

00581

BERKALA ILMU KEDOKTERAN (Journal of the Medical Sciences)

ISSN 0126 — 1312 CODEN: BIKEDW

Diterbitkan oleh Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

Jilid XXV

Juni 1993

Nomor 2

Patogenesis Molekular Talasemia

Oleh: Sunarto

Laboratorium Ilmu Kesehatan Anak
Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

Sunarto — *Molecular pathogenesis of thalassemia*

Since the first description in 1925, thalassemia has been studied intensively and extensively. Thalassemia is inherited by Mendelian recessive genes, in which there is a mutation or deletion of the DNA nucleotide or results in defective production of one or more globin chains of the hemoglobin. There are two important forms of thalassemias, α - and β -thalassemia that are health problems in the tropical belt, extending from Africa and Mediterranean countries up to West Melanesia. The molecular studies of thalassemia and other hemoglobinopathies had discovered such a lot of abnormal hemoglobin structures and pathogenesis of the disease, so that the hemoglobin is now indeed a paradigm for our understanding of gene action at the molecular level. The α -thalassemia occurs essentially due to deletion, whereas β -thalassemia is mostly due to mutation of the gene(s). The understanding of the molecular pathogenesis of thalassemia is very essential for the diagnosis of the trait and especially for prenatal diagnosis, and in the future might be for genetic therapy.

Key Words: thalassemia — gene deletion — gene mutation — polymerase chain reaction — haemoglobin

PENGANTAR

Talasemia dilaporkan pertama kali pada tahun 1925 dengan judul: *A series of cases of splenomegaly in children, with anemia and peculiar bone changes* oleh Cooley dan Lee (Weatherall & Clegg, 1981). Ternyata kemudian kasus tersebut hampir pasti talasemia- β . Talasemia mula-mula disangka bukan penyakit hereditas, bukti-bukti genetik

dilaporkan pada tahun 1936 dan 1938 oleh beberapa peneliti. Pada tahun 1946 dan sesudahnya muncul teori bahwa talasemia disebabkan oleh kekurangan sintesis hemoglobin dewasa (HbA) disertai menetapnya produksi hemoglobin fetal (HbF) (Weatherall & Clegg, 1981).

Pada tahun 1956 diperoleh bukti bahwa globin terdiri atas dua pasang molekul yang identik, yaitu sepasang globin- α dan sepasang globin-non α . Pada tahun 50-an dan 60-an para peneliti dengan berbagai teknik berusaha menerangkan secara rinci defek dalam pembentukan hemoglobin pada talasemia. Pelabelan radioaktif pada asam amino, teknik elektroforesis dan kromatografi memungkinkan pengukuran sintesis rantai polipeptid penyusun globin, sehingga menurunnya sintesis globin dapat dibuktikan secara kuantitatif. Penelitian talasemia sekarang telah mencapai tingkat molekular (Conconi *et al.*, 1970; Fucharoen *et al.*, 1991; Friedman *et al.*, 1974; Todd *et al.*, 1980; Weatherall & Clegg, 1981). Di Indonesia penelitian molekular pada talasemia baru dikerjakan di Jakarta dan di Yogyakarta (Lie-Injo *et al.*, 1989; Sofro *et al.*, 1992).

Dengan berkembangnya IPTEK dalam bioteknologi, patogenesis molekular talasemia dan hemoglobinopatia yang lain telah dapat diketahui. Dalam makalah ini dibahas patogenesis molekular talasemia dan hal-hal yang berkaitan, khususnya mengenai talasemia- α dan - β .

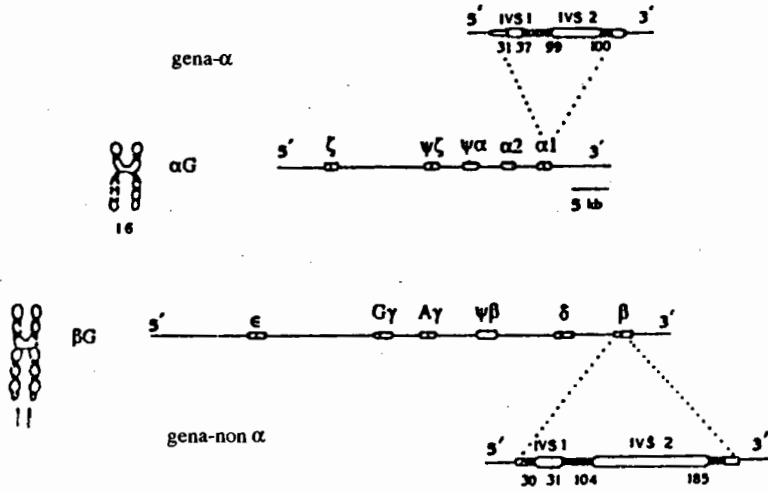
PEMBAHASAN

Susunan Gena Talasemia

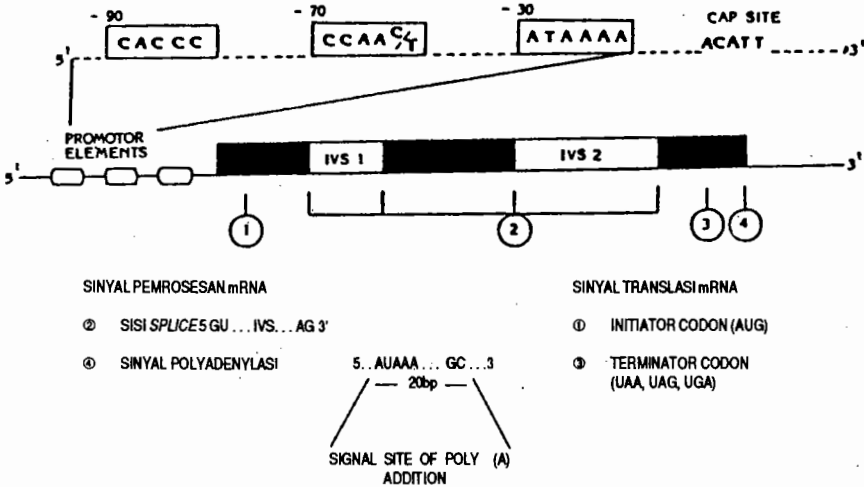
Talasemia diturunkan melalui gena resesif mengikuti hukum Mendel. Kelainan dasarnya terletak pada gena yang menyandi sintesis rantai polipeptid globin. Pada keadaan normal sintesis globin- α dan globin-non α sama banyak. Pada talasemia, sintesis salah satu polipeptid globin itu berkurang atau tak terjadi sehingga timbul kekurangan pembentukan hemoglobin. Pada manusia ada 6 macam polipeptid globin, yaitu α , β , γ , δ , ζ dan ϵ . Polipeptid ϵ dan ζ hanya disintesis intra uterin, dengan demikian teoretis ada 4 jenis talasemia. Karena talasemia- δ dan - γ amat jarang dan klinis tidak penting, maka talasemia yang merupakan masalah kesehatan adalah talasemia- β dan - α (Fucharoen & Winichagoon *et al.*, 1989; Weatherall & Clegg, 1981).

