



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET, DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan. Dr. Gumbreg 1 Mersi Purwokerto 53112
Telepon (0281) 622022, 624948, 624848
Surel : fk@unsoed.ac.id Laman : fk.unsoed.ac.id

SURAT TUGAS

Nomor B/23879/UN23.11/KR.01.04/2022

DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN

Dasar : Kegiatan belajar mengajar di Jurusan Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto.

Menugaskan :

Kepada :
Nama : Dr. dr. Joko Setyono, M.Sc
NIP : 197207192002121001
Pangkat/Golongan : Penata Tk I/ III d
Jabatan : Lektor

Untuk melaksanakan tugas sebagai penulis buku ajar/referensi dengan judul " Aspek Biomolekuler Hemoglobin Dan Mekanisme Regulasi Produksi Hemoglobin Fetus (Hb F) Sebagai Alternatif Terapi Penyakit Talasemia-Beta Terkini" di Jurusan Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto.

Demikian surat tugas ini dibuat untuk dapat dilaksanakan sebaik-baiknya dengan penuh rasa tanggung jawab.



22 Agustus 2022

Dekan,

Dr.dr. MM. Rudi Prihatno, M.Kes,MSi.Med,Sp.An-KNA.
NIP. 197702062006041002

Buku Referensi



ASPEK BIOMOLEKULER HEMOGLOBIN DAN MEKANISME REGULASI PRODUKSI **HEMOGLOBIN FETUS (Hb F)**

*Sebagai Alternatif Terapi Penyakit
Talasemia-Beta Terkini*

JOKO SETYONO



ASPEK BIOMOLEKULER HEMOGLOBIN DAN MEKANISME REGULASI PRODUKSI HEMOGLOBIN FETUS (Hb F) SEBAGAI ALTERNATIF TERAPI PENYAKIT TALASEMIA-BETA TERKINI

Joko Setyono



Penerbit
Universitas Jenderal Soedirman
2022

Buku Referensi

**ASPEK BIOMOLEKULER HEMOGLOBIN DAN MEKANISME
REGULASI PRODUKSI HEMOGLOBIN FETUS (HB F)
SEBAGAI ALTERNATIF TERAPI PENYAKIT
TALASEMIA-BETA TERKINI**

© 2022 Universitas Jenderal Soedirman

Cetakan Kesatu, Desember 2022
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang
All Right Reserved

Penulis:
Joko Setyono

Editor Isi:
Dr. dr. Lantip Rujito, M.Si.Med.

Editor Bahasa:
Sri Nani Hari Yanti, S.S., M.Hum.

Diterbitkan oleh:
UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN
Gd. BPU Percetakan dan Penerbitan (UNSOED Press)
Telp. (0281) 626070
Email: unsoedpresspwt@gmail.com



Anggota
Afiliasi Penerbit Perguruan Tinggi Indonesia
Nomor : 003.082.1.02.2019

viii + 92 hal, 15,5 x 23 cm

ISBN: 978-623-465-061-7

*Dilarang mengutip dan memperbanyak tanpa izin tertulis dari penerbit,
sebagian atau seluruhnya dalam bentuk apapun, baik cetak,
photoprint, microfilm dan sebagainya.*

KATA PENGANTAR

Puji syukur alhamdulillah ke hadirat Allah SWT, atas rahmat dan hidayahNYA, penulis telah berhasil menyusun Buku Referensi yang berjudul ***Aspek Biomolekuler Hemoglobin dan Mekanisme Regulasi Produksi Hemoglobin Fetus (Hb F) sebagai Alternatif Terapi Penyakit Talasemia-Beta Terkini***. Buku ini disusun dalam rangka mengungkap aspek biologi molekuler hemoglobin sebagai dasar dalam mencari alternatif terapi penyakit talasemia. Salah satu terapi terkini adalah melakukan induksi terhadap Hemoglobin Fetus. Para pembaca buku ini diharapkan dapat memahami dan mengetahui dasar-dasar ilmu ini dalam mengungkap penyakit talasemia beserta terapi terkini melalui induksi Hb F. Oleh karena itu, buku ini disusun secara sistematis tentang aspek biomolekuler pembentukan dan regulasi hemoglobin, dilanjutkan dengan patologi molekuler penyakit talasemia dan diakhiri dengan alternatif terapi terkini talasemia melalui induksi Hb F.

Penulis dengan sadar dan paham bahwa buku ini tidak lepas dari kekurangan, maka besar harapan penulis kepada para pembaca untuk dapat memberikan masukan dalam rangka perbaikan maupun *update* buku ini di masa mendatang. Akhirnya, penulis berharap semoga pembaca dapat mengambil ilmu dan manfaat dari buku referensi ini.

Joko Setyono

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR.....	viii
BAB 1 SELAYANG PANDANG TENTANG TALASEMIA...	1
A. Pendahuluan	1
B. Peluang Alternatif Terapi Talasemia.....	2
BAB 2 BIOLOGI MOLEKULER HEMATOPOEISIS	4
A. Pendahuluan	4
B. Hematopoeisis Embrionik	4
C. Perubahan-perubahan di dalam Distribusi Sumsum Hemopoietik Pascanatal	6
D. Karakteristik Umum Hematopoeisis	7
E. Sel Stem Hematopoietik dan Sel Progenitor	7
BAB 3 BIOLOGI MOLEKULER ERITROPOEISIS.....	9
A. Pendahuluan	9
B. Diferensiasi Lini Eritroid.....	11
C. Ontogeni Sel Eritroid.....	14
1. Eritropoeisis Primitif.....	15
2. Eritropoeisis Definitif.....	16
D. Sitokin pada Diferensiasi Eritroid	16
E. Faktor Transkripsi dalam Diferensiasi Eritroid	19
F. MicroRNA dan Eritropoeisis.....	20
G. Regulasi Gena Globin	20
BAB 4 REGULASI ERITROPOEISIS	24
A. Pendahuluan	24
1. Gambaran Eritropoeisis Dewasa pada Tingkat Seluler	25

2. Gambaran Eritropoeisis Dewasa pada Tingkat Transkripsional.....	26
B. Regulasi Eritropoeisis.....	32
1. Peran Sel Stromal pada Regulasi Eritropoeisis ..	33
2. Maturasi dan E nukleasi Terminal	34
C. Regulasi Positif Eritropoeisis pada Tingkat Seluler	
1. SCF dan c-Kit.....	36
2. Eritropoeitin dan Reseptor Eritropoeitin	37
BAB 5 STRUKTUR NORMAL DAN REGULASI KLASTER GENA GLOBIN MANUSIA	40
A. Pendahuluan	40
B. Struktur dan Fungsi	40
C. Kontrol Genetik Hemoglobin	41
D. Kerja Gena dan Sintesis Globin	43
E. Regulasi Sintesis Hemoglobin.....	44
F. Regulasi Perubahan Perkembangan Ekspresi Gena Globin.....	47
BAB 6 PATOLOGI MOLEKULER HEMOGLOBIN	48
A. Pendahuluan	48
B. Talasemia Beta (β).....	49
1. Defektif Transkripsi Gena Globin- β	49
2. Mutasi yang Menyebabkan <i>Processing</i> mRNA Abnormal.....	50
3. Mutasi yang Mengakibatkan Translasi mRNA Globin- β Abnormal	53
4. Varian Rantai Globin- β <i>Unstable</i>	53
5. Hubungan Genotip-Fenotip pada Talasemia β ...	54
C. Talasemia Alfa (α).....	58
1. Talasemia- α^0	59
2. Talasemia- α^+	60
3. Talasemia- α /Sindrom Retardasi Mental	62
4. Talasemia- α dan Sindrom Mielodisplastik.....	62
D. Bentuk Talasemia yang Lebih Jarang dan Gangguan yang Berkaitan	63

1. Talasemia- $\delta\beta$	63
2. <i>Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin</i> (HPFH).....	64
E. Hubungan Genotip-Fenotip pada Talasemia α	64
F. Jumlah dan Lokasi Kromosomal Gena Globina Manusia	66
BAB 7 MEKANISME REGULASI PRODUKSI HEMOGLOBIN FETUS (Hb F) SEBAGAI ALTERNATIF TERAPI PENYAKIT TALASEMIA- BETA TERKINI	67
A. Pendahuluan	67
B. Hemoglobin Fetus (Hb F).....	68
C. Pengaturan Molekular Ekspresi Gena Globin- γ	71
1. Regulator Negatif Ekspresi Gena Globin- γ	71
2. Regulator Positif Ekspresi Gena Globin- γ	73
D. <i>Curcumin</i> dan <i>6-Shogaol</i>	73
E. Efek <i>curcumin</i> dan <i>6-shogaol</i> terhadap Kadar Hemoglobin F pada Sel line K562	75
F. Induksi Hemoglobin F sebagai Alternatif Terapi Talasemia-Beta Terkini	75
G. Hasil Penambatan <i>Curcumin</i> dan <i>6-Shogaol</i> terhadap Protein DNMT1 dan LSD1.....	77
H. Visualisasi <i>Curcumin</i> dan <i>6-Shogaol</i> terhadap Protein- Protein DNMT1 dan LSD1.....	78
BAB 8 KESIMPULAN	82
DAFTAR PUSTAKA.....	83
DAFTAR ISTILAH (GLOSSARIUM)	88
INDEX.....	90

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Perkembangan hematopoiesis embrionik.....	5
Gambar 3.1. Model pengaturan gen globin.....	21
Gambar 3.2. Model regulasi produksi hemoglobin F pada individu dewasa, yang diaplikasikan untuk <i>treatmen hidrosiurea</i> pada penyakit sel sabit	23
Gambar 3.3. Diagram lokus globin β manusia.....	23
Gambar 4.1. Proses eritropoiesis.....	26
Gambar 4.2. Faktor transkripsi pada promotor gena globin- γ	29
Gambar 5.1. Regulasi sintesis Hemoglobin	46
Gambar 6.1. Pola mutasi yang terjadi pada gena globin- β	50
Gambar 7.1. Mekanisme kompetitif <i>switching</i> hemoglobin manusia saat fetal menjadi dewasa.....	69
Gambar 7.2. Mekanisme <i>silencing autonom</i> dari <i>switching</i> hemoglobin.....	70
Gambar 7.3. Peran BCL11A dalam proses <i>silencing</i> ekspresi globin- γ melibatkan interaksi yang panjang dengan klaster globin- β dan interaksi lokal dengan protein SOX6 terkait-kromatin.....	71
Gambar 7.4. Penghambatan ekspresi globin- γ oleh DNMT1 dan LSD1	77
Gambar 7.5. Hasil visualisasi penambatan DNMT1 dengan 6-shogaol 2 dimensi dan 3 dimensi.....	78
Gambar 7.6. Hasil visualisasi penambatan DNMT1 dengan <i>curcumin</i> 2 dimensi dan 3 dimensi.....	79
Gambar 7.7. Hasil visualisasi penambatan LSD1 dengan 6-shogaol 2 dimensi dan 3 dimensi.....	79
Gambar 7.8. Hasil visualisasi penambatan LSD1 dengan <i>curcumin</i> 2 dimensi dan 3 dimensi.....	80

BAB 1

SELAYANG PANDANG TENTANG TALASEMIA

A. Pendahuluan

Talasemia merupakan salah satu penyakit genetik yang disebabkan oleh mutasi pada gena globin-alfa (α), globin-beta (β), globin-delta (δ) dan globin-gamma (γ), namun yang paling sering berefek klinis adalah globin- α atau globin- β yang berakibat sintesis hemoglobin menjadi abnormal. Bila defek terjadi pada produksi rantai globin- α disebut talasemia- α sedangkan defek pada produksi rantai globin- β disebut talasemia- β . Sebaran penderita talasemia- β sangat luas, dari daerah Mediterania, Afrika, Timur Tengah, India, Burma, dan Asia Tenggara (termasuk China Selatan, Semenanjung Malaysia, dan Indonesia). Diperkirakan di seluruh dunia, setidaknya ada 60.000 bayi lahir dengan talasemia setiap tahun dengan frekuensi gena berkisar 38% di beberapa daerah. Menurut WHO, diperkirakan 1,5% dari populasi dunia membawa sifat talasemia- β , sedangkan di Indonesia dilaporkan antara 3–10% di berbagai daerah. Di Kabupaten Banyumas, terdapat pertambahan penderita talasemia tiap tahunnya 4,76%–11,50% dari jumlah kasus sebelumnya, sedangkan pembawa sifat talasemia dilaporkan 8,2%. Dalam 5 tahun terakhir, tercatat peningkatan jumlah penderita talasemia di Banyumas yaitu data tahun 2016 tercatat sekitar 389 penderita, dan pada akhir tahun 2021 tercatat sekitar 500 penderita dan diantaranya ada yang sudah meninggal dunia sebelum mencapai usia 30 tahun.

Sebagian besar dari penderita talasemia tergolong dalam keluarga dengan keadaan sosial ekonomi yang rendah, padahal biaya perawatan medis dan perawatan harian yang ditanggung pemerintah dan keluarga sangat besar. Demikian juga kebutuhan darah yang harus dipersiapkan untuk kebutuhan harian transfusi rutin bagi penderita talasemia sangat besar. Semua biaya tersebut sebagian besar ditanggung oleh pemerintah melalui BPJS Kesehatan. Pasien talasemia- β mayor harus mendapatkan perawatan yang rutin tiap bulan sehingga berpotensi menimbulkan dampak klinis dari transfusi berulang yaitu timbunan zat besi pada organ vital seperti otak, jantung, limpa, ataupun pankreas yang berat hingga sampai terjadi kematian. Berangkat dari beban biaya besar dan dampak klinis yang berat tersebut, maka perlu beberapa alternatif terapi yang lebih maju dengan dampak klinis yang rendah dan biaya yang terjangkau.

B. Peluang Alternatif Terapi Talasemia

Saat ini alternatif terapi talasemia- β mayor adalah pemberian transfusi beserta obat khelasi besi, transplantasi sel punca allogenik, induksi Hb F dan terapi gen. Terapi transplantasi sel punca allogenik, meskipun harapan menghasilkan kualitas hidup yang lebih menjanjikan daripada terapi konvensional, tetapi memerlukan persiapan, prosedur dan peralatan yang kuat. Kemudian, terapi gen untuk talasemia- β , walau berhasil dilakukan pertama kali tahun 2007, namun pasien berpotensi mengandung onkogen akibat dari prosedur. Oleh sebab itu, salah satu pendekatan terapi terkini yang potensial pada talasemia- β yaitu stimulasi peningkatan produksi hemoglobin F. Induksi Hb F pada kadar yang tinggi adalah penting untuk menurunkan tingkat keparahan talasemia- β , sehingga menyebabkan perbaikan dalam mengurangi hemolisis, inefektivitas eritropoesis, dan akhirnya meningkatkan kadar hemoglobin total. Ada senyawa aktif dari herbal alami tanaman jahe merah dan temulawak yaitu *6-shogaol* dan *curcumin* yang dapat mempengaruhi produksi Hb F melalui beberapa jalur molekuler yang ada.

Produksi Hb F dapat diatur melalui beberapa jalur molekuler, di antaranya adalah aktivitas pengalihan hemoglobin (*Hb switching*) dari Hb Fetus ke Hb dewasa yang diatur oleh regulator baru yaitu BCL11A (*B-*

cell lymphoma/leukemia 11A). Jalur ini dilaporkan mempunyai aktivitas sebagai represor globin- γ . Ada jalur lain dalam memengaruhi produksi Hb F yaitu melalui jalur *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT) dengan cara penghambatan ekspresi gena globin- γ . Selain BCL11A dan STAT ada jalur molekuler lain dalam mengatur transkripsi gena globin- γ yaitu jalur *p38 mitogen activated protein kinase* (p38 MAPK) melalui proses fosforilasi *cAMP response element binding protein 1* (CREB I). Adapau CREB I ini mengatur ekspresi dari GATA-1 dan GATA-1 merupakan master regulator faktor transkripsi diferensiasi eritroid sehingga berperan penting dalam hematopoeisis normal.

Berdasarkan latar belakang epidemiologi, mekanisme molekuler dan peran genetik yang terkait dengan pengaturan kadar Hb F di atas, maka diharapkan buku referensi ini dapat memberikan gambaran potensi terapeutik terkini talasemia beta yang lebih baik dalam rangka peningkatan kualitas hidup penderita dan memberikan gambaran jalur mekanisme molekuler yang mendasari pemahaman regulasi ekspresi gena globin pembentuk hemoglobin fetal.

BAB 2

BIOLOGI MOLEKULER HEMATOPOEISIS

A. Pendahuluan

Hematopoeisis adalah proses maturasi semua lini elemen darah yang berasal dari sel stem pluripoten. Ada 2 jenis sistem hematopoeitik yaitu :

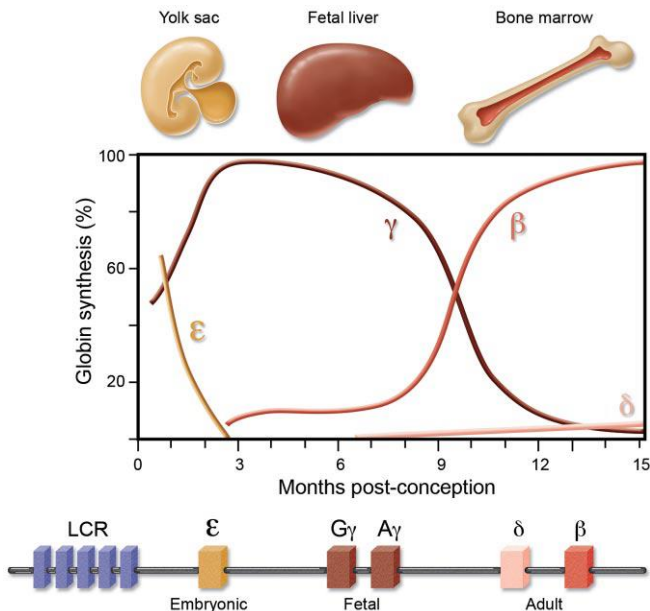
1. Hematopoeisis “Primitif” atau embrionik, berasal dari *yolk sac* yang sebagian besar terdiri atas sel-sel eritroid dan bersifat sementara/transien.
2. Hematopoeisis “Definitif” atau pascanatal, berasal dari sel stem hematopoeitik (*Hematopoietic stem cells* = HSC) pluripoten. Semua sel hematopoeitik pascanatal berasal dari sel HSC pluripoten ini yang mengalami diferensiasi melalui sejumlah jenis sel intermediet untuk menjadi sel-sel darah matur dari lini *limfoid* dan lini *myeloid*.

B. Hematopoeisis Embrionik

Hematopoeisis dimulai dari populasi HSC primitif transien yang dihasilkan di dalam *yolk sac*. Awal proses ini pada hari ke-14 sampai hari ke-19 dari embriogenesis dan menetap di sana sampai akhir minggu ke-12 masa kehamilan. *Yolk Sac* pertama kali menghasilkan sel eritroid berinti yaitu megaloblastik dan mengandung hemoglobin embrionik, yaitu Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$), Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$), dan Portland ($\zeta_2\gamma_2$). Eritropoeisis *Yolk Sac* disebut sebagai “primitif”. Pada waktu minggu ke-6 dan ke-7 masa kehamilan, pulau-pulau darah di dalam *yolk sac* juga mengandung beberapa megakaryosit. Aktivitas hemopoeitik kemudian terjadi di dalam regio mesoderm *splancholeirial para-aortic*. Regio ini terdiri atas aorta

dorsal, jembatan gonadal dan mesonephros yang disebut *the aorta-gonad-mesonephros (AGM) regio*. Hemopoiesis di dalam regio AGM berkembang dari HSC definitif yang kelak berada di *Bone Marrow (BM)* dewasa. Beberapa HSC jenis-dewasa juga berkembang di dalam *yolk sac* dan plasenta.

Adapun HSC yang berasal dari AGM bermigrasi ke hepar dan fokus eritropoietik dapat terdeteksi pada saat minggu ke-6 masa kehamilan. Hepar memberi tempat utama untuk eritropoiesis dari bulan ke-3 sampai bulan ke-6 ketika eritroblas mencapai kira-kira 50% dari sel berinti di hepar. Eritroblas sebagian besar berada di ekstrasvaskuler, berlokasi di dekat dan di dalam sel Kupffer lalu maturasi mereka berlanjut di dalam sinusoid. Eritroblas, awalnya megaloblastik, namun berikutnya menjadi makronormoblas. Eritropoiesis hepatik fetal terkait dengan sintesis hemoglobin fetal (HbF, $\alpha_2\gamma_2$) dan menghasilkan sel darah merah makrositik berinti. Hepar melanjutkan menghasilkan sel darah merah dalam jumlah yang menurun setelah bulan ke-6 masa kehamilan hingga akhir minggu pertama setelah lahir (Gambar 2.1).



Gambar 2.1. Perkembangan hematopoiesis embrionik (D.E. Bauer et.al., 2012)

Fokus kecil sel eritropoeitik berada di dalam jaringan pengikat vaskular dari beberapa ruang-ruang BM dari 2.5 sampai 4 bulan kehamilan. Dari bulan ke-6, BM merupakan tempat utama hematopoeisis dan rasio myeloid/erythroid (M/E) kira-kira 1:4. Eritropoeisis pada BM fetal terjadi secara ekstra vaskular, adalah makronormoblastik dan menghasilkan sel darah merah makrositik yang mengandung HbF dan HbA ($\alpha_2\beta_2$). Volume sel rata-rata (*Mean Cell Volume*, MCV) di dalam darah tali pusat dari bayi baru lahir cukup bulan adalah 90-118 fl. Eritropoeisis di dalam BM fetal terjadi diatur oleh eritropoeitin yang dihasilkan dari ekstra renal, mungkin di dalam hepar. Dari bulan ke-6, terjadi proliferasi HSC di dalam hepar fetal yang menghasilkan sel eritroid, myeloid dan beberapa limfoid. Fokus kecil dari eritroblas, beberapa sel granulositopoeitik, dan kadang-kadang megakaryosit juga terjadi di beberapa jaringan dan organ embrionik maupun fetal (termasuk nodus limfe, limpa dan ginjal); namun demikian, kontribusi mereka terhadap keseluruhan aktivitas hemopoeitik adalah kecil.

C. Perubahan-perubahan di dalam Distribusi Sumsum Hemopoeitik Pascanatal

Saat lahir, semua ruang BM berisi sumsum merah yang sebagian besar terdiri atas sel hemopoeitik. Pada hakikatnya, setelah 1 tahun, semua sel hemopoeitik di dalam ujung phalang digantikan oleh sel lemak. Setelah 4 tahun pertama terdapat peningkatan sel lemak di antara sel-sel hemopoeitik dari ruang-ruang sumsum lainnya. Antara 10–14 tahun, sel hemopoeitik di dalam pertengahan dari shaft tulang-tulang panjang, hakikatnya secara lengkap digantikan oleh sel lemak. Selanjutnya, zona sumsum kuning non-hematopoeitik menyebar ke arah proksimal dan distal. Penyebaran ke distal adalah lebih cepat dan kira-kira setelah 25 tahun hanya regio dari tulang panjang yang mengandung sumsum hematopoeitik merah adalah proksimal *shaft* dari femur dan humeri. Tempat hematopoeisis lainnya pada orang dewasa adalah tulang tengkorak, klavikula, skapula, sternum, vertebra dan pelvis.

D. Karakteristik Umum Hematopoiesis

Pembentukan sel darah dari semua tipe terdiri atas 2 proses :

1. Proliferasi sel, yaitu proses melipatgandakan jumlah sel matur yang dihasilkan dari sebuah sel yang komit terhadap beberapa lini sel khusus.
2. Diferensiasi sel, atau perkembangan karakteristik biokimia, fungsional dan struktural yang progresif, yang spesifik terhadap jenis sel tertentu.

Selama kehidupan di intra uteri dan dalam tumbuh kembang anak, terdapat peningkatan progresif di dalam jumlah total sel hemopoetik dan sel darah. Pada orang dewasa normal, jumlah total sel hemopoetik dan sel darah masih relatif konstan. Terdapat pembaruan yang tetap dengan laju kehilangan sel matur yang relatif konstan (eritrosit, granulosit, monosit dan platelet) yang seimbang secara presisi oleh produksi sel baru.

E. Sel Stem Hematopoetik dan Sel Progenitor

Hematopoetic stem cells uncommitted/inkomit adalah pluripoten, yang mempunyai kapasitas terhadap swa-pembaruan, ia mempunyai kemampuan untuk diferensiasi menjadi *progenitor lineage-commited*. Ia tidak dikenali secara morfologi tetapi dapat diidentifikasi oleh profil ekspresi antigen. Diferensiasi HSC menghasilkan progenitor myeloid dan progenitor limfoid multipoten. Bukti terhadap adanya HSC pluripoten berasal dari sejumlah bukti-bukti berikut ini :

1. Penelitian sitogenetik dari leukemia myeloid kronik, yang menunjukkan bahwa kromosom Philadelphia (Ph) berada baik di dalam sel myeloid (granulositik, eritroid dan megaryositik) maupun sel limfoid.
2. Demonstrasi yang terjadi pada kasus anemi sideroblastik dengan mosaikisme *glucosa-6-fosfat-dehydrogenase* (G6PD), adalah sebuah izoenzim G6PD tunggal yang berada di dalam sel myeloid seperti halnya limfosit -B dan -T.

3. Penelitian model transplan xenogeneik pada hewan imunokompeten

Semua HSC pluripoten mengekspresikan antigen CD34. Fraksi kecil dari HSC pluripoten dengan aktivitas sel yang mendiami kembali dalam jangka panjang dikaitkan dengan fenotip CD34⁺/CD38⁺. Sel-sel ini sangat jarang di dalam BM normal (biasanya <0,1%), namun mungkin meningkat di dalam BM yang regenerasi dan di dalam sindrom myelodisplastik. Sel CD34⁺/CD45dim termasuk fraksi mayor sel progenitor yang telah komit terhadap lini hematopoetik spesifik (eritroid, neutrofil, monositik, sel dendritik, basofil, sel mast, eosinofil dan megakaryositik) dan jumlah yang berubah-ubah dari prekursor sel-B CD34⁺.

Hematopoetic stem cells multipoten atau pluripoten mengalami restriksi gradual di dalam potensial hemopoeitik mereka sampai saatnya berkembang menjadi sel progenitor unipoten. Keturunan dari HSC, kemudian dibatasi secara progresif menjadi satu lini sel dan mereka kehilangan kapasitas untuk swa-pembaruan. Percabangan paling awal di antara perkembangan myeloid dan limfoid adalah menjadi sel progenitor komit dari jenis myeloid atau limfoid adalah sebagai berikut:

1. *Common Myeloid Progenitor* (CMP) tumbuh menjadi sel dari semua lini myeloid (contohnya: granulositik, eritroid, megakaryositik). Berikutnya CMP menghasilkan *granulocyte-macrophage progenitor* (GMP) dan *megakaryocyte-erythroid progenitor* (MEP).
2. *Common Lymphoid Progenitor* (CLP), tumbuh menjadi sel limfosit-T dan -B serta sel *natural killer* (NK).

Growth-promoting cytokines, seperti *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) dan *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF), sitokin lainnya, dan faktor transkripsi adalah regulator kunci dari hemopoiesis dan mungkin juga memperkuat beberapa fungsi dari sel matur.

BAB 3

BIOLOGI MOLEKULER ERITROPOEISIS

A. Pendahuluan

Eritrosit (Sel darah merah), merupakan sel yang paling melimpah (lebih dari 25 juta) di dalam tubuh manusia, dirancang secara unik agar dapat menahan perubahan-perubahan mikrosirkulasi guna membawa oksigen ke jaringan. Sel darah merah dihasilkan di BM, dimana sel ini mengalami maturasi progresif dari progenitor sampai secara morfologi disebut prekursor dan akhirnya menjadi eritrosit tak berinti. Eritrosit yang berada di sirkulasi tidak mempunyai inti maupun organela, tetapi terdiri atas hemoglobin untuk membawa oksigen dari paru-paru ke seluruh jaringan tubuh. Kandungan optimum sel darah merah di dalam darah kurang lebih 40–45 %. Bila kandungannya meningkat seiring bertambahnya sel darah merah, akan meningkatkan viskositas darah dan menyebabkan hambatan aliran darah serta membatasi oksigenasi jaringan. Hemoglobin tersusun dari empat rantai protein (globin), masing-masing mengandung cincin hem dengan molekul besi (fe) yang berfungsi untuk mengikat dan melepaskan molekul oksigen tanpa mengubah valensinya. Konsisten dengan peran sentral sel darah merah dalam oksigenasi jaringan, maka jumlah sel darah merah diatur oleh kadar oksigen di dalam tubuh. Ketika jaringan mengalami hipoksia, maka akan menyebabkan peningkatan produksi sel darah merah melalui hormon eritropoetin (EPO), yang dihasilkan terutama oleh ginjal tetapi bekerja di BM dimana sel darah merah disintesa di sana. Bila jumlah sel darah merah berkurang di dalam sirkulasi (misalnya: anemia) dapat menyebabkan penurunan kesehatan dan bila terjadi kehilangan jumlah sel

darah merah yang berat atau cepat, maka dapat mengancam jiwa. Sel darah merah pada mamalia bentuknya seperti cakram bikonkaf dengan membran sel yang unik. Komponen luar dari membran sel darah merah terdiri atas lipid dua-lapis dengan protein yang tertanam termasuk band 3 dan *glikophorin*. Komponen dalam dari membran sel darah merah terdiri atas sitoskeleton yang tersusun terutama molekul alfa dan beta spektin yang menempel ke dalam lipid dua-lapis melalui protein jangkar. Sitoskeleton membantu mempertahankan bentuk sel darah merah, mengatur mobilitas lateral protein membran, dan mendukung struktur lipid dua-lapis. Deformabilitas selular, terkait dengan kelebihan membran yang berbentuk bikonkaf, sehingga sel darah merah mempunyai kemampuan dalam navigasi di jaringan kapiler dimana pertukaran gas terjadi. Mutasi pada gena yang mengkode komponen sitoskeletal dapat menyebabkan kerusakan membran sel yang mengarah pada penurunan deformabilitas dan meningkatkan kerusakan sel darah merah. Hemolisis normal terjadi saat usia sel darah merah kurang lebih 120 hari.

