

Masala, Bruno Lucio (1981) *Le Sindromi talassemiche*. Bollettino della Società sarda di scienze naturali, Vol. 20 (1980), p. 1-25. ISSN 0392-6710.

<http://eprints.uniss.it/3344/>

BOLLETTINO

della

SOCIETA' SARDA
DI SCIENZE NATURALI

La Società Sarda di Scienze Naturali ha lo scopo d'incoraggiare e stimolare l'interesse per gli studi naturalistici, promuovere e sostenere tutte le iniziative atte alla conservazione dell'ambiente e costituire infine un Museo Naturalistico Sardo.

S. S. S. N.
SOCIETÀ SARDA di SCIENZE NATURALI
Via Muroni, 25 - 07100 Sassari.

CONSIGLIO DIRETTIVO (1980-1982)

Presidente: Franca Valsecchi.

Segretario: Giovanni Cordella.

Consiglieri: Bruno Corrias, Franca Dalmasso, Umberto Giordano, Maria Pala, Gavino Vaira.

Collegio Revisori dei conti: Ulisse Prota, Giancarlo Rodella, Giovanni Maria Testa.

Collegio Probi Viri: Giovanni Manunta, Vico Mossa, Enzo Sanfilippo.

Consulenti Editoriali per il XX volume:

Prof. Pier Virgilio ARRIGONI
Prof. Paolo Roberto FEDERICI
Prof. Fabio GARBARI
Prof. Nullo Glauco LEPORI
Prof. Paolo MELETTI
Prof. Enio NARDI
Prof. Antonio ONNIS
Prof. Romolo PROTA
Prof. Renzo STEFANI

Direttore Responsabile e Redattore
Prof. FRANCA VALSECCHI

Autorizzazione Tribunale di Sassari n. 70 del 29.V.1968

Le sindromi talassemiche

BRUNO MASALA

Istituto di Fisiologia Generale e Laboratorio Interdisciplinare
per lo Studio delle Talassemie, Emoglobinopatie e Favismo
dell'Università di Sassari.

Via Muroni 25, Sassari.

The thalassemia syndromes

Recent developments of molecular biology and genetic of thalassemia syndromes are discussed with special regard to Sardinian situation. In the island heterozygous α and β thalassemias are present with incidences of 13,5 and 12,5% respectively. β^+ and $\delta\beta$ thalassemias together with several types of HPFH, are also present.

Screening programs at level of couples are suggested for the prevention of β thalassaemic homozygosity.

KEY WORDS: Thalassemias, Genetic diseases, Sardinia.

INTRODUZIONE

Le emoglobine umane sono formate dalla associazione di 4 catene polipeptidiche dette globine ciascuna delle quali è coniugata ad un gruppo non proteico, contenente un atomo di ferro, detto eme. Il tetramero che ne risulta ha peso molecolare di circa 68.000 dalton e la sua funzione principale è quella di trasportare ossigeno.

Le catene globiniche sono state denominate mediante lettere dell'alfabeto greco ed i tetrameri originati dalla loro associazione sono rappresentati dalla emoglobina adulta Hb A ($\alpha_2\beta_2$), dalla adulta minore Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$), dalla fetale Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) e da tre emoglobine embrionali. Recenti esperienze di biologia molecolare

hanno chiarito la localizzazione cromosomica dei geni che controllano la sintesi di ciascuna delle catene globiniche conosciute.

In particolare è dimostrato che sul cromosoma 16 sono disposti in sequenza 5' → 3' due geni ζ e due geni α identici (DEISSEROTH e coll., 1977; LAUER e coll., 1980), mentre sul cromosoma 11 sono localizzati il gene ε, due geni γ (i cui prodotti differiscono per la presenza dell'aminoacido glicina o alanina nella posizione 136 della catena), il gene δ ed il gene β (DEISSEROTH e coll., 1978; FRITSCH e coll., 1980). Con gli stessi metodi, di cui si parlerà più avanti, sono stati scoperti altri geni non attivi dei quali, peraltro, non è ancora noto il significato.

La Fig. 1 mostra come le globine prodotte da ciascun gene si appaiano per formare il tetramero e come le emoglobine siano sempre formate da una metà prodotta sotto il controllo di geni sul cromosoma 16 e da una metà sotto il controllo di geni su cromosoma 11.

I geni per le catene globiniche non sono tutti attivi contemporaneamente ma soltanto in periodi specifici della vita a dimostrazione della esistenza di un complicato meccanismo di regolazione non ancora chiarito. I geni ζ sono attivi molto precocemente già a livello delle cellule eritroidi del sacco vitellino. La attività dei geni α comincia intorno al 3° mese di gestazione e si mantiene poi costante sia nella vita fetale che adulta, mentre quella dei geni γ dopo aver raggiunto prontamente il massimo della espressività decresce quando comincia la sintesi della catena β (HUEHNS e coll., 1964). La precisa collocazione dei momenti di sintesi delle diverse catene globiniche nel feto ha reso possibile l'attuazione della importantissima pratica della diagnosi prenatale delle talassemie. Intorno all'ottavo mese di vita si stabilisce il quadro emoglobinico definitivo che, in condizioni normali, risulta costituito per il 97% da Hb A, per il 2,5% da Hb A₂ e per lo 0,1-0,5% da Hb F.

LE EMOGLOBINOPATIE E LE TALASSEMIE

Peraltro, sia il DNA che costituisce i geni per le globine, che la sequenza di reazioni che dal DNA conducono alla sintesi di esse, possono subire danni che alterano o la composizione in ami-

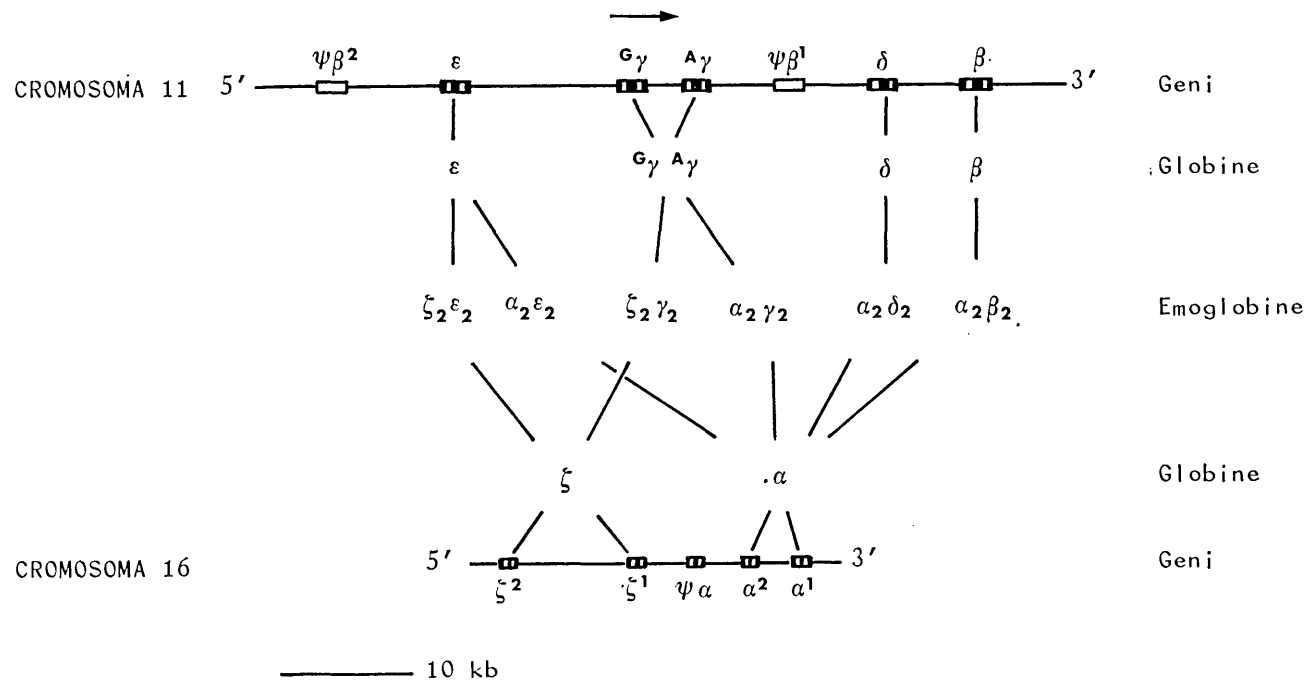


Fig. 1 - Localizzazione cromosomica dei geni per le catene globiniche e struttura delle emoglobine $\zeta_2\epsilon_2$ Gower I; $\alpha_2\epsilon_2$ Gower II; $\zeta_2\gamma_2$ Portland; $\alpha_2\gamma_2$ Fetale; $\alpha_2\beta_2$ Adulta; $\alpha_2\delta_2$ Adulta minore. Le zone chiare all'interno dei geni rappresentano le sequenze intercorrenti non trascritte. La freccia indica la direzione della trascrizione.

noacidi o la capacità di sintesi di una certa globina. Le emoglobine S e C, per esempio, diffuse fra i negri, sono il risultato di una mutazione a carico del codone GAG (G: guanina; A: adenina) che codifica per l'acido glutamico nel sesto residuo aminoacidico della catena β . La mutante β^s è codificata da GUG (U: uracile) che rappresenta il codone per la valina, mentre la mutante β^c è codificata da AAG che rappresenta il codone per la lisina (MARTINI e coll., 1977).