Sintesis globin disandi oleh gena yang unik: gena yang menyandi sintesis polipeptid α dan ξ (disebut sebagai keluarga α) terletak pada lengan pendek kromosom 16, sedang gena yang menyandi sintesis rantai β , γ , δ , dan ϵ (keluarga gena- β , - γ , - δ atau non α) terletak pada lengan pendek kromosom 11. *Cluster* gena- α menempati regio 16-25 kb (*kilo base pair*), dan keluarga non- α menempati regio 55-60 kb (GAMBAR 1a dan 1b).

Secara umum setiap gena globin terdiri atas tiga exon dan diantara ketiga exon tadi terdapat intron (*intervening sequence=IVS*) (GAMBAR 2). Sebelah hulu (*upstream*) atau 5' dan sebelah hilir (*downstream*) atau 3' terdapat segmen DNA yang masing-masing dinamakan DNA sisi 5' (*5' flanking DNA*) dan DNA sisi 3'. Setelah transkripsi, ujung hulu 5' dari mRNA akan ditempati oleh rangkai (*sequence*) yang terdiri atas 2 atau 3 nukleotid yang mempunyai struktur khusus, disebut *cap*, sehingga tempat itu dinamakan *cap site*. Ujung hilir dari DNA sisi 3' merupakan tempat penambahan poliadeniln.



GAMBAR 1a. – Organisasi keluarga gena- α dan gena-non α (Fucharoen & Fucharoen, 1986)

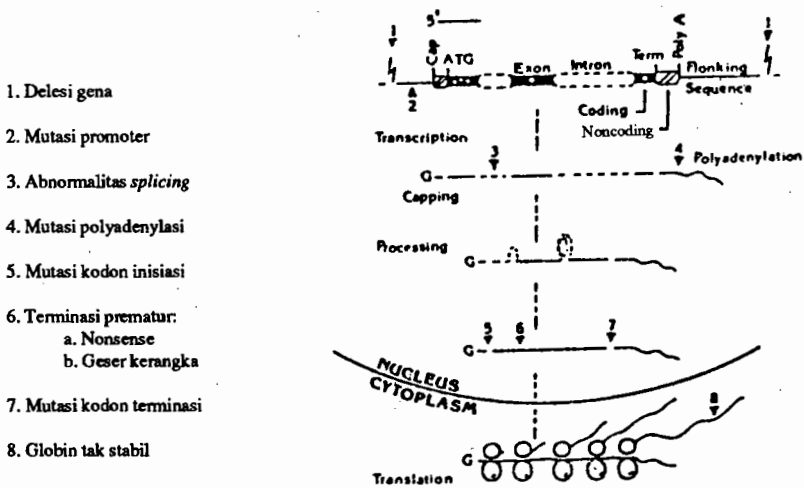


GAMBAR 1b. – Struktur umum gena globin (Fucharoen & Fucharoen, 1986)

Sebelah hulu dari *cap site* terdapat sederet panjang nukleotid yang tidak ditranskripsikan yang mempunyai 3 rangkai yang susunan dan letaknya relatif seragam pada semua gena globin dan mempunyai peran penting, yaitu:

1. Deretan DNA ATAA yang dinamakan kotak ATA atau TATA, terletak pada -30 (30 nukleotid hulu dari *cap site*).
2. CCAAT pada -80 sampai -80 dari *cap site*.
3. GGGGG G atau C'CCCC pada -80 sampai -100 dari *cap site*.

Ketiga rangkai itu penting untuk pengikatan polimerase dan untuk berlangsungnya transkripsi yang efisien dan akurat. Pada ujung non-sandi 3' dari gena globin terdapat rangkai terpelihara lain, ATAAA, untuk mengakhiri transkripsi dan poliadenilasi. Poli A tersebut mungkin penting untuk transportasi mRNA dari nukleus ke sitoplasma dan untuk stabilitas mRNA dalam sitoplasma. Heksanukleotid yang terdapat pada batas exon-intron penting sekali untuk berlangsungnya proses *splicing* (Wong *et al.*, 1989); rangkai itu dinamakan *consensus splice sequence*. Inisiasi translasi dari mRNA bermula dari kodon AUG dan berakhir pada kodon UAA, UAG atau UGA. Globin- α mempunyai 141 asam amino dan non- α 146, berarti masing-masing disandi oleh kodon sejumlah itu (Bunn & Forget, 1986; Fucharoen & Winichagoon, 1989; Vogel & Motulsky, 1986) (GAMBAR 2).



GAMBAR 2. – Bagan proses sintesis globin abnormal (Vogel & Motulsky, 1986).

Talasemia terjadi bila terdapat delesi gena atau mutasi noktah (*point mutation*) pada exon, pada IVS, pada rangkai terpelihara hilir dari *cap site* (Cai *et al.*, 1989; Fucharoen & Winichagoon, 1989; Rosatelli *et al.*, 1989; Vogel & Motulsky, 1986), bahkan juga pada mutasi AATAAA menjadi AACAAA yang terletak lebih kurang 1000 bp hilir (*downstream*) dari ujung 3'.