Ada 2 lini eritroid yang berbeda selama ontogeni mamalia. Pertama, lini eritroid primitif, dimulai selama awal embriogenesis pada *yolk sac* dan menghasilkan gelombang transien maturasi sel eritroid. Kedua, lini eritroid definitif, terjadi pada masa janin sampai kehidupan pasca lahir. Eritropoeitin adalah sitokin primer yang mengatur maturasi sel eritroid dengan cara sinyaling melalui reseptornya untuk mengaktifkan kaskade sinyaling intraseluler multipel. Eritropoeisis diatur juga oleh kompleks transkripsional yang terdiri atas GATA-1, SCL, EKLF dan faktor lainnya. Kompleks ini membantu dalam kreasi dari regio kromatin aktif secara transkripsional dan *upregulate* gena spesifik-eritroid. Saat ini, microRNA ditemukan di dalam sel eritroid dan menaikkan kemungkinan bahwa *downregulate* gena juga merupakan hal yang penting dalam lini maturasi. Pemahaman yang lebih baik dari pengaturan ekspresi gena globin di dalam embrio, janin dan saat dewasa akan mengarah dalam peningkatan terapi yang sempurna untuk pasien hemoglobinopati, termasuk anemia sel sabit dan talasemia.

B. Diferensiasi Lini Eritroid

Pada manusia dewasa, semua sel darah yang matur berasal dari sel stem hematopoietik. Diferensiasi sel stem hematopoietik mempunyai ciri restriksi progresif dalam kapasitas potensial dan proliferasi yang mengarah pada progenitor hematopoietik hanya komit terhadap lini tunggal. Produksi sel darah merah (eritropoeisis) pada mamalia dewasa terjadi di dalam BM dan bercirikan 3 tahap yang jelas.

Tahap pertama terdiri atas progenitor yang komit-lini digambarkan dengan kemampuan mereka dalam membentuk koloni pada media semisolid. Progenitor khusus eritrosit yang dikenal pertama kali adalah *The Burst-Forming Unit Erythroid* (BFU-E), yang berkembang menjadi koloni besar sel darah merah secara *in vitro* dalam waktu 7 hari (tikus) dan 14 hari (manusia). BFU-E menghasilkan lebih banyak *progenitor komit-eritroid* matur yang disebut *The Colony-Forming Unit Erythroid* (CFU-E), yang berkembang menjadi koloni besar sel darah merah secara *in vitro* dalam waktu 2 hari (tikus) dan 7 hari (manusia) kultur. CFU-E mempunyai potensi proliferasi terbatas yang ekstrim dibanding dengan BFU-E. Beberapa sitokin telah diketahui memperkuat pembentukan koloni dari BFU-E, termasuk IL-3, SCF dan EPO konsentrasi tinggi. Sebaliknya, kelangsungan hidup CFU-E tergantung hampir secara eksklusif pada konsentrasi EPO yang rendah.

Tahap ke-2 dari diferensiasi *erythroid* terdiri atas prekursor eritroid berinti yang berkembang dari proeritroblas menjadi bentuk basofilik, polikhromatofilik dan orthokromatik. Pada mamalia, ditandai dengan 3 tahap khusus pada tahap diferensiasi ini. *Proses pertama*, adalah akumulasi hemoglobin secara progresif, yang membentuk lebih dari 90 % isi protein yang dikandung sel darah merah matur. *Proses ke-2* adalah ekspansi sejumlah eritroblas melalui sejumlah divisi sel yang terbatas. Oleh karena itu, prekursor eritroid berlanjut membelah sesuai diferensiasi mereka. *Proses ke-3* adalah piknosis inti progresif dan kehilangan inti sel secara sempurna.

Prekursor eritroid matur bersama-sama dengan sel makrofag di dalam “*erythroblast islands*” yang melayani sebagai suatu *stromal microenvironment* di dalam ruang BM. Faktanya, setiap prekursor

eritroid di dalam sumsum adalah dalam kontak secara fisik dengan sel makrofag. Beberapa interaksi adesif telah menjelaskan bahwa hal ini membantu interaksi makrofag-eritroblas. Yang pertama terjadi antara integrin $\alpha 4\beta 1$ terekspresi pada eritroblas dan kontra reseptornya yaitu *vascular adhesion molecule 1* (VCAM-1) terekspresi pada sel makrofag. Ketika sebuah antibodi monoklonal diarahkan ke masing-masing $\beta 1$ -integrin dan VCAM-1, mengganggu *erythroblast islands* secara in vitro. Yang ke-2, molekul yang melakukan mediasi interaksi adesif antara sel eritroblas dan makrofag adalah *erythroblast macrophage protein* (Emp). *erythroblast macrophage protein* adalah sebuah protein transmembran berat 36-kD yang terekspresi oleh kedua sel baik sel eritroblas maupun sel makrofag. Selanjutnya, kultur eritroblas manusia tanpa sel makrofag maupun dengan sel makrofag dan antibodi yang bekerja memblok Emp menghasilkan suatu tanda penurunan proliferasi eritroblas dan enukleasi serta peningkatan apoptosis. Hasil-hasil tersebut mendukung gagasan bahwa interaksi eritroblas-makrofag adalah hal yang penting dalam maturasi, kelangsungan hidup dan enukleasi eritroblas. Emp berfungsi secara autonom baik pada sel makrofag maupun eritroblas. Pada akhir kehamilan, fetus yang kekurangan Emp berkembang menjadi pucat dan memiliki peningkatan sel eritroid berinti di sirkulasi. Interaksi adhesif eritroblas-makrofag yang ke-3 terjadi antara *the erythroid-specific isoform of intercellular adhesion molecule 4* (ICAM-4) dan αv integrin pada sel makrofag. Penambahan peptida αv integrin memblok interaksi ini dan mengganggu integritas *erythroblast island* secara in vitro. Gangguan yang ditargetkan ke ICAM-4 menyebabkan 50% penurunan jumlah *erythroblast islands* pada BM. Namun demikian, keadaan-kesetimbangan eritropoeisis tidak terpengaruh pada orang dewasa.

Interaksi sel-sel di dalam eritroblas telah dikemukakan untuk memfasilitasi baik pada tahap awal maupun tahap akhir dari maturasi eritroid. Mengenai tahap awal maturasi eritroid, penelitian dengan mikroskop elektron pada *erythroblast island* telah mendukung bahwa makrofag mungkin sebagai “perawat” eritroblas dengan cara memberi suplai besi. Pada proses ini, diawali istilah “*rhopheocytosis*” yang sekarang dikenal sebagai *micropinocytosis*, suatu proses dimana eritroblas imatur mengakumulasi besi melalui sebuah reseptor asam

feritin khusus. Ini juga telah dikemukakan, walau tidak ada bukti, bahwa sel makrofag sentral mungkin berperan sebagai sumber penting dari sitokin, khususnya EPO, yang mendukung maturasi eritroid. Lebih jauh, penempelan terhadap sel makrofag membawa sel-sel eritroblas menjadi sangat dekat secara fisik sehingga membantu interaksi di antara sel-sel eritroblas. Kepentingan dari interaksi ini telah didukung oleh regulasi sejumlah sel eritroid dengan cara sistem sinyaling Fas-FasL. Ekspresi FasL pada tahap akhir eritroblas dapat menghantarkan sinyal kematian terhadap eritroblas imatur berdekatan yang mengekspresi Fas. Kadar EPO yang tinggi dapat melindungi eritroblas imatur dari jalur sinyal ini dan mengarah pada peningkatan kelangsungan hidup sel eritroid. Lebih jauh, ko-kultur eritroblas dengan sel makrofag mencegah apoptosis eritroblas dan meningkatkan proliferasinya.

Enukleasi merupakan ciri khas dari eritropoeisis definitif pada mamalia dan membedakan sel darah merah mamalia dewasa dari sel darah merah spesies nonmamalia. Enukleasi dimulai ketika nukleus menjadi mudah bergerak secara bebas di dalam eritroblas tahap akhir, sebuah kejadian yang bersamaan dengan hilangnya filamen-filamen vimentin intermediet sehingga membentuk sangkar di seputar nukleus. Segera setelah itu, nukleus menjadi asentris dan vakuola-vakuola menyatu dengan membran baru lalu membentuk alur antara nukleus dan retikulosit insipien. Kemudian nukleus dipaksa keluar dengan cincin tipis dari sitoplasma dan sekeliling membran plasma. Nukleus yang dipaksa keluar ini sejatinya adalah sebuah sel intak yang saat ini disebut “*pyrenocyte*”. Selama enukleasi, sebuah cincin aktin terbentuk antara *nascent pyrenocyte* dan retikulosit, dan inhibisi polimerasi aktin memblok enukleasi secara bermakna.

Proses enukleasi eritroblas juga melibatkan segregasi sitoskeletal dan protein permukaan sel di antara membran plasma inti dan *incipient reticulocyte*. Yang menarik, hampir semua protein sitoskeletal utama, termasuk band 3, spectrin, ankyrin, dan 4.1, menjauhi/terpisah, walaupun Emp, β 1-integrin dan glikokonjugat dikenali oleh *concanavalin* sebuah partisi terhadap *nascent pyrenocyte*. *Pyrenocyte* secara cepat kehilangan *fosfatidilserin* asimetri di dalam plasma membrannya, mengirimkan sinyal “*eat me*” ke makrofag sentral. Bila terjadi defek ini yaitu

ketidakmampuan makrofag dalam memakan *pyrenocyte*, maka akan menyebabkan anemia berat dan kematian dalam rahim saat akhir kehamilan. Oleh karena itu, hal tersebut mendukung bahwa *engulfment* dan pemecahan *pyrenocyte* berperan penting dalam regulasi eritropoiesis tahap akhir.

Tahap ke-3 diferensiasi eritroid terdiri atas maturasi retikulosit dan sirkulasi dari sel darah merah matur. Transkripsi menghentikan dengan membongkar mesin ribosomal saat retikulosit transisi menuju akhir eritrosit terdiferensiasi, kehilangan organel internal secara aktif termasuk retikulum endoplasmik dan mitokondria yang terjadi melalui degradasi internal disebut *autophagy*. Saat ini telah dikemukakan bahwa klirens mitokondrial pada retikulosit memerlukan protein NIX yang terkait-BCL2. Saat retikulosit matur dari bentuk sel multilobul menjadi suatu *disk bikonkaf*, terdapat restrukturisasi sitoskeleton membran yang secara signifikan menghasilkan kehilangan membran sel yang bermakna terkait dengan hilangnya protein permukaan sel khusus melalui eksosomes. Retikulosit memasuki aliran darah dengan cara migrasi melalui endotel sinusoid BM. Dalam waktu 24–48 jam setelah memasuki sirkulasi, retikulosit manusia kehilangan ribosom sisanya dan berlanjut transisi menjadi eritrosit matur yang beredar kurang lebih selama 120 hari. Saat usia eritrosit tersebut, di sana terjadi kehilangan membran sel, isi hemoglobin dan ekspresi CD47 secara progresif. Akhirnya, *senescent* eritrosit mengekspresikan *fosfatidilserin* pada permukaan sel mereka dan segera dikenali dan ditelan oleh sel makrofag dari sistem retikuloendotelial.

C. Ontogeni Sel Eritroid

Berbeda dengan eritrosit tak berinti pada mamalia, sel darah merah yang beredar pada ikan, amfibi dan burung ternyata masih berinti. Sel darah merah tak berinti, kecil dan beredar secara kontinyu selama dalam kandungan dan setelah lahir, disebut eritropoeisis “definitif”, yang dibedakan dari eritropoeisis “primitif” mempunyai ciri, sel darah merah berinti, besar dan beredar hanya sebentar, yang mula-mula berada di *yolk sac*.

1. Eritropoeisis Primitif

Progenitor eritroid primitif (EryP-CFC), kemampuan membentuk koloni-koloni dari sel eritroid primitif teridentifikasi pertama kali ketika sel-sel *yolk sac* tikus dikultur di media semisolid. eryP-CFC tikus membentuk koloni-koloni merah padat dalam waktu 5 hari terdiri atas sel-sel eritroid dewasa yang teekspresi baik pada globin embrionik maupun dewasa. Sebaliknya, BFU-E dan CFU-E membentuk koloni-koloni yang terdiri atas sel-sel merah kecil yang terekspresi hanya pada globin dewasa. EryP-CFC muncul selama awal gastrulasi pada embrio tikus, lalu bertambah banyak pada *yolk sac*, dan hilang dalam waktu 48 jam. Hal ini menunjukkan bahwa lini eritroid primitif adalah sementara/transien dan berbeda dari lini eritroid definitif.

Tempat lokasi sel-sel eritroid primitif terbukti pada *yolk sac* tikus sebagai “*blood islands*”. Setelah 24 jam berikutnya, mereka berdiferensiasi menjadi *proeritroblas* primitif tak bersarang melalui pleksus vascular primer. Eritroblas primitif memasuki sirkulasi segera setelah onset kontraksi jantung. Selanjutnya mereka membelah di dalam aliran darah, dibuktikan dengan adanya gambaran mitotik di dalam sirkulasi, *thymidine incorporatin*, dan penelitian siklus sel. Akumulasi eritroblas primitif meningkatkan jumlah hemoglobin dan menjadi rendah basofilik secara progresif.

Analisis morfologik menunjukkan bahwa eritroblas primitif menjadi matur dalam kohort semisinkron saat mereka berada dalam sirkulasi aliran darah. Sel darah merah primitif mencapai kadar keadaan-kesetimbangan hemoglobin 80–100pg per sel, kira-kira 6 kali jumlah hemoglobin yang ditemukan pada eritrosit tikus dewasa. Dengan menggunakan pendekatan imunohistokimia dan transgenik, ditemukan bahwa sel eritroid primitif tak berinti pada embrio tikus dan berlanjut sampai sirkulasi sebagai eritrosit dalam beberapa hari setelahnya. Saat ini, dicatat bahwa *pyrenocyte* primitif ditemukan hanya sesaat di aliran darah fetal, konsisten dengan dugaan bahwa prekursor eritroid primitif, seperti pasangannya yaitu eritroid definitif, bahwa tak berinti melalui ekstrusi inti.

Eritropoeisis primitif pada manusia tidak dapat diungkap secara jelas seperti pada tikus, karena kendala etik ketidaktersedianya akses secara fisik. Sel eritroid primitif beredar di embrio manusia seluruhnya berada saat trimester pertama. Namun demikian, tidak diketahui dengan pasti, bila sel eritroid primitif manusia muncul dari populasi EryP-CFC transien atau bila mereka tak berinti untuk membentuk eritrosit primitif secara sempurna di dalam aliran darah fetal.

2. Eritropoeisis Definitif

Eritropoeisis primitif memenuhi fungsi kritis terhadap kelangsungan hidup dan pertumbuhan embrionik pasca implantasi awal, namun demikian, fetus membutuhkan peningkatan jumlah sel darah merah selama gestasi. Sebelum pembentukan kavitas BM, hepar berperan sebagai tempat maturasi sel eritroid definitif pada fetus. Sumber progenitor eritroid definitif ini adalah *yolk sac*, karena BFU-E ditemukan pertama kali di *yolk sac* sebelum onset sirkulasi dan berikutnya ditemukan jumlahnya meningkat di dalam aliran darah sebelum kolonisasi di hepar. Walaupun secara fundamental mirip, namun ada perbedaan antara progenitor eritroid fetal dengan pasangan imbangannya pada BM dewasa. Sebagai contoh, CFU-E pada janin tikus lebih sensitif terhadap EPO dibanding CFU-E dari BM. Di samping itu, BFU-E fetal kapasitas proliferasi yang lebih baik dan lebih cepat matur dibanding BFU-E dewasa. Terakhir, BFU-E dari hepar fetus mempunyai kemampuan lebih dari BFU-E dari BM dewasa dalam hal respon proliferasi terhadap EPO.

D. Sitokin pada Diferensiasi Eritroid

Telah lama dikenal bahwa terdapat hubungan terbalik yang muncul antara penghantaran oksigen di dalam tubuh dengan produksi sel darah merah. Mekanisme yang bertanggung jawab terhadap hubungan ini menjadi lebih jelas setelah kloning glikoprotein hormon EPO dan pengenalan bahwa maturasi sel eritroid bergantung pada sitokin ini. Sintesis EPO diatur secara transkripsional oleh oksigen melalui

pengaturan *hypoxia inducible factor 1 α* (HIF1 α). Saat kondisi normal, HIF1 α diubiquitinasi dan didegradasi setelah hidroksilasi prolin dan mengikat protein *von Hippel Lindau*. Hidroksilasi ini memerlukan oksigen untuk fungsi enzimatisnya. Sebaliknya, pada saat hipoksia, HIF1 α tidak terhidroksilasi pada residu prolin dan oleh karena itu, bebas mengikat urutan *enhancer* dari gena EPO dan upregulasi transkripsi EPO. Jadi, setiap muncul sinyal untuk mensintesa EPO secara efektif terjadi *down-modulated* oleh kadar oksigen normal di jaringan.

Pada orang dewasa, EPO disintesa terutama di ginjal. Jadi, tempat sintesis hormon berada jauh dari kerjanya. Beberapa penelitian mengungkap bahwa hepar merupakan tempat pertama baik untuk maturasi sel eritroid primitif dan sintesis EPO. Sumber EPO untuk sel eritroid primitif di dalam *yolk sac* belum pernah digambarkan. Hilangnya sinyaling EPO mengarah pada penurunan jumlah sel eritroid primitif dan memblok komplit pada kemampuan prekursor eritroid definitif menjadi matur.

Pada orang dewasa, reseptor EPO (EPO-R) diekspresikan secara primer oleh CFU-E dan prekursor eritroid imatur. Baik BFU-E dan CFU-E membutuhkan EPO untuk membentuk koloni-koloni secara *in vitro*, namun demikian, hanya CFU-E responsif terhadap EPO secara *in vivo*. Hal ini jelas bahwa EPO bekerja sebagai faktor kelangsungan hidup kritikal terhadap CFU-E dan aktivitas ini diketahui menjadi mekanisme regulatori primer untuk mempertahankan homeostasis jumlah sel darah merah. Jadi, penurunan jumlah sel darah merah menyebabkan hipoksia jaringan, memacu peningkatan sintesis EPO dan menambah kelangsungan hidup CFU-E yang dapat matur menjadi eritrosit.

Eritropoeitin menempel di reseptornya sehingga terbentuk dimerisasi EPO-R, otofosforilasi Janus Kinase 2 (JAK2), dan fosforilasi beberapa residu tirosin dari porsi intrasitoplasmik EPO-R. Fosforilasi EPO-R mengarah pada rekrutmen berbagai molekul sinyaling, termasuk SAT5, Grb2-SOS dan p85. STAT5 translokasi menuju nukleus untuk mengatur transkripsi gena *Bcl-x(L)* antiapoptotik dan memperkuat kelangsungan hidup sel erithroid. *Bcl-x(L)* berfungsi untuk melindungi baik sel erithroid primitif maupun definitif dari apoptosis. Rekrutmen Grb2-SOS terhadap EPO-R memicu jalur sinyaling Ras/Raf dan MAP

kinase, sedangkan p85 terikat pada EPO-R akan mengaktivasi P13 kinase, yang pada gilirannya akan mengarah pada fosforilasi GATA-1 dan Foxo3a. P13 kinase mengaktivasi progenitor eritroid juga mengarah pada up-regulasi beberapa gena siklus sel sama seperti peningkatan transkripsi c-kit. Lyn, sebuah anggota tyrosine kinase famili Src juga terkait dengan EPO-R, memfosforilasinya dan STAT5. Sel eritroid yang kehilangan lyn menurunkan kadar beberapa faktor-faktor kunci transkripsi eritroid, termasuk STAT5, GATA-1 dan EKLF. Walaupun efek EPO terhadap CFU-E dan progenitor eritroid imatur telah banyak menyita perhatian yang luas, EPO mungkin juga berperan dalam maturasi eritroid tahap akhir. Hal ini diketahui, bahwa saat ini EPO memengaruhi ekspresi molekul adhesif, seperti *podocalixin* pada sel target dan membantu meningkatkan kecepatan retikulosit keluar dari BM menuju aliran darah. Dapat disimpulkan bahwa sinyaling EPO melalui reseptor khususnya akan memicu multipel kaskade sinyaling intrasel untuk melindungi sel eritroid dari apoptosis, menginduksi lebih cepat diferensiasi lini, dan memicu pelepasan retikulosit.

Beberapa sitokin yang telah ditunjukkan bersinergi dengan EPO untuk memperkuat diferensiasi sel eritroid, termasuk IL6, IL3, dan *stem cell factor* (SCF, juga disebut kit ligand seperti pada sel mast faktor pertumbuhan). SCF berinteraksi dengan reseptornya, c-kit, yang diekspresikan oleh berbagai progenitor hematopoeitik termasuk BFU-E dan CFU-E. SCF bersinergi dengan EPO dan sitokin yang lain untuk memperluas jumlah dan ukuran koloni eritroid yang terbentuk secara in vitro dari BM, sebagai bagian dalam memacu proliferasi progenitor eritroid. SCF penting untuk pertumbuhan BFU-E in vitro saat tidak ada serum dan untuk mempercepat respon stres eritroid yang terjadi secara in vivo saat induksi anemia akut. Aksi ini terjadi melalui interaksi fisik dari c-kit dan EPO-R di dalam progenitor hematopoeitik mengarah pada aktivasi EPO melalui fosforilasi tirosin. Lebih jauh, sinyaling SCF melalui c-kit muncul untuk mempertahankan ekspresi protein EPO-R dan STAT5, jadi memperkuat kelangsungan hidup progenitor eritroid dalam responnya terhadap EPO.

E. Faktor Transkripsi dalam Diferensiasi Eritroid

Diferensiasi lini di dalam sistem hematopoietik dan akhir maturasi sel eritroid diatur sebagian oleh ekspresi diferensial dan kerja kombinasi dari faktor-faktor transkripsi. Faktor transkripsi khusus eritroid sentral adalah GATA-1, yang membentuk kompleks dengan berbagai protein lainnya untuk up-regulasi ekspresi gen khusus-eritroid. Lebih jauh, beberapa faktor transkripsi Kruppel-like, khususnya Erythroid Kruppel-like Factor (EKLF,KLF1), juga berperan penting dalam regulasi gen khusus-eritroid.

GATA-1 adalah anggota pendiri dari famili faktor transkripsi GATA yaitu protein zinc finger rangkap yang mengikat sebuah motif konsensus WGATAR yang muncul pada semua gen khusus-eritroid yang penting. Kerusakan GATA-1 mengarah pada penghentian maturasi sel eritroid primitif pada tahap proeritroblas yang mengakibatkan kematian embrionik. Hilangnya GATA-1 pada sel stem embrionik gagal berkontribusi dalam eritropoeisis definitif. Oleh karena itu, jelas bahwa GATA-1 berperan proliferasi prekursor eritroid imatur dan diferensiasi terminal. Domain fungsional yang berbeda dari GATA-1 diperlukan untuk aktivasi gen target pada sel eritroid primitif melawan definitif, hal ini mendukung bahwa kompleks transkripsional yang berbeda mungkin bentuk di dalam lini ini.

Penapisan terhadap protein yang mengikat GATA-2 mengarah pada identifikasi *Friend of GATA* (FOG-1), sebuah protein *zinc finger nuklear* yang mengikat zinc finger amino dari GATA-1. Jadi, FOG-1 melakukan mediasi interaksi GATA-1 dengan kompleks MeCP1 yang dilibatkan dalam mediasi kerja represif gen.

GATA-1 juga dapat berinteraksi secara fisik dengan CREB-binding Protein (CBP), sebuah protein nuklear yang terekspresi tersebar dimana-mana, dengan aktivitas *asetiltransferase histon*. Sejak *asetilasi histon* dikaitkan dengan regio aktif secara transkripsional dari kromatin, penemuan ini mendukung bahwa GATA-1 mungkin juga berfungsi untuk merekrut modifikator histon terhadap gen khusus-eritroid untuk memperkuat ekspresinya.

Selain itu ditemukan pula faktor transkripsi lainnya yaitu SCL, TAL1, Lbd1, ETO-2, Cdk9 dan LMO4. Juga ada famili dari faktor transkripsi Krupper-like (KLF2 dan KLF4). Oleh karena itu, identifikasi interaksi faktor-faktor transkripsi yang berkelanjutan akan memberikan pemahaman yang lebih baik lagi terhadap maturasi sel eritroid dan akan membantu meningkatnya konstruksi model kompleks dari jaringan pengatur genetik yang ada di dalam sel eritroid. Komposisi sederhana relatif dari seritrosit matur, kehilangan inti dan organel intrasel, dan mengandung hemoglobin sebagai protein predominan, hal ini membuat lini eritroid menjadi sebuah model menarik sebagai penelitian dari proteomik seluler.

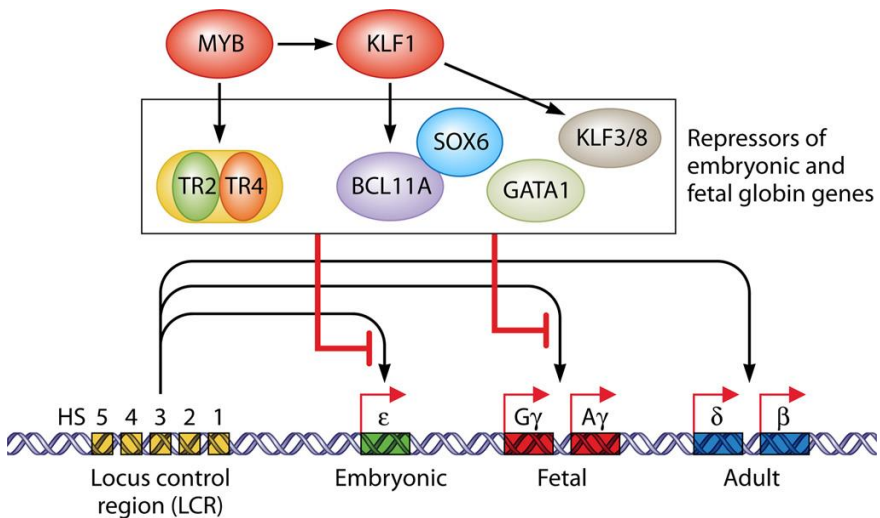
F. MicroRNA dan Eritropoeisis

MicroRNA adalah RNA non koding kecil endogen yang mempunyai target mRNA dengan cara memodulasi stabilitas atau kemampuannya hingga translasi. Ada lebih dari 100 microRNA yang berada di sel eritroid definitif. Namun hanya mir-451 yang terbanyak ditemukan dalam *upregulated* selama maturasi sel eritroid. Over ekspresi mir-451 menginduksi maturasi sel eritroleukemik tikus in vitro. Hal ini mendukung bahwa mir-451 berperan penting dalam maturasi sel eritroid. Mir-451 dan mir-144 saat ini teridentifikasi sebagai urutan pengatur GATA-1. Namun hanya mir-451 secara in vivo maupun in vitro terindikasi penting untuk eritropoeisis terminal dan maturasi lini hematopoietik, sehingga saat ini penelitian microRNA berpotensi penting dalam *downregulation* gena selama maturasi sel eritroid.

G. Regulasi Gena Globin

Molekul hemoglobin mengandung rantai globin yang berasal dari lokus gena globin α dan β . Klaster gena globin- β berperan sebagai sistem model prototipikal untuk penelitian sel jenis khusus dan regulasi gena developmental tahap khusus. Keseluruhan struktur lokus globin- β telah dijelaskan dan ditemukan mengandung berbagai gena globin β -like yang berdekatan dan sebuah *upstream Locus Control Region* (LCR) yang mengandung beberapa tempat hipersensitif DNase I. Tempat hipersensitif

ini masing-masing mengandung berbagai motif ikatan faktor transkripsi, termasuk untuk GATA1 dan NFE2. Locus globin- β manusia berisi 5 gena aktif (ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ dan β) yang berlokasi secara tandem dalam urutan ekspresi mereka selama perkembangan. Gena globin- ϵ diekspresikan selama awal embriogenesis, diikuti oleh gena globin- γ saat fetus, dan gena globin- δ dan β saat dewasa. Regulasi “globin switching” telah menjadi area aktif penelitian dalam 3 dekade terakhir.

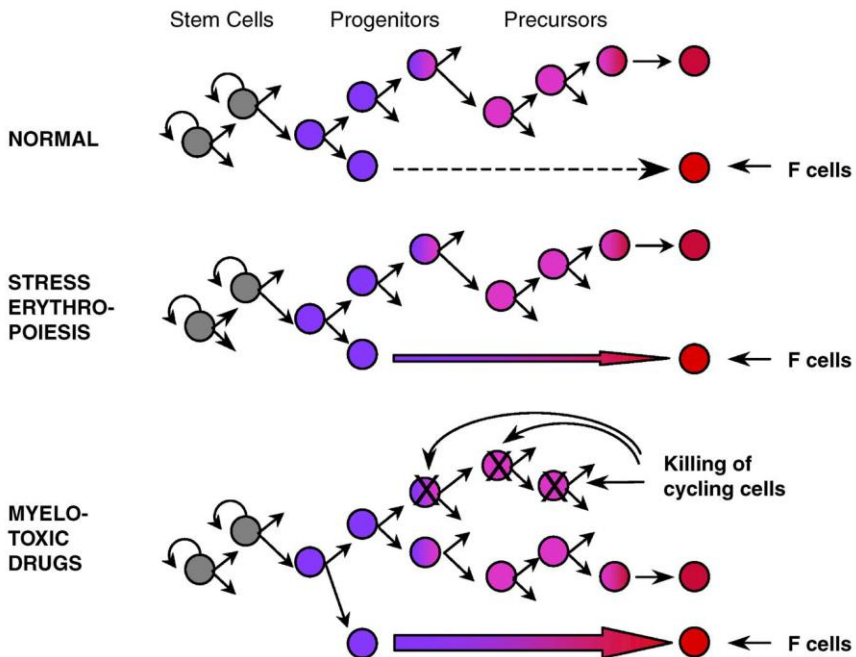


Gambar 3.1. Model pengaturan gen globin (M. Suzuki *et al.*, 2014)

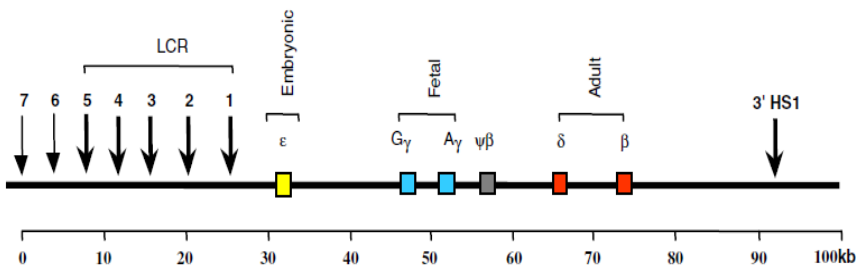
Locus *Control Region* (LCR) memfasilitasi ekspresi tingkat tinggi dari gena globin- β pada sel eritroid, hilangnya LCR pada tikus menyebabkan penurunan 100 kali lipat ekspresi gena globin. Oleh karena itu, LCR diketahui berfungsi untuk membawa regulator transkripsional di tempat yang sangat dekat dengan mesin transkripsional basal segera dalam *upstream* berbagai gena globin. Tempat hipersensitif individual di dalam LCR tampak mempunyai peran berbeda dalam remodeling kromatin dan kontrol *switching* gena globin. Tikus transgenik yang mempunyai 1 atau 2 transgena globin tandem *downstream* elemen LCR telah memberikan bukti dalam mendukung suatu model kompetisi dari regulasi gena globin- gena globin berkompetisi terhadap interaksi LCR

berdasarkan kedekatannya terhadap LCR. Di samping kompetisi, ada bukti lain, bahwa gena globin embrionik dan fetal diatur oleh *autonomous silencing*. Sebagai contoh, gena globin- ϵ embrionik dibungkam di dalam sel eritroid dewasa oleh reseptor nuklear orphan TR2 dan TR4.

