
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

LUIGI BERNINI, CELESTINO DEL BIANCO, GIACOMO LA
TORRETTA, SILVANO MARSICO, MARCELLO SINISCALCO

Possibile influenza del genotipo materno sulla sintesi delle aptoglobine fetali. Dati preliminari

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 32 (1962), n.6, p.
989–995.*

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1962_8_32_6_989_0

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Genetica. — *Possibile influenza del genotipo materno sulla sintesi delle aptoglobine fetali. Dati preliminari* (*). Nota di LUIGI BERNINI (**), CELESTINO DEL BIANCO (***), GIACOMO LA TORRETTA (****), SILVANO MARSICO (****) e MARCELLO SINISCALCO (**), presentata (****) dal corrisp. G. MONTALENTI.

Le aptoglobine (Hp), come è noto, sono una famiglia di proteine plasmatiche che hanno la caratteristica proprietà di combinarsi con l'emoglobina (Hb). Esse furono scoperte da Polonovski e Jayle [1] nel 1938, ma solo pochi anni fa Smithies e Ford Walker [2] riuscirono a stabilire che queste proteine rappresentano un tipico esempio di polimorfismo genetico nell'Uomo. I tipi fondamentali di Hp distinguibili con l'elettroforesi zonale su gel d'amido sono i tre che Smithies descrisse come fenotipi $I : I$, $2 : I$, $2 : 2$.

Le numerose indagini genetiche finora realizzate da Autori diversi [3] hanno permesso di stabilire che questi 3 fenotipi aptoglobinici corrispondono rispettivamente ai 3 genotipi possibili per una coppia di geni allelomorfi autosomici: Hp^I , Hp^2 , entrambi con dominanza incompleta.

Negli ultimi anni sono state descritte alcune altre varianti aptoglobiniche [4] e sono stati segnalati alcuni alberi genealogici con segregazione aberrante [5].

Le indagini di Smithies [3] sulla fine struttura biochimica delle aptoglobine hanno rivelato che la complessità strutturale di queste proteine *in vivo* è soltanto apparente in quanto si tratta di prodotti di polimerizzazione che possono essere risolti in monomeri di basso peso molecolare.

Molto recentemente Connell, Dixon, e Smithies [6] hanno precisato che 3 sono i monomeri aptoglobinici fondamentali: le specie molecolari Hp^2 , Hp^{IF} (« F » per veloce) e Hp^{IS} (« S » per lento).

L'analisi biochimica e quella genetica hanno fatto concludere a tali Autori che queste tre specie molecolari rappresentano i prodotti primari dei 3 geni allelomorfi più comuni al *locus* Hp, per il quale si possono pertanto prevedere 6 genotipi possibili che non sono però tutti distinguibili con la ordinaria tecnica di elettroforesi zonale su gel d'amido del siero o plasma:

genotipi possibili al <i>locus</i> Hp	fenotipi distinguibili con la elettroforesi su gel d'amido
Hp^2/Hp^2	2,2
Hp^2/Hp^{IF} , Hp^2/Hp^{IS}	2,I
Hp^{IF}/Hp^{IF} , Hp^{IF}/Hp^{IS} , Hp^{IS}/Hp^{IS}	I,I

(*) Queste ricerche sono state eseguite con un contributo del C.N.R. e della Rockefeller Foundation di New York. Si ringrazia il sig. Ricciotti Palmarino per l'assistenza tecnica.

(**) Istituto di Biologia generale e Genetica dell'Università di Napoli.

(***) Clinica Ostetrica e Ginecologica dell'Università di Napoli.

(****) Nella seduta del 12 giugno 1962.

Si ritiene che le altre varianti aptoglobiniche finora descritte, come il fenotipo 2:1 modificato, il fenotipo « Johnson » e talvolta la stessa anaptoglobinemia congenita, possono essere dovuti ad altri più rari allelomorfi al *locus* aptoglobinico [7].

