

SIGNIFICAT EVOLUTIU DELS POLIMORFISMES ENZIMÀTICS

per ROSER GONZALEZ i DUARTE

Quan parlem de polimorfismes enzimàtics ens referim a les diverses formes moleculars que depenen d'un locus i que coexisteixen en una població natural amb freqüències no massa baixes. Aquestes molècules presenten en la major part dels casos una funcionalitat qualitativament semblant i es distingeixen entre elles per la mobilitat electroforètica. Aquesta diferència de mobilitat és deguda a la diferència de càrregues elèctriques en la superfície de les proteïnes o molècules, bé pels diversos aminoàcids que ara la componen o bé per una diferent conformació també deguda principalment a la substitució d'un aminoàcid o més per d'altres.

Molts estudis recents han posat de manifest l'abundància de polimorfismes en poblacions naturals d'organismes molt diversos^{3, 11}. Si la causa de l'evolució molecular és la fixació d'alels neutres per deriva, o bé si és fruit de la selecció natural, és un problema que avui preocupa tots els qui treballen en genètica de poblacions. La gran variabilitat genètica, posada de manifest principalment emprant la tècnica d'electroforesi, presenta el problema del seu manteniment en les poblacions al llarg del temps. O bé actuen uns mecanismes selectius molt més estesos del que ara es creia, o bé la major part d'aquestes proteïnes són selectivament neutres i per tant continuen essent passivament fixades com a canvis evolutius per deriva genètica.

A causa de l'interès d'aquesta problemàtica, en el Departament de Genètica de la Universitat són duts a terme treballs sobre la variabilitat en sistemes d'isoenzims dels quals presentarem ací dades, referents a l'ADH de *D. subobscura*, obtingudes per M. CARME GONZÀLEZ, i especialment a esterases de la mateixa espècie, per l'autora.

Les dades que hom presenta il·lustren algunes de les situacions que es troben en les poblacions naturals.

FIG. 1. — FREQUÈNCIES GÈNIQUES DEL LOCUS PER A LES ALCOHOL DESHIDROGENASES

	MARROC			PENÍNSULA IBÈRICA								ESCÒCIA	
	Agadir (n=68)	Essaouira (n=52)	Asni (n=96)	Puerto de Sta. Maria (n=204)	Andratx (n=124)	Toro (n=158)	Ordesa (n=204)	Torla (n=165)	Prat de Llobregat (n=292)	Joncadella (n=56)	Llafranc (n=141)	Penicuik (n=60)	Bonnyrigg (n=168)
ad ^l	94,1	95,8	96,2	98,5	98,4	98,1	97,5	98,2	99,7	96,4	98,6	96,7	98,8
ad ^r	5,9	4,2	3,8	1,5	1,6	1,9	2,5	1,8	0,3	3,6	1,4	3,3	1,2

FIG. 2. — FREQUÈNCIES GÈNIQUES PER A L'ESTERASA LARVARIA (e')

	MARROC			PENÍNSULA IBÈRICA							ESCÒCIA	
	Agadir (n=101)	Essaouira (n=77)	Asni (n=103)	Puerto de Sta. Maria (n=31)	Andratx (n=46)	Toro (n=55)	Ordesa (n=84)	Torla (n=50)	Llafranc (n=220)	Penicuik (n=48)	Bonnyrigg (n=48)	
t ₁	4,9	2,6	—	—	4,3	5,4	3,6	4	2,7	—	4,2	
t ₂	10,9	15,6	20,4	—	6,5	—	16,7	10	12,7	4,2	4,2	
t ₃	42,6	37,7	43,7	29,0	41,3	47,3	54,7	42	52,3	54,1	62,5	
t ₄	37,6	42,8	35,9	67,8	47,9	47,3	25,0	44	30,9	41,7	22,9	
t ₅	4,0	1,3	—	3,2	—	—	—	—	1,4	—	6,2	

