

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI  
**RENDICONTI**

---

ROSA MARIA CORBO

**Assenza di nucleoside fosfondasi purinica e deficit  
selettivo grave dei linfociti T**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 66 (1979), n.4, p. 290–296.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1979\\_8\\_66\\_4\\_290\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1979_8_66_4_290_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.** — *Assenza di nucleoside fosforilasi purinica e deficit selettivo grave dei linfociti T.* Nota di ROSA MARIA CORBO (\*), RENATO SCACCHI (\*\*), TIZIANA FERRARINI (\*), RICCIOTTI PALMARINO (\*\*\*) e ERMINIA CARAPPELLA-DE LUCA (\*\*\*), presentata (\*\*\*\*) dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — We studied a 22 months-old girl with severe selective T-cell deficiency and no measurable purine nucleoside phosphorylase activity in the RBC and granulocytes. No inhibitor was found in the patient's erythrocytes. Her parents are second cousins and their red cells exhibited about half the normal level of NP activity. The identification of heterozygotes within a three generation pedigree confirms that PNP deficiency is inherited as a mendelian autosomal trait and that erythrocytes can be used for carrier detection.

La nucleoside fosforilasi purinica (PNP) catalizza la conversione reversibile dei nucleosidi purinici nelle corrispondenti basi libere. La sintesi dell'enzima dipende, nell'uomo, da un singolo locus strutturale localizzato sul cromosoma 14 [1], e la maggior parte degli individui è omozigote per l'allele NP<sup>1</sup> [2]. L'analisi dei patterns elettroforetici delle varianti genetiche suggerisce che la molecola della PNP, il cui peso è circa 84.000, sia costituita da tre sub-unità [2].

Durante gli ultimi tre anni sono state individuate 4 famiglie in cui uno dei membri presentava una enzimopenia ereditaria di PNP associata con una alterazione grave della immunità cellulare ed un blocco nel catabolismo delle purine [3, 4, 5, 6]. È stata inoltre descritta, in due membri di una stessa famiglia, una non grave disfunzione dei linfociti T ed un blocco parziale della degradazione dei nucleosidi purinici associati ad una forma di nucleoside fosforilasi con alterate caratteristiche chimico-fisiche [7, 15].

Recentemente abbiamo individuato un soggetto con enzimopenia della PNP ed alterazioni gravi a carico dei linfociti T e B; alcuni aspetti del caso sono stati già pubblicati [8, 9]. In questa Nota riportiamo i risultati di indagini genetiche e biochimiche relative al paziente ed alcuni membri del nucleo familiare.

#### MATERIALI E METODI

Il probando e 10 membri della famiglia sono stati esaminati per il pattern elettroforetico e l'attività enzimatica della nucleoside fosforilasi purinica (PNP) e dell'adenosindeaminasi (ADA). La popolazione di controllo, individui appa-

(\*) Istituto di Genetica, Facoltà di Scienze, Università di Roma, Italia.

(\*\*) Centro di Genetica Evoluzionistica del CNR, Roma, Italia.

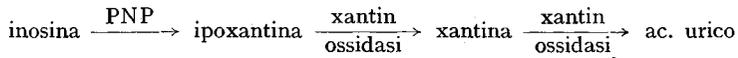
(\*\*\*) Istituto di Puericultura, Università di Roma, Italia.

(\*\*\*\*) Nella seduta del 21 aprile 1979.

rentemente sani, non imparentati, di età compresa tra i 6 e i 40 anni, era costituita di 65 soggetti (30 ♂ e 35 ♀) per la PNP e di 53 soggetti (26 ♂ e 27 ♀) per l'ADA.

#### *Nucleoside fosforilasi eritrocitaria.*

L'attività enzimatica è stata determinata secondo il metodo di Hopkinson *et al.* [10] ed espressa come variazione di densità ottica a 37 °C, a 293  $\mu$  per ora e per mg di emoglobina, variazione di densità ottica dovuta alla produzione di acido urico:



Per esprimere l'attività enzimatica come  $\mu$ mol di acido urico formate/ml/minuto/gr. Hb, i valori di PNP riportati nelle figg. 1 e 2 vanno moltiplicati per il fattore 4.12.

