

CIÈNCIES NATURALS

Actualització de continguts i didàctica / Recursos

ELS VIRUS

LA IMMUNOLOGIA

**CARACTERÍSTIQUES GENERALS
I MECANISMES DE REGULACIÓ
DELS ENZIMS**

**Albert Bosch
Ramon Vilella
Antoni Cortés**

**institut de ciències
de l'educació**

ice

Universitat de Barcelona

CIÈNCIES NATURALS
Actualització de continguts i didàctica / Recursos

ELS VIRUS

Albert Bosch

LA IMMUNOLOGIA

Ramon Vilella

**CARACTERÍSTIQUES GENERALS I
MECANISMES DE REGULACIÓ
DELS ENZIMS**

Antoni Cortés

ice
Institut de Ciències de l'Educació
Universitat de Barcelona

1990

© A. Bosch, R. Vilella, A. Cortés

© Publicacions de l'ICE
Universitat de Barcelona

Composició, maquetació i paginació en Macintosh: J. Vila

D.L.: L - 147 - 90

Imprès a Poblagràfic, S.A.

ÍNDIX

ELS VIRUS	5
<i>Albert Bosch</i>	
QUÈ SÓN ELS VIRUS?	7
La natura dels virus	7
Els virus i la resta de microorganismes	7
Són els virus organismes? Són els virus éssers vius?	9
PROPIETATS ESTRUCTURALS	9
El virió	9
El core	10
La càpsida	11
L'embolcall	12
LA MULTIPLICACIÓ VÍRICA	13
El cicle multiplicatiu	13
1. Adsorció	13
2. Penetració	13
3. Desencapsidació	14
4. Transcripció	14
5. Replicació	15
6. Traducció	15
7. Muntatge	15
8. Alliberació	15

II

TAXONOMIA VÍRICA	16
Criteris de classificació	16
Principals famílies de virus	17
BIBLIOGRAFIA	23
LA IMMUNOLOGIA	25
<i>Ramon Vilella</i>	
QUÈ ÉS LA IMMUNITAT	27
Tipus de reaccions defensives	28
Reaccions cel.lulars	28
Reaccions humorals	30
Evolució de les reaccions defensives	31
Cèl.lules del Sistema Immune	34
Limfòcits	34
Cèl.lules nul·les	36
Fagòcits	36
Cèl.lules presentadores d'antigen	37
El Sistema Limfoide	38
Les molècules del reconeixement	40
Anticossos	40
El receptor de la cèl.lula T	42
El Complex Principal d'Histocompatibilitat	43
Interaccions cel.lulars en la resposta immune	45
Cooperació cel.lular en la resposta immune	45
Limfocines i monocines	46
Regulació de la resposta immune	47

Mecanismes efectors de la immunitat	48
Tipus de resposta immune	48
Tolerància	49
BIBLIOGRAFIA	51

CARACTERÍSTIQUES GENERALS I MECANISMES DE REGULACIÓ DELS ENZIMS	53
<i>Antoni Cortés</i>	

ELS ENZIMS. CARACTERÍSTIQUES GENERALS I MECA- NISMES DE REGULACIÓ	55
Interaccions alostèriques	62
Modificacions covalents	72
BIBLIOGRAFIA	81

QUÈ SÓN ELS VIRUS

L'estructura dels virus

ELS VIRUS

Albert Bosch

Departament de Microbiologia
Universitat de Barcelona

El virus és un agent infeccios que es compon d'un àcid nucleic rodejat per una capa proteica. Els virus són capaços d'afectar tant a animals com a plantes. També poden provocar malalties importants en l'home, com ara el càncer, la grip, la diftèria i la poliomielitis. Els virus són els agents infecciosos més petits que es coneixen. Els virus són capaços de replicar-se i de transmetre's d'un individu a un altre.

El virus és un agent infeccios que es compon d'un àcid nucleic rodejat per una capa proteica. Els virus són capaços d'afectar tant a animals com a plantes. També poden provocar malalties importants en l'home, com ara el càncer, la grip, la diftèria i la poliomielitis. Els virus són els agents infecciosos més petits que es coneixen. Els virus són capaços de replicar-se i de transmetre's d'un individu a un altre.

El virus i la resta de microorganismes.

En el quadre 1 es troben resumida les principals diferències dels virus envers altres microorganismes.

QUÈ SÓN ELS VIRUS?

La natura dels virus.

És realment difícil tractar de definir els virus utilitzant els mateixos criteris que apliquem als animals o als vegetals. També resulta pràcticament impossible donar una definició satisfactòria dels virus en una frase o en un paràgraf. Tanmateix, podem intentar-ho, posant especial èmfasi en algunes de les característiques diferencials dels virus. Per exemple, podríem dir que un virus és una entitat estrictament paràsita intracel·lular constituïda, en els casos més senzills, només per un àcid nucleic i una coberta proteica. Així, fem palesa l'absoluta dependència d'un hoste, és a dir, ens trobem amb un paràsit intracel·lular obligat que utilitza la maquinària de l'individu que infecta. També es fa esment al fet de posseir un sol tipus d'àcid nucleic, és a dir, ADN o ARN, però mai els dos a la vegada. La definició abans esmentada també implica una gran senzillesa estructural: un virus pot ésser constituït solament per un àcid nucleic i una coberta protectora de naturalesa proteica. En alguns casos de major complexitat, apareix una segona capa protectora, aquesta vegada contenint lípids a més de proteïnes.

Els virus i la resta de microorganismes.

En el quadre 1 es troben ressenyats els trets diferencials dels virus enfront altres microorganismes.

Una de les característiques més conegudes dels virus és el seu tamany extraordinàriament petit. Tanmateix, els virus de la família Poxviridae tenen un tamany més gran que algunes clamídies. No és, per tant, el tamany el tret més diferencial dels virus. Per exemple, un virus mai es multiplica per fisió binària com ho fan la resta de microorganismes que creixen i, en un moment determinat, es divideixen i apareixen dues cèl·lules filles que s'han repartit el material cel·lular de la cèl·lula mare. Una altra particularitat és la manca de ribosomes, per això tenen l'obligatorietat d'utilitzar els que posseeix la cèl·lula hoste.

Encara que és bastant freqüent que es recepti un tractament amb antibiòtics per processos d'etiologia viral, els virus no són sensibles a aquest tipus de fàrmac, llevat d'algunes escassíssimes excepcions, com en el cas de la rifampicina que inhibeix algunes polimerasses víriques. La resta dels microorganismes és, en major o menor grau, sensible a l'acció d'un o altre tipus d'antibiòtics.

S'anomena interferó un grup de proteïnes codificades per àcids nuclèics no propis que, entre altres propietats, tenen la d'interferir en la infecció d'un virus. Contràriament a l'opinió generalitzada, no solament els virus són capaços d'induir la síntesi d'interferó. Aquesta propietat la comparteixen amb les clamídies i, encara que en menor grau, també amb les rickettsies.

Són els virus organismes? Són els virus éssers vius?

L'any 1936, Stanley comprovà que els virus purificats a partir de cèl.lules infectades tenen un tamany uniforme, una composició química determinada i que fins i tot poden cristal.litzar. La naturalesa essencialment molecular dels virus ha fet que es dubti de la seva condició d'organismes, sobretot tenint en compte que mai poden tenir una vida independent. També es diu que un virus no és un ésser viu. Naturalment, tant en un cas com en l'altre, tot depèn de què entenem per organisme i de quina forma es defineix la vida. Un organisme és un sistema independent d'estructures i de funcions integrades i interrelacionades que poden créixer i dividir-se. La vida pot definir-se com a la capacitat de manifestar-se o també com a l'estat de cèl.lules i organismes. Un protiste té totes les característiques típiques d'un organisme i té vida. Un virus difícilment es pot considerar un organisme. Això no obstant, si cataloguem d'ésser viu aquell que és capaç de mantenir una configuració específica després de moltes generacions, podem afirmar que els virus són éssers vius.

PROPIETATS ESTRUCTURALS

El viriό.

La partícula vírica extracel.lular s'anomena viriό. Els virus són totalment inertes fins que entren en

contacte amb la cèl.lula que infecten. Mitjançant l'observació en el microscopi electrònic es poden diferenciar diversos tipus morfològics:

Alguns virus semblen petits cristalls, tenen una carcassa proteica icosaèdrica que és la càpsida. Diem que són virus icosaèdrics o, millor, virus amb càpsida icosaèdrica.

Altres virus semblen bastons llargs. L'àcid nucleic està envoltat d'una càpsida cilíndrica que té simetria helicoïdal. Anàlogament al cas anterior fem referència a virus helicoïdals.

Virions més complicats contenen lípids. La càpsida, tant si és icosaèdrica com si és helicoïdal, està envoltada d'un embolcall membranós que conté lípids. En aquest cas parlem de virus embolcallats.

Finalment, tenim virus amb estructura encara més complexa que presenten diferents capes protectores al voltant de l'àcid nucleic. No es diferencia una càpsida ben definida. Tenen una morfologia més pròxima als organismes cel.lulars. Alguns bacteriòfags i una família de virus animals com els Poxviridae tenen aquestes característiques.

El core.

El core o nucli està constituït per un àcid nucleic acompanyat generalment d'un esquelet proteic. L'àcid nucleic és ADN o ARN, essent, en aquest últim cas, un fenomen únic a la natura. A més, en tot cas, pot

tractar-se d'àcids nucleics de cadena senzilla o de cadena doble. D'altra banda, es poden observar virus que presenten molècules d'àcid nucleic segmentades.

La quantitat d'informació que porten els àcids nucleics virals oscil·la de dos o tres gens fins a centenars, amb la qual cosa s'aprecia que en qualsevol cas aquesta quantitat d'informació és prou limitada. Totes les famílies de virus són haploides quant a la seva constitució genètica, exceptuant els retrovirus que són diploides.

La càpsida.

La càpsida constitueix quantitativament la major part del viriò. Està especificada totalment per gens vírics i contribueix a l'aparença típica dels virus.

La principal funció de la càpsida és protectora: dona protecció a l'àcid nucleic enfront de l'acció de les nucleasses. En el cas dels virus nus té, a més, la funció de reconèixer unes molècules receptores sobre la superfície de la cèl·lula hoste i facilitar d'aquesta manera l'adsorció del virus sobre ella mateixa.

Una de les característiques de la càpsida és tenir l'aparença d'autèntics cristalls. Això és perquè hi ha pocs gens destinats a codificar la seva síntesi. L'estratègia seguida pel virus consisteix en codificar la síntesi d'unes unitats senzilles i, posteriorment, codificar la síntesi de moltes repeticions d'aquestes unitats.

Podem diferenciar tres nivells d'organització en la càpsida viral. Unes unitats químiques que estan constituïdes per polipèptids senzills, unes unitats estructurals que són unions de polipèptids i s'anomenen protòmers, i, finalment, unes unitats morfològiques que són les que s'aprecien en les observacions en el microscopi electrònic, i són els capsòmers. En aquest últim cas, ens referim a pentons o a hexons segons si estan formats per grups de cinc o sis protòmers respectivament.

Quan els capsòmers es projecten a l'exterior amb l'aparença de cargols s'anomenen peplòmers. Totes aquestes unitats de la càpsida es troben unides entre sí per enllaços no covalents.

L'embolcall.

Per sobre de la càpsida pot existir una coberta suplementària que és l'embolcall. Aquest està constituït per diverses capes lipídiques i proteiques. Les proteïnes estan codificades exclusivament per gens vírics i poden ser combinades amb glúcids i, en moltes ocasions, formen projeccions en forma d'espícules. Estan disposades de manera alternada amb lípids. Tant els lípids com els sucres de l'embolcall són adquirits pel virus en el seu procés de sortida de la cèl.lula hoste, per la qual cosa pot afirmar-se que tenen un origen cel.lular. Els virus que presenten embolcall lipídic perden la seva capacitat infecciosa després d'un tractament amb éter, ja que l'embolcall és destruït per l'acció de dissolvents polars i, d'aquesta manera, el virus no pot reconèixer els receptors cel.lulars.

Les proteïnes de l'embolcall i les de la càpsida es troben unides entre sí per enllaços no covalents i de la seva rigidesa depèn que la forma i aparença dels virus sigui o no constant.

LA MULTIPLICACIÓ VÍRICA

El cicle multiplicatiu.

Els virus deixen de comportar-se com a partícules inertes en el moment que inicien la infecció d'una cèl.lula hoste. En el cicle multiplicatiu d'un virus hi ha una sèrie d'estadis ben diferenciats que, això no obstant, poden presentar-se de forma cavalcada.

1. *Adsorció.* El primer estadi del cicle suposa un reconeixement dels receptors situats sobre la superfície de la cèl.lula a infectar per part de les molècules de la càpsida o de l'embolcall, segons es tracti de virus nus o embolcallats. Aquest fenomen és el causant de l'elevada especificitat que existeix entre els virus i els seus respectius hostes. Els virus de vegetals no tenen receptors en les cèl.lules que infecten i possiblement és per això que no presenten especificitat i necessiten vectors, com pot ser un insecte, per realitzar la infecció.

2. *Penetració.* Els virus embolcallats sofreixen un procés d'autèntica fusió de l'embolcall lipídic amb la membrana cel.lular, la qual cosa facilita l'entrada del virus a l'interior de la cavitat citoplasmàtica. Els

virus nus indueixen la cèl.lula hoste a fagocitar el virió. En el cas dels virus que infecten bacteris, només penetra l'àcid nucleic que és injectat a l'interior del citoplasma.

3. Desencapsidació. Perquè l'àcid nucleic víric tingui accés a la maquinària cel.lular de l'hoste, és necessari que s'alliberi de la càpsida que en aquests moments és l'única coberta que li queda. Ja s'ha esmentat que en el cas dels virus bacterians pot afirmar-se que la desencapsidació es realitza en el mateix moment que la penetració, ja que solament l'àcid nucleic entra a la cèl.lula hoste. En el moment de la desencapsidació l'àcid nucleic víric és susceptible a l'acció de les nucleasses.