FIG. 3. — FREQUÈNCIES GÈNIQUES DEL SISTEMA e⁻⁵

	MARROC			PENÍNSULA IBÈRICA							ESCÒCIA	
	Agadir (n=48)	Essaouira (n=42)	Asni (n=92)	Puerto de Sta. Maria (n=204)	Andratx (n=187)	Toro (n=176)	Ordesa (n=224)	Torla (n=168)	Llafranc (n=272)	Penicuik (n=58)	Bonnyrigg (n=178)	
i ⁰	12,5	9,5	5,4	—	1,6	1,1	—	2,4	0,7	—	2,3	
i ¹	47,9	69,1	43,5	35,8	25,1	13,6	25,5	21,4	13,6	6,9	10,1	
i ²⁻⁵	39,6	21,4	46,7	62,2	70,1	80,7	71,4	71,4	77,6	77,6	73,0	
i ⁶	—	—	4,4	2,0	3,2	4,6	3,1	4,8	8,1	15,5	14,6	

Han estat estudiades al laboratori, mitjançant la tècnica d'electroforesi¹³, poblacions naturals de *D. subobscura* per tal d'analitzar-ne les freqüències gèniques per a les diverses formes moleculars de l'alcohol deshidrogenasa. Tant en les poblacions naturals com en d'altres mantingudes feia temps al laboratori han estat detectats 2 al·lells, dels quals el que migra menys cap a l'ànode és sempre molt més freqüent que l'altre. El gen que controla la síntesi d'aquest enzim està localitzat al cromosoma U.

Veiem que, si bé l'al·lel ràpid tendeix a ésser més freqüent en les poblacions de l'Àfrica que en les de la Península, les diferències són molt petites i hom no pot considerar que existeixi cap clina en aquest cas. Que les freqüències siguin semblants en les poblacions analitzades, és independent de les ordenacions cromosomàtiques que hom hi troba.

Han estat estudiades també les freqüències gèniques en 11 poblacions naturals per a una esterasa que apareix en les larves de *D. subobscura*. Aquest cas es diferencia de l'anterior en el fet que hom hi troba diversos al·lells, 3 dels quals presenten freqüències intermèdies en moltes poblacions. Per contra, coincideix amb el cas anterior en el fet que no hi ha una diferenciació clara i regular entre les poblacions.

No passa el mateix que en els casos anteriors amb les freqüències gèniques del sistema E-5 dels adults de *D. subobscura*. Hom hi observa clarament una clina per als al·lells 1^a i 1^b. L'al·lel 1^a presenta la freqüència més elevada a les poblacions del Marroc, decreix a la Península i presenta la freqüència més baixa a Edimburg. L'al·lel 1^b és inexistent en dues poblacions del Marroc; en l'altra població del Marroc i les de la Península, la freqüència és baixa, però ja comença a pujar a Llafranc, i troba la freqüència màxima a Penicuik i Bonnyrigg (poblacions properes a Edimburg).

L'al·lel 1^a té una freqüència semblant a les poblacions de la Península i a Edimburg, però més baixa a les poblacions del Marroc.

Per tractar d'explicar el significat evolutiu dels polimorfismes enzimàtics, considerarem primer els mecanismes selectius que podrien mantenir les diverses formes moleculars en les poblacions, i després la teoria que postula l'existència d'al·lells neutres i les limitacions d'ambdues teories. Això consistirà en un resum dels punts de vista de diferents autors, entre els quals cal esmentar KIMURA i CROW⁴, MAYNARD SMITH¹⁰, KOJIMA⁸ i LEWONTIN⁹, sobre els mecanismes de manteniment d'aquests polimorfismes.

Polimorfisme de transició. Podria donar-se el cas que el polimorfisme observat en la població natural no fos estable, pel fet d'haver estat detectat en un moment de transició d'un al·lel a l'altre. Bé que això pot donar-se en algun *locus*, és molt improbable que aquesta sigui la causa de tots els polimorfismes detectats en la població.

En estudis recents de l'home, *Drosophila*, granota, *Limulus*, ratolins, etcètera ¹², hom dedueix que aproximadament el 30 % dels *loci* són polimòrfics; sembla evident que almenys una part considerable d'aquests *loci* no pot ésser considerada en estat de transició.