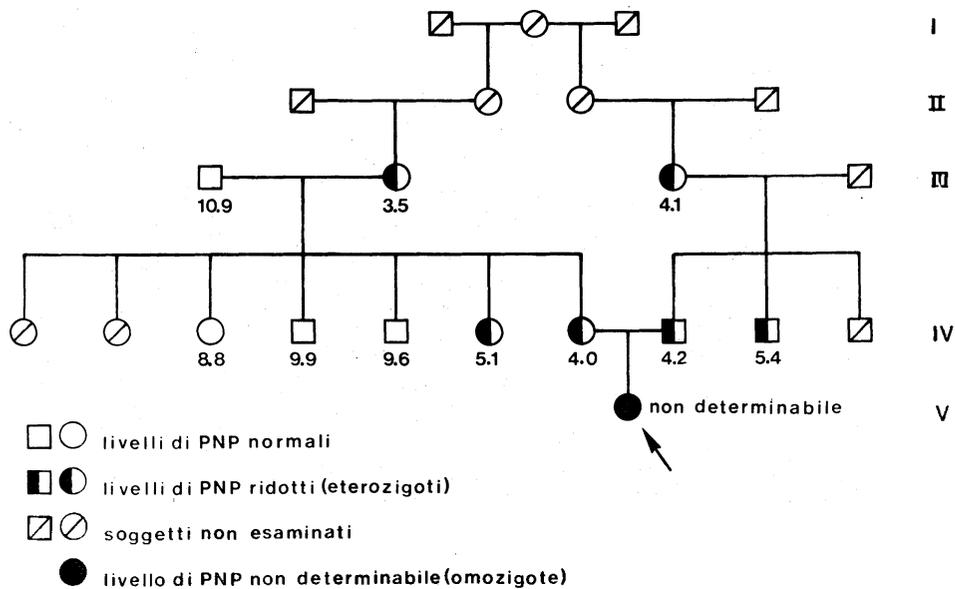


Fig. 1. - Nucleo familiare del paziente. I valori riportati nella figura corrispondono all'attività della PNP eritrocitaria ( $\Delta E_{293\mu}$ /h/mgHb).

Per la determinazione del fenotipo elettroforetico è stato usato il metodo di Edwards *et al.* [2].

#### *Adenosindeaminasi eritrocitaria.*

L'attività enzimatica è stata determinata secondo il metodo di Battistuzzi *et al.* [11] ed espressa come  $\mu$ mol di adenosina deaminata per ora, per grammo di emoglobina a 37 °C.

Per la determinazione del fenotipo elettroforetico è stato usato il metodo di Spencer *et al.* [12].

*Emoglobina.*

L'emoglobina è stata determinata secondo il metodo della cianmetemoglobina [13].

