

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

GUIDO MODIANO, GIORGIO FILIPPI, FLAMINIO  
BRUNELLI, RICCIOTTI PALMARINO, CARLO  
SANTOLAMAZZA, MARCELLO SINISCALCO

**Indagini preliminari sulle fosfatasi acide eritrocitarie  
in Sardegna. - I. Distribuzione dei geni nei villaggi  
del Campidano e ricerca di un eventuale linkage con  
la talassemia beta**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 38 (1965), n.6, p. 916-924.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1965\\_8\\_38\\_6\\_916\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_38_6_916_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.** — *Indagini preliminari sulle fosfatasi acide eritrocitarie in Sardegna.* — I. *Distribuzione dei geni nei villaggi del Campidano e ricerca di un eventuale linkage con la talassemia beta<sup>(\*)</sup>.* Nota di GUIDO MODIANO, GIORGIO FILIPPI, FLAMINIO BRUNELLI, RICCIOTTI PALMARINO, CARLO SANTOLAMAZZA e MARCELLO SINISCALCO, presentata <sup>(\*\*)</sup> dal Corrisp. G. MONTALENTI.

Hopkinson, Spencer e Harris (1963) [1] hanno recentemente individuato nell'uomo un nuovo interessante esempio di variabilità biochimica geneticamente controllata. Si tratta delle fosfatasi acide dei globuli rossi che possono differire da individuo a individuo sia nel loro comportamento elettroforetico (in gel d'amido) sia per la loro attività catalitica.

La distribuzione dei 5 patterns elettroforetici più comuni (A, B, BA, CA, CB) in un gruppo di 139 individui inglesi presi a caso e la segregazione osservata nella discendenza di 42 coppie di genitori a pattern noto, consentì agli Autori inglesi di formulare l'ipotesi che questo polimorfismo enzimatico fosse controllato da una serie di almeno 3 geni, allelomorfi allo stesso locus autosomico e codominanti e quindi capaci di dar luogo a sei distinti genotipi e ad altrettanti fenotipi:

geni:  $P^A$  ,  $P^B$  ,  $P^C$   
 genotipi:  $P^A P^A$  ,  $P^B P^B$  ,  $P^C P^C$  ,  $P^B P^A$  ,  $P^C P^A$  ,  $P^C P^B$   
 fenotipi: A , B , C , BA , CA , CB

Gli stessi Autori (1964) [2] notarono inoltre che l'attività enzimatica totale dei vari fenotipi fosfatasi non era uguale: i 3 geni apparivano capaci di funzionare in modo indipendente sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo, infatti il pattern elettroforetico e l'attività enzimatica di miscele artificiali di emolizzati ottenuti dagli omozigoti A e B erano uguali a quelli dell'eterozigote BA. Ciò lasciava evidentemente supporre che ciascuno dei tre geni allelomorfi determinasse non soltanto la struttura della fosfatasi acida eritrocitaria, ma anche la sua attività per globulo rosso. Con le unità arbitrarie scelte dagli Autori di cui sopra, il gene  $P^A$  dava così luogo in singola dose a 60 unità di attività enzimatica e rispettivamente i geni  $P^B$  e  $P^C$  a 90 e 120. In base a queste conclusioni fu loro possibile di predire non solo l'esistenza del sesto fenotipo ma anche il suo pattern elettroforetico e l'attività enzimatica media. Tali previsioni sono state pienamente confermate dagli Autori stessi e

(\*) Ricerche eseguite con contributi della Rockefeller Foundation (New York) e del Consiglio Nazionale delle Ricerche all'Istituto di Genetica dell'Università di Roma (Facoltà di Scienze).

(\*\*) Nella seduta del 17 giugno 1965.

da altri ricercatori in America [3] e in Italia [4 a] che hanno contribuito con la raccolta di nuovi dati familiari e popolazionistici a consolidare definitivamente l'ipotesi genetica su riferita. Molto recentemente Conneally et al. (1965) [5] hanno escluso l'esistenza di linkage stretto tra il nuovo locus e quelli relativi ai seguenti marcatori autosomici: ABO, Secretore, MNS, Rh, P, Kell, Fy, Jk, Hp, Gm, Inv e Lutheran.

I dati riportati nella presente Nota sono i risultati preliminari di un'indagine intrapresa in Sardegna allo scopo di ricercare eventuali interazioni, sia a livello individuale che popolazionistico, di questo nuovo polimorfismo genetico dei globuli rossi con la talassemia e l'enzimopenia G6PD, la cui distribuzione in Sardegna è stata, com'è noto, sensibilmente influenzata dalla malaria (Siniscalco et al., 1961) [6].