Existeixen grans diferències en la desencapsidació segons la família de virus de què es tracti. Així, els Picornaviridae pràcticament desencapsiden abans de penetrar, de forma que la major part de la càpsida queda en l'exterior de la cèl.lula infectada, mentre que els Reoviridae no arriben mai a perdre totalment la càpsida.

4. Transcripció. Hi ha dues transcripcions en el temps. Es parla d'una transcripció primària, o avançada (early), que és la que té lloc abans de la replicació de l'àcid nucleic viral. La seva finalitat és la de transcriure la informació per codificar la síntesi d'enzims essencials, per l'esmentada replicació de l'àcid nucleic del virus. La transcripció secundària o tardana (late) donarà lloc a síntesi de proteïnes estructurals com poden ser les que formen la càpsida del virus.

5. Replicació. Una vegada s'ha realitzat la transcripció primària, s'inicia la replicació de l'àcid nucleic viral. Pràcticament sempre es realitza segons el model semiconservatiu proposat per Watson i Crick. L'única excepció la constitueixen els membres de la família Reoviridae que segueixen un model conservatiu i asimètric.

És necessari recalcar que els virus amb ARN com a material genètic, estan obligats a portar les corresponents polimerases ja que mai es troben en les cèl.lules hostes. Una altra particularitat és que alguns virus repliquen en el citoplasma cel.lular i d'altres en el nucli.

6. Traducció. A l'igual que abans, també es dona una traducció primerenca i una traducció tardana que corresponen als productes genètics de transcripcions primàries i tardanes respectivament. Els ribosomes cel.lulars són utilitzats per la síntesi de proteïnes virals, seguint models monocistrònics o policistrònics, dependent de la família de virus de què es tracti.

7. Muntatge. Un cop s'han sintetitzat les proteïnes estructurals del virus, té lloc el muntatge de les mateixes envoltant als àcids nucleics. Això es realitza en determinats punts del citoplasma cel.lular que arriben a convertir-se en autèntiques factories virals i, en el cas de virus vegetals, provoquen distorsions a la cèl.lula per l'enorme cúmul de material víric.

8. Alliberació. L'última etapa del cicle multiplicatiu d'un virus és la sortida de la progènie viral a l'exterior de la cèl.lula hoste. Els virus embolcallats tenen a més,

un procés de gemmació (budding), mitjançant el qual obtenen els lípids i els glúcids que formen part de l'embolcall extern del virus. Aquests productes d'origen cel.lular es troben, tanmateix, modificats. A partir d'una sola partícula vírica original poden aparèixer al voltant de mil noves partícules que són alliberades de la cèl.lula hoste.

TAXONOMIA VÍRICA

Criteris de classificació.

Per classificar els virus es fa referència, en primer lloc, al tipus d'hoste que infecten, és a dir, si l'hoste en qüestió és un animal, un vegetal o bé un bacteri. D'aquesta forma tenim virus animals, virus vegetals i virus bacterians o bacteriòfags.

Posteriorment, es comprova si es tracta d'un virus embolcallat o nu, la qual cosa s'acostuma a realitzar mitjançant un tractament amb éter o qualsevol dissolvent polar, i la comprovació posterior del manteniment de la infectivitat per part del virus. Normalment el pas següent és investigar la naturalesa de l'àcid nucleic viral. És a dir, si es tracta d'ADN o ARN, si és de cadena senzilla o doble, i si és sencer o segmentat. A vegades, s'investiga la presència de determinades proteïnes específiques, com alguns enzims exclusius d'algun grup de virus, tal és el cas de la transcriptassa inversa.

Principals famílies de virus.

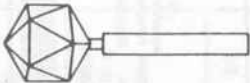
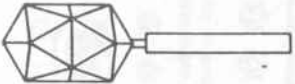

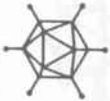
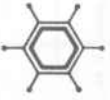





En els quadres 2, 3, 4 i 5 es poden observar les principals famílies de virus bacterians, virus d'invertebrats, virus de plantes i virus de vertebrats, respectivament, segons la darrera classificació existent de virus (Estrasburg, 1981).

QUADRE 1. CARACTERÍSTIQUES DIFERENCIALS DE VIRUS I ALTRES MICROORGANISMES.



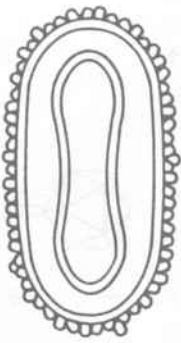


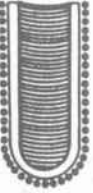


CARACTERÍSTICA	BAC	MIC	RIC	CLA	VIR
Creixement en un medi lliure de cèl.lules	+	+	-	-	-
Divisió binària	+	+	+	+	-
Presència d'ADN i ARN	+	+	+	+	-
Presència de ribosomes	+	+	+	+	-
Parasitisme intracel.lular obligat	-	-	-	+	+
Sensibilitat antibiòtics	+	+	+	+	-
Inducció d'interferó	-	-	+-	+	+

BAC: Bacteris; MIC: Micoplasmes; RIC: Rickettsies;
CLA: Clamídies; VIR: Virus.

QUADRE 2. FAMÍLIES DE VIRUS BACTERIANS.




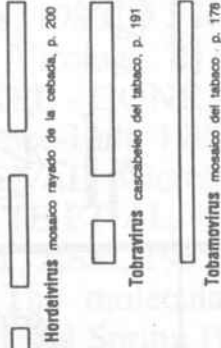
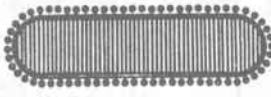
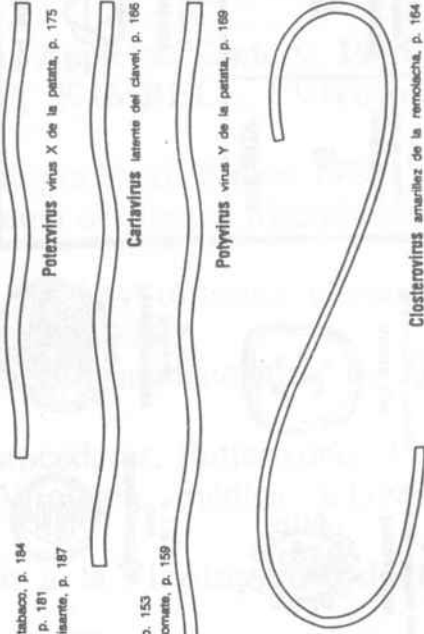


DESNUDOS		CON ENVOLTURA	
<p>ADN bc</p>  <p>Myoviridae cabeza esfèrica P2, p. 75</p>  <p>Siphoviridae A, p. 76</p>  <p>Podoviridae T7, p. 76</p>		<p>ADN bc</p> <p>Vista superficial</p>  <p>Tectiviridae PRD1, p. 72</p> <p>Secció</p>  <p>Secció</p>  <p>Corticoviridae PM2, p. 73</p>	
<p>ADN mc</p>  <p>Inoviridae Tipo MV-L1, p. 87</p>  <p>Inoviridae Tipo I3 p. 86</p>		<p>ARN mc</p>  <p>Leviviridae MS2, p. 151</p>	
		<p>ARN bc</p>  <p>Cystoviridae φ 6, p. 88</p> <p>100 nm</p>	

QUADRE 3. FAMÍLIES DE VIRUS D'INVERTEBRATS.



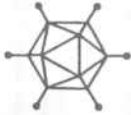
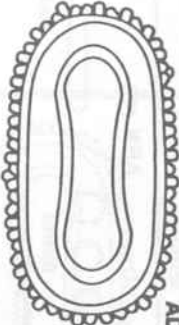


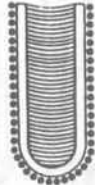




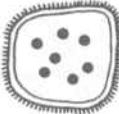



DESNUDOS		CON ENVOLTURA
<p>ADN bc</p>  <p>Iridoviridae Virus iridocèntric de Toxala p. 61</p>	<p>ARN bc</p>  <p>Rosoviridae Oribvirus de la llengua azul p. 69</p>	<p>ADN bc</p>  <p>Paxiviridae Eimonoovirus de la Melidornia p. 44</p>
<p>ADN mc</p>  <p>Parvoviridae Oribonirus de Galiena p. 79</p>	<p>ARN mc</p>  <p>Nodaviridae Virus de Nodanura p. 198</p> <p>Picomaviridae Virus de la pellada del gryo p. 144</p>	<p>ARN mc</p>  <p>Rhabdoviridae L'ysavirus de la rabia p. 120</p>  <p>Bunyviridae Virus Bunyamwera p. 128</p>  <p>Togaviridae Ailivirus Sindbis p. 108</p>

100 nm

QUADRE 4. FAMÍLIES DE VIRUS DE PLANTES.

CON ENVOLTURA	
<p>ADN bc</p>  <p>Caulimovirus mosaico de la coliflor p. 70</p>	<p>DESKUDOS</p>  <p>Grupo del mosaico de la alfalfa, p. 139</p> <p>Illarvirus estirido del tabaco, p. 187</p> <p>Cucumovirus mosaico del pepino, p. 183</p> <p>Bromovirus mosaico del bromo, p. 195</p>
<p>ARN bc</p>  <p>Reoviridae virus tumoral de las heridas p. 89</p>	<p>ARN mc</p>  <p>Hordeivirus mosaico rayado de la cebada, p. 200</p> <p>Tobravivirus cascabeleo del tabaco, p. 191</p> <p>Tobamovirus mosaico del tabaco, p. 178</p>
<p>ARN mc</p>  <p>Rabdovirus Amarilliz necrótica de la lechuga p. 124</p>	<p>ARN mc</p>  <p>Potexvirus virus X de la patata, p. 175</p> <p>Carlavirus latente del clavil, p. 166</p> <p>Potyvirus virus Y de la patata, p. 169</p> <p>Closterovirus amarilliz de la remolacha, p. 164</p>
<p>ADN mc</p>  <p>Geminivirus estirido del maíz p. 83</p>	<p>ADN mc</p>  <p>Manchas broncoasidas del tomate p. 137</p> <p>100 nm</p>

QUADRE 5. FAMÍLIES DE VIRUS DE VERTEBRATS.

DESNUDOS		CON ENVOLTURA	
<p>ADN bc</p> <p>Iridoviridae Tritula indecomite p. 61</p>  <p>Papovaviridae Papilloma de Siroca p. 68</p>  <p>Adenoviridae Adenovirus humano p. 65</p> 		<p>ADN bc</p>  <p>Poxviridae Virus vaccinae p. 44</p> <p>ARN mc</p> <p>Paramyxoviridae Sarampoen p. 113</p>  <p>Orthomyxoviridae Gripe p. 116</p>  <p>Rhabdoviridae Estatonitis vesicular. p. 120</p>  <p>Reoviridae Sarcina de Ross p. 136</p> 	
<p>ARN mc</p> <p>Caliciviridae Estatonitis vesicular. del carco p. 146</p>  <p>Picomaviridae Polo numero 1 p. 144</p>  <p>Parvoviridae Rata de Kham p. 75</p> 		<p>ARN mc</p> <p>Arenaviridae Cofonemengitis linfoctura p. 133</p>  <p>Coronaviridae Bronquitis infecciosa aviar p. 111</p>  <p>Bunyaviridae Bunyavirus p. 126</p>  <p>Togaviridae Sindbis p. 106</p> 	

100 nm

BIBLIOGRAFIA

- FENNER ET AL. The biology of animal viruses. 2^a ed., Academic Press, 1979.
- LURIA ET AL. General Virology. 3^a ed., John Wiley & Sons, 1978.
- WHITE & FENNER. Medical Virology. Academic Press, 1986.
- JOKLIK. Virology. 2^a ed., Appleton-Century, 1985.
- FRAENKEL - CONRAT, KIMBELL. Virology. Prentice-Hall, 1982.
- DAVIS ET AL. Microbiologia 3^a ed., Salvat 1980.
- LENNETTE ET AL. Manual of clinical Microbiology. 4^a ed., ASM, 1985.
- TOOZE. The molecular biology of tumor viruses. 2^a ed., Cold Spring Harbor, 1979.
- MATTHEWS. Clasificación y nomenclatura de los virus. SEM, 1984.
- HOSKINS. Virological procedures. Butterworks, 1967.
- TIMBURY. Notas de Virología médica. EUNSA, 1978.
- PRIMROSE. Introducción a la Virología moderna. Blume, 1974.
- KURSTAK & KURSTAK. Comparative diagnoses of viral diseases. Academic Press, 1974.
- MARAMOROSH & KOPROWSKI. Methods in Virology. Academic Press, 1971.

QUÈ ÉS LA IMMUNOLÒGIA ?

El sistema immunitari és el que defensa la nostra salut i ha desenvolupat un arsenal de mecanismes per defensar-nos de les agressions dels agents patògens. Aquesta defensa és molt sofisticada i complexa i ha desenvolupat un arsenal de mecanismes per defensar-nos de les agressions dels agents patògens.

LA IMMUNOLOGIA

Ramon Vilella
Servei d'Immunologia
Hospital Clínic de Barcelona

Una bona lectura sobre immunologia és imprescindible per a tots els que treballen en el camp de la salut humana.

El desenvolupament de les tècniques de diagnòstic i de tractament de les malalties immunològiques ha permès aconseguir importants avanços en el diagnòstic i en el tractament de les malalties immunològiques.

La immunologia és una disciplina científica que estudia els mecanismes de defensa de l'organisme i les malalties immunològiques.

El desenvolupament de les tècniques de diagnòstic i de tractament de les malalties immunològiques ha permès aconseguir importants avanços en el diagnòstic i en el tractament de les malalties immunològiques.

La immunologia és una disciplina científica que estudia els mecanismes de defensa de l'organisme i les malalties immunològiques.

Les recerques en immunologia han permès aconseguir importants avanços en el diagnòstic i en el tractament de les malalties immunològiques.

QUÈ ÉS LA IMMUNITAT ?

