

LA GENÈTICA DE LES IMMUNOGLOBULINES

per JOSEP VIÑAS

Em proposo de parlar d'un tema que planteja uns problemes únics en la biologia actual; veritables problemes de frontera entre genètica, estructura de proteïnes, regulació de la diferenciació, proliferació cel·lular i altres. El presento avui en recerca de suggeriments, discussió i, si pot ésser, de nous punts de vista per a qüestions que encara no tenen una resposta satisfactòria.

Es tracta de les immunoglobulines, les proteïnes que constitueixen els anticossos. Per tal de centrar una mica el problema i que no ens puguin dir que filosofem, començaré per presentar unes fotografies en què veiem molècules d'anticòs. Hi són evidents unes estructures en forma de triangles i de quadrilàters. Aquestes imatges han estat obtingudes fent reaccionar un antigen molt petit, però amb dos determinants antigènics, amb l'anticòs específic corresponent. Com que cada molècula d'anticòs té dos llocs reactius, es formen unes estructures, que, vistes al microscopi electrònic, considerablement augmentades, donen imatges compostes per 3 o 4 molècules d'anticòs; l'antigen és massa petit per a ésser visualitzat. Hom pot veure-hi que la molècula d'anticòs té la forma de la lletra «Y». Els llocs actius, que són els que permeten a l'antigen de fixar-se específicament, es troben situats a l'extrem dels braços curts.

És bastant ben coneguda l'estructura interna d'aquestes proteïnes, especialment l'estructura primària. Sabem que es componen de quatre cadenes d'aminoàcids (quatre polipèptids) unides per enllaços sofre (S-S). Dues d'aquestes cadenes tenen una llargada d'uns 200 aminoàcids, són denominades cadenes lleugeres, i en una mateixa molècula són idèntiques entre elles. Les altres dues també són idèntiques entre elles però diferents de les primeres, i són aproximadament el doble de llargues. Aquestes últimes són denominades cadenes pesants perquè a l'ultracentrífuga sedimenten més ràpidament. Cada cadena lleugera es compon de dues unitats amb una simetria estructural marcada pels respectius enllaços entre cadena de tipus S-S que uneixen punts situats uns 60 aminoàcids a part. Les

cadena pesants tenen quatre enllaços d'aquests, és a dir que repeteixen quatre vegades el mòdul bàsic, en comptes de dues.

És important de constatar que l'especificitat de la molècula de l'anticòs depèn de la composició de la meitat terminal de les cadenes lleugeres i de la quarta part terminal de les cadenes pesants. D'aquesta zona de la molècula d'anticòs on radica l'especificitat, se'n diu zona variable de les cadenes lleugeres i pesants, respectivament.

Ha pogut ésser analitzada la seqüència d'aminoàcids d'un cert nombre d'aquestes cadenes, especialment de lleugeres, i això és el que ha permès de veure que, efectivament, no n'hi ha dues d'iguals pel que fa al tros variable. Per contra, la resta de la cadena té una composició ben definida i constant de molècula a molècula, com és corrent en les altres proteïnes.

Arribats en aquest punt crec que interessa d'agafar com a referència una família de proteïnes de composició ben coneguda i d'herència i regulació cel·lular típiques. Prendrem l'hemoglobina com a exemple. Tots sabem que l'hemoglobina es compon de 4 polipèptids —concretament l'hemoglobina humana «normal», de tipus adult, es compon de dues cadenes α i dues cadenes β d'estructura perfectament coneguda. El que interessa recordar aquí és que tot individu normal té en el seu genoma una sèrie de gens que especifiquen cadenes peptídiques similars a les α i β i que corresponen o bé a tipus d'hemoglobina que s'expressen gairebé exclusivament en unes certes etapes de la vida embrionària o bé a la mioglobina. Hom creu que aquest grup de gens, presents en tota cèl·lula normal, constitueix una família de gens que han anat apareixent gradualment, en el curs de l'evolució, per duplicacions i acumulació de mutacions a partir d'un sol gen ancestral. La regulació inter- i intracel·lular és la que fa que els precursors dels glòbuls vermells fabriquin hemoglobina i no mioglobina i que les diverses hemoglobines apareguin en períodes ben definits del desenvolupament embrionari. Cada tipus de polipèptid, però, es transmet invariablement de generació en generació. D'altra banda, cal tenir en compte que, de tant en tant, apareixen mutacions en aquests gens i que aquestes mutacions determinen l'aparició de variants de l'hemoglobina que poden ésser responsables de defectes hereditaris. Aquestes mutacions, però, consisteixen en simples substitucions d'un aminoàcid per un altre, en un tipus determinat de cadena, i es transmeten seguint perfectament les lleis mendelianes de l'herència.