In questa occasione vengono riportati dati su:

1° la distribuzione dei fenotipi fosfatasi nei villaggi del Campidano di Cagliari (una vasta area pianeggiante nota per la sua elevata malaricità fino a circa venti anni or sono);

2° i primi risultati relativi ad un eventuale rapporto di linkage tra il locus per la fosfatasi acida e quello per la talassemia beta.

#### IL CAMPIONE DI DATI E LE TECNICHE.

Sono stati esaminati complessivamente 243 individui (237 maschi e 6 femmine) non parenti tra di loro e tutti provenienti da villaggi della pianura del Campidano di Cagliari distribuiti in un'area molto ristretta e quindi da considerare come appartenenti praticamente ad un'unica grossa « popolazione mendeliana naturale ».

Di questi individui, tutti in stato di buona salute, 68 non erano portatori né di beta-tallemia né di enzimopenia G6PD, 23 erano affetti da talassemia beta (allo stato eterozigote), 110 erano enzimopenici per la G6PD, 26 erano beta-tallemici-enzimopenici e 16 non completamente classificati.

Per la ricerca sul linkage sono state esaminate complessivamente 19 famiglie già precedentemente studiate per la beta-tallemia e tra queste se ne sono trovate sette che davano informazione per la ricerca di un eventuale linkage con il locus per le fosfatasi acide.

Per le determinazioni dei fenotipi fosfatasi i campioni di sangue sono stati esaminati sempre entro le 48 ore dal prelievo (di solito entro 24) secondo la tecnica descritta da Hopkinson, Spencer ed Harris (1963) [1] lievemente modificata [7]. Tutte le determinazioni sono state eseguite in duplicato ed in tutti i casi si è giunti ad una classificazione non ambigua.

Le determinazioni quantitative dell'attività fosfatasi sono state eseguite sulla quasi totalità dei campioni su riferiti e sempre entro 12 ore dal prelievo. I risultati relativi, con particolare riguardo al problema della interazione tra attività fosfatasi, talassemia ed enzimopenia G6PD al livello individuale, saranno riferiti in altra sede [7].

La diagnosi della beta-talassemia per le famiglie utilizzate per la ricerca sul linkage, è stata eseguita mediante l'esame dello striscio di sangue periferico e determinazione rapida della resistenza globulare (percentuale di globuli rossi residui in una soluzione contenente gr 0,375 di NaCl per 100 ml) e successiva valutazione quantitativa del tasso di emoglobina A<sub>2</sub> su colonna di DEAE-Sephadex secondo la tecnica di Huisman e Dozy (1961) [8]. È stato calcolato precedentemente che in queste circostanze l'errore di classificazione per la talassemia beta in Sardegna è del tutto insignificante (dell'ordine del 0,7 %) [9].

#### RISULTATI E DISCUSSIONE.

##### A) *Dati popolazionistici.*

La Tabella I riassume la distribuzione dei fenotipi fosfatasi tra i 243 individui del presente campione di popolazione sarda. Si nota il buon accordo tra numeri osservati e quelli attesi in base all'ipotesi genetica su riportata per una popolazione considerata in condizioni di equilibrio stabile secondo Hardy-Weinberg. La tabella riporta anche le stime di frequenza genica ottenute dal campione stesso e le frequenze fenotipiche attese per l'equilibrio.

TABELLA I.

Fenotipi	Frequenze attese per l'equilibrio	Frequenze percentuali osservate	Frequenze assolute		Chi-quadro (Yates)
			osservate	attese	
A	$p^2 \cdot N$	7,0	17	15,82	0,029
BA	$2pq \cdot N$	31,7	77	81,39	0,186
B	$q^2 \cdot N$	44,0	107	104,69	0,031
CA	$2pr \cdot N$	5,3	13	10,97	0,213
CB	$2qr \cdot N$	11,5	28	28,23	0,000
C	$r^2 \cdot N$	0,5	1	1,90	0,084
Totali . . .		100,0	N = 243	243,00	0,543

Stime delle frequenze geniche:  $PA = (2A + BA + CA) : (2N) = 0,255$

$PC = (2B + BA + CB) : (2N) = 0,656$

$PB = (2C + CA + CB) : (2N) = 0,089$

1,000

Chi-quadro totale (3 gradi di liberta): 0,543; Probabilità > 0,9.