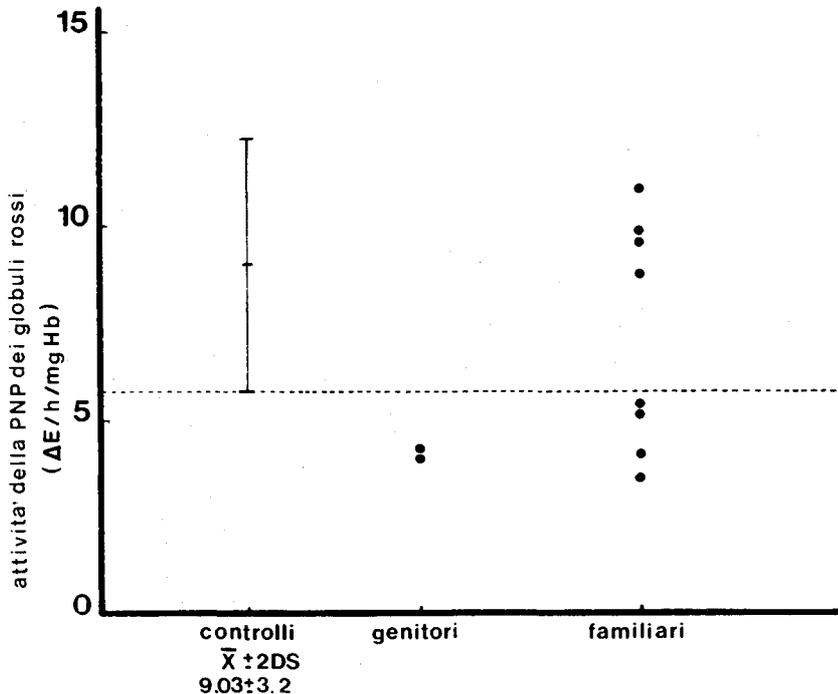


Fig. 2. - Attività della PNP in 65 controlli ed in 10 membri del nucleo familiare del paziente.

*Separazione dei globuli rossi in base all'età.*

La separazione dei globuli rossi in giovani e vecchi veniva effettuata secondo il metodo di Murphy [14].

## RISULTATI

La fig. 1 mostra parte del nucleo familiare del paziente ora deceduto, una bambina di 22 mesi con grave deficienza dei linfociti T, perdita progressiva della funzione dei linfociti B ed assenza di nucleoside fosforilasi purinica. Dal pedigree si può vedere come i genitori della bambina siano imparentati essendo le due bisnonne figlie della stessa madre. Accanto ad ogni soggetto esaminato abbiamo riportato i valori della attività della PNP eritrocitaria espressa come variazione di densità ottica a 293 m $\mu$ .

Per quanto riguarda la popolazione di controllo, l'attività della PNP, che è risultata indipendente sia dal sesso che dall'età, è riportata in fig. 2.

Confrontando le attività osservate nei componenti il nucleo familiare con la distribuzione dei valori della popolazione di controllo si distinguono due gruppi: il primo con livelli di attività compresi nell'intervallo  $\bar{x} \pm 2$  DS della distribuzione nei valori normali ed il secondo che si colloca al di fuori di questo intervallo e precisamente al di sotto di  $\bar{x} - 2$  DS. In questo secondo gruppo sono compresi i due genitori del paziente i cui livelli di attività si dispongono rispettivamente a 3 e 3.1 DSs al di sotto della media della popolazione di controllo ( $p < 0.01$ ). Se si ammette che questi ultimi siano eterozigoti, altri quattro membri del nucleo familiare risultano portatori. Pertanto il pattern di trasmissione da noi osservato per tre generazioni conferma quanto visto in tre [3, 4, 15] dei quattro casi finora descritti in cui è stato preso in considerazione il problema (5) e cioè che il deficit di PNP si trasmette come un carattere mendeliano autosomico.