Delesi, yang merupakan penyebab utama kelainan pada talasemia- α , dapat mengenai seluruh *cluster* gena- α atau suatu segmen dari gena- α . Delesi menyebabkan RNA tidak akan terbentuk sehingga sintesis polipeptid globin juga tak terjadi. Mutasi yang khususnya merupakan penyebab talasemia- β , menyebabkan mRNA yang terbentuk tidak normal strukturnya sehingga polipeptid globin hasil translasi juga tidak normal; disamping itu mRNA demikian tidak stabil sehingga kuantitasnya juga kurang (Kazazian *et al.*, 1975; Nienhuis *et al.*, 1977).

Berbagai mutasi dan akibatnya adalah sebagai berikut (Fucharoen & Winichagoon, 1989):

1. Mutasi yang mempengaruhi transkripsi (*promoter mutation*). Tujuh mutasi ditemukan dari tipe ini pada gena- β .

2. Mutasi yang mempengaruhi pemrosesan RNA: dikenal 4 mekanisme yang berkaitan dengan kelainan itu pada talasemia- β , yaitu:
 - a. mutasi pada sisi *splicing* yang menyebabkan mekanisme *splicing* rusak sehingga tidak terbentuk RNA timbul talasemia- β^0 ;
 - b. mutasi pada *consensus splice sequence* yang mengganggu pembentukan struktur basa-berpasangan, sehingga mengurangi pembentukan RNA, terjadi talasemia- β^+ ;
 - c. mutasi pada kodon dapat mengaktifkan *cryptic splice sequence* dengan akibat terbentuk RNA abnormal, tetapi sejumlah 75% mRNA normal masih terbentuk, timbul talasemia- β^+ , HbE.
 - d. mutasi pada IVS dapat membentuk sisi *splice* baru atau mengaktifkan penggunaan *cryptic splice site*, maka timbul talasemia- β^0 atau - β^+ .
3. Mutasi yang mempengaruhi poliadenilasi (AATAAA), sehingga RNA hasil transkripsi lebih panjang; suatu contoh T \rightarrow C pada nukleotid +1570 atau 12 bp hulu dari poliadenilasi AATAAA (Cai *et al.*, 1992).
4. Mutasi yang mempengaruhi translasi. Mutasi pada kodon inisiasi telah ditemukan pada talasemia- α , yaitu ATG \rightarrow ACG pada gena- α_1 pada 70% penyakit Hb-H, dan ATG \rightarrow GTG pada gena - α_2 (lebih ringan, kurang sering). Delesi 2 nukleotid pada posisi -2 atau -3 dari kodon inisiasi berkaitan dengan - $\alpha^{3,7}$ dari tipe talasemia - α^+ , di Aljazair menyebabkan pengurangan 30-45% efisiensi translasi. Ada pula mutasi yang menyebabkan terminasi translasi prematur, baik berupa substitusi satu basa tunggal yang mengubah kodon normal menjadi kodon terminasi, maupun delesi yang menyebabkan mutasi geserkerangka dan pembentukan *in-phase termination codon*.

Talasemia- α

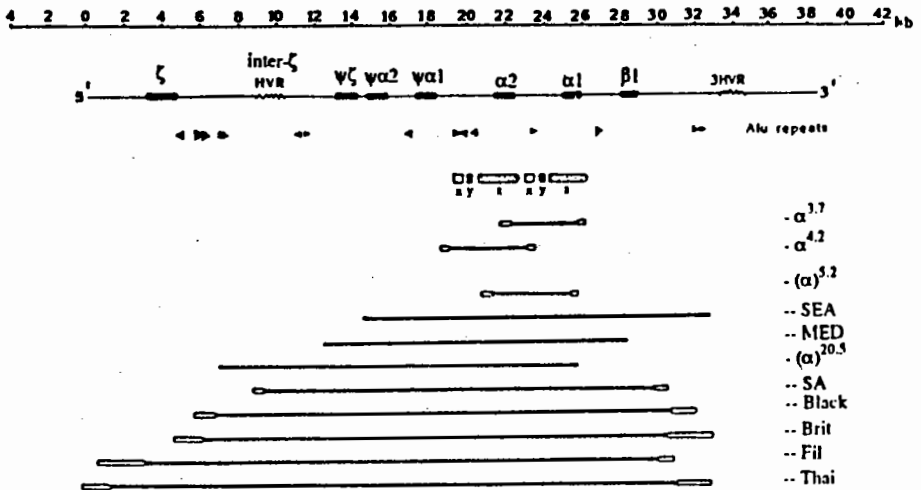
Talasemia- α terjadi umumnya karena delesi atau inaktivasi gena, hanya sedikit sekali yang disebabkan oleh mutasi nukleotid. Karena ada dua gena- α pada tiap kromosom, maka terdapat berbagai kemungkinan kombinasi, yaitu:

1. $\alpha_1 \alpha_2 =$ normal
 $\alpha_1 \alpha_2$
2. $\alpha_1 \alpha_2 =$ talasemia- α_2 ; klinis normal, Hb normal
 α_2
3. $\alpha_1 =$ talasemia- α_1 (trans) = talasemia minor/trait; klinis normal, Hb>10 g%
 α_1
4. $\alpha_1 \alpha_2 =$ talasemia- α_1 (cis); klinis normal, Hb>10 g%
 $\alpha_1 \alpha_2$
4. $\alpha_1 =$ penyakit Hb-H, anemi ringan, ikterus, splenomegali
 α_1

5. _____ = talasemia- α homozigot (hidrop fetalis Hb-Bart) tidak kompatibel untuk hidup, tidak dapat membuat globin- α sehingga tak dapat membuat Hb.

Delesi atau inaktivasi gena cis terdapat pada ras Asia, sehingga pada ras Asia kombinasi 4 delesi (Hb-Bart dengan hidrops fetalis) mungkin terjadi, dan delesi 3 gena (penyakit Hb-H) sering terjadi. Pada ras kulit hitam delesi gena mempunyai konfigurasi trans, sehingga penyakit Hb-H amat jarang terjadi dan tidak pernah ditemukan hidrop fetalis (Bunn & Forget, 1986; Fucharoen & Winichagoon, 1989).