Si noti che l'identificazione dell'omozigote C (il secondo reperito nel nostro laboratorio) è stata ottenuta mediante numerose prove concordanti su campioni di sangue prelevati in tempi diversi. Essa è stata peraltro confermata dall'esame dell'intera famiglia del proposito (i genitori erano entrambi CA e così anche i suoi 3 fratelli) e dalla determinazione dell'attività quantitativa (circa 230).

La Tabella II riporta un confronto tra le frequenze geniche trovate in Sardegna, quelle da noi precedentemente descritte per la popolazione romana [4] e quelle finora riportate nella letteratura.

TABELLA II.

*Distribuzione delle fosfatasi acide* (frequenze geniche percentuali in Italia e altrove).

Numero degli individui esaminati	Località	Frequenze geniche (percentuali)		
		gene P <sup>A</sup>	gene P <sup>B</sup>	gene P <sup>C</sup>
417	Roma (*) . . . .	26,1	65,8	8,0
243	Sardegna . . . .	25,5	65,6	8,8
367	Inghilterra (**)	36,2	59,9	3,8
369	Brasile (***) . .	19,7	77,2	3,1

(\*) Dati di MODIANO et al. (1965 *b*) [4 *b*].

(\*\*) Dati di HOPKINSON et al. (1964) [10].

(\*\*\*) Dati di LAI et al. (1964) [3].

Da questa tabella si può ovviamente concludere che nelle popolazioni sarde finora studiate i geni per le fosfatasi acide dei globuli rossi hanno la stessa distribuzione osservata nella popolazione romana e che, in entrambi questi collettivi, essi si mostrano distribuiti in modo significativamente diverso rispetto alle popolazioni inglesi e brasiliana.

Il dato importante per quel che ci riguarda è l'uguaglianza tra frequenze geniche in Sardegna e a Roma in quanto ciò rende molto probabile la conclusione che la malaria *non* abbia influenzato la distribuzione di questo polimorfismo genetico dei globuli rossi a differenza di quanto accade per le emoglobinopatie S e C, per la talassemia e per l'enzimopenia G6PD.

Naturalmente questa conclusione si potrà ritenere definitiva solo dopo averne ottenuto la conferma diretta con lo studio della distribuzione dei fenotipi fosfatasi nei villaggi sardi di montagna noti per essere stati sempre esenti da malaria endemica.

B) *Dati sul confronto per il linkage Talassemia-fosfatasi.*

Le ricerche sul linkage per loci autosomici si distinguono, come è noto, nella specie umana in due fasi: 1° la « scoperta » del linkage, ovvero la dimostrazione che la segregazione delle coppie di geni in esame non è indipendente e che quindi la frequenza di ricombinazione è significativamente diversa da 0,5; 2° la « stima » del linkage, ovvero la misura accurata della frequenza di ricombinazione.

Esistono diversi metodi per realizzare questo tipo di analisi e tra di essi quello di Morton (1955, 1957) [11] ha il vantaggio di essere contemporaneamente utile sia per la « scoperta » che per la « stima » del linkage. Questo metodo, detto dei « Lod scores », consiste nel calcolare la probabilità di imbattersi in segregazioni come quelle osservate nel campione di famiglie raccolto, per determinati valori di frequenza di ricombinazione tra i due loci in esame che si suppongono localizzati sullo stesso cromosoma (*l'ipotesi zero* che si sottopone al controllo statistico). I « Lod scores » («  $z$  ») si esprimono per convenienza con il logaritmo decimale del rapporto delle probabilità di « linkage » a « non-linkage » (« Log probability ratio » donde il nome di « Log odds » e quindi « Lod scores »):

$$\text{Lod score, « } z \text{ »} = \text{Log}_{10} [\text{Prob (F}/\chi = \theta : \text{Prob (F}/\chi = 0,5)]$$