Heterosi. Selecció a favor del heterozigots. El fenomen de l'heterosi pot ésser suficient per a explicar el manteniment d'una variabilitat gènica independentment de la mutació o de la migració. Això consisteix que en un *locus* l'heterozigot Aa és més viable que els homozigots respectius AA o aa. Un cas clàssic d'heterosi és el de la leucèmia falciforme descrita per ALLISON ¹. Els individus heterozigots presenten l'avantatge, respecte a la resta de la població, que són resistent a l'anèmia i a la malària. Fenòmens d'heterosi en inversions cromosomàtiques són freqüents en poblacions naturals i han estat molt estudiats per DOBZHANSKY ² en *D. pseudoobscura*. Ara bé, si considerem una població en la qual no un sinó molts *loci* són polimòrfics, i volem explicar el mecanisme de llur manteniment per l'heterosi, ens trobem que la pressió de selecció sobre aquesta població és enorme. Suposem que en una població de *Drosophila* la selecció de cada *locus* reduïx l'eficàcia de la població al 95 % del màxim; la capacitat reproductiva, suposant que 1/3 dels *loci* són polimòrfics (és a dir que aproximadament 2000 *loci* es mantenen per heterosi), es veuria reduïda al $(0,95)^{2000} = 10^{-48}$ del seu màxim. Si l'homozigot tenia el 98 % d'eficàcia respecte a l'heterozigot, la capacitat reproductiva es veuria reduïda en 10^{-2} . Tot i que en aquest segon cas la reducció és molt menor, la població hauria de suportar una càrrega genètica excessiva, i no és aquest el cas que trobem en les poblacions naturals.

Variació ambiental més migració. En alguns casos el manteniment de la variabilitat en un *locus* s'explica perquè si en un lloc de la distribució de l'espècie l'homozigot AA és més viable, en un altre el més viable és aa. Si a més s'esdevé un cert grau de migració entre l'un i l'altre, és molt probable que això doni lloc a una clina en les freqüències gèniques; i les poblacions locals seran polimòrfiques. Aquest és el cas en *Catostomus clarkii* descrit per KOEHN ⁷. Un aHel que determina la síntesi d'una esterasa és més freqüent en el naixement d'un riu on la temperatura és inferior a la de la desembocadura i on l'altre aHel és el més freqüent. Demuestra després *in vitro* que tant l'una esterasa com l'altra presenten la T òptima de reacció d'acord amb la T de l'aigua en què es troba l'aHel més freqüent.

Selecció dependent de la freqüència. Si per qualsevol causa cadascun dels homozigots AA i aa és més viable quan és menys freqüent, això dona

FIG. 4. — ESTIMACIÓ DE LA FREQUÈNCIA MITJANA DE LOCI POLIMÒRFICS PER POBLACIÓ I DE LA FREQUÈNCIA MITJANA DE LOCI HETEROZIGÒTICS PER INDIVIDU EN DIVERSES ESPÈCIES ANIMALS

ESPÈCIES	Nombre de poblacions estudiades	Nombre de proteïnes	Nombre de loci	Frequència de loci polimòrfics per població	Frequència de loci heterozigòtics per individu	REFERÈNCIES
<i>Limulus polyphemus</i>	4	24	25	0,250	0,057	Selander <i>et al.</i> (1970)
<i>Acris crepitans</i>	3 (?)	16	20	0,14-0,23	—	Dessauer i Nevo (1969)
Mus musculus:						
Dinamarca	6	36	41	0,22-0,30	0,078	Selander, Hund i Yang (1969)
Califòrnia	1	35	40	0,300	0,110	Selander i Yang (1969)
<i>Peromyscus polionotus</i>	18	30	32	0,234	0,058	Selander <i>et al.</i> (1970).
<i>Drosophila persimilis</i>	1	24	24	0,250	0,105	Prakash (1969)
<i>Drosophila pseudoobscura</i>	3	24	24	0,420	0,123	Prakash <i>et al.</i> (1969)
Homo sapiens:¹						
(Població britànica)	1	33	33	0,36	0,160	Lewontin (1967)
(Població britànica)	1	20	20	0,30	0,074	Harris (1969)

¹ Estimacions basades en una anàlisi de la seqüència en el temps del descobriment d'antígens eritrocítics.

lloc a un polimorfisme estable a una determinada freqüència intermèdia.

Diverses situacions ecològiques, com és ara la d'individus depredadors, paràsits que tendeixen a adaptar-se a les varietats més comunes i l'hoste tendeix a esdevenir resistent als paràsits més comuns, població sotmesa a diferents ambients i selecció cíclica, poden donar lloc a aquest tipus d'equilibri.

