

## FISIOLOGIA DELS ENZIMS

### CONTROL FISIOLÒGIC DE LES ACCIONS ENZIMÀTIQUES \*

pel doctor S. VIDAL i SIVILLA

Professor de Fisiologia a la Facultat de Medicina  
de la Universitat de Barcelona

Per control fisiològic de l'acció dels enzims cal entendre la regulació de les activitats enzimàtiques dintre la cèl·lula i en l'organisme, tal com es desenvolupen i combinen per a donar les diverses manifestacions funcionals dels éssers vivents.

Tenint en compte que els enzims són els protagonistes de les reaccions metabòliques i que d'aquestes depenen tots els fenòmens funcionals, resulta evident que el control de l'acció dels enzims ha d'ésser molt important i decisiu per a regular totes les activitats vitals.

En les reaccions enzimàtiques investigades «in vitro», amb la finalitat d'estudiar les propietats bioquímiques dels enzims aïllats, hom pot demostrar influències o factors capaços de modificar l'activitat enzimàtica, però aquestes influències sols poden ésser acceptades com a factors de regulació fisiològica si hom comprova que intervenen també «in vitro», dins l'organisme i en circumstàncies fisiològiques.

Cal tenir present que les accions enzimàtiques dintre la cèl·lula poden resultar fins i tot diferents de les que mostren els enzims aïllats en el tub d'assaig. A més, en la cèl·lula es tracta no de controlar una sola reacció enzimàtica, sinó de regular sistemes de reaccions, cada un amb participació de múltiples factors, enzimàtics i no enzimàtics, i tots combinats entre ells de manera que originen processos metabòlics. Finalment, en la regulació de les reaccions enzimàtiques de l'organisme intervenen, a més de senzills agents de control, complexos sistemes que regulen activitats fisiològiques i no simplement accions enzimàtiques.

\* Treball lliurat a Secretaria el dia 27 de gener de 1971.

Actualment els agents i els mecanismes de regulació coneguts o suposats són tan nombrosos i comporten tantes interferències que resulta difícil de fer una exposició sistemàtica de tots els que intervenen en el control fisiològic de l'acció dels enzims. A més, molts dels coneixements actuals són encara fragmentaris o aconseguits en unes condicions experimentals més o menys artificioses, cosa que dona lloc a interpretacions dubtoses i a la incorporació constant de dades noves que obliguen sovint a rectificar conceptes o a variar les classificacions.

Per a revisar el control fisiològic de l'acció dels enzims, cal primerament ordenar i classificar les influències reguladores. Tot seguit convé de recordar algunes nocions sobre la fisiologia dels enzims, principalment les referents als processos de llur síntesi, activació, distribució, inactivació i destrucció. Amb aquestes dades fisiològiques hom pot entendre fàcilment els diversos mecanismes que es combinen per a regular l'acció dels enzims d'acord amb les necessitats fisiològiques.

#### CLASSIFICACIÓ DE LES INFLUÈNCIES REGULADORES

Per a distingir les influències que controlen l'acció dels enzims, hom pot tenir en compte, com a criteri de classificació, l'origen dels agents de control, el lloc o el procés on actuen i el mecanisme de les accions reguladores. En lloc d'utilitzar un sol criteri de classificació és millor servir-se conjuntament desl tres esmentats, ja que les propietats corresponents es presenten barrejades i combinades.

Considerant l'origen i la complicació de les influències reguladores, STADIE<sup>7</sup> proposà la distinció entre regulacions intrínseques o primitives i regulacions extrínseques o sobreafegides.

Les regulacions intrínseques o primitives s'originen en els sistemes enzimàtics de la mateixa cèl·lula, per les propietats i reaccions de llurs components, i depenen de les pròpies activitats cel·lulars. Per tant, les regulacions intrínseques funcionen automàticament, de manera que l'acció dels enzims i les activitats metabòliques resulten autoregulades per mecanismes semblants als dels circuits de retroalimentació.

Les regulacions extrínseques o sobreafegides actuen en els mateixos sistemes enzimàtics cel·lulars, però s'originen fora de la cèl·lula i depenen de factors o de sistemes exogènics. En els organismes pluricel·lulars, els agents de regulació extrínseca provenen generalment d'algunes cèl·lules especialitzades i van a les altres cèl·lules per a actuar-hi com a missatgers dels sistemes de regulació hormonal i nerviosos.

En els éssers més inferiors, i especialment en els unicel·lulars, el control fisiològic de les accions enzimàtiques és aconseguit mitjançant regulacions

primitives o intrínseques, bé que aquestes poden ésser influïdes, més o menys directament, pels factors exogènics dels canvis ambientals i donar lloc a respostes d'adaptació.

En les cèl·lules dels organismes superiors les accions enzimàtiques són controlades igualment per regulacions intrínseques, però són regulades també, addicionalment, per sistemes de regulació extrínseca, hormonals i nerviosos, que reaccionen enfront dels canvis del medi exterior i donen lloc a respostes coordinades d'adaptació.

Tenint en compte el mecanisme de l'acció reguladora i seguint en bona part KREBS<sup>2</sup>, hom pot distingir els següents tipus o mecanismes de regulació intrínseca: a) Autoregulació per la reversibilitat d'algunes reaccions enzimàtiques. b) Autoregulació per influències específiques degudes als substrats i als metabòlits o productes de les reaccions enzimàtiques. c) Autoregulació per la necessitat de reaccions acoblades. d) Autoregulació per efectes de competició entre cofactors i substrats d'ús comú. e) Autoregulació per la diferent distribució dels components del sistema enzimàtic entre els diversos compartiments de l'estructura cel·lular.

Deixant a part que els agents extrínsecs, provinents del medi que envolta la cèl·lula, poden modificar o condicionar el funcionament dels diferents mecanismes de regulació intrínseca, la cosa més avinent és classificar les regulacions extrínseques per la localització de l'acció reguladora, segons la reacció o el nivell del metabolisme cel·lular on actuïn els agents o missatgers reguladors. Aquest criteri, útil per a classificar les accions reguladores de les diverses hormones, també és aplicable per a catalogar l'acció dels transmissors nerviosos i la de qualsevol substància activa provinent del medi que envolta la cèl·lula.