dove « F » sta per famiglia, «  $\chi$  » per frequenza di ricombinazione, «  $\theta$  » è un determinato valore di frequenza di ricombinazione scelto a caso tra 0 e 0,5. Poiché i valori di «  $z$  » sono stati tabulati da Smith, Penrose e Smith (1961) [12] per i valori di ricombinazione di 0,05, 0,10, 0,20, 0,30, 0,40, è estremamente facile calcolare oggi i *Lod scores* per ciascuna famiglia e per i su riportati livelli di frequenza di ricombinazione. Sommando infine i « Lod scores » di famiglie diverse si ottiene la distribuzione del rapporto di probabilità totale di *Linkage* a *non-linkage* e la stima più accurata (maximum likelihood estimate) della frequenza di ricombinazione. Per comodità di rappresentazione grafica conviene in effetti disegnare la curva degli anti-logaritmi delle sommatorie dei « lod scores » in modo che essa sia tutta compresa tra i valori di ordinata di « 0 » e «  $+\infty$  ». Il punto più elevato di questa curva corrisponderà alla frequenza di ricombinazione più probabile (sulle ascisse). Dall'area della curva infine si potrà calcolare la probabilità totale in favore dell'ipotesi di linkage secondo i criteri discussi in dettaglio da Smith (1959) [13]. Si noti a questo proposito il vantaggio del metodo che dà la risposta finale già in termini di probabilità e quindi non richiede l'uso di tavole statistiche per il calcolo del livello di significatività. Per il calcolo rapido di questa probabilità finale a favore del linkage,  $P_L$ , si procede come segue:

$$P_L = (\text{Area compresa nel grafico} \times 2) : (\text{Area compresa nel grafico} \times 2 + 21)$$

Per ulteriori dettagli sul metodo e sul suo significato si rinvia a Smith (1959) [13].

Un altro vantaggio notevole nell'uso del metodo su descritto è quello di essere in grado di stabilire, quando si fosse trovata una sia pure debole evidenza di linkage in un primo collettivo di dati, qual'è il numero di ulteriori famiglie da esaminare per raggiungere una conclusione definitiva, ovvero accettare o respingere l'ipotesi di linkage tra i due loci in esame. Questo è in effetti il motivo principale che ci ha spinto a pubblicare i dati riportati qui appresso sul presunto linkage talassemia-fosfatasi eritrocitarie.

I dati finora disponibili su questo confronto si riferiscono a 7 famiglie già classificate nei riguardi della talassemia nel corso di precedenti ricerche (probandò un genitore) e riesaminate in questa occasione per le fosfatasi acide eritrocitarie insieme ad altre 12 « non informative » nei riguardi della presente ricerca di linkage.

La Tabella III riporta i « Lod scores » per 9 livelli di frequenza di ricombinazione tra « 0, e 0,5 » (quelli riportati nelle Tavole di Smith, Penrose e Smith [12] più 4 nuovi punti calcolati *ex-novo* per una migliore interpolazione della curva di probabilità), con le sommatorie e i relativi antilogaritmi per ogni punto. Poiché la selezione delle famiglie è stata fatta indipendentemente, attraverso la talassemia (main character), e il secondo sistema genico a confronto (test character) dipende da geni « co-dominanti », non è stata necessaria alcuna correzione per la selezione dei dati.

Il grafico della fig. 1 riporta la distribuzione del rapporto delle probabilità di *linkage* a *non-linkage*. Da esso si può dedurre che *se* i loci per la talassemia beta e la fosfatasi acida eritrocitaria *sono linked*, la migliore stima di frequenza di ricombinazione è intorno al 27 % (il punto di ascissa corrispondente all'ordinata maggiore.). Tuttavia appare evidente che la probabilità in favore dell'esistenza di questo linkage è per il momento molto scarsa e precisamente dell'ordine del 12 %:

$$P_L = \frac{2,7915 (*)}{2,7915 + 21} = 0,117.$$

È tuttavia da notare che questa debole evidenza di linkage è piuttosto costante e dello stesso tipo in tutte le famiglie informative finora esaminate. Se questa situazione persistesse anche in altre famiglie, il linkage potrebbe essere « provato » al di là di ogni ragionevole dubbio con un collettivo di famiglie almeno quattro volte più grande di quello qui riportato in quanto, come si può facilmente verificare, se i « Lod scores » totali di cui alla Tabella IV, vengono moltiplicati per 4, la probabilità totale in favore dell'esistenza del linkage diventa superiore al 90 %.

Bisogna dunque concludere che per poter dire una parola definitiva su questo presunto rapporto di linkage bisogna disporre almeno di una trentina di famiglie informative il che equivale ad averne esaminate per le fosfatasi acide circa un centinaio di quelle già note per avere un genitore talassemico e l'altro normale.

(1) Doppio dell'area della curva in unità arbitrarie.

TABELLA III.