Sel darah merah definitif fetal dan dewasa pada tikus, tidak seperti pada manusia, bahwa hanya diekspresikan globin dewasa saja ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$). Sebaliknya, sel darah merah primitifnya diekspresikan baik pada globin embrionik ($\beta H1$, ϵy , ζ) maupun dewasa. Perbedaan ekspresi gena globin di dalam sel eritroid definitif dan primitif, mendukung bahwa mekanisme regulatori di dalam lini yang berbeda juga berakibat berbeda pula. Analisis ekspresi gena globin pada sel eritroid primitif tikus murin menunjukkan bahwa gena globin- ζ dan $-\beta H1$ digantikan oleh gena globin- $\alpha 1$, $-\alpha 2$ dan gena globin- ϵy saat sel-sel ini matur di dalam aliran darah. Proses maturasional *switching* globin ini terjadi di dalam sel yang sama saat mereka menyempurnakan diferensiasi terminal mereka. Perubahan-perubahan dalam tingkatan transkrip globin ini dikaitkan dengan perubahan di dalam densitas RNA polimerase pada promoter mereka. Lebih jauh, gena globin- $\beta H1$ dan $-\epsilon y$ di dalam sel eritroid primitif berada di dalam domain hiperasitilasi besar tunggal, sehingga mendukung bahwa *switching* maturasional globin diatur oleh adanya faktor transkripsi yang berubah daripada aksesibilitas kromatin. Sebaliknya, gena globin embrionik pada sel eritroid definitif berada di luar domain hipersetilasi dan tidak diekspresikan di dalam sel eritroid definitif. Sel eritroid primitif pada embrio manusia, juga muncul sampai maturasional gena globin *switching*, dari globin- ζ menjadi globin- α dan globin- ϵ menjadi globin- γ , yang telah dijelaskan antara 5–7 minggu kehamilan. Sel eritroid definitif juga mengalami *switching* lebih halus maturasional dari globin- γ menjadi $-\beta$ saat differensiasi terminal. Pemahaman yang lebih baik mengenai mekanisme regulasi aktivasi dan *silencing* gena globin embrionik, fetal dan dewasa mempunyai kepentingan klinis yang sangat penting untuk penatalaksanaan dan merawat pasien dengan hemoglobinopathi, khususnya penyakit *sickle cell* dan sindrom talasemia.



Gambar 3.2. Model regulasi produksi hemoglobin F pada individu dewasa, yang diaplikasikan untuk *treatment hidroksiurea* pada penyakit sel sabit (Stamatoyannopoulos, 2005).



Gambar 3.3. Diagram lokus globin β manusia (Stamatoyannopoulos, 2005)

BAB 4

REGULASI ERITROPOEISIS

A. Pendahuluan

Eritropoeisis diatur oleh kombinasi dari faktor lingkungan mikro (*microenvironmental*) dan faktor pertumbuhan (*growth factor*) dalam rangka untuk meningkatkan kelangsungan hidup, proliferasi dan atau diferensiasi progenitor eritroid serta faktor nuklear pengatur transkripsi gena yang terlibat dalam penentuan fenotip eritroid. Eritropoeisis merupakan salah satu dari jalur terbaik dalam penelitian hematopoietik, baik pada tingkat molekuler maupun seluler, karena ada 4 alasan berikut ini: *pertama*, walaupun terdapat berbagai tahap eritropoeisis yang berbeda, namun semuanya dapat ditentukan oleh marker fenotip; *ke-2*, penyakit pada jaringan eritroid telah dikenali dengan baik dan saat ini ditemukan penyebab molekuler mereka; *ke-3*, diferensiasi eritroid terminal hanya tergantung pada faktor pertumbuhan eksogen yaitu eritropoeitin; *ke-4*, hampir sebagian besar faktor transkripsi yang mengatur eritropoeisis tidak diketahui. Apabila dapat memahami sistem yang kompleks ini, maka akan dapat mengetahui prinsip-prinsip biologi seluler dasar dan patofisiologi berbagai penyakit termasuk penyakit degeneratif dan kanker.

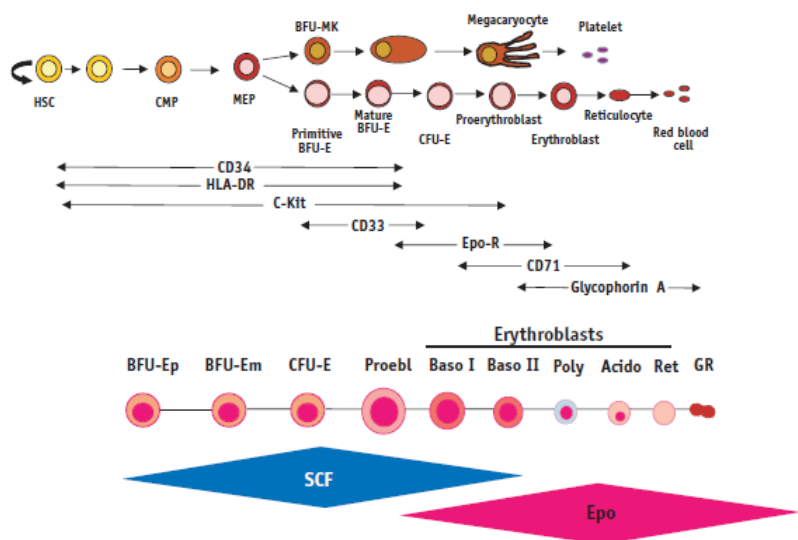
1. Gambaran Eritropoeisis Dewasa pada Tingkat Seluler

Produksi eritrosit merupakan *output* terbesar dari sistem hematopoietik dengan perkiraan laju produksinya sebanyak 2×10^{11} eritrosit per hari. Frekuensi progenitor makrofag-granulosit *committed* 3 kali lebih banyak dari progenitor eritroid *committed* di *Bone Marrow* (BM), namun dinetralkan oleh indeks proliferasi yang tinggi pada akhir tahap transisional perkembangan eritroid. Waktu yang diperlukan untuk siklus sel eritroblas diperkirakan 6-7 jam, yang unik pada orang dewasa di bawah kondisi *steady state* dan sangat menyerupai sel embrionik. Bagaimana diferensiasi dan aktivasi program ekspresi gena khusus dikoordinasi dengan pertumbuhan sel, ini masih perlu diklarifikasi, meskipun pengetahuan yang detail dari jaringan faktor transkripsi yang mengatur ekspresi gena lini telah diketahui. Progenitor eritroid *committed* dapat terdeteksi oleh kemampuannya membentuk koloni eritroid pada kultur in vitro di dalam metil-selulose, dan disebut *burst forming unit-erythroid* (BFU-E) dan *colony forming unit-erythroid* (CFU-E). BFU-E adalah sel hematopoietik yang hampir semuanya imatur dimana siap komit kepada lini eritroid. BFU-E hanya 0,03% dari sel hematopoietik BM dan hanya 40% yang menjalani siklus, sedangkan CFU-E sebanyak 0,3% dari sel hematopoietik BM dan sebagian besar dari mereka aktif menjalani siklus. Proses seluler yang kontinyu terjadi dari awal BFU-E sampai akhir CFU-E tetapi kebutuhan faktor pertumbuhan untuk BFU-E dan CFU-E sangat berbeda. BFU-E membutuhkan *stem cell factor* (SCF) dan beberapa faktor pertumbuhan hematopoietik untuk pertumbuhan dan diferensiasi mereka, sebaliknya CFU-E sangat bergantung dengan eritropoietin (Epo). CFU-E akan berdiferensiasi pertama kali menjadi sel lini eritrosit yaitu pro-eritroblas, kemudian berdiferensiasi menjadi eritroblas basofilik, eritroblas polikromatofilik, dan eritroblas asidofilik yang merupakan sel berinti terakhir dari lini eritrosit mamalia. E nukleasi eritroblas asidofilik terus tumbuh menjadi retikulosit yang matur dan akhirnya menjadi sel darah merah. Proses ini terjadi di dalam *erythroblast*

blood island pada BM, dimana makrofag dikelilingi eritroblas pada semua tahap maturasi.

2. **Gambaran Eritropoeisis Dewasa pada Tingkat Transkripsional**

Selama diferensiasi eritroid, pola ekspresi gena khusus-eritroid mengikuti waktu yang presisi dimana sebagian besar diatur saat tingkat transkripsional. Penelitian pada faktor-faktor *acting* baik *cis* maupun *trans* yang mengatur gena khusus-eritroid, bersama-sama dengan gangguan eritropoeisis pada penyakit leukemia dan penyakit eritroid hereditier dan di dalam model hewan coba, telah meningkatkan pengetahuan tentang regulasi transkripsional dari eritropoeisis. Penemuan yang paling menarik dari penelitian ini adalah pentingnya interaksi diantara protein di dalam regulasi transkripsional dan hubungannya dengan leukaemogenesis.



Gambar 4.1. Proses eritropoeisis (Vandekerckhove *et al.*, 2009)

a. Sekuens Cis-acting Terlibat di Dalam Regulasi Gena Khusus-eritroid

Analisis fungsional dari gena khusus-eritroid dan megakaryositik telah mengungkap sekuens yang penting yaitu 5' A/T GATA 3', saat ini disebut motif GATA, di dalam lini ekspresi khusus gena-gena ini. sekuens ini terkait dengan sekuens mirip-GT atau CACC pada gena khusus-eritroid, meskipun ini terkait dengan tempat binding Ets pada gena khusus megakaryositik. Saat ini, kedua asosiasi tersebut dipercaya sebagai *hallmarks erythroid* atau regio regulatori khusus-megakaryositik. Motif lainnya, 5' TGAC/GTCAGC 3', juga ditemukan di dalam inti regio promotor atau *enhancer* gena yang mengekspresi eritroid dan ini penting untuk efisien transkripsi gena khusus-eritroid yang mengandung motif ini. Tidak ada motif lainnya yang ditemukan secara berulang pada sekuens regulatori dari gena khusus eritroid atau pun khusus megakaryositik. Tiap-tiap motif *binding*, diidentifikasi sebagai sekuens berulang dari gena eritroid atau megakaryositik, famili dari faktor nuklear yang mengenali motif yang telah ditandai. Hal yang penting adalah tidak ada faktor *trans-acting* yang teridentifikasi mempunyai ekspresi terbatas terhadap lini eritroid atau megakaryositik, yang mengindikasikan bahwa spesifisitas ekspresi gena di dalam eritropoeisis dan megakaryopoeisis, seperti pada lini hematopoeitik yang lain, ditentukan oleh kombinasi khusus faktor-faktor *trans-acting* lebih dari faktor-faktor khusus lini.

b. Faktor *Trans-acting* yang Mengatur Ekspresi Gena Khusus-eritroid

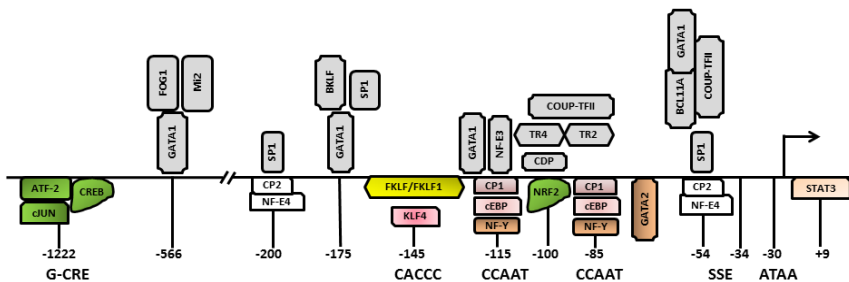
1) GATA-1 dan GATA-2

Famili faktor transkripsi GATA terdiri 6 faktor transkripsi yaitu GATA-1 sampai -6, yang dapat mengikat sekuens konsensus 5'A/T GATA A/G 3'. Protein ini terdiri 2 motif *conserved zinc fingers* (Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cys) spesifik terhadap famili GATA. Terminal karboksil *zinc finger* bertanggung jawab terhadap stabilisasi interaksi DNA/GATA.

Regio luar *zinc finger*, konservasi di antara faktor GATA adalah lemah tetapi setiap faktor dikonservasi di antara spesies. Dalam hal eritropoeisis, hanya GATA-1 dan GATA-2 yang menunjukkan peran penting baik dalam determinasi eritrositik maupun dalam diferensiasi terminal.

Selama eritropoeisis, ada sekuensial namun *overlapping* ekspresi GATA-1 dan GATA-2. Gata-2 diekspresikan awal lini eritroid dan ekspresinya menurun seiring dengan meningkatnya ekspresi GATA-1. Beberapa penelitian melaporkan bahwa GATA-2 terlibat dalam proliferasi progenitor eritroid *committed* dan *non-committed*, sebaliknya GATA-1 adalah kritikal untuk maturasi terminal sel eritroid. Pada tingkat molekuler, cross talk antara GATA-1 dan GATA-2 terjadi pada tingkat transkripsional, GATA-2 menghambat transkripsi gena GATA-1 dan GATA-1 mempunyai efek sama terhadap gena GATA-2. Jaringan regulatori antara GATA-1 dan GATA-2 selama eritropoeisis hasil di dalam substitusi sekuensial GATA-2 oleh GATA-1 di dalam regio regulatori beberapa gena spesifik eritroid. Ketiadaan GATA-1 menimbulkan kematian sel secara apoptosis yaitu dengan cara memblokade diferensiasi eritroid pada tahap pro-eritroblas. Aktivitas GATA-1 selama eritropoeisis diatur ketat saat tingkat transkripsi, translasi dan pasca translasi. GATA-1 mengatur secara positif transkripsi dari gena melalui tempat GATA yang berada di dalam regio promoter dan enhancer dari gena GATA-1. GATA-1 memiliki sebuah tempat inisiasi translasi alternatif yaitu pada methionin 84 dan protein GATA-1 yang dihasilkan tidak berfungsi secara penuh, seperti saat protein ini tidak dapat mengarahkan diferensiasi eritroid ketika terekspresi pada kadar normal. Aktivitas dan kadar GATA-1 harus diatur ketat untuk mencegah akumulasi kontinyu dari GATA-1 di dalam sel, yang mana mungkin memblokade diferensiasi eritroid secara sempurna.

Aktivitas GATA-1 diatur dengan cara asetilasi. Asetilasi GATA-1 oleh P300 atau protein CREB-binding tampaknya memperkuat asosiasi diri GATA-1 dan selanjutnya aktivitas transkripsionalnya. Demikian juga, mutasi tempat utama asetilasi mengeliminasi kemampuan GATA-1 untuk mengikat semua tempat target selular yang diuji in vivo, termasuk gena yang secara normal diaktivasi dan direpresi oleh GATA-1 selama diferensiasi eritroid. Selain itu, GATA-1 terasetilasi ditargetkan untuk degradasi via jalur *ubiquitin/proteosome*. Asetilasi secara positif merupakan sinyal *ubiquitinasi*, hal ini mendukung bahwa aktivasi oleh asetilasi secara simultan menandai GATA-1 untuk degradasi. Asetilasi sendirian tidak cukup untuk memberi sinyal degradasi, tetapi MAPK fosforilasi GATA-1 bekerja sama dengan asetilasi untuk *ubiquitinasi* yang efisien.



Gambar 4.2. Faktor transkripsi pada promotor gena globin- γ (Makala *et al.*, 2014)

Penelitian biokimia mengungkap bahwa GATA-1 difosforilasi pada 6 residu serin pada sel eritroleukemia tikus yang tidak terdiferensiasi. Akt secara langsung memfosforilasi GATA-1 pada serin 310 in vitro maupun in vivo dan memperkuat aktivitasnya pada sel eritroid. GATA-1 ser³¹⁰ fosforilasi bukan esensial untuk keseluruhan ekspresi gena eritroid (*major late erythroid genes*) tetapi ia secara absolut diperlukan untuk subset gena seperti gena TIMP-1. Akhirnya,

aktivitas GATA-1 dalam beberapa lingkungan diatur oleh pemotongan yang dimediasi-caspase selama diferensiasi eritroid terminal.

Aktivitas GATA-1 juga tergantung pada interaksi protein-protein. Beberapa protein yang telah diungkap mempunyai interaksi secara fisik dengan GATA-1 di antaranya adalah FOG-1, LMO-2, TAL-1, Gfi-1b, PU-1, ZBP-89 dan CBP. Di antara kesemuanya, ternyata fokus pada interaksi GATA-1/FOG-1. FOG-1 (*Friends of GATA-1*) adalah protein *multiple zinc finger*. Fungsi berbeda dari GATA-1/FOG-1 dimediasi oleh 2 kompleks nuklear yang berbeda, yaitu yang pertama, kompleks GATA-1/FOG-1/MeCP1 melakukan represi transkripsi; sisi yang lain, GATA-1/FOG-1, melakukan link untuk aktivasi transkripsi. Keberadaan dari dua kompleks yang berbeda ini dengan berlawanan dalam aktivitas transkripsional menjelaskan bahwa GATA-1 secara simultan mengaktivasi dan merepresi gena target selama eritropoeisis. Namun demikian, timbul pertanyaan, bagaimana menjelaskan bahwa beberapa gena berlabuh pada ikatan GATA lalu diaktivasi, sedangkan tempat berlabuh yang lain masih terbuka saat direpresi.

2) TAL-1, LMO-2, LMO-4, EKLF, NFE-2, Gfi-1B, ZBP-89 dan Id2

Pada tingkat molekuler, TAL-1 bekerja melalui mekanisme dependen dan independen *binding*-DNA dan dapat mengaktivasi maupun merepresi transkripsi. Pada sel eritroid awal, kompleks TAL-1 bergabung dengan regio regulatori spesifik eritroid seperti promotor GPA atau HS-26 dari lokus globin- α .

LMO-2, suatu faktor nuklear domain LIM, telah teridentifikasi terlibat dalam kasus jaang dari T-ALL manusia. TAL-1 telah diungkap menginduksi diferensiasi eritroid, sedangkan LMO-2 muncul untuk mensupres eritropoeisis fetal. Yang menarik, baik TAL-1 maupun LMO-2 mampu

menekan diferensiasi myeloid parsial, mempunyai implikasi bahwa mereka mengaktifkan diferensiasi eritroid di dalam progenitor BM *committed*.

EKLF terikat sangat kuat terhadap tapak CACCC yang ditemukan di promotor gena globin- β manusia. Mutasi dari sekuens ini pada manusia ditemukan terkait dengan talasemia- β . Di samping perannya sebagai aktivasi gena globin dan *switch* ekspresi gena globin fetal ke dewasa, EKLF juga diperlukan untuk diferensiasi eritroid tahap akhir–tetapi tidak untuk proliferasi–dan secara langsung mengatur gena yang terlibat di dalam metabolisme hemoglobin dan stabilitas membran.

NFE-2 adalah anggota famili *leucine-zipper* dari aktivator transkripsional dan mengenali sekuens konsensus TGCTGA(G/C)TCA yang berlokasi di dalam sekuens regulatori dari sejumlah gena spesifik eritroid, termasuk LCR dari kedua gena globin- α dan - β .

GF1-1B (*growth factor independence 1B*) adalah famili Gfi repressor transkripsional yang mengandung domain SNAG yang melakukan mediasi represi transkripsional dan domain zinc finger pada terminal karboksil untuk DNA binding ke sekuens rekognisi TAAATC(A/T)GCA. Kerusakan Gfi-1B berakibat kematian janin terkait dengan kegagalan pembentukan sel darah merah memperkuat ekspresi Gfi-1B pada sel progenitor eritroid awal menginduksi ekspansi progenitor eritroid awal tetapi meng-apoptosis masif prekursor eritroid berikutnya, mereduksi ekspresi Bclxl dengan signifikan, meskipun tanpa sekuens konsensus yang resmi ditemukan pada promotor gena Bclxl. Aktivasi GATA-1, awalnya menginduksi Gfi-1B sementara/transien, selanjutnya diikuti induksi Bclxl selama maturasi eritroid pada sel G1ER. Kadar konstan GATA-1 mengikat promotor Bclxl secara keseluruhan selama periode induksi, meskipun Gfi-1B secara transien terkait dengan promotor pada awal fase. Ekspresi yang terus menerus dari Gfi-1B menghapuskan ekspresi Bclxl

yang diinduksi GATA-1. GATA-1 terikat pada motif GATT tidak resmi dari promotor Bclxl untuk *trans-activation*. Ekspresi Gfi-1B pada kadar yang meningkat direkrut ke promotor Bclxl melalui keterkaitannya dengan GATA-1, melakukan supresi transkripsi Bclxl. Namun demikian, *down regulation* Gfi-1B pada akhir fase maturasi eritroid penting untuk induksi Bclxl. Secara keseluruhan, Gfi-1B memainkan peran yang kompleks di dalam *eritropoeisis*. Pada progenitor eritroid imatur, melalui domain zinc finger, Gfi-1B akan melakukan *trans-activate* gena target yang berimplikasi pada proliferasi sel untuk ekspansi eritroblas. Pada onset diferensiasi, Gfi-1B akan mengatur gena yang direpresi untuk induksi diferensiasi.

Faktor transkripsi *zinc finger* jenis Kruppel ZBP-89 adalah komponen kompleks multiprotein yang menyertai GATA-1 dan kofaktor esensialnya FOG-1. Gata-1 dan ZBP-89 merupakan *co-occupy* elemen *cis-regulatory* dari gena spesifik eritroid tertentu, termasuk sebagai *enhancer* dari gena GATA-1 itu sendiri.

Anggota famili dari Inhibitor of DNA Binding (Id) adalah kunci regulator proliferasi dan diferensiasi seluler. Aktivitas ini terkait dengan kemampuan protein Id menjadi protein E antagonis dan faktor transkripsi lainnya. Id2 secara instrinsik mengatur perkembangan eritroid melalui interaksi dengan protein target yang berbeda. Overekspresi Id2 memperkuat perkembangan eritroid, meskipun penurunan kadar ID2 mengganggu perkembangan eritroid normal.

B. Regulasi Eritropoeisis

Seperti yang telah dibahas, bahwa proses pembuatan sel darah merah merupakan orkestrasi dari jaringan kompleks faktor-faktor transkripsi. Di antaranya bahwa GATA-1 memainkan peran kritikal dalam mengatur gena yang terlibat tidak hanya pada diferensiasi eritroid, namun juga pada siklus sel, dan kelangsungan hidup sel. Program

diferensiasi ini harus diatur secara positif dan negatif untuk memastikan keberlanjutan tetapi pengendalian produksi sel darah merah dalam menjaga oksigen harus dipastikan tetap berada pada tingkat fisiologis di jaringan perifer.

1. Peran Sel Stromal pada Regulasi Eritropoeisis

Pada manusia dewasa, eritropoeisis definitif terjadi secara esensial tetapi tidak eksklusif di dalam lingkungan mikro BM. Pada tingkat ini, sel stromal dan sel imun berperan penting dalam menjaga faktor-faktor yang meliputi integrin dan atau ligan serta sitokin. Faktor-faktor ini yang mampu menginduksi proliferasi dan kelangsungan hidup, memungkinkan program diferensiasi progenitor eritroid berperan di sana. Pulau eritroblastik, suatu ceruk khusus prekursor proliferasi, diferensiasi dan enuklease, tersusun dari eritroblas yang mengelilingi makrofag sebagai pusatnya. Pulau eritroid berlokasi tidak hanya pada regio terdekat terhadap sinusoid BM, tetapi juga regio sumsum secara keseluruhan. Eritroblas mengekspresi molekul adhesi yang melakukan mediasi baik interaksi eritroblas/eritroblas maupun eritroblas/makrofag. Emp (*erythroblast macrophage protein*) berperan penting dalam eritropoeisis. Interaksi antara integrin VLA-4/ICAM-4 dan VCAM-1/ αv antara eritroblas dan makrofag sentral berkontribusi terhadap integritas pulau. Suatu yang memperkuat proliferasi eritroblas terkait terhadap kontak dengan makrofag telah menunjukkan terjadi pada semua konsentrasi Epo yang dihasilkan dari pengurangan waktu transit pada fase G0/G1 siklus sel dengan mekanisme yang berbeda dari efek anti-apoptotic Epo.

Penelitian saat ini, mengungkap bahwa ada peran dari DNase II di dalam maturasi dan khususnya dalam proses enukleasi yang terjadi pada tahap sangat akhir dari maturasi eritroid. Tikus dengan defisiensi DNase mengalami kematian akibat anemia berat dan menunjukkan tanda penurunan sel darah merah di sirkulasi yang terkait dengan adanya eritroblas berinti definitif di dalam sirkulasi, sebuah jenis sel yang harusnya secara normal hanya ada di BM dan

tidak berada di dalam sirkulasi darah perifer. Makrofag sentral berada dalam pulau eritroblastik mungkin mewakili sumber DNase dan kemudian bertanggung jawab terhadap penelanan inti yang dipaksa keluar melalui pengenalan serin fosfatidil nukleus yang terbuka saat mereka kerjakan untuk sel apoptotik.

Abnormalitas diferensiasi makrofag dapat mengarah gangguan fungsi pulau eritroid dan berpengaruh terhadap diferensiasi eritroid. Protein Rb, suatu regulator diferensiasi makrofag adalah penting untuk maturasi eritroid. Gena Rb yang menjadi target kerusakan, mengarah terjadinya kematian tikus pada embrionik karena anemia yang disebabkan kegagalan enukleasi. Protein Rb berperan juga sebagai intrinsik sel di dalam eritropoeisis dimediasi oleh proses kopling dari biogenesis mitokondrial sampai keluar dari siklus sel. Ketidaannya menimbulkan eritropoeisis menjadi tidak efektif, dengan cara memblok diferensiasi pada saat transisi dari awal sampai akhir eritroblas.

2. Maturasi dan E nukleasi Terminal

Sel eritroid yang berjalan menuju akhir diferensiasi menunjukkan konkuren *up-regulation* transkripsional dari Bclxl anti-apoptotik dan BH3 pro-apoptotik hanya mirip faktor Nix. Jadi nix merupakan regulator negatif eritropoeisis melalui modulasi apoptosis. Nix juga diperlukan untuk klirens mitokondrial selektif selama maturasi retikulosit, dengan cara memicu inkorporasi mitokondria masuk autofagosom diikuti oleh maturasi autofagosom.

Penelitian terbaru mengungkap adanya peran penting dari Rac GTPase dan protein efekturnya (mDIA2) dalam enukleasi eritroblas fetal yaitu dengan memengaruhi pembentukan cincin aktin kontraktile pada akhir dari tahap eritroblas. Rac GTPase berada pada keadaan yang dinamik *on* dan *off* dan setiap inhibisi atau ekseksif aktivasi dari Rac GTPase mengarah pada inhibisi enukleasi.

C. Regulasi Positif Eritropoeisis pada Tingkat Seluler

Berbagai komponen diperlukan untuk memastikan produksi sel darah merah secara konstan yaitu meliputi zat besi untuk sintesis hemoglobin, asam folat dan vitamin B12 untuk sintesis DNA. Insulin *growth factor* 1 bersinergi dengan sitokin lainnya untuk meningkatkan proliferasi progenitor eritroid awal dan mungkin mengkoordinasi produksi sel darah merah selama perkembangan dan peningkatan massa tubuh. Hormon steroid melalui reseptor nuklernya mungkin juga memperkuat produksi sel darah merah tetapi tak satupun dari molekul ini terlibat dalam regulasi eritropoeisis yang jelas. Namun demikian, produksi androgen mungkin menjelaskan mengapa hematokrit lebih tinggi pada laki-laki dibanding perempuan. Mirip dengan di atas, glukokortikoid mungkin berkontribusi terhadap peningkatan produksi eritroid selama stress eritropoeisis. Ada juga bukti peran dari sistem renin angiotensin dalam regulasi eritropoeisis. Angiotensin II menstimulasi proliferasi progenitor eritroid normal dan kekurangan enzim konverting-angiotensin (ACE) mungkin menyebabkan anemia. Angiotensin II berperan dalam regulasi produksi EPO oleh ginjal, konsisten dengan efek terapeutik inhibitor ACE pada eritrositosis sekunder pasca transplantasi ginjal.

Sitokin berperan penting dalam regulasi positif eritropoeisis. Mereka bekerja pada progenitor eritroid dan prekursor pada semua tahap maturasi. (BFU-E, CFU-E dan prekursor eritroid) untuk mencegah apoptosis, menginduksi proliferasi dan meningkatkan atau menghambat/menunda diferensiasi. Penundaan dalam diferensiasi mungkin berperan penting dalam memungkinkan *self-renewal* dan ekspansi progenitor eritroid sebelum maturasi terminal, sehingga menyebabkan produksi sel darah merah meningkat. Sitokin sebagian besar diproduksi oleh sel stromal dan sel endotelial BM, di dalam lingkungan BM, tetapi juga oleh sel imun termasuk makrofag dan limfosit, serta oleh organ di luar BM, khususnya liver dan ginjal yang berturut-turut menghasilkan thrombopoietin (TPO) dan Epo.

Beberapa sitokin yang telah dijelaskan mempunyai aktivitas *burst-promoting*, yaitu: mereka bekerja pada progenitor eritroid awal untuk meningkatkan jumlah BFU-E, ini meliputi TPO, IL-3, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, GM-CSF. Namun demikian, tidak satupun dari mereka yang berperan kritikal dalam perkembangan eritroid *in vivo*. Pendekatan biokimiawi dan genetik, mengungkap bahwa, sebaliknya, SCF (*Stem Cell Factor*) dan Epo, yang bekerja pada reseptornya masing-masing c-Kit dan Epo-R, secara mutlak diperlukan untuk produksi sel eritroid. Tikus dengan mutasi gena SCF, atau pada gena reseptornya c-Kit berkembang menjadi anemia berat sebagai ciri eritropoeisis yang tertekan. Tikus dengan *Knock Out* pada Epo dan Epo-R mati karena gagal pembentukan eritrosit hepar saat fetal.