Tenint en compte la localització de l'acció reguladora i seguint VILLEE<sup>3</sup>, hom pot distingir els següents tipus o mecanismes de regulació hormonal o extrínseca: a) Accions en la síntesi de l'enzim. b) Accions en l'activitat de l'enzim. c) Accions en la permeabilitat de les estructures membranoses de la cèl·lula. d) Accions en la mateixa reacció enzimàtica, participant-hi directament, com a cofactor o cosubstrat, o bé condicionant-la indirectament per efectes de competició. Hom hi podria afegir, com a una possibilitat encara poc coneguda, les accions reguladores capaces d'influir els processos del catabolisme normal dels enzims.

#### PROPIETATS FISIOLÒGIQUES DELS ENZIMS

Per a analitzar les diverses accions reguladores i llurs mecanismes, convé de recordar algunes nocions sobre les propietats funcionals dels enzims dintre la cèl·lula i en l'organisme, que són justament les que poden ésser

agrupades sota el títol de *fisiologia dels enzims*. Els mecanismes d'acció de les diverses regulacions, intrínseques i extrínseques, són més fàcils d'entendre després d'esbossar els processos fisiològics que determinen la *concentració enzimàtica* i els que condicionen l'*activitat enzimàtica*.

Les variacions de la concentració enzimàtica en els diferents compartiments cel·lulars depenen dels processos fisiològics de síntesi, distribució i destrucció dels enzims i de les influències que controlen aquests processos en l'organisme. Les variacions de l'activitat enzimàtica depenen dels diversos processos fisiològics d'activació i d'inactivació dels enzims, entre els quals hom atribueix avui dia especial valor funcional a les modificacions anomenades alostèriques.

#### PROCESSOS FISIOLÒGICS DETERMINANTS DE LA CONCENTRACIÓ ENZIMÀTICA

La concentració enzimàtica en els diversos compartiments cel·lulars depèn molt dels processos de la síntesi dels enzims. Per aquesta dependència, tots els agents que activen o inhibeixen la síntesi de proteïnes enzimàtiques poden actuar com a factors reguladors o modificadors del contingut cel·lular d'enzims.

Però s'ha de tenir present que el contingut enzimàtic de la cèl·lula depèn en qualsevol moment, no sols dels factors que influeixen la síntesi, sinó també dels processos del catabolisme dels enzims, condicionats probablement per mecanismes i factors múltiples, potser més nombrosos i variables que els que influeixen la síntesi dels enzims.

Veritablement, la concentració enzimàtica de les cèl·lules depèn, en qualsevol moment, del balanç entre la síntesi i la destrucció dels enzims. Per tant, tots els agents i mecanismes que determinen o condicionen la inactivació i destrucció dels enzims poden actuar també com a factors modificadors o reguladors de la concentració enzimàtica.

Mentre que la concentració cel·lular d'alguns enzims es manté força constant, com si els processos de llur síntesi i de llur destrucció variessin conjuntament però conservant un cert equilibri entre ells, la concentració cel·lular d'altres enzims ofereix oscil·lacions capaces de fer variar les accions enzimàtiques i, per tant, amb valor per a regular les activitats metabòliques i funcionals. En aquests casos cal suposar que les activitats metabòliques o les necessitats funcionals influeixen els processos de síntesi i els d'inactivació i destrucció dels enzims d'una manera desigual o amb un cert asincronisme.

## CONTROL DE LA CONCENTRACIÓ ENZIMÀTICA DE LA SÍNTESI DELS ENZIMS

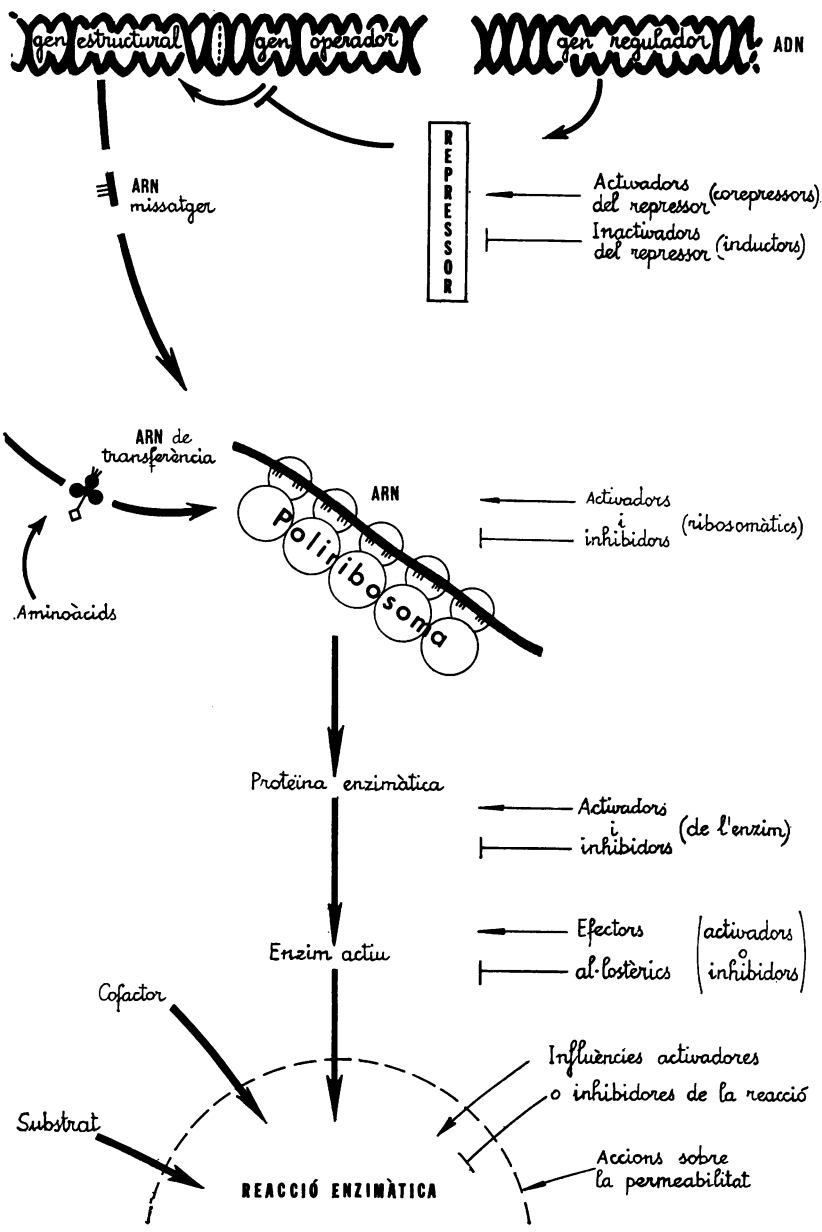
La possibilitat de fabricar els diferents enzims ve planificada en el material genètic, però la producció de cada un d'ells esdevé efectiva o no, en les diferents cèl·lules, segons llur especialització funcional, i varia, a cada cèl·lula i en diferents moments, d'acord amb les necessitats fisiològiques. En els organismes pluricel·lulars, el potencial o el material genètic de totes les cèl·lules és idèntic i fix (genotip), però en el transcurs de la diferenciació, les cèl·lules dels diversos teixits manifesten quadres metabòlics particulars i diferències molt acusades en la fabricació d'enzims (fenotip).

