et al.*, 1976).

Al efectuar un fraccionamiento subcelular de los distintos tejidos, se determinó que es una enzima 100% citosólica (tabla I), en contraposición a la hexoquinasa que está parcialmente asociada a orgánulos subcelulares. De la actividad de partida y después de todas las etapas del fraccionamiento se recupera un 85% en el sobrenadante  $100.000 \times g$ , que es la fracción citosólica.

La caracterización de sus isoenzimas se llevó

TABLA I. Actividad total hexokinasa y enolasa en distintas fracciones subcelulares de melanoma Harding-Passey.

Total hexokinase and enolase activity of Harding-Passey melanoma subcellular fractions.

| FRACCIÓN                   | ACTIVIDAD<br>HEXOKINASA TOTAL | ACTIVIDAD<br>ENOLASA TOTAL |
|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Homogenado inicial         | 10,5 U (100%)                 | 494,8 U (100%)             |
| Sobrenadante (10.000 x g)  | 1,6 U (15%)                   | 558,5 U (100%)             |
| Precipitado (10.000 x g)   | 5,6 U (53%)                   | 63,0 U (13%)               |
| Sobrenadante (100.000 x g) | 2,4 U (23%)                   | 424,2 U (86%)              |
| Precipitado (100.000x g)   | 0,3 U (2,5%)                  | 4,4 U (1%)                 |

( ) Porcentaje de actividad total inicial.

El fraccionamiento se efectuó a partir de unos 5g de tejido.

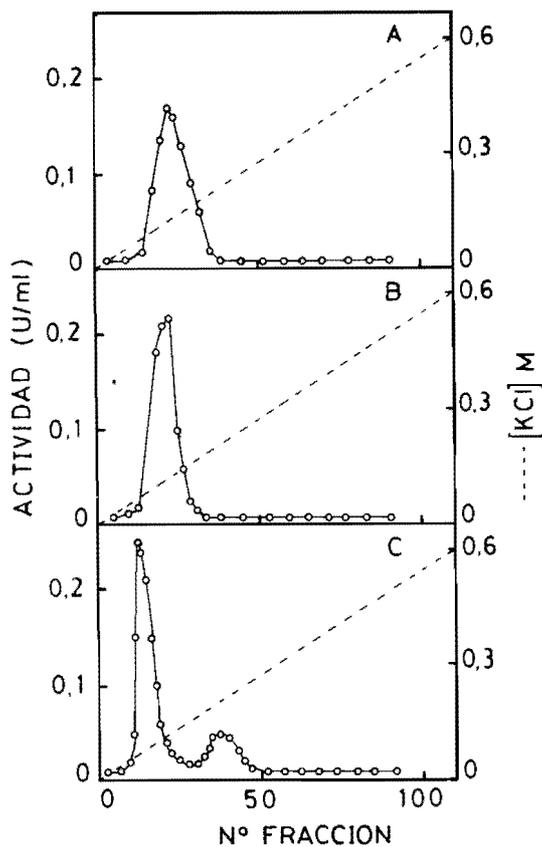


FIGURA 1. Perfiles de elución de la actividad hexoquinasa de melanoma (A), feocromocitoma (B) y tejido cromafín (C) por cromatografía en columna de DEAE celulosa, según se ha descrito en métodos.

DEAE cellulose chromatography profiles of melanoma hexokinase (A), pheochromocytoma hexokinase (B) and chromaffin tissue hexokinase (C).

a cabo, como se ha mencionado anteriormente, analizando el efecto de diferentes sales y alta temperatura sobre la actividad de la enzima.

En la figura 2A se muestra el efecto de la temperatura (incubación a 50 °C) en presencia y ausencia de  $Mg^{+2}$ , sobre la enzima procedente de tejido cromafín. La pérdida de actividad indicaría que se trata del isoenzima no neural ( $\alpha\alpha$ ) o bien el híbrido  $\alpha\gamma$ , no obstante la acción protectora de los iones  $Mg^{+2}$  frente a la inactivación, permite excluir al isoenzima  $\alpha\alpha$ , concluyendo que el isoenzima presente es el híbrido  $\alpha\gamma$ . Para confirmar estos resultados se efectuaron estudios de inhibición por sales de haluros,

KCl y KBr (fig. 2B), obteniéndose un 20% y un 60% de inhibición respectivamente. Este comportamiento nos permite asegurar la existencia del híbrido  $\alpha\gamma$ .