Rentang DNA yang mengalami delesi dapat terdiri atas beberapa kb sampai beberapa puluh kb, mungkin meliputi gena- α_1 atau- α_2 atau kedua-duanya dan letak delesi juga bermacam-macam (GAMBAR 3). Bahkan delesi pada posisi -27kb dari titik awal transkripsi gena- α (*locus controlling sequences*) dapat menyebabkan terganggunya ekspresi gena- α (Romao *et al.*, 1991).



GAMBAR 3. – Berbagai ukuran panjang dan lokasi delesi pada gena- α (Fucharoen & Fucharoen, 1989).

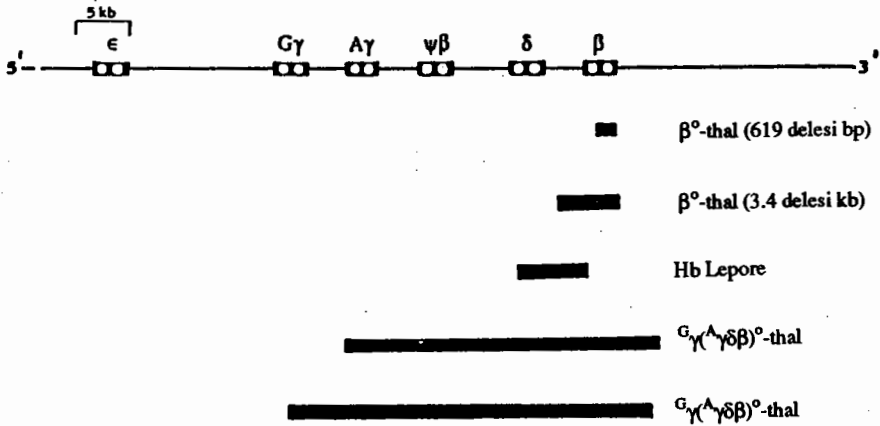
Meskipun sedikit, talasemia- α dapat disebabkan oleh mutasi noktah yang:

1. menimbulkan kodon terminasi,
2. menyebabkan perubahan pemrosesan RNA,
3. menyebabkan terminasi prematur,
4. terjadi pada rantai terminasi,
5. menghasilkan varian tak stabil (Fucharoen *et al.*, 1989).

Mutasi- α yang merupakan masalah kesehatan terpenting di Asia Tenggara adalah *Hb constant spring* (TAA \rightarrow CAA) (Kropp *et al.*, 1991). Mutasi itu menyebabkan translasi *mRNA constant spring* melampaui kodon terminasi normal sehingga rantai globin- α yang tersintesis menjadi lebih panjang (176 asam amino; normal 141). *mRNA constant spring* menyebabkan ekspresi talasemia- α dan pembentukan *Hb constant spring*, dengan kadar Hb amat rendah.

Talasemia- β

Lebih dari 95% talasemia- β disebabkan oleh mutasi noktah, sedikit saja disebabkan oleh delesi gena (Fucharoen & Winichagoon, 1989; Vogel & Motulsky, 1986). Delesi 619 bp dari ujung 3' gena adalah delesi yang paling sering ditemukan pada gena- β . Delesi seluruh gena- β telah dilaporkan oleh Laig *et al.* (1989) (GAMBAR 4).



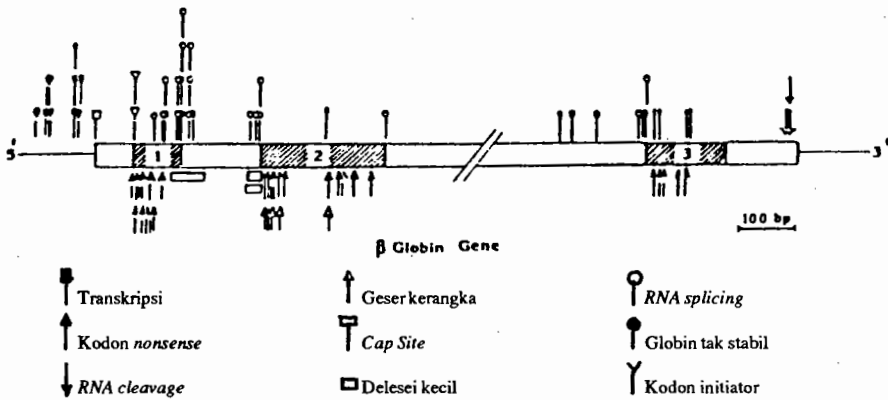
GAMBAR 4. - Berbagai ukuran panjang dan lokasi delesi pada gena- α (Fucharoen & Fucharoen, 1989)

Tidak kurang dari 100 jenis mutasi telah ditemukan dan kiranya tidak banyak lagi mutasi yang belum diketahui. GAMBAR 5 menunjukkan berbagai tempat mutasi pada gena- β . Mutasi noktah pada gena- β dapat menyebabkan:

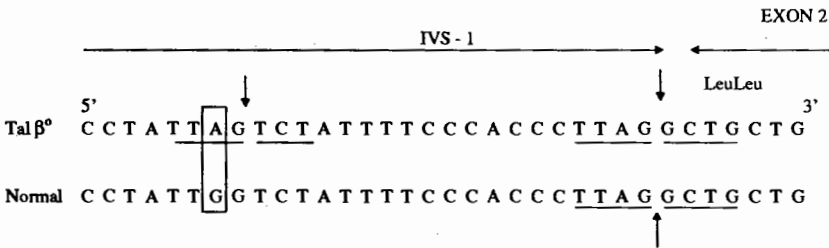
1. kelainan transkripsi,
2. defek pemisahan RNA,
3. RNA non fungsional (defek terminasi atau mutasi geseran kerangka),
4. kelainan pemrosesan RNA (pada *junction splice*, timbulnya sisi *splice* baru, memunculkan *cryptic splice site*).