Les variacions enzimàtiques observades en el transcurs de la diferenciació i de l'adaptació cel·lulars, persistint invariable el material genètic, són proves evidents que la síntesi dels enzims és influïda per factors i mecanismes extragenètics, capaços de fer-la variar o de regular-la segons les circumstàncies de cada cèl·lula i d'acord amb les necessitats de cada moment.

En les variacions i anomalies enzimàtiques degudes a alteracions del material genètic, per selecció o per mutació en el transcurs de generacions successives, la intervenció de factors extragenètics és també possible. Aquestes variacions degudes a canvis del material genètic no són pròpies del control fisiològic dels enzims, però hom en fa esment per indicar que alguns factors exogènics, a més de condicionar el funcionament genètic, poden contribuir a l'aparició d'alteracions del material genètic i donar lloc així a variacions o anomalies enzimàtiques que no són funcionals sinó constitucionals i hereditàries, o patològiques.

La síntesi de proteïnes enzimàtiques és el resultat d'una sèrie de processos en els quals participen essencialment els àcids desoxiribonucleics del material genètic del nucli (ADN), els àcids ribonucleics del citoplasma i dels ribosomes (ARN), els enzims propis de la síntesi de proteïnes i la primera matèria de nutrients adequats, principalment aminoàcids. Cal tenir present també la participació de factors extragenètics que poden modificar o regular els processos de la síntesi de proteïnes enzimàtiques, actuant a diferents nivells i per diversos mecanismes.

Els àcids desoxiribonucleics (ADN) del material genètic nuclear estan distribuïts ordenadament en els cromosomes i formen els anomenats gens estructurals, gens operadors i gens reguladors (vegeu l'esquema adjunt). Els *gens estructurals* comporten els patrons o models de la síntesi de totes les cadenes polipeptídiques i també de les combinacions d'aquestes per a formar les proteïnes possibles. Per a utilitzar els gens estructurals calen els *gens operadors*, que poden ésser situats en els mateixos cromosomes.



SÍNTESI

DELS

ENZIMS

ACTIVITAT

ENZIMÀTICA

Cada gen operador és capaç de promoure la utilització de diversos gens estructurals, però la seva influència promotora és reprimida pels anomenats *gens reguladors*, els quals poden ésser situats en altres cromosomes.

L'acció frenadora dels gens reguladors és exercida per mitjà d'uns repressors la naturalesa dels quals no és encara ben coneguda (nucleòtids, proteïnes o nucleopròtids). A nivell d'aquest *mecanisme genètic de repressió* poden influir o interferir alguns dels factors extragenètics que regulen la síntesi de proteïnes enzimàtiques o provoquen variacions del contingut enzimàtic de les cèl·lules en el transcurs de la diferenciació i en els fenòmens d'adaptació.

Els factors reguladors que actuen a nivell del mecanisme genètic de repressió són els que han estat anomenats, des del principi, amb tota propietat i en el sentit més restringit, inductors i corepressors. Els *inductors* anul·len el mecanisme genètic de repressió, tot inactivant els repressors i alliberant els gens operadors corresponents, de manera que aquests puguin fer funcionar els gens estructurals necessaris per a la síntesi de determinats enzims. Els *corepressors* estimulen el mecanisme genètic de repressió, activen els repressors en llur acció frenadora dels gens operadors, de manera que resulta difícil o impossible la utilització dels gens estructurals corresponents a la síntesi de determinades proteïnes enzimàtiques.

Hom ha demostrat que alguns bacteris i cèl·lules animals, en trobar-se amb substrats no habituals, poden reaccionar iniciant la fabricació dels enzims necessaris per a atacar-los, i hom suposa que aquests substrats actuen com a inductors, inactivant el mecanisme genètic de repressió que s'oposa normalment a la síntesi d'aquells enzims. A la inversa, hom observa sovint que quantitats abundants de productes finals d'un cicle metabòlic fan disminuir la síntesi dels enzims iniciadors del cicle, i hom suposa que aquests productes actuen sobre el mecanisme genètic de repressió, com a corepressors, activant el repressor que frena la síntesi d'aquells enzims.

Mentre que els enzims susceptibles d'inducció o de repressió són anomenats *enzims adaptatius*, els que fins ara no s'han mostrat induïbles ni reprimibles s'anomenen *enzims constitutius*. Però cal aclarir que aquesta distinció no significa l'absència, en els darrers, del mecanisme genètic de repressió i dels gens operador i regulador corresponents.

PARDEE <sup>4</sup> i d'altres investigadors han suggerit que la síntesi de totes les proteïnes enzimàtiques és sotmesa al control de metabòlits intracel·lulars que actuen com a inductors o com a repressors o corepressors, bé que la demostració experimental d'aquest control resulta encara difícil o impossible per a molts enzims. Segons aquesta hipòtesi, totes les activitats metabòliques de la cèl·lula podrien ésser molt justament autocontrolades gràcies a múltiples regulacions de mecanisme intrínsec que funcionarien com a

circuits de retroalimentació i farien variar la síntesi i el contingut cel·lular de tots els enzims d'acord amb les necessitats fisiològiques.

També poden actuar com a inductors o com a repressors o corepressors, a més dels substrats i dels productes de les reaccions metabòliques intracel·lulars, substàncies exògeniques d'estructura semblant i les hormones, que regulen el metabolisme per llur acció de provocar variacions de la síntesi d'enzims. Per tant, les influències reguladores exercides a nivell del mecanisme genètic de repressió poden ésser intrínseques o extrínseques, segons la natura i l'origen dels agents reguladors.

Han estat observats *efectes d'inducció aparent* que no poden ésser interpretats pel mecanisme suara descrit d'inactivació de la repressió genètica a nivell del nucli, sinó per fenòmens d'activació de la síntesi dels enzims a nivell citoplasmàtic o ribosomàtic, en fases ulteriors de la síntesi de proteïnes que seran exposades tot seguit i en relació amb els àcids ribonucleics.

