# GENÈTICA DE LES IMMUNOGLOBULINES

Comunicació presentada el dia 26 d'abril de 1974
pel doctor

RAFAEL ORIOL

de l'Institut d'Immunobiologie (INSERM et CNRS).
«Hôpital Broussais», París

L'estudi de les immunoglobulines és apassionant i revolucionari al mateix temps. A partir de la seqüència d'aminoàcids d'una sola molècula d'IgG, hom pot analitzar l'evolució que s'ha operat a través de diversos milions d'anys.

L'estructura general de la molècula d'IgG, dues cadenes lleugeres i dues cadenes pesades reunides per ponts disulfur (fig. 1) presenta un fet

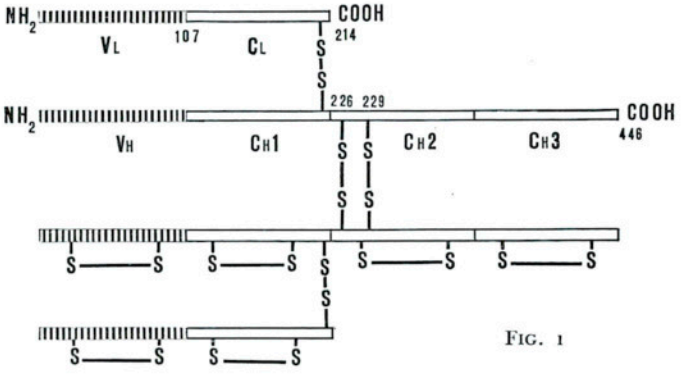



FIG. 1

curiós, una repetició periòdica a intervals regulars dels ponts —S—S— intracatenaris.

L'anàlisi de la seqüència d'aminoàcids [2] confirma aquest fet i dóna una repetició, ben superior d'allò que podríem esperar per simple atzar, dels mateixos aminoàcids a intervals regulars (fig. 2), com si una unitat bàsica, o *domini,* d'una centena d'aminoàcids s'hagués repetit dues vegades per

les cadenes lleugeres i quatre vegades per les cadenes pesades. Com que la síntesi de cada cadena s'opera d'un sol tret a nivell dels RNA missatgers dels ribosomes, aquesta repetició del producte final implica una duplicació dels gens d'estructura corresponents.

Consideracions d'aquest tipus conduïren HILL i col.[5] a la proposició d'un model evolutiu per a explicar l'estructura de la molècula d'IgG (fig. 3). A l'hora actual, totes les experiències semblen confirmar aquest esquema, i ja han pogut ésser identificades i estudiades en detall tota una gama de cadenes d'immunoglobulina amb 1, 2, 3, 4 o 5 dominis, que

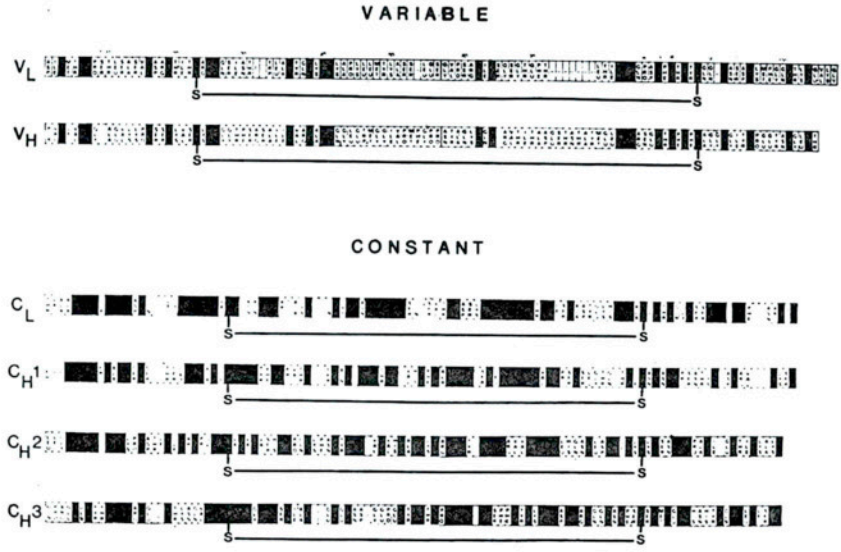



FIG. 2

podrien correspondre als descendents dels productes intermediaris de tota una sèrie de duplicacions successives (fig. 4).