1. SCF dan c-Kit

Stem Cell Factor (SCF) adalah sitokin yang diproduksi oleh sel stromal, SCF berinteraksi dengan reseptornya (c-Kit). C-Kit diekspresikan sebagian besar pada progenitor hematopoietik CD34⁺ dan ekspresinya dipertahankan pada kadar tinggi selama tahap diferensiasi dari BFU-E sampai CFU-E; pada tahap akhir diferensiasi selama maturasi CFU-E, ekspresi c-Kit berkurang secara progresif dan hilang eritroblas polikromatofilik dan ortokromatik. Jadi, SCF berpengaruh pada sel eritroid sebagian besar selama awal dan akhir tahap diferensiasi progenitor eritroid, dan mungkin juga bekerja pada prekursor eritroid imatur.

Ada 2 isoform dari SCF yang dikode saat *splicing* mRNA, yaitu bentuk solubel dan terkait-membran. Pentingnya, tikus mutan yang kekurangan SCF terkait-membran, tetapi mempunyai bentuk solubel yang normal, ternyata menderita anemia berat. Meskipun belum diketahui secara jelas tentang perbedaan ini, mungkin ini berhubungan dengan kinetika aktivasi c-Kit. Aktivasi c-Kit oleh SCF terkait-membran mengakibatkan internalisasi dan degradasi yang lambat dan dalam hal peningkatan aktivasi ketika dibandingkan dengan aktivasi yang diinduksi bentuk solubel.

Pada tingkat seluler, SCF menginduksi peningkatan proliferasi dan kelangsungan hidup sel progenitor dan prekursor eritroid awal hingga CFU-E, dan tahap proeritroblas saat maturasi. Pada saat yang sama, SCF menunda diferensiasi dan maturasi eritroid. Efek ini memungkinkan *self-renewal* dari progenitor dan prekursor eritroid awal sebelum mereka mencapai tahap dimana sel tidak mampu lebih lama membelah lagi. Pada akhir tahap maturasi, peran utamanya adalah untuk mencegah apoptosis dan untuk menginduksi proliferasi, dan ini bersinergi dengan Epo.

Saat ini, tidak ada bukti bahwa produksi SCF diatur oleh kebutuhan terhadap sel darah merah dan oksigenasi di dalam BM. Sintesis CSF mungkin lebih konstitutif, meskipun tidak ada bukti, kadar SCF yang tersedia sangat mungkin tergantung pada konsumsi dari sejumlah protein c-Kit yang terekspresi pada prekursor eritroid. Faktanya, sekarang disetujui bahwa regulasi eritropoeisis terjadi pada tingkat CFU-E tergantung secara esensial pada kadar Epo yang tersedia.

2. Eritropoeitin dan Reseptor Eritropoeitin

Produksi eritrosit harian, meskipun diatur sangat ketat, namun kehilangan darah akibat perdarahan atau hemolisis terkait dengan peningkatan produksi retikulosit di dalam beberapa hari. Saat peningkatan produksi retikulosit dalam rangka menormalkan jumlah eritrosit di sirkulasi, laju pembentukan retikulosit baru malah menurun. Hal ini untuk menghindari terjadinya polisitemia. Epo bertanggung jawab untuk menjaga jumlah eritrosit berada pada keadaan homeostasis dalam rangka oksigenasi jaringan. Oleh karena itu, ada hubungan terbalik antara eritropoeisis dengan transpor oksigen oleh darah. Rentang normal konsentrasi Epo serum relatif rendah (5-30 mU/mL) dan pada kondisi fisiologis, penurunan linier terhadap hematokrit akibat peningkatan eksponensial pada Epo serum. Ginjal sebagai tempat utama produksi Epo untuk eritropoeisis definitif. Epo juga dihasilkan di liver orang dewasa, merupakan organ penghasil Epo yang utama selama eritropoeisis fetal yang saat

itu dimana eritropoeisis berlokasi di liver fetal. Jumlah sel yang menghasilkan Epo meningkat secara eksponensial dengan penurunan linier terhadap hematokrit. Pada liver orang dewasa, sel penghasil Epo adalah sel hepatosit dan sel intersisial, jumlah mereka meningkat dramatis seiring penurunan hematokrit. *Hypoxia Inducible Factor* (HIF)-1 α diinduksi oleh hipoksia dan berinteraksi dengan promotor gen EPO untuk membentuk kompleks faktor transkripsi yang secara positif mengatur ekspresi gen EPO. Kecepatan induksi HIF-1 α oleh hipoksia dan hilangnya segera setelah teratasinya hipoksia adalah konsekuensi dari kecepatan *ubiquitinasi* oleh kompleks yang melibatkan protein von Hippel-Lindau, dan kemudian degradasi oleh proteosom. Ikatan HIF-1 α oleh protein von Hippel-Lindau tergantung pada hidroksilasi 2 prolin khusus oleh prolin hidroksilase. Di dalam kompleks transkripsional, HIF-1 α dihidroksilasi pada residu asparagin oleh asparaginase hidroksilase, yang sebagai konsekuensinya adalah menghambat HIF-1 α terikat pada protein lain dari kompleks faktor transkripsi. Jadi, sel-sel normal mempunyai oksigen yang cukup untuk hidroksilasi HIF-1 α yang mengarah pada degradasi dan inaktivasi cepat, sedangkan sel hipoksik tidak mempunyai cukup oksigen untuk reaksi ini, HIF-1 α nonhidroksilasi tetap hidup dan melakukan mediasi transkripsi dari gen EPO. Dengan menarget gen EPO bahwa Epo tidak penting pada tahap eritropoeisis paling awal, termasuk BFU-E, demikian juga, pemberian Epo *in vivo* mempunyai pengaruh kecil terhadap jumlah BFU-E. Sebaliknya, pemberian EPO meningkatkan jumlah CFU-E dan prekursor eritroid secara dramatis sampai pada tahap eritroblas basofilik, terutama dengan cara mencegah apoptosis mereka. Progenitor dan prekursor eritroid menunjukkan sensitivitas Epo dengan rentang yang luas. Rentang sensitivitas Epo ini sesuai dengan rentang konsentrasi Epo serum eksponensial ditemukan pada keadaan anemia dan normal. Saat konsentrasi Epo rendah, hanya progenitor dan prekursor hipersensitif saja yang bisa hidup.

Namun demikian, regulasi apoptosis dari sel progenitor dan prekursor eritroid selama perkembangan mereka dari ketergantungan Epo, jelas cepat namun populasi eritrosit dalam respon terhadap hipoksia, hiperoksia dan anemia diatur secara ketat tanpa memerlukan beberapa pengaruh Epo pada siklus dan diferensiasi sel.

BAB 5

STRUKTUR NORMAL DAN REGULASI KLASTER GENA GLOBIN MANUSIA

A. Pendahuluan

Gena-gena yang mengkode rantai globin yang berbeda dari hemoglobin adalah anggota famili gena kuno. Pada bab ini, akan dijelaskan gambaran struktural dari gena globin, dengan perhatian khusus pada sekuens yang diperlukan untuk regulasi ekspresi gena yang tepat.

B. Struktur dan Fungsi

Kebutuhan oksigen yang bervariasi selama kehidupan saat embrionik, fetal dan dewasa dicerminkan dalam sintesis hemoglobin dengan struktur yang berbeda-beda pada masing-masing tahap perkembangan manusia. Namun demikian, mereka semua mempunyai struktur tetramerik umumnya sama, terdiri atas 2 pasang rantai globin yang berbeda, masing-masing menempel pada satu molekul hem. Hemoglobin fetal dan dewasa mempunyai rantai- α berkombinasi dengan rantai- β (HbA, $\alpha_2\beta_2$), dengan rantai- δ (HbA₂, $\alpha_2\delta_2$) dan rantai- γ (Hb F, $\alpha_2\gamma_2$). Pada saat embrio, rantai mirip- α disebut rantai- ζ yang kombinasi dengan rantai- γ menghasilkan Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$), atau kombinasi dengan rantai- ϵ membentuk Hb Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$), kadang-kadang rantai- α dan - ϵ membentuk Hb Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$). Hemoglobin fetal adalah heterogen, ada 2 varietas rantai- γ yang berbeda hanya pada komposisi asam amino pada posisi 136, yang ditempati glisin atau alanin, rantai- γ yang mengandung

glisin pada posisi ini disebut rantai $^G\gamma$, sedangkan bila ditempati alanin disebut rantai $^A\gamma$.

Sintesis tetramer hemoglobin terdiri atas 2 pasang rantai globin yang tidak sama adalah mutlak penting/esensial untuk fungsi hemoglobin sebagai pengangkut oksigen. Kurva dissosiasi oksigen berbentuk sigmoid klasikal, yang mencerminkan sifat alosterik dari molekul hemoglobin, memastikan bahwa, pada saat tekanan oksigen tinggi di paru-paru, oksigen siap diambil dan akhirnya kemudian dilepaskan secara efektif di jaringan saat menemui tekanan di sana lebih rendah. Bentuk kurva ini sungguh berbeda pada myoglobin, suatu molekul yang terdiri atas rantai globin tunggal dengan terlekat hem padanya, mirip hemoglobin abnormal yaitu rantai yang mirip homotetramer, mempunyai kurva disosiasi hiperbola.

Sel darah merah fetal mempunyai afinitas terhadap oksigen lebih kuat dibandingkan sel darah merah pada dewasa, meskipun hemoglobin fetal yang dimurnikan mempunyai kurva dissosiasi oksigen mirip dengan hemoglobin dewasa. Perbedaan ini menyesuaikan terhadap kebutuhan oksigen fetus, tercermin dari kemampuan relatif dari Hb F berinteraksi dengan 2,3-DPG dibanding Hb A. Hal ini disebabkan rantai- γ dari Hb F kekurangan tempat ikatan khusus terhadap 2,3-DPG.

Singkat cerita, transpor oksigen dapat dimodifikasi oleh berbagai fitur-fitur adaptif pada sel darah merah yang meliputi interaksi antara molekul hem yang berbeda, efek CO_2 dan perbedaan afinitas terhadap 2,3-DPG. Perubahan-perubahan ini, bersama-sama dengan lebih banyak mekanisme umum yang melibatkan sistem kardiovaskular, menyediakan basis utama untuk adaptasi fisiologis terhadap anemia.

C. Kontrol Genetik Hemoglobin

Rantai globin mirip- α dan mirip- β adalah produk dari 2 famili gena yang berbeda dan ditemukan dalam famili gena yang berbeda pula. Gena-gena globin mirip- β membentuk sebuah klaster yang terhubung satu dengan lainnya pada kromosom 11, menyebar luas kira-kira 60kb (1000 basa nukleotid). Gena-gena yang berbeda tersebut dalam klaster ini tersusunurut dari 5'- ϵ - $^G\gamma$ - $^A\gamma$ - $\psi\beta$ - δ - β -3'. Gena-gena globin mirip- α juga

membentuk klaster yang terhubung satu dengan lainnya pada kromosom 16, dalam urutan 5'ζ-ψζ-ψα₁-α₂-α₁-3'. Gena ψβ, ψζ, dan ψα adalah pseudogena, yang mana mereka mempunyai sekuens yang kuat dan homolog dengan gena β, ζ, α tetapi mengandung sejumlah perbedaan bahwa mencegahnya dari mengarahkan sintesis dari berbagai produk. Mereka mencerminkan sisa-sisa dari gena yang fungsional pada tahap paling awal dari evolusi manusia.

Struktur gena globin manusia, yang pokok adalah mirip dengan hampir semua gena mamalia. Mereka tersusun dari untai nukleotida yang panjang dibagi ke dalam regio koding, atau ekson, dan regio sisipan non-koding yang sering disebut *intervening sequences* (IVS) atau intron. Gena globin mirip-β berisi 2 intron, salah satunya 122–130 pasangan basa antara kodon 30 dan 31 dan yang lainnya 850–900 pasangan basa antara kodon 104 dan 105 (kodon ekson sejumlah urutan dari 5' ke akhir gena 3', contohnya dari kiri ke kanan). Mirip dengan itu, meskipun lebih kecil, intron yang ditemukan dalam gena globin-α dan -ζ. Intron dan ekson ini, bersama-sama dengan sekuens non-koding yang pendek pada 5' dan 3' akhiran gena, mewakili regio fungsional dari gena-gena khusus. Namun demikian, ada sekuens regulatori penting sangat ekstrim yang melayani fungsi-fungsi ini yang berada di luar gena tersebut.

Pada gena globin regio non-koding (*flanking*) 5', terdapat pada semua gena mamalia, ada blok nukleotid homolog. Pertama, TATA box, kira-kira 30 basa *upstream* (ke kiri) dari kodon inisiasi, yang mana sebagai kata “*start*” untuk mengawali sintesis protein. Kedua, CCAAT box, kira-kira 70 pasangan basa *upstream* dari akhir 5' dari gena. Kira-kira 80–100 basa jauh *upstream*, di sana ada sekuens GGGGTG atau CACCC yang mungkin terbalik atau duplikasi. Ketiga sekuens DNA yang dilindungi sangat ketat ini disebut elemen promotor, mereka terlibat dalam inisiasi transkripsi dari gena individual. Terakhir, pada regio non-koding 3' dari semua gena globin di sana terdapat sekuens AATAAA, yang merupakan sinyal untuk *cleavage* dan penambahan polyA pada transkrip RNA.

Klaster gena globin juga mengandung beberapa urutan yang menyusun elemen regulatori, yang mana berinteraksi untuk meningkatkan ekspresi gena spesifik-eritroid dan koordinasi dari

perubahan di dalam aktivitas gena globin selama perkembangan. Di sini meliputi gena globinnya sendiri dan elemen promoternya disebut *enhancer* (sekuens regulatori yang meningkatkan ekspresi gena walaupun berlokasi pada tempat yang sangat jauh dari gena) dan sekuens regulatori “*master*”, pada kasus klaster gena globin- β , disebut *Locus Control Region* (LCR). Pada kasus gena- α , HS40 (tempat hipersensitif-nuklease di dalam DNA 40kb dari gena globin- α). Masing-masing sekuen ini mempunyai struktur modular yang membuat bagus suatu array motif pendek yang mewakili tempat ikatan terhadap aktivator atau represor transkripsi.

D. Kerja Gena dan Sintesis Globin

Ketika gena globin ditranskripsi, RNA messenger (mRNA) disintesis dari salah satu pita, suatu proses yang dimulai dengan pembentukan kompleks transkripsi yang terdiri atas berbagai protein regulatori bersama-sama dengan enzim disebut RNA polimerase. Transkrip primer adalah prekursor mRNA besar yang masih mengandung baik sekuens ekson maupun intron. Selama di dalam inti sel, molekul ini mengalami berbagai modifikasi. Pertama, intron diambil dan ekson dipotong secara bersamaan. Sambungan intron/ekson selalu mempunyai sekuens yang sama yaitu GT pada akhir 5' dan AG pada akhir 3'. Di sini menjadi penting untuk akurasi pemotongan (*splicing*), bila tempat ini mengalami mutasi, maka proses selanjutnya tidak akan terjadi. *Splicing* mencerminkan suatu kompleks serial dari tahap intermediat dan interaksi dari sejumlah protein inti yang berbeda. Setelah ekson disambung, mRNA dimodifikasi dan distabilkan, pada akhir 5' dibentuk struktur kompleks CAP, sebaliknya pada akhir 3' ditambahkan pita residu asam adenilat (polyA). mRNA diproses pada jalan ini bergerak menuju sitoplasma, dimana ia bekerja sebagai cetakan (*template*) untuk produksi rantai globin. Karena peran dari pasangan basa (contohnya: cytosine selalu berpasangan dengan thymine, dan guanine dengan adenine), struktur mRNA mencerminkan salinan yang sesuai dari kodon DNA seperti yang disintesis, hanya perbedaannya pada RNA urasil (U) menggantikan thymine (T).

Asam amino dibawa ke cetakan mRNA oleh suatu pembawa yang disebut RNA transfer (tRNA), di sana tRNA khusus membawa asam amino tertentu, karena kode genetiknya *redundant* (misalnya, lebih dari 1 kodon dapat mengkode satu asam amino khusus), untuk beberapa asam amino ada beberapa tRNA individual yang berbeda. Permintaan rantai globin ditentukan oleh permintaan kodon di dalam mRNA. tRNA berisi 3 basa, yang bersama-sama membentuk antikodon, antikodon ini sesuai cocok dengan kodon mRNA untuk asam amino tertentu. Mereka membawa asam amino menuju cetakan/*template*, dimana mereka menemukan posisi yang tepat oleh karena pasangan basa kodon-antikodon. Ketika tRNA pertama pada posisi, merupakan kompleks inisiasi yang dibentuk antara beberapa faktor inisiasi protein yang bersama-sama dengan 2 subunit ribosom. tRNA ke-2 bergerak di sampingnya dan 2 asam amino yang mereka bawa membentuk ikatan peptid di antara mereka, rantai globin sekarang mempunyai panjang sebanyak 2 residu asam amino. Proses ini terus menerus berlanjut sepanjang mRNA dari kiri ke kanan, dan menambah panjang ikatan peptida dari satu tRNA yang datang terus berlanjut ke berikutnya, sampai semua mRNA ditranslasi dari 5' sampai 3'. Ada kodon inisiasi (AUG) dan kodon terminasi (UAA, UAG dan UGA). Ketika ribosom mencapai kodon terminasi, maka translasi putus/berhenti, rantai globin lengkap dilepaskan dan subunit ribosom didaur ulang. Rantai globin individual bergabung dengan hem, yang disintesa melalui jalur yang terpisah dan kemudian mereka berinteraksi dengan satu rantai yang mirip dan dua rantai yang tidak mirip untuk membentuk tetramer hemoglobin lengkap.

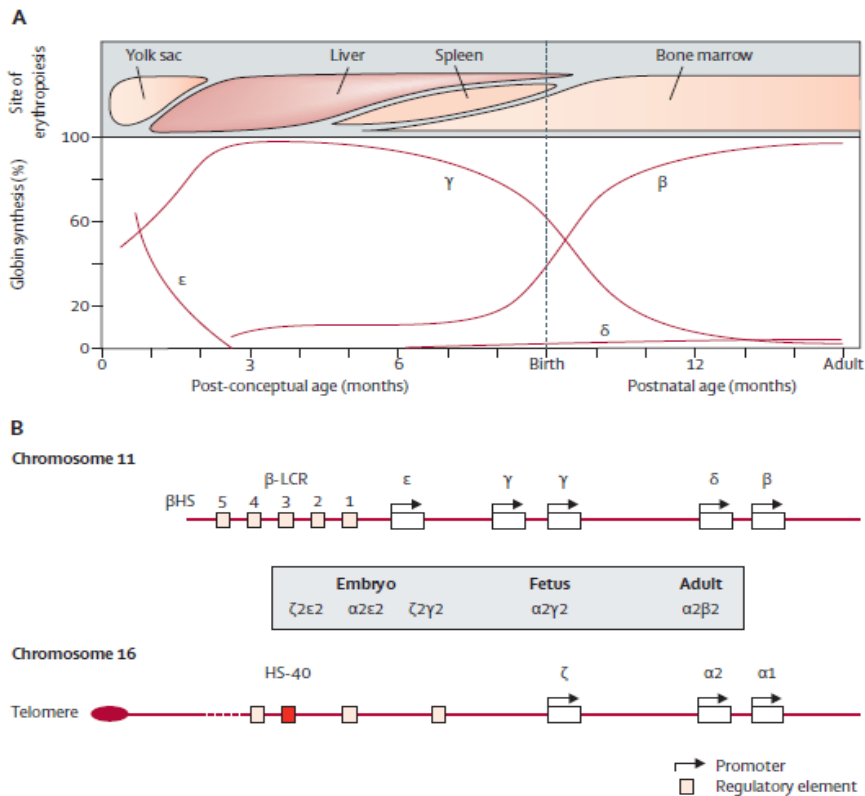
E. Regulasi Sintesis Hemoglobin

Regulasi ekspresi gena globin dimediasi sebagian besar pada tahap transkripsional, dengan beberapa penyesuaian selama translasi dan modifikasi produk gena pascatranslasi. DNA yang tidak terlibat dalam transkripsi disimpan sangat kuat dalam suatu bentuk paket yang padat, dimodifikasi secara kimiawi, tidak bisa diakses terhadap faktor transkripsi dan polimerase, serta dimetilasi secara kuat. Aktivasi gena tertentu dicerminkan oleh perubahan struktur dari kromatin

sekelilingnya, yang dapat diidentifikasi dengan cara memperkuat sensitivitas terhadap nuklease. Tempat-tempat hipersensitif-nuklease lini eritroid-khusus ditemukan pada beberapa lokasi di dalam klaster gena globin- β . ada 4 yang didistribusikan lebih dari 20 kb *upstream* dari gena globin- ϵ pada regio LCR globin- β . Regio regulatori vital ini mampu menegakkan domain aktif secara transkripsional merentang pada keseluruhan klaster gena globin- β . Beberapa sekuens *enhancer* telah teridentifikasi pada klaster ini. berbagai protein regulatori terikat pada LCR, dan pada regio promoter dari gena globin serta pada sekuens *enhancer*. Hal ini diketahui bahwa LCR dan regio *enhancer* lainnya menjadi berlawanan terhadap promoter untuk meningkatkan laju transkripsi gena yang berkaitan.

Regio regulatori ini berisi motif sekuens untuk berbagai faktor transkripsi terbatas-eritroid dan tersebar dimana-mana. Tempat ikatan faktor-faktor ini telah teridentifikasi pada masing-masing promoter gena globin dan pada regio tempat-hipersensitif dari berbagai elemen regulatori. Sejumlah faktor yang terikat pada area ini ditemukan pada semua jenis sel. Mereka terdiri atas Sp1, Yy1 dan Usf. Sebaliknya, sejumlah faktor transkripsi telah teridentifikasi, meliputi GATA-1, EKLF dan NF-E2, yang terbatas dalam distribusinya terhadap sel eritroid dan dalam beberapa kasus pada sel megakaryosit serta sel mast. Tumpang-tindihnya tempat ikatan faktor-yang tersebar dimana-mana dan khusus-eritroid pada beberapa kasus mendukung bahwa ikatan kompetitif berperan penting sebagai bagian dalam regulasi gena khusus-eritroid. Faktor ikatan lainnya, *Stage Selector Protein* (SSP), muncul untuk berinteraksi secara khusus dengan gena ϵ dan γ . Beberapa elemen melibatkan kromatin dan asetilasi histon untuk mengakses protein regulatori ini telah teridentifikasi. Ikatan dari faktor-faktor khusus-hematopoietik mengaktivasi LCR, sehingga membuat keseluruhan klaster gena globin- β menjadi aktif secara transkripsional. Faktor-faktor ini terikat pada sekuens *enhancer* dan promoter, yang bekerja tandem untuk mengatur ekspresi dari gena individual di dalam klaster. Hal ini mirip bahwa beberapa faktor transkripsional berhubungan dengan perkembangan tahap-khusus dan oleh karena itu mungkin bertanggung terhadap ekspresi yang berbeda-beda dari gena globin embrionik, fetal

dan dewasa. Kluster gena globin- α juga mengandung elemen, HS40, yang mempunyai beberapa fitur-fitur struktural yang umum sama dengan LCR β , meskipun berbeda pada aspek strukturnya. Sejumlah sekuens mirip-*enhancer* juga telah diidentifikasi, meskipun menjadi jelas bahwa ada perbedaan mendasar pada pola regulasi dari dua kluster gena globin ini.



Gambar 5.1. Regulasi sintesis Hemoglobin (Higgs *et al.*, 2012)

Selain itu, ada juga perbedaan *outline* sekuens regulatori di atas, yaitu ada sekuens yang mungkin terlibat secara khusus dengan gena “silencing”, tercatat itu untuk hemoglobin embrionik, selama perkembangan. Beberapa tingkatan regulasi juga dimediasi oleh perbedaan dalam laju inisiasi dan translasi dari mRNA yang berbeda, dan pada tingkat pasca-transkripsional oleh karena perbedaan afinitas

terhadap sub unit protein yang berbeda. Namun demikian, jenis penyesuaian/penyetelan yang tepat mempunyai peluang dalam memainkan peran sedikit relatif dalam menentukan keseluruhan output dari produk gena globin.

F. Regulasi Perubahan Perkembangan Ekspresi Gena Globin

Selama perkembangan, tempat produksi sel darah merah berpindah dari *yolk sac* menuju hepar dan limpa fetal, dan selanjutnya menuju sumsum tulang saat dewasa. Sintesis hemoglobin embrionik, fetal dan dewasa kira-kira dihubungkan dalam waktu terhadap perubahan ini di dalam tempat eritropoeisis, meskipun sungguh jelas bahwa berbagai pergantian, antara sintesis hemoglobin embrionik dan fetal, maupun antara fetal dan dewasa, tersinkronisasi secara bagus melalui tempat yang berbeda ini. Sintesis hemoglobin fetal menurun selama bulan-bulan akhir dari kehamilan dan HbF digantikan dengan HbA dan Hb A₂, pada saat akhir dari tahun pertama kehidupannya. Kesepakatan besar dari penelitian, bahwa sangat kecil diketahui tentang regulasi penggantian yang berbeda ini dari satu gena globin ke gena globin lainnya selama perkembangan. Aksi dari berbagai sumber-sumber yang berbeda mendukung bahwa mungkin ada regio khusus pada klaster gena globin- α dan $-\beta$ yang responsif terhadap kerja faktor transkripsi, beberapa di antaranya mungkin menjadi berkembang pada tahap khusus. Namun demikian, protein dari jenis ini bisa jadi tidak terisolasi, dan tidak diketahui mengenai regulasi mereka dan bagaimana ia dimediasi selama perkembangan.

BAB 6

PATOLOGI MOLEKULER HEMOGLOBIN

A. Pendahuluan

Pada hampir sebagian besar kasus penyakit monogenik, gangguan hemoglobin yang diturunkan terbagi menjadi 2 kelas besar. **Pertama**, akibat dari pengurangan *output* dari satu atau lebih gena globin, kemudian yang **ke-2** adalah akibat dari produksi rantai globin yang abnormal strukturnya, dan ini mempunyai rentang kondisi yang luas serta jenis penyakitnya tergantung pada bagaimana perubahan khusus yang terjadi dalam struktur protein sehingga mengganggu stabilitas dan fungsinya. Oleh karena itu, tidak ada klasifikasi secara biologi yang memuaskan secara keseluruhan dalam mendefinisikan gangguan hemoglobin. Ada beberapa varian struktur hemoglobin yang disintesa dengan laju yang berkurang dan selanjutnya terkait dengan gambaran klinis mirip dengan talasemia. Ada pula kelas mutasi lainnya yang secara sederhana memengaruhi transisi normal dari sintesis hemoglobin fetal ke dewasa, selanjutnya sering disebut hemoglobin fetal persisten hereditas. Lagi pula, penyakit ini semuanya adalah hal umum dan terjadi bersama-sama dalam populasi tertentu, hal ini bukan tidak umum bagi individu untuk menurunkan sebuah gena terhadap satu atau lebih bentuk talasemia dan hemoglobin varian strukturalnya.

Akhir-akhir ini, determinasi patologi molekuler dari 2 bentuk talasemia yang umum terjadi yaitu alfa dan beta, memberikan gambaran yang luar biasa dari daftar mutasi yang dapat mendasari penyakit monogenik pada manusia. Selanjutnya, akan dijelaskan lebih rinci

tentang bentuk-bentuk perbedaan patologi molekuler yang mendasari masing-masing keadaan tersebut.

B. Talasemia Beta (β)

Talasemia beta dibagi dalam 2 kelas besar yaitu talasemia β^0 , yang mana tidak ada produksi rantai globin- β , dan talasemia β^+ , yang mana ada reduksi bervariasi pada *output* rantai globin- β . Mutasi gena globin- β mungkin menyebabkan reduksi *output* produk gena pada tingkat transkripsi atau mRNA *processing*, translasi, atau melalui stabilitas produk gena globin.

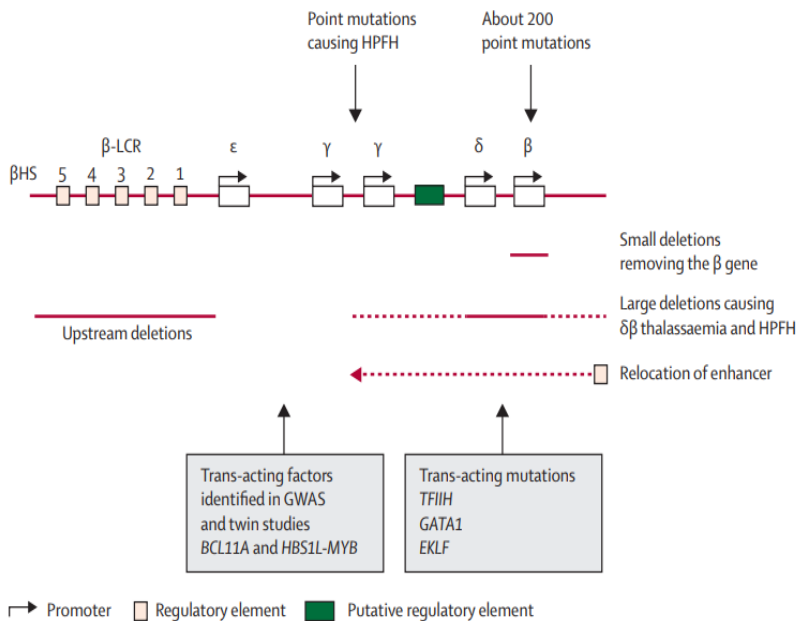
1. Defektif Transkripsi Gena Globin- β

Terdapat variasi mekanisme yang mengganggu transkripsi normal dari gena globin- β . **Pertama**, gena mungkin masing-masing delesi lengkap atau sebagian. Secara keseluruhan, delesi gena globin β tidak umum ditemukan pada pasien dengan talasemia β , dengan pengecualian: sebuah delesi 619-bp termasuk akhir 3' dari gena yang sering ditemukan pada populasi Sind di India dan Pakistan, dimana ini terdapat kira-kira 30% dari alel talasemia β , delesi lainnya sangat jarang.

Kedua, ada beberapa grup mutasi yang menyebabkan penurunan laju transkripsi gena globin β secara moderat, termasuk substitusi nukleotid tunggal di dalam atau dekat TATA box kira-kira -30 nukleotid (nt) dari tempat dimulainya transkripsi, atau pada elemen promotor proksimal atau distal kira-kira -90 nt dan -105 nt. Mutasi ini mengakibatkan pengurangan produksi mRNA globin β , dengan rentang 10–25% dari *output* normal. Jadi, mereka biasanya dikaitkan dengan bentuk talasemia β^+ ringan, khususnya terdapat pada populasi Afrika. Salah satu mutasi khusus, C $\rightarrow$ T pada posisi-101 nt menuju gena globin β , menyebabkan defisit mRNA globin β terlalu ringan. Oleh karena itu, alel ini ringan sehingga pada karier menjadi *silent* lengkap dan hanya dapat diidentifikasi oleh interaksi mereka dengan lebih banyak alel talasemia β berat yang bergabung dalam heterozigot.