La *síntesi dels àcids ribonucleics (ARN)* té lloc sobre el patró de gens estructurals (ADN) que esdevenen utilitzables gràcies a la influència no reprimida de gens operadors. A nivell dels gens estructurals del nucli, prèviament desplegats, es disposen ordenadament ribonucleòtids procedents del citoplasma, justament els adequats i amb la seqüència de bases convenient per a formar àcids ribonucleics que es corresponguin amb els àcids desoxiribonucleics genètics («*transcripció*» del *codi genètic*). D'aquesta manera i per l'acció d'enzims ARN-polimerases, són sintetitzats els anomenats *ARN missatgers (m-ARN)*, que es desprenen tot seguit del nucli, migren pel citoplasma i van a fixar-se en els ribosomes, formant agrupacions poliribosomàtiques.

En el nucli i per un procés de replicació inicialment semblant al de la síntesi dels ARN missatgers, són sintetitzats també, per una part, els *ARN ribosomàtics (r-ARN)*, destinats a acoblar-se amb proteïnes i formar els ribosomes, i d'altra banda, els diversos *ARN de transferència (t-ARN)*, que passen al citoplasma com a àcids ribonucleics solubles (s-ARN). Aquests són els àcids ribonucleics més coneguts fins ara: n'han estat aïllats uns 60, tots de molècula relativament senzilla (70 nucleòtids) i alguns amb estructura ben determinada, de cadena plegada figurant com una fulla de trèvol.

Cada ARN de transferència, després de captar en un extrem de la cadena el corresponent aminoàcid activat, va a situar-se en cert lloc del poliribosoma, just on la cadena de l'ARN missatger, prèviament fixat pels ribosomes, presenta un triplet de bases determinat, acoblable amb un triplet central i característic de l'ARN de transferència. Això fa que a nivell del poliribosoma resultin disposats els aminoàcids ordenadament, amb una seqüència que tradueix l'ordenació dels ribonucleòtids integrats en la cadena de l'ARN missatger («*traducció*» del *codi genètic*).



A nivell de cada ribosoma, els aminoàcids, ordenats pels ARN de transferència segons el codi dels ARN missatgers, s'acoblen seguidament entre ells i formen, per l'acció d'enzims sintetases, les unions peptídiques corresponents. Al mateix temps que es formen les unions peptídiques de l'estructura primària, es produeixen també acoblaments i plegaments de les cadenes polipeptídiques que donen lloc a les estructures secundària i terciària i finalment a l'alliberament de la proteïna enzimàtica.

Perquè tinguin lloc totes aquestes reaccions de la síntesi de proteïnes enzimàtiques, en el nucli, en el citoplasma i en els ribosomes, calen, a més dels àcids nucleics, els enzims específics que les catalitzen, l'aportament de primera matèria en forma d'aminoàcids i el subministre de molta energia en forma d'ATP. Les variacions d'aquests elements indispensables condicionen la velocitat de síntesi de les proteïnes enzimàtiques i poden donar lloc a variacions de la concentració enzimàtica.

Les *variacions de l'aportació material* (aminoàcids i altres nutrients) i *del subministre d'energia* (ATP procedent de les reaccions del metabolisme energètic) poden afectar la síntesi enzimàtica, principalment en el sentit de limitació, si les variacions són per defecte, i comporten disminució de la síntesi i de la concentració d'enzims. En el cas contrari, baldament els subministres de substrats i d'energia siguin molt abundants, la síntesi de proteïnes enzimàtiques no resulta necessàriament augmentada, ja que la concentració dels substrats més enllà d'un cert límit no accelera les reaccions enzimàtiques.

En canvi, les *variacions de concentració i d'activitat dels enzims catalitzadors de la síntesi de proteïnes enzimàtiques* poden provocar variacions molt importants del contingut celular d'enzims i contribuir indirectament a regular l'acció d'aquests mateixos enzims. En aquests casos, l'agent regulador pot actuar a nivell del nucli, afectant principalment els enzims ARN-polimerases, a nivell dels poliribosomes, tot afectant també els enzims sintetases d'unions peptídiques, o a nivell del citoplasma afectant els enzims activadors dels aminoàcids. L'acció de molts antibiòtics contra els bacteris es produeix justament per influències inhibidores d'alguna d'aquestes reaccions enzimàtiques que contribueixen a la síntesi de proteïnes.

Tenint present, doncs, la multiplicitat de reaccions i de factors involucrats, resulta que la síntesi de les proteïnes enzimàtiques pot ésser interferida o regulada per molts agents i a diferents nivells o llocs d'acció, més que els assenyalats en l'esquema adjunt. I encara resulten més possibilitats de regulació si hom té en compte les que es dedueixen de les dades i consideracions afegides a continuació i no representades tampoc en l'esquema.

A nivell del nucli, a més d'influir el mecanisme genètic de repressió,

els agents reguladors poden actuar provocant variacions de la síntesi dels diversos àcids ribonucleics, és a dir, dels ARN ribosomàtics, dels ARN missatgers o dels ARN de transferència, segons quin sigui l'agent regulador o modificador.

Hom obté del citoplasma diverses fraccions o grups d'enzims capaços d'activar i transferir aminoàcids amb especificitats diferents. L'acció d'aquests enzims activadors dels distints aminoàcids pot ésser afectada diversament per agents reguladors diferents.

A nivell dels poliribosomes, les influències activadores o inhibidores tampoc no es limiten a una sola reacció. Dels agents inhibidors que actuen en els ribosomes, els uns priven la fixació dels ARN missatgers i els altres la incorporació dels ARN de transferència amb llurs aminoàcids, alguns s'oposen al creixement de la cadena polipeptídica i d'altres a l'alliberament de la proteïna enzimàtica.

A més de les influències que afecten els enzims catalitzadors de la síntesi, també es poden produir variacions importants de la síntesi de proteïnes enzimàtiques per fenòmens d'acció de masses, principalment a nivell dels poliribosomes. Per exemple, l'abundància de substrats amb afinitat envers els enzims sintetitzats pot fer anticipar llur despesa dels ribosomes i deixar-hi lloc per a accelerar la síntesi de noves molècules enzimàtiques. També la presència de substàncies o de factors favorables al plegament de les cadenes polipeptídiques pot accelerar, de manera semblant, la despesa de la proteïna enzimàtica i la síntesi de les noves molècules. A la inversa, les variacions o les influències de sentit contrari poden retardar, també per acció de masses, la despesa i la síntesi de noves molècules de l'enzim.