Attualmente sono conosciute ben 308 varianti emoglobiniche dovute a sostituzioni di un aminoacido, mentre ne sono state descritte 6 con più di una sostituzione, 7 dovute alla fusione di due geni, 10 con delezione di uno o più aminoacidi e 7 dovute all'allungamento della catena globinica.

Non tutte le emoglobine contenenti catene globiniche mutate determinano effetti patologici come nel caso della anemia falciforme da Hb S, e ciò si verifica solo quando la sostituzione coinvolge aminoacidi interessati a funzioni o proprietà essenziali del tetramero emoglobinico. In Sardegna, accanto a rari casi di Hb S di probabile origine punica o araba, sono presenti due varianti della catena α , Hb J Sardegna e Hb G Philadelphia, ed una variante della catena γ (Hb F Malta) quest'ultima rilevabile solo in una piccola percentuale di neonati di Ittiri (MAZZA e coll., 1980).

Poiché le globine β sono prodotte da due geni per corredo cromosomico diploide, le varianti relative sono presenti nell'eterozigote in concentrazioni intorno al 50%. Le varianti della catena α invece sono presenti in concentrazioni di circa il 25% dato che quattro sono i geni per corredo diploide.

In altri tipi di difetti ereditari le globine mostrano la normale sequenza di aminoacidi ma vengono prodotte in quantità ridotte: tali sindromi prendono il nome di talassemie. Poiché qualunque gene può subire danni che ne riducono la capacità di sintesi, si distinguono α -, β -, δ -, γ -talassemie oltre ad altri tipi quali la $\delta\beta$ -talassemia (OTTOLENGHI e coll., 1976) e la $\gamma\beta$ -talassemia (KAN e coll., 1972) nelle quali il danno interessa contemporaneamente due geni dello stesso cromosoma. La condizione caratterizzata da produzione di livelli del 15-25% di Hb F anche nella vita adulta, chiamata persistenza ereditaria di emoglobina fetale o HFPFH, pur essendo causata da un danno genico a carico del gene β e di altre grosse porzioni dello stesso tratto di cromosoma, non viene consi-

derata una talassemia non essendo presente uno sbilancio fra le globine α e le non- α (WEATHERALL e CLEGG, 1979; WOOD e coll., 1979). Quando lo sbilancio esiste esso è di lieve entità.

I geni per le catene globiniche vengono ereditati secondo le leggi mendeliane relative a caratteri autosomici recessivi. Così gli eterozigoti per la Hb S possiedono un gene β^s ed uno β^A , mentre gli omozigoti ambedue i geni del tipo β^s ; gli eterozigoti per la β -talassemia hanno un gene normale ed uno malfunzionante e gli omozigoti ambedue i geni β malfunzionanti.

Allo stato eterozigote le talassemie sono asintomatiche: l'allele normale compensa in modo sufficiente il deficit di sintesi sull'altro cromosoma. Allo stato omozigote invece, il grave deficit o la mancanza di sintesi di una globina determinano sempre fenomeni patologici di una certa gravità. L'omozigosi per l' α -talassemia per esempio, è letale: essendo l'assenza di catene α totale, le γ e le β globine formano degli omotetrameri (Hb Bart γ^4 , e Hb H β^4) la cui affinità per l'ossigeno è tale da non consentirne la sua completa cessione ai tessuti. Per conseguenza i feti muoiono in utero subito prima della nascita o immediatamente dopo. Nella omozigosi per la β -talassemia l'assenza della globina β viene compensata dalla conservata capacità di sintesi delle γ . Purtroppo tale sintesi non è sufficiente a consentire la produzione di quantità idonee di Hb F determinando l'instaurarsi di una grave anemia.

LE BASI MOLECOLARI DELLE β -TALASSEMIE

Per comprendere le ragioni che determinano nella β -talassemia la riduzione della sintesi della β globina, è necessario riassumere il meccanismo di espressione dei geni per le globine come risulta dalle ricerche più recenti e come è schematizzato nella Fig. 2.

È dimostrato che la sequenza di DNA che codifica per le catene globiniche è discontinua ed intercalata da tratti detti « intercorrenti » non codificanti o anche « introni » (JACKSON e WILLIAMSON, 1980). La funzione di queste sequenze è sconosciuta, ma è certo che esse vengono trascritte in un grosso precursore di mRNA il quale nel nucleo subisce una serie di modifiche e di accorciamenti.

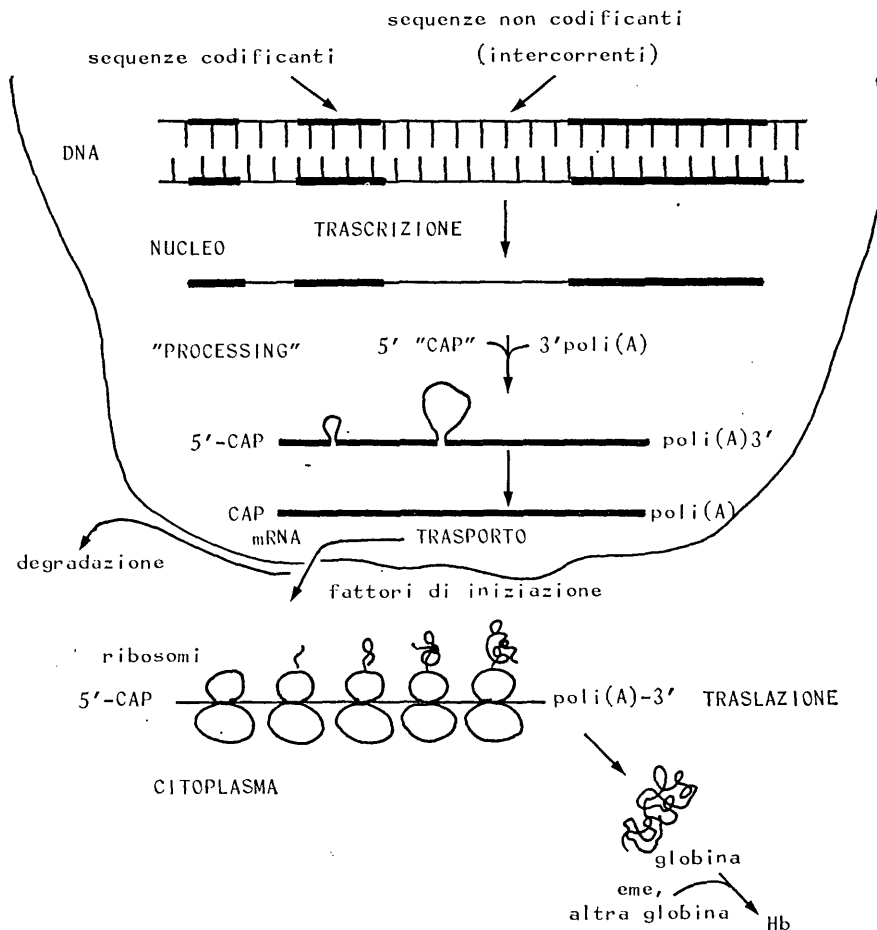


Fig. 2 - Rappresentazione schematica della sintesi delle catene globiniche.

Le modifiche riguardano l'aggiunta di nucleotidi alle estremità 5' e 3' mentre gli accorciamenti consistono nell'allontanamento delle sequenze complementari al DNA intercorrente. L'mRNA così maturato viene trasportato nel citoplasma dove, associandosi ai ribosomi e agli altri componenti l'apparato traslazionale, viene tradotto in globina. La globina si associa in seguito all'eme ed alla globina controparte formando l'emoglobina funzionale (NIENHUIS e coll., 1979).