2. Mutasi yang Menyebabkan *Processing* mRNA Abnormal

Seperti yang telah dijelaskan di awal, bahwa batas-batas antara ekson dan intron ditandai oleh dinukleotid invarian GT pada pada tempat donor (5') dan AG pada tempat akseptor (3'). Mutasi yang memengaruhi masing-masing tempat ini secara lengkap menghapus *splicing* normal dan menghasilkan fenotip talasemia β^0 . Transkripsi dari gena yang membawa mutasi ini muncul normal, tetapi terjadi inaktivasi *splicing* yang lengkap pada sambungan yang terkena.



Gambar 6.1. Pola mutasi yang terjadi pada gena globin- β (Higgs *et al.*, 2012)

Jenis mutasi lainnya adalah *splice site consensus sequences*. Meskipun hanya dinukleotid GT adalah invarian pada tapak *splice* donor, namun di sana terdapat konservasi nukleotid-nukleotid perbatasan dan umumnya disebut *consensus*, sekuens dari regio ini yang dapat diidentifikasi. Mutasi di dalam sekuens ini dapat

menurunkan efisiensi *splicing* sampai berbagai tingkat karena mereka mengarah terhadap *splicing* alternatif pada tempat yang tidak jelas di sekitarnya. Sebagai contoh, mutasi nukleotid pada posisi 5 dari IVS-1 (*the first intervening sequence*), G→C atau T, menyebabkan reduksi produksi rantai β yang jelas sehingga menimbulkan fenotip talasemia β^+ berat. Di lain tempat, substitusi C terhadap T pada posisi 6 dari IVS-1 mengarah hanya pada reduksi ringan dari output rantai β .

Mekanisme lainnya yang mengarah pada *splicing* abnormal termasuk *cryptic splice site*. Ini adalah regio DNA, yang jika terjadi mutasi, diasumsikan fungsi dari tapak *splice* pada regio yang tidak tepat dari prekursor mRNA. Sebagai contoh, variasi mutasi yang mengaktifasi tempat yang tidak jelas pada rentang kodon 24–27 ekson 1 dari gena globin β . Tempat ini mengandung dinukleotida GT, dan substitusi perbatasan yang mempengaruhinya, maka ini lebih menyerupai konsensus tapak *splice* donor sehingga mengaktifasinya, meskipun tapak *splice* normalnya masih intact. Mutasi pada kodon 24 GGT→GGA, walaupun ia tidak memengaruhi asam amino yang ditemukan secara normal pada posisi rantai globin β (glycin), memungkinkan beberapa *splicing* terjadi pada tempat ini, daripada perbatasan ekson-intron. Hal ini menyebabkan produksi mRNA globin β yang terpotong menjadi normal dan abnormal sehingga selanjutnya menimbulkan fenotip klinis talasemia β yang berat. Yang menarik, mutasi pada kodon 19, 26 dan 27 menyebabkan penurunan produksi mRNA normal (berhubungan dengan *splicing* abnormal) dan substitusi asam amino ketika mRNA yang terpotong secara normal ditranslasi menjadi protein. Hemoglobin abnormal yang dihasilkan berurutan-turut adalah Hb Malay, Hb E dan Hb Knossos. Semua varian ini terkait dengan fenotip talasemia –like β^+ ringan. Mutasi ini menggambarkan bagaimana perubahan sekuens koding lebih banyak daripada sekuens intervening dalam mempengaruhi RNA *processing* dan menggarisbawahi pentingnya kompetisi di antara sekuens tapak *splice* yang berpotensi dalam membangkitkan varietas mRNA globin β normal maupun abnormal.

Tapak *splice* yang tidak jelas di intron mungkin juga membawa mutasi yang mengaktifkannya meskipun tapak *splice* normalnya masih intact. Mutasi yang biasa dari jenis ini terdapat pada populasi mediterania meliputi substitusi basa pada posisi 110 di dalam IVS-1. Regio ini mengandung sekuens yang mirip tempat akseptor 3', meskipun ia kekurangan dinukleotida AG invarian. Perubahan G menjadi A pada posisi 110 menciptakan dinukleotida ini. Akibatnya adalah kira-kira 90% transkrip RNA dipotong pada tempat khusus ini dan hanya 10% pada tempat normal, menghasilkan fenotip talasemia β^+ berat (Gambar 5.3). Beberapa mutasi talasemia β lainnya telah dijelaskan terjadi pada tempat donor baru di dalam IVS-2 dari gena globin β .

Mutasi lainnya yang mengganggu *processing* gena globin β meliputi sekuens AAUAAA pada regio 3' *untranslated*, yang merupakan sinyal untuk *cleavage dan polyadenylation* transkrip gena globin β . Bagaimanapun juga, mutasi ini menimbulkan destabilisasi transkrip. Sebagai contoh, substitusi T $\rightarrow$ C pada sekuens ini mengarah hanya pada 1/10 jumlah normal dari transkrip mRNA globin β dan selanjutnya menimbulkan fenotip talasemia β^+ berat moderat. Contoh lain adalah mutasi yang mungkin mengarah pada defektif *processing* dari fungsi mRNA globin β yaitu substitusi basatunggal A $\rightarrow$ C di dalam tempat CAP. Walaupun belum dimengerti sepenuhnya bagaimana mutasi ini menyebabkan penurunan laju transkripsi gena globin β .

Ada mutasi yang lain walaupun sangat jarang yaitu melibatkan regio 3' *untranslated* dari gena globin β dan ini terkait dengan bentuk talasemia β ringan relatif. Diketahui bahwa mutasi ini mengganggu transkripsi namun mekanismenya tidak diketahui dengan pasti.

3. Mutasi yang Mengakibatkan Translasi mRNA Globin- β Abnormal

Ada 3 kelas besar mutasi jenis ini. Substitusi basa mengubah kodon asam amino menjadi kodon rantai terminasi sehingga mencegah translasi mRNA globin β dan menimbulkan fenotip talasemia β^0 . Beberapa mutasi dari jenis ini, telah dijelaskan paling sering terjadi pada kodon 17, yang banyak terdapat pada populasi Asia Tenggara, kemudian ada kodon 19 yang sering terjadi di Mediterania.

Klas ke-2 yaitu meliputi insersi atau delesi dari satu, dua atau empat nukleotida yang mengkode regio gena globin β . Hal ini akan merusak *reading frame*, menyebabkan *frameshift* dan selanjutnya mengganggu translasi mRNA globin β . Akibat akhir adalah insersi anomali asam amino setelah *frameshift* hingga kodon terminasi dicapai pada *frame reading* yang baru. Tipe mutasi ini selalu mengarah pada fenotip talasemia β^0 .

Yang terakhir, ada beberapa mutasi yang terlibat dalam kodon inisiasi gena globin β , diperkirakan dapat menurunkan efisiensi translasi.

4. Varian Rantai Globin- β Unstable

Beberapa bentuk talasemia β akibat dari sintesis rantai globin β *unstable* yang terlalu banyak sehingga menyebabkan ketidakmampuan membentuk tetramer hemoglobin dan cepat terdegradasi dan selanjutnya menimbulkan fenotip talasemia β^0 . Tentu saja, pada beberapa keadaan ini tidak ada produk rantai globin yang abnormal, ini dapat ditunjukkan dengan analisis protein dan patologi molekuler telah menginterpretasikan secara sederhana pada basis sekuens yang berasal dari rantai β varian, diperoleh dari analisis DNA.

Penelitian terkini, banyak mengungkap fenotip klinis kompleks akibat sintesis produk globin β tidak stabil. Sebagai contoh, ada spektrum gangguan akibat mutasi di ekson 3 yang menimbulkan bentuk talasemia β berat moderat pada *heterozigot*. Ini

ditemukan bahwa mutasi nonsense atau *frameshift* pada ekson I dan II terkait dengan ketadaan mRNA dari sitoplasma prekursor sel darah merah. Hal ini terjadi pada mekanisme adaptif yang disebut *non-sense mediated decay*, dimana mRNA abnormal jenis ini tidak ditransportasikan ke sitoplasma, dimana ia bekerja sebagai template untuk produksi produk gena yang tidak lengkap. Namun demikian, pada kasus mutasi di ekson III, rupanya karena proses ini membutuhkan adanya ekson *upstream* intak, mRNA abnormal ditransportasikan ke sitoplasma dan selanjutnya dapat bekerja sebagai template produksi rantai globin β tidak stabil. Akhirnya presipitat pada prekursor sel darah merah bersama-sama dengan kelebihan rantai α untuk membentuk badan inklusi, dan selanjutnya terjadi ketidakseimbangan rantai globin yang cukup pada *heterozigot* sehingga menghasilkan tingkat anemia yang berat moderat.

5. Hubungan Genotip-Fenotip pada Talasemia β

Seperti yang sudah diketahui bahwa defek dasar yang menimbulkan lebih dari 200 mutasi yang berbeda adalah berkurangnya produksi rantai globin β . Sintesis rantai globin α berproses secara normal, sehingga menimbulkan ketidakseimbangan *output* rantai globin dengan kelebihan rantai α . Rantai α yang tidak punya pasangan membentuk gumpalan baik pada prekursor sel darah merah maupun progeni mereka sehingga menghasilkan badan inklusi. Hal ini mengganggu berbagai jalur kompleks kehidupan maupun maturasi sel yang normal. Menempelnya badan inklusi ke membran sel darah merah menyebabkan gangguan strukturnya dan produk degradasinya, yaitu heme, hemin (heme teroksidasi) dan zat besi, menyebabkan kerusakan oksidatif terhadap isi dan membran sel darah merah. Interaksi ini menyebabkan destruksi prekursor sel darah merah intramedulla dan memperpendek kelangsungan hidup mereka saat mencapai darah perifer. Akibat akhirnya adalah anemia dengan berbagai tingkat keparahan. Selanjutnya, akan menyebabkan hipoksia jaringan dan memproduksi eritropoeitin dalam jumlah relatif besar. Akhirnya akan mengarah terjadinya ekspansi yang

masif dari sumsum tulang secara tidak efektif, sehingga menimbulkan deformitas tulang, keadaan hipermetabolik dan fragilitas tulang.

Proporsi besar dari hemoglobin pada darah penderita talasemia β adalah dari varietas fetal. Individu normal menghasilkan Hb F kira-kira 1%, yang didistribusikan tidak merata di antara sel-sel darah merah. Pada sumsum tulang pasien talasemia β , setiap prekursor sel darah merah yang mensintesis rantai γ menjadi di bawah seleksi yang kuat sehingga menyebabkan mereka berkombinasi dengan rantai α untuk menghasilkan hemoglobin fetal dan kemudian tingkat ketidakseimbangan rantai globin dapat berkurang. Selanjutnya, kemungkinan produksi rantai γ tampak meningkat di dalam eritroid sumsum tulang. Hal ini sepertinya adalah 2 faktor kombinasi yang dilakukan untuk meningkatkan output Hb F secara relatif pada gangguan ini. Namun demikian, karena ia mempunyai afinitas yang lebih tinggi terhadap oksigen daripada Hb A, maka selanjutnya pasien talasemia β tidak mampu beradaptasi pada kadar hemoglobin yang rendah.

Lebih jauh, akibat tidak efektifnya eritrosit akan menyebabkan peningkatan laju absorpsi zat besi dan ditambah dengan zat besi dari transfusi, menyebabkan tumpukan progresif dari zat besi di jaringan sehingga menimbulkan kerusakan liver, jantung dan endokrin.

Akibat masuknya sel darah merah abnormal secara konstan dan banyak, menimbulkan hipertropi limpa selanjutnya terjadi splenomegali progresif akibat peningkatan volume plasma dan terjebaknya massa sel darah merah yang beredar dalam sirkulasi di dalam limpa. Ini memperburuk keadaan anemia. Semua mekanisme patofisiologi, kecuali penimbunan zat besi, dapat didaur ulang oleh transfusi darah reguler, namun mempunyai efek penghentian sumsum tulang inefektif dan konsekuensinya.

Keberagaman fenotipe, meskipun sebagian besar pasien homozigot mutasi talasemia β atau gabungan heterozigot terhadap 2 mutasi yang berbeda mempunyai fenotip ketergantungan yang berat terhadap transfusi, tetapi masih ada beberapa pengecualian. Beberapa pasien jenis ini mempunyai keadaan yang lebih ringan,

hanya membutuhkan sedikit atau bahkan sama sekali tidak perlu transfusi, keadaan ini disebut talasemia β intermedia. Contoh keadaan khusus yang penting ini adalah digambarkan oleh penemuan klinis pada orang yang diturunkan dari salah satu orang tuanya menderita talasemia β dan yang lainnya menderita Hb E, gangguan ini disebut talasemia β /HbE. Karena mutasi yang menghasilkan Hb E juga mengungkap suatu alternatif tapak *splice* di ekson pertama dari gena globin β , ini disintesa pada kecepatan yang rendah dan oleh karena itu berjalan seperti bentuk talasemia β yang ringan. Ini merupakan varian hemoglobin yang paling sering terjadi secara global dan talasemia β /Hb E adalah bentuk talasemia berat yang paling sering terjadi di beberapa negara Asia. Ia mempunyai variabel fenotip yang tidak biasa, mempunyai rentang dari kondisi yang tidak dapat dibedakan pada talasemia β mayor sampai salah satu dari yang paling ringan yaitu pasien tumbuh dan berkembang sangat normal dan tidak pernah memerlukan transfusi.

Sampai saat ini, suatu kesepakatan besar telah dicapai mengenai beberapa mekanisme yang terlibat dalam variabilitas fenotip yang luar biasa besar ini. Singkat cerita, hal itu mencerminkan adanya kerja dari modifikasi gena dan variabilitas dalam adaptasi terhadap anemi, dan yang paling dipercaya adalah efek dari lingkungan. Berdasar kompleksitas dari interaksi ini, ada baiknya untuk membagi modifier genetik fenotip talasemia β menjadi 3 kelas yaitu primer, sekunder dan tertier.

Modifier primer adalah alel yang berbeda dari talasemia β yang dapat berinteraksi bersama-sama. Sebagai contoh, gabungan heterozigot untuk mutasi talasemia β^0 yang berat dan salah satu yang lebih ringan mungkin mempunyai bentuk intermediat dari talasemia β dengan berbagai variasi yang tergantung pada tingkat reduksi sintesis globin β di bawah kerja alel yang lebih ringan. Hal ini adalah salah satu mekanisme yang tidak diragukan untuk keparahan yang bervariasi dari talasemia β /Hb E, ini secara sederhana mencerminkan kerja variabel dari mutasi talasemia β yang diturunkan bersama-sama dengan Hb E. Namun demikian, penjelasan ini tidak relevan

pada kasus pasien dengan mutasi talasemia β identikal yang mempunyai disparitas fenotip yang luas.

Modifier sekunder adalah yang secara langsung memengaruhi tingkat ketidakseimbangan rantai globin. Pasien dengan talasemia β yang juga mewarisi satu atau lebih bentuk talasemia α cenderung mempunyai fenotip yang lebih ringan karena reduksi kelebihan gena globin α yang disebabkan oleh alel talasemia α yang hidup berdampingan. Mirip dengan ini, pasien dengan bentuk talasemia berat yang mewarisi lebih banyak gena α dibanding dengan normal karena orang tuanya terdapat susunan gena α *triplicated* dan *quadruplicated* cenderung mempunyai fenotip yang lebih berat. Pasien lainnya dengan alel talasemia berat nampak menjadi lebih ringan karena secara genetika menentukan kemampuan untuk menghasilkan lebih banyak rantai- γ dan selanjutnya menjadi hemoglobin fetal, sebuah mekanisme yang juga menyebabkan penurunan tingkat ketidakseimbangan rantai globin. Sekarang jelas bahwa beberapa lokus gena terlibat dalam mekanisme ini, ciri yang paling khas adalah polimorfisme pada promoter regio gena globin γ yang muncul untuk meningkatkan *output* dari lokus ini di bawah kondisi stres hemopoeitik. Namun demikian, ada gena lain yang jelas terlibat dalam meningkatkan *output* Hb F. Penelitian terbaru tentang genom menyatakan dengan jelas bahwa ada bukti yang menentukan pada kromosom 6 dan 8 serta suatu hubungan yang sangat kuat telah ditemukan dengan adanya BCL11A, sebuah faktor transkripsi yang diketahui terlibat dalam hematopoeisis. Mekanisme nyata adalah telah ditetapkan adanya kaitan dengan peningkatan Hb F pada pasien talasemia β dan anemia sel sabit.

Modifier tertier adalah tidak mempunyai efek terhadap sintesis hemoglobin tetapi memodifikasi beberapa komplikasi yang berbeda pada talasemia β , meliputi osteoporosis, absorpsi zat besi, *jaundice*, dan kerentanan terhadap infeksi.

Meskipun sampai saat ini masih diabaikan, ini juga muncul bahwa variasi pada adaptasi terhadap anemia dan lingkungan juga berperan penting dalam modifikasi fenotip pada talasemia β . Sebagai contoh, pasien dengan talasemia β /Hb E mempunyai kadar Hb F

relatif rendah dan selanjutnya kurva disosiasi oksigen mereka menjadi lebih besar bergeser ke arah kanan daripada pasien dengan bentuk talasemia β intermedia dengan kadar Hb F lebih tinggi secara bermakna. Penelitian sangat terbaru juga mendukung bahwa respon eritropoeitin terhadap anemia berat untuk memperoleh kadar hemoglobin dipercaya bervariasi menurut usia, pasien selama tahun pertama kehidupannya mempunyai respon lebih tinggi yang bermakna terhadap kadar hemoglobin yang sama daripada pasien yang lebih tua. Penelitian ini mungkin mempunyai beberapa cara untuk menjelaskan variasi di dalam fenotip saat usia berbeda yang telah ditunjukkan pada pasien dengan talasemia β /Hb E. Akhirnya, ini jelas bahwa penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memisahkan efek pada fenotip dari modifier genetik dan faktor lingkungan.

Jadi variabilitas fenotip talasemia β mencerminkan beberapa lapis dari interaksi kompleks yang melibatkan *modifier* genetik bersama-sama dengan variasi dalam adaptasi dan hampir pasti adalah lingkungan.

C. Talasemia Alfa (α)

Patologi molekuler talasemia- α lebih kompleks dibanding dengan talasemia- β , karena secara sederhana di sana terdapat 2 gena globin- α per haploid genom, jadi, genotip globin α normal dapat ditulis $\alpha\alpha/\alpha\alpha$. Seperti halnya pada talasemia- β , ada 2 varietas utama dari talasemia α yaitu talasemia- α^+ dan $-\alpha^0$. Pada talasemia- α^+ , salah satu dari gena globin *linked- α* hilang, bisa karena delesi (-) atau mutasi (T). Genotip heterozigot dapat ditulis $-\alpha/\alpha\alpha$ atau $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$. Pada talasemia- α^0 , kedua gena globin hilang karena delesi, genotip heterozigot ditulis $--/\alpha\alpha$. Pada populasi dimana delesi khusus, terjadi khususnya pada populasi Asia Tenggara (SEA) atau di Mediterania (MED), ditambahkan penulisannya menjadi $--^{SEA}/\alpha\alpha$ atau $--^{MED}/\alpha\alpha$. Untuk selanjutnya, bila dikatakan “gena talasemia α ” akan merujuk pada haplotip bahwa hal itu, pernyataan dan fungsi dari kedua gena globin α linked.

1. Talasemia- α^0

Ada 3 patologi molekuler yang utama, semua meliputi delesi, ditemukan untuk mendasari fenotip talasemia- α^0 . Mayoritas kasus akibat dari delesi yang mengangkat kedua gen globin α dan klaster globin α panjangnya bervariasi. Namun demikian, kadang-kadang klaster gen globin- α intak, tetapi diinaktifkan oleh delesi yang melibatkan regio regulatori utama HS40, 40kb *upstream* dari gen globin- α , atau gen globin- α mungkin hilang sebagai bagian dari terpotongnya ujung lengan pendek kromosom 16.

Telah ditemukan bahwa 5' *breakpoint* dari jumlah delesi klaster gen globin α berlokasi kira-kira sama jaraknya dan sama urutannya sepanjang kromosom seperti itu juga untuk 3' *breakpoint*, hal ini mirip dengan yang ditemukan pada delesi klaster gen globin- β . Delesi ini akibat dari kejadian rekombinasi yang tidak sah (*illegitimate*) sehingga mengarah delesi dari keseluruhan loop kromatin saat mereka melewati titik tempel nuklear selama replikasi kromosomal. Delesi panjang yang lain telah diketahui berciri yaitu potongan baru dari 2 *breakpoint* jembatan DNA pada klaster gen globin- α . Sekuens yang menyisip dimulai *upstream* dari klaster gen globin- α , dimana normalnya ditemukan di dalam orientasi *inverted* dengan menghormati terhadap yang ditemukan di antara *breakpoint* delesi. Jadi, ini muncul untuk digabungkan ke dalam jembatan dalam suatu cara yang mencerminkan sangat dekat jarak terhadap regio *breakpoint* delesi selama replikasi. Delesi lainnya, tampak terkait dengan famili Alu-repeats, sekuens ulangan sederhana yang secara luas tersebar sepanjang genom, satu delesi muncul akibat dari rekombinasi homolog sederhana di antara 2 ulangan dari jenis ini, biasanya terpisah 62 kb.

Sejumlah bentuk talasemia- α^0 akibat dari pemotongan terminal dari lengan pendek kromosom 16 di tapak kira-kira 50kb distal terhadap gen globin- α . Sekuens konsensus telomerik TTAGGG, ditambahkan secara langsung pada tapak dari *breakpoint*. Sejak mutasi ini stabil diturunkan, maka muncul bahwa DNA telomerik sendiri cukup untuk menstabilkan akhiran dari kromosom yang terpotong.

Terbaru, 2 mekanisme molekuler yang lain diidentifikasi sebagai penyebab talasemia- α^0 , meskipun jarang namun mungkin mempunyai implikasi yang penting terhadap pemahaman patologi molekuler dari penyakit genetik lainnya. Pada satu kasus, delesi pada klaster gena globin- α diakibatkan gena terekspresi secara luas (LUC7L) menjadi sejajar terhadap gena globin α yang normal secara struktural. Meskipun yang terakhir itu menyimpan semua elemen regulatori yang penting, ekspresinya *silence*. Pada kasus lain dari talasemia- α^0 , yang mana tidak ada defek molekuler yang terdeteksi di dalam klaster gena globin α , tetapi ada kelebihan fungsi regulatori polimorfisme ditemukan pada regio di antara gena globin- α dan elemen regulatori *upstream*nya. Perubahan ini menciptakan suatu elemen *like-promoter* baru yang mengganggu aktivasi normal dari semua *downstream* gena globin *like- α* .

Singkat cerita, analisis detail dari patologi molekuler talasemia- α^0 telah tersedia bukti yang terukur tidak hanya tentang seberapa besar delesi dari klaster gena disebabkan, tetapi juga mengenai beberapa mekanisme kompleks yang mungkin menjadi dasar kasus dimana klaster gena α masih intact, tetapi fungsi mereka tertekan secara lengkap.

2. Talasemia- α^+

Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, talasemia- α^+ akibat dari inaktivasi salah satu dari gena globin- α yang mengalami duplikasi baik oleh delesi maupun mutasi titik.

Talasemia α^+ yang berhubungan dengan delesi gena. Ada 2 bentuk umum dari talasemia- α^+ terkait dengan hilangnya satu atau lebih dari gena globin- α yang mengalami duplikasi, $-\alpha^{3.7}$ dan $-\alpha^{4.2}$, dimana 3.7 dan 4.2 menunjukkan ukuran delesi. Jalur delesi ini telah dihasilkan berdasar struktur dari kompleks gena globin.

Masing-masing gena α berada di dalam perbatasan homolog, kira-kira panjangnya 4kb, kemungkinan dihasilkan oleh kejadian duplikasi masa lalu. Regio homolog, yang dibagi oleh sisipan kecil, didesain X, Y dan Z. Bagian boks Z duplikasi sebesar 3.7kb dan

bagian boks X sebesar 4.2kb. Sebagai hasil *crossover* tidak segaris (*misalignment*) dan timbal balik (*reciprocal*) di antara segmen-segmen tersebut pada saat meiosis, sebuah kromosom dihasilkan dengan masing-masing menjadi sebuah gena globin- α *single* ($-\alpha$) atau *triplicated* ($-\alpha\alpha\alpha$). Jika *crossover* terjadi di antara homolog boks Z maka 3.7kb DNA akan hilang, kejadian ini disebut sebagai delesi ke arah kanan (*rightward deletion*), $-\alpha^{3.7}$. Demikian juga yang terjadi pada boks X maka hilang 4.2kb, disebut delesi ke arah kiri (*leftward deletion*), $-\alpha^{4.2}$. Mirip dengan itu untuk yang *triplicated*, susunan gena α disebut $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3.7}$ dan $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}4.2}$. Variasi perbedaan titik *crossover* di dalam box Z menimbulkan perbedaan panjang delesi, tetapi masih meliputi 3.7kb.

Jenis **talasemia- α^+ non-delesi**. Gangguan ini akibat dari mutasi *single* atau *oligonucleotide* dari gena globin- α tertentu. Sebagian besar dari mereka melibatkan gena $\alpha 2$, namun sejak *output* dari lokus ini adalah 2 sampai 3 kali lebih besar dari gena $\alpha 1$. Hal ini mungkin secara sederhana mencerminkan bias penetapan yang berhubungan dengan efek fenotip yang lebih baik dan mungkin keuntungan selektif yang lebih baik. Secara keseluruhan, mutasi ini mengganggu fungsi gena globin- α , yang mirip dengan pengaruhnya pada gena globin- β . Mereka memengaruhi stabilitas transkripsi, translasi maupun pasca translasi dari produk gena. Ada famili mutasi yang melibatkan kodon terminasi gena globin $\alpha 2$, yaitu TAA. Perubahan kodon ini menyebabkan insersi asam amino dari rantai *terminating*. Ini diikuti dengan “*read-through*” dari mRNA globin- α , yang tidak ditranslasi secara normal sampai mencapai kodon fase terminasi. Akibatnya terjadi elongasi rantai dengan menambahkan 31 residu di akhir terminal-C. Ada 5 hemoglobin varian dari jenis ini yang bisa diidentifikasi, di antaranya yang paling biasa yaitu Hb *Constant Spring* (di Asia Tenggara). Hal ini belum jelas sama sekali, mengapa *read-through* dari mRNA yang tidak ditranslasi secara normal, malah mengarah pada penurunan *output* dari gena $\alpha 2$, meskipun di sana sangat dipercaya terbukti bahwa ada beberapa jalur dalam destabilisasi mRNA.

3. Talasemia- α /Sindrom Retardasi Mental

Ada suatu famili ringan dari bentuk talasemia- α yang sungguh berbeda dari yang telah dijelaskan di muka, dan ini terkait dengan berbagai tingkat retardasi mental. Penelitian saat ini menunjukkan ada 2 varietas yang berbeda dari kondisi ini, yaitu satu encode di kromosom 16 (ATR-16) dan lainnya encode di kromosom X (ATR-X).

Sindrom ATR-16 mempunyai ciri *handicap* mental relatif ringan dengan konstelasi bervariasi pada *dismorfisme* muka dan tulang. Individu ini mempunyai delesi yang panjang melibatkan klaster gena globin- α , tetapi mengambil paling tidak 1-2Mb. Keadaan ini dapat terjadi dalam beberapa jalur, meliputi translokasi tidak seimbang melibatkan kromosom 16, pemotongan ujung kromosom 16, dan hilangnya klaster gena globin α dan bagian regio *flanking* dengan cara mekanisme lainnya.

Sindrom ATR-X akibat dari mutasi dalam gena pada kromosom X, Xq13.1-q21.1. Produk dari gena ini adalah salah satu dari famili protein yang terlibat dalam regulasi transkripsional yang dimediasi-khromatin. Protein ini berfungsi untuk menegakan dan atau menjaga metilasi genom. ATR-X juga berperan penting dalam awal perkembangan janin, khususnya sistem urogenital dan otak.

4. Talasemia- α dan Sindrom Mielodisplastik

Keadaan ini terjadi kebanyakan pada laki-laki dengan usia yang sudah lanjut. Pasien ini biasanya mempunyai mutasi yang melibatkan ATR-X. Hasil pemeriksaan hematologi biasanya ditemukan satu atau yang lain bentuk dari sindrom mielodisplastik. Hubungan antara mutasi ini dengan mielodisplastik masih harus ditentukan.

D. Bentuk Talasemia yang Lebih Jarang dan Gangguan yang Berkaitan

Ada beberapa keadaan lainnya yang melibatkan klaster gen globin β , meskipun tidak seperti talasemia β , namun memberikan informasi yang penting mengenai mekanisme patologi molekuler.

1. Talasemia- $\delta\beta$

Seperti talasemia- β , talasemia- $\delta\beta$ merupakan akibat dari sintesis rantai $-\delta$ dan $-\beta$ yang tidak efektif, dibagi 2 bentuk yaitu $-\delta\beta^+$ dan $-\delta\beta^0$.

Talasemia- $\delta\beta^+$ akibat dari ketidakseimbangan *crossover* antara lokus gen globin- δ dan $-\beta$ saat meiosis dengan produksi gen fusi $\delta\beta$. Akibat rantai fusi $\delta\beta$ menghasilkan kombinasi rantai α sehingga membentuk famili varian hemoglobin yang disebut Hemoglobin Lepore, diambil dari nama pasien yang pertama ditemukan dengan penyakit ini. Pasien mempunyai fenotip bentuk talasemia- $\delta\beta$ yang berat moderat.