Malgrado le esaurienti conoscenze sulla struttura e sulla genetica delle aptoglobine, ben poco si sa sulla loro funzione e sul loro meccanismo di sintesi.

È ben noto che le aptoglobine diminuiscono durante i processi emolitici perché evidentemente utilizzate a formare il complesso Hp-Hb che non può essere eliminato come tale attraverso il filtro renale e viene rapidamente catabolizzato. È opinione generalmente accettata che sia proprio la concentrazione della Hp plasmatica a determinare la soglia di eliminazione renale della Hb e che quindi una delle funzioni più importanti delle Hp potrebbe essere quella di evitare la improvvisa perdita di ferro dopo una acuta crisi emolitica [8].

Diminuzioni di Hp per difetto di sintesi sono state descritte in altre condizioni patologiche, mentre aumenti talora notevoli si hanno in tutte le mensechimopatie ed in genere nei processi infettivi acuti [9].

Uno dei punti più oscuri è certamente quello del meccanismo di sintesi delle aptoglobine. È stato osservato da numerosi Autori [10] che questa famiglia di proteine plasmatiche compare in genere tra la prima e la seconda settimana dopo la nascita, e solo in una modesta aliquota di casi si ritrova nel sangue del cordone ombelicale.

Probabilmente il prodotto genico primario comincia ad essere sintetizzato precocemente, ma la polimerizzazione è inibita per qualche ragione durante la vita intrauterina.

Nelle ricerche che qui vengono riportate si è rivolta l'attenzione specialmente al problema della precoce comparsa delle aptoglobine nel sangue del cordone ombelicale con l'intento di stabilire se i diversi fenotipi aptoglobinici si comportano, a questo proposito, in modo omogeneo, o, in caso contrario se l'eterogeneità potesse essere messa in rapporto con una eventuale incompatibilità materno-fetale.

Il materiale necessario per questa indagine è stato raccolto presso la Clinica Ostetrica e Ginecologica della Università di Napoli. Sono stati esaminati 351 campioni di sangue del cordone ombelicale prelevati subito dopo l'espulsione del neonato insieme ad un campione di sangue della madre e, quando possibile, del padre.

Su ciascun campione di plasma eparinizzato, è stato determinato il fenotipo aptoglobinico mediante la semplice elettroforesi zonale sul gel d'amido, secondo la tecnica originale di Smithies [11] ed usando il tampone discontinuo di Poulik [12], non tenendo conto in tal modo dell'eventuale polimorfismo della frazione Hp¹. Inoltre è stata anche determinata la concentrazione delle aptoglobine, espressa come attività perossidasi del siero a pH 4, dopo aggiunta di metemoglobina, secondo la tecnica di Connell e Smithies [13].

È stato così trovato che 67 dei 351 campioni di sangue del cordone (19 %) avevano un fenotipo aptoglobinico determinabile, per quanto abbastanza più debole di quello normalmente osservato negli adulti. Quando tuttavia la frequenza relativa di plasmi determinabili viene calcolata separatamente, a seconda del genotipo materno, (Tabella I), si nota subito che vi è una sensibile eterogeneità della distribuzione, in quanto che le madri 2 : 1 mostrano di avere più frequentemente figli con fenotipo determinabile rispetto alle madri 2 : 2 ed alle 1 : 1. Nella Tabella I si nota che le deviazioni tra frequenze osservate ed attese sono significative ad un livello del 5 %. Questa circostanza ci ha fatto subito pensare che il fenomeno potesse essere legato ad un meccanismo di incompatibilità materno-fetale, e per saggiare ulteriormente questa ipotesi, i dati di cui sopra sono stati distribuiti per tipo di incrocio nella Tabella II, distinguendo:

I) gruppo di « incroci incompatibili », ovvero quelli dove la madre aveva certamente concepito un figlio con una specie molecolare aptoglobinica che ella non possedeva;

II) gruppo di « incroci semicompatibili », in cui la madre poteva nel 50 % dei casi concepire un figlio con fenotipo aptoglobinico identico al suo, e nel 50 % un figlio con specie molecolare aptoglobinica che ella non possedeva;

III) gruppo di « incroci compatibili » che comprende quei casi in cui la madre doveva necessariamente concepire figli con specie molecolare aptoglobiniche già presenti nel suo organismo.