Pola mutasi berbeda-beda untuk bangsa, ras, dan wilayah geografi (Chan *et al.*, 1987; Gomez *et al.*, 1988; Laig *et al.*, 1989; Lanni, 1991; Lie-Injo *et al.*, 1989; Old *et al.*, 1990; Pirastu, *et al.*, 1987; Varawalla *et al.*, 1991; Winichagoon *et al.*, 1990). Di China Selatan bagian barat terdapat variasi mutasi yang agak berbeda dengan bagian timur (Huang *et al.*, 1989).

Mutasi pada IVS-1 nt110 (G-A) menghasilkan heksanukleotid yang mempunyai susunan mirip dengan *consensus 5' splice sequences*. Akibatnya 90% *splicing* terjadi pada lokasi abnormal tadi dan hanya 10% saja terjadi pada lokasi normal (ujung 3' IVS-1). Akibatnya 90% mRNA mempunyai tambahan 19 nukleotid, sehingga bersifat tak stabil dan segera dihancurkan (GAMBAR 6).



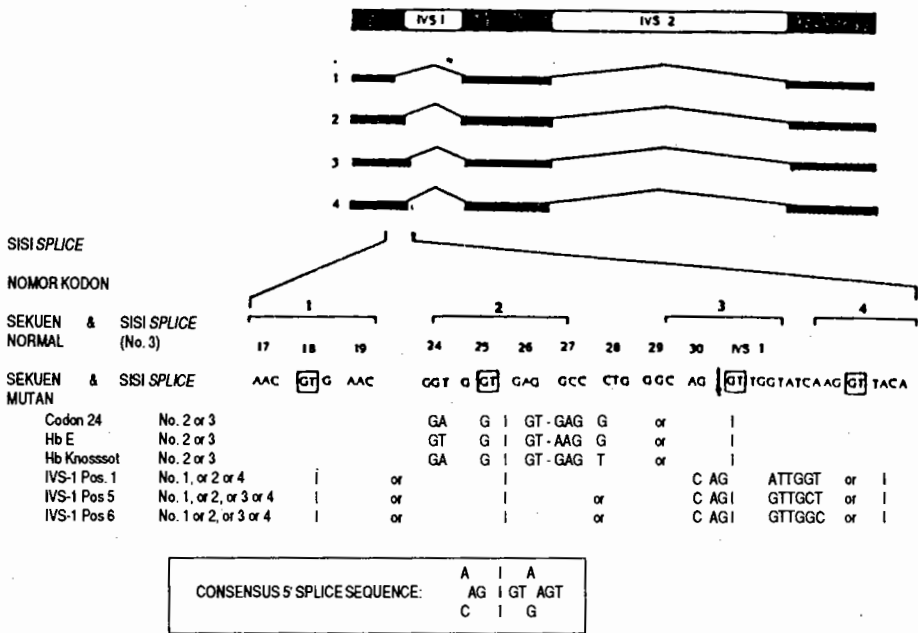
GAMBAR 5. – Macam-macam mutasi noktah dan lokasinya pada gena-β (Kazazian Jr., 1990)



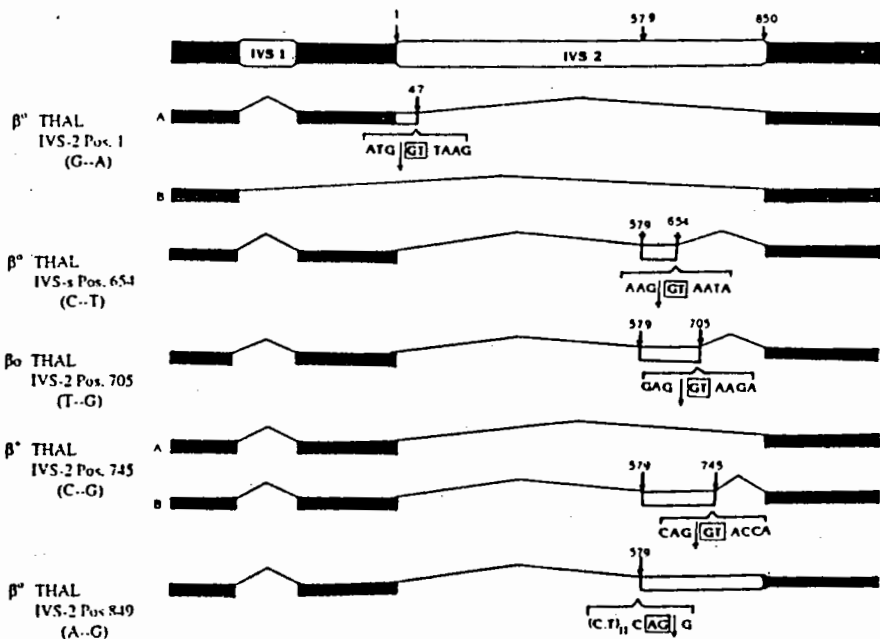
GAMBAR 6. – Ukuran nukleotid gena-β dekat perbatasan IVS-1 dan exon-2. Kotak tegak menunjukkan mutasi IVS-1 nt110 (G → A). Garis datar putus-putus menunjukkan rangkai nukleotid yang cocok sebagai tempat untuk *splicing* (Bunn & Forget, 1986)

Mutasi pada exon-1 atau IVS-1 dekat ujung 5' menyebabkan *cryptic site* yang sebelumnya telah ada tetapi tidak digunakan, menjadi *splicing* alternatif (GAMBAR 7). Pada transkripsi gena normal, *splicing* hanya terjadi pada lokasi no 3. Berbagai mutasi di sekitar pertemuan exon-1 dan IVS-1 akan menyebabkan *splicing* di berbagai lokasi, sehingga timbul urutan nukleotid yang mirip dengan *consensus 5' splice sequence*.

Mutasi pada IVS-2 nt654 (G → T), menyebabkan *splicing* mulai dari tempat normal (ujung 5' IVS-2) sampai *acceptor splice site*, yang AG-nya terletak pada nt578 dan 579; dan selanjutnya *splicing* terjadi mulai dari tempat mutasi (heksanukleotid GT) sampai ujung 3' IVS-2; dan nukleotid yang terletak di antara posisi 579 dan tempat mutasi tidak dipotong. Akibatnya mRNA yang terbentuk akan mempunyai kelebihan nukleotid sepanjang dari IVS-2 posisi 579 sampai lokasi mutasi (ada penambahan 73nt), dan mRNA demikian tidak stabil (Cheng *et al.*, 1984). Mutasi pada IVS-2 nt705 (TG) berakibat serupa (Bunn & Forget, 1986). Mutasi pada IVS2 nt745 menyebabkan mekanisme yang sama, tetapi transkripsi mRNA normal masih terjadi (GAMBAR 8).