Talasemia- $\delta\beta^0$ hampir semua akibat dari delesi panjang yang melibatkan kompleks gen globin- β . Kadang-kadang melibatkan rantai globin- $^A\gamma$ dan selanjutnya yang aktif hanya lokus $^G\gamma$. Pada kasus lain, lokus $^A\gamma$ dan $^G\gamma$ masih intak dan delesi sederhana mengmabil gen globin δ dan β , pada kasus ini kedua gen globin- $^A\gamma$ dan $^G\gamma$ masih fungsional. Untuk beberapa alasan, delesi panjang ini memungkinkan sintesis persisten dari gen globin γ dengan kadar yang relatif tinggi pada saat dewasa, yang membantu mengkompensasi terhadap ketidakadanya produksi rantai globin- δ dan $-\beta$. Selanjutnya dikelompokkan menurut jenis sesuai hemoglobin fetal dan mempunyai 2 jenis varietas yaitu talasemia- $^G\gamma(^A\gamma\delta\beta)^0$ dan $^G\gamma^A\gamma(\delta\beta)^0$, senada dengan bentuk lain dari talasemia, mereka digambarkan dengan baik oleh apa yang tidak dihasilkan yaitu talasemia- $(^A\gamma\delta\beta)^0$ dan $-(\delta\beta)^0$ secara berurutan. Homozigot hanya menghasilkan hemoglobin fetal, sedangkan heterozogot mempunyai gambaran darah *thalasemik* bersama-sama dengan kira-kira 5-15% Hb F.

2. ***Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH)***

Secara genetik, penentuan sintesis hemoglobin fetal persisten pada saat dewasa adalah tidak mempunyai implikasi secara klinis kecuali bahwa faktor yang menentukan genetiknya dapat berinteraksi dengan talasemia- β atau varian hemoglobin struktural, menyebabkan kadar tinggi dari produksi Hb F sering mengalami penurunan pada kondisi ini. Bentuk lain dari HPFH akibat dari setiap delesi panjang yang melibatkan klaster gena globin $\delta\beta$, mirip dengan itu menyebabkan talasemia- $(\delta\beta)^0$, atau dari mutasi titik yang melibatkan promotor dari gena globin- $^G\gamma$ dan $^A\gamma$. Pada kasus dimana tidak ada sintesis rantai globin- β maka dikelompokkan sebagai HPFH $(\delta\beta)^0$. Pada kasus dimana ada mutasi promotor yang melibatkan gena globin- γ , ada peningkatan produksi rantai globin- γ pada orang dewasa terkait dengan beberapa sintesis rantai- β dan $-\delta$ pada cis terhadap mutasi HPFH. Jadi, berdasar pada apakah mutasi titik melibatkan promotor dari gena globin- $^G\gamma$ atau $^A\gamma$, keadaan ini disebut berturut-turut $^G\gamma\beta^+$ HPFH dan $^A\gamma\beta^+$ HPFH.

E. **Hubungan Genotip-Fenotip pada Talasemia α**

Patofisiologi talasemia- α berbeda dari talasemia- β sebagian besar karena sifat-sifat dari kelebihan rantai globin yang dihasilkan sebagai akibat dari defektif sintesis rantai- α . Kelebihan rantai α yang dihasilkan pada talasemia- β adalah tidak stabil dan menggumpal, namun ini tidak terjadi pada kasus talasemia- α , yang mana kelebihan rantai γ atau rantai β mampu untuk membentuk homotetramer γ_4 yang larut (Hb Bart's) dan β_4 (Hb H). Varian ini, khususnya Hb H, meskipun tidak stabil dan menggumpal pada populasi sel darah merah yang tua, namun mereka masih mempunyai kondisi mudah larut yang cukup panjang untuk sel darah merah menjadi matur dan berkembang relatif normal. Selanjutnya di sana terjadi eritropoiesis inefektif jauh berkurang pada talasemia α dan penyebab utama anemia adalah hemolisis yang terkait dengan presipitasi Hb H pada sel darah merah yang lebih tua. Selain itu, tentu saja, ada reduksi pada sintesis hemoglobin normal yang menyebabkan eritrosit mikrositik hipokromik.

Faktor penting lainnya pada patofisiologi talasemia- α adalah kenyataan bahwa Hb Bart's dan Hb H adalah karier oksigen yang percuma, mempunyai kurva disosiasi mirip dengan mioglobin. Selanjutnya kadar hemoglobin sirkulasi mungkin memberi kesan pengaruh palsu dari kapasitas darah yang mengantarkan oksigen dan pasien mungkin menjadi mempunyai gejala pada saat kadar hemoglobin relatif tinggi.

Fenotip klinis yang berbeda dari talasemia- α adalah efek dari dosis gena. Heterozigot dinyatakan untuk talasemia α^+ dikaitkan dengan perubahan hematologi minimal. Talasemia- α^0 (hilang 2 gena globin α) mempunyai ciri mikrositosis hipokromia moderat, mirip apa yang terjadi pada talasemia- β trait. Bukan menjadi masalah apakah gena α hilang pada kromosom yang sama atau pasangan lawannya dari kromosom homolog. Selanjutnya homozigot dinyatakan untuk talasemia- α^+ , $-\alpha/-\alpha$, mempunyai fenotip yang mirip terhadap heterozigot yang dinyatakan untuk talasemia α^0 ($--/\alpha\alpha$).

Hilangnya 3 gena globin- α , biasanya akibat dari gabungan heterozigot yang dinyatakan untuk talasemia- α^0 dan $-\alpha^+$, terkait dengan anemia berat moderat dengan produksi kadar Hb H bervariasi. Keadaan ini, penyakit hemoglobin H, mempunyai ciri anemia bervariasi dan splenomegali dengan kelangsungan hidup sel darah merah lebih pendek secara jelas.

Akhirnya, homozigot yang dinyatakan untuk talasemia- α^0 , ($--/--$) mempunyai ciri meninggal saat dalam kandungan atau sesaat setelah lahir, dengan gambaran klinis hydrops fetalis. Bayi ini tidak menghasilkan rantai α dan hemoglobin mereka sebagian besar mengandung Hb Bart's dengan variabel persisten hemoglobin embrionik. Ini mencerminkan adanya hipoksia berat intra uteri, meskipun bayi ini mempunyai kadar hemoglobin kira-kira 8-9g/dl, sebagian besar darinya tidak mampu melepas oksigennya. Ini mencerminkan perubahan hidropik, suatu tumpahan masif dari sel darah merah berinti, dan hepatosplenomegali dengan hematopoeisis persisten pada hepar dan limpa.

F. Jumlah dan Lokasi Kromosomal Gena Globina Manusia

Hemoglobin adalah heterotetramer yang terdiri 2 sub unit polipeptid yang terkait dengan sub famili gena globin- α (α -like globin) dan 2 sub unit polipeptid yang terkait sub famili gena globin- β (β -like globin). Polipeptid globin mengikat hem, yang memungkinkan hemoglobin di dalam eritrosit mengikat oksigen secara reversibel dan mengangkutnya dari paru-paru untuk pernapasan jaringan. Pada manusia, seperti pada semua spesies vertebrata yang diteliti, perbedaan rantai globin like- α dan like- β disintesis pada tahap perkembangan progresif untuk menghasilkan hemoglobin karakteristik sel eritroid primitif (embrionik) dan definitif (fetal dan adult).

Jumlah dan komposisi sub unit dari hemoglobin manusia yang berbeda normal mendukung bahwa harus ada paling tidak satu gena globin pada masing-masing rantai globin yang berbeda : α , β , γ , δ , ϵ , dan ζ . Bukti dari penelitian varian hemoglobin dan heterogenitas biokimiawi dari rantai pada hemoglobin fetal (Hb F) menunjukkan bahwa gena globin- α dan $-\gamma$ adalah duplikat. Orang yang teridentifikasi memiliki sel darah merah yang mengandung lebih dari dua rantai globin- α yang berbeda secara struktural. Hal itu dapat dijelaskan dengan baik sebagai berikut, bahwa duplikasi lokus gena globin- α dan karakterisasi perbedaan struktural rantai globin- $^G\gamma$ dan $^{-A}\gamma$ dari Hb F membuat suatu kebutuhan terhadap duplikasi dari lokus gena globin- γ .

Penelitian mengenai pola pewarisan hemoglobin varian dari orang yang membawa baik varian rantai α dan rantai β , mengungkap bahwa gena globin- α dan globin- β berada pada kromosom yang berbeda (atau sangat jauh terpisah bila mereka berada pada kromosom yang sama). Varian rantai globin- α dan globin- β selalu terlihat terpisah secara independen pada keturunan dari orang tua yang terdampak secara ganda.

Akhirnya setelah beberapa penelitian yang berjenjang, dipastikan bahwa lokasi regio khusus dari gena globin- β adalah klaster pada lengan pendek kromosom 11 (11p15.5), dan gena globin- α adalah klaster pada lengan pendek kromosom 16 (16p13.3). Urutan berikutnya DNA dari keseluruhan kromosom manusia dan penjajaran dengan peta peta dari pita kromosom menempatkan klaster gena globin- β pada 11p15.4. Klaster gena globin- α hanya kira-kira 150 kbp dari telomere lengan pendek kromosom 16.

BAB 7

MEKANISME REGULASI PRODUKSI HEMOGLOBIN FETUS (Hb F) SEBAGAI ALTERNATIF TERAPI PENYAKIT TALASEMIA-BETA TERKINI

A. Pendahuluan

Talasemia- β adalah salah satu penyakit yang diturunkan secara genetik dengan angka prevalensi yang cukup tinggi. Penyakit genetik hematologi hereditas yang cukup tinggi angka prevalensi pembawa sifat di Indonesia, dan khusus di Banyumas mencapai angka 8,2%. Ada beberapa tata laksana terkini pada penyakit ini yaitu dengan mengurangi akumulasi kelebihan globin- α bebas. Langkah ini dilakukan dengan cara mengatur produksi globin- γ (mirip dengan globin- β) sedemikian rupa hingga tercapai kombinasi dengan globin- α membentuk Hb F ($\alpha_2\gamma_2$).

Produksi Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) ditingkatkan dengan cara menginduksi kadar globin- γ hingga mencapai kadar yang seimbang dengan kadar globin- α bebas. Globin- γ secara fisiologis hanya dihasilkan ketika masih janin sampai beberapa bulan paska kelahiran, selanjutnya diganti dengan globin- β melalui mekanisme pengalihan hemoglobin (*Hb Switching*). Induksi kadar globin- γ , yang pertama melalui jalur GATA-1 (diketahui sebagai faktor transkripsi di 5'UTR globin- γ), bila jalur ini diinduksi maka terjadi peningkatan ekspresi gena globin- γ . Namun jalur ini dapat direpresi dengan peningkatan kadar STAT3 yang terikat pada 5'UTR globin- γ sehingga terjadi penurunan ekspresi gena globin- γ . Jalur yang

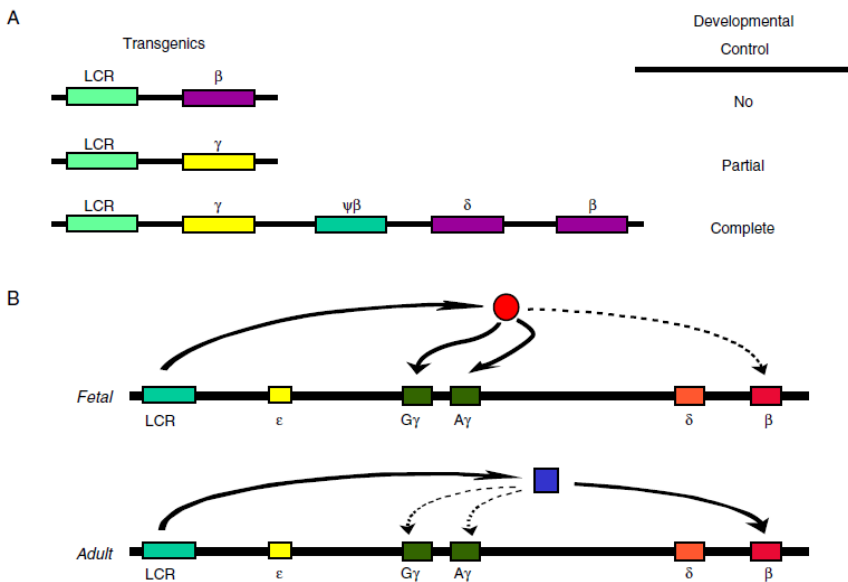
ke-2 adalah melalui jalur BCL11A yang akan mengurangi mRNA globin- γ , sehingga terjadi penurunan ekspresi gena globin- γ , berakibat produksi Hb F berkurang. Namun demikian ekspresi BCL11A dapat dihambat oleh miRNA-486-3p. Jalur ke-3 induksi ekspresi gena globin- γ adalah melalui jalur sinyal p38 MAPK/CREB yang akan memperkuat transkripsi globin- γ .

Senyawa aktif dari bahan herbal yaitu kurkumin dan 6-shogaol dapat memodulasi semua jalur induksi produksi Hb F di atas. Kurkumin dapat berperan dalam represi STAT3, meningkatkan miRNA dan juga menghambat P38 MAPK (tidak tergantung besarnya dosis). Efek 6-shogaol dapat menghambat STAT3 dan induksi ekspresi gena globin- γ dengan cara melalui jalur p38MAPK/CREB1. Kedua senyawa tersebut dapat digunakan dalam membantu memengaruhi seluruh faktor tersebut di atas sedemikian rupa sehingga dapat diduga mampu menginduksi produksi Hb F. Hal ini dapat digunakan sebagai alternatif penatalaksanaan penyakit talasemia yaitu mencegah penurunan Hb. Berangkat dari hal tersebut, maka alternatif terapi ini dapat mempunyai dampak yang besar dalam mengurangi komplikasi akibat terapi transfusi darah yang kontinyu sekaligus dapat meningkatkan kualitas hidup penderita talasemia maupun beban biaya yang ditanggung keluarga penderita dan pemerintah.

B. Hemoglobin Fetus (Hb F)

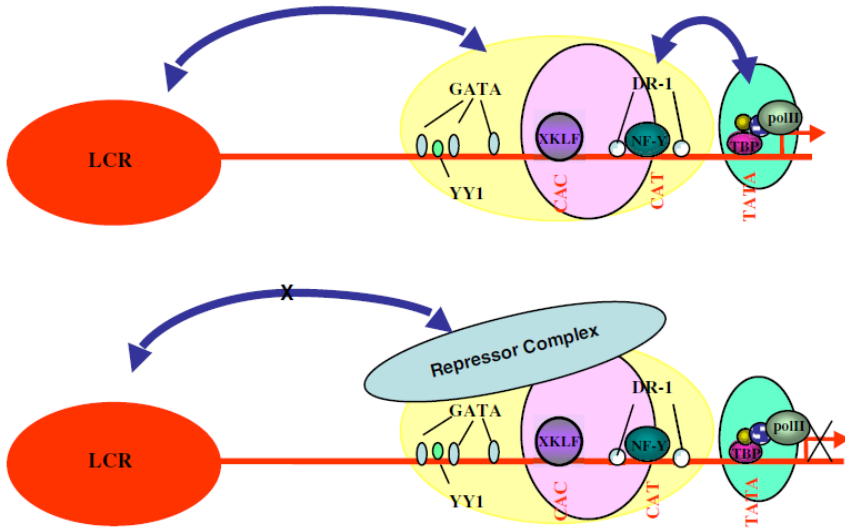
Saat di dalam kandungan, produksi rantai zetta (ζ) yang mirip dengan rantai globin- α embrionik berhenti lalu diganti dengan globin- α . Dalam waktu yang bersamaan, sintesis rantai epsilon (ϵ) – mirip globin- β embrionik juga berhenti lalu dan diganti dengan rantai globin- γ . Kedua rantai globin- α dan globin- γ ini bergabung maka terbentuk hemoglobin fetal ($\alpha_2\gamma_2$). Hemoglobin fetal ini yang bertanggung jawab atas transpor oksigen utama yang terjadi pada fetus manusia dalam waktu 11 bulan di dalam kandungan sampai 6 bulan setelah kelahiran. Secara fisiologis, Hb F mempunyai afinitas terhadap oksigen lebih tinggi dari kemampuan hemoglobin dewasa sehingga janin lebih kuat mengikat oksigen dari aliran darah ibunya. Ketika lahir, secara fisiologis produksi Hb F

dikurangi dan digantikan penuh oleh hemoglobin dewasa saat 6 bulan paska kelahiran. Namun pada kasus talasemia, produksi Hb F tetap dipertahankan sampai usia 3-5 tahun. Ketika dewasa, Hb F dapat diaktifkan kembali secara farmakologi seperti pada penatalaksanaan penyakit sel sabit. Pendekatan terapeutik induksi Hb F ini dimungkinkan karena pengembangan genetika manusia dapat mengungkap target molekuler melalui pendekatan terhadap regulator pengalihan/*Switching* Hb Fetal-Hb Adult) dan *Silencing* Hb F.



Gambar 7.1. Mekanisme kompetitif *switching* hemoglobin manusia saat fetal menjadi dewasa. (A). Tidak muncul kontrol perkembangan bila hanya salah satu gen globin- γ atau β yang terhubung dengan LCR. Berbeda ketika kedua gen lengkap berada pada kromosom normalnya terhubung dengan LCR, gen globin- γ hanya diekspresikan saat tahap fetal dan gen globin- β saat tahap dewasa. (B). Ilustrasi untuk memperlihatkan interpretasi terbaik terjadinya kompetisi gen globin fetal dan dewasa. Bila ada ligkungan transkripsional yang baik untuk interaksi gen globin- γ dengan LCR pada tahap fetal, mengakibatkan *silencing* ekspresi gen globin- β , begitu juga sebaliknya (Stamatoyannopoulos, 2005).

Pada penderita talasemia beta, kadar Hb F yang lebih tinggi mempunyai dampak besar dalam mengurangi tingkat keparahan penyakit ini dan telah diketahui secara kuat dalam 20 tahun terakhir. Jadi, penting dan sangat diperlukan untuk mengaktifkan kembali atau reaktivasi globin- γ pada sel eritroid dewasa yang menguntungkan bagi individu penderita hemoglobinopathi- β , termasuk talasemia.



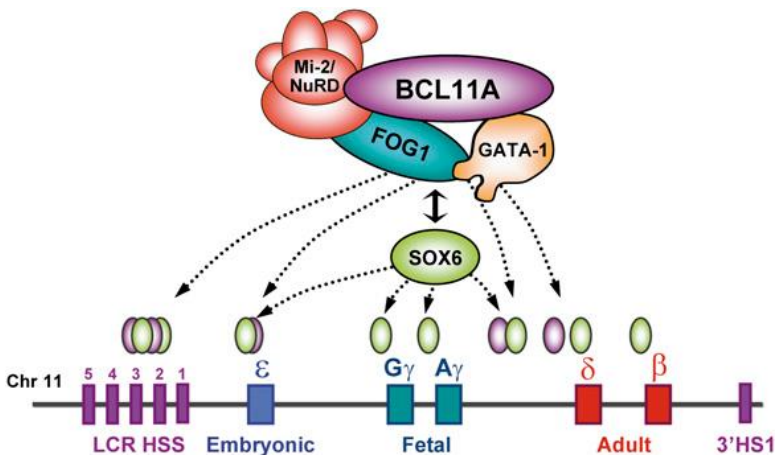
Gambar 7.2. Mekanisme *silencing autonom* dari *switching* hemoglobin. Semua urutan yang diperlukan untuk *silencing* harus berada di dalam proksimal sampai elemen regulatori gena. *Silencing* terjadi secara otonom, tidak ada kompetisi diantara gena globin yang terlibat. Ilustrasi ini untuk memperlihatkan *silencing* otonom pada gena globin- ϵ . Faktor transkripsional terikat pada urutan *silencing* yang berlokasi pada proksimal sampai distal promoter gena globin- ϵ dan membentuk suatu komplek represor yang merusak interkasi antara gena dengan LCR, berakibat penghentian ekspresi gena globin- ϵ (Stamatoyannopoulos, 2005).

C. Pengaturan Molekular Ekspresi Gena Globin- γ

Regulasi reaktivasi ekspresi globin- γ menjadi penting untuk dibahas dalam rangka terapi alternatif pasien talasemia beta, Prinsip dasar terapi melalui pengaturan ekspresi gen globin- γ adalah melakukan induksi globin- γ sehingga akan mengikat globin- α yang bebas membentuk Hb F. Kadar Hb F yang tinggi berefek terhadap perbaikan manifestasi klinis yang berat seperti yang terjadi pada penderita anemia sel sabit dan talasemia. Oleh karena itu, penting dibahas faktor-faktor transkripsi dan protein regulatori baik yang secara langsung terikat dalam promotor maupun regio regulatori lainnya. Regulator ekspresi gena globin- γ dibagi dalam 2 kelompok yaitu regulator negatif dan regulator positif.

1. Regulator Negatif Ekspresi Gena Globin- γ

a. Gena BCL11A



Gambar 7.3. Peran BCL11A dalam proses *silencing* ekspresi globin- γ melibatkan interaksi yang panjang dengan kluster globin- β dan interaksi lokal dengan protein SOX6 terkait-kromatin (Xu *et al.*, 2010).

Gena BCL11A (juga dikenal sebagai Evi9, Ctip1 suatu *encoding zinc finger transcription factor*) yang berfungsi sebagai regulator ekspresi Hb F ini posisinya ada di kromosom 2. Ekspresi bentuk *full-length* BCL11A yang melimpah berkembang pada sel eritroid dewasa. Pada prekursor eritroid manusia dewasa, *Down-Regulation* ekspresi BCL11A mengarah pada induksi Hb F secara sehat. Proses *silencing* ekspresi globin- γ melibatkan interaksi lokal dengan protein SOX6 terkait-kromatin dan interaksi yang panjang dengan kluster globin- β .

b. MicroRNA (miRNA/miR)

MicroRNA diketahui mempunyai fungsi dalam mengatur ekspresi multi gen pascatranskripsional. MicroRNA merupakan RNA non koding pendek rantai tunggal endogenus dengan panjang 19-25 nukleotid. miRNA matur mengatur ekspresi gen dengan cara terikat pada 3'UTR RNA target. Peeristiwa ini menyebabkan degradasi mRNA atau menghambat translasi menjadi protein fungsional seperti diferensiasi, pertumbuhan, proliferasi dan apoptosis sel.

Ada beberapa microRNA (miR) mempunyai peran penting dalam proses hematopoiesis, yaitu mempunyai implikasi terhadap proliferasi, diferensiasi spesifikasi sel, lalu etiologi dan progresi kanker. Bila terjadi perubahan yang spesifik pada ekspresi miR, maka akan menghasilkan fenotip defek hematopoetik yang berat. Beberapa miR teridentifikasi diduga kritikal terhadap perkembangan dan maturasi eritroid. Eritropoesis dapat ditingkatkan oleh miR-451 dan miR-144, namun dikontrol negatif oleh miR-150, miR-221, miR-223, dan miR-224.

Ada beberapa miR yang telah diketahui berperan penting dalam ekspresi gen globin, khususnya reaktivasi ekspresi gen globin- γ yang terkait dalam induksi sintesis Hb F. Berikut ini pernah dilaporkan terkait dalam induksi globin- γ yaitu miR-210, miR-221 dan miR-222. Peningkatan ekspresi miR-15a dan miR-16-1 pada sel eritroid manusia juga pernah dilaporkan dapat meningkatkan ekspresi gen hemoglobin embrional dan fetal.

Selain itu, miR-96 teridentifikasi sebagai regulator ekspresi Hb F yaitu melalui penghambatan secara langsung mRNA globin- γ pasca transkripsional. Penelitian genetik terkini fokus pada regulator pada *switching* hemoglobin maupun *silencing* ekspresi globin- γ pada orang dewasa, yaitu BCL11A. Peningkatan ekspresi yang berlebihan dari miR-486-3p yang terikat pada 3' UTR BCL11A pada sel eritroid berakibat penurunan kadar protein BCL11A, dan terkait dengan peningkatan ekspresi gena globin- γ .

2. Regulator Positif Ekspresi Gena Globin- γ

a. p38 MAPK

Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) adalah salah satu famili dari Ser/Thr kinase yang mempunyai anggota di antaranya yaitu p38, ERK, dan cjun amino terminal kinase (JNK). Awalnya teridentifikasi sebagai protein kinase yang diaktivasi oleh stress, tapi belakangan diketahui bahwa sinyaling p38 MAPK mengkoordinasikan respon selular selama eritropoeisis, terutama untuk sintesis hemoglobin. p38 MAPK berperan dalam memperkuat transkripsi gena dengan dengan cara memfosforilasi *cAMP response element binding protein 1* (CREB1) pada Ser 133 untuk mediasi aktivasi transkripsional. Sinyaling p38 mengatur transkripsi globin-G γ yaitu melalui CREB1 yang mengikat G γ -Globin *cAMP response element* (G-CRE) sehingga mengaktivasi ekspresi Hb F.

D. Curcumin dan 6-Shogaol

Curcumin merupakan senyawa polifenol dari tanaman *Curcuma Longa*, selain dapat digunakan sebagai obat-obat tradisional, pewarna makanan alami dan bumbu rempah-rempah, juga berfungsi sebagai anti inflamasi, antikanker, anti oksidan, anti virus; dan sitoprotektif. Selain itu, *curcumin* juga dilaporkan sebagai pengatur jalur sinyaling intra sel yang terkait dengan berbagai penyakit kronis, penghambat sinyaling p38 MAPK sehingga

menurunkan sinyal imun COX-2 dan iNOS pada *chronic experimental colitis*, serta menghambat sinyaling STAT3.

Curcumin memainkan peran juga dalam ekspresi gena melalui interaksi langsung dengan faktor-faktor transkripsi seperti *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B celss*(NF-kB), modulasi epigenetik melalui penghambatan terhadap DNA *methyltransferase I* (DNMT1), *histone acethyltransferase* (HAT), kompleks *histone deacetylase* (HDAC). Berbagai target molekular kurkumin di antaranya adalah inflamasi (Il-1,-2,-6,-8, TNF α), aktivitas kinase (MAPK, PKA, JAK), faktor transkripsi (CREB, STAT3, PPARY), aktivitas enzim (COX-2, INOS, MMP), dan lainnya (VEGF, adiponectin, ROS). Kurkumin dilaporkan secara bermakna mengembalikan ekspresi mir-199 dan -200 dengan gena target yang terkait sampai mendekati kadar normal. Kurkumin merupakan inhibitor STAT3 pada domain SH2. Penghambatan domain SH2, tidak hanya mengganggu aktivasi namun juga dimerisasi faktor transkripsi.

Di samping itu, *curcumin* juga bisa digunakan sebagai kemoprevensi berbagai sel kanker, mengatur ekspresi gena yang terlibat dalam jalur sinyaling selular melalui miRNA. Profil ekspresi miRNA dipengaruhi oleh *curcumin* pada sel kanker pankreatik dengan cara *up-regulation* maupun *down-regulation*. *Curcuminoid* juga dilaporkan menginduksi mRNA globin- γ dan peningkatan kadar Hb F pada kultur sel eritroid manusia. Senyawa *6-shogaol* mempunyai efek penghambatan terhadap STAT3 dan memacu ekspresi gena globin- γ melalui jalur p38MAPK/CREB1

Senyawa aktif bahan herbal lainnya yang mempunyai target molekular terkait regulasi Hemoglobin F adalah *6-shogaol*. *6-shogaol* merupakan bagian dari senyawa aktif gingerol yang ditemukan dalam jumlah sedikit pada akar jahe merah segar, namun ditemukan dalam jumlah besar pada akar jahe merah yang sudah dikeringkan secara termal, dengan *6-shogaol* yang paling banyak. Bila dibandingkan dengan analognya seperti *6-gingerol*, *8-gingerol* dan *10-gingerol*, ternyata *6-shogaol* merupakan penghambat aktivasi STAT3 yang paling poten. Di samping itu, dilaporkan juga bahwa *6-*

shogaol menekan ekspresi produk gena yang diatur oleh STAT3. Juga dilaporkan bahwa *6-shogaol* menyebabkan aktivasi JNK, p38 dan ERK, serta *downregulating* ekspresi p38 MAPK, NF- κ B dan COX-2 (Ha *et al.*, 2012). Oleh karena itu, *6-shogaol* dapat berperan dalam induksi Hemoglobin F.

E. Efek *curcumin* dan *6-shogaol* terhadap Kadar Hemoglobin F pada Sel line K562

Curcumin berpengaruh terhadap penurunan ekspresi mRNA gena STAT3 dan kadar p-p38 MAPK secara signifikan, serta peningkatan kadar Hb F. Namun demikian, *curcumin* berpengaruh tidak signifikan terhadap peningkatan ekspresi mRNA gena *Globin- γ* . Senyawa *6-shogaol* berpengaruh secara signifikan terhadap penurunan ekspresi mRNA gena STAT3 dan peningkatan kadar Hb F. Namun demikian, *6-shogaol* berpengaruh tidak signifikan terhadap penurunan kadar p-p38 MAPK, dan peningkatan ekspresi mRNA gena *Globin- γ* . Berdasarkan hal tersebut, dapat diambil kesimpulan bahwa *curcumin* dan *6-shogaol* dapat menginduksi Hb F melalui jalur STAT3, namun kurkumin lebih kuat pengaruhnya dibandingkan *6-shogaol* pada sel line K562 dalam waktu 96 jam.

F. Induksi Hemoglobin F sebagai Alternatif Terapi Talasemia-Beta Terkini

Pasien talasemia beta mengalami kerusakan sel eritrosit karena presipitasi akibat kelebihan rantai globin- α bebas di dalam prekursor eritroid sehingga menimbulkan anemia kronis. Saat ini terapi yang diberikan adalah transfusi sel darah merah secara rutin sepanjang hayat, ditambah obat khelasi besi. Alternatif terapi pada pasien talasemia-beta akibat kelebihan globin- α bebas adalah dengan reaktivasi/induksi ekspresi gena *Globin- γ* dengan obat tertentu maupun bahan herbal, transplantasi sel punca hematopoetik allogenik dan terapi gen. Indonesia sebagai salah satu negara yang sedang berkembang mempunyai banyak keterbatasan dalam terapi

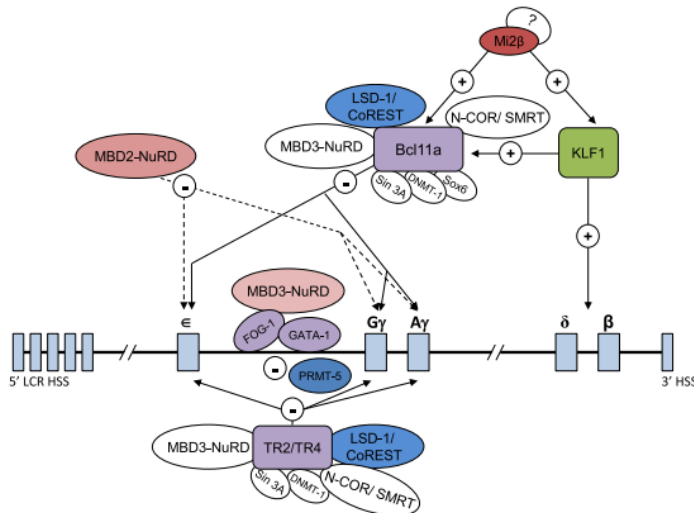
transplantasi maupun terapi gena. Oleh karena, itu pilihan terbaik terapi pasien talasemia beta adalah reaktivasi/induksi Globin- γ . Dengan demikian Globin- α bebas dapat bergabung dengan Globin- γ menggantikan Globin- β yang tidak terbentuk. Berangkat dari hal tersebut, maka induksi Hb F merupakan alternatif terapi yang paling *feasible* melalui agen farmakologi maupun herbal.