TABELLA I.

Correlazione tra genotipo materno ed incidenza dei fenotipi aptoglobinici determinabili nei campioni di sangue prelevati dal cordone.

Genotipo materno	N. sieri determinabili	N. sieri indeterminabili	Totale
2 : 2	23 (28,0)	124 (119,0)	147
2 : 1	41 (32,6)	130 (138,4)	171
1 : 1	3 (6,4)	30 (26,6)	33
	67	284	351

$$\chi^2 = 5,99$$

Grado di libertà $n = 2$

$$P \sim 0,05$$

N. B. - In parentesi sono riportate le frequenze attese nell'ipotesi dell'indipendenza.

Come si rileva dalla Tabella II, l'incidenza dei sieri con fenotipo determinabile tra i figli degli « incroci incompatibili » è significativamente più bassa, al livello di probabilità dell'1%, rispetto a quella degli altri due gruppi. Inoltre una differenza apprezzabile, per quanto non significativa per lo scarso numero di osservazioni, si nota anche tra i gruppi di « incroci semicompatibili » e « compatibili ».

TABELLA II.

Incidenza dei fenotipi aptoglobinici determinabili nei vari tipi di incrocio.

	M	P	N. sieri determinabili	N. sieri indeterminabili	Totale	Frequenza relativa di A ed errore <i>standard</i>
			A	B	A + B	
I	2 : 2	1 : 1	1	15	23	0,0435 ± 0,04
	1 : 1	2 : 2	—	7		
II	2 : 2	2 : 1	12	41	66	0,197 ± 0,04
	1 : 1	2 : 1	—	12		
III	2 : 1	2 : 2	15	43	181	0,238 ± 0,03
	2 : 1	2 : 1	15	39		
	2 : 1	1 : 1	8	18		
	1 : 1	1 : 1	—	6		
	2 : 2	2 : 2	5	32		

N. B. - M = Madre.

P = Padre.

I = Gruppo degli « incroci incompatibili ».

II = Gruppo degli « incroci semicompatibili ».

III = Gruppo degli « incroci compatibili ».

Tale variabilità nell'incidenza dei fenotipi aptoglobinici determinabili nel sangue del cordone a seconda del tipo di incrocio, spiega probabilmente perché i dati finora riportati in letteratura da vari Autori siano così diversi tra di loro [14].

Un ulteriore dato in favore dell'ipotesi della possibile influenza del genotipo materno nella sintesi dell'Hp fetale può essere rilevata dalla Tabella III dove sono riportate le segregazioni dei fenotipi aptoglobinici nei figli per ciascun tipo di incrocio.

Si noti qui specialmente l'incrocio M (2 : 2) × P (2 : 1), dove si ha una segregazione di un figlio 2 : 1 contro 11 figli 2 : 2. Tale deviazione dalla segre-

gazione attesa di $I:I$ si può presentare, per caso, con una probabilità di $1/308$ ⁽¹⁾, ed è significativa ad un livello di qualità inferiore all'1%. Nell'incrocio reciproco, invece, $M(2:I) \times P(2:2)$ la segregazione osservata è praticamente identica a quella attesa.

TABELLA III.

Segregazioni dei fenotipi aptoglobinici osservate nei campioni di sangue prelevati dal cordone.