La duplicació de la informació genètica és un dels mecanismes més importants per permetre una evolució molecular basada en la selecció i fixació de les mutacions favorables.

Com que les mutacions són fetes a l'atzar, en general no representen un avantatge funcional; al contrari, la gran majoria de les mutacions són letals, sobretot si la mutació modifica el *locus* actiu de la molècula. L'evolució d'una proteïna per la selecció de mutacions favorables o neutres és extremament lenta i es manifesta sobretot a les porcions allunyades del *locus* actiu de la molècula (fig. 5). La duplicació d'un gen d'estructura obre un nou horitzó.

Si tenim dues còpies del mateix gen, mentre l'una assegura la síntesi de la proteïna normal i, per tant, és capaç d'assegurar la funció vital, l'altra pot servir de banc de proves per a assajar tota classe de mutacions,

FIG. 3

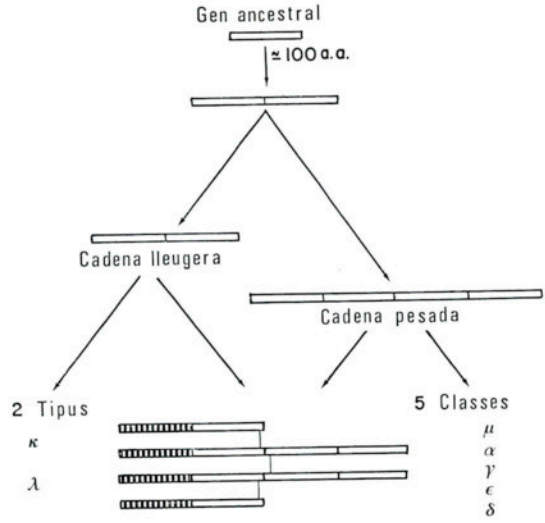
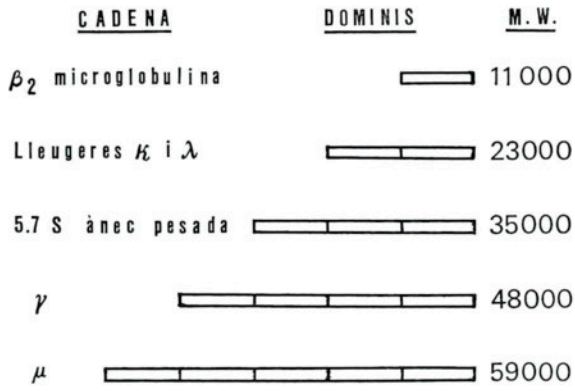



FIG. 4




fins i tot aquelles que modifiquen el *locus* actiu, i sobretot pot acumular diverses mutacions que individualment serien neutres o nocives i que, sumades, poden donar un avantatge d'adaptació selectiva o l'aparició d'una nova funció (fig. 6).

La molècula d'IgG és el millor exemple conegut d'aquest mecanisme evolutiu. Els dos dominis amino-terminals (dits variables) asseguren la