Resultados similares se han obtenido en feocromocitoma (fig. 3A y 3B). Una diferencia significativa se puede apreciar en el comportamiento de la actividad enolasa de melanoma Harding-Passey al estudiar su estabilidad frente a la temperatura. En este caso las sales de  $Mg^{+2}$  no ejercen una protección total, lo cual nos indica que además del isoenzima híbrido  $\alpha\gamma$ , existen cantidades significativas del isoen-

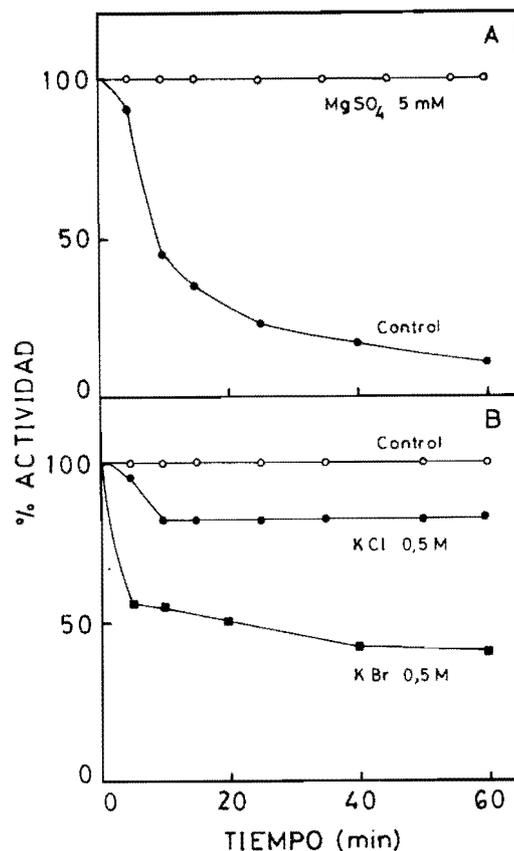


FIGURA 2. A. Cinética de inactivación de la actividad enolasa de tejido cromafín por la temperatura. B. Cinética de inactivación de esta actividad por sales.

A. Temperature stability of chromaffin tissue enolase. B. Kinetics of chromaffin tissue enolase inactivation by salts.

zima no neural  $\alpha$  (fig. 4A). Los efectos de las sales KCl y KBr (fig. 4B) nos confirman la existencia conjunta de las formas  $\alpha\gamma$  y  $\alpha\alpha$ .

Generalmente el dímero  $\alpha\alpha$  de enolasa se ha adjudicado a células gliales y el  $\gamma\gamma$  a las neuronas. La presencia del híbrido  $\alpha\gamma$  ha sido detectada, en no excesiva cantidad, en homogenados de cerebro, en los que se ha discutido su posible formación como artefacto del proceso de homogenización frente a la posibilidad de que ya estuvieran presentes en el tejido original (MARANGOS, 1976; SCHMECHEL *et al.*, 1978, 1980; TAPIA *et al.*, 1981). El hecho de que los tejidos utilizados en este trabajo sean neurales,

exentos de glía y, en el caso del tejido cromafín, de naturaleza no tumoral, demuestra la existencia del isoenzima híbrido  $\mu$  reformado en los tejidos neurales y, por lo tanto, la expresión de las dos cadenas polipeptídicas  $\alpha$  y  $\gamma$  en la misma célula. El feocromocitoma, homólogo tumoral del tejido cromafín, presenta su misma distribución. No obstante, en el caso de melanoma, en donde la actividad es muy elevada, la presencia del isoenzima  $\alpha\alpha$  es mayor. Estas elevadas actividades de enolasa en feocromocitoma y melanoma se correlacionan bien con la gran capacidad glicolítica de estos tejidos (LAZO, 1981 y DELICADO *et al.*, 1985).