Sovint és difícil d'esbrinar si un agent activador o inhibidor de la síntesi d'un determinat enzim actua a nivell dels ribosomes o del nucli, i en aquest cas, si l'acció és directa o bé indirecta, mitjançant l'hipotètic mecanisme genètic de repressió. Per això, alguns autors usen les denominacions d'inducció i de repressió amb un significat molt ampli, no restringit a les accions indirectes pel suposat mecanisme genètic de repressió, sinó aplicable igualment a totes les influències activadores o inhibidores de la síntesi de proteïnes en general, tant si actuen a nivell del nucli com si llur acció és exercida a nivell dels ribosomes.

Darrerament, uns treballs de SPIRIN <sup>6, 6'</sup>, demostratius que els ARN missatgers migren en el citoplasma no aïllats sinó units amb proteïnes i formant complexos nucleoproteics de diferents pesos moleculars, han plantejat una nova possibilitat de regulació de la síntesi de proteïnes, el lloc d'acció de la qual ha de situar-se entre el nucli i els ribosomes, a nivell dels complexos descoberts per SPIRIN i anomenats *informosomes*. La formació d'aquests complexos a nivell del nucli i llur dissociació a

nivell dels ribosomes, són reaccions fàcilment reversibles i influenciables, condicionadores del transport dels ARN missatgers des del nucli fins als ribosomes. L'investigador més amunt alludit atribueix als informosomes, a més de la funció de transport, un efecte protector dels ARN missatgers i un valor regulador de la síntesi de proteïnes.

Segons SPIRIN, les possibilitats de transport i lliurament dels ARN missatgers podrien condicionar la síntesi de proteïnes d'una manera decisiva. Fins i tot és possible que algunes variacions de la síntesi d'enzims, explicades fins ara per influències a nivell del mecanisme genètic de repressió, siguin degudes a variacions del transport dels ARN missatgers i a influències exercides a nivell de les reaccions reversibles de formació i de dissociació dels informosomes corresponents.

Deixant a part el possible encert d'aquestes interpretacions, les dades aportades per SPIRIN tenen almenys el valor d'un argument més per a justificar la importància creixent que diversos investigadors han atribuït darrerament a les *unions proteïques dels àcids nucleics*. Mentre que, fins fa poc, l'atenció dels investigadors de la síntesi proteica es limitava als àcids nucleics, actualment hom atribueix també importància a les fraccions proteïques, principalment a les histones, com a factors capaços de condicionar i regular la síntesi de proteïnes.

Entre nosaltres, a Barcelona, el professor SUBIRANA i els seus col·laboradors han dut a terme investigacions sobre les interaccions dels àcids desoxiribonucleics amb les histones i les protamines. SUBIRANA<sup>8</sup> suposa que les proteïnes bàsiques nuclears poden condicionar o regular la síntesi de proteïnes d'una manera especial, no limitada a una simple acció repressora.

#### CONTROL DE LA CONCENTRACIÓ ENZIMÀTICA PEL CATABOLISME DELS ENZIMS

Fins fa poc les variacions de la concentració celular d'enzims eren atribuïdes principalment a l'augment o a la disminució dels processos de síntesi, i hom gairebé no feia referència al catabolisme o destrucció fisiològica dels enzims com a factor de variació de la concentració enzimàtica.

Darrerament les inactivacions irreversibles d'alguns enzims, observades en condicions normals, han desvetllat l'interès envers el possible valor funcional de tals inactivacions, provocades per factors o circumstàncies fisiològics.

Les molècules enzimàtiques que sofreixen una inactivació irreversible no poden tenir altre destí que el de llur desintegració pels processos normals del catabolisme proteic. Per tant, les inactivacions irreversibles que es produeixen en condicions fisiològiques poden ésser considerades com un primer pas del catabolisme normal dels enzims. D'això hom dedueix que

els factors fisiològics capaços de provocar inactivacions irreversibles poden actuar com a agents reguladors de la concentració enzimàtica i donar lloc així a efectes de regulació de les reaccions metabòliques.

Entre els fenòmens d'inactivació irreversible observats en condicions fisiològiques, són especialment interessants els d'alguns enzims que resulten inactivats per concentracions normals de productes o de substrats participants en el mateix cicle metabòlic.

En qualsevol cicle metabòlic, els productes d'una reacció enzimàtica passen a ésser substrats d'un altre enzim, de manera que s'estableix una dependència en cadena entre les successives reaccions del cicle. A més d'aquesta relació encadenada entre reaccions immediates, alguns substrats o productes metabòlics poden influir també altres reaccions més o menys llunyanes del mateix cicle mitjançant efectes modificadors de l'activitat o de la concentració dels enzims corresponents.

Les variacions de concentració enzimàtica produïdes per l'alteració de la síntesi són les més conegudes i ja han estat exposades en descriure els efectes d'inducció i de repressió; poden ésser provocades per l'acció dels substrats o dels metabòlits intracel·lulars a nivell de qualsevol de les múltiples reaccions involucrades en els processos de síntesi. Les variacions de concentració enzimàtica provocades per l'acció dels substrats i de productes metabòlics en els processos d'inactivació i catabolisme dels enzims són encara poc conegudes, però cal tenir-les en compte i és probable que elles resultin cada dia més importants per a la regulació del metabolisme.

GRISOLIA <sup>1, 2</sup> ha cridat l'atenció envers aquest darrer tipus d'autoregulació i suposa que l'enzim, en presència de substrats i cofactors o per la influència de productes i factors metabòlics normals, pot sofrir canvis de configuració, les anomenades *modificacions elastoplàstiques de la proteïna enzimàtica*, que alteren l'estabilitat molecular, comporten la inactivació i faciliten el catabolisme de l'enzim. Les modificacions elastoplàstiques són relativament inespecífiques i els agents que les provoquen són productes o factors metabòlics normals que no tenen relació directa amb el grup actiu ni amb els grups anomenats alostèrics.

Segons aquesta hipòtesi, l'enzim, si bé no és consumit per la reacció catalitzada, pot resultar inactivat, dins la cèl·lula i en condicions normals, per substrats i productes del mateix cicle metabòlic o relacionats amb l'activitat de l'enzim. D'aquesta manera indirecta, per les anomenades modificacions elastoplàstiques, la mateixa activitat enzimàtica provocaria la inactivació o un cert desgast de l'enzim, amb una pèrdua d'estabilitat de la proteïna enzimàtica, que facilitaria el catabolisme i limitaria la «vida» o la persistència intracel·lular de l'enzim actiu. Aquests processos normals de destrucció obligarien a una renovació constant del

contingut intracel·lular d'enzims, cosa que explicaria, segons GRISOLIA, el gran dinamisme del metabolisme proteic en els éssers vivents.