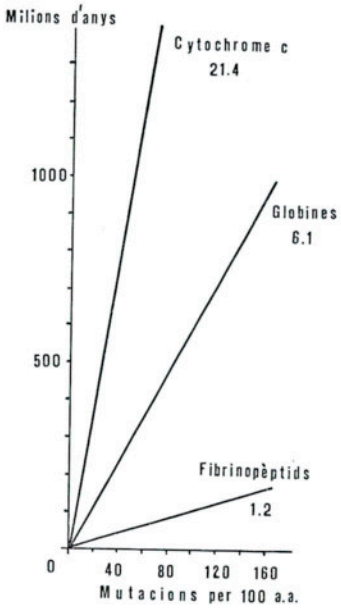



FIG. 5

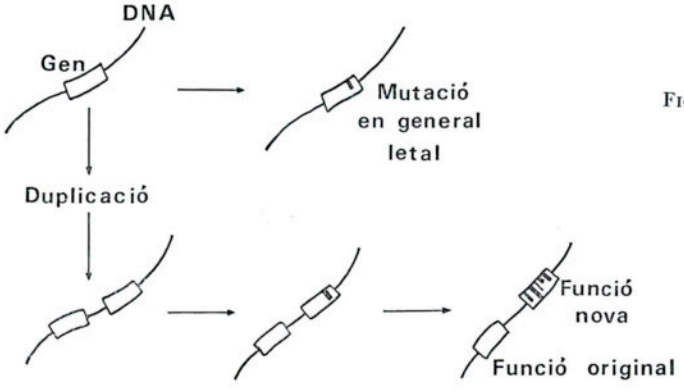



FIG. 6

combinació antigen-anticòs, mentre que als altres dominis (dits constants) han aparegut estructures noves que permeten el passatge placentari de la molècula, la fixació del complement i l'adhesió selectiva a unes certes cèl·lules.

L'estructura de les immunoglobulines suggereix tres tipus de duplicació diferents:

*a*) Duplicació dels gens d'estructura, que dóna lloc a una sola cadena polipeptídica més llarga, en la qual es poden identificar els diferents dominis.

*b*) Duplicació de l'operó complet incloent els gens operadors de regulació i d'estructures. Aquest mecanisme produeix cadenes polipeptídiques diferents que evolucionen independentment i donen lloc a les diferents classes o *isotipus* d'anticossos (IgA, IgM, IgD, IgE, IgG) i les corresponents subclasses, per exemple, gamma1, gamma2, gamma3 i gamma4 per l'IgG. El nombre de diferències entre les porcions constants de dues cadenes dóna una idea de l'època en què es va produir la duplicació que les va originar i podem construir l'arbre genealògic de cada cadena (fig. 7). L'estudi genètic d'aquestes dupli-

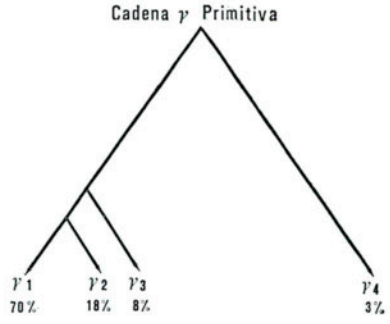



FIG. 7

cacions dóna un cert grau de «linkage», que determina la posició de cadascun dels nous operons sobre la mateixa parella d'autosomes.

*c*) I finalment una duplicació similar a l'anterior, a la qual hom afegeix una translocació que transporta la sèrie nova de gens a una altra parella d'autosomes. Aquest seria el cas dels gens que codifiquen les cadenes lleugeres K i les cadenes pesades gamma que es troben sobre autosomes diferents però que guarden un grau d'homologia suficient per a afirmar un origen genèric comú.

Les diferents formes de duplicació dels gens s'han produït durant el curs de l'evolució i poden ésser emprades com a punts de referència per a establir un arbre genealògic de l'evolució de les diferents espècies animals, però, dintre de cada espècie, tots els individus presenten els mateixos *isotipus*.

OUDIN [9] va descobrir una altra forma de variació genètica, l'*allotipia*. Els *allotipus* són petites diferències d'estructura de les immunoglobulines, d'una mateixa classe i subclasse, presents en uns certs grups d'individus d'una mateixa espècie animal, i que s'hereden de forma mendeliana. Estudis posteriors han demostrat que, en general, corresponen a la substitució d'un sol aminoàcid deguda a una mutació sobre un sol dels dos allels que formen la parella d'autosomes corresponents; d'ací el seu nom i la forma particular de transmissió hereditària. A la loteria cromosòmica de l'herència, cada individu hereda un «marker» del pare i un de la mare per cada *locus* allotípic, i serà homocigot o heterocigot per a l'allotipus corresponent segons la combinació que representa (fig. 8).

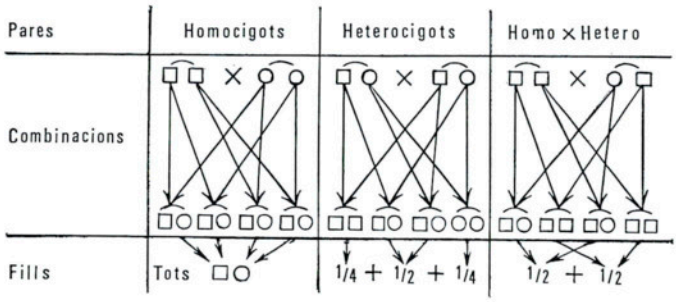



FIG. 8

Per fi, el darrer polimorfisme genètic, l'*idiotipus* [10], és diferent en tots els individus de la mateixa espècie i, entre les molècules d'un sol individu, varia segons l'especificitat anticòs de cada molècula.