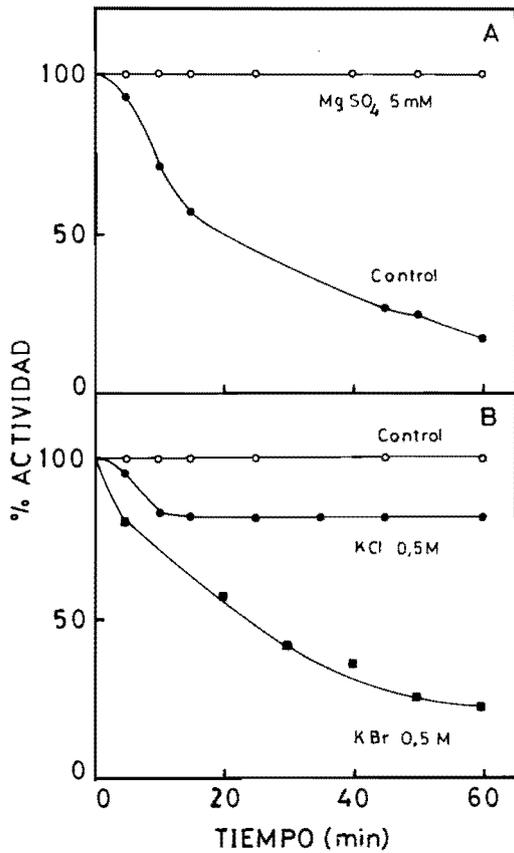


FIGURA 3. A. Cinética de inactivación de la enolasa de feocromocitoma por la temperatura. B. Cinética de inactivación de dicha actividad por sales.

A. Temperature stability of pheochromocytoma enolase. B. Kinetics of pheochromocytoma enolase inactivation by salts.

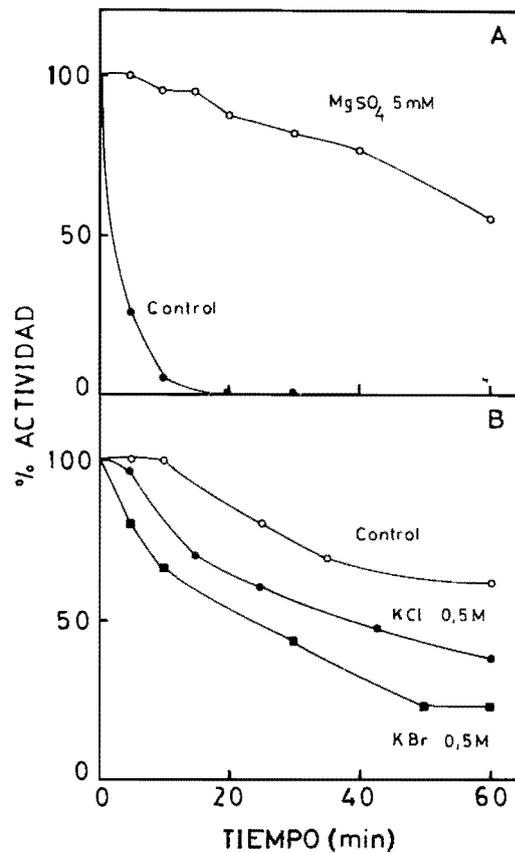


FIGURA 4. A. Cinética de inactivación de la actividad enolasa de melanoma por la temperatura. B. Cinética de inactivación de esta actividad por sales.