Els organismes, per tal de defensar la seva integritat, han desenvolupat tot un seguit de mecanismes de defensa, alguns molt evidents com és que un animal corri, lluiti o s'amagui davant d'un perill, d'altres més subtils, ja que tenen lloc dins de l'organisme. És precisament d'aquests tipus "intraorgànics" de mecanisme de defensa que parlarem a continuació.

Dins d'una reacció intraorgànica de defensa hi ha 3 fases: *reconeixement*, *processament* i *resposta*.

El *reconeixement* és una interacció no covalent entre dues molècules, una que porta una determinada informació (senyal) i una altra que és capaç de rebre aquesta informació (receptor).

Mitjançant el reconeixement un organisme pot discriminar entre el que li és propi i l'estrany. La part més petita del món estrany capaç de provocar una reacció defensiva s'anomena *antigen (Ag)*.

El *processament* és la transmissió del senyal rebut des del receptor fins altres molècules i l'anàlisi de la informació del senyal per aquestes molècules.

La *resposta* és l'actuació de l'individu per eliminar l'amenaça o agressió del no propi.

Les reaccions defensives poden tenir diversos graus d'especificitat. Aquesta especificitat es defineix com a

la capacitat de discriminar entre diverses molècules no pròpies. Aquesta discriminació té lloc durant la fase de reconeixement. Un receptor capaç de reconèixer només unes poques molècules s'anomena "altament específic", mentre que un que sigui capaç de reconèixer moltes molècules s'anomena inespecífic.

En algunes reaccions defensives la resposta es produeix a la mateixa velocitat, independentment del nombre de cops que sigui estimulada. En d'altres, la segona resposta (i successives) és més ràpida i més vigorosa que la primera, hom diu que és "anamnèsica" i les reaccions que tenen aquesta habilitat es diu que tenen memòria.

Tipus de reaccions defensives.

La majoria dels éssers vius tenen mecanismes de defensa, fins i tot les plantes poden defensar-se dels patògens (mitjançant substàncies fungitòxiques), si bé els sistemes defensius més ben desenvolupats es troben en els animals i es poden classificar en *cel.lulars* i *humorals*.

Reaccions cel.lulars.

Les reaccions cel.lulars podem dividir-les en no agressives i agressives. Les no agressives són les més primitives i l'única expressió que donen és la manca d'establiment de contactes entre les cèl.lules que interactuen quan no provenen de la mateixa espècie. Exemples d'aquestes reaccions els trobem en els

Protozous, els Porífers i els Cnidaris. En totes tres fila, per experimentació, s'ha pogut comprovar que troços d'animals de la mateixa espècie són capaços de fusionar-se, mentre que troços provinents d'espècies diferents no.

Les reaccions agressives les podem subdividir en: hiperplàsiques, de fagocitosis i citotòxiques.

Hiperplàsiques: es donen en els corals (*Hydractinia echinata*) quan es posen estolons de coral en un vas amb aigua de mar, s'enganxen al fons i creixen com a noves colònies. Si les colònies provenen de la mateixa espècie es fusionen, sinó, unes eliminen les altres per sobrecreixement.

Fagocitosis: es parla de pinocitosis, fagocitosis o encapsulament segons el tamany de la partícula ingerida. Són reaccions molt esteses dins el món animal.

Citotòxiques: aquestes reaccions estan dirigides fonamentalment contra els paràsits intracel·lulars (sobretot virus). Quan un virus envaeix una cèl·lula el millor és eliminar-la abans que el virus es reproduïxi dins d'ella. També es produeixen reaccions citotòxiques quan s'enfronten cèl·lules d'individus diferents, direm que una reacció citotòxica és al·logènica quan enfronta cèl·lules provinents d'individus diferents, però de la mateixa espècie; direm que és xenogènica, quan enfronta cèl·lules provinents d'individus de diferents espècies.

Hi ha tres tipus de reaccions citotòxiques: tipus platelmint (la més primitiva), tipus anèlid (intermitja) i tipus murí (la més evolucionada).

En la de *tipus platelmint* s'observa un rebuig xenogènic molt lent i sense memòria. En el tipus anèlid s'observa un rebuig al·logènic (30-150 dies), els segons trasplants són rebutjats més ràpidament (*memòria*) si provenen del mateix individu amb el que es va fer el primer i normalment (30-150 dies) si provenen d'un altre individu (*especificitat*), malgrat tot, la memòria i l'especificitat són expressades amb pobresa i sovint fallen (de vegades no es reconeixen els trasplantaments al·logènics i la resposta secundària és també poc vigorosa i lenta).

En el *tipus murí* tots els trasplantaments no sin-gènics són rebutjats i aquests rebuig és vigorós, la memòria s'expressa intensament i la especificitat és alta.

Reaccions humorals.

Els teixits dels organismes multicel·lulars es troben banyats pels líquids corporals. Una de les funcions d'aquests líquids és la de disseminar els elements defensius, ja siguin cel·lulars o humorals.

Les reaccions humorals es poden dividir en no induïbles i induïbles. Els factors humorals no induïbles són secretats en els líquids corporals a una velocitat determinada, independentment de la presència o absència d'antigens, com a exemples tenim la aglutinina del cargol *Helix pomatia* que utilitzen per aglutinar i

eliminar bacteris i el complement humà format per un conjunt de proteïnes que en determinades condicions poden reaccionar per formar un complex supra-molecular capaç de lisar cèl.lules.

Els factors humorals induïbles són absents o bé presents en quantitats molt petites abans de l'estimulació antigènica. Quan l'Ag penetra en l'organisme provoca un ràpid augment en la producció d'aquests factors, al finalitzar l'estímul antigènic es produeix una desaparició gradual d'aquests factors. La bactericidina de la llagosta i els anticossos dels vertebrats són exemples d'aquest tipus de factors. La bactericidina apareix quan la llagosta és infectada per algun bacteri, augmenta el seu nivell i es manté elevat fins al final de la infecció, en una segona infecció pel mateix o per un altre bacteri, augmenta ràpidament (té doncs memòria malgrat que poca especificitat). En els mamífers, s'assoleix el màxim nivell de memòria i especificitat en els anticossos, com veurem més endavant).

Evolució de les reaccions defensives.

Ja que les reaccions defensives constitueixen un dels trets característics de la matèria viva probablement van aparèixer molt aviat o al mateix temps que ella. Al principi aquestes reaccions defensives estaven lligades a altres funcions orgàniques, com el processament dels aliments o el reconeixement cèl.lula a cèl.lula durant la diferenciació embrionària, més endavant, quan les necessitats defensives van augmentar, van aparèixer les primeres cèl.lules especialitzades, que es passejaven per

tot l'organisme a la recerca de substàncies estranyes, que o bé fagocitaven, o bé neutralitzaven mitjançant substàncies solubles. Quan va aparèixer el sistema circulatori, les cèl.lules defensives s'hi van associar per aconseguir arribar més bé a tot arreu. Després, es produí una més gran especialització, en primer lloc una divisió del treball mitjançant la generació de diferents tipus cel.lulars (reconeixement, transferència de senyals, mecanismes efectors), col.laboradores, efectores citotòxiques, secretores d'immunoglobulines. En segon lloc, les cèl.lules implicades en el reconeixement van incrementar progressivament l'especificitat dels seus receptors i la seva capacitat de memòria.

Els organismes més avançats no van descartar els mecanismes de defensa menys sofisticats (fagocitosis). Els macròfags, a més de la seva capacitat fagocítica, secreten factors solubles no específics: complement.

Mentre que els macròfags poden atacar qualsevol substància estranya, els limfòcits són especialistes en atacar un sol tipus cel.lular: les cèl.lules pròpies alterades. Això implica que les han de reconèixer com a pròpies (això ho fan mitjançant les molècules codificades pel Complex Principal d'Histocompatibilitat CPH) i també com a estranyes (virus, alteracions de la membrana).

Els limfòcits, a més de la seva capacitat d'atacar cèl.lules, poden secretar factors solubles, bé reguladors (limfocines), bé efectors (immunoglobulines).

Els sistemes defensius, per tant, van adquirir progressivament més sofisticacions i gradualment van

canviar l'estratègia defensiva. Quan el sistema era relativament inespecífic, seguia el principi de "sobreviure l'individu més adaptat", és a dir, hi havia un joc de gens que codificaven per receptors capaços de reconèixer alguns patògens i de disparar reaccions defensives contra ells, així quan apareixia un nou patògen la majoria dels individus morien, però dins de cada població hi havia uns pocs individus amb receptors que havien estat modificats per mutació, que eren capaços de reconèixer el nou patògen, aquests individus serien els que sobreviurien i constituïrien el nou stock que permetria derivar envers una nova població resistent.

Aquest tipus d'estratègia és vàlida per espècies amb una taxa de reproducció molt elevada i amb un període de vida curt. Les altres espècies amb una taxa de reproducció més petita i amb un període de vida més llarg, van desenvolupar una nova estratègia en la que el procés de selecció del més adaptat es desplaçà des del nivell poblacional fins el nivell cel.lular dins d'un individu. Cada individu té unes cèl.lules (limfòcits) que poden dividir-se ràpidament i poden, en cada divisió generar canvis en els gens que codifiquen pels receptors, d'aquesta manera cada individu genera una població limfocitària amb múltiples variants de receptors (GOD: "generation of diversity") que li permetran contrarrestar un gran ventall d'antigens. Aquesta nova estratègia necessita d'un gran nombre de cèl.lules, això fa que aquestes s'organitzin en un sistema limfoide distribuït per tot l'organisme. Així van aparèixer els òrgans limfoides.

En els òrgans limfoides primaris es produeix el desenvolupament dels dos grans llinatges limfocitaris: els limfòcits T que s'ocupen de la regulació i de la citotoxicitat en el timus i els limfòcits B que s'ocupen de la secreció de les immunoglobulines, en la Bursa de Fabricius (aus) o en el seu anàleg, el moll d'os (mamífers).

Cèl.lules del Sistema Immune.

Limfòcits.

Constitueixen aproximadament el 20% del total dels leucòcits. Els limfòcits es divideixen en 2 tipus principals els T i els B que no es poden distingir l'un de l'altre per microscòpia òptica convencional (aquestes dues poblacions cel.lulars, així com d'altres poblacions i subpoblacions de leucòcits, poden distingir-se per immunofluorescència mitjançant la utilització d'anticossos monoclonals que reconeixen glicoproteïnes característiques a la superfície d'aquestes cèl.lules).

Els limfòcits T es desenvolupen en el timus i porten a terme diferents funcions: ajuden als B a fabricar anticossos, maten les cèl.lules infectades per virus i estimulen l'activitat microbicida i citotòxica d'altres cèl.lules efectores (macròfags). Per poder portar a terme aquestes funcions és necessària la transmissió de senyals entre les diverses cèl.lules, bé per contacte cel.lular directe, bé a través de factors solubles.

Els limfòcits B es desenvolupen en el moll d'os o en el fetge fetal i poden diferenciar-se de cèl.lules plasmàtiques productores d'anticossos.

Cada limfòcit té un receptor de superfície capaç de reconèixer un determinat tipus d'antigen. Malgrat que cada limfòcit porta un sol tipus de receptor i, per tant, pot reconèixer un sol tipus d'antigen, els diferents limfòcits tenen diferents receptors i, per tant, la població total de limfòcits d'un individu és capaç de reconèixer un gran nombre d'antigens diferents. Els receptors antigènics són generats durant el desenvolupament dels limfòcits en els òrgans limfoides primaris. Els receptors utilitzats pels limfòcits T i B són diferents: els dels B són les immunoglobulines (Ig) de superfície, els dels T tenen una estructura diferent i són codificats per uns gens distints dels de les immunoglobulines. Els B poden reconèixer l'Ag nadiu, lliure o a la superfície d'altres cèl.lules; en canvi els T només poden reconèixer els fragments resultants del processament de l'Ag que es trobin associats a molècules codificades pel CPH, sobre les cèl.lules presentadores (macròfags, B i d'altres).

La base de la resposta immune adaptativa és la de la selecció clonal: quan un Ag entra dins l'organisme s'uneix exclusivament a aquells limfòcits que portin receptors adequats per poder-lo reconèixer, per tant només respondran aquelles cèl.lules que hagin estat estimulades per la unió de l'Ag; la resposta es posa de manifest per la proliferació i diferenciació de les cèl.lules que responen. Durant aquesta resposta es produeix l'alliberament de mediadors solubles com: limfocines, monocines, interleucines i anticossos.

Quan el Sistema Immune (SI) troba per primera vegada un antigen, hi han relativament pocs limfòcits amb el corresponent receptor capaços de dur a terme una resposta immune. Però, durant la primera resposta la població que respon pateix una expansió i un desenvolupament. Quan l'Ag és trobat per segona vegada hi ha una població cel.lular molt més gran capaç de reconèixer-lo i, a més, es troba més diferenciada. Això explica que la resposta secundària és més ràpida i efectiva que la primària. Els limfòcits estimulats per l'Ag poden o bé diferenciar-se completament de cèl.lules efectores o bé passar a formar part del pool expandit (cèl.lules memòria) que intervindrà en la resposta secundària al mateix antigen.

Cèl.lules nul.les.

Hi ha limfòcits que no poden catalogar-se ni com T ni com B, hom els anomena cèl.lules nul.les o cèl.lules no T no B o cèl.lules de la tercera població. Quan són madures aquestes cèl.lules tenen una morfologia de limfòcits grans granulars. Característicament expressen receptors Fc per les Ig G i són molt efectives en l'activitat de cèl.lules "killer" (lisis de cèl.lules recobertes per anticossos) i "natural killer" (lisis de cèl.lules tumorals).

Fagòcits.

Inclueixen els neutròfils, els monòcits i les diverses cèl.lules del sistema reticuloendotelial dispersades per tot l'organisme (macròfags, cèl.lules de Kupffer del

fetge, cèl.lules microglials del cervell i cèl.lules mesangials del ronyó, entre d'altres). Gràcies a la presència de receptors per els components C3 del Complement i Fc de les Ig G, poden fagocitar més fàcilment el material que hagi estat opsonitzat per aquestes molècules. Els neutròfils només viuen 2 ó 3 dies mentre que els monòcits són cèl.lules de vida més llarga, que esdevenen macròfags al passar als teixits. Els macròfags són cèl.lules metabòlicament més actives, més fagocítiques i tenen una bateria d'enzims lisosòmics més gran que no pas els monòcits.