La comparació d'unes quantes molècules d'IgG és suficient per a comprovar que no n'hi ha dues d'iguals; totes presenten seqüències diferents a les porcions variables, sobretot en les posicions 30-35, 50-55 i 95-100 dites hipervariables i que corresponen probablement al *locus* anticòs.

Hom no ha trobat encara dues molècules d'immunoglobina normal ni dos mielomes idèntics, però totes les molècules sintetitzades per un mateix «clon» mielomatós són idèntiques entre elles.

Com a resum de tot el que acabem de dir, podem concloure que totes les propietats de les porcions *constants* de les immunoglobulines poden ésser explicades en termes de genètica clàssica. El problema difícil radica en les porcions *variables*, és a dir, les estructures que asseguren la funció *prínceps* de l'anticòs, la combinació amb l'antigen.

Plantejarem el problema de l'anticòs en quatre etapes:

*1*) El nombre de determinants antígens possibles a la naturalesa és enorme, de l'ordre de milions, i com que la combinació de l'anticòs amb l'antigen depèn de la seqüència d'aminoàcids del *locus* anticòs, necessitem almenys un nombre igual de seqüències diferents. La primera solució o teoria instructiva proposava que l'antigen actua com un motlle al voltant del qual l'anticòs s'adapta.

*2*) Desgraciadament els coneixements actuals sobre la síntesi de proteïnes pel *DNA* → *RNA* → *Proteïna* prohibeixen formalment la transmissió al DNA de la informació necessària per a fer un anticòs, a partir de l'antigen. Hem d'acceptar, doncs, que tots els anticossos possibles *existeixen abans de l'arribada de l'antigen corresponent* i aquest és el postulat de base de totes les teories basades en la selecció de l'anticòs preexistent, per l'antigen.

*3*) La demostració experimental que cada plasmòcit madur fabrica un sol anticòs i que transmet als seus descendents *(clon)* la possibilitat de fer el mateix anticòs, va originar la teoria de *selecció clonal*, que és una interpretació a nivell cel·lular d'una teoria selectiva.

La teoria de selecció clonal, tal com va ésser proposada inicialment per Sir Mc Farlane Burnett [7] implica un sistema de generació de diversitat durant el període embrionari.

*4*) El problema de base, per a qualsevol teoria selectiva, és l'origen de totes les variants necessàries perquè l'antigen pugui triar. És necessari un generador de diversitat o «Generator of diversity» dels autors anglosaxons que, amb un cert sentit de l'humor, l'han batejat «GOD». El més greu és que «Déu», tot sol, no se'n pot sortir, si el mecanisme de diversificació és prou eficaç, és indispensable posar-li al costat un petit *Dimoni de Maxwell* per triar i deixar passar les variants bones, i eliminar d'alguna manera les variants prohibides perquè l'aparició d'anticossos dirigits contra els constituents propis de l'organisme o «self» seria fatal.

Abans de revisar les principals teories per a resoldre la «teologia» de les immunoglobulines, mirem quina és la variació mínima necessària per a poder explicar tots els anticossos.

Com que el locus anticòs és format per les parts variables de dues cadenes diferents, si qualsevol cadena lleugera pot unir-se amb qualsevol cadena pesada, el nombre de locus possibles serà igual al quadrat del nombre de cadenes, és a dir, si disposem de 1.000 cadenes lleugeres i 1.000 cadenes pesades tindrem $1.000^2 = 1.000.000$ de locus anticòs possibles diferents.

Estudiant l'estructura de les immunoglobulines normals de *Numigall*, un híbrid de *Numida neleagris* (pintada) i *Gallus domesticus* (gall), hem pogut demostrar que l'associació de les cadenes lleugeres i pesades dels dos orígens parentals es fa a l'atzar [8] (fig. 9) i qualsevol cadena pesada pot combinar-se amb qualsevol cadena lleugera.