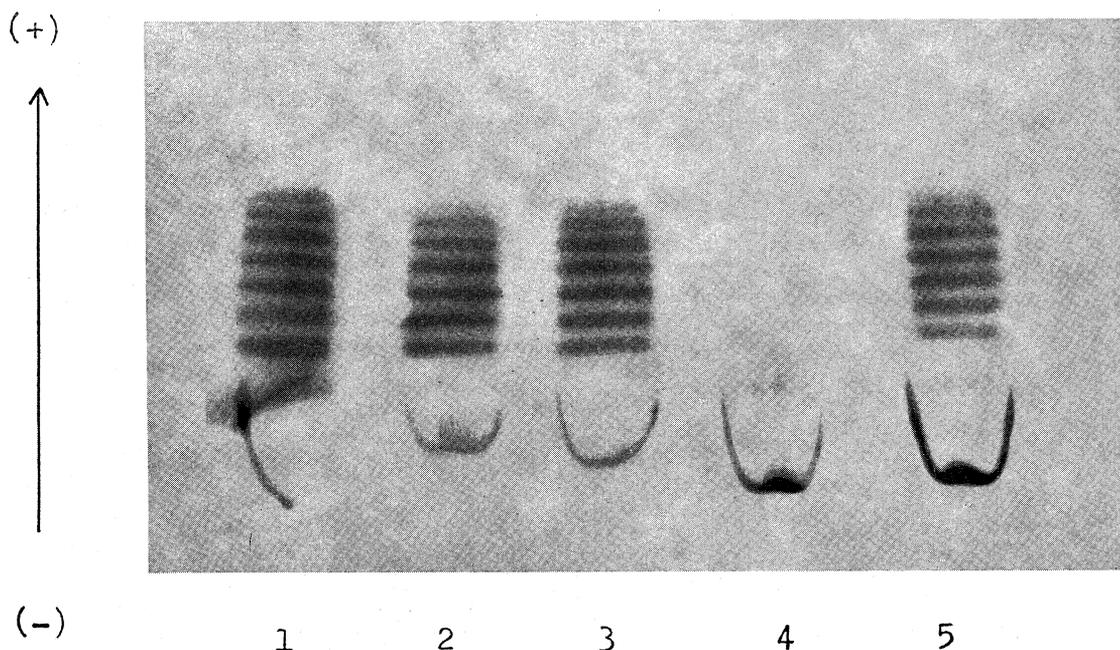


Fig. 3. - Traccianti elettroforetici della PNP eritrocitaria di un soggetto normale (1), della madre (2 e 3), del paziente (4) e del padre (5).

L'esame mediante elettroforesi su gel d'amido della PNP eritrocitaria non ha rilevato alcuna differenza tra i patterns dei genitori ed un controllo normale; il paziente non mostrava traccia di attività enzimatica (fig. 3).

Data l'assenza di attività nei granulociti e nella frazione giovane dei globuli rossi del paziente, è stata esclusa per questo caso l'ipotesi che l'enzimopenia fosse da attribuirsi ad una forma instabile di enzima. Da notare che nei controlli l'attività della frazione dei globuli rossi « giovani » risultava di circa il 20% superiore a quella dei globuli rossi « vecchi ».

Il dosaggio della PNP in una miscela al 50 % degli emolisati del paziente e di un controllo normale ha permesso di escludere l'ipotesi della presenza di un inibitore specifico negli eritrociti del paziente stesso. Come risulta dalla fig. 4 i livelli di attività della miscela in esame erano pressoché uguali a quelli attesi per una soluzione al 50 % del lisato dello stesso controllo.

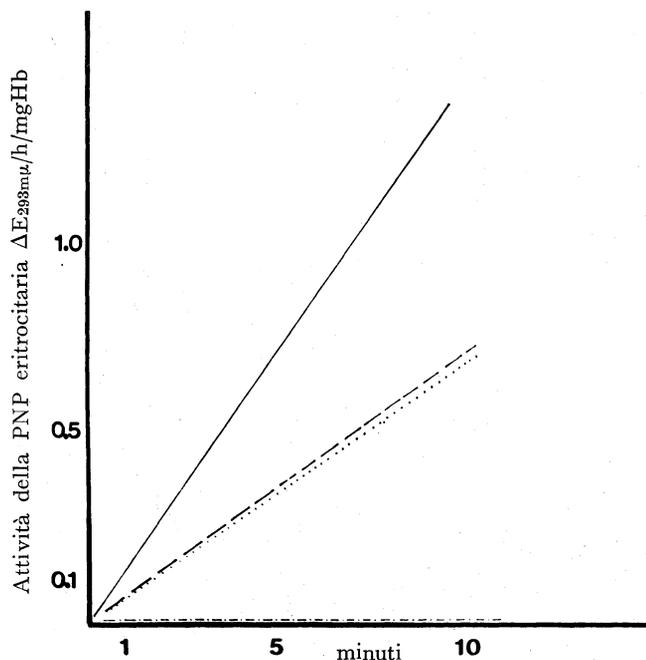


Fig. 4. - Attività della PNP nei globuli rossi del paziente, di un controllo normale e in una miscela al 50% dei loro lisati.