GRISOLIA i els seus col·laboradors han descobert que l'enzim glutàmicodeshidrogenasa, relacionat amb la ureogènesi, és acilat i resulta inactivat per concentracions normals de carbamil-fosfat, producte intermediari del cicle de la ureogènesi, i consideren aquesta inactivació com una varietat de modificació elastoplàstica, provocada per l'acilació de la proteïna enzimàtica. A més, han demostrat que l'acilació pel carbamil-fosfat pot afectar també proteïnes no enzimàtiques, especialment les histones amb contingut abundant de lisina i d'arginina, i pot ésser interferida per l'enzim acil-fosfatasa, capaç d'hidrolitzar el carbamil-fosfat. Això sembla indicar que la inactivació fisiològica de l'enzim glutàmicodeshidrogenasa pel carbamil-fosfat depèn de diversos factors metabòlics, uns de favorables i uns altres de desfavorables, i permet de suposar que tots plegats poden contribuir a regular la ureogènesi, ja que l'enzim glutàmicodeshidrogenasa resulta decisiu per al funcionament del cicle.

Malgrat que de l'estabilitat dels enzims dintre la cèl·lula i dels factors que la condicionen, igual que del catabolisme normal dels enzims, hom en coneix poca cosa, podem suposar que depenen de processos fisiològics múltiples i diversos, potser més nombrosos i variats que els que contribueixen a la síntesi dels enzims. Les variacions d'aquells processos i els factors que els controlen poden provocar canvis de concentració enzimàtica més ràpids i més importants que els deguts a variacions de la síntesi d'enzims. A més, en moltes adaptacions dels enzims intracel·lulars, és probable que les variacions dels processos d'inactivació siguin primàries i que les variacions de la síntesi es produeixin secundàriament, a remolc de les necessitats suscitées pel catabolisme dels enzims.

Tenint present que per a mantenir la constància del contingut enzimàtic intracel·lular cal que la síntesi s'adapti al catabolisme dels enzims, hom pot suposar que les alteracions ocasionals i passatgeres de la concentració enzimàtica, fisiològiques, poden presentar-se més aviat per variacions del catabolisme que per variacions de la síntesi. Els processos de síntesi només donarien lloc a variacions del contingut enzimàtic d'una manera eventual, en fracassar llur adaptació al catabolisme dels enzims.

Amb el temps, quan els processos normals d'inactivació i catabolisme dels enzims siguin més coneguts que ara, és probable que llur influència reguladora del metabolisme resulti evident i superior a la dels processos de síntesi. Aleshores, la regulació de la síntesi enzimàtica seguirà éssent important per a explicar les anomalies i algunes desviacions metabòliques, però ho seria menys per a explicar la regulació del metabolisme en condicions normals i patològiques.

## VARIACIONS DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA I DEL SEU VALOR REGULADOR

Després d'ésser sintetitzades i alliberades pels poliribosomes, les proteïnes enzimàtiques solament poden actuar com a enzims si el grup actiu és en forma reactiva, apte per a reaccionar amb el substrat. L'adopció de la forma reactiva, o *activació de la proteïna enzimàtica*, depèn dels diversos factors i de les circumstàncies que poden influir o modificar la molècula proteica i repercutir en l'afinitat o capacitat de reacció del grup actiu.

En uns casos, l'activació depèn simplement de circumstàncies ambientals inespecífiques, com el pH o la presència de diversos ions, que condicionen la ionització de la proteïna enzimàtica a nivell del grup actiu o en les seves proximitats. En altres casos, l'activació depèn de factors més o menys específics, que provoquen canvis de configuració en la proteïna enzimàtica i en el grup actiu. En el cas dels anomenats zimògens o pre-enzims, l'activació és el resultat de veritables reaccions químiques que modifiquen l'estructura de la proteïna i del grup actiu mitjançant la incorporació o la separació d'algun component.

El canvi o la reacció química que converteix la proteïna enzimàtica en l'enzim actiu pot dependre també de l'acció d'altres enzims més o menys específics. En aquest cas, l'activació és una reacció enzimàtica i pot ésser condicionada per diversos factors activadors o inhibidors, involucrats de manera que la conversió de la proteïna enzimàtica en l'enzim actiu es produeixi sols en determinats llocs i en determinades ocasions o circumstàncies.

La necessitat d'activar la proteïna enzimàtica, o de convertir el pre-enzim en l'enzim actiu, comporta una possibilitat de regulació molt important, ja que permet de controlar el lloc, el moment i la intensitat de l'acció enzimàtica, per mitjà dels factors activadors i dels que s'oposen a l'activació.

Les activacions de proteïnes enzimàtiques més evidents i conegudes són les que tenen lloc en el medi extracel·lular, com les dels enzims digestius, segregats per les cèl·lules en forma de pre-enzims i activats en el tub digestiu. També actuen en el medi extracel·lular, on arriben en forma de pre-enzims i pendent de complicats mecanismes d'activació, alguns enzims que catalitzen importants processos fisiològics i de defensa o protecció, com els de la coagulació de la sang.

Les activacions de proteïnes enzimàtiques que tenen lloc en el medi intracel·lular no són tan fàcilment demostrables, però hom en coneix ja algunes de prou importants per a poder atribuir a aquestes activacions

i als factors que les determinen o condicionen un gran valor regulador de l'acció enzimàtica i del metabolisme.

Entre els activadors i els inhibidors intracel·lulars cal distingir especialment els que provoquen les anomenades *variacions allostèriques de l'activitat enzimàtica*, a les quals hom atribueix actualment una gran importància per a la regulació del metabolisme.

En aquests darrers anys, hom ha demostrat que alguns enzims varien en llur activitat, i resulten inhibits o activats, per la presència de certs productes o factors metabòlics, els efectors allostèrics, que intervenen no com a cosubstrats o cofactors sinó com a «senyals metabòlics» orientadors i reguladors de l'activitat enzimàtica. Mentre la relació dels cosubstrats o cofactors amb l'enzim s'estableix a nivell del grup actiu, els efectors allostèrics actuen en un altre lloc o grup específic de la proteïna enzimàtica, on poden ésser fixats de manera reversible. Aquest altre lloc o grup específic fou anomenat allostèric per MONOD, CHANGEUX i JACOB<sup>3</sup>, i el mateix qualificatiu fou aplicat, per extensió, als enzims posseïdors de grups allostèrics i als productes o factors metabòlics que s'hi fixen i fan variar, ensems, l'activitat enzimàtica (efectors allostèrics).