D'acord amb les dades obtingudes per KOJIMA i YARBROUGH⁸ per a l'esterasa-6 en *D. melanogaster* en caixes de poblacions, aquest és el tipus d'equilibri atès. La selecció depenent de la freqüència, segons aquests autors, amb quasi neutralitat quan s'arriba a l'equilibri, pot explicar un gran nombre de polimorfismes genètics en poblacions naturals. Però no sembla aquest el cas en molts d'altres polimorfismes.

Teoria dels al·lels neutres. Els defensors de la teoria, entre els quals sobresurten KIMURA i CROW⁵, que postulen l'existència d'al·lels neutres o molt baixos coeficients de selecció, reforcen la validesa d'aquesta pel fet que poden predir la velocitat evolutiva d'una proteïna i que aquesta és constant. Això és particularment evident en els canvis evolutius de les hemoglobines, en què el nombre de substitucions d'aminoàcids és el mateix partint d'un avantpassat comú en la línia que duu a l'home, que en la que duu a la carpa. Es troba la mateixa constància en el citocrom C, malgrat la velocitat diferent de l'hemoglobina. KING i JUKES⁶ donen dades que demostren la uniformitat de la velocitat evolutiva en d'altres proteïnes que no són l'hemoglobina. Però ells mateixos diuen que aquesta regla no es compleix en determinades proteïnes com és ara la insulina.

Podem obtenir una estima de la velocitat evolutiva d'una proteïna en termes de substitució d'aminoàcids per cadena polipeptídica per unitat de temps. Dividint pel nombre d'aminoàcids d'una cadena obtindrem la velocitat d'evolució (per aminoàcid) per unitat de temps. Si considerem la velocitat evolutiva de les hemoglobines, veurem que estimes completament independents l'una de l'altra donen resultats clarament coincidents.

FIG. 5. — TAXES MITJANES DE SUBSTITUCIÓ D'AMINOACIDS EN L'EVOLUCIÓ DE LES HEMOGLOBINES

<i>Comparació</i>	<i>Substitucions lloc/any × 10¹⁰</i>
β de l'home amb globina de llamprea	12,8
β de l'home amb α de l'home	8,9
β de l'home amb $\beta\beta$ d'altres mamífers	11,9
β del ratolí amb $\beta\beta$ d'altres mamífers	14,0
α de l'home amb $\alpha\alpha$ de la carpa	8,9
α de l'home amb $\alpha\alpha$ d'altres mamífers	8,8

Suposem que la major part de les mutacions aparegudes són neutres, i que la velocitat de mutació neutra per gen i per generació és u i que és constant per a un tipus determinat de proteïnes. Moltes mutacions seran letals i per tant eliminades; i alguna mutació serà neutra i la fracció d'aquestes dependrà de les exigències funcionals de cada tipus de proteïna. Les mutacions favorables seran tan poc freqüents que no poden influir al llarg del temps en les estimes de les velocitats de substitució d'aminoàcids.

Si en una generació el total de la població és N , apareixeran $2Nu$ nous mutants selectivament neutres en aquesta generació. Si cada gen té

una probabilitat $\frac{1}{2N}$ de sobreviure i els nous mutants contribueixen

igual que els altres a la *fitness* en la població, el nombre de gens que apareixerà i que restarà fixat per generació serà una constant u .

$$\frac{1}{2N} \times 2Nu = u$$

Si la protagonista de les substitucions de mutants és la selecció natural, la velocitat expresada com a nombre de mutants substituïts en la població per gen per any serà donada per $4N_0 S_1 u$ (N_0 , nombre eficaç de la població; S_1 , valor selectiu; u , velocitat en què es produeixen els mutants favorables per gàmeta i per unitat de temps). En aquest cas haurem de suposar que 3 paràmetres s'han ajustat de tal manera al llarg del temps que el producte es manté constant per any o generació en les diverses línies. En l'exemple esmentat carpa-home hem de suposar que $N_0 S_1 u$ s'ha mantingut constant en dues línies que han estat separades fa 400 milions d'anys i tenint en compte la gran diferència atesa a nivell fenotípic (aquesta sí que depèn de la selecció natural) entre aquests organismes.