Cèl.lules presentadores d'antigen.

Les cèl.lules capaces de presentar l'Ag als limfòcits en forma immunogènica, s'anomenen col·lectivament cèl.lules presentadores d'Ag (CPA). Inclouen diverses cèl.lules derivades del moll d'os: cèl.lules de Langerhans de la pell que es traslladen als nòduls limfàtics on esdevenen cèl.lules dendrítiques de la zona T, les cèl.lules fol·liculars dendrítiques, els macròfags marginals i els monòcits. En circumstàncies especials altres tipus cel.lulars com per exemple endotelials, endocrins i epitelials poden ser induïts a actuar com a cèl.lules presentadores. Recentment s'ha demostrat que els limfòcits B també poden actuar com a cèl.lules presentadores. De la forma com sigui presentat un determinat antigen dependrà, en certa manera, el tipus de resposta immune resultant.

El sistema limfoide.

Les cèl.lules progenitores limfoïdes comencen a colonitzar el timus cap al final de la vida fetal, no ho fan d'una manera continuada, sinó en un seguit d'onades. Aquestes cèl.lules pre-T no tenen els marcadors (glicoproteïnes de superfície) típics dels limfòcits T. La majoria de timòcits es troben a la zona cortical on hi ha una considerable proliferació cel.lular. Les cèl.lules aparentment més madures es troben a la zona medul.lar que és molt menys poblada, això pot estar relacionat amb l'abundant mortalitat que se sap que es produeix dins del timus.

Durant la diferenciació intratímica dels limfòcits T té lloc l'adquisició del seu receptor específic per l'Ag, una considerable mortalitat cel.lular (que es suposa relacionada amb la pèrdua de les clones reactives contra el propi, o bé de les clones sense receptors funcionals) i la diferenciació cap a les diverses subpoblacions T.

En els mamífers es suposa que la diferenciació completa dels limfòcits B té lloc dins del moll de l'os. En primer lloc, els B adquireixen les Ig M de superfície que actuen com a els seus receptors específics, més endavant adquireixen les Ig G, és a dir, canvien de classe d'Ig però no pas d'especificitat, quan finalment els limfòcits B esdevenen cèl.lules plasmàtiques perden les Igs de superfície.

En els mamífers el timus i el moll d'os constitueixen els òrgans limfoïdes primaris, en ells es produeix la seva diferenciació, que és independent de l'Ag.

En els òrgans limfoides secundaris (melsa, amígdales, apèndix, plaques de Peyer i ganglis limfàtics), és on té lloc la maduració dels limfòcits dependent de l'Ag, que donarà lloc a la resposta immune.

Els limfòcits recirculen contínuament a través dels teixits, òrgans limfoides secundaris i de la sang. Els limfòcits emigren des de la sang als teixits a través d'unes regions especialitzades de l'endoteli vascular, les vèdules d'endoteli alt (VEH). També hi ha VEH en els nòduls limfàtics i en els òrgans limfoides secundaris, de tal manera que un limfòcit pot assolir un nòdul limfàtic per dues vies: pels limfàtics aferents o bé per emigració directa des de la sang a través de les VEH.

Els nòduls limfàtics són més abundants al coll, aixelles, engonals, mesenteri i a cada costat de la columna vertebral. La majoria dels nòduls limfàtics del tronc i dels membres inferiors desenvoquen en el conducte toràcic dret i des d'allí assoleixen la circulació sanguínia. L'organització del sistema limfàtic fa que l'Ag sigui dirigit als nòduls limfàtics regionals, un cop allí es produeixen modificacions en el tràfic a través del nòdul limfàtic, les reaccions immunològiques dins del nòdul fan que determinades àrees s'expandeixin. De manera que una de les funcions del sistema limfàtic és la de portar els antigens a prendre contacte amb els limfòcits que els poden reconèixer.

Les molècules del reconeixement:

Anticossos.

Els anticossos o les immunoglobulines (Igs), són les molècules de reconeixement generades pels limfòcits B, poden ser de membrana o lliures. Les de membrana actuen com els receptors específics dels limfòcits B i són proteïnes de membrana de tipus integral. Cada limfòcit B pot produir i secretar Igs amb especificitat antigènica idèntica a la que es troba en la seva superfície.

Malgrat que el conjunt de molècules d'anticòs és molt heterogeni, totes tenen la mateixa estructura bàsica: dues cadenes pesades idèntiques i dues cadenes lleugeres idèntiques, unides i estabilitzades per ponts de disulfur intercatenaris. Tant les cadenes pesades com les lleugeres es caracteritzen per estar formades per uns dominis amb una estructura globular terciària particular d'uns 110 aminoàcids, amb diversos lòbuls amb estructura de full plegat beta estabilitzats amb ponts de disulfur intracatenaris.

Cadascun dels dominis N-terminals d'una cadena pesada i d'una cadena lleugera formen el lloc d'unió amb l'Ag. Aquests dominis N-terminals és on es troba la màxima variabilitat quan es comparen les seqüències d'AA de diferents molècules d'Igs, per això s'anomenen regions variables. La resta dels dominis, tant en les cadenes lleugeres com en les pesades, són molt menys variables i s'anomenen regions constants. L'extrem carboxiterminal de les cadenes pesades té la

propietat d'unir-se, a través de receptors de superfície anomenats Fc, a determinades cèl.lules i mitjançant aquesta unió es porten a terme una sèrie de funcions efectores de la molècula d'anticòs.

Les cadenes de les Igs estan codificades per gens situats en diferents cromosomes: un locus codifica pels diferents isotips de les cadenes pesades (alfa, gamma, delta, mu i epsilon) i un altre per les cadenes lleugeres kappa i el darrer per les lambda.

Els gens que codifiquen pels dominis variables de les cadenes d'Igs es generen durant la ontogènia dels limfòcits B, per un procés de recombinació somàtica que implica la unió de segments de genoma separats, aquest procés genera una gran diversitat de regions variables per a les cadenes pesades i lleugeres i, d'aquesta manera, la població de cèl.lules B pot generar un gran nombre de receptors antigènics immunoglobulínics capaços de reconèixer d'una forma específica els diferents Ags.

Cal dir, però, que cada cèl.lula B utilitza una sola cadena pesada i una sola cadena lleugera i, per tant, que té una sola especificitat antigènica. Una cèl.lula B individual pot canviar de cadena pesada (isotip) tot i mantenir la mateixa especificitat antigènica de la molècula d'immunoglobulina. Això és possible perquè els gens que codifiquen pels dominis constants (que determinen la classe d'anticòs) i els gens que codifiquen pels dominis variables (que determinen l'especificitat de l'anticòs) es troben separats en el genoma per introns i només es posen junts en el moment del processament del RNAm. La cèl.lula B controla quina

classe d'Ig serà expressada alterant els gens de la regió constant utilitzats per fer la primera transcripció de RNA. Això pot ser determinat bé durant la transcripció o bé a nivell de propi DNA.

La gran heterogeneïtat en la població de molècules d'Ig en un individu pot ser dividida en dos tipus: la idiotípica (relacionada amb els diferents dominis variables) i la isotípica (relacionada amb els diferents dominis constants).

El receptor de la cèl.lula T.

Com les cèl.lules B, els limfòcits T també reconeixen l'Ag, utilitzen un receptor que és generat per un procés de recombinació a partir d'un joc de gens de la línia germinal, produint així una gran diversitat de receptors capaços d'unir els diferents antigens. A diferència de les cèl.lules B però, els limfòcits T no reconeixen l'Ag sol, sinó associat a les molècules codificades pel CPH. La majoria de T col.laboradores reconeixen un fragment de l'Ag associat a les molècules de classe II del CPH en la superfície de les cèl.lules processadores/presentadores. Fins i tot les cèl.lules presentadores classe II⁺ són molt efectives en estimular a les T col.laboradores. La majoria de les T citotòxiques reconeixen una combinació de l'Ag i de les molècules de classe I del CPH, com passa a la superfície de les cèl.lules infectades per virus. De fet, la principal funció fisiològica de les T citotòxiques és l'eliminació de les cèl.lules infectades per virus.

En alguns protocols experimentals les T supressores semblen reconèixer l'Ag en associació amb les molècules del CPH, malgrat que en d'altres experiments semblen reconèixer l'Ag tot sol.

La manera com les T col.laboradores i les T citotòxiques reconeixen l'Ag/CPH es troba restringida genèticament: les cèl.lules T que es desenvolupen en un animal amb un particular haplotip del CPH i que responen a un Ag en aquest individu, són tant sols capaces posteriorment de reconèixer l'Ag en associació amb les molècules del CPH d'aquell haplotip determinat. O sigui que hi ha una restricció amb el tipus de molècules del CPH amb les que una cèl.lula T pot reaccionar.

Moltes cèl.lules T poden reconèixer les molècules del CPH al·logèniques (és a dir, les d'altres individus de la mateixa espècie), això seria perquè segons alguns autors la molècula al·logènica seria l'equivalent a la pròpia més l'Ag. Aquesta capacitat de reconeixement al·logènica seria la que provocaria les reaccions (no fisiològiques) que tenen lloc contra els empelts de teixit estrany que expressen les molècules del CPH al·logèniques.

El Complex Principal d'Histocompatibilitat.

Malgrat que el CPH va ser identificat a través del seu paper en el rebuig d'empelts, aquest no és el seu paper fisiològic. La funció del CPH està relacionada amb el procés de reconeixement antigènic pels limfòcits T.

Hi ha tres tipus de molècules: classe I, classe II i classe III.

Les molècules de classe I presents en la superfície de totes les cèl.lules nucleades de l'organisme, tenen un paper en el reconeixement de les cèl.lules diana (cèl.lules pròpies infectades per virus, o bé cèl.lules d'un empelt de teixit que expressin molècules del CPH no pròpies) per les cèl.lules citotòxiques. Estan formades per una glicoproteïna de 45 KD codificada pel CPH associada amb la beta-2 microglobulina de 12 KD. La cadena pesada és altament polimòrfica: hi ha diversos loci dins del CPH que codifiquen per les cadenes pesades de classe I.

Les molècules de classe II són presents només a la superfície de determinades cèl.lules presentadores de l'Ag. La funció d'aquestes molècules és la de presentar l'Ag a les T col. Estan formades per dues glicoproteïnes codificades pel CPH, essent les dues altament polimòrfiques. El nombre de loci dins del CPH que codifiquen pels classe II canvia molt segons l'espècie considerada (2 en el ratolí, moltes més en l'home).

Les molècules de classe III agrupen una sèrie de components del complement: C2, C4, factor B. La funció dels components del complement és diferent de la de les molècules de classe I i de classe II.

Interaccions cel·lulars en la resposta immune.

La resposta immune és el resultat de les interaccions de les cèl·lules integrans del SI. La resposta immune la podem dividir en tres etapes:

a.- La unió, processament i presentació de l'Ag a les cèl·lules T i B efectuada per les cèl·lules presentadores recirculans o bé residents en els òrgans limfoides secundaris.

b.- Les interaccions que tenen lloc entre les T col i les diverses cèl·lules efectores, inclouen: macròfags, cèl·lules B i T cit. Aquestes interaccions poden realitzar-se per contacte cel·lular directe o bé ser mediades per factors solubles, limfocines i monocines.

c.- El nivell i tipus de resposta és aleshores regulat per les cèl·lules T sup així com per les APC, T col i per l'Ac.

Finalment el SI interacciona amb d'altres cèl·lules com granulòcits, mastòcits, fibroblastes i cèl·lules endotelials, així com amb els sistemes enzimàtics sèrics per produir les reaccions inflammatòries de cara a eliminar l'entrada de l'Ag o, almenys minimitzar els danys que aquest pot causar si es tracta d'un patogen.

Cooperació cel·lular en la resposta immune.

Les cèl·lules B reconeixen determinats antigènics (epítops) presents en l'Ag natiu, però les T normalment

reconeixen l'Ag després del seu processament, és a dir que poden reconèixer un petit fragment desnaturalitzat de l'Ag original, presentat en associació amb les molècules del CPH. L'haplotip del CPH de cada individu juga un paper principal en determinar el tipus i especificitat de la resposta immune: els diferents haplotips presenten l'Ag de manera diferent, i com que els haplotips canvien entre els individus, el complex fragment d'Ag/CPH presentat a la cèl.lula T i la subsegüent resposta també canvien. Alguns individus tenen un elevat nivell de resposta per un antigen determinat, mentre que d'altres individus presenten una petita resposta, per aquest mateix Ag, en canvi per a un altre Ag pot passar a l'inrevés. Malgrat que el nivell de resposta immune total és determinat per un gran nombre de gens (els gens de la resposta immune) les molècules de classe II del CPH són particularment importants. Els gens que codifiquen pels classe II estan també implicats en la cooperació entre cèl.lules T i B i en la producció d'anticossos contra antigens T dependents. Hi ha evidències que la col.laboració T pot ser transmesa per contacte cel.lular directe o per limfocines.

Limfocines i monocines.

Els macròfags i les cèl.lules T activades alliberen una sèrie de molècules que actuen com a senyals per altres cèl.lules essencials per al desenvolupament de la resposta immune. Els macròfags alliberen Interleucina 1 que actua sobre les T induint l'expressió del receptor de la Interleucina 2 i la secreció de Interleucina 2. La Interleucina 2 actua provocant la proliferació dels

limfòcits T que hagin estat activats per l'Ag/CPH. Les cèl.lules T també alliberen limfocines que actuen sobre les B (factors estimuladors dels limfòcits B). Com que les cèl.lules T poden col.laborar amb les B d'una manera antígen específica, s'especula amb l'existència de factors solubles antígen específics. L'alliberament de les limfocines no depèn solament del tipus de cèl.lula sinó també del seu grau de desenvolupament i de la fase en què es trobi pel que fa referència al cicle cel.lular.

Regulació de la resposta immune.