GAMBAR 7. – Berbagai sisi *splice* yang timbul akibat mutasi pada gena-β (Bunn & Forget, 1986)



GAMBAR 8. – Mutasi pada IVS-2 (Bunn & Forget, 1986).
 ■ exon; □ segmen IVS yang tak dipotong pada proses transkripsi sebagai akibat mutasi

Mutasi geser kerangka oleh karena delesi atau insersi basa dapat menghasilkan kodon *in-phase termination* atau kodon nonsens baru pada titik sebelah hilir dari mutasi. Mutasi itu mengacaukan kerangka pembacaan dari mRNA sebelah hilir mutasi, sehingga translasi berhenti pada kodon terminasi yang kemungkinan terletak lebih hulu ataupun lebih hilir dari tempat yang normal. Contohnya pada globin- β^{Makabe} , delesi satu nukleotid pada kodon 123 menyebabkan pergeseran pembacaan (GAMBAR 9).

Kodon no.	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133
Normal (N)	GAA Glu	TTG Phe	ACC Thr	CCA Pro	CCA Pro	GTG Val	CAG Gln	GCT Ala	GCC Ala	TAT Tyr	CAG Glu	AAA Lys	GTG Val
Mutasi (M)	GAA Glu	TTC Phe	CCC Pro	CAC His	CAG Glu	TGC Cys	AGG Arg	CTG Leu	CCT Pro	ATC Ile	AGA Arg	AAG Lys	TGG Trp
Kodon no.	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146
(N)	GTG Val	GCT Ala	GGT Gly	GTG Val	GCT Ala	AAT Asn	GCC Ala	CTG Leu	GCC Ala	CAC His	AAG Lys	TAT Tyr	CAC His
(M)	TGG Trp	CTG Leu	GGT Val	TGG Trp	CTA Leu	ATG met	CCC Pro	TGG Trp	CCC Pro	ACA Thr	AGT Ser	ATC Ile	ACT Thr
Kodon no.	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157		
(N)	TAA TERM												
(M)	AAG Lys	CTC Leu	GCT Ala	TTC Phe	TTG Leu	CTG leu	TCC Ser	AAT Asn	TTC Phe	TAT Tyr	TAA TERM		

GAMBAR 9. – Urutan DNA gena- β mulai kodon 121 s/d 157 normal dan mutasi kodon 123 (-A): kodon terminasi normal (147) berubah jadi kodon sandi, dan translasi baru berhenti pada kodon 157 (Fucharoen *et al.*, 1990).

Analog: insersi +A pada kodon 71/72 menyebabkan terminasi pada kodon 90 (Cheng *et al.*, 1984); insersi (+G) antara codon 14 dan 15 menyebabkan terminasi prematur 20bp hilir dengan akibat talasemia- β^0 (Chan *et al.*, 1988); demikian pula mutasi kodon 6, GAG \rightarrow G-G menyebabkan terminasi pada Kodon 18; kodon 8, AAG \rightarrow G (terminasi kodon 21); kodon 41/42, -4 bp (terminasi kodon 60); dan sebagainya, tidak kurang dari 9 macam mutasi geser kerangka.

Mutasi satu basa dapat menghasilkan kodon nonsens (TAG, TAA atau TGA) dengan akibat berhentinya translasi tepat di depan kodon nonsens tersebut. Misalnya substitusi C menjadi G pada kodon 35 (TAC \rightarrow TAG), kodon 15 (TGG \rightarrow TAG), kodon 17 (AAG \rightarrow TAG) (Fucharoen *et al.*, 1989).

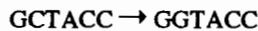
Mutasi pada DNA sisi juga dapat menyebabkan talasemia, antara lain nukleotid -87 (C \rightarrow T) pada urutan ACA-CCC yang dikonservasi. Urutan tersebut penting untuk ekspresi normal dari globin- β . Mutasi nt-87 (C \rightarrow G) menyebabkan talasemia ringan (Rosatelli *et al.*, 1989).

Pada kotak TATA, rangkai ATAAA yang diketahui penting untuk inisiasi transkripsi normal dapat mengalami mutasi dengan akibat talasemia- β^+ . Mutasi G \rightarrow A pada nt +22 dari *cap site* gena- β (26bp hulu dari kodon inisiasi), menghasilkan kodon inisiasi (ATG) dan kodon terminasi yang terletak 36bp disebelah hilirnya (terminasi prematur). Mungkin pula mekanisme yang berperan pada timbulnya talasemia ringan disini adalah terganggunya pengikatan *binding factor* ke kotak TATA (Cai *et al.*, 1992). Mutasi yang ada di situ adalah -31(A \rightarrow G), -30(T \rightarrow G), dan -28(A \rightarrow C atau A \rightarrow G) (Bunn & Forget, 1986; Cai *et al.*, 1989; Cheng *et al.*, 1984). Mutasi pada *cap site* nt 1(A \rightarrow C) juga dapat menimbulkan talasemia ringan (Wong *et al.*, 1987).

Arti Praktis

Seperti halnya pada penyakit lain, pemahaman patogenesis talasemia mempunyai arti penting sekali untuk kepentingan diagnostik maupun terapeutik. Beberapa cara diagnostik molekular talasemia, antara lain:

1. Adanya mutasi menyebabkan perubahan urutan nukleotid; urutan yang telah berubah tadi menyebabkan perubahan titik kerja endonuklease restriksi. Misalnya mutasi pada IVS-1 nt754 (C \rightarrow G):



Pada mutasi tersebut urutan nukleotid yang terjadi merupakan titik pengenalan (*recognition site*) dari endonuklease restriksi Rsa I, sehingga akan dihasilkan fragmen DNA sepanjang 1,9 kb, sedangkan pada keadaan normal fragmen yang dihasilkan adalah 2,2 kb. Pada mutasi tersebut endonuklease restriksi Kpn I, akan menghasilkan fragmen sepanjang 3,7 kb, sedangkan pada normal 39 kb (Bunn & Forget, 1986).