Bé que la teoria dels aHels neutres sembla per ara que respon molt millor a aquestes dades experimentals de velocitat evolutiva constant per a determinades proteïnes, no està mancada de certes limitacions que ara tractarem d'explicar.

En una població finita els aHels seran eliminats per atzar contínuament i la mutació en farà aparèixer d'altres. Quan hom arribarà a l'equilibri entre eliminació i mutació, KIMURA i CROW demostren que s'ha de

$$\text{complir } I = \frac{1}{1 + 4N_0 u}$$

I és la probabilitat que 1 individu pres a l'atzar sigui homozigot en un *locus* determinat.

u és la velocitat de mutació neutra en 1 *locus* per generació.

N_0 és el nombre eficaç de la població, si considerem el cas de l'hemoglobina d'acord amb les variants electroforètiques detectades $u = 10^{-6}$ per cistró per generació.

I segons això, el grau de polimorfisme en una població variarà molt segons les dimensions d'aquesta.

$$\begin{array}{ll} \text{Si } N_0 = 10^6 & I = 0,20 \\ \text{i si } N_0 = 10^4 & I = 0,96 \end{array}$$

Com més petita sigui la població, menys variabilitat gènica hom hi ha de trobar. El grau d'homozigosi augmenta considerablement en reduir les dimensions de la població.

Però perquè aquesta fórmula sigui vàlida i, per tant, poder-la comprovar experimentalment han d'ésser complertes dues condicions:

a) Que existeixi un flux genètic suficient entre les subpoblacions perquè N_0 pugui ésser considerat el nombre total d'individus de la població i que alhora sigui suficientment petit per a donar un valor de I raonable.

b) Que una població d'un nombre eficaç N_0 hagi estat aïllada durant N_0 generacions, puix que només així hom pot considerar que no ha atès l'equilibri.

Si la població humana s'hagués mantingut amb el mateix nombre d'individus d'ara d'ençà del cambrià, encara ara no hauria estat atès l'equilibri per a aplicar la fórmula anterior.

La dificultat esmentada creix considerablement quan hom considera que el nombre d'individus d'una població no és constant al llarg del temps. D'acord amb això, per a les variants electroforètiques de l'hemoglobina humana, el nombre de gens apareguts fa 10^4 a 10^6 anys (es a dir $N = 50.000$ generacions) fóra el 5 % dels gens ara existents. És evident que aquestes estranyes variants de l'hemoglobina no són conegudes encara actualment. Hi ha algunes variants comunes de l'hemoglobina que són mantingudes per heterosi en les poblacions. Hi ha també una altra explicació per a justificar-ne l'absència. Hom dedueix de la mateixa equació que hi ha una probabilitat d'un 5 % que tots els gens de l'hemoglobina ara existents apareguessin en aquell període; perquè això fos, la població humana fa un milió d'anys havia d'haver estat reduïda, en un coeficient de l'ordre de $N_0 = 10.000$ durant mig milió d'anys. Sembla doncs evident que si existien mutants neutres per a l'hemoglobina no podrien ésser justificats per aquesta teoria. O també podem concloure que no existeixen mutants neutres per a l'hemoglobina.

La via que hom ha seguit fins ara per tal de resoldre el problema del manteniment dels polimorfismes ha estat principalment l'anàlisi electroforètica de poblacions naturals de moltes espècies.

Les dades obtingudes en molts casos en què no han estat observades diferències en les freqüències entre les poblacions estudiades són utilitzades pels defensors d'una teoria i de l'altra, indistintament. Ben poc coneixem sobre les propietats d'aquests enzims, aparentment semblants, a nivell molecular. I creiem que aquest camí pot ésser molt eficaç per a resoldre el problema. En la figura 6 presentem unes dades obtingudes al

FIG. 6. — ACTIVITATS ESPECÍFIQUES $\left(\frac{\text{mg. naftol}}{\text{mg. proteïna}} 30' \right)$
DE LES ESTERASES $e^{0.93}$, $e^{1.07}$ I LLUR COMBINACIÓ