L'Ag és el principal regulador de la resposta immune. Quan l'estimulació antigènica s'acaba hi ha un "feed-back" d'inhibició de l'activació de les clones específiques per aquell Ag. Dins d'aquest sistema hi ha una sèrie de petits mecanismes reguladors. Hi ha un "feed-back" mitjançant els propis anticossos que s'uneixen via els receptors Fc inhibint la proliferació de les clones específiques B. Les cèl.lules T col.laboradores actuen a dos nivells: inicialment expandeixen la població de B específiques per l'Ag determinat i, a continuació, es produeix una expansió selectiva d'una població particular de cèl.lules B (aquelles que expressin un particular idiotip).

Les T supressores poden ser de tres tipus: Ts1, específiques per l'Ag, Ts2, específiques d'idiotip i Ts3, no específiques. El senyal d'activació per les Ts1 és el propi Ag, la generació de les Ts2 depèn de l'idiotip expressat per les T i per les B. Les cèl.lules supressores poden actuar a nivell de la generació de la resposta immune o bé sobre les cèl.lules efectores.

Mecanismes efectors de la immunitat.

Per portar a terme l'eliminació de l'Ag el SI recluta un gran nombre de sistemes efectors de l'organisme que donen com a resultat final la inflamació. De gran importància en aquest sentit és el sistema del complement (C), que és format per una vintena de proteïnes sèriques. La funció d'aquest sistema inclou l'atracció de cèl.lules cap al lloc de la inflamació (quimiotàxia), l'augment de l'afluència de sang i de la permeabilitat vascular i, com a conseqüència, hi ha un increment de proteïnes sèriques. La inflamació pot ésser disparada també per l'activació dels mastòcits sensibilitzats per Ig E específiques per a l'Ag, que té com a conseqüència la seva degranulació. Això indueix la síntesi d'una sèrie de mediadors de la inflamació, derivats de l'àcid araquidònic, dels leucotriens, dels tromboxans i de les prostaglandines.

Les reaccions inflamatòries poden ser agudes, caracteritzades per una major abundància de neutròfils i cròniques, caracteritzades per més abundància de limfòcits i de macròfags.

Tipus de resposta immune.

El tipus de resposta produït contra un Ag depèn en gran manera de la forma com és processat i presentat als diferents tipus de limfòcits i això depèn de la naturalesa de l'Ag i de la seva ruta d'entrada. Per exemple, un Ag provocarà una resposta d'anticossos quan s'administri parentalment, mentre que si s'administra en la pell provocarà una resposta de tipus

T. Un antigen soluble pot no donar resposta mentre que quan es troba en forma agregada si que ho fa. Quan un Ag ha provocat un tipus de resposta, en general els subsegüents contactes provocaran el mateix tipus de resposta que l'inicial per l'expansió selectiva de determinades subpoblacions limfocitàries.

La resposta secundària per la majoria d'Ag és normalment més gran que la primària i mostra una maduració. Això es pot observar en el canvi de classe des d'Ig M a Ig G i d'altres isotips i que s'acompanya per un augment de l'afinitat dels anticossos. Això demostra que la resposta incrementada no és conseqüència solament d'una població expandida de limfòcits B sinó que és portada a terme per cèl.lules que han avançat una sèrie de passos maduratívament.

Tolerància.

És la falta específica de resposta per a un determinat Ag, que pot ser induïda naturalment o per pautes particulars d'immunització. La tolerància pot esdevenir com un procés actiu per la supressió de les cèl.lules potencialment reactives, o bé pot ser a causa de l'eliminació funcional d'aquelles cèl.lules. Aquestes dues possibilitats poden distingir-se, ja que la supressió activa per cèl.lules T pot ésser transmesa a un animal no tolerant mentre que la que té per causa la selecció clonal no.

L'exemple més clar de tolerància és la de la tolerància als teixits propis. Durant el seu desenvolupament els limfòcits passen a través d'un

estadi, en el qual són molt susceptibles a la inducció de tolerància. És molt més difícil fer tolerants les cèl.lules madures i gairebé impossible fer-ho quan ja han estat activades per l'Ag.

BIBLIOGRAFIA

- ROITT I.; BROSTOFF J.; MALE D.. *Immunology*, 20 edition. Gower Medical Publishing. London-New York (1989).
- MALE-CHAMPION-COOKE. *Advanced Immunology*. Gower Medical Publishing. London - New York (1987).
- GOLUB, E. S.. *Immunology: A synthesis*. 20 edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachussets (1987).
- UNANUE-BENACERRAF. *Texbook of Immunology*. 20 edition. Williams and Wilkins. Baltimore/London (1984).
- HOOD, WEISSMAN, WOOD, WILSON. *Immunology*. 20 edition. The Benjamin / Cummings Publishing Company Inc. Menlo Park, California (1984).
- DARNELL, LODISH, BALTIMORE. *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books, Inc. W. H. Freeman and Company. New York (1986). Capítol 24.

ELS ENZIMS: CARACTERÍSTIQUES GENE-
RALS I MECANISMES DE REGULACIÓ

CARACTERÍSTIQUES GENERALS I MECANISMES DE REGULACIÓ DELS ENZIMS

Antoni Cortés

Departament de Bioquímica i Fisiologia
Facultat de Química. Universitat de Barcelona.

proteïna. Malgrat això, en molts casos, sense la presència d'un component no purificat a l'entorn cofactor, els enzims no tenen activitat catalítica (1). La forma activa de l'enzim és un dípteroformi resultant de la combinació dels dos subunitats i que pot ésser de tipus holoenzim (2) o apoenzim (3). El cofactor pot ésser de tipus orgànic i inorgànic i estar unita firmament a l'enzim o no (4).

Les característiques més importants dels enzims són l'alta especificitat, el seu caràcter catalític i que poden ésser regulats. En els últims anys, els mecanismes de regulació dels enzims han estat objecte d'una gran atenció i han estat desenvolupats diversos mecanismes per a regular l'activitat dels enzims.

En els últims anys, els mecanismes de regulació dels enzims han estat objecte d'una gran atenció i han estat desenvolupats diversos mecanismes per a regular l'activitat dels enzims.

ELS ENZIMS. CARACTERÍSTIQUES GENERALS I MECANISMES DE REGULACIÓ

El metabolisme dels éssers vius està constituït per una complexa xarxa de vies biosintètiques (anabolisme) i de rutes degradatives (catabolisme), controlades de manera que la composició del medi intern resta constant, assolint-se un estat estacionari. Aquesta homeòstasi cel.lular s'aconsegueix mitjançant el control de l'activitat dels enzims que catalitzen les diferents reaccions que configuren el metabolisme de l'ésser viu.

Els enzims són macromolècules de naturalesa proteica. Malgrat això, en molts casos, sense la presència d'un component no proteic anomenat cofactor, els enzims no tenen activitat catalítica (estat d'apoenzim). La forma activa de l'enzim (estat d'holoenzim) resulta de la combinació amb el cofactor, el qual pot ésser de naturalesa inorgànica (ions metàl·lics) o bé orgànica; en aquest darrer cas el cofactor rep el nom de coenzim. Quan els cofactors estan units fortament a l'enzim s'anomenen grups prostètics.

Les característiques més destacades dels enzims són llur especificitat, el seu poder catalític i que poden ésser regulables. Tot seguit comentarem les propietats esmentades, dedicant una atenció preferent als mecanismes principals mitjançant els quals l'activitat enzimàtica pot ésser regulada.

Un dels atributs més notables dels enzims és el de la seva especificitat, tant pel que fa a la reacció que

catalitzen com pel que fa a la selecció de les substàncies reaccionants, anomenades substrats. Gràcies a això, només certs substrats experimenten la seva acció i únicament té lloc un tipus de reacció sense que es produeixin reaccions col·laterals o subproductes. L'especificitat dels enzims és un dels fenòmens biològics més importants, sense el qual el metabolisme ordenat dels éssers vivents no existiria i la vida seria impossible.

Alguns enzims mostren una especificitat absoluta o quasi absoluta per un substrat determinat i no transformen altres compostos estructuralment relacionats. Així, l'aspartasa, que catalitza l'addició d'amoníac al doble enllaç de la molècula de fumarat originant L-aspartat, i també la reacció inversa, no utilitza al maleat (isòmer cis del fumarat) com a substrat ni promou la desaminació del D-aspartat. Altres enzims presenten una especificitat de substrat més àmplia, ja que actuen sobre diversos anàlegs diferents d'un substrat específic. Per exemple, l'hexoquinasa catalitza la fosforilació de diverses hexoses per l'ATP, si bé la glucosa és el substrat més eficient de l'enzim.

Els estudis que s'han dut a terme sobre l'especificitat de substrat dels enzims han posat de manifest l'existència d'una complementarietat entre la molècula del substrat i una zona específica, situada en la superfície de la molècula enzimàtica a manera de fenedura o concavitat, a la que s'uneix el substrat i que s'anomena centre actiu. El centre actiu constitueix una part relativament petita del volum total de l'enzim i és una entitat tridimensional, l'estructura de la qual és

conseqüència de la conformació de la molècula enzimàtica completa.

En els enzims poden distingir-se quatre tipus de residus aminoàcids: 1. *Residus no essencials*, que poden ésser substituïts o fins i tot eliminats sense que es produeixi una pèrdua apreciable en llur funció catalítica; 2. *Residus estructurals*, que són importants pel manteniment de la conformació òptima de l'enzim; 3. *Residus d'unió*, que són els responsables de l'associació de l'enzim amb el substrat; 4. *Residus catalítics*, que participen en la transformació química del substrat. Òbviament, els residus estructurals, els d'unió i els catalítics poden considerar-se essencials, ja que la seva modificació repercuteix negativament en l'activitat enzimàtica. Es dedueix, per tant, que en el centre actiu es trobaran presents residus d'unió i residus catalítics (de vegades hi ha també cofactors units a les cadenes laterals dels aminoàcids), conjuntament amb residus estructurals que contribueixen a l'especificitat de l'enzim, ja que el tamany i la naturalesa dels seus grups laterals no impedeix la unió del substrat a l'enzim, però pot interferir en la fixació adequada d'altres compostos estructuralment relacionats.

Els enzims són els catalitzadors més eficients que es coneixen, ja que incrementen la velocitat de les reaccions que catalitzen en un factor que oscil·la entre 10^4 i 10^{20} vegades. L'enzim es combina amb els reaccionants per formar un estat de transició diferent del que s'origina en la reacció no catalitzada, de manera que l'energia lliure d'activació de la reacció enzimàtica és notablement inferior a la que tindria la

reacció química en absència de l'enzim. En conseqüència, els enzims acceleren l'assoliment de l'equilibri d'una reacció, però, òbviament, no varien llur posició, és a dir, no alteren el valor de la seva constant d'equilibri.

En l'augment de la velocitat de les reaccions químiques induït pels enzims influeixen, fonamentalment, quatre factors: 1. *Efecte de proximitat i d'orientació orbital del substrat*. La primera etapa del procés catalític és la formació d'un complex enzim-substrat per unió d'aquest al centre actiu. Això incrementa sobre manera la concentració efectiva de substrat en una regió molt localitzada de la molècula enzimàtica. A més del factor de proximitat, una de les funcions principals del centre actiu és el produir l'orientació precisa entre el substrat i els residus catalítics, de manera que els seus orbitals d'enllaç s'orientin adientment per tal que la reacció tingui lloc. 2. *Efecte de tensió i de distorsió*. La unió del substrat provoca un canvi de conformació en la molècula enzimàtica que posa en tensió l'estructura del centre actiu i distorsiona també el substrat enllaçat, el que facilita que el complex enzim-substrat assoleixi l'estat de transició. 3. *Catàlisi àcid-base*. El centre actiu dels enzims pot proporcionar grups laterals de residus aminoàcids específics (per exemple, grups carboxil, amino, tiol, imidazola, etc.) que segons el seu estat de protonació són bons donadors o acceptors d'electrons i que actuen com a catalitzadors eficaços en moltes reaccions orgàniques en medi aquós. 4. *Catàlisi covalent*. En aquest tipus de catàlisi, l'atac d'un grup nucleofílic o electrofílic sobre el substrat dóna lloc a la formació d'un complex covalent intermediari enzim-

substrat en el cicle de la reacció. Constitueixen exemples característics les serin proteases, tals com la tripsina i la quimotripsina, en les que el grup hidroxil d'una serina del centre actiu està implicat en la formació d'un ester intermediari per reacció amb un grup acil del substrat. Alguns grups prostètics també poden establir enllaços covalents amb el substrat, tal com succeeix amb diverses transaminases, en les que el substrat aminoàcid origina una base de Schiff amb el fosfat de piridoxal (grup prostètic) que es troba unit covalentment a un grup ϵ -NH₂ d'un residu de lisina de l'enzim. En tots els casos, els intermediaris covalents formats són molt inestables i l'alliberament de producte és més ràpida que en la reacció no catalitzada.

El manteniment de l'homeòstasi, no solament a nivell cel.lular sinó també a nivell de teixit, d'òrgan o fins i tot d'organisme, precisa de la coordinació d'una gran diversitat de funcions, per la qual cosa els organismes fan servir mecanismes molt diversos per al control del seu metabolisme, si bé, en tots els casos, la regulació enzimàtica juga un paper central en el control dels diferents processos metabòlics.

En el metabolisme cel.lular, grups d'enzims actuen conjuntament en cadenes seqüencials o sistemes per dur a terme un procés metabòlic, tal com succeeix a la conversió de la glucosa en piruvat o a la biosíntesi d'un aminoàcid a partir de precursors més senzills. En sistemes enzimàtics d'aquest tipus, el producte de la reacció del primer enzim es converteix en el substrat de la reacció següent i així succesivament. Les reaccions d'una via metabòlica poden classificar-se en dues categories: les reaccions pròximes a l'equilibri i

les de no equilibri. En les primeres, l'activitat catalítica de l'enzim és elevada en relació amb la dels altres enzims de la ruta metabòlica en qüestió. Això permet la seva fàcil inversió i possibilita que petits canvis en la concentració dels substrats o dels productes puguin originar variacions importants en la velocitat del flux global. Les reaccions de no equilibri es caracteritzen pel fet que l'activitat de l'enzim corresponent és baixa en comparació amb la que tenen els altres enzims de la via. En conseqüència, la concentració del substrat de la reacció resta elevada mentre que la del producte és petita, ja que s'elimina amb rapidesa a causa de la major activitat de l'enzim següent de la ruta.