Nella β -talassemia una qualunque di tali tappe può venire interrotta o impedita in parte. È certo che l'apparato traslazionale citoplasmatico è integro nelle cellule eritroidi, mentre è stato dimostrato che nei diversi tipi di β -talassemia conosciuti l'mRNA è presente in quantità ridotte o ha ridotte capacità funzionali (NIENHUIS e BÉNZ, 1977). Recentemente le difficoltà insite nelle proprietà dell'mRNA, quali la brevità della vita della molecola, hanno sollecitato il ricorso a nuove metodologie che prendono il nome di ibridazione molecolare e mappaggio genico, mediante le quali sono stati ottenuti in breve tempo risultati spettacolari.

Quando preparati di mRNA per le globine α o β vengono incubati in presenza dell'enzima trascrittasi inversa, si può ottenere una molecola di DNA radioattiva complementare nella sequenza di basi al mRNA impiegato. Tale molecola viene chiamata DNA copia o cDNA e costituisce una molecola « testimone » per i geni α , β o altri o per i rispettivi mRNA. In effetti se campioni di DNA o di RNA vengono incubati con gli idonei cDNA, si formano doppie eliche ibride di cDNA-DNA o cDNA-RNA che consentono di dosare la quantità di geni o di RNA presente in un dato campione.

Alternativamente le sequenze dei cDNA possono essere sintetizzate in batteri se questi vengono infettati mediante plasmidi nel cui DNA circolare sia stato inserito il DNA copia di un dato gene. I cDNA così ottenuti possono essere ibridizzati con frammenti di DNA sottoposto alla azione idrolizzante di endonucleasi di restrizione altamente specifiche. Gli ibridi ottenuti mostrano, in condizioni normali lunghezze precise. Con questi sistemi sono state ottenute le mappe fisiche dei due cromosomi contenenti i geni per le globine così come sono schematizzate in Fig. 1, oltre a numerose informazioni sui precisi danni in certe forme talassemiche e non.

Le β -talassemie sono essenzialmente di due tipi definiti β^+ o β^0 a seconda che la sintesi della globina sia inibita parzialmente o totalmente (WEATHERALL e CLEGG, 1979). Nella β^+ -talassemia una diminuita quantità di mRNA determina la riduzione della sintesi della β globina (NIENHUIS e coll., 1977). Il difetto molecolare si è comunque rilevato piuttosto eterogeneo. Esso si ritiene dovuto ad una difettosa regolazione della trascrizione o ad una anormale maturazione del mRNA. Poiché il gene si è rivelato intatto, o perlomeno senza delezioni apprezzabili (MEARS et al., 1978; FLAVELL et al., 1979) e grosse quantità di RNA copia del gene con le

sue sequenze intercorrenti si accumulano nella cellula eritroide mentre è scarsa la quantità di mRNA dosabile, è molto probabile che la mutazione sia a carico del DNA che costituisce le sequenze intercorrenti (MAQUAT e coll., 1980). Se infatti la mutazione è a carico di siti riconosciuti dagli enzimi implicati nella esclusione delle zone non codificanti e nella successiva saldatura dei filamenti, l'RNA maturo che ne risulterà sarà in quantità ridotte. In realtà piccole delezioni a carico del DNA degli introni sarebbero già state descritte (come riferiscono BANK e coll., 1980).

Nella β^0 -talassemia, invece, la sintesi della β globina è assente. Esperienze di ibridazione hanno dimostrato la assenza di mRNA forse a causa di fattori che ne impediscono la maturazione. La grande eterogeneità esistente anche nell'ambito di questa forma non facilita l'estensione di ipotesi con unico modello. In effetti, accanto a forme nelle quali il gene si è rivelato intatto (almeno nelle sequenze codificanti), in un caso (CHANG e KAN, 1979) è stata svelata una mutazione con produzione di una tripletta « non-senso »

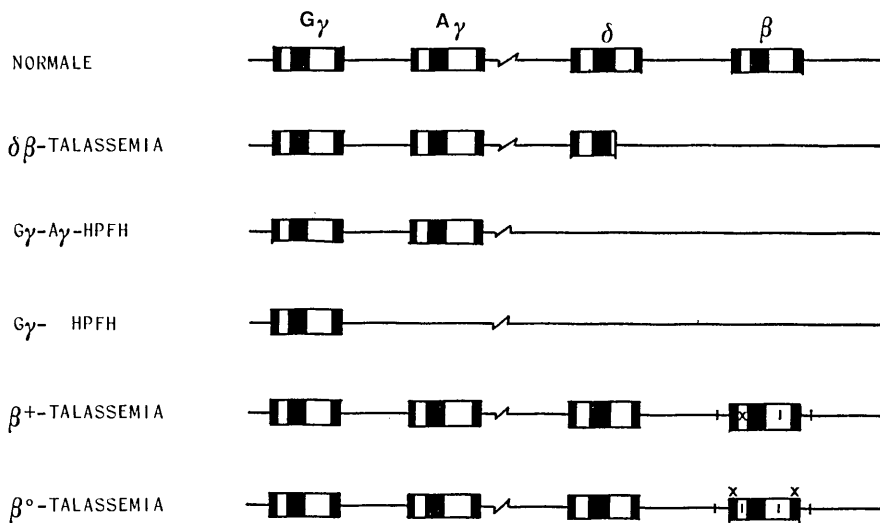


Fig. 3 - Mappe fisiche del cromosoma 11 indicanti alcune delle delezioni dimostrate sia con esperienze di ibridazione liquida che con il mappaggio genico. I difetti indicati nel gene β sono I: ipotizzati; X: dimostrati.

che, anziché codificare per un aminoacido, determina un precoce segnale di « fine lettura » del DNA. In un altro caso (ORKIN e coll., 1979) è stata dimostrata una delezione di circa 600 basi che esclude l'estremo 3' del gene. È comunque probabile che anche in certe forme di β^0 -talassemia esistano mutazioni all'interno delle sequenze intercorrenti.

Nella zona di Ferrara la β^0 -talassemia è determinata o dalla presenza di inibitori o dalla carenza di fattori promuoventi la traduzione dell'mRNA presente in quantità normali (CONCONI e coll., 1972; OTTOLENGHI e coll., 1977). Il difetto può essere in parte corretto mediante trasfusioni. Il mappaggio mediante enzimi di restrizione ha mostrato che sia il gene β che le zone di DNA adiacenti non presentano differenze rispetto al normale (DEL SENNO e coll., 1979).

Risultati altrettanto sorprendenti sono stati ottenuti nello studio della $\delta\beta$ -talassemia e della HPFH. Ambedue le condizioni sono caratterizzate dalla presenza di Hb F nell'eterozigote (15-25%) e nell'omozigote (100%). Nella $\delta\beta$ -talassemia omozigote il quadro clinico è relativamente lieve mentre nella HPFH i soggetti affetti sono da considerarsi del tutto normali. In queste due forme sono state dimostrate delezioni piuttosto estese che nel caso della $\delta\beta$ -talassemia interessano l'intero gene β più una grossa porzione del gene δ , e nella HPFH delezioni che si spingono fino ad eliminare il gene per la globina $^A\gamma$ (OTTOLENGHI e coll., 1974; WEATHERALL e CLEGG, 1979; OTTOLENGHI e coll., 1979). Il fatto che in queste due condizioni la sintesi delle catene γ sia tale da bilanciare in larga misura la mancanza delle catene β , suggerisce che nelle zone delete siano localizzati tratti di DNA che fungono da regolatori della sintesi delle catene γ .

Le mappe fisiche del cromosoma 11 così come esso si presenta nei portatori delle mutazioni descritte sono schematizzate nella Fig. 3.

LE BASI MOLECOLARI DELL' α -TALASSEMIA

La diminuzione della sintesi della globina α si è dimostrata dovuta, nella gran parte dei casi, alla delezione di un numero di geni variabile da uno a quattro, tanti quanti sono i geni α per corredo diploide (TAYLOR e coll., 1974; KAN e coll., 1975).

Se la delezione è a carico di un gene ($-\alpha/\alpha\alpha$ o α_2 -talassemia) lo sbilancio di sintesi globinica che ne deriva è talmente lieve che spesso il portatore del danno, detto anche portatore silente, non viene riconosciuto se non con particolari indagini.