2. Berdasarkan urutan nukleotid dan titik-titik mutasi yang telah diketahui dapat disintesis oligonukleotid (\pm 20 nukleotid) yang komplementer dengan DNA normal maupun mutan dengan tujuan oligonukleotid tadi digunakan sebagai *probe* untuk mendeteksi mutan (Saiki *et al.*, 1988b).
3. Oligonukleotid yang komplementer (*allele specific oligonucleotide* = ASO primer) dapat digunakan sebagai primer alel untuk mengadakan amplifikasi segmen tertentu dari DNA dengan prosedur *polymerase chain reaction* (PCR) (Saiki *et al.*, 1988a). Dengan primer ASO dapat dideteksi mutan dari DNA tanpa harus mengadakan kloning atau digesti DNA dengan endonuklease restriksi yang rumit (Varawalla *et al.*, 1991). Sebagai contoh, dengan PCR mutasi pada kodon 41/42 berupa hilangnya 4 nukleotid (-CTTT) dapat dideteksi dengan elektroforesa produk PCR dari segmen DNA yang mencakup kodon 41/42 (Winichagoon *et al.*, 1989). PCR dapat dilaksanakan terhadap setiap sel berinti, juga tetes darah kering (Huang *et al.*, 1989; Wong *et al.*, 1987).

Cara diagnosis di atas amat memudahkan pengenalan pengemban bakat dan diagnosis pre natal talasemia dan mempunyai peran amat penting pada pengendalian talasemia (Old *et al.*, 1990). Mencegah lahirnya bayi talasemia merupakan isu sangat penting (Wasi, 1986). Di beberapa negara dengan prevalensi talasemia tinggi, upaya pengendalian telah menurunkan kelahiran bayi talasemia menjadi 50-10% dari semula (Angastiniotis & Hadjiminis, 1981; Bain, 1988; Modell *et al.*, 1984).

Berdasarkan patogenesis molekular talasemia kemungkinan terapi gena untuk talasemia di masa datang diharapkan akan menjadi kenyataan.

KESIMPULAN

Kelainan molekular talasemia dan berbagai hemoglobinopatia telah dapat diungkapkan melalui penelitian molekular gena globin. Hal ini memberi sumbangan bukan saja terhadap pemahaman kita terhadap kelainan-kelainan genetik tersebut, tetapi juga mempunyai arti praktis yang amat bermanfaat bagi kepentingan diagnostik terhadap pengemban bakat dan diagnosis pre natal untuk mencegah lahirnya bayi talasemia.

KEPUSTAKAAN

- Angastiniotis, M. A., & Hadjiminis, M. G. 1981 Prevention of thalassemia in Cyprus. *Lancet* 1:369-71.
- Bain, J. B. 1988 Screening of antenatal patients in a multiethnic community for β -thalassemia trait. *J. Clin. Pathol.* 41:481-5.
- Bunn, H. F., & Forget, B. G. 1986 *Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects*. W. B. Saunders Co., Philadelphia.
- Cai, S. P., Zhang, J. Z., Doherty, M., & Yuet, W. K. 1989 A new TATA box mutation detected at prenatal diagnosis for β -thalassemia. *Hum. Genet.* 45:112-4.
- _____, Eng, B., Francombe, W. H., Olivieri, N. F., Kendall, A. G., Wayne, J. S., & Chui, D. H. K. 1992 Two novel β -thalassemia mutations in the 5' and 3' noncoding regions of the β -globin gene. *Blood* 79:1342-6.
- Chan, V., Chan, T. K., Chebab, F. F., & Todd, D. 1987 Distribution of β -thalassemia mutations in South China and their association with haplotypes. *Hum. Genet.* 41:678-85.
- _____, Kan, Y. W., & Todd, D. 1988 A Novel β -thalassemia frameshift mutation (codon 14/15), detectable by direct visualization of abnormal restriction fragment in amplified genome DNA. *Blood* 72:1420-23.
- Cheng, T. C., Orkin, S. H., Antanarokis, S. E., Potter, M. J., Sexton, J. P., Markham, A. F., Giardina, P. J. V., Li, A., Kazazian, Jr. H. H. 1984 β -thalassemia in Chinese: Use of in vivo mRNA analysis and oligonucleotide hybridization in systemic characterization of molecular defects. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 81:2821-5.
- Conconi, F., Bargellesi, A., Del Senno, L., Menegatti, E., Pontremoli, S., & Russo, G. 1970 Globin chain synthesis in Sicilian thalassemia subjects. *Brit. J. Haemat.* 19:469-75.
- Friedman, S. H., Schwartz, E., Ahem, V., & Ahem, E. 1974 Globin synthesis in the Jamaican Negro with β -thalassemia. *Br. J. Haematol.* 28:505-513.
- Fucharoen, P. & Fucharoen, S. 1986 Molecular mechanism of thalassemia in Thailand. *J. Sci. Soc. Thailand* 12:9-21.
- _____, & Winichagoon, P. 1989 The molecular basis of thalassemias. *Indian J. Pediatr.* 56:693-700.
- _____, Fucharoen, G., Fucharoen P., & Fukimaki, Y. 1989 A novel orecher mutation in the β -thalassemia gene of a Thai. *J. Biol. Chem.* 264:7780-83.
- _____, Kobayashi, Y., Fucharoen, G., Ohba, Y., Miyazono, K., Fukumaki, F., & Takaku, F. 1990 A single nucleotide deletion in codon 123 of the β -globin gene cause an inclusion body β -thalassemia trait: A novel elongated globin chain Makabe. *Brit. J. Haematol.* 75:393-9.
- Fucharoen, S., Winichagoon, P., Thonglairoam, V., Siriboon, W., Siritanarakul, N., Kanokpongsakdi, S., & Vantanasiri, V. 1991 Prenatal diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathies in Thailand: Experiences from 100 pregnancies. *SEA J. Trop. Med. Publ. Hlth* 22:16-29.