Encara que l'eficiència catalítica global d'una via metabòlica depèn de l'activitat de tots els seus enzims constituents, és un fet freqüent que una sola reacció de la ruta pugui governar el funcionament de tota la seqüència de reaccions que participen en aquesta ruta. Aquesta etapa limitant de la velocitat és una reacció de no equilibri, l'enzim que la catalitza s'anomena enzim regulador de la via i la seva activitat pot ésser modulada per diverses classes de senyals moleculars. En la major part de les vegades, l'enzim regulador catalitza la primera reacció de la seqüència i gràcies a l'acció d'aquests enzims reguladors la velocitat de les vies metabòliques s'ajusta constantment a les variacions en la demanda de les cèl·lules pel que fa a les seves necessitats d'energia i de molècules necessàries per al creixement cel·lular i llur manteniment.

Els enzims que catalitzen les etapes limitants de velocitat de les rutes metabòliques són, normalment, els punts principals d'atac per aconseguir un funcionament

adequat del metabolisme. Atès que l'activitat d'un enzim depèn de la seva concentració, llur regulació per canvi en el nombre de molècules existents constitueix un mecanisme evident de control. Les proteïnes presents en un organisme es troben en estat dinàmic, per tant la seva concentració és el balanç entre la seva velocitat de síntesi i la seva velocitat de degradació. Els canvis en els nivells d'enzim existents per adaptació a condicions alimentàries variables succeeixen lentament al llarg d'hores i, en la major part dels casos, de dies. En ocasions això s'aconsegueix regulant la velocitat a la que l'enzim es degrada (procés poc conegut), si bé la situació més comú és el control de la velocitat de síntesi. A més de la regulació a nivell gènic, existeixen diversos mecanismes de control a curt termini. D'aquests mecanismes de control, les interaccions alostèriques i les modificacions covalents són particularment importants. Abans de comentar amb detall aquests dos tipus de regulació de l'activitat enzimàtica, és necessari indicar que la major part de la informació existent sobre les propietats cinètiques i reguladores dels enzims s'han obtingut d'estudis « in vitro », sota condicions que difereixen substancialment de les existents « in vivo ». A títol d'exemple, la disponibilitat de substrats, de cofactors, d'efectors, etc. per part d'un enzim, que « in vitro » està perfectament controlada, pot canviar de manera molt important « in vivo » a causa de diversos factors (compartimentació intracel·lular, associació de l'enzim a membranes, formació de complexos multienzimàtics, etc.). A més, a diferència de la situació « in vitro », dins de la cèl·lula poden existir diferències entre la concentració total i la concentració lliure dels metabòlits, ja que són freqüents els casos en què es troben units a macromolècules,

principalment proteïnes, amb la qual cosa la seva concentració efectiva és molt inferior a la total. Per exemple, la concentració total de 2,3-bisfosfoglicerat en els eritròcits és extraordinàriament elevada; malgrat això, la concentració lliure d'aquest metabòlit és comparable a la que hi ha en els altres teixits, perquè en els eritròcits una gran proporció de 2,3-bisfosfoglicerat es troba unida a l'hemoglobina.

És important tenir en compte aquests i d'altres factors (força iònica i naturalesa del medi, concentració de proteïna present, efecte dels productes de la reacció, etc.), a fi i efecte de minimitzar al màxim els errors d'interpretació a l'hora d'intentar extrapolar el comportament d'un enzim « in vitro » al que tindria en condicions fisiològiques.

Interaccions alostèriques.

En algunes rutes metabòliques l'enzim que catalitza la primera etapa de la via està inhibit del producte final. La treonina desaminasa i l'aspartat transcarbamilasa constitueixen dos exemples il·lustratius d'enzims sotmesos a aquest tipus de control, denominat retroinhibició o inhibició « feed-back ». La treonina desaminasa catalitza l'etapa inicial de la ruta de biosíntesi d'isoleucina a partir de treonina i és inhibida quan s'assoleix una concentració d'isoleucina suficientment elevada. Per la seva part, l'aspartat transcarbamilasa, que catalitza la primera etapa de la biosíntesi de pirimidines per reacció entre el L-aspartat i el carbamil fosfat, s'inhibeix pel CTP, producte final de la ruta. En ambdós casos la retroinhibició és

reversible, ja que si disminueixen les concentracions d'isoleucina o de CTP augmenta el ritme de l'activitat de la treonina desaminasa i de l'aspartat transcarbamilasa produint-se, per tant, una resposta molt ràpida i reversible a les fluctuacions de les concentracions d'isoleucina i de CTP a la cèl.lula. Tant l'isoleucina com el CTP no es fixen al centre actiu dels enzims corresponents, sinó que ho fan en un altre centre específic, l'anomenat centre regulador o allostèric; aquesta unió és no-covalent i, per tant, és fàcilment reversible.

La treonina desaminasa i l'aspartat transcarbamilasa són membres típics d'una classe d'enzims, els denominats enzims allostèrics, la funció dels quals es veu regulada per unió no-covalent reversible d'un o més lligands en el centre o centres allostèrics existents a la molècula enzimàtica. Com que el centre regulador és diferent del centre actiu, pot fixar compostos que no estan relacionats estructuralment amb els que reconeix el centre catalític, els quals reben el nom de moduladors o efectors.

Els enzims allostèrics són proteïnes oligomèriques les cadenes polipeptídiques de les quals, anomenades subunitats o protòmers, estan disposades de manera simètrica i s'interaccionen en resposta a les molècules dels metabòlits moduladors. La unió d'un efector al centre allostèric modifica l'estructura tridimensional de l'enzim, amb la qual cosa s'altera la disposició geomètrica dels residus aminoàcids del centre actiu. Això facilita o rebaixa la fixació i/o la transformació de les molècules del substrat en els centres catalítics, amb la repercussió consegüent sobre l'activitat

enzimàtica (activació o inhibició). Els centres al·lostèrics poden trobar-se en les mateixes subunitats que contenen els centres catalítics o bé, com succeeix en el cas de l'aspartat transcarbamilasa, estar situats en subunitats reguladores independents que interactuen amb les subunitats catalítiques a fi i efecte de mantenir-les en una conformació determinada.

Entre els compostos que poden afectar l'estructura d'un enzim oligomèric les subunitats del qual interactuen cooperativament, es troba el seu propi substrat. Si la unió d'una molècula de substrat modifica l'estructura de l'enzim, estabilitzant una nova conformació en la que l'afinitat del substrat pels centres vacants està augmentada, la cooperativitat és positiva i de caràcter homotròpic, ja que la fixació d'una molècula de lligand altera l'afinitat de la unió de posteriors molècules del mateix lligand. En una situació d'aquest tipus, la representació gràfica de la velocitat enzimàtica enfront de la concentració de substrat, origina una corba de saturació sigmoïdal en lloc de la clàssica hipèrbola característica dels enzims michaelians. La concentració de substrat amb la que s'obté una velocitat de reacció que és igual a la meitat de la velocitat màxima, no es pot considerar equivalent a la K_M del sistema, ja que l'enzim no s'ajusta a la cinètica de Michaelis-Menten; per aquesta raó la concentració abans esmentada es simbolitza com $S_{0.5}$.

La resposta cinètica sigmoïdal al canvi en la concentració de substrat és molt semblant a la corba de fixació d'oxigen per l'hemoglobina, i posa de manifest que l'enzim no comença a catalitzar la reacció de manera eficaç fins que la concentració del substrat no

arriba a un nivell determinat, per sota del qual la seva activitat és molt reduïda. És important destacar que un increment petit de la concentració del substrat en la part més ascendent de la corba sigmoïdal, dóna lloc a un augment de velocitat molt més pronunciat del que s'obtidria si la corba de saturació fos hiperbòlica. Això posa de manifest que la sensibilitat (relació entre el canvi relatiu de l'activitat de l'enzim i el canvi relatiu de la concentració del modulator) d'un enzim allostèric serà més gran que la d'un enzim michaelià, la qual cosa fa palesa la importància fisiològica dels efectes cooperatius.

La cooperativitat en la unió del substrat també pot ésser negativa; això passa quan la fixació d'una molècula de substrat redueix l'afinitat de l'enzim per a posteriors molècules d'aquest compost. L'existència d'interaccions cooperatives positives o negatives, pot ésser reconeguda fàcilment mitjançant diverses representacions gràfiques (vegeu la Figura 1).

Quan els efectors d'un enzim allostèric són metabòlits diferents del substrat, la seva unió reversible al centre regulador provoca una alteració en la conformació de la molècula enzimàtica que es tradueix en canvis en la forma de la corba de saturació pel substrat (efectors heterotròpics). Un fet freqüent és que la presència del modulator modifiqui el valor de $S_{0.5}$, sense que s'alteri de manera significativa la velocitat màxima de la reacció. Tal com s'observa a la Figura 2, un activador (modulador positiu) rebaixa el valor de $S_{0.5}$, per la qual cosa la corba de saturació pel substrat s'aproxima a una hipèrbola, mentre que un inhibidor (modulador negatiu) incrementa la $S_{0.5}$ i exalta el

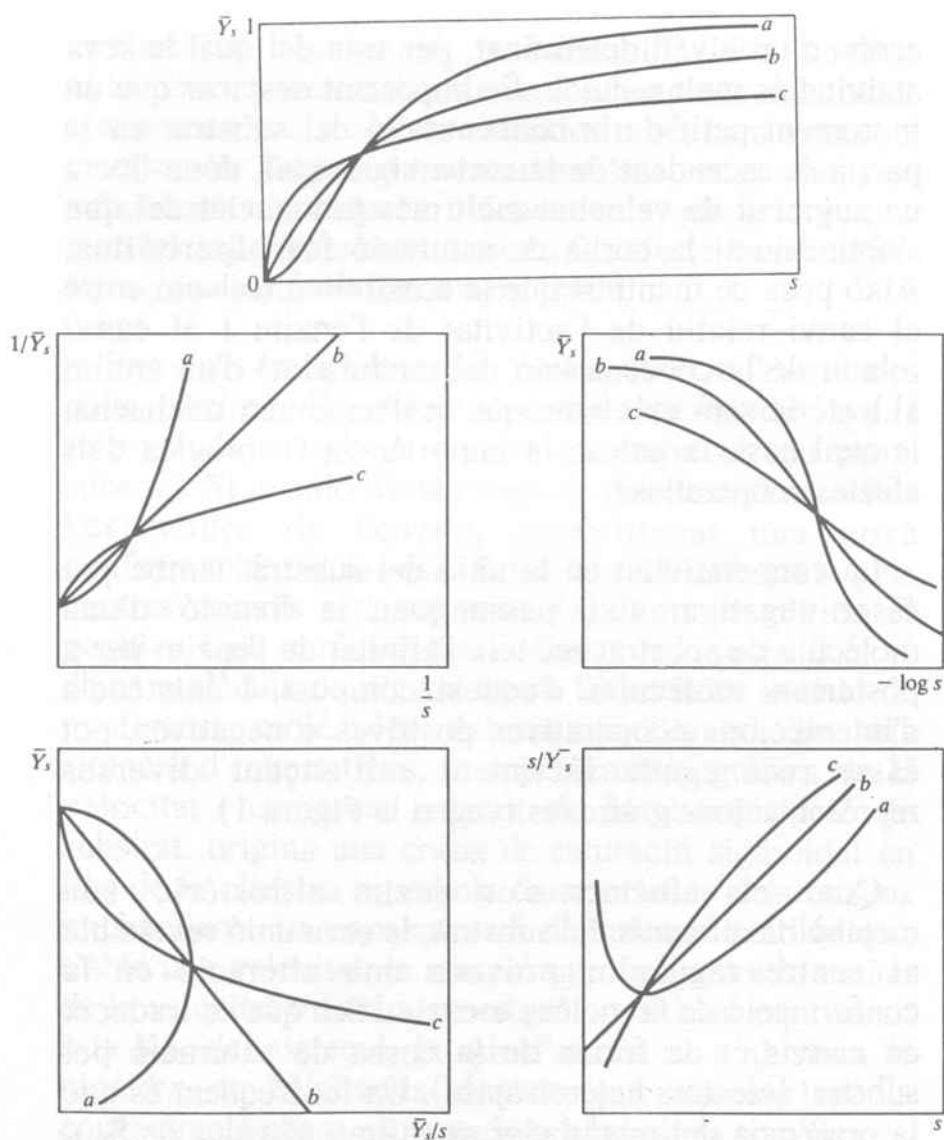


Figura 1. REPRESENTACIONS GRÀFIQUES HABITUALS PER DIFERENCIAR ELS DIFERENTS TIPUS DE COOPERATIVITAT. (a) cooperativitat positiva; (b) cooperativitat nul·la (comportament michaelià); (c) cooperativitat negativa. \bar{Y}_s representa la relació entre el nombre medi de centres actius ocupats pel substrat i el nombre total de centres. s representa la concentració del substrat present en el medi de reacció.

DIXON, M. and WEBB, E. C. (1979): *Enzymes*. Longman Group Ltd. London. 3a. ed. Capítol 8, p. 401. VIII. 29.