Se la delezione è a carico di due geni ($--/\alpha\alpha$ o α_1 -talassemia) si instaura una condizione simile a quella della β -talassemia eterozigote; una condizione equivalente si manifesta quando nello stesso soggetto sono presenti due geni per l' α_2 -talassemia ($-\alpha/-\alpha$). Se la delezione è a carico di tre geni ($--/-\alpha$, o α_2 - α_1 -talassemia o malattia da Hb H) si stabilisce una forma di anemia piuttosto seria dovuta al grave deficit di α catene. In tal caso le catene globiniche β libere si associano nel tetramero Hb H facilmente riconoscibile alla elettroforesi. La delezione di tutti i quattro geni ($--/--$) è associata alla morte del feto in utero o subito dopo la nascita. La condizione di omozigosi è nota anche come idrope feto-placentare ed è abbastanza comune in Asia dove l' α -talassemia raggiunge incidenze piuttosto alte.

Il mappaggio del DNA mediante enzimi di restrizione ha confermato le precedenti ricerche ed ha anche evidenziato la presenza di diversi tipi di danno molecolare quali delezioni parziali e non-delezioni che fanno della α -talassemia una malattia altamente eterogenea (KAN e coll., 1979; ORKIN e coll., 1979; PHILLIPS e coll., 1979). La presenza di soggetti con tre geni α su uno stesso cromosoma e la determinazione della esatta mappa fisica del difetto $-\alpha/\alpha\alpha$ hanno consentito di dimostrare che la delezione è dovuta a crossing-over non omologhi (GOSSENS e coll., 1980; SANCAR e coll., 1980).

Sebbene l' α -talassemia sia piuttosto comune fra le popolazioni dell'area del Mediterraneo e fra i Negri, la forma omozigote del difetto era stata osservata una sola volta in Grecia (DIAMOND e coll., 1965). Questo particolare ha per anni rappresentato un problema di non facile interpretazione. Era stato dapprima proposto che in tali popolazioni la mancanza dell'idrope feto-placentare ($--/--$) dovesse necessariamente significare assenza del genotipo α_1 -talassemico con assetto $--/\alpha\alpha$ e presenza del solo $-\alpha/-\alpha$. Perciò dall'incrocio di soggetti con genotipo $-\alpha/-\alpha$ si dovrebbero ottenere solo genotipi uguali a quello dei genitori. Diversi dati sperimentali, in effetti, confermavano tale ipotesi (ALTAY e coll., 1977). Successivamente però tutto veniva rimesso in discussione dalla scoperta

sia di genotipi senza delezione (KAN e coll., 1977) sia di genotipi con delezione simili a quelli degli orientali (KAN e coll., 1979; PHILLIPS e coll., 1979). La recente identificazione di un nuovo caso di idrope in Grecia e la disponibilità di DNA copia del gene per la globina ζ , hanno forse risolto l'interessante problema (KAT-TAMIS e coll., 1980; PRESSLEY e coll., 1980). Sembra cioè che la delezione α_1 dei non asiatici si spinga, nella direzione 5', fino ad interessare la regione dei geni ζ : in tal modo l'eventuale omozigote per la delezione dei geni α lo sarebbe anche per la delezione di quelli ζ impedendo la formazione delle emoglobine embrionali Gower 1 e Portland e di conseguenza la vita dello stesso embrione.

Sebbene nei Sardi le indagini col metodo del mappaggio non abbiano, per il momento, ancora interessato i geni per le globine embrionali è plausibile che la ragione della mancanza di casi descritti di omozigosi sia la medesima.

PATOLOGIA DELLE TALASSEMIE

Ambedue le forme di β -talassemia allo stato eterozigote sono caratterizzate da alterazioni minime e riconoscibili soltanto mediante indagini di laboratorio mirate. La diminuita produzione di β globina riduce la quantità di emoglobina in modo abbastanza modesto. La riduzione del volume delle emazie (MCV), del loro contenuto in emoglobina (MCH), l'aumento della Hb A₂, l'aumento della resistenza alla lisi osmotica e la alterazione della morfologia delle emazie sono i reperti pressoché costanti. In particolare l'aumento della Hb A₂ risulta il parametro che più concretamente consente di discriminare fra la β -talassemia e le altre forme allo stato eterozigote, tutte le altre caratteristiche essendo in comune.

Allo stato omozigote (noto anche come talassemia major o morbo di Cooley o anemia mediterranea) sia di tipo β^+ che β^0 , l'anemia è sempre in forma grave anche se variabile.

La ragione più importante che determina la fisiopatologia di questa malattia non è dovuta solo alla grave riduzione o alla assenza di sintesi di catene β , ma piuttosto alla globina α che continua ad essere prodotta in quantità normale (WEATHERALL e CLEGG, 1972). Le catene α in assenza di quantità adeguate di catene controparte per la formazione del tetramero emoglobinico,

vengono a trovarsi in eccesso e, essendo molto instabili, precipitano all'interno della cellula eritroide formando inclusioni insolubili determinandone così o la morte prematura o danni irreversibili a carico della membrana (BARGELLESÌ e coll., 1968; RACHMILEWITZ e KAHANE, 1980) che sembrano comuni anche alla α -talassemia (MASALA e coll., 1980). Ne risultano eritropoiesi inefficace ed accorciamento della sopravvivenza eritrocitaria media. Nel sangue periferico le poche emazie ipocromiche circolanti determinano uno stato anossico che stimola la produzione di altri precursori eritroidi anch'essi destinati a morire in gran parte prematuramente. Dopo alcuni mesi dalla nascita del bambino omozigote si determina una notevole espansione del midollo osseo che diviene fragile e deformabile. Le poche emazie che riescono ad emergere dal tessuto ematopoietico a causa dei danni a livello di membrana e della presenza dei corpi inclusi da aggregati di catene globiniche, vengono sequestrate dalle cellule del sistema reticolo-endoteliale della milza che, nella loro azione di estrazione degli aggregati di globina, ne distruggono una ulteriore aliquota. L'iperplasia delle cellule del sistema reticolo-endoteliale sono causa della splenomegalia. La grave anemia conseguenza dei fattori suddetti viene alleviata da regolari trasfusioni di sangue. D'altra parte il carico di ferro dovuto sia ai danni primari che alle continue trasfusioni causano disfunzioni endocrine e danni epatici e cardiaci che rappresentano la maggior causa della prematura morte dei piccoli pazienti. Recentemente l'impiego di sostanze chelanti capaci di ridurre drasticamente il sovraccarico di ferro, e l'impiego di eritrociti con maggiore sopravvivenza hanno notevolmente allungato la vita dell'omozigote (NIENHUIS e coll., 1979).

Come già detto, l'esame elettroforetico del sangue di soggetti omozigoti avanti la prima trasfusione, presenta livelli di Hb F variabili da circa il 40% a circa il 95%. Le ragioni della presenza della emoglobina fetale possono essere diverse anche se sembra molto probabile che una piccola popolazione di cellule, presente anche nei soggetti normali, che ha conservato la capacità di produrre catene γ , venga spinta a moltiplicarsi durante l'espansione midollare. Nell'ambito di queste cellule, che vengono chiamate cellule F, vengono attualmente compiute ricerche tendenti a selezionare eventuali cloni con alta capacità di sintesi di catene γ tale

da bilanciare le catene α in eccesso (NIENHUIS e STAMATOYANNOPOULOS, 1978). È pensabile che in un prossimo futuro questo tipo di approccio terapeutico possa dare, insieme all'impiego di nuovi prodotti chelanti il ferro, buoni risultati.

La clinica dell' α -talassemia, essendo l'omozigosi fatale già alla nascita, è limitata alla sola malattia da Hb H che rappresenta la doppia eterozigosi per i geni α_2 - e α_1 -talassemici. Analogamente alla β -talassemia, il grave sbilancio di sintesi della globina α determina la presenza di un eccesso di catene β che provocano iperplasia midollare, anemia cronica, alterazioni più o meno evidenti della facies, splenomegalia, richieste trasfusionali variabili. A seconda del gruppo etnico però la malattia si può presentare con aspetti del tutto differenti: fra i Negri ed i Sardi essa ha un decorso particolarmente lieve e compatibile con una vita normale. La casistica raccolta presso il nostro Laboratorio comprende addirittura un soggetto che frequentava i Centri trasfusionali non per ricevere sangue ma per donarlo!

Essendo la soppressione della sintesi della globina α dello stesso ordine di grandezza di tutti gli altri gruppi etnici, le ragioni di tali differenze non sono chiare.

LA DIAGNOSI PRENATALE

Le implicazioni di carattere fisico e sociale connesse con la malattia di Cooley sono numerose e facilmente comprensibili. Attualmente sono comunque disponibili, una volta identificata una coppia di portatori del gene β -talassemico, i mezzi per diagnosticare durante la gestazione se un feto è sano o affetto dalla malattia offrendo quindi alla coppia l'alternativa dell'aborto terapeutico.