- controllo
- - - - - paziente
- · - · - atteso per una soluzione al 50% del lisato del controllo
- · · · · livelli di attività della miscela al 50% dei lisati del controllo e del paziente.

I globuli rossi del paziente e di alcuni suoi familiari sono stati esaminati anche per l'adenosindeaminasi purinica (ADA), l'enzima che catalizza la reazione immediatamente precedente a quella della PNP, e la cui deficienza causa una grave forma di disfunzione immunitaria (CID) [16]. Tutti i componenti il nucleo familiare, incluso il probando, presentavano fenotipo elettroforetico ADA 1-1; poiché, come è noto [11] l'attività enzimatica media associata al fenotipo 1-1 è significativamente più elevata di quella che si osserva negli eterozigoti 2-1, questi ultimi sono stati esclusi dalla popolazione di controllo. Non sono risultate differenze tra le distribuzioni dei valori di attività dell'ADA nella popolazione di controllo ( $\bar{x} = 98 \pm 2.7$ ) e nei familiari del paziente ( $\bar{x} = 96 \pm 5.2$ ); quest'ultimo presentava una attività enzimatica nettamente superiore ( $213.5$ ,  $s = 5.8$ ,  $p < 0.0001$ ).

## DISCUSSIONE

Fino ad oggi sono stati descritti 5 casi di enzimopenia per la PNP con alterazioni gravi del sistema immunitario oltre ad un caso di associazione tra una variante labile di questo enzima ed una forma lieve di disfunzione immunitaria. Si tratta di una sindrome clinica per la quale la conoscenza del difetto biochimico che ne è alla base rende possibile la ricerca dei portatori mediante la determinazione dell'attività enzimatica. Nel nucleo familiare da noi esaminato, dei nove componenti che nell'ambito di due generazioni potevano essere eterozigoti, sei presentavano un livello di PNP che si collocava al di sotto del limite inferiore dell'intervallo di confidenza al 95 % dell'attività media della popolazione di controllo. Questi dati indicano che mediante l'esame dell'attività enzimatica dei lisati dei componenti il nucleo familiare di un soggetto con alterazioni gravi del sistema immunitario ed enzimopenia di PNP è possibile l'individuazione degli eterozigoti con un margine di errore del 2.5 %.

L'esame dei tracciati elettroforetici dei portatori obbligati nell'ambito delle 4 famiglie in cui è stato possibile tale confronto e delle caratteristiche biochimiche e cliniche dei pazienti dimostra l'esistenza di almeno tre diversi alleli mutati nel locus NP e quindi la notevole eterogeneità genetica di questa enzimopenia [9].

L'elevata attività dell'ADA osservata nel paziente potrebbe essere un dato rilevante per la stretta relazione che lega l'ADA e la PNP nel metabolismo purinico. Risulta però di difficile interpretazione non essendo questa una situazione comune a tutti i casi di enzimopenia di PNP descritti [4].

I nucleotidi purinici sono degradati ad acido urico mediante una serie di reazioni regolate in maniera complessa. Errori congeniti in questa fase del metabolismo quali l'enzimopenia dell'ADA e della PNP sono stati trovati in associazione con specifiche sindromi di immunodeficienza. Questa relazione suggerisce che gli intermedi del catabolismo delle purine possano avere un ruolo regolativo della funzione immunitaria. Si accetta pertanto che tra il difetto immunitario e queste enzimopenie vi sia una relazione di tipo causale ma non è ancora chiaro come tali disordini metabolici possano determinare la immunodeficienza.