Ara podem tornar a les immunoglobulines. Aquí també coneixem un grup de polipèptids emparentats que probablement han aparegut per duplicacions i mutacions. Concretament coneixem dos tipus de cadenes lleugeres (κ , λ) i cinc tipus principals de cadenes pesants (γ , α , μ , δ , ϵ), a més d'alguns subtipus. Per tipus entenem cadenes determinades per llocs

diferents del genoma, independentment que per a cadascun hi pugui haver formes al·lèliques.

Les cadenes pesants són les que determinen la classe a què pertany cada molècula d'immunoglobulina i àdhuc les seves propietats biològiques (no l'especificitat, que depèn del tros variable). Així direm que, segons el tipus de cadena llarga, pertanyen a la classe IgG, IgA, IgM, IgD o IgE, respectivament. Dins cada classe, les cadenes lleugeres poden ésser indistintament de tipus α o λ .

Fins aquí tot resulta comparable al cas de les hemoglobines. També hom suposa que tota aquesta família de proteïnes deriva d'un gen ancestral comú per duplicacions i divergències dels gens redundants. En aquesta família podrien ésser-hi inclosos, per llur similitud, no solament diversos tipus de cadenes de les immunoglobulines, sinó també les de les haptoglobines. Com a dada curiosa, puc mencionar que hom observa més divergència entre les cadenes α i λ humanes que entre les cadenes α de l'home i de la rata. Això ens permet de deduir que la diferenciació entre cadenes α i λ és molt més llunyana que l'aparició dels mamífers.

La mateixa estructura d'aquests polipèptids fa pensar que la cadena ancestral més primitiva tenia la llargada, aproximadament, de mitja cadena lleugera actual, és a dir, uns 100 aminoàcids. Del gen primitiu hauria aparegut la cadena curta primitiva per reduplicació, i d'aquesta haurien divergit les cadenes α i λ després d'una duplicació. Les cadenes pesants serien el resultat de reduplicació de la cadena curta ancestral i posterior divergència.

El panorama canvia considerablement i es complica amb la introducció del concepte de zona variable i en considerar la manera particular amb què és regulada la fabricació d'aquest tipus de proteïnes.

Tots sabem que quan un animal rep un estímul antigènic, respon amb la producció d'anticossos específics per a aquest antigen. Aquesta especificitat depèn de l'estructura del tros variable de cadenes llargues i curtes. Cal tenir present que hi ha una gamma gairebé infinita d'antígens de composició química variadíssima. També cal insistir sobre el fet que quan en un animal apareixen anticossos específics per a un antigen, solen pertànyer alhora a més d'una classe.

Per tal d'explicar aquests fets, en teoria es plantegen dues possibilitats: o bé l'antigen modela l'estructura del tros variable de les immunoglobulines, o bé hi ha una gran varietat de genomes amb la porció variable diferent, i l'antigen determina el funcionament dels més apropiats. La primera possibilitat resulta difícil de sostenir en l'actualitat. Ens quedem, per tant, amb la segona.

Un primer problema consisteix a explicar l'existència d'un nombre tan elevat de gens que divergeixen tant en un tros determinat mentre man-

tenen la resta constant. Sobretot tenint en compte que això hauria d'haver ocorregut paral·lelament en una sèrie de polipèptids semblants.

Un segon problema seria d'arribar a explicar el mecanisme pel qual l'antigen selecciona la producció de l'anticòs corresponent.