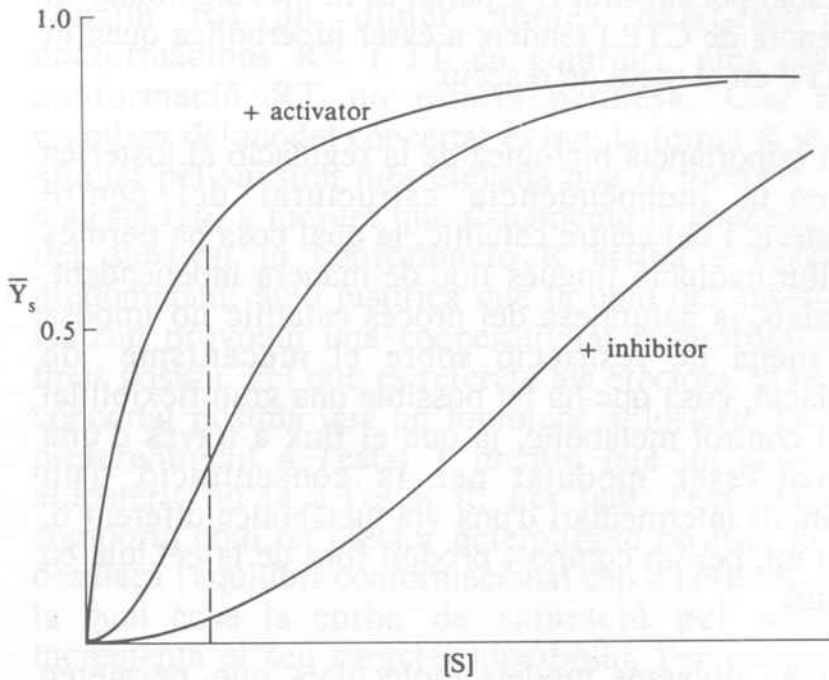


Figura 2. CORBES DE SATURACIÓ OBTINGUDES AMB UN ENZIM QUE MOSTRA COOPERATIVITAT POSITIVA. En presència d'un activador, la corba de saturació pel substrat s'aproxima a una hipèrbola (disminueix la cooperativitat), mentre que un inhibidor incrementa el caràcter sigmoïdal de la corba (augmenta la cooperativitat). A una concentració de substrat no saturant (indicada per la línia discontinua), l'activador incrementa el valor de \bar{Y}_s i l'inhibidor el rebaixa. Els significats de \bar{Y}_s i de S són els indicats a la Figura 1.

BULL, A. T.; LAGNADO, J. R.; THOMAS, J. O.; TIPTON, K. F. (Eds.) (1979): Companion to Biochemistry. Longman Group Ltd. London. Volum 2. Capítol 11. p. 329. 11.3.

caràcter sigmoidal de la representació gràfica obtinguda. En el cas de l'aspartat transcarbamilasa, el CTP seria un efector heterotròpic negatiu i l'ATP un efector heterotròpic positiu, ja que la corba de saturació pel substrat L-aspartat es fa més sigmoidal en presència de CTP i tendeix a ésser hiperbòlica quan hi ha ATP en el medi de reacció.

La importància biològica de la regulació alostèrica rau en la independència estructural del centre alostèric i del centre catalític, la qual cosa ha permès que llur evolució tingués lloc de manera independent. Per això, la naturalesa del procés catalític no imposa cap mena de restricció sobre el mecanisme de regulació, cosa que ha fet possible una gran flexibilitat en el control metabòlic, ja que el flux a través d'una via pot ésser modulats per la concentració d'un metabòlit intermediari d'una via metabòlica diferent o, fins i tot, per un compost produït fora de la cèl·lula en qüestió.

Hi ha diversos models moleculars que permeten interpretar les interaccions alostèriques ja que justifiquen, per una part, la dependència sigmoidal de l'activitat catalítica en funció de la concentració del substrat i, per l'altra, les alteracions que experimenta la corba de saturació esmentada en presència dels efectors alostèrics (activadors o inhibidors). En aquest sentit, destaquen els models de Monod, Wyman i Changeux (model concertat) i de Koshland, Nemethy i Filmer (model seqüencial).

El model concertat (vegeu la Figura 3) postula que l'enzim presenta en dissolució un equilibri entre dues

conformacions diferents, simbolitzades per R (conformació relaxada) i per T (conformació tensa). En ambdós estats, la conformació de cadascuna de les subunitats de l'enzim és idèntica; és a dir, que si l'enzim fos un dímer només existirien les conformacions RR i TT en equilibri, atès que la conformació RT no estaria permesa. Una altra premissa del model concertat és que la forma R té una afinitat pel substrat més elevada que la forma T. Per aquesta raó, a mesura que s'augmenta la concentració del substrat la conformació R arriba a ésser la predominant; això justifica que la unió del substrat a l'enzim provoqui una cooperativitat homotròpica de tipus positiu. Pel que es refereix als efectors, el model concertat postula que un inhibidor al·lostèric es fixa preferentment a l'estat T mentre que un activador al·lostèric ho fa a l'estat R. Per tant, l'activador es comporta com un efector heterotròpic positiu, ja que desplaça l'equilibri conformacional cap a l'estat R, amb la qual cosa la corba de saturació pel substrat incrementa el seu caràcter hiperbòlic. Per contra, en presència de l'inhibidor (efector heterotròpic negatiu), l'estat T seria el majoritari i la variació de la velocitat de reacció en funció de la concentració de substrat donaria lloc a una corba més sigmoïdal de la que s'obtidria en absència del modulador.

Les interaccions al·lostèriques també poden ésser explicades mitjançant el model seqüencial (vegeu la Figura 4), que difereix del model concertat en diversos aspectes. En primer lloc, no pressuposa l'existència d'un equilibri entre dues conformacions diferents de l'enzim en absència de lligands. Per altre part, la unió del substrat o dels efectors (activadors o inhibidors)

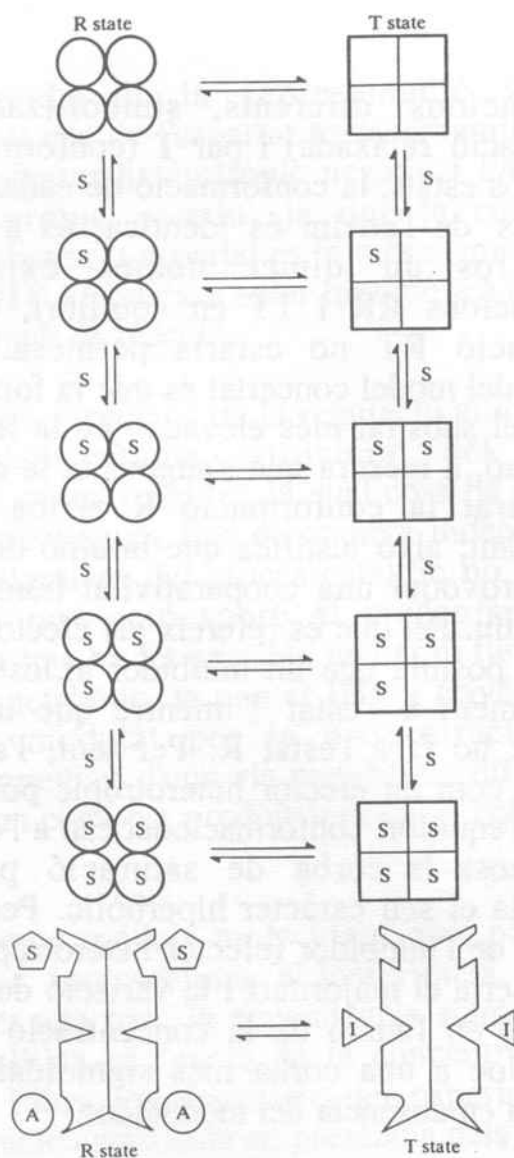


Figura 3. REPRESENTACIÓ ESQUEMÀTICA DEL MODEL CONCERTAT DE MONOD. (a) En aquest exemple l'enzim és un tetràmer i el lligand el substrat de la reacció. Les conformacions de les subunitats es representen per cercles (conformació R) i per quadrats (conformació T). Habitualment el substrat és més afí per l'estat R que per l'estat T. (b) En aquest exemple l'enzim és un dímer, el substrat (S) i l'activador (A) només es fixen a l'estat R i l'inhibidor (I) s'uneix de manera exclusiva a l'estat T.

DIXON, M. and WEBB, E. C. (1979): *Enzymes*. Longman Group Ltd. London. 3a. edició. Capítol 8. p. 407. VIII. 31 i p. 411. VIII. 32.

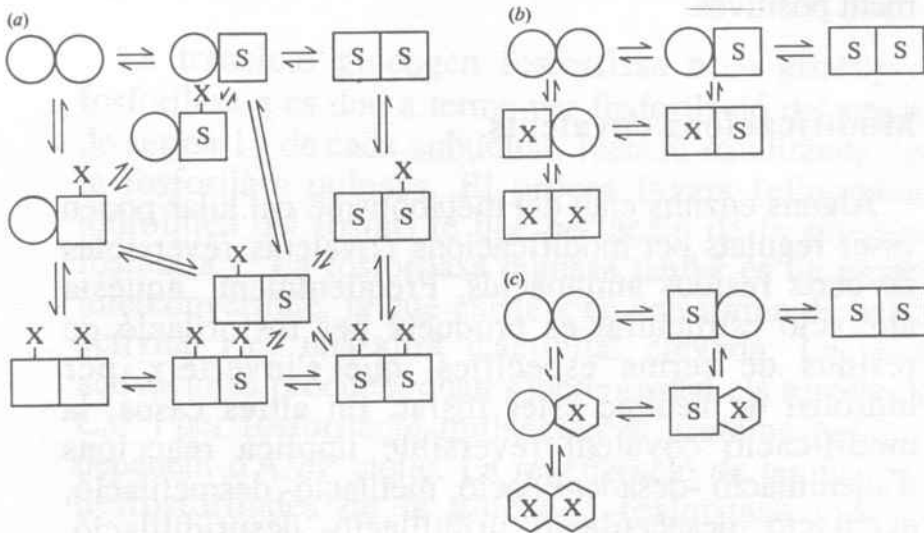


Figura 4. REPRESENTACIÓ ESQUEMÀTICA DEL MODEL SEQÜENCIAL DE KOSHLAND. (a) La unió de l'efector (X) no impedeix la fixació del substrat (S) i provoca el mateix canvi conformacional que l'induït per S. X actuarà com un activador o com un inhibidor segons quins siguin els valors relatius de les constants d'interacció entre les subunitats. (b) X es comporta com un inhibidor competitiu desplaçant S del seu centre d'unió (comportament michaelià). (c) X actua com un inhibidor al·lostèric, ja que la seva unió provoca un canvi conformacional en la subunitat que impedeix la fixació del substrat.

BULL, A. T.; LAGNADO, J. R.; THOMAS, J. O.; TIPTON, K. F. (Eds.) (1979): Companion to Biochemistry. Longman Group Ltd. London. Volum 2. Capítol 11. p. 359. 11.11.

modifica la conformació de les subunitats de l'oligòmer de manera seqüencial, per la qual cosa s'admet que les subunitats poden interaccionar fins i tot quan presenten diferents estats conformacionals (estats híbrids). Això justifica tant la cooperativitat homotròpica positiva com la negativa, a diferència del model de Monod en el qual les interaccions homotròpiques eren necessàriament positives.

Modificacions covalents.

Alguns enzims clau del metabolisme cel·lular poden ésser regulats per modificacions covalents reversibles de certs residus aminoàcids. Freqüentment, aquesta alteració estructural es produeix per fosforilació de residus de serina específics, que s'inverteix per hidròlisi de l'enllaç ester fosfat. En altres casos, la modificació covalent reversible implica reaccions d'adenililació -desadenililació, metilació- desmetilació, acetilació -desacetilació, uridililació- desuridililació, etc.

Un exemple característic d'aquest tipus d'enzims, anomenats enzims interconvertibles, el constitueix la glucogen fosforilasa, que escurça les cadenes de glucogen eliminant les restes de glucosa terminals no reductores de la seva molècula, mitjançant ruptura específica dels enllaços glucosídics α (1 \rightarrow 4). L'enzim de múscul esquelètic és una molècula dimèrica que existeix en dos estats interconvertibles: la glucogen fosforilasa a (activa) i la glucogen fosforilasa b, que normalment és inactiva. Ambdues formes són enzims al·lostèrics que responen de manera diferent a diversos

efectors. En el cas de la fosforilasa a, l'equilibri conformacional R (actiu) \leftrightarrow T (inactiu) està desplaçat envers la forma R, a menys que el nivell de glucosa sigui elevat; per contra, la fosforilasa b es troba fonamentalment en l'estat T, a menys que el nivell d'AMP sigui elevat i els d'ATP i de glucosa 6-fosfat siguin baixos.

La transició glucogen fosforilasa b \rightarrow glucogen fosforilasa a es duu a terme per fosforilació del residu de serina 14 de cada subunitat, reacció catalitzada per la fosforilasa quinasa. El procés invers (eliminació hidrolítica del fosfat) té lloc per acció de la proteïna fosfatasa 1. La fosforilasa quinasa també és un enzim interconvertible, ja que existeix en una forma de baixa activitat i en una altra d'activitat elevada. La seva activació es produeix quan s'incrementen els nivells de Ca^{2+} i per fosforilació mitjançant la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic. La regeneració de les formes desfosforilades de la glucogen fosforilasa i de la proteïna quinasa les catalitza el mateix enzim, la proteïna fosfatasa 1. La seva acció catalítica es bloqueja per la forma fosforilada d'una proteïna anomenada inhibidor 1, essent ineficaç quan està desfosforilada. El grau de fosforilació d'aquesta proteïna es troba sota control hormonal.