Tipo di incrocio		N. sieri determinabili			N. sieri indeterminabili
M	P	I:I	2:I	2:2	
2:2	2:2	—	—	5	32
2:2	2:I	—	I	II	41
2:2	I:I	—	I	—	15
2:I	2:2	—	8	7	43
2:I	2:I	6	8	I	39
2:I	I:I	4	4	—	18
I:I	2:2	—	—	—	7
I:I	2:I	—	I	—	12
I:I	I:I	—	—	—	6
		10	23	24	213

Va osservato che il fenomeno su descritto non può essere messo in rapporto all'eventuale passaggio passivo delle aptoglobine materne nel circolo fetale, in quanto:

a) è frequente il caso di un fenotipo aptoglobinico del sangue di cordone diverso da quello del sangue materno, come già osservato del resto da Rausen, Diamond e Gerald [15]. Nella presente casistica ciò accade in 21 dei 57 sieri del cordone a fenotipo determinabile (Tabella III);

b) non è stata trovata correlazione positiva tra la concentrazione aptoglobinica del siero materno e quella del siero del cordone, ed in particolare si è

(1) Se la segregazione attesa di figli $2:2$ e $2:I$ è di $\frac{1}{2} : \frac{1}{2}$ la probabilità totale della segregazione osservata sarà infatti:

$$P = \frac{12!}{1! 11!} (1/2)^1 (1/2)^{11}.$$

osservato che la determinabilità del fenotipo Hp nel sangue del cordone è del tutto indipendente dalla concentrazione Hp del sangue materno.

Su questi aspetti sono in corso ulteriori ricerche di cui si riferirà in altra sede.

È chiaro che i dati fin qui riportati rendono probabile l'esistenza di una interazione fra il genotipo aptoglobinico materno e la sintesi delle Hp nel feto; è d'altronde ovvio che l'ipotesi della compatibilità o meno tra il genotipo materno e quello fetale non è sufficiente a dar ragione dei fatti in modo completo. Se questa ipotesi, infatti, fosse vera al 100%, ci si attenderebbe di trovare nessun siero determinabile tra i figli di «incroci incompatibili», e, per contro, tutti i sieri determinabili tra i figli di quelli «compatibili». Ciò è ben lungi dall'essere vero, per quanto, come abbiamo visto, la frequenza dei sieri determinabili è massima per i gruppi di «incroci compatibili» e minima per quelli «incompatibili».

Per spiegare questa situazione si potrebbe pensare che:

1° negli «incroci incompatibili» non tutte le madri si comportano allo stesso modo nei riguardi dell'inibizione della sintesi delle Hp fetali. Se il processo fosse, per esempio, di natura immunitaria, potrebbe avere importanza la parità e potrebbe comportare qualche differenza l'essere la madre stessa nata da un «incrocio incompatibile» o meno (tolleranza immunologica);

2° che gli «incroci compatibili» per il fenotipo aptoglobinico siano in effetti solo apparentemente tali e che nascondano spesso un polimorfismo molecolare non rilevabile alla classificazione elettroforetica. Questo potrebbe essere certamente il caso delle varianti «veloce» (Hp^{rF}) e «lenta» (Hp^{rS}), recentemente descritte da Smithies [16].

Tuttavia i ripetuti tentativi da noi fatti per mettere in evidenza eventuali anticorpi antiaptoglobinici nel siero delle madri degli «incroci incompatibili» hanno dato sempre esito negativo. Per quanto questi risultati negativi possano essere attribuiti a limitazioni di tecnica, essi fanno ritenere che il meccanismo di inibizione della sintesi delle Hp fetali durante la gravidanza potrebbe anche non essere di natura immunitaria ed avvenire in uno stadio molto precoce, prima ancora che sia possibile la polimerizzazione dei monomeri aptoglobinici.

Ci è stato inoltre possibile osservare che i sieri del cordone con pattern aptoglobinico indeterminabile restano tali anche se concentrati fino a 5-10 volte. La medesima osservazione è stata riportata da Imperato, Battistini e Fine [17], che ritengono tuttavia possibile l'esistenza di una Hp neonatale identica per caratteristiche antigeniche alla Hp dell'adulto, ma incapace di legare l'Hb. Si potrebbe pensare quindi che la capacità dell'Hp a legare l'Hb sia in effetti connessa al grado di polimerizzazione della molecola e che questo fenomeno potrebbe essere più o meno inibito durante la vita fetale, specialmente quando le specie molecolari aptoglobiniche prodotte dal feto non sono possedute dalla madre.