La prima diagnosi prenatale è stata eseguita nel 1975 negli Stati Uniti dal Dr. Yuet Wai Kan il quale ha utilizzato brillantemente una serie di conoscenze che stabilivano le caratteristiche della sintesi delle catene globiniche in utero. Da allora il metodo è stato adottato da diversi altri laboratori ed il numero di diagnosi effettuate è oggi imponente: alla primavera 1980 nei soli laboratori di Cagliari e Atene erano state effettuate 210 e 228 diagnosi rispettivamente (CAO e coll., 1980; LOUKOPOULOS, 1980).

In breve l'esame consiste nel prelievo di piccole quantità di sangue fetale, intorno alla 18°-20° settimana di gestazione, mediante placentocentesi dopo che, tramite ultrasuoni, la posizione della placenta stessa sia stata individuata. I campioni di sangue così ottenuti vengono, se necessario, allontanati da quelli materni e quindi incubati con una miscela di aminoacidi di cui uno radioattivo. Successivamente le globine fetali vengono mescolate a globine non radioattive e separate mediante cromatografia a scambio ionico su colonna. La localizzazione della radioattività incorporata durante l'incubazione consente di stabilire le effettive capacità biosintetiche del feto: se nella zona di recupero delle globine β non viene rilevata radioattività il feto è evidentemente incapace di sintetizzarle in quanto omozigote. Nonostante l'esame nel suo complesso non sia di facile esecuzione, i rischi connessi sono esigui e limitati agli aspetti ostetrici. Nella casistica raccolta nel Laboratorio del Prof. Antonio Cao nella 2ª Clinica Pediatrica dell'Università di Cagliari il rischio di perdita fetale è intorno al 6% mentre non sono stati commessi errori di diagnosi; analoghi risultati sono stati ottenuti in Grecia in termini di perdite fetali (6,1%) con un solo errore (CAO e coll., 1980; LOUKOPOULOS, 1980).

Circa 60 malattie ereditarie possono essere riconosciute in utero utilizzando un metodo più semplice di quello descritto che consiste nel prelievo, mediante amniocentesi, di un numero relativamente piccolo di cellule fetali, fibroblasti, normalmente presenti nel liquido amniotico. I rischi connessi con l'amniocentesi sono notevolmente inferiori a quelli già bassi della placentocentesi ma col particolare, certo non indifferente, che le cellule del liquido amniotico non sono capaci di produrre emoglobina.

Il metodo del mappaggio genico si è rivelato di estrema utilità anche per risolvere questo non semplice problema. Tenendo presente che il DNA contenuto nelle cellule fetali deve ovviamente possedere i danni caratteristici della talassemia di cui si desidera evitare l'omozigosi, ORKIN e coll. (1978) sono riusciti ad effettuare diagnosi in utero di $\delta\beta$ -talassemia. Il DNA di questa forma, essendo caratterizzato da delezione di un lungo tratto contenente il gene β , non ibridizza con DNA radioattivo copia di quel gene. Nello stesso anno KAN e DOZY (1978a) segnalavano che l'87% dei Negri eterozigoti per l'Hb S, presentano il gene β contenuto in un frammento di DNA di 13 kb (1000 basi = 1 kb), quando il DNA

viene trattato con l'enzima di restrizione Hpa I. Ciò a causa di una mutazione che ha soppresso, o spostato, il normale sito per quell'enzima che è localizzato a 7,6 kb in 3' al gene β . Probabilmente l'individuo nel quale per la prima volta è comparsa la mutazione β^s era anche portatore di tale polimorfismo che si è conservato nonostante le numerose ricombinazioni genetiche certamente verificatesi.

Essendo il polimorfismo 13 kb legato al gene β^s sarà facile diagnosticare l'omozigote se il DNA copia del gene β ibridizza solo con DNA del feto di 13 kb di lunghezza, l'eterozigote se l'ibrido si forma con un frammento di 13 ed uno di 7,6 kb, e il normale con un solo frammento a 7,6 (KAN e DOZY, 1978b).

Una situazione simile è stata messa in evidenza nei Sardi β -talassemici i quali non hanno polimorfismi per l'enzima Hpa I ma ne presentano uno, pure in 3' al gene β , per il Bam HI a 22 kb nel 33% dei casi. Nel 66% dei soggetti normali lo stesso enzima produce un frammento di 9,3 kb (KAN e coll., 1980).

Come è evidente dalle percentuali di frequenza dei polimorfismi Hpa I per i Negri e Bam HI per i Sardi, la diagnosi prenatale su fibroblasti con l'ibridazione molecolare non è possibile che in casi limitati. PHILLIPS e coll. (1980) hanno recentemente potuto incrementare fino all'80% il numero di coppie a rischio per l'anemia falciforme esaminabili associando al polimorfismo Hpa I dei polimorfismi esistenti negli introni dei geni $\alpha\gamma$ e $\beta\gamma$ svelati con l'enzima Hind III. Risultati analoghi sono stati ottenuti contemporaneamente da LITTLE e coll. (1980) in β -talassemici Italiani, Ciprioti e Indiani. Anche in questo caso associando l'eventuale polimorfismo osservato da KAN e coll. (1979) o altri polimorfismi simili a quelli individuati negli introni dei geni $\alpha\gamma$ e $\beta\gamma$ con una serie di enzimi, è stato possibile effettuare con successo un buon numero di diagnosi in utero su fibroblasti. Il metodo è applicabile alla diagnosi di qualunque malattia genetica monogenica a condizione che si disponga del DNA copia per il gene affetto o per un altro locus sufficientemente vicino perché possa essere considerato geneticamente linked.

Sembra dunque certo che l'estensione di queste ricerche rappresenterà in un prossimo futuro un validissimo aiuto per le regioni ad alta incidenza di talassemie ed emoglobinopatie.

LE TALASSEMIE IN SARDEGNA

Le talassemie sono prevalentemente distribuite in una fascia che dal Mediterraneo, passando per il Medio Oriente, si spinge sino al Sud-Est Asiatico. In quelle stesse regioni sono diffuse, o lo sono state in passato, altre malattie strettamente interdipendenti: la malaria, il favismo e l'anemia falciforme. Una serie di indagini dovute soprattutto a Lucio Luzzatto hanno dimostrato che il plasmodio della malaria non è capace di moltiplicarsi nella fase schizogonica del suo ciclo vitale in emazie di soggetti carenti dell'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi, G6PDH, o contenenti Hb S (LUZZATTO, 1979). Pertanto l'alta concentrazione di portatori della enzimopenia o della Hb S nelle zone in cui la malaria è endemica, viene interpretata con una pressione selettiva dovuta alla migliore sopravvivenza di quei soggetti alla infezione del parassita.

Sebbene manchino ancora prove sperimentali è plausibile che la malaria abbia selezionato in modo analogo anche la β -talassemia.

Le precise incidenze delle talassemie nelle zone di origine ed in quelle in cui sono pervenute con le migrazioni, non sono sempre note nei dettagli. In Sardegna la malaria, che come è noto ha infierito per secoli, e l'isolamento non soltanto geografico hanno fatto sì che le mutazioni talasemiche raggiungessero incidenze da primato. Una indagine pubblicata da CARCASSI (1974) riferisce di incidenze altissime nei paesi delle zone paludose dell'isola o di certe sue zone rivierasche, con punte del 35% di portatori di favismo e del 28% di portatori della β -talassemia a Cabras. Per contro, come vuole la teoria della selezione malarica, a Fonni, Desulo e Tonara i due difetti incidono per circa il 4%, mentre nella Sardegna nel suo complesso l'incidenza media veniva stimata nel 16% di β -talassemici e nel 12,6% di favici. Programmi di screening più recenti effettuati da CAO e coll. (1978) nelle città o in agglomerati industriali con una diversa metodologia, hanno stimato nelle provincie di Cagliari ed Oristano, Nuoro e Sassari incidenze della β -talassemia pari al 12,9 11,8 e 11,6% rispettivamente. L' α -talassemia incide nelle stesse provincie per il 6,7 8,5 e 6,5%. L'incidenza della α -talassemia si dimostra sorprendentemente elevata se calcolata con i sofisticati metodi della ibridizzazione molecolare con mappaggio genico: KAN riferisce che la frequenza del