La fixació de l'efector específic, inhibidor o activador, en el lloc allostèric de l'enzim, provoca un canvi de configuració de la proteïna enzimàtica que repercuteix en el grup actiu disminuint o augmentant la seva afinitat per a reaccionar amb el substrat. La fixació de l'efector i la modificació de l'enzim són reversibles, de manera que l'efector es pot separar sense experimentar transformacions i l'enzim recobra tot seguit la forma i l'activitat que tenia abans de fixar l'efector allostèric.

La propietat reguladora dels enzims allostèrics depèn d'ells mateixos, ja que els efectors allostèrics, amb llurs variacions de concentració, sols tenen el valor funcional de senyals metabòlics, per a orientar i graduar l'activitat enzimàtica de manera que resulti adaptada a les necessitats del metabolisme. Mitjançant investigacions i arguments d'ordre cinètic, ha estat demostrat que la capacitat receptora i la resposta d'adaptació d'aquests enzims reguladors depenen de la possessió dels grups específics o llocs allostèrics, diferents del lloc actiu. Fins i tot és possible «insensibilitzar» la propietat receptora i suprimir la resposta d'adaptació dels enzims allostèrics, per certs factors o influències que ocupen i priven el grup allostèric, sense resultar anul·lada l'aptitud catalítica de l'enzim, depenent del grup actiu.

És notable que la majoria dels enzims coneguts fins ara com a allostèrics són iniciadors de cicles metabòlics o tenen accions que resulten decisives per a orientar la direcció del metabolisme en els entrecreuaments de diverses vies metabòliques. Per exemple, l'enzim aspàrtico-transcarbamilasa, els substrat i cosubstrat del qual són el carbamilsfosfat i l'àcid aspàrtic,

inicia la biosíntesi de les pirimidines i pot ésser activat o inhibit, com a enzim al·lostèric, pels nucleòtids ATP i CTP, de manera que la síntesi pirimidínica progressa o no segons predomini l'ATP o el CTP, els quals actuen com a efectors al·lostèrics, activador el primer i inhibidor el segon.

SOLS <sup>5, 5'</sup> i els seus col·laboradors de l'Institut de Enzimologia de Madrid, han investigat les propietats al·lostèriques de dos enzims molt importants i decisius per a la regulació de la glucòlisi: l'enzim glucoquinasa hepàtica, que inicia el metabolisme de la glucosa en catalitzar la formació de glucosa-6-fosfat, i l'enzim fosfofructoquinasa, que determina el curs progressiu de la glucòlisi fins a formar finalment ATP. Aquest nucleòtid actua com a inhibidor al·lostèric de l'enzim fosfofructoquinasa, de manera que la intensitat de la glucòlisi resulta autoregulada pel nivell d'ATP, que és a la vegada producte final, portador de l'energia i efector o regulador al·lostèric de tot el procés.

En els exemples esmentats, quan els efectors al·lostèrics procedeixen del metabolisme cel·lular i no depenen d'influències extrínseques, les variacions al·lostèriques de l'activitat enzimàtica han d'ésser considerades com a un mecanisme de regulació intrínseca. Si els efectors al·lostèrics són substàncies exogèniques, arribades del medi exterior o produïdes per altres cèl·lules del mateix organisme (metabòlits, hormones, transmissors nerviosos), les variacions al·lostèriques de l'activitat enzimàtica han d'ésser considerades com a un mecanisme de regulació extrínseca. Alguns efectors al·lostèrics s'originen i actuen en la mateixa cèl·lula, però llur síntesi és determinada o condicionada per hormones o missatgers exogènics.

Dels agents o metabòlits intracel·lulars que exerceixen accions reguladores dins la mateixa cèl·lula d'origen, hom podria dir que són missatgers o *hormones intracel·lulars*, les anomenades citohormones o citomones, sigui el que sigui llur mecanisme d'acció, al·lostèric o de qualsevol altre tipus.

En els exemples d'enzims al·lostèrics abans esmentats, el caràcter hormonal dels efectors al·lostèrics és indiscutible, per tal com són nucleòtids l'adenosina-trifosfat (ATP) i la citidina-trifosfat (CTP), que intervenen en el metabolisme com a cosubstrats i l'acció reguladora dels quals apareix com a sobreafegida o secundària. En canvi, d'altres efectors al·lostèrics que s'originen i actuen en la mateixa cèl·lula tenen una missió purament reguladora i mereixen amb tota propietat el nom d'hormones intracel·lulars.

El més important o conegut dels efectors al·lostèrics amb funció purament reguladora és l'àcid *adenilic cíclic* (AMP cíclic), que s'origina en el metabolisme cel·lular, a partir de l'ATP i per l'acció de l'enzim adenilciclase. Dins la mateixa cèl·lula on s'origina, l'àcid adenilic cíclic actua d'agent hormonal capaç de regular processos metabòlics tan diversos com la síntesi i la desintegració del glucogen en els teixits hepàtic i muscular,



la lipòlisi en el teixit adipós, la formació i secreció d'hormones en algunes glàndules endocrines, etc.

Dels diversos efectes reguladors atribuïts a l'àcid adenílic cíclic, els més coneguts són els corresponents a la síntesi i a la desintegració del glucogen. L'àcid adenílic cíclic influeix aquests processos actuant com a efector al·lostèric capaç d'activar reversiblement dos enzims, un que modifica l'enzim glucogen-sintetasa, amb el resultat de disminuir la síntesi de glucogen, i un altre que modifica l'enzim glucogen-fosforilasa, amb el resultat d'augmentar la glucogenòlisi. Per aquests mecanismes, complexos i de doble via, l'àcid adenílic cíclic exerceix una important acció reguladora del metabolisme dels glúcids, posada de manifest per dos efectes simultanis, l'activació de la glucogenòlisi i la inhibició de la síntesi del glucogen.

En relació amb el metabolisme del glucogen, no serà per demés esmentar, encara que sigui sols de passada, les importants contribucions de ROSELL i col·laboradors (*Estudis en els sistemes enzimàtics de la biosíntesi de glucogen*), amb les quals ha investigat les propietats i modificacions de l'enzim glucogen-sintetasa en cèl·lules diverses, de teixits i espècies diferents.