Allo stato attuale queste conclusioni non rappresentano più che una ipotesi di lavoro confortata dai dati statistici sopra riportati.

Ulteriori ricerche sono attualmente in corso per cercare di provare in modo più diretto la possibile influenza del genotipo materno sulla aptoglobinogenesi fetale.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] M. POLONOVSKI, M. F. JAYLE, «C. R. Soc. Biol., Paris», 129, 457 (1938).
- [2] O. SMITHIES, N. F. WALKER, «Nature, Lond.», 178, 694 (1956).
- [3] A. C. ALLISON, «Nature, Lond.», 183, 1312 (1959); F. GALATIUS-JENSEN, *The Haptoglobins. A genetical study*, Copenhagen 196; E. R. GIBLETT, «Nature, Lond.», 183, 192 (1959); O. MÄKELÄ, A. W. ERIKSSON, R. LEHTOVAARA, «Acta Genet.» 9, 149 (1959); H. HARRIS, E. B. ROBSON, M. SINISCALCO, «Biochemistry of Human Genetics, a Ciba Foundation Symposium», pp. 151-177, Little, Brown, Boston 1959; O. SMITHIES, G. E. CONNELL, «Biochemistry of Human Genetics, a Ciba Foundation Symposium», pp. 178-193, Little, Brown, Boston 1959.
- [4] F. GALATIUS-JENSEN, «Acta genet.», 8, 248 (1958); E. R. GIBLETT, A. G. STEINBERG, «Amer. J. hum. Genet.», 12, 160 (1960); O. SMITHIES, G. E. CONNELL, *Transactions of First Conference on Genetics*, «Josiah Macy Foundation, N. Y.», pp. 129-136, Ed. by H. E. Sutton (1960).
- [5] H. HARRIS, E. B. ROBSON, M. SINISCALCO, «Nature, Lond.», 182, 1324 (1958).
- [6] G. E. CONNELL, G. H. DIXON, O. SMITHIES, «Nature, Lond.», 193, 505 (1962).
- [7] E. R. GIBLETT, «Vox Sanguinis», 6, 513 (1961).
- [8] R. K. MURRAY, G. E. CONNELL, J. H. PERT, «Blood», 17, 45 (1961); B. F. NOSSLIN, M. NYMAN, «Lancet», i, 1000 (1958); M. NYMAN, «Scand. J. clin. Lab. Invest.», 39 (1959).
- [9] J. A. OWEN, I. R. MACKAY, G. GOT, «Brit. med. J.», ii, 1454 (1959); R. K. MURRAY, G. E. CONNELL, «Nature, Lond.», 186, 86 (1960).
- [10] Cfr. ref. N. 3. e F. VECCHIO, M. MIRAGLIA, N. RIGILLO, «Boll. Soc. It. Biol. Sper.», 36, 1239 (1960); 35, 634 (1961).
- [11] O. SMITHIES, «Biochem. J.», 61, 629 (1955).
- [12] M. D. POULIK, «Nature, Lond.», 181, 1477 (1957).
- [13] G. E. CONNELL, O. SMITHIES, «Biochem. J.», 72, 115 (1959).
- [14] Cfr. ref. n. 3, 10.
- [15] Á. R. RAUSEN, L. K. DIAMOND, P. S. GERALD, «Nature», 191, 716 (1961).
- [16] Cfr. ref. n. 6.
- [17] C. IMPERATO, A. BATTISTINI, I. M. FINE, «Il Lattante», 32, V, Parma 1961; I. M. FINE, A. BATTISTINI, «Experientia», 16, 57 (1960); I. M. FINE, C. IMPERATO, A. BATTISTINI, A. MORETTI, «Nouvelle Rev. Franc. Hémat.», 1, 71 (1961).