Salah satu agen farmakologi yaitu *Hydroxyurea* (HU) dapat menginduksi ekspresi Hemoglobin F. *Hydroxyurea* dapat melalui beberapa jalur molekular utama yaitu modifikasi epigenetik, jalur sinyaling dan proses pasca transkripsional. Terapi kombinasi antara HU dengan *knockdown* HDAC2 dapat meningkatkan ekspresi globin- γ . Selain itu, pada sel CD34⁺ dilakukan terapi dengan HU dan MS-275 (inhibitor HDAC 1,2 dan 3) dapat terjadi peningkatan relatif ekspresi gena *Globin- γ* . Pada sel K562, HU juga bisa meningkatkan diferensiasi eritroid melalui aktivasi p38 kinase.

Induksi Hemoglobin F kemungkinan juga dapat diatur secara pasca transkripsional, yaitu melalui jalur *the eukaryotic initiation factor 2 α* (eIF2 α) sebagai regulator pasca transkripsional Hb F. *Salubrinal*, sebagai agen aktivator *sinyaling* eIF2 α secara selektif dapat meningkatkan jumlah ribosom yang mentranslasi aktif pada mRNA *Globin- γ* melalui induksi eIF2 α terfosforilasi (p-eIF2 α). Melalui jalur ini, *Salubrinal* bisa meningkatkan translasi mRNA *Globin- γ* hingga kadar Hb F meningkat 4,5 kali lipat dengan tidak ada perubahan kadar mRNA $\gamma/(\gamma+\beta)$, diferensiasi sel, maupun isi Hb total.

Mekanisme lain dari induksi HbF adalah melalui penghambatan kerja protein DNMT1 dan LSD1. Protein ini memainkan peran penting dalam proses *silencing* gen pembentuk Hb F yang akan digantikan Hb A saat menjelang kelahiran manusia. Oleh karena itu, bila terjadi penghambatan terhadap protein DNMT1 dan LSD1, maka produksi HbF tetap tinggi. Eksplorasi interaksi antara *curcumin* dan *6-shogaol* terhadap protein DNMT1 dan LSD1 dapat dilakukan dengan metode *in silico* penambatan molekul. Metode ini mampu memprediksi ikatan kompleks antara protein

dengan senyawa dengan mempunyai kelebihan pada biaya murah dan waktu singkat dengan hasil cukup baik.

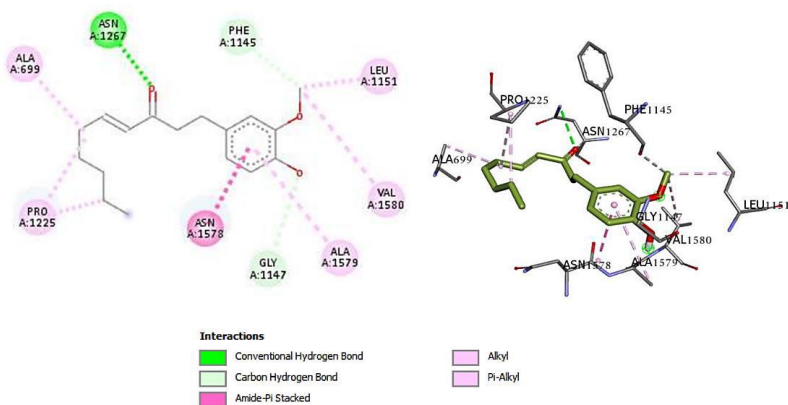


Gambar 7.4. Penghambatan ekspresi globin- γ oleh DNMT1 dan LSD1 (Ginder, 2015)

G. Hasil Penambatan *Curcumin* dan *6-Shogaol* terhadap Protein DNMT1 dan LSD1

Tiap ligan *curcumin* dan *6-shogaol* ditambatkan pada protein DNMT1 dan LSD1. Proses penambatan ini memakai aplikasi *AutoDock Vina*, menghasilkan sejumlah konformasi senyawa beserta energi ikatan yang ada pada setiap konformasi tersebut. Bila terdapat hasil konformasi dengan energi ikatan yang paling rendah, maka ini adalah konformasi terbaik. *Curcumin* mempunyai energi ikatan yang lebih rendah dibandingkan *6-shogaol* dalam hal pengikatan terhadap protein DNMT1 dan LSD1. Energi ikatan terendah dari *curcumin* dan *6-shogaol* terhadap protein DNMT1 berturut-turut -8,0 kkal/mol dan -6,5 kkal/mol. Adapun energi ikatan terendah dari *curcumin* dan *6-shogaol* terhadap protein LSD1 berturut-turut -10,1 kkal/mol dan -8,2 kkal/mol.

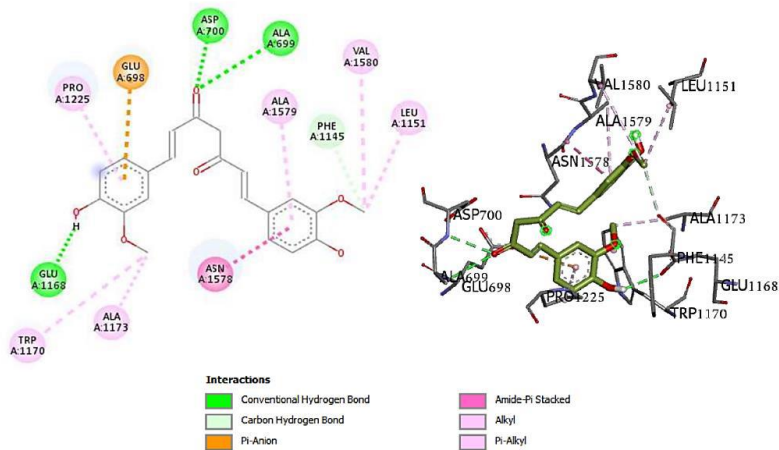
H. Visualisasi *Curcumin* dan *6-Shogaol* terhadap Protein-Protein DNMT1 dan LSD1



Gambar 7.5. Hasil visualisasi penambatan DNMT1 dengan 6-shogaol 2 dimensi dan 3 dimensi (Setyono *et. al*, 2021)

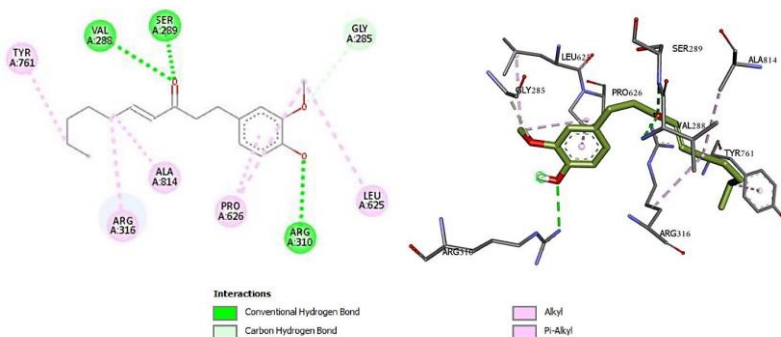
Ada 2 jenis ikatan/interaksi antara senyawa *6-shogaol* dengan protein DNMT1 kode 3SWR adalah ikatan hidrogen pada asam amino Asn1267, Phe1145, Gly1147 dan ikatan hidrofobik pada Asn1578, Ala1579, Val1580, Leu1151, Ala699, Pro1225. Berikut adalah asam amino-asam amino yang berperan penting dalam mengikat ligan inhibitor pada DNMT1 adalah Phe1145, Gly1147, Asn1578, Ala1579, Val1580, dan Pro1225. Asam amino tersebut sama dengan hasil penambatan dengan *6-shogaol*.

Ada 2 jenis ikatan/interaksi antara senyawa *curcumin* dengan protein DNMT1 kode 3SWR adalah ikatan hidrogen pada asam amino Asp700, Glu1168, Ala699, Phe1145 dan ikatan hidrofobik pada Pro1225, Trp1170, Ala1173, Asn1578, Ala1579, Val1580 dan Leu1151. Berikut adalah asam amino-asam amino yang berperan penting dalam mengikat ligan inhibitor pada DNMT1 adalah Glu1168, Phe1145, Pro1225, Trp1170, Asn1578, Ala1579 dan Val1580. Asam amino tersebut sama dengan yang terikat pada hasil penambatan dengan *curcumin*.



Gambar 7.6. Hasil visualisasi penambatan DNMT1 dengan *curcumin 2* dimensi dan 3 dimensi (Setyono *et. al*, 2021)

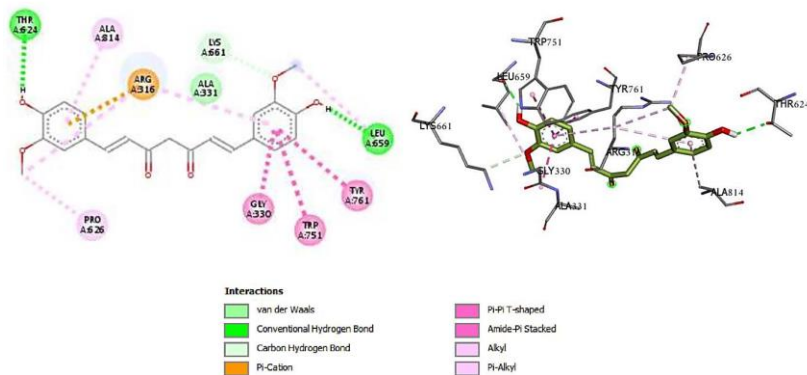
Ikatan yang terjadi antara senyawa *6-shogaol* dengan protein LSD1 kode 6KGP yaitu ikatan hidrogen pada Val288, Ser289, Arg310 dan Gly285. Berikut ini adalah asam amino yang berperan penting dalam peningkatan aktivitas inhibitor terhadap protein LSD1 adalah Val288, Ser289, Gly314, Tyr624 dan Lys661. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa *6-shogaol* mempunyai peran penting dalam aktivitas inhibitor protein LSD1, karena hasil penambatan memperlihatkan adanya ikatan dengan dua asam amino tersebut.



Gambar 7.7. Hasil visualisasi penambatan LSD1 dengan *6-shogaol 2* dimensi dan 3 dimensi (Setyono *et. al*, 2021)

Ikatan yang terjadi antara senyawa *curcumin* dengan protein LSD1 kode 6KGP yaitu ikatan hidrogen pada Thr624, Leu659, dan Lys661. Berikut ini adalah asam amino yang berperan penting dalam peningkatan aktivitas inhibitor terhadap protein LSD1 yaitu Thr624 dan Lys661. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa *curcumin* mempunyai peran penting dalam aktivitas inhibitor protein LSD1, karena hasil penambatan memperlihatkan adanya ikatan hydrogen dengan dua asam amino tersebut.

Secara keseluruhan, masing-masing hasil penambatan antara senyawa *curcumin* dan 6-*shogaol* dengan DNMT1 adalah terdiri atas empat ikatan hidrogen dan tujuh interaksi hidrofobik. Khusus *curcumin* dengan DNMT1 mempunyai ikatan elektrostatis pada asam amino Glu698 dan ini tidak dimiliki oleh 6-*shogaol*. Selain itu, ikatan hidrogen konvensional mendominasi pada *curcumin* dengan tiga ikatan, padahal ikatan jenis ini lebih kuat dibandingkan ikatan hidrogen karbon. Pada senyawa 6-*shogaol* yang mendominasi adalah ikatan hidrogen karbon sebanyak tiga ikatan.



Gambar 7.8. Hasil visualisasi penambatan LSD1 dengan *curcumin* 2 dimensi dan 3 dimensi (Setyono *et. al.*, 2021)

Hasil penambatan dengan protein LSD1, *curcumin* mempunyai dua buah ikatan hidrogen konvensional dengan atom H-O yang terlibat, telah diketahui bahwa kedua atom ini mempunyai perbedaan keelektronegatifan yang besar dan dapat diartikan bahwa ikatan ini lebih

kuat dibandingkan dengan N-O. *Curcumin* mempunyai satu buah ikatan hidrogen karbon dengan LSD1. Pada 6-shogaol, hasil penambatan dengan protein LSD1 walaupun mempunyai tiga ikatan hidrogen konvensional tetapi melibatkan dua atom N-O yang mempunyai perbedaan keelektronegatifan lebih kecil dibandingkan H-O. Ada kelebihan lain dari kurkumin dibandingkan dengan 6-shogaol yaitu kurkumin mempunyai satu buah ikatan elektrostatik pada Arg316 dan jumlah interaksi hidrofobik yang lebih banyak.

Berdasarkan hal tersebut di atas, maka dapat diketahui bahwa *curcumin* berpotensi menghambat protein DNMT1 dan LSD1 yang lebih kuat dibandingkan dengan 6-shogaol disebabkan *curcumin* mempunyai energi ikatan yang lebih rendah dan jenis ikatan yang terlibat lebih kuat. Selanjutnya apabila protein DNMT1 dan LSD1 yang berikatan dengan BCL11A dihambat, maka dapat diharapkan berpotensi penghentian mekanisme *switch off* hemoglobin fetal oleh BCL11A. Oleh sebab itu, *curcumin* dan 6-shogaol berpotensi dapat menginduksi produksi HbF dengan melakukan penghambatan terhadap protein DNMT1 dan LSD1, sehingga dapat digunakan sebagai alternatif terapi pada penyakit talasemia beta.

BAB 8

KESIMPULAN

Induksi Hb F berpotensi sebagai alternatif terapi talasemia beta saat ini. Mekanisme regulasi induksi Hb F dapat melalui berbagai jalur ekspresi gena *Globin- γ* . Ekspresi gena *Globin- γ* dapat ditingkatkan melalui penghambatan STAT3, peningkatan fosforilasi p38-MAPK dan penghambatan BCL11A. Ada jalur lainnya yaitu melalui jalur *the eukaryotic initiation factor 2 α* (eIF2 α) yang merupakan regulator pasca transkripsional Hb F. Bila jalur ini diaktifkan, maka terjadi peningkatan translasi mRNA *Globin- γ* sehingga terjadi peningkatan kadar Hb F. Beberapa senyawa telah ditemukan sebagai agen induksi Hb F, baik senyawa dari bahan herbal maupun obat. Senyawa tersebut adalah *curcumin*, 6-shogaol, salubrinal dan hidroxyurea. Langkah selanjutnya adalah mengembangkan senyawa tersebut menjadi preparat dalam bentuk, tablet, sirup maupun sediaan lain yang dapat digunakan sebagai terapi pada pasien talasemia beta.

DAFTAR PUSTAKA

- Aman, A.K., 2003, *Klasifikasi, Etiologi dan Aspek Laboratorik pada Anemi Hemolitik*, Repository FK USU, Medan.
- Basak, A. and Sankaran, V. G., 2016, “Regulation of the Fetal Hemoglobin Silencing Factor” BCL11A., *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 1368 (1) : 25–30, DOI: 10.1111/nyas.13024.
- Bauer, D.E., Kamran, S.C., and Orkin, S.H., 2012, “Reawakening Fetal Hemoglobin : Prospects for New Therapies for The β -Globin Disorders”, *Blood*, 120 (15) : 2945 – 2953. DOI 10.1182/blood 2012-06-292078.
- Bauer, D.E., and Orkin, S.H., 2015, “Hemoglobine Switching’s Surprise : The Versatile Transcription Factor BCL11A is a Master Repressor of Fetal Hemoglobin”, *Curr. Opin. Genet. Dev*, 33: 62-70. DOI : 10.1016/j.gde.2015.08.001.
- Cao, A., and Moi, P., 2002, “Regulation of the Globin Genes”, *Pediatr Res*, 51(4): 415–421.
- CDC, 2015, *Hemoglobinopathies : Current Practice for Screening, Confirmation and Follow-up*, Association of Public Health Laboratories, USA.
- Dreuzy, E., Bhukhai, K., Leboulch, P., and Payen, E., 2016, “Current and Future Alternative Therapies for Beta-Thalassemia Major”, *Biomed. J*, 39 : 24-38, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bj.2015.10.001>.
- Drew Provan, John Gribben, 2010, *Molecular Hematology*, 3rd Ed, Willey-Blackwell, UK.
- Ernst, P., (auth.), Wickrema, A., Kee, B (eds.), 2009, *Molecular Basis of Hematopoiesis*, Springer-Verlag, New York.

- Ginder G. D. 2015, 'Epigenetic Regulation of Fetal Globin Gene Expression in Adult Erythroid Cells', *Translational research : the Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, Vol. 165, No. 1, pp. 115–125, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2014.05.002>.
- Hattangadi, S.M., Wong, P., Zhang, L., Flygare, J., and Lodish, H.F., 2011, "From Stem Cell to Red Cell: Regulation of Erythropoiesis at Multiple Levels by Multiple Proteins, RNAs, and Chromatin Modifications", *Blood*, 118 (14) : 6258-6268 DOI 10.1182/blood-2011-07-356006.
- Higgs, D.R., Engel, J.D., and Stamatoyannopoulos, G., 2012, "Thalassaemia", *Lancet*, 379: 373–83. DOI:10.1016/S0140-6736(11)60283-3
- Hoffman, R., Furie, B., McGlave, P., Silberstein, L.E., Shattil, S.J., Benz Jr, E.J., Heslop, H., 2009, *Hematology Basic Principles and Practice*, 5th Edition, Churchill Livingstone
- Ivanovs, A., Rybtsov, S., Ng, E.S., Stanley, E.G., Elefanty, A.G., and Medvinsky, A., 2017, "Human Haematopoietic Stem Cell Development: from the Embryo to The Dish", *Development*, 144, 2323-2337 doi:10.1242/dev.134866.
- Liang, R., and Ghafarri, S., 2016, "Advances in Understanding The Mechanisms of Erythropoiesis in Homeostasis and Disease", *British Journal of Haematology*, 174:661–673 doi: 10.1111/bjh.14194
- Makala, L.H., Torres. C.M., Clay, E.L., Neumert, C., and Pace, B.S., 2014, "Fetal Hemoglobin Induction β -Hemoglobinopathies : From Bench to Bedside", *J Hematol Transfus*, 2 (2):1018,
- Metcalf, D., 1998, "Regulatory Mechanisms Controlling Hematopoiesis: Principles and Problems", *Stem Cells*, 16(suppl 1):3-11
- Mussolino, C., and Strouboulis, J., 2021, "Recent Approaches for Manipulating Globin Gene Expression in Treating

- Hemoglobinopathies”, *Front Genome Ed.* 3:618111. doi: 10.3389/fgeed.2021.618111
- Porwit, A., McCullough, J., Erber, W.N., 2011, *Blood and Bone Marrow Pathology*, 2nd Edition, Churchill Livingstone.
- Rujito, L., Sunnaya, J., Basalamah, M., Setyono, J., dan. Siswandari, W., 2014, “Deteksi Pembawa Sifat Thalassaemia di Banyumas Menggunakan Capillary Electrophoresis”, *J Indon Med Assoc*, 64 (6) : 275-280
- Rujito, L., 2019, *Talasemia : Genetik Dasar dan Pengelolaan Terkini*, Unsoed,
- Sankaran, V.G., Xu, J., and Orkin, S.H., 2010, “Advances in The Understanding of Haemoglobin Switching”, *Br J Haematol.* 149(2): 181–194.
- Sankaran, V.G., and Nathan, D.G., 2010, “Reversing the Hemoglobin Switch”, *N Engl J Med*, 363 (23) : 2258 – 2260.
- Sarmoko, Ekowati H, Setiono J, 2014, “The Synergistic Effect of Curcuma xanthorrhiza, Curcuma longa, Zingiber Officinale As Co-chemotherapy Agent with Doxorubicin on MCF-7 Cell Line”, The International Conference New Development of Pharmaceutical Care in Pharmacogenetic and Pharmacogenomic Approach, UMM, Malang.
- Setyono, J., Harini, I.M., Sarmoko, S., and Rujito, L., 2019, “Supplementation of Curcuma Domestica Extract Reduces Cox-2 and inos Expression on Raw 264.7 Cells”, *J. Phys. Conf. Ser.* 1246 012059, IOP Publishing. doi:10.1088/1742-6596/1246/1/012059
- Setyono, J., Sadewa, A. H., Meiyanto, E. and Mustofa, M., 2020, “Curcumin and 6-Shogaol Increase Hemoglobin F Levels by Inhibiting Expression of STAT3 mRNA Gene in K562 Line Cell”, *IJPHRD*, DOI: 10.37506/v11/i1/2020/ijphrd/194002
- Setyono, J., Nurani, S.C., Fareza, M.S., Fadlan, A., and Sarmoko., 2021, “Molecular Docking of 6-Shogaol and Curcumin on DNMT1 and

- LSD1 as Potential Agents for Thalassemia Treatment”, *JKPK*, 6 (3) : 326-334.
- Smith, B.R., 1990, “Regulation of *Hematopoiesis*”, *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 63, 371-380.
- Stamatoyannopoulos, G., 2005, “Control of Globin Gene Expression During Development and Erythroid Differentiation”, *Exp Hematol*, 33(3): 259. doi:10.1016/j.exphem.2004.11.007.
- Stefanska, M., Batta, K., Patel, R., Florkowska, M., Kouskoff, V., and Lacaud, G., 2017, Primitive Erythrocytes are Generated from Hemogenic Endothelial Cells”, *Scientific Reports*, 7: 6401, DOI:10.1038/s41598-017-06627-9
- Steinberg, M.H., Forget, B.G., Higgs, D.R., Weatherall, D.J., 2009, *Disorders of Hemoglobin Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management*, 2nd Edition, Cambridge University Press.
- Suzuki, M., Yamamoto, M. and Engel, J.D., 2014, “Fetal Globin Gene Repressors as Drug Targets for Molecular Therapies to Treat the β -globinopathies”, *Mol. Cell. Biol*, 34 (19) : 3560–3569, DOI: 10.1128/MCB.00714-1.
- Tumburu, L., and Thein, S.L., 2017, “Genetic Control of Erythropoiesis”, *Curr Opin Hematol*, 24:173–182 DOI:10.1097/MOH.0000000000000333.
- Vandekerckhove, J., Courtois, G., Coulon, S., Ribeil, J-A., Hermine O., 2009, Regulation of Erythropoiesis: CAP.2, *EBMT*, 16 (03): 44 – 87, http://www.esh.org/files/doc/IRON2009_CAP.2%2844-87%29.pdf.
- Wilber, A., Nienhuis, A.W., and Persons, D.A., 2011, “Transcriptional Regulation of Fetal to Adult Hemoglobin Switching: New Oherapeutic Opportunities”, *BLOOD*, 117(15):3946-3953 DOI 10.1182/blood-2010-11-316893.
- Xu, J., Sankaran, V.G., Ni, M., Menne, T.F., Puram, R.V., Kim, W., and Orkin, S.H., 2010, “Transcriptional Silencing of γ -globin by

BCL11A Involves Long-range Interactions and Cooperation with SOX6”, *Genes Dev*, 24:783–798.

Yamane, T., 2020, “Cellular Basis of Embryonic Hematopoiesis and Its Implications in Prenatal Erythropoiesis”, *Int. J. Mol. Sci.*, 21: 9346; doi:10.3390/ijms21249346.

Zivot, A., Lipton, J., Narla, A., and Blanc, L., 2018, “Erythropoiesis: Insights into Pathophysiology and Treatments in 2017”, *Molecular Medicine*, 24:11 <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0011-z>.

DAFTAR ISTILAH (*GLOSSARIUM*)

Allogenic adalah sel yang diperoleh dari donor dengan spesies yang sama.

Antibodi monoklonal adalah antibodi monospesifik yang dapat mengikat satu epitop saja. Antibodi monoklonal ini dapat dihasilkan dengan teknik hybridoma.

Asam amino adalah senyawa organik yang memiliki gugus fungsi karboksil ($-\text{COOH}$) dan amina (biasanya $-\text{NH}_2$), serta rantai samping (gugus R) yang spesifik untuk setiap jenis asam amino.

Embriogenesis adalah pembuahan atau fertilisasi yang meliputi pembelahan sel dan pengaturan di tingkat sel.

Enukleasi adalah proses pengangkatan inti sel yang mengacu pada pelepasan inti dari sebuah sel.

Fosforilasi adalah penambahan gugus fosfat pada suatu protein atau molekul organik lain.

Gen adalah suatu lokasi tertentu pada genom yang berhubungan dengan pewarisan sifat dan dapat dihubungkan dengan fungsi sebagai regulator (pengendali), sasaran transkripsi, atau peran-peran fungsional lainnya.

Hemoglobin adalah metaloprotein (protein yang mengandung zat besi) di dalam sel darah merah yang berfungsi sebagai pengangkut oksigen dari paru-paru ke seluruh tubuh,[1] pada mamalia dan hewan lainnya.

Homeostasis adalah proses dan mekanisme otomatis yang dilakukan makhluk hidup untuk mempertahankan kondisi konstan agar tubuhnya dapat berfungsi dengan normal, meskipun terjadi perubahan pada lingkungan di dalam atau di luar tubuh.

Ikatan peptida adalah ikatan yang terbentuk ketika atom karbon pada gugus karboksil suatu molekul berbagi elektron dengan atom nitrogen pada gugus amina molekul lainnya. ikatan peptida hanya terdapat pada protein.

- Ikatan hidrogen adalah sejenis gaya tarik-menarik antar molekul atau antar dipol-dipol yang terjadi antara dua muatan listrik parsial dengan polaritas yang berlawanan.
- Khelasi adalah pengikatan suatu atom dengan suatu ligan yang mengikatnya pada dua atau lebih lokasi ikatan.
- Kurkumin (bahasa Inggris: *diferuloylmethane*) adalah senyawa aktif yang ditemukan pada kunir, berupa polifenol dengan rumus kimia $C_{21}H_{20}O_6$.
- microRNA atau miRNA, adalah segolongan asam ribonukleat (RNA) berkas tunggal berukuran kecil (panjang antara 21 hingga 24 nukleotida).
- Ontogeni (atau ontogenesis, morfogenesis) adalah mendeskripsikan asal usul dan perkembangan organisme sejak dari telur yang dibuahi ke bentuk dewasanya.
- Prekursor adalah senyawa yang berpartisipasi dalam reaksi kimia yang menghasilkan senyawa lain, merujuk lebih khusus pada senyawa kimia yang mendahului senyawa lain dalam suatu jalur metabolisme.
- Protein adalah kelompok biomolekul berukuran besar yang terbentuk dari satu rantai panjang asam amino atau lebih.
- Sel darah merah (eritrosit) adalah jenis sel darah yang paling banyak dan berfungsi mengikat oksigen.
- Sel progenitor adalah sel dengan kemampuan untuk terdiferensiasi menjadi suatu jenis sel tertentu.
- Sel stromal adalah sel yang membentuk jaringan penghantar atau stroma. Fibroblas, perisit, sel endotelial merupakan jenis umum sel stromal.
- Sitokin adalah kategori luas dari protein kecil (~ 5-20 kDa) yang penting dalam pensinyalan sel. Pelepasan sitokin memengaruhi perilaku sel di sekitarnya.
- Transkripsi adalah pembuatan RNA terutama mRNA dengan menyalin sebagian berkas DNA oleh enzim RNA polymerase.
- Yolk sac adalah kantung bermembran yang melekat pada embrio, yang dibentuk oleh sel-sel dari hipoblas yang berdekatan.