cromosoma con assetto $-\alpha$ è pari a 0,18; ciò significa che circa il 36% dei sardi sono portatori di questo seppur lieve difetto (citato da MELONI e coll., 1980). Nonostante le sue notevoli dimensioni il fenomeno dell' α -talassemia in Sardegna, oltre ad ingenerare non poca confusione, resta ai più abbastanza sconosciuto anche perché fortunatamente, come già detto, non sono noti né è probabile che lo saranno, casi di idrope fetale da omozigosi. Eppure lo studio di questo difetto e dei suoi modi di esprimersi fenotipicamente hanno impegnato, ed impegnano tuttora, diversi ricercatori. Dopo la segnalazione fatta da BIANCO e coll. (1972) della presenza della Hb Bart, che è il segno tipico della presenza dell' α -talassemia alla nascita nel 4,3% dei neonati della provincia di Sassari, altre indagini hanno evidenziato che l'incidenza è in realtà più elevata. CAO e coll. (1978) riferiscono una incidenza del 12,6% nei neonati di Cagliari mentre in una serie di indagini del nostro gruppo si è verificato che il tetramero è presente, in concentrazioni comprese fra lo 0,6 ed il 10%, nel 13,46% dei neonati della provincia di Sassari (LONGINOTTI e coll., 1977; DEMURO e coll., 1980). È noto da tempo che le indagini sull' α -talassemia sono più agevoli e precise se condotte nei neonati, tuttavia le troppe discrepanze esistenti fra i dati rilevabili in quel campione e fra gli adulti, fanno ritenere che in effetti la espressione fenotipica di questo difetto nelle popolazioni della Sardegna e del Mediterraneo sia molto diversa da quella riscontrata negli orientali, come sottolineato in precedenza.

La forma β -talassemica predominante in Sardegna è quella definita β^0 a causa della mancanza assoluta di sintesi di Hb A nell'omozigote. Nel 1977 abbiamo comunque potuto dimostrare che nella parte settentrionale dell'isola sono presenti casi con livelli di Hb A, determinabili sia alla elettroforesi che con il metodo della sintesi *in vitro* della emoglobina, fino al 40% (MASALA e coll., 1977). Tali soggetti, figli di entrambi i genitori con i classici parametri della β -talassemia eterozigote, sono definibili omozigoti β^+ -talassemici. In quasi tutti i casi da noi esaminati le manifestazioni cliniche sono assai modeste, con richieste trasfusionali da scarse a nulle e tali da assomigliare tale forma a quella descritta nei Negri americani (dati non pubblicati).

Oltre alla β^0 e alla β^+ -talassemia abbiamo potuto stabilire la presenza di forme i cui danni molecolari possono corrispondere a quelli di ciascuno dei genotipi della Fig. 3. Sono presenti cioè casi

di HPFH con produzione di catene $\epsilon\gamma$ e $\zeta\gamma$ in proporzioni simili, altri più numerosi con Hb F formata prevalentemente da catene $\zeta\gamma$ (MASALA e coll., 1980) ed altri, rari, con sole catene $\epsilon\gamma$ (dati non pubblicati). Nel meridione dell'isola è stata anche segnalata una incidenza dello 0,12% di $\delta\beta$ -talassemia, 0,25% di HPFH di tipo eterocellulare e sporadici casi di portatori di Hb S (CAO e coll., 1978).

È facilmente comprensibile come tutti i genotipi descritti possono interagire e presentarsi in associazione nello stesso individuo con manifestazioni anche inattese che, in ogni caso, devono essere ben conosciute o riconoscibili da parte di chi opera nei laboratori preposti alla diagnosi delle talassemie.

Due genotipi che molto facilmente si ritrovano associati a causa delle rispettive alte incidenze, sono quelli α e β -talassemici. Il doppio eterozigote α - β -talassemico presenta quasi sempre indici ematologici migliori di quelli dei corrispondenti α - e β - presi singolarmente e spesso del tutto normali (MASALA e coll., 1979). Le variazioni osservabili nei principali genotipi talassemici rispetto al normale sono schematizzati nella Tabella 1.

TABELLA I

	β -tal.	α -tal.	α - β -tal.	δ - β -tal.	HPFH
MCV	↓	↓	N o ↓	↓	N
MCH	↓	↓	N o ↓	↓	N
Hb A ₂	↑	N o ↓	↑	N o ↓	N
Hb F	N o ↑	N	N o ↑	↑	↑
Alterazione della morfologia	+ +	+ +	+	+ +	-
Resistenze osmotiche	↑	↑	N o ↑	↑	N
Sintesi delle globine (α/β)	> 1	< 1	> ≤ 1	> 1	= 1

I dati numerici puntualizzanti il fenomeno β -talassemia in Sardegna sono semplici ma quanto mai eloquenti. Circa 200.000 portatori, 12,5% della popolazione; 1 coppia ogni 65 circa in cui

ambidue i membri sono portatori, dette « a rischio » di generare un figlio omozigote; 1 nato omozigote ogni 200 nati vivi e circa 100 nascite di omozigoti per anno (cifre del 1976); un numero di malati costantemente superiore alle 1500 unità che annualmente sono sotto regime trasfusionale; un fabbisogno di sangue due volte il disponibile; disagi e spese notevoli che si aggiungono alle sofferenze dei familiari oltre che degli stessi malati; carenze notevoli nelle strutture di diagnosi ed in quelle di cura; disinformazione.

Un notevole contributo al contenimento delle nascite di omozigoti viene offerto dalla diagnosi prenatale seguita dall'aborto terapeutico: grazie all'imponente lavoro del centro cagliaritano in 3 anni l'incidenza delle nascite nelle provincie di Cagliari e Oristano è scesa da 1 ogni 200 a 1 ogni 300 nati vivi. La pratica viene accolta con favore e i casi in cui la coppia ha preferito continuare la gravidanza nonostante la diagnosi di omozigosi sono stati molto rari.

Questa possibilità rischia peraltro di restare prerogativa di pochi fortunati senza un intervento, o una serie di interventi, che consenta di identificare tutti i potenziali beneficiari di questa forma di prevenzione che comunque, non va dimenticato, non è l'unica alternativa per chi non ne accettasse tutte le implicazioni. L'adozione, l'uso di metodi anticoncezionali sono esempi di altre possibili scelte.

Stabilito che: 1) le spese necessarie per la prevenzione di una malattia sono sempre di gran lunga inferiori a quelle per la cura della stessa; 2) che gli interventi devono essere proporzionati agli sforzi necessari ed alla entità del fenomeno che si vuole controllare e che 3) le responsabilità economiche devono ovviamente essere a carico della pubblica amministrazione, il problema resta quello di individuare la strategia più idonea per raggiungere lo scopo di identificare tutte le possibili coppie a rischio e bloccare il numero di nascite di omozigoti a minimi casuali.

Si è molto discusso e si discute ancora su quali possono essere le migliori forme di intervento nelle regioni ad alta incidenza di una malattia genetica anche se non mancano esempi coronati da successo. Sono state suggerite campagne di propaganda e prelievo nelle scuole elementari e medie, nelle terze liceo, nei distretti militari, fra le sole donne, fra le coppie in formazione eccetera. Ognuno di tali approcci mostra vantaggi e svantaggi indubbi. Lo

screening nelle scuole inferiori per esempio, se da un lato consente di raggiungere quasi tutta la popolazione e di risalire dal soggetto portatore di microcitemia a possibili coppie di genitori a rischio, dall'altro non è completamente compreso dai piccoli oggetto dell'indagine, è di alto costo, prevede tempi di esecuzione molto lunghi ed i benefici sono ottenibili a lunga scadenza, al raggiungimento cioè della età evolutiva dei soggetti testati, quando una certa parte avrà avuto tutto il tempo di dimenticare quanto gli è stato diagnosticato. Inoltre questa strategia implica la parallela prosecuzione delle indagini sugli adulti volontari e non. L'indagine nelle scuole superiori mentre è capita meglio dagli interessati e consente di ottenere in tempi più brevi i risultati prefissati, raggiunge soltanto una piccola percentuale di giovani.

Una strategia che può dare risultati concreti immediatamente può essere quella dell'esame delle sole donne in età riproduttiva sia in quanto esse sono più motivate, sia perché più facilmente raggiungibili tramite i ginecologi, i consultori e così via, ed esaminare successivamente solo i partners di quelle risultate eterozigoti. Analogamente si possono ottenere buoni risultati mediante l'accertamento diagnostico nelle nuove coppie prima del matrimonio. Non andrebbe in questo caso nemmeno sottovalutata la possibilità di obbligare in qualche modo, per esempio con una disposizione di legge o di simile autorità, le nuove coppie a sottoporsi all'accertamento diagnostico al momento dei preparativi burocratici delle nozze, poiché scopo ultimo non è di impedire che la coppia a rischio si formi, quanto fare in modo che essa prenda coscienza della propria situazione e possa poi decidere secondo le proprie convinzioni.