## Distribuzione dei « Lod-scores » (z).

Numero della famiglia	Figli informativi		Livelli di frequenza di ricombinazione per i quali si sono calcolati i « Lod-scores »											
	non ricombinanti	ricombinanti	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45			
AO-3 (*)	3	0	0,837	0,765	0,690	0,612	0,528	0,438	0,342	0,237	0,123			
AO-3 (*)	3	2	-1,442	-0,887	-0,385	-0,388	-0,250	-0,151	-0,082	-0,035	-0,009			
BL-2 (*)	3	1	-0,163	+0,066	+0,167	+0,214	+0,227	+0,216	+0,187	+0,140	+0,077			
BC-1	2	1	-0,721	-0,444	-0,292	-0,194	-0,125	-0,076	-0,041	-0,018	-0,004			
AD-7	5	1	+0,093	+0,276	+0,329	+0,323	+0,284	+0,222	+0,149	+0,076	+0,021			
AL-4	3	0	+0,533	+0,465	+0,393	+0,318	+0,243	+0,170	+0,104	+0,049	+0,013			
AO-2	2	1	-0,721	-0,444	-0,292	-0,194	-0,125	-0,076	-0,041	-0,018	-0,004			
Total Lod-Scores (Z)			-1,584	-0,203	+0,410	+0,691	+0,782	+0,743	+0,618	+0,431	+0,217			
Antilogaritmi di « Z »			0,026	0,627	2,571	4,909	6,053	5,533	4,150	2,698	1,648			

(\*) Le famiglie con asterisco sono le uniche nelle quali si conosce la « fase » (in « coupling » o « repulsion ») del genotipo del genitore doppio-eterozigote.

Una tale impresa è così gigantesca da poter essere realizzata solo attraverso lo sforzo combinato di due o più gruppi di ricerca ed è appunto per esortare, coloro che ne avessero la possibilità, a raccogliere dati critici sull'argomento, che abbiamo considerato opportuno pubblicare i dati cui sopra malgrado l'ancora debole probabilità in favore della reale esistenza di linkage.