- Gomez, C. M. P., da Costa, G. M. G., Braga, L. B., Ferreira, N. T. C., Loi, A., Pirastu, M., & Cao, A. 1988 β -thalassemia mutations in Portugese population. *Hum. Genet.* 78:13-5.
- Huang, S. Z., Zhou, X. D., Zhu, H., Ren, Z. R., & Zeng, Y. T. 1989 Detection of β -thalassemia mutations in Chinese using amplified DNA from dried specimens. *Hum. Genet.* 84:129-31.
- Kazazian, H. H., Ginder, G. D., Snyder, P. G., Van Beneden, R. J., & Woodhead, A. P. 1975 Further evidence of quantitative deficiency of chain-specific globin mRNA in thalassemia syndromes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72:567-71.
- Kazazian, Jr. H. H. 1990 The thalassemia syndromes: Molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Sem. Hematol.* 27:209-228.
- Kropp, G. L., Fucharoen, S., & Embury, S. H. 1991 Asymmetrically primed selective amplification/temperature shift fluorescence polymerase chain reaction to detect the hemoglobin Constant Spring mutation. *Blood* 78:26-9.
- Laig, M., Sanguamsersri, T., Wiangnon, S., Hundrieser, J., Pape, M., & Flatz, G. 1989 The spectrum of β -thalassemia mutations in northern and northeastern Thailand. *Hum. Genet.* 84:47-50.
- Lanni, F. 1991 Deteksi mutasi gena penderita thalasemia- β di RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta. Tesis S2. Fakultas Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Lie-Injo, L. E., Cai, S. P., Wahidiyat, I., Moeslichan, S., Lim, M. L., Evangelista, I., Doherty, M., & Kan, Y. M. 1989 β -thalassemia mutations in Indonesia and their linkage to β -haplotype. *Am. J. Hum. Genet.* 45:971-5.
- Modell, B., Petrou, M., Ward, R. H. T., Fairweather, D. V. I., Rodeck, C., & Vamavides, L. A. 1984 Effect of fetal diagnosis testing on birth-rate thalassemia major in Britain. *Lancet* 2:1383-4.
- Nienhuis, A. W., Turner, P., & Benz Jr, E. J. 1977 Relative stability of α - and β -globin messenger RNAs in homozygous β -thalassemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:3960-64.
- Old, J. M., Varawalla, N. Y., & Weatherall, D. J. 1990 Rapid detection and prenatal diagnosis of β -thalassaemia: Studies in Indian and Cypriot populations in the UK. *Lancet* 2:834-7.
- Pirastu, M., Galanello, R., Doherty, M. A., Tuveri, T., Cao, A., & Yuet, W. K. 1987 The same β -globin gene mutation is present on nine different β -thalassaemia chromosomes in a Sardinian population. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84:2882-5.
- Romao, L., Almeida, L., Higgs, D. R., Levinha, J., & Liebhaber, S. A., 1991 α -thalassemia resulting from deletion of regulatory sequences far upstream of the β -globin structural gene. *Blood* 78:1589-95.
- Rosatelli, M. C., Oggiano, L., Leoni, G. B., Tuveri, T., DiTucci, A., Scalas, M. T., Dore, F., Pistida, P., Massa, A., Longinotu, M., & Cao, A. 1989 Thalassemia intermedia resulting from mild β -thalassaemia mutation. *Blood* 73:601-605.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. 1988a Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91
- _____, Chang, C. A., Levenson, C. H., Wareen, T. C., Boehm, C. D., Haig, M. S., Kazazian, H. H., & Ehrlich, H. A. 1988b Diagnosis of sickle cell anemia and β -thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *New. Engl. J. Med.* 319:537-41.
- Sofro, A. S. M., Lanni, F. & Ismadi, M. 1992 Globin gene mutation of beta-thalassemia at Dr. Sardjito General Hospital Yogyakarta, Indonesia. *Am. J. Hum. Genet.* 51(4)(Suppl.) A:343.
- Todd, D., Chan, V., Schneider, R. G., Dozy, A. M., Kan, Y. W., & Chan, T. K. 1980 Globin synthesis in haemoglobin New York (113 valine \rightarrow glutamic acid). *Br. J. Haemat.* 46:557-64.
- Varawalla, N. Y., Old, J. M., Sarkar, R., Venkatesan, R., & Weatherall, D. J. 1991 The spectrum of β -thalassaemia mutations on the Indian subcontinent: The basis for prenatal diagnosis. *Br. J. Haemat.* 78:242-7.

- Vogel, F., & Motulsky, A. G. 1986 *Human Genetics Problem and Approaches*, 2nd ed. Springer-Verlag, Berlin.
- Wasi, P. 1986 The problems of thalassemia in South East Asia. *Konas V PHTDI*, Semarang.
- Weatherall, D. J., & Clegg, J. B., 1981 *The Thalassemia Syndromes*, 3rd ed. Blackwell Scientific Publ., Oxford.
- Winichagoon, P., Kownkon, J., Yetchinsomanus, P., Thonglairoam, V., Siritanaratkul, N., & Fucharoen, S. 1989 Detection of β -thalassemia and hemoglobin E genes in Thai by a DNA amplication technique. *Hum. Genet.* 82:389-90.
- _____, Fucharoen, S., Thonglairoam, V., Tanapotiwirut, V., & Wasi, P. 1990 β -thalassemia in Thailand. *Ann. NY Acad. Sci.* 612:31-42.
- Wong, C., Dowling, C. E., Saiki, R. K., Higuchi, R. G., Erlich, H. A. & Kazazian, Jr. H. H. 1987 Characterization of β -thalassemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature* 330:384-6.
- _____, Antonarakis, S. E., Goff, S. C., Orkin, S. H., Forget, B. G., Nathan, D. G., Giardina, P. J. V., & Kazazian, Jr. H. H. 1989 β -thalassemia due to two novel nucleotide substitutions in consensus acceptor splice sequences of the β -globin gene. *Blood* 73:914-8.