SUBSTRAT	Soca 21-1-3 Fracció T 23 (1,07)	Soca 21-1-3 Fracció T 33 (0,93-1,07)	Soca S 35 Fracció T 53 (0,93)
β -naftil-acetat	0,89	0,85	0,61
α -leucina- β -naftilamida	—	0,09	0,04
β -naftil-caprilat	0,06	0,91	0,66
β -naftil-estearat	0,05	5,—	—
α -naftil-acetat	2,7	6,64	6,6

laboratori. Han estat aïllades i purificades per electroforesi preparativa de les soques 21-1-3 i S 35 de *D. subobscura* les esterases l^2 , sistema del qual hem vist abans la distribució geogràfica en forma de clines, i una altra (1.07) de controlada per un *locus* diferent, del qual encara no hem parlat. Els substrats enfront dels quals és mesurada l'activitat específica són indicats a l'esquerra. Veiem que l'activitat específica d'1.07 de 21-1-3 i 0.93 de S 35 és semblant per a tots els substrats emprats, però quan β -naftil-estearat és el substrat i hi són presents les dues esterases 0.93 i 1.07, l'activitat específica és molt superior. Això és degut a la formació d'un enzim híbrid, observat clarament en l'electroforesi i que també explica que creixi una mica l'activitat enfront del substrat α -leucina- β -naftilamida. La formació d'aquest enzim híbrid confereix a l'individu unes propietats noves. Si les dues esterases independentment es comportaven com arilesterases hidrolitzant substrats com l' α NA i el β NA, ara poden actuar com lipases hidrolitzant compostos d'àcids grassos superiors. No sabem si això que comprovem *in vitro* s'esdevé *in vivo*. Però el que hem comprovat experimentalment és la possibilitat que els enzims híbrids formats enriqueixin l'individu amb noves propietats.

Precisament acabem d'obtenir els resultats d'unes anàlisis d'aminoàcids d'aquestes dues esterases. Les composicions centesimals d'aquests aminoàcids són molt semblants, i en molts casos coincidents. Això és una indicació molt forta que els dos gens que controlen aquests enzims han estat originats per duplicació l'un de l'altre.

HALDANE digué ja fa molt de temps que la superioritat dels heterozigots podia ésser explicada per una major flexibilitat funcional basada en l'elaboració de dues variants moleculars controlades, una per cada al·lel. Els homozigots, per contra, en tenir els dos al·lells iguals, elaboren una sola classe de molècules. L'avantatge funcional dels heterozigots suposada per HALDANE és contrarestada pel llast genètic que aquest genotip comporta, com abans ha estat dit en parlar de l'heterosi. La situació que sembla haver estat comprovada en tots dos sistemes d'esterases de què tractem, reuneix l'avantatge de la flexibilitat d'un heterozigot sense el desavantatge del llast genètic.

La molècula híbrida entre l¹ i l² pot formar-se constantment en els individus homozigots pels dos *loci* que controlen aquestes esterases, i té les propietats d'una molècula híbrida formada en un heterozigot. L'origen d'aquesta situació per duplicació gènica, demostra un aspecte de l'eficàcia d'aquest mecanisme evolutiu.

BIBLIOGRAFIA

1. ALLISON, A. C. — «Ann. Hum. Genet.», 21, 67-89 (1956).
2. DOBZHANSKY, T. — *Genetics and the origin of species*, 3rd. ed. (Columbia Univer. Press., 1951), Nova York.
3. HARRIS, H. — «British Medical Bulletin», 25, 5 (1967).
4. KIMURA, M. i ONHA, T. — «Nature», 229, 467-469 (1971).
5. KIMURA, M. i CROW, J. F. — «Genetics», 49, 725-738 (1964).
6. KING, J. L. i JUKES, T. H. — «Science», 164, 788-798 (1969).
7. KOEHN, R. K. — «Science», 163, 943 (1969).
8. KOJIMA, K. i YARBROUGH, K. M. — «Proc. Nat. Acad. Sciences», 3, 645-649 (1967).
9. LEWONTIN, R. C. i HUBBY, J. L. — «Genetics», 61, 841 (1969).
10. MAYNARD SMITH, J. — «Symp. Zool. Soc. London», 26, 371-383 (1970).
11. SELANDER, R. K., HUNT, W. G. i YANG, S. Y. — «Evolution», 23, 379 (1969).
12. SELANDER, R. K., YANG, S. Y., LEWONTIN, R. C. i JOHNSON, W. E. — «Evolution», 24, 402 (1970).