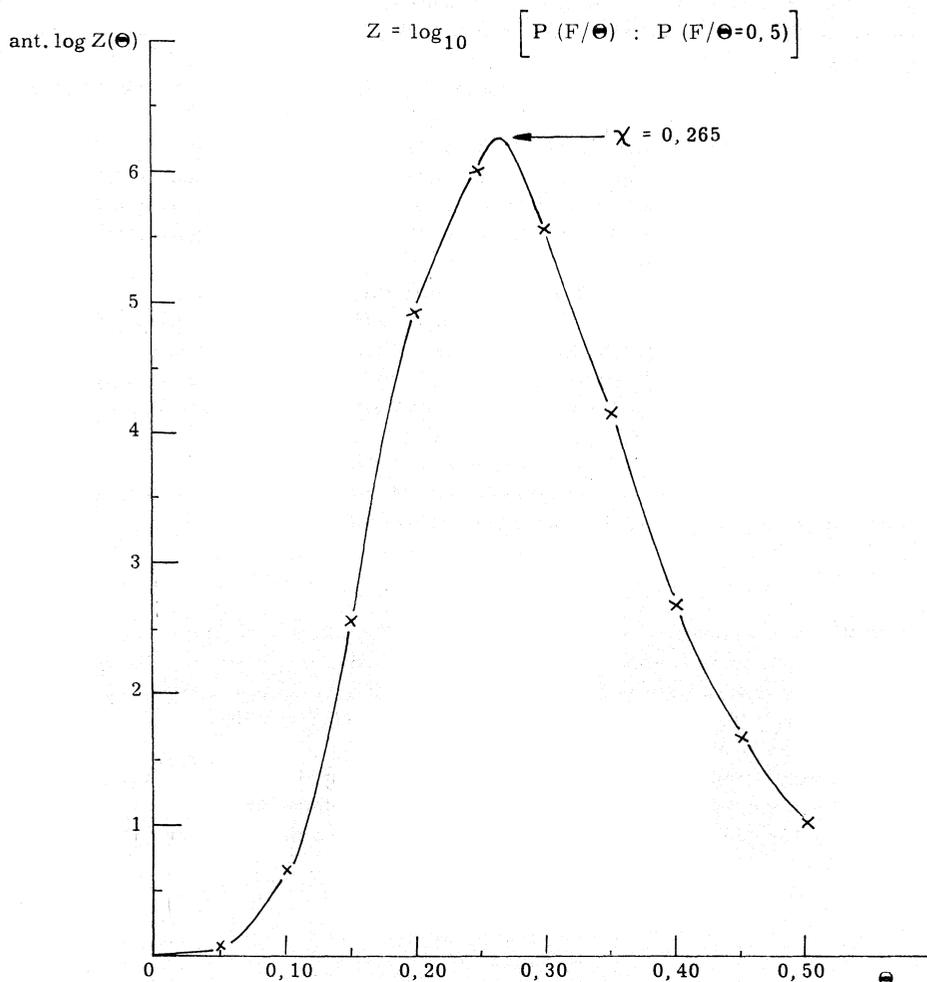


Fig. 1. - Distribuzione del rapporto di probabilità di *linkage* a non-*linkage* ( $Z$ ).

A questo proposito val la pena di suggerire anche l'opportunità di estendere le ricerche al confronto tra i loci per la fosfatasi acida eritrocitaria e il sistema Lewis-Secretore, essendo stata in precedenza segnalato dal nostro stesso gruppo [14] una debole evidenza di linkage tra talassemia beta e Lewis-secretore. Se uno stretto linkage tra i loci secretore e fosfatasi acida eritrocitaria dovesse risultare da siffatta indagine, si otterrebbe una conferma indipendente e definitiva di entrambi i linkages incerti su riferiti e si avrebbe la prima mappa statistica a tre punti per un cromosoma autosomico della specie umana.

## BIBLIOGRAFIA.

- [1] D. A. KOPKINSON, N. SPENCER, H. HARRIS, «Nature», 199, 969 (1963).  
 [2] N. SPENCER, D. A. HOPKINSON, H. HARRIS, «Nature», 201, 299 (1964).  
 [3] L. LAI, S. NEVO, A. G. STEINBERG, «Science», 145, 1187 (1964).  
 [4 a] G. MODIANO, F. BRUNELLI, A. FERRARI, W. FRATTAROLI, «Atti A. G. I.», X, 296 (1965 a).  
 [4 b] G. MODIANO, F. BRUNELLI, A. FERRARI, C. SANTOLAMAZZA, W. FRATTAROLI, in preparazione.  
 [5] P. M. CONNEALLY, SARAH NEVO, T. E. CLEGHORN, H. HARRIS, D. A. HOPKINSON, E. B. ROBSON, N. SPENCER e A. G. STEINBERG, «Am. J. Hum. Genet.», 17, 109 (1965).  
 [6] M. SINISCALCO, L. BERNINI, B. LATTE, A. G. MOTULSKY, «Nature», 190, 1179 (1961).  
 [7] G. MODIANO, G. FILIPPI, F. BRUNELLI, R. PALMARINO, C. SANTOLAMAZZA e M. SINISCALCO, in preparazione.  
 [8] T. H. J. HUISMAN, A. M. DOZY, «Anal. Biochem.», 2, 400 (1961).  
 [9] U. CARCASSI, R. CEPPELLINI, M. SINISCALCO, «Haematologica», XLII, 1635 (1957).  
 [10] D. A. HOPKINSON, N. SPENCER, H. HARRIS, «Am. J. Human Genet.», 16, 141 (1964).  
 [11] N. E. MORTON, «Am. J. Human Genet.», 7, 277 (1955); Ibidem 9, 55 (1957).  
 [12] S. SMITH, L. S. PENROSE, C. A. B. SMITH, *Mathematical Tables for Research Workers in Human Genetics*, Churchill, Ltd, London (1961).  
 [13] C. A. B. SMITH, «Am. J. Human Genet.», 11, 289 (1959).  
 [14] I. BIANCO, R. CEPPELLINI, E. SILVESTRONI, M. SINISCALCO, «Ann. Human Genet.», 19, 81 (1954); R. CEPPELLINI, M. SINISCALCO, «Riv. Ist. Sier. Ital.», 30, 431 (1955).

SUMMARY. — The frequencies of  $P^A$ ,  $P^B$  and  $P^C$  alleles at the locus for red cell acid phosphatase have been determined in 243 individuals living in the province of Cagliari. This has been highly malaric until recently and a high frequency of G-6-PD deficiency and thalassaemia genes has been observed in its population. Frequencies of the alleles of P genes are identical to those found in Rome.

The results strongly argue against the hypothesis that the malarial endemia had some effect on the maintenance of this polymorphism in Sardinia. Results of linkage studies between  $\beta$ -thalassaemia and red cell acid phosphatase genes are also reported.