Per la determinazione dell'attività della PNP nei granulociti si ringrazia il Dott. D. Roos, Lab. Centrale del servizio trasfusionale della C.D.O. e Lab. di Immunologia Clinica e Sperimentale dell'Università di Amsterdam.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] D. L. GEORGE e U. FRANCKE (1976) - *Gene dose effect: regional mapping of human nucleoside phosphorylase on chromosome 14*, « Science », 194, 851-852.
- [2] Y. H. EDWARDS, D. A. HOPKINSON e H. HARRIS (1971) - *Inherited variants of human nucleoside phosphorylase*. « Ann. Hum. Genet. Lond. », 34, 395-408.
- [3] E. R. GIBLETT, A. J. AMMAN, D. W. WARA, R. SANDMAN e L. K. DIAMOND (1975) - *Nucleoside-phosphorylase deficiency in a child with severely defective T-cell immunity and normal B-cell immunity*, « The Lancet », i, 1010-1013.
- [4] J. W. STOOP, B. J. M. ZEGERS, G. F. M. HENDRICKX, L. H. SIEGENBEEK VAN HEUKELOM, G. E. J. STAAL, P. K. DE BREE, S. K. WADMAN e R. E. BALLIEUX (1977) - *Purine nucleoside phosphorylase deficiency associated with selective cellular immunodeficiency*, « The New England Journal of Medicine », 296, 651-655.
- [5] M. HAMET, C. GRISCELLI e P. CARTIER (1977) - *A second case of inosine phosphorylase deficiency with severe T-cell abnormalities*, « Adv. Exp. Med. Biol. », 76 A, 477.
- [6] K. RICH, W. ARNOLD, I. FOX e T. PALELLA (1978) - *Purine nucleoside phosphorylase (PNP) deficiency with cellular immunodeficiency*, « Pediatric Research », 12, 485.
- [7] I. H. FOX, C. M. ANDRES, E. W. GELFAND e D. BIGGAR (1977) - *Purine nucleoside phosphorylase deficiency: altered kinetic properties of a mutant enzyme*, « Science », 197, 1084-1086.
- [8] E. CARAPELLA-DE LUCA, F. AIUTI, P. LUCARELLI, L. BRUNI, C. D. BARONI, C. IMPERATO, D. ROOS e A. ASTALDI (1978) - *A patient with nucleoside phosphorylase deficiency, selective T-cell deficiency and auto-immune haemolytic anaemia*, « The Journal of Pediatrics », 93, 1000-1003.
- [9] P. LUCARELLI, R. M. CORBO, R. SCACCHI, R. PALMARINO e E. CARAPELLA-DE LUCA (1979) - *Another family with purine nucleoside phosphorylase deficiency*. « Human Genetics », in corso di stampa.
- [10] D. A. HOPKINSON, P. J. L. COOK e H. HARRIS (1969) - *Further data on the adenosine deaminase (ADA) polymorphism and a report of a new phenotype*, « Ann. Hum. Genet. Lond. », 32, 361-367.
- [11] G. BATTISTUZZI, R. SCOZZARI, P. SANTOLAMAZZA, L. TERRENATO e G. MODIANO (1974) - *Comparative activity of red cell adenosine deaminase allelic forms*, « Nature », 251, 711-713.
- [12] N. SPENCER, D. A. HOPKINSON e H. HARRIS (1968) - *Adenosine deaminase polymorphism in man*, « Ann. Hum. Genet. Lond. », 32, 9-14.
- [13] J. E. DACIE (1958) - *Basic haematological techniques. I: the cyanmethaemoglobin method*, in « Practical haematology », seconda edizione, J. e A. Churchill Ltd., p. 31.
- [14] J. R. MURPHY (1973) - *Influence of temperature and method of centrifugation on the separation of erythrocytes*. « J. Lab. Clin. Med. », 82, 334-341.
- [15] W. R. A. OSBORNE, S. CHEN, E. R. GIBLETT, W. D. BIGGAR, A. A. AMMAN e C. R. SCOTT (1977) - *Purine nucleoside phosphorylase deficiency. Evidence for molecular heterogeneity in two families with enzyme-deficient members*, « J. Clin. Invest. », 60, 741-746.
- [16] S. H. POLMAR (1977) - *Lymphocyte enzyme deficiencies and the metabolic basis of immunodeficiency disease*, « Clinics in Haematology », 6, 423-438.