Tali strategie devono comunque essere precedute da campagne di informazione capillari e continue tramite la stampa, le radio e le televisioni locali e nazionali, i medici, i consultori, i parroci, mediante manifesti, conferenze, dibattiti e quanti altri mezzi possibili onde raggiungere il maggior numero di coppie.

Nel contempo non va dimenticato che il maggior « serbatoio » di coppie a rischio è rappresentato proprio dalle coppie già formate che, per effetto delle leggi mendeliane, sono tre volte più numerose di quelle conosciute per aver generato un bambino malato.

È evidente che si tratta di mettere in moto meccanismi complessi e costosi, ma è anche innegabile che per la prima volta si hanno concretamente a disposizione i mezzi tecnici per arrestare

un triste fenomeno che è già costato fin troppo. La quantità di informazioni scientifiche emerse negli ultimi anni rappresentano un capitale che sarebbe assurdo non investire, specie in un Paese giudicato moderno.

RIASSUNTO

Sono descritti alcuni degli aspetti più recenti della biologia molecolare e della genetica delle talassemie con particolare riguardo alla Sardegna, regione nella quale la β - e l' α -talassemia incidono per il 12,5 ed il 13,5% rispettivamente. Nell'isola sono anche presenti la β^+ - e la $\delta\beta$ -talassemia oltre a molte forme di HPFH. Vengono suggeriti, per la prevenzione delle nascite degli omozigoti, programmi di screening a livello di coppie.

BIBLIOGRAFIA

- ALTAY C., RINGELHANN B., YAWSON G.I., BRUCE-TAGOE A.A., KONOTEY-AHULU F.I.D., JAMES L., GRAVELY M., HUISMAN T.H.J., 1977 — Hemoglobin α chain deficiency in Black children with variable quantities of hemoglobin Bart's at birth. *Pediat. Res.*, 11: 147.
- BANK A., MEARS G.J., RAMIREZ F., 1980 — Disorders of human hemoglobin. *Science*, 207: 486-493.
- BARGELLES I. A., PONTREMOLI S., MENINI C., CONCONI F., 1968 — Excess of α -globin synthesis in homozygous β -thalassemia and its removal from the red blood cell cytoplasm. *Europ. J. Biochem.*, 3: 364.
- BIANCO I., GRAZIANI B., SALVINI P., MASTROMONACO I., SILVESTRONI E., 1972 — Frequence et caractères de l'alpha-microcitémie dans les populations de la Sardaigne Septentrionale. *Nouv. Rev. Franç. Hematol.*, 12: 191-200.
- CAO A., GALANELLO R., FURBETTA M., MURONI P.P., GARBATO L., ROSATELLI C., SCALAS M.T., ADDIS M., RUGGERI R., MACCIONI L., MELIS M.A., 1978 — Thalassaemia types and their incidence in Sardinia. *J. Med. Genet.*, 15: 443-447.
- CAO A., FUBETTA M., ANGIUS A., ROSATELLI C., SCALAS M., TUVERI T., FALCHI A.M., ANGIONI G., CAMINITI F., 1980 — Diagnosi prenatale di β -talassemia major su sangue fetale: controllo della malattia tramite screening e diagnosi prenatale in Sardegna. *VI° Congresso Internazionale Associazione Nazionale per la Lotta contro le Microcitemie in Italia*. Roma, 17-19 Aprile.
- CARCASSI U., 1974 — The interaction between β -thalassemia, G-6-PD deficiency and favism. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 232: 297-302.
- CHANG J.C., KAN Y.W., 1979 — β^0 thalassaemia, a nonsense mutation in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 2886-2889.

- CONCONI F., ROWLEY P.T., DEL SENNO L., PONTREMOLI S., VOLPATO S., 1972 — Induction of β -globin synthesis in the β -thalassaemia of Ferrara. *Nature New Biol.*, 238: 83-87.
- DEISSEROTH A., NIENHUIS A., TURNER P., VELEY R., ANDERSON W.F., RUD-
DLE F., LAWRENCE J., CREAGEN R., KUCHER LAPATI R., 1977 — Loca-
lisation of the human α -globin gene on human chromosome 16 in so-
matic cell hybrids. *Cell*, 12: 205-218.
- DEISSEROTH A., NIENHUIS A., LAWRENCE J., GILES R., TURNER P., RUD-
DLE F., 1978 — Chromosomal location of the human β -globin gene on hu-
man chromosome 11 in somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,
75: 1456-1460.
- DEL SENNO L., CONCONI F., LITTLE P.F.R., WILLIAMSON R., 1979 — Re-
striction enzyme analysis of the β -globin gene in DNA from β^0 -thalas-
saemic subjects from Ferrara. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 91:
548-553.
- DEMURO P., MASALA B., LONGINOTTI M., PILO G., ANGIUS G., TIDORE M.,
PARDINI S., OGGIANO L., 1980 — Il fenotipo ematologico dei neonati
portatori di Hb Bart's. *Atti XVIII Riunione Gruppo Studio Eritrocita*,
42-45.
- DIAMOND M.P., COTGROVE I., PARKER A., 1965 — Case of intrauterine death
due to α -thalassaemia. *Brit. Med. J.*, 2: 278-80.
- FLAVELL R.A., BERNARD R., KOOTER J.M., DE BOER E., LITTLE P.F.R., AN-
NISON G., WILLIAMSON R., 1979 — The structure of the β -globin gene
in β -thalassaemia. *Nucleic Acid Res.* 6: 2749-2760.
- FRITSCH E.F., LAWN R.M., MANIATIS T., 1980 — Molecular cloning and
characterization of the human β -like globin gene cluster. *Cell*,: 959-972.
- GOOSSENS M., DOZY A.M., EMBURY S.H., ZACHARIADES Z., HADJIMINAS
M.G., STAMATOYANNOPOULOS G., KAN Y.W., 1980 — Triplicated α -glo-
bin loci in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 518-521.
- HUEHNS E.R., DANCE N., BEAVEN G.H., HECHT F., MOTULSKY A.G., 1964 —
Human embryonic hemoglobins. *Cold Spring Harbor Symp. Quant.
Biol.*, 29: 327-331.
- JACKSON I.J., WILLIAMSON R., 1980 — Mapping of the human globin genes.
Brit. J. Haematol., 46: 341-349.
- KAN Y.W., DOZY A.M., 1978a — Polymorphism of DNA sequences adja-
cent to the human β -globin structural gene: relationship to sickle mu-
tation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 5631-5635.
- KAN Y.W., DOZY A.M., 1978b — Antenatal diagnosis of sickle-cell anaemia
by DNA analysis of amniotic fluid cells. *Lancet*, 2: 910-912.
- KAN Y.W., DOZY A.M., STAMATOYANNOPOULOS G., HADJIMINAS M.G., ZA-
CHARIADES Z., FURBETTA M., CAO A., 1979 — Molecular basis of he-
moglobin-H disease in the Mediterranean population. *Blood*, 54: 1434-
1438.
- KAN Y.W., DOZY A.M., TRECARTIN R., TODD D., 1977 — Identification of a
nondeletion defect in α -thalassemia. *N. Engl. J. Med.* 297: 1081-1084.