Per tal d'explicar el primer punt, han estat proposades una sèrie de teories que poden ésser agrupades en tres grups principals. Per a alguns el genoma de cada cèl·lula porta totes les variants possibles aparegudes per duplicacions consecutives del gen primitiu de cada tipus de polipèptid. En aquest cas es topa amb la dificultat d'haver d'admetre que la part variable ha divergit considerablement mentre la constant s'ha mantingut immutable. Per a uns altres la porció variable de cada tipus de cadena té una especial mutabilitat i les cèl·lules immunocompetents, en el curs de les successives divisions somàtiques, constitueixen una sèrie de clons amb constitució genètica diferent pel que afecta els trossos variables de les diverses cadenes de les immunoglobulines. Finalment, un tercer grup proposa que el tros variable i el constant es troben en llocs separats del cromosoma. Aquests dos trossos es poden unir a nivell d'ARN missatger o bé un cop formats els polipèptids. Subsisteix en tot cas la doble possibilitat que el tros «variable» sigui genuïnament variable o bé que cada cèl·lula tingui representat en el genoma un gran nombre de gens variants però que només un funcioni a la vegada.

Quant a l'altre problema, o sigui la forma en què l'antigen selecciona o estimula la producció d'anticòs específic, també vull dir dues paraules abans de passar a la discussió. Hi ha bàsicament dues possibilitats. O bé l'antigen selecciona del genoma de cada cèl·lula el tipus de cadenes que ha de produir, o bé estimula precisament les cèl·lules que ja són predestinades, compromeses, a fabricar el tipus de cadenes específic per a aquest antigen. D'aquestes dues possibilitats, avui hom tendeix a acceptar la segona sense prejudicar el mecanisme pel qual han arribat a existir els clons de cèl·lules predestinades a fabricar un determinat tipus de variants de cadenes lleugeres i cadenes pesants.

Si hom accepta la idea que en tot individu immunològicament actiu hi ha una sèrie de clons de cèl·lules immunològicament competents, no actives, però compromeses a fabricar un tipus determinat de cadenes, la majoria de dades de la bibliografia reforcen la noció que aquestes cèl·lules tenen expressades en llur membrana, a manera de mostra, el tipus d'immunoglobulina que són predestinades a fer. En aquest cas l'antigen es combinaria específicament amb la superfície de les cèl·lules del clon corresponent i aquest contacte induiria per un mecanisme o altre la transformació i proliferació de la cèl·lula. Aquest fenomen, repetit en un gran nombre de cèl·lules, constituïria la base de la resposta immunològica. En altres circumstàncies, el contacte específic de l'antigen amb les cèl·lules

corresponents, en comptes de proliferació i diferenciació, podria provocar la destrucció cel·lular. Això constituiria la base de la inducció de tolerància. El que es produeixi l'un o l'altre d'aquests efectes dependria de les concentracions relatives, de l'experiència immunològica anterior o de l'estat físic de l'antigen. Hom ha vist, per exemple, que uns antigens determinats indueixen fàcilment tolerància quan són injectats en forma soluble, mentre que immunitzen quan són injectats en forma de partícules. Sembla que en aquest sentit té bastant d'importància la fagocitosis. El contacte directe de l'antigen amb la cèl·lula específica induiria tolerància, mentre que el pas previ pel macròfag facilitaria la inducció de resposta immunològica.

Nota. — Mentre estava en premsa aquest treball han sortit algunes publicacions que contribueixen a reforçar notablement la teoria que la zona veritable de les cadenes lleugeres i pesants és heretada per respectius polígens distints dels gens corresponents a les zones constants. Hom recomana al lector interessat la següent

BIBLIOGRAFIA

1. HEINZ KOLER, AKIRA SHIMIZU, CLAUDINE PAUL, VIRGINIA MOORE and FRANK W. PUTNAM: *Three variable-gene pools common to IgM, IgG and IgA immunoglobulins*. «Nature» 227, 1318 (1970).
2. LEROY HOOD and DAVID W. TALMAGE: *Mechanism of antibody diversity: germ line basis for variability*. «Science» 168, 325 (1970).
3. LEROY HOOD, KLAUS EICHMANN, HENRY LACKLAND, RICHARD M. KRAUSE and JACK J. OHMS: *Rabbit antibody light chains and gene evolution*. «Nature» 228, 1040 (1970).

DISCUSSIÓ

FONTDEVILA

El model exposat resulta força explicable. La replicació dels gens i la seva incorporació a l'ADN com a templets de les possibles cadenes variables, juntament amb l'eliminació de les mutacions desfavorables de la cadena constant per selecció, produiria una gran variabilitat genètica. L'antigen actuaria com a depressor d'aquestes zones reprimides d'ADN.

VINAS

En les cadenes pesants hi ha unes dotze classes heretades de zona fixa; les cadenes curtes són de dues classes com a mínim. Són fabri-

caades independentment i el que és específic és la molècula sencera i no els pèptids per ells mateixos.