Malgrat aquesta reducció, la quantitat de seqüències necessàries és encara de l'ordre de $10^3$ cadenes per a obtenir $10^6$ molècules.

Segons la participació de «GOD», les hipòtesis de producció de variabilitat poden ésser dividides en tres grups:

1) *Hipermutabilitat somàtica* [1, 6]. A partir d'un sol gen o d'un nombre reduït de gens es genera la diversitat per una hipermutabilitat puntiforme a nivell de les regions hipervariables del DNA.

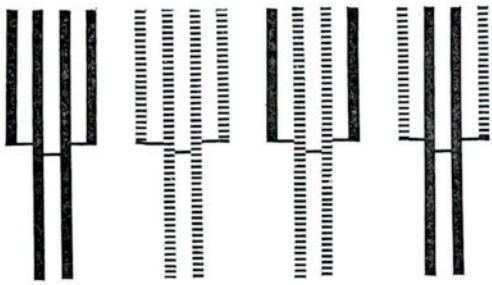



FIG. 9

2) *Recombinació somàtica* [4]. A partir d'un cert nombre de seqüències de base, es genera la diversitat per recombinacions dels gens entre ells.

3) *Línia germinal* [12]. Totes les seqüències necessàries s'han generat pels mecanismes clàssics de duplicació, mutació, selecció durant l'evolució de les espècies i actualment cada cèl·lula té la informació necessària en el seu DNA per a fer tots els anticossos.

Una experiència recent de WILLIAMSON [11] basada en la hibridació RNA-DNA d'una RNA missatger pur d'un mieloma, demostra que cada cèl·lula té almenys la informació necessària per a fer 5.000 porcions variables de cadena pesada diferents, la qual cosa ens dóna la possibilitat de fer $5.000^2 = 25$ milions de locus anticòs. Per quin mecanisme la cèl·lula tria la molècula adequada, davant una agressió bacteriana o viral, entre els 25 milions de molècules possibles? El dia que puguem contestar aquesta pregunta haurem resolt el problema de l'anticòs.

## BIBLIOGRAFIA


1. COHN, M. — *The take-home lesson.* «Ann. N.Y. Acad. Sci.», *190,* 529 (1971).
2. EDELMAN, G. M. — *The structure and function of antibodies.* «Scientific American», *223,* 34 (1970).
3. EDELMAN, G. M. i GALL, W. E. — *The antibody problem.* «Ann. Rev. Biochemistry», *38,* 415 (1969).
4. GALLY, J. A. i EDELMAN, G. M. — *Somatic translocation of antibody genes.* «Nature», *227,* 341 (1970).
5. HILL, R. L., DELANEY, R., FELLOWS, R. F. i LEBOVITG, H. E. — *The evolutionary origins of the immunoglobulins.* «Proc. Natl. Acad. Sci.», *52,* 1403 (1966).
6. JERNE, N. K. — *The somatic generation of immune recognition.* «Eur. J. Immunol.», *1,* 1 (1971).
7. MAC FARLANE BURNET, Sir. — *The mechanism of immunity.* «Scientific American», *240,* 58 (1961).
8. ORIOL, R., BARBIER, Y. i BIOZZI, G. — *Hybrid 7S immunoglobulin molecules formed* in vivo *by association of heavy and light chains of different parental, origin.* «Eur. J. Immunology», *2,* 105 (1972).
9. OUDIN, J. — *L'allotype de certains antigenes proteidiques du serum.* «C. R. Acad. Sci. (Paris)», *242,* 2606 (1956).
10. OUDIN, J. — *L'idiotype des anticorps.* «In. P. Bordet-Immunologie», p. 858. Ed. Flammarion. Paris (1972).
11. PRECKMAR, E., SHOYAB, M. i WILLIAMSON, A. R. — *Germ. line basis for antibody diversity. Immunoglobulin* VH *and* CN *gene frequencies measured by DNA RNA hybridization.* «Proc. Nat. Acad. Sci. USA.», *71,* 99 (1974).
12. SMITH, G., HOOD, L. i FITCH, W. — *Antibody diversity.* «Ann. Rev. Biochemistry», *40,* 969 (1971).