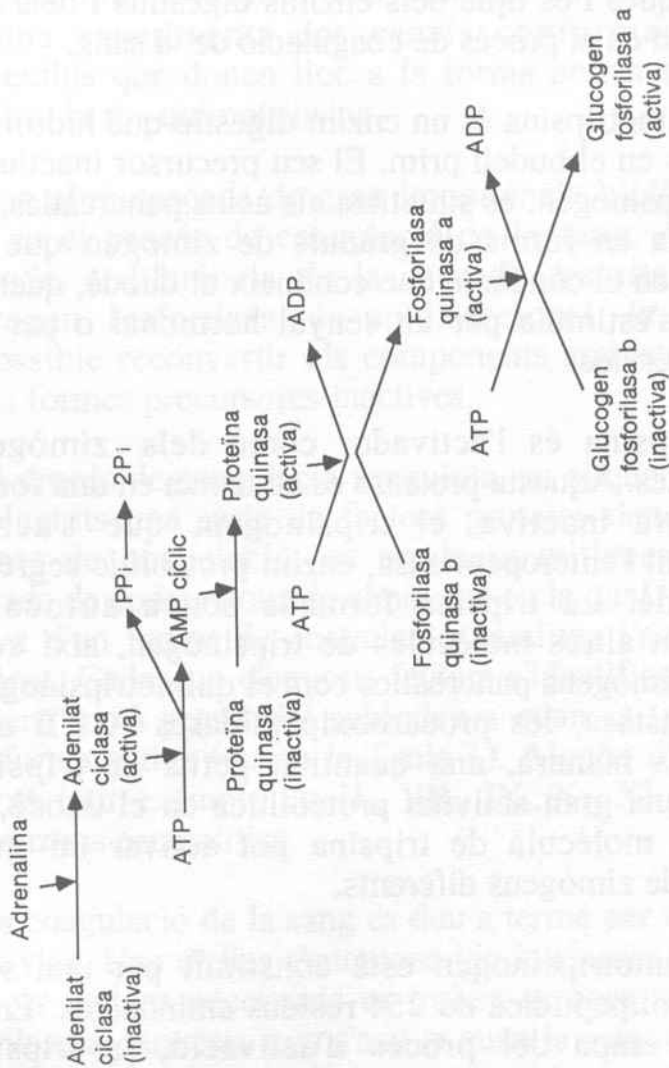
En els sistemes biològics moltes de les molècules senyals, tals com les hormones, es troben en una concentració molt baixa, però tenen efectes molt considerables sobre l'òrgan diana. La senyal que es genera quan es fixen quantitats molt petites de l'hormona, es multiplica dins de la cèl·lula mitjançant un procés d'amplificació biològica. El mecanisme

d'aquesta amplificació suposa una cascada de reaccions, ja que l'activació de l'enzim inicial en la cascada estimula un segon enzim, aquest, a la vegada, n'activa un tercer i així successivament. Com que en cadascuna de les etapes de la cascada hi estan implicades proteïnes catalítiques, la senyal inicial pot incrementar-se moltes vegades en termes de la quantitat de producte final generat.

Quan la mèdulla adrenal és estimulada pel sistema nerviós central, allibera adrenalina i noradrenalina al torrent circulatori. Aquestes hormones afavoreixen la movilització del glucogen muscular, és a dir, la glucogenolisi, mitjançant la cascada de reaccions següent (vegeu l'esquema 1).

Aquesta cascada s'inicia amb la fixació de l'adrenalina a un receptor de membrana específic de les cèl·lules de l'òrgan diana i dóna lloc a un elevat grau d'amplificació, ja que si la glucogen fosforilasa fos regulada directament per l'adrenalina, serien necessàries quantitats molt més grans de l'hormona per produir l'efecte que s'obté mitjançant el sistema de control en cascada comentat.

La transformació d'un enzim inactiu en la seva forma activa també pot ocórrer per modificació covalent irreversible de la molècula proteica. En aquest cas, l'enzim es sintetitza en una forma precursora inactiva (anomenada zimogen o proenzim) i posteriorment s'activa per proteòlisi específica que escindeix un o uns pocs enllaços peptídics del zimogen, la qual cosa origina un canvi en llur conformació que dóna lloc a la forma activa de l'enzim. Aquest tipus de



Esquema 1. CASCADA ENZIMÀTICA D'ACTIVACIÓ DE LA GLUCOGENOLISI MUSCULAR EN RESPOSTA A L'ADRENALINA.

mecanisme de control permet disposar immediatament d'un enzim actiu com a resposta a les demandes fisiològiques i és típic dels enzims digestius i dels que participen en el procés de coagulació de la sang.

La quimotripsina és un enzim digestiu que hidrolitza proteïnes en el budell prim. El seu precursor inactiu, el quimotripsinogen, es sintetitza als àcins pancreàtics, on s'acumula en forma de grànuls de zimogen que es secreten en el conducte que condueix al duodè, quan la cèl.lula s'estimula per un senyal hormonal o per un impuls nerviós.

La tripsina és l'activador comú dels zimògens pancreàtics. Aquesta proteasa es sintetitza en una forma precursora inactiva, el tripsinogen, que s'activa mitjançant l'enteropeptidasa, enzim proteolític segregat pel duodè. La tripsina formada activa autocatalíticament altres molècules de tripsinogen, així com d'altres zimògens pancreàtics com el quimotripsinogen, la proelastasa, les procarboxipeptidases A i B etc. D'aquesta manera, una quantitat petita de tripsina origina una gran activitat proteolítica en el duodè, ja que una molècula de tripsina pot activar un gran nombre de zimògens diferents.

El quimotripsinogen està constituït per una sola cadena polipeptídica de 254 residus aminoàcids. En la primera etapa del procés d'activació, la tripsina catalitza la ruptura de l'enllaç peptídic entre Arg 15 i Ser 16. L'enzim actiu resultant (π - quimotripsina) actua llavors sobre d'altres molècules de π - quimotripsina, cosa que origina l'alliberament dels dipèptids Ser 14 - Arg 15 i Thr 147 - Asn 148 i la formació de

la δ - quimotripsina constituïda per tres cadenes polipeptídiques unides entre sí mitjançant dos ponts disulfur intercatenaris. Darrerament la δ - quimotripsina experimenta dos canvis conformacionals successius que donen lloc a la forma activa final de l'enzim, la α - quimotripsina.

Una altra cascada de gran importància biològica té lloc en el procés de coagulació de la sang. Aquesta cascada, a diferència de la cascada descrita per la glucogen fosforilasa, és unidireccional, ja que és impossible reconvertir els components activats en les seves formes precursors inactives.

El procés de coagulació sanguínia, en el que hi estan involucrats una sèrie de factors proteics denominats factors de coagulació, es produeix mitjançant una cascada de conversions de zimògens en la qual la forma activa d'un factor de coagulació catalitza l'activació següent. Cadascun d'aquests factors s'identifica per un número romà seguit del subíndex a quan es tracta de llur forma activa (vegeu la Taula 1). Alguns d'aquests factors (per exemple els II_a, VII_a, IX_a, X_a, XI_a i XII_a) són enzims proteolítics.

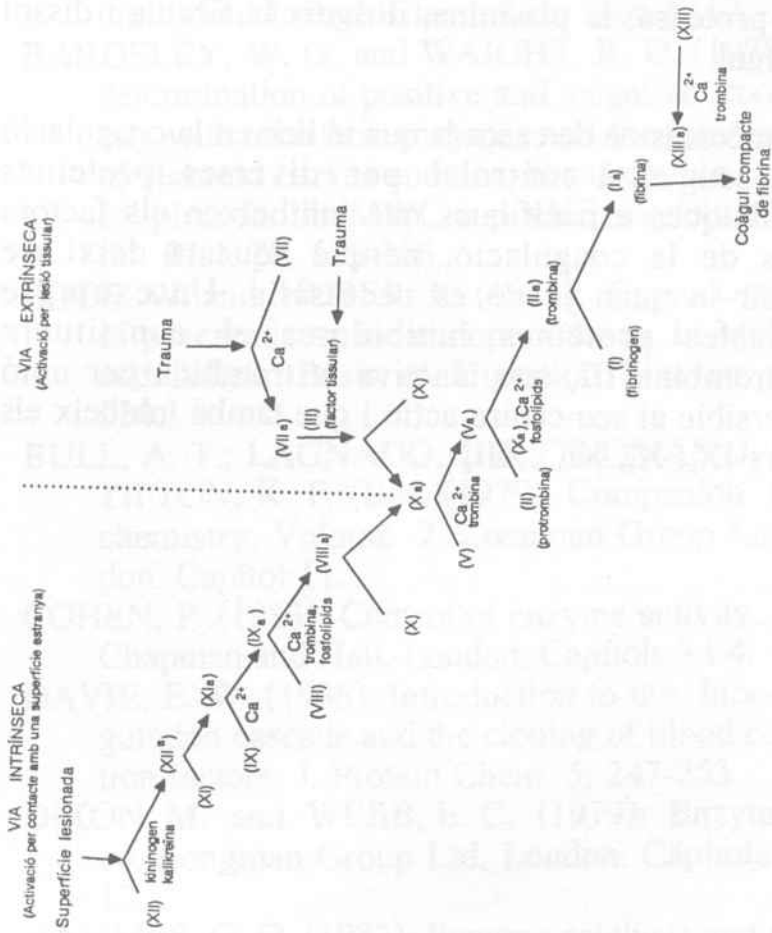
La coagulació de la sang es duu a terme per mitjà de dues vies. Una d'elles s'anomena via intrínseca, perquè tots els factors necessaris es troben sempre circulant pel plasma. Aquesta ruta s'activa quan la sang entra en contacte amb una superfície estranya, per exemple un vidre, i es caracteritza per ser relativament lenta, ja

FACTOR	NOM
I	Fibrinogen
II	Protrombina (II). Trombina (II _a)
III	Factor tissular
IV	Ca ²⁺
V	Proacelerina (V). Acelerina (V _a)
VII	Preconvertina
VIII	Factor antihemofílic (la seva absència causa l'hemofília A)
IX	Factor Christmas (la seva absència causa l'hemofília B)
X	Factor Stuart
XI	Tromboplastina plasmàtica
XII	Factor Hageman
XIII	Factor estabilitzant de la fibrina

Taula 1. FACTORS DE LA COAGULACIÓ SANGUÍNIA

que necessita diversos minuts. La via extrínseca es desencadena per acció de substàncies que són alliberades dels teixits com a conseqüència d'un traumatisme tissular, i condueix a la formació d'un coàgul en pocs segons (vegeu l'Esquema 2).

Les vies extrínseca i intrínseca convergeixen en l'activació del factor X, i posteriorment donen lloc a una seqüència comuna d'etapes finals per formar un coàgul de fibrina. La cascada que apareix a l'Esquema 2, s'amplifica encara més ja que la trombina promou l'activació de la protrombina perquè catalitza l'activació dels factors V i VIII, que són necessaris per activar la protrombina i el factor X, respectivament.



Esquema 2. CASCADA DE LA COAGULACIÓ SANGÜÍNA.

La trombina estimula la coagulació sanguínia al catalitzar la conversió del fibrinogen en fibrina i l'activació del factor XIII, responsable de l'aparició del coàgul de fibrina. Després de la formació d'aquest, una serin-proteasa, la plasmina, dirigeix la fibrina i dissol el coàgul.

El mecanisme de cascada que té lloc en la coagulació de la sang està controlat per diverses proteïnes plasmàtiques específiques que inhibeixen els factors actius de la coagulació, perquè aquesta deixi de produir-se quan ja no és necessària. Un exemple d'aquestes proteïnes inhibidores el constitueix l'antitrombina III, que inactiva la trombina per unió irreversible al seu centre actiu i que també inhibeix els factors IX_a, X_a, XI_a i XII_a.

BIBLIOGRAFIA

- ARONOW, B. and ULLMAN, B. (1987): In situ regulation of mammalian CTP synthetase by allosteric inhibition. *J. Biol. Chem.* 262, 5106-5112.
- BARDSLEY, W. G. and WAIGHT, R. D. (1978): The determination of positive and negative cooperativity with allosteric enzymes and the interpretation of sigmoid curves and non-linear double reciprocal plots for the MWC and KNF models. *J. Theoret. Biol.* 70, 135-156.
- BODE, W. and HUBER, R. (1986): Crystal structure of pancreatic serine endopeptidases. In *Molecular and Cellular Basis of Digestion*. Elsevier. p. 213-234.
- BULL, A. T.; LAGNADO, J. R.; THOMAS, J. O. and TIPTON, K. F. (Eds.) (1979): *Companion to Biochemistry*. Volume 2. Longman Group Ltd. London. Capítol 11.
- COHEN, P. (1983): *Control of enzyme activity*. 2a. ed. Chapman and Hall. London. Capítols 3 i 4.
- DAVIE, E. W. (1986): Introduction to the blood coagulation cascade and the cloning of blood coagulation factors. *J. Protein Chem.* 5, 247-253.
- DIXON, M. and WEBB, E. C. (1979): *Enzymes*. 3a. ed. Longman Group Ltd. London. Capítols 5, 8 i 12.
- HAMMES, G. G. (1982): *Enzyme catalysis and regulation*. Academic Press. New York. Capítols 5, 6 i 8.
- HERRERA, E. (1986): *Bioquímica*. 1a. ed. Interamericana. Capítol 6.

- KAISER, E. T.; LAWRENCE, D. C. and EDWARD, S. (1985): The chemical modification of enzymatic specificity. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 565-595.
- KOSHLAND, D. E. (1984): Control of enzyme activity and metabolic pathways. *Trends Biochem. Sci.* 9, 155-159.
- KREBS, E. G. (1987): The Enzymology of control by phosphorylation. *The Enzymes*. 3a. ed. 18, 3-20.
- KURGANOV, B. I. (1982): Allosteric enzymes. Kinetic behaviour. Wiley and Sons. Chichester. Capítols 2 i 3.
- PRICE, N. C. and STEVENS, L. (1982): Fundamentals of Enzymology. Oxford University Press. Oxford. Capítols 5, 6 i 8.
- RAWN, J. D. (1989): Bioquímica. Volumen 1. Interamericana. Capítols 7 i 8.
- RICARD, J. and NOAT, G. (1986): Catalytic efficiency, kinetic cooperativity of oligomeric enzymes and evolution. *J. Theoret. Biol.* 123, 431-451.
- SEGEL, I. H. (1975): Enzyme kinetics. Wiley and Sons. New York. Capítol 7.
- SHACTER, E. ; BOON-CHOCK, P. ; GOO-RHEE, S. and STADTMAN, E. R. (1987): Cyclic cascades and metabolic regulation. *The enzymes*. 3a. ed. 18, 21-42.
- STRYER, L. (1988): Bioquímica. 3a. ed. Volumen 1. Ed. Reverté. Barcelona. Capítols 8 i 10.