El que hauríem d'acceptar és que el gen ancestral primer era de la llargada de mitja cadena curta i passà a cadenes llargues per desdoblament.

En l'evolució hauria estat seleccionant i variant un tros mentre en l'altre hauria estat guardada una alta variació mutacional. Costa de pensar que hi hagi polipèptids amb mutacions acumulades en un sol tros. A més es repeteix de manera paral·lela i variable en 15 o 16 proteïnes diferents.

FONTDEVILA

Cal observar que la selecció natural és un procés negatiu i pot conservar els caràcters neutres que en canviar en el futur l'ambient poden passar a tenir valor selectiu.

ROSELL

Aparentment la fabricació d'anticossos es fa de la forma clàssica de les proteïnes i pressuposa missatger i gen específics. En alguns cromosomes de cèl·lules especialitzades en la fabricació d'anticossos hi ha un gen preformat fins a un cert punt i un altre d'amotllable al que succeeixi.

VINAS

Sembla poc possible l'existència d'un tros de gen que funcioni bé i d'un altre que no.

ROSELL

És quasi impossible de pensar que tenim tots els anticossos previstos i per preveure, més o menys 50.000 gens per a tot el que pugui passar.

SUBIRANA

En els organismes superiors el que passa del nucli al citoplasma és ARN informacional. Tenim una seqüència específica que es va canviant i que quan és útil s'estabilitza i dona ARN missatger.

VINAS

La cèl·lula es troba normalment en repòs i amb poc ARN. Quan és estimulada dona més ARN. Pot ésser que en fabricar ràpidament ARN no doni lloc a canvis.

PREVOSTI

Hom pot pensar que hi ha un grup de gens que controlen els diversos antígens. Per tal de saber-ho, hom podria cercar en individus diferents la producció d'anticossos idèntics. També ens ajudaria a comprendre-ho el coneixement de la variabilitat d'aquests anticossos en un mateix individu o cèl·lula. Quines dades hi ha sobre aquestes qüestions?

VINAS

Fins i tot en individus iguals hi ha anticossos amb cadenes diferents.

Les cèl·lules tumorals donen un sol clon (anticòs) i totes les proteïnes que fabriquen són iguals. El tros variable no varia. Sembla que generalment una cèl·lula fabrica un sol tipus de motlle.

PREVOSTI

En comparar les seqüències variables dels individus, ¿n'hi ha algunes que coincideixin?

VINAS

No se sap en el moment actual.

PREVOSTI

Per tal de saber si hi ha base genètica sembla que el mecanisme més suggestiu és el de la repetició. La repetició de gens en una taxa molt alta no és estranya; en *Xenopus* hom coneix 1.500 còpies dels gens fets ARN ribosomàtic. L'aplicació de la selecció en la zona variable permet una àmplia gamma de possibilitats. És conegut el fet que hi hagi moltes rèpliques d'un gen.

VINAS

Així no molesta en un principi la idea que la resta sigui tan estable?

PREVOSTI

El polimorfisme no molesta; sí, però, l'augment de variabilitat.

VINAS

Hom ha volgut explicar-ho tot per *crossing-over* interns entre templets del mateix cromosoma. És raonable?

PREVOSTI

És possible. Això donaria una recombinació gran que donaria aquesta gamma.

ROSELL

Aquesta recombinació hauria de parar-se en arribar en un moment donat, i d'adaptar-se a l'antigen que entra en l'organisme.

VINAS

Han d'existir clons prefabricats, diferents, que són seleccionats per l'antigen.

ROSELL

Hi ha poques dades d'anàlisi seqüencial.

VINAS

Són ben conegudes les cadenes curtes i que poden ésser tingudes pures. Les altres són més difícils; n'han d'ésser dissociats els pèptids i això dóna inseguretat. Les dades més completes fan referència a les cadenes curtes de ratolí i d'home.

FERRER

¿Quina explicació té la mortalitat extremada en les malalties infeccioses? ¿Pot ésser que la fabricació d'antigen estigui repartida entre diferents tipus de cèl·lules?

VINAS

Pot ésser que hi hagi una certa influència genètica perquè alguns individus tenen més facilitat per a formar uns certs anticossos. És difícil de saber, perquè això es troba condicionat als antigens que hi han tingut contacte anteriorment.