La formació intracel·lular de l'àcid adenílic cíclic per l'acció de l'enzim adenil-ciclasa, està sota el control de diverses hormones i transmissors exògens. El glucagon, l'adrenalina, la noradrenalina, l'ACTH i la serotonina activen l'enzim adenil-ciclasa i augmenten la formació d'àcid adenílic cíclic, i així hom pot explicar llurs efectes d'augment de la glucogenòlisi i de disminució de la síntesi del glucogen. L'efecte d'estimular la lipòlisi, que tenen les mateixes hormones, és explicat igualment per llur acció d'augmentar la formació d'àcid adenílic cíclic en les cèl·lules adiposes. A la inversa, la insulina fa disminuir la concentració d'àcid adenílic cíclic i, per això, provoca els efectes antagònics d'accelerar la síntesi del glucogen i de frenar la glucogenòlisi i la lipòlisi.

En el teixit ossi, la concentració d'àcid adenílic cíclic augmenta per la influència de la hormona paratiroidea i disminueix per l'acció de la tirocalcitonina, cosa que està d'acord amb l'antagonisme dels efectes metabòlics d'ambdues hormones. FORN DALMAU ha contribuït a investigar el control neuro-hormonal de la formació d'àcid adenílic cíclic en el teixit nerviós.

Per l'acció d'un enzim fosfodiesterasa, l'àcid adenílic cíclic produït dins les cèl·lules resulta hidrolitzat i passa a la forma oberta (AMP), inactiva. Qualsevol factor capaç d'influir aquesta reacció pot fer variar la concentració d'àcid adenílic cíclic i determinar que els seus efectes metabòlics resultin més o menys intensos i persistents. La tirocalcitonina és capaç d'activar l'enzim fosfodiesterasa, i aquesta acció fa disminuir la concentració d'àcid adenílic cíclic o s'oposa als seus augments. En canvi, algunes substàncies exògeniques, com la cafeïna o la teofilina, inactiven l'enzim fosfodiesterasa i donen lloc que els augments d'àcid adenílic cíclic, pro-

vocats per diverses hormones, resultin més elevats i persistents, cosa que comporta el reforçament de llurs efectes metabòlics.

Els efectes de les hormones que actuen per mitjà de la formació d'àcid adenílic cíclic són variables segons les cèl·lules, probablement per llurs distintes especialitzacions metabòliques i també, possiblement, per particularitats de les adenil-ciclastes corresponents (isoenzims?). En tot cas, els diversos efectes de regulació provocats per mitjà de l'àcid adenílic cíclic justifiquen que aquest nucleòtid especial sigui considerat com una hormona intracel·lular, capaç de regular i coordinar diversos processos de dins d'una mateixa cèl·lula (regulació intrínseca) i també, de transmetre i amplificar el missatge de les hormones o transmissors exogènics (missatger intracel·lular de les regulacions extrínseques).

#### INFLUÈNCIES I FACTORS DE REGULACIÓ QUE ACTUEN A NIVELL DE LA REACCIÓ ENZIMÀTICA

Després de considerar els mecanismes de regulació que actuen fent variar la concentració i l'activitat dels enzims, cal tenir present que la velocitat de la reacció enzimàtica depèn, també, de les concentracions dels substrats i dels cosubstrats i, de més a més, de les influències d'alguns factors i circumstàncies que poden accelerar o retardar la reacció.

Altrament, la presència d'estructures membranoses separa compartiments cel·lulars que comporten concentracions i circumstàncies físico-químiques diferents i variables. Això vol dir que cal comptar també amb la influència reguladora dels canvis de permeabilitat i dels factors capaços de provocar-los.

Tots aquests factors i influències, bé que no actuen a nivell de l'enzim, condicionen el resultat de l'acció enzimàtica i contribueixen així a regular el metabolisme cel·lular. Cal tenir-los en compte en exposar la regulació del metabolisme, però en podem prescindir si es tracta només d'explicar el control fisiològic dels enzims. Per això, i per no repetir conceptes de cinètica enzimàtica, propis de la bioquímica dels enzims, aquests factors i influències que actuen a nivell de la reacció enzimàtica són esmentats només com a mecanismes de regulació, però no correspon d'exposar-los en aquest resum, dedicat principalment a la fisiologia dels enzims.

## BIBLIOGRAFIA

1. GRISOLIA, S. — *The catalytic environment and its biological implications*. «Physiol. Rev.», 44: 657 (1964).
- 1'. GRISOLIA, S., i KENNEDY, J. — *On specific dynamic action, turnover and protein synthesis*. Perspectives in Biology and Medicine, 9: 4 (1966).
2. KREBS, H. A. — *Control of cellular metabolism*. «The molecular control of cellular activity», p. 279, McGraw-Hill Book Company, Nova York, 1962.
3. MONOD, J., CHANGEUX, J. P., i JACOB, F. — *Allosteric proteins and cellular control systems*. «J. of Molecular Biology», 6: 306 (1963).
4. PARDEE, A. B. — *Aspects of genetic and metabolic control of protein synthesis*. «The molecular control of cellular activity», p. 265, McGraw-Hill Book Company, Nova York, 1962.
5. SOLS, A. — *Regulation of glycolysis and gluconeogenesis at the enzyme level*. «Biochem. J.», 112: 2 (1969).
- 5'. SOLS, A., i MARCO, R. — *Concentrations of metabolites and binding sites. Implications in metabolic regulation*. «Current topics in cellular regulation», vol. 2, p. 227, Academic Press, Nova York, 1970.
6. SPIRIN, A. S. — Citat per ZH. A. MEDVEDEV, «Protein Biosynthesis», p. 538 (apèndix de la traducció anglesa), Oliver and Boyd, Edimburg i Londres, 1966.
- 6'. SPIRIN, A. S. — Conferència de clausura del 6th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies (FEBS), celebrat a Madrid, 1969.
7. STADIE, W. C. — *Current concepts of the action of insulin*. «Physiol. Rev.», 34: 52 (1954).
8. SUBIRANA, J. A. — *Histones and Differentiation*. «Macromolecules. Byosynthesis and function», p. 243, vol. 21, FEBS Symposium (Proceedings of the 6th Meeting, Madrid), Academic Press, Londres, 1970.
9. VILLEE, C. A. — *The role of steroid hormones in the control of metabolic activity*. «The molecular control of cellular activity», p. 297, McGraw-Hill Book Company, Nova York, 1962.