INDEKS

6

6-shogaol, 2, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 83

A

allogenik, 2, 75
anemi sideroblastik, 7
antigen, 7, 8
autophagy, 14

B

BCL11A, 2, 57, 68, 71, 72, 73, 81, 83, 84, 88
BFU-E, 11, 15, 16, 17, 18, 25, 35, 36, 38
BPJS Kesehatan, 2

C

CFU-E, 11, 15, 16, 17, 18, 25, 35, 36, 37, 38
cincin hem, 9
Common Lymphoid Progenitor, 8
Common Myeloid Progenitor (, 8
CREB I, 3
curcumin, 2, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 83, 94

D

delesi, 49, 53, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64

differensiasi, 3, 4, 7, 11, 14, 18, 22, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 76

Differensiasi, 7, 11, 16, 19

distal, 6, 49, 59, 70

DNMT1, 74, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 86

E

EKLF, 10, 18, 19, 30, 31, 45
eIF2 α , 76, 83
embriogenesis, 4, 10, 21
Emp, 12, 13, 33
EPO, 9, 11, 13, 16, 17, 18, 35, 38
eritroid, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 42, 45, 55, 66, 70, 72, 74, 75, 76
Eritropoeisis, 4, 5, 6, 10, 15, 16, 20, 24, 25, 26, 32, 33, 35
eritropoeitin, 6, 9, 24, 25, 37, 54, 58
Eritrosit, 9
erythroblast macrophage protein, 12, 33
Erythroid Kruppel-like Factor, 19
erythroblast islands, 11

F

faktor transkripsi, 3, 8, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 27, 32, 38, 44, 45, 47, 57, 67, 71, 74
fosforilasi, 3, 17, 18, 29, 83

frameshift, 53, 54

G

GATA-1, 3, 10, 18, 19, 20, 27, 28, 29,
30, 31, 32, 45, 67
gena globin- α , 1, 22, 31, 42, 43, 46, 47,
58, 59, 60, 61, 62, 65, 66
Genotip, 54, 58, 64
gingerol, 74
globin- β , 1, 20, 21, 22, 31, 43, 45, 49,
50, 59, 61, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 71,
72
Gower I, 4
Gower II, 4
granulocyte colony stimulating factor,
8
*granulocyte-macrophage colony
stimulating factor*, 8
granulositik, 7, 8
Growth-promoting cytokines, 8

H

Hb switching, 2
HbA, 6, 40, 47
HDAC2, 76
Hematopoiesis, 4, 7
Hematopoietic stem cells, 4, 7, 8
hemoglobin, 1, 2, 3, 4, 5, 9, 11, 14, 15,
20, 23, 31, 35, 40, 41, 44, 46, 47, 48,
53, 55, 56, 57, 58, 61, 63, 64, 65, 66,
67, 68, 69, 70, 72, 73, 81, 84, 87
hemopoeitik, 4, 6, 7, 8, 57
HIF1 α , 17
Hydroxyurea, 76

I

ICAM-4, 12, 33
ikatan hidrofobik, 78

induksi Hb F, 2, 69, 72, 76, 83

J

janin, 10, 16, 31, 62, 67, 68
Janus Kinase, 17

K

khelasi besi, 2, 75
kromosom Philadelphia, 7

L

LCR, 20, 21, 31, 43, 45, 69, 70
ligan inhibitor, 78
Locus Control Region, 20, 21, 43

M

makronormoblastik, 6
makrositik, 5, 6
maturasi, 4, 5, 9, 10, 12, 14, 16, 17, 18,
19, 20, 26, 28, 31, 33, 34, 35, 36, 37,
54, 72
MCV, 6
megakaryosit, 4, 6, 45
megaloblastik, 4, 5
mesoderm, 4
MicroRNA, 20, 72
molekuler, 2, 3, 24, 28, 30, 48, 53, 58,
59, 60, 63, 69, 74
mutasi, 1, 29, 36, 43, 48, 49, 50, 51, 52,
53, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 64
myeloid, 4, 6, 7, 8, 31

N

natural killer, 8

O

Ontogeni, 14, 90
Overekspresi, 32

P

p38 MAPK, 3, 68, 73, 74, 75
pembawa sifat, 1, 67
penambatan, 76, 77, 78, 79, 80, 81
pluripoten, 4, 7, 8
Portland, 4, 40
progenitor, 7, 8, 9, 11, 16, 18, 24, 25,
28, 31, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 90
proksimal, 6, 49, 70
Proliferasi, 7

R

Rac GTPase, 34
Ras/Raf, 17
Regio, 4, 28, 45, 52, 60
remodeling, 21
retikulum endoplasmik, 14
ribosomal, 14

S

Salubrinal, 76
sel line K562, 75
sel punca, 2, 75
sel stem pluripoten, 4
shogaol, 2, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 79,
80, 81, 83, 94
STAT, 3
stem cell factor, 18, 25
stromal microenvironment, 11

T

Talasemia, 1, 2, 49, 54, 58, 59, 60, 62,
63, 64, 65, 67, 75
talasemia- α , 1, 58, 59, 60, 61, 62, 64,
65
talasemia- β , 1, 2, 31, 58, 63, 64, 65
terapi gen, 2, 75
The Burst-Forming Unit Erythroid, 11
The Colony-Forming Unit Erythroid, 11
transplantasi, 2, 35, 75

U

upstream, 20, 21, 42, 45, 54, 59, 60

V

VCAM-1, 12, 33
visualisasi, 78, 79, 81

W

WHO, 1

X

Xq13, 62

Y

yolk sac, 4, 10, 14, 15, 16, 17, 47

Z

ZBP-89, 30, 32
zinc finger, 19, 27, 30, 31, 32, 72

Aspek Biomolekuler Hemoglobin dan Mekanisme Regulasi Produksi Hemoglobin Fetus (Hb F) sebagai Alternatif Terapi Penyakit Talasemia-Beta Terkini

Saat ini ada beberapa alternatif terapi talasemia- β mayor yaitu pemberian transfusi beserta obat khelasi besi, transplantasi sel punca allogenik, induksi Hb F dan terapi gen. Pemberian transfuse darah dan obat khelasi besi berpotensi menimbulkan komplikasi dan berbiaya tinggi, sedangkan terapi transplantasi sel punca allogenik dan terapi gen berpotensi mengandung onkogen, maka salah satu pendekatan terapi terkini yang potensial pada talasemia- β yaitu stimulasi peningkatan produksi hemoglobin F. Induksi Hb F pada kadar yang tinggi adalah penting untuk menurunkan tingkat keparahan talasemia- β , sehingga menyebabkan perbaikan dalam mengurangi hemolisis, inefektivitas eritropoesis, dan akhirnya meningkatkan kadar hemoglobin total. Ada senyawa aktif dari herbal alami tanaman jahe merah dan temulawak yaitu *6-shogaol* dan *curcumin* yang dapat mempengaruhi produksi Hb F melalui beberapa jalur molekuler yang ada.

Produksi Hb F dapat diatur melalui beberapa jalur molekuler, di antaranya adalah aktivitas pengalihan hemoglobin (*Hb switching*) dari Hb Fetus ke Hb dewasa yang diatur oleh regulator baru yaitu BCL11A (*B-cell lymphoma/leukemia 11A*). Jalur ini dilaporkan mempunyai aktivitas sebagai represor globin- γ . Ada jalur lain dalam memengaruhi produksi Hb F yaitu melalui jalur *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT) dengan cara penghambatan ekspresi gena globin- γ . Selain BCL11A dan STAT ada jalur molekuler lain dalam mengatur transkripsi gena globin- γ yaitu jalur *p38 mitogen activated protein kinase* (p38 MAPK) melalui proses fosforilasi *cAMP response element binding protein 1* (CREB I). Adapau CREB I ini mengatur ekspresi dari GATA-1 dan GATA-1 merupakan master regulator faktor transkripsi diferensiasi eritroid sehingga berperan penting dalam hematopoeisis normal.

Berdasarkan mekanisme molekuler dan peran genetik yang terkait dengan pengaturan kadar Hb F di atas, maka diharapkan buku referensi ini dapat memberikan gambaran potensi terapeutik terkini talasemia beta yang lebih baik dalam rangka peningkatan kualitas hidup penderita dan memberikan gambaran jalur mekanisme molekuler yang mendasari pemahaman regulasi ekspresi gena globin pembentuk hemoglobin fetal.



UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN
Gd. UNSOED Press
Jalan Prof. Dr. H.R. Boenjamin 708 Purwokerto
Kode Pos 53122 Kotak Pos 115
Telepon (0281) 626070
Email: unsoedpresspwt@gmail.com

ISBN 978-623-465-061-7



9

786234

650617

Buku Referensi Aspek Biomolekuler_lengkap. joko setyono

by Joko Setyono

Submission date: 27-Mar-2023 01:14PM (UTC+0700)

Submission ID: 2047774025

File name: BukuReferensiAspekBiomolekuler_lengkap._joko_setyono.pdf (3.98M)

Word count: 23468

Character count: 150328

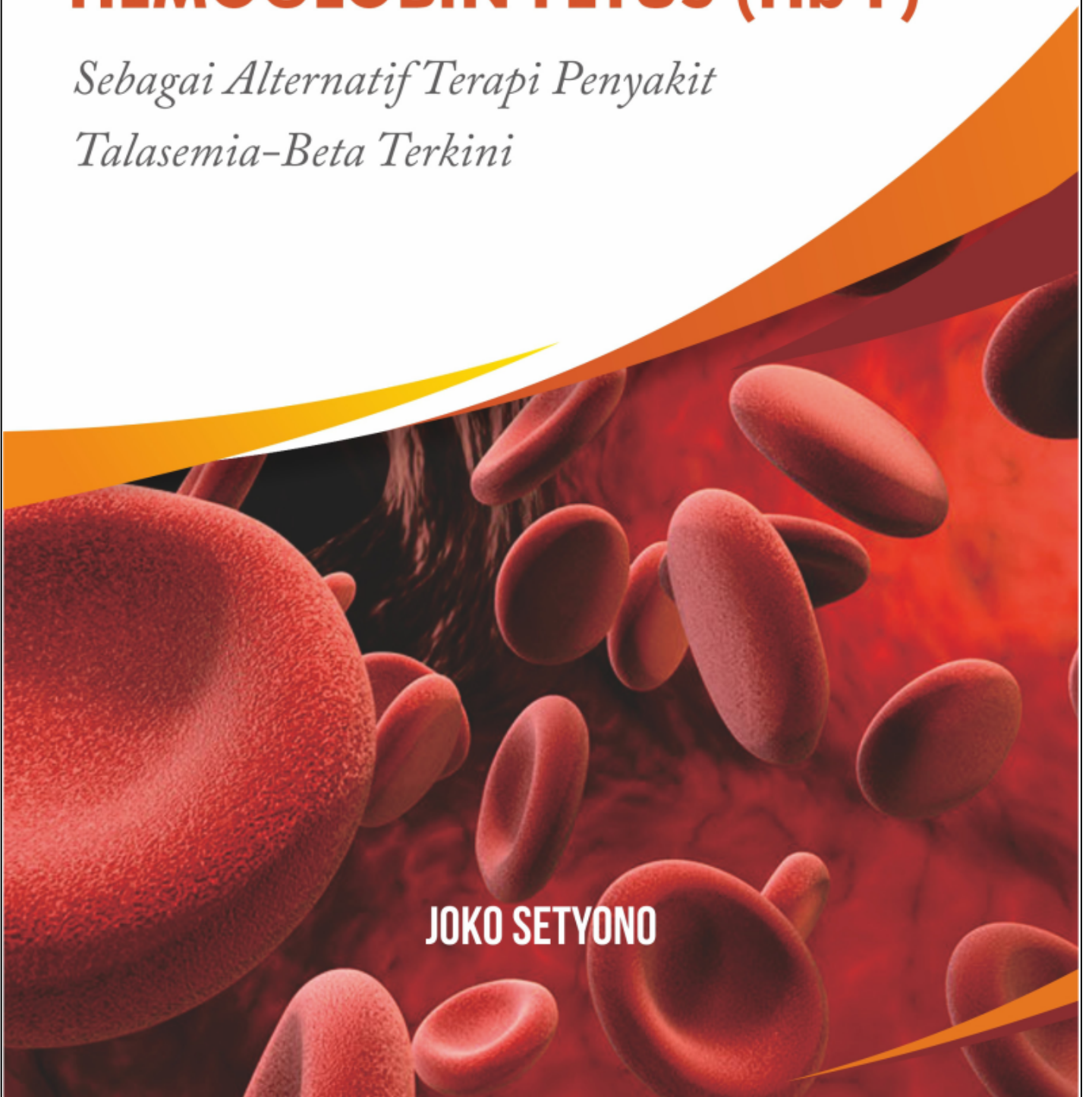
Buku Referensi



ASPEK BIOMOLEKULER HEMOGLOBIN DAN MEKANISME REGULASI PRODUKSI **HEMOGLOBIN FETUS (Hb F)**

*Sebagai Alternatif Terapi Penyakit
Talasemia-Beta Terkini*

JOKO SETYONO



**ASPEK BIOMOLEKULER HEMOGLOBIN
DAN MEKANISME REGULASI PRODUKSI
HEMOGLOBIN FETUS (Hb F)
SEBAGAI ALTERNATIF TERAPI PENYAKIT
TALASEMIA-BETA TERKINI**

Joko Setyono



Penerbit

Universitas Jenderal Soedirman

2022

Buku Referensi

**ASPEK BIOMOLEKULER HEMOGLOBIN DAN MEKANISME
REGULASI PRODUKSI HEMOGLOBIN FETUS (HB F)
SEBAGAI ALTERNATIF TERAPI PENYAKIT
TALASEMIA-BETA TERKINI**

© 2022 ¹ Universitas Jenderal Soedirman

Cetakan Kesatu, Desember 2022
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang
All Right Reserved

Penulis:
Joko Setyono

Editor Isi:
Dr. dr. Lantip Rujito, M.Si.Med.

Editor Bahasa:
Sri Nani Hari Yanti, S.S., M.Hum.

¹
Diterbitkan oleh:
UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN
Gd. BPU Percetakan dan Penerbitan (UNSOED Press)
Telp. (0281) 626070
Email: unsoedpresspwt@gmail.com



Anggota
Afiliasi Penerbit Perguruan Tinggi Indonesia
Nomor : 003.082.1.02.2019

viii + 92 hal, 15,5 x 23 cm

ISBN: 978-623-465-061-7

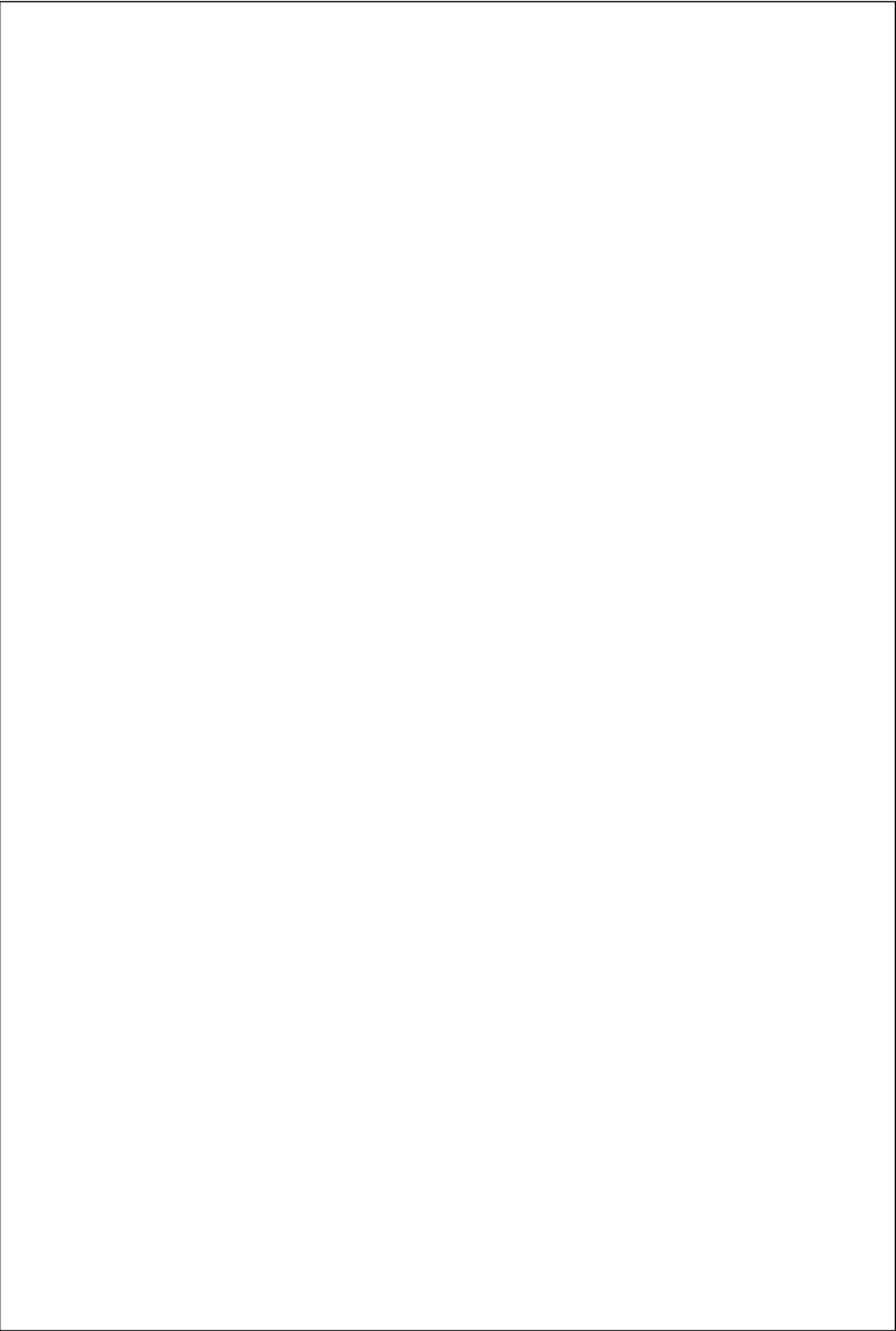
*Dilarang mengutip dan memperbanyak tanpa izin tertulis dari penerbit,
sebagian atau seluruhnya dalam bentuk apapun, baik cetak,
photoprint, microfilm dan sebagainya.*

KATA PENGANTAR

Puji syukur alhamdulillah ke hadirat Allah SWT, atas rahmat dan hidayahNYA, penulis telah berhasil menyusun Buku Referensi yang berjudul *Aspek Biomolekuler Hemoglobin dan Mekanisme Regulasi Produksi Hemoglobin Fetus (Hb F) sebagai Alternatif Terapi Penyakit Talasemia-Beta Terkini*. Buku ini disusun dalam rangka mengungkap aspek biologi molekuler hemoglobin sebagai dasar dalam mencari alternatif terapi penyakit talasemia. Salah satu terapi terkini adalah melakukan induksi terhadap Hemoglobin Fetus. Para pembaca buku ini diharapkan dapat memahami dan mengetahui dasar-dasar ilmu ini dalam mengungkap penyakit talasemia beserta terapi terkini melalui induksi Hb F. Oleh karena itu, buku ini disusun secara sistematis tentang aspek biomolekuler pembentukan dan regulasi hemoglobin, dilanjutkan dengan patologi molekuler penyakit talasemia dan diakhiri dengan alternatif terapi terkini talasemia melalui induksi Hb F.

Penulis dengan sadar dan paham bahwa buku ini tidak lepas dari kekurangan, maka besar harapan penulis kepada para pembaca untuk dapat memberikan masukan dalam rangka perbaikan maupun *update* buku ini di masa mendatang. Akhirnya, penulis berharap semoga pembaca dapat mengambil ilmu dan manfaat dari buku referensi ini.

Joko Setyono



DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR.....	viii
BAB 1 SELAYANG PANDANG TENTANG TALASEMIA ...	1
A. Pendahuluan	1
B. Peluang Alternatif Terapi Talasemia	2
BAB 2 BIOLOGI MOLEKULER HEMATOPOEISIS	4
A. Pendahuluan	4
B. Hematopoeisis Embrionik	4
C. Perubahan-perubahan di dalam Distribusi Sumsum Hemopoeitik Pascanatal	6
D. Karakteristik Umum Hematopoeisis	7
E. Sel Stem Hematopoeitik dan Sel Progenitor	7
BAB 3 BIOLOGI MOLEKULER ERITROPOEISIS	9
A. Pendahuluan	9
B. Diferensiasi Lini Eritroid.....	11
C. Ontogeni Sel Eritroid.....	14
1. Eritropoeisis Primitif	15
2. Eritropoeisis Definitif	16
D. Sitokin pada Diferensiasi Eritroid	16
E. Faktor Transkripsi dalam Diferensiasi Eritroid	19
F. MicroRNA dan Eritropoeisis	20
G. Regulasi Gena Globin	20
BAB 4 REGULASI ERITROPOEISIS	24
A. Pendahuluan	24
1. Gambaran Eritropoeisis Dewasa pada Tingkat Seluler	25

2. Gambaran Eritropoeisis Dewasa pada Tingkat Transkripsional	26
B. Regulasi Eritropoeisis.....	32
1. Peran Sel Stromal pada Regulasi Eritropoeisis ..	33
2. Maturasi dan E nukleasi Terminal	34
C. Regulasi Positif Eritropoeisis pada Tingkat Seluler	
1. SCF dan c-Kit.....	36
2. Eritropoeitin dan Reseptor Eritropoeitin	37
BAB 5 STRUKTUR NORMAL DAN REGULASI KLAS TER	
GENA GLOBIN MANUSIA	40
A. Pendahuluan	40
B. Struktur dan Fungsi	40
C. Kontrol Genetik Hemoglobin	41
D. Kerja Gena dan Sintesis Globin	43
E. Regulasi Sintesis Hemoglobin.....	44
F. Regulasi Perubahan Perkembangan Ekspresi Gena Globin.....	47
BAB 6 PATOLOGI MOLEKULER HEMOGLOBIN	48
A. Pendahuluan	48
B. Talasemia Beta (β).....	49
1. Defektif Transkripsi Gena Globin- β	49
2. Mutasi yang Menyebabkan <i>Processing</i> mRNA Abnormal.....	50
3. Mutasi yang Mengakibatkan Translasi mRNA Globin- β Abnormal	53
4. Varian Rantai Globin- β <i>Unstable</i>	53
5. Hubungan Genotip-Fenotip pada Talasemia β ...	54
C. Talasemia Alfa (α).....	58
1. Talasemia- α^0	59
2. Talasemia- α^+	60
3. Talasemia- α /Sindrom Retardasi Mental	62
4. Talasemia- α dan Sindrom Mielodisplastik.....	62
D. Bentuk Talasemia yang Lebih Jarang dan Gangguan yang Berkaitan	63

1. Talasemia- $\delta\beta$	63
2. <i>Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin</i> (HPFH)	64
E. Hubungan Genotip-Fenotip pada Talasemia α	64
F. Jumlah dan Lokasi Kromosomal Gena Globina Manusia	66
BAB 7 MEKANISME REGULASI PRODUKSI HEMOGLOBIN FETUS (Hb F) SEBAGAI ALTERNATIF TERAPI PENYAKIT TALASEMIA- BETA TERKINI	67
A. Pendahuluan	67
B. Hemoglobin Fetus (Hb F)	68
C. Pengaturan Molekular Ekspresi Gena Globin- γ	71
1. Regulator Negatif Ekspresi Gena Globin- γ	71
2. Regulator Positif Ekspresi Gena Globin- γ	73
D. <i>Curcumin</i> dan <i>6-Shogaol</i>	73
E. Efek <i>curcumin</i> dan <i>6-shogaol</i> terhadap Kadar Hemoglobin F pada Sel line K562	75
F. Induksi Hemoglobin F sebagai Alternatif Terapi Talasemia-Beta Terkini	75
G. Hasil Penambatan <i>Curcumin</i> dan <i>6-Shogaol</i> terhadap Protein DNMT1 dan LSD1	77
H. Visualisasi <i>Curcumin</i> dan <i>6-Shogaol</i> terhadap Protein- Protein DNMT1 dan LSD1	78
BAB 8 KESIMPULAN	82
DAFTAR PUSTAKA	83
DAFTAR ISTILAH (GLOSSARIUM)	88
INDEX	90

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Perkembangan hematopoeisis embrionik	5
Gambar 3.1.	Model pengaturan gen globin	21
Gambar 3.2.	Model regulasi produksi hemoglobin F pada individu dewasa, yang diaplikasikan untuk <i>treatmen hidroksiurea</i> pada penyakit sel sabit	23
Gambar 3.3.	Diagram lokus globin β manusia	23
Gambar 4.1.	Proses eritropoeisis	26
Gambar 4.2.	Faktor transkripsi pada promotor gena globin- γ	29
Gambar 5.1.	Regulasi sintesis Hemoglobin	46
Gambar 6.1.	Pola mutasi yang terjadi pada gena globin- β	50
Gambar 7.1.	Mekanisme kompetitif <i>switching</i> hemoglobin manusia saat fetal menjadi dewasa	69
Gambar 7.2.	Mekanisme <i>silencing autonom</i> dari <i>switching</i> hemoglobin	70
Gambar 7.3.	Peran BCL11A dalam proses <i>silencing</i> ekspresi globin- γ melibatkan interaksi yang panjang dengan kluster globin- β dan interaksi lokal dengan protein SOX6 terkait-kromatin	71
Gambar 7.4.	Penghambatan ekspresi globin- γ oleh DNMT1 dan LSD1	77
Gambar 7.5.	Hasil visualisasi penambatan DNMT1 dengan 6-shogaol 2 dimensi dan 3 dimensi	78
Gambar 7.6.	Hasil visualisasi penambatan DNMT1 dengan <i>curcumin</i> 2 dimensi dan 3 dimensi	79
Gambar 7.7.	Hasil visualisasi penambatan LSD1 dengan 6-shogaol 2 dimensi dan 3 dimensi	79
Gambar 7.8.	Hasil visualisasi penambatan LSD1 dengan <i>curcumin</i> 2 dimensi dan 3 dimensi	80

BAB I

SELAYANG PANDANG TENTANG TALASEMIA

A. Pendahuluan

Talasemia merupakan salah satu penyakit genetik yang disebabkan oleh mutasi pada gena globin-alfa (α), globin-beta (β), globin-delta (δ) dan globin-gamma (γ), namun yang paling sering berefek klinis adalah globin- α atau globin- β yang berakibat sintesis hemoglobin menjadi abnormal. Bila defek terjadi pada produksi rantai globin- α disebut talasemia- α sedangkan defek pada produksi rantai globin- β disebut talasemia- β . Sebaran penderita talasemia- β sangat luas, dari daerah Mediterania, Afrika, Timur Tengah, India, Burma, dan Asia Tenggara (termasuk China Selatan, Semenanjung Malaysia, dan Indonesia). Diperkirakan di seluruh dunia, setidaknya ada 60.000 bayi lahir dengan talasemia setiap tahun dengan frekuensi gena berkisar 38% di beberapa daerah. Menurut WHO, diperkirakan 1,5% dari populasi dunia membawa sifat talasemia- β , sedangkan di Indonesia dilaporkan antara 3–10% di berbagai daerah. Di Kabupaten Banyumas, terdapat pertambahan penderita talasemia tiap tahunnya 4,76%–11,50% dari jumlah kasus sebelumnya, sedangkan pembawa sifat talasemia dilaporkan 8,2%. Dalam 5 tahun terakhir, tercatat peningkatan jumlah penderita talasemia di Banyumas yaitu data tahun 2016 tercatat sekitar 389 penderita, dan pada akhir tahun 2021 tercatat sekitar 500 penderita dan diantaranya ada yang sudah meninggal dunia sebelum mencapai usia 30 tahun.

Sebagian besar dari penderita talasemia tergolong dalam keluarga dengan keadaan sosial ekonomi yang rendah, padahal biaya perawatan medis dan perawatan harian yang ditanggung pemerintah dan keluarga sangat besar. Demikian juga kebutuhan darah yang harus dipersiapkan untuk kebutuhan harian transfusi rutin bagi penderita talasemia sangat besar. Semua biaya tersebut sebagian besar ditanggung oleh pemerintah melalui BPJS Kesehatan. Pasien talasemia- β mayor harus mendapatkan perawatan yang rutin tiap bulan sehingga berpotensi menimbulkan dampak klinis dari transfusi berulang yaitu timbunan zat besi pada organ vital seperti otak, jantung, limpa, ataupun pankreas yang berat hingga sampai terjadi kematian. Berangkat dari beban biaya besar dan dampak klinis yang berat tersebut, maka perlu beberapa alternatif terapi yang lebih maju dengan dampak klinis yang rendah dan biaya yang terjangkau.

B. Peluang Alternatif Terapi Talasemia

Saat ini alternatif terapi talasemia- β mayor adalah pemberian transfusi beserta obat khelasi besi, transplantasi sel punca allogenik, induksi Hb F dan terapi gen. Terapi transplantasi sel punca allogenik, meskipun harapan menghasilkan kualitas hidup yang lebih menjanjikan daripada terapi konvensional, tetapi memerlukan persiapan, prosedur dan peralatan yang kuat. Kemudian, terapi gen untuk talasemia- β , walau berhasil dilakukan pertama kali tahun 2007, namun pasien berpotensi mengandung onkogen akibat dari prosedur. Oleh sebab itu, salah satu pendekatan terapi terkini yang potensial pada talasemia- β yaitu stimulasi peningkatan produksi hemoglobin F. Induksi Hb F pada kadar yang tinggi adalah penting untuk menurunkan tingkat keparahan talasemia- β , sehingga menyebabkan perbaikan dalam mengurangi hemolisis, inefektivitas eritropoesis, dan akhirnya meningkatkan kadar hemoglobin total. Ada senyawa aktif dari herbal alami tanaman jahe merah dan temulawak yaitu *6-shogaol* dan *curcumin* yang dapat mempengaruhi produksi Hb F melalui beberapa jalur molekuler yang ada.

Produksi Hb F dapat diatur melalui beberapa jalur molekuler, di antaranya adalah aktivitas pengalihan hemoglobin (*Hb switching*) dari Hb Fetus ke Hb dewasa yang diatur oleh regulator baru yaitu BCL11A (*B-*

cell lymphoma/leukemia 11A). Jalur ini dilaporkan mempunyai aktivitas sebagai represor globin- γ . Ada jalur lain dalam memengaruhi produksi Hb F yaitu melalui jalur *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT) dengan cara penghambatan ekspresi gena globin- γ . Selain BCL11A dan STAT ada jalur molekuler lain dalam mengatur transkripsi gena globin- γ yaitu jalur *p38 mitogen activated protein kinase* (p38 MAPK) melalui proses fosforilasi *cAMP response element binding protein 1* (CREB I). Adapau CREB I ini mengatur ekspresi dari GATA-1 dan GATA-1 merupakan master regulator faktor transkripsi diferensiasi eritroid sehingga berperan penting dalam hematopoeisis normal.

Berdasarkan latar belakang epidemiologi, mekanisme molekuler dan peran genetik yang terkait dengan pengaturan kadar Hb F di atas, maka diharapkan buku referensi ini dapat memberikan gambaran potensi terapeutik terkini talasemia beta yang lebih baik dalam rangka peningkatan kualitas hidup penderita dan memberikan gambaran jalur mekanisme molekuler yang mendasari pemahaman regulasi ekspresi gena globin pembentuk hemoglobin fetal.

BAB 2

BIOLOGI MOLEKULER HEMATOPOEISIS

A. Pendahuluan

Hematopoiesis adalah proses maturasi semua lini elemen darah yang berasal dari sel stem pluripoten. Ada 2 jenis sistem hematopoetik yaitu :

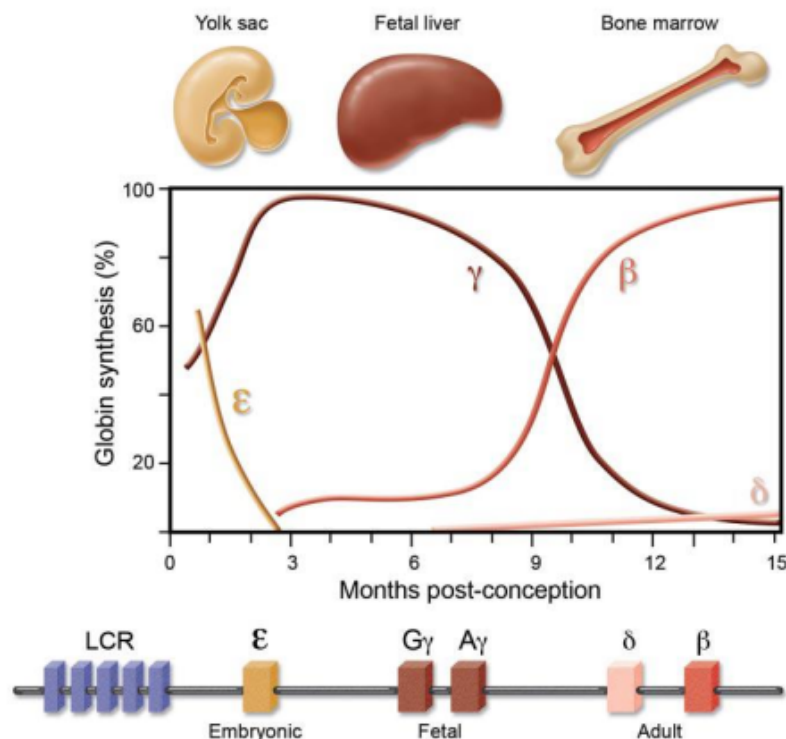
1. Hematopoiesis “