A. Temperature stability of melanoma enolase. B. Kinetics of melanoma enolase inactivation by salts.

## BIBLIOGRAFÍA

- BERGMEYER, H. U.; BERNT, E.; SCHMIDT, F. & STORT, H. 1974. D-glucose determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: Bergmeyer, H.U. (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, 3: 1.196-1.201, Verlag Chemie, Weinheim, Academic Press, New York.
- COLOWICK, S. P. 1973. The hexokinases. In: BOYER, P. D. (ed.), *The Enzymes*, 9: 1-48, Academic Press, New York.
- CRANE, R. K. & SOLS, A. 1953. The association of hexokinase with particulate fractions of brain and other tissue homogenate. *J. Biol. Chem.*, 203: 273-292.
- DELICADO, E. G.; TORRES, M. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 1986. Glucose transportes and metabolic patterns in Harding-Passey melanoma cells. Insulin effects. *Cancer Res.* 46: 3.762-3.767.
- EL-HASSAN, A.; ZUBAIN, S.; HOTHERSHALL, J. S. & GREENBAUN, A. L. 1981. Age-related changes in enzymes of rat brain. Enzymes of glycolysis, the pentose phosphate pathway and lipogenesis. *Enzyme*, 26: 107-112.
- FUJITA, T. & KOBAYASHI, S. 1979. Current views on the paraneurone concept. *TINS*, 2: 27-30.
- GROSSBARD, L. & SCHIMKE, R. T. 1966. Multiple hexokinases of rat tissues. Purification and comparison of soluble forms. *J. Biol. Chem.*, 211: 3.546-3.560.
- ISHIGURO, Y.; KATO, K., ITO, T.; NAGAYA, M.; YAMADA, N. & SUGITO, T. 1983. Nervous system-specific enolase in serum as a marker for neuroblastoma. *Pediatrics*, 72: 696-700.
- KATO, K.; ARIYOSHI, Y.; ISHIGURO, Y.; OTA, K.; SUCHI, T. & SATO, T. 1983. Effect of radiation treatment on serum levels of enolase isoenzymes in a thymic carcinoid patient. *Disease markers*, 1: 49-54.
- KATO, K.; ISHIGURO, Y. & ARIYOSHI, Y. 1983. Enolase isoenzymes as disease markers: Distribution of three enolase subunits ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) in various human tissues. *Disease markers*, 1: 213-220.
- KATZEN, H. M.; SODERMAN, D. D. & WILEY, C. E. 1970. Multiple forms of hexokinase. Activities associated with subcellular particulate and soluble fractions of normal and streptozotocin diabetic rat tissues. *J. Biol. Chem.*, 245: 4.081-4.096.
- LAZO, P. A. 1981. Amino acids and glucose utilization by different metabolic pathways in ascites-tumor cells. *Eur. J. Biochem.*, 117: 19-25.
- LE DOUARIN, N. H. 1980. The ontogeny of the neural crest in avian embryo chimaeras. *Nature*, 286: 663-668.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. H.; FAR, A. L. & RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- MARANGOS, P. J.; PARMA, A. M. & GOODWIN, F. K. 1978. Functional properties of neuronal and glial isoenzymes of brain enolase. *J. Neurochem.*, 31: 727-732.
- MARANGOS, P. J.; ZOMZELY-NEURATH, C. & YORK, C. 1976. Determination and characterization of neuron specific protein (NSP) associated enolase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 68(4): 1.309-1.316.
- MILLARUELO, A. I.; DE SAGARRA, M. R.; DELICADO, E.; TORRES, M. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 1986. Enzymes and pathways of glucose utilization in bovine adrenal medulla. *Mol. Cell. Biochem.* 70, 67-76.
- MÖSS, D. W. 1982. *Isoenzymes*. Chapman and Hall, Ltd. London.
- SCHMECHEL, D. E.; BRIGHTMAN, M. W. & MARANGOS, P. J. 1980. Neurons switch from non neural enolase to neuron-specific enolase during differentiation. *Brain Research*, 190: 195-214.
- SCHMECHEL, D. E.; MARANGOS, P. J.; ZIS, A. P.; BRIGHTMAN, M. W. & GOODWIN, F. K. 1978. The brain enolases as specific markers of neuronal and glial cells. *Science*, 199: 313-315.
- SOKOLOFF, L. 1981. The deoxyglucose method: Theory and practice. *Eur. Neurol.*, 20: 137-145.
- TAPIA, F. J.; BARBOSA, A. J. A.; MARANGOS, P. J.; POLAK, J. M.; BLOOM, S. R.; DERMODY, C. & PEARSE, A. G. E. 1981. Neuron-specific enolase is produced by neuroendocrine tumours. *Lancet* 1 (8224), 808-811.
- URETA, T. 1982. The comparative isozymology of vertebrate hexokinases. *Comp. Biochem. Physiol.*, 71B(4): 549-555.