- KAN Y.W., DOZY A.M., VARMUS H.E., TAYLOR J.M., HOLLAN J.P., LIE-JNJO L.E., GANESON J., TOOD D., 1975 — Deletion of α -globin genes in haemoglobin-H disease demonstrates multiple α -globin structural loci. *Nature*, 255: 255-256.
- KAN Y.W., FORGET B.G., NATHAN D.G., 1972 — Gamma-beta thalassemia: a cause of hemolytic disease of the newborn. *N. Engl. J. Med.*, 286: 129-133.
- KAN Y.W., LEE K.Y., FURBETTA M., ANGIUS A., CAO A., 1980 — Polymorphism of DNA sequence in the β -globin gene region. *N. Engl. J. Med.*, 302: 185-188.
- KATTAMIS C., METAXOTOU-MAVROMATI A., TSIARTA E., METAXATOU C., WASSI P., WOOD W.G., PRESSLEY L., HIGGS D.R., CLEGG J.B., WEATHERALL D.J., 1980 — Haemoglobin Bart's hydrops syndrome in Greece. *Brit. Med. J.*, 2: 268-270.
- LAUER J.C., SHEN K.J., MANIATIS T., 1980 — The chromosomal arrangement of human α -like globin genes: sequence homology and α -globin gene deletions. *Cell*, 20: 119-130.
- LITTLE P.F.R., ANNISON G., DARLING S., WILLIAMSON R., CAMBA L., MODEL B., 1980 — Model for antenatal diagnosis of β -thalassaemia and other monogenic disorders by molecular analysis of linked DNA polymorphisms. *Nature*, 285: 144-147.
- LONGINOTTI M., MASALA B., MELONI T., DORE F., PRANZETTI P., CAMPUS S., 1977 — Hb Bart's, sintesi globinica e alfa-talassemia in neonati del Nord-Sardegna. *Atti XXVI Congresso Nazionale Soc. Ital. Ematol.*: 824-829. Torino 10-11 giugno.
- LOUKOPOULOS D., 1980 — Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies in Greece. *Atti VI Congresso Internazionale Associazione Nazionale Lotta contro le Microcitemie in Italia*, Roma 17-19 aprile.
- LUZZATTO L., 1979 — Genetics of red cells and susceptibility to malaria. *Blood*, 54: 961-976.
- MAQUAT L.E., KINNIBURGH A.J., BEACH L.R., HONIG G.R., LAZERSON J., ERSHLER W.B., ROSS J., 1980 — Processing of human β -globin mRNA precursor to mRNA is defective in three patients with β^+ thalassemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4287-4291.
- MAROTTA C.A., WILSON J.T., FORGET B.G., WEISSMAN S., 1977 — Human β -globin messenger RNA. III. Nucleotide sequences derived from complementary DNA. *J. Biol. Chem.* 252: 5040-5053.
- MASALA B., COINU R., MATERA A., TIDORE M., DEMURO P., PRANZETTI P., LONGINOTTI M., 1980 — Alterazioni nei livelli di acido sialico e gruppi SH in membrane di emazie alfa e beta talassemiche. *26° Congresso Nazionale Soc. Ital. Biochim.*: 267; 24-26 settembre.
- MASALA B., LONGINOTTI M., DORE F., PARDINI S., ANGIUS G., DEMURO P., 1979 — Heterogeneity of red blood cell indices in different beta-thalassemia genotypes. *International Meeting on New Biomedical Trends in Thalassemia an Favism*. Stintino 21-22 settembre.

- MASALA B., LONGINOTTI M., DORE F., PRANZETTI P., MAEDDU G., IVALDI G., CAMPUS S., 1977 — Globin chain synthesis in homozygous beta-thalassaemic patients in Sardinia. *IRCS Med. Sci. Biochem.*, 5: 239.
- MASALA B., TIDORE M., LONGINOTTI M., DORE F., PARDINI S., PIRAS G., 1980 — HPFH di tipo greco in Sardegna: studio ematologico, biochimico e genetico in tredici soggetti eterozigoti. *XIX Riunione Gruppo Studio Eritrocita*. Napoli 13 dicembre.
- MAZZA U., MELONI T., DAVID O., PICH P.G., CAMASCHELLA C., SAGLIO G., CIOCCA VASINO M.A., GUERRASIO A., RICCO G., 1980 — Gamma chain composition in five Italian newborns heterozygous for Hb F Malta. *Brit. J. Haematol.*, 44: 93-99.
- MEARS J.G., RAMIREZ F., LEIBOWITZ D., BANK A., 1978 — Organisation of human β and δ globin genes in cellular DNA and the presence of intragenic inserts. *Cell*, 15: 15-23.
- MELONI T., PILO G., CAMARDELLA L., CANCEDDA F., LANIA A., PEPE G., LUZZATTO L., 1980 — Coexistence of three hemoglobins with different α -chains in two unrelated children. *Blood*, 55: 1025-1032.
- NIENHUIS A.W., BENZ E.J., 1977 — Regulation of hemoglobin synthesis during the development of the red cell. *N. Engl. J. Med.*, 297: 1318-1328.
- NIENHUIS A.W., BENZ E.J., PROPPER R., CORASH L., ANDERSON F., HENRY W., BORER J., 1979 — Thalassemia major: molecular and clinical aspects. *Ann. Internal Med.* 91: 883-897.
- NIENHUIS A.W., TURNER P., BENZ E.J., 1977 — Relative stability of α - and β -globin messenger RNAs in homozygous β^+ thalassemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 3960-3964.
- NIENHUIS A.W., STAMATOYANNOPOULOS G., 1978 — Hemoglobin switching. *Cell*, 15: 307-315.
- ORKIN S.H., ALTER B.P., ALTAY C., MAHONEY M.J., LAZARUS H., HOBBIN J.C., NATHAN D.G., 1978 — Application of restriction endonuclease mapping to the analysis and prenatal diagnosis of thalassemia caused by globin gene deletions. *N. Engl. J. Med.* 299: 166-172.
- ORKIN S.H., OLD J., LAZARUS H., ALTAY C., GURGEY A., WEATHERALL D.J., NATHAN D.G., 1979 — The molecular basis of α -thalassemias: frequent occurrence of dysfunctional α loci among non-asians with Hb H disease. *Cell*, 17: 33-42.
- OTTOLENGHI S., COMI P., GIGLIONI B., 1977 — Direct demonstration of β -globin mRNA in homozygous Ferrara β^0 patients. *Nature*, 266: 231-234.
- OTTOLENGHI S., COMI P., GIGLIONI B., TOLSTOSHEV P., LANYON W., MITCHELL G., WILLIAMSON G.J., RUSSO G., MUSUMECI S., SCHILIRO G., TSISTRAKIS G.A., CHARACHE S., WOOD W.G., CLEGG J.B., WEATHERALL D.J., 1976 — $\delta\beta$ -thalassemia is due to a gene deletion. *Cell*, 9: 71-80.
- OTTOLENGHI S., GIGLIONI B., COMI P., GIANNI A.M., POLLI E., ACQUAYE C.T.A., OLDHAM J.H., MASERA G., 1979 — Globin gene deletion in HPFH, $\delta^0\beta^0$ thalassaemia and Hb Lepore disease. *Nature*, 278: 654-656.

- OTTOLENGHI S., LANYON W.G., PAUL J., WILLIAMSON R., WEATHERALL D.J., CLEGG J.B., PRITCHARD J., POOTRAKUL S., WONG HOCK BOON, 1974 — The severe form of α -thalassaemia is caused by a haemoglobin gene deletion. *Nature*, 251: 398-392.
- PHILLIPS J.A., PANNY S.R., KAZAZIAN H.H., BOEHM C.D., SCOTT A.F., SMITH K.D., 1980 — Prenatal diagnosis of sickle cell anemia by restriction endonuclease analysis: Hind III polymorphisms in γ -globin genes extend test applicability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77: 2853-2856.
- PHILLIPS J.A., SCOTT A.F., SMITH K.D., YOUNG K.E., LIGHTBODY K.L., JIJI R.M., KAZAZIAN H.H., 1979 — A molecular basis for hemoglobin disease in American Blacks. *Blood*, 54: 1439-1445.
- PRESSLEY L., HIGGS D.R., CLEGG J.B., WEATHERALL D.J., 1980 — Gene deletion in α -thalassemia prove that the 5' ζ locus is functional. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77: 3586-3589
- RACHMILEWITZ E.A., KAHANE I., 1980 — The red blood cell membrane in thalassaemia. *Brit. J. Haematol.* 46: 1-6.
- SANCAR G.B., CEDENO M.M., RIEDER R.F., 1980 — The varied arrangement of the α globin genes in α thalassemia and Hb H disease in American Blacks. *Johns Hopkins Med. J.*, 146: 146-269.
- TAYLOR J.M., DOZY A.M., KAN Y.W., VARMUS H.E., LIE-INJO L.E., GANESON J., TODD D., 1974 — Genetic lesion in homozygous α thalassaemia (hydrops fetalis). *Nature*, 251: 392-393.
- WEATHERALL D.J., CLEGG J.B., 1972 — The thalassaemia syndromes, 2nd Ed., Oxford, Blackwell Scientific Publ.
- WEATHERALL D.J., CLEGG J.B., 1979 — Recent development in the molecular genetics of human hemoglobin. *Cell*, 16: 467-479.
- WOOD W.G., CLEGG J.B., WEATHERALL D.J., 1979 — Hereditary persistence of fetal haemoglobin (HPFH) and thalassaemia. *Brit. J. Haematol.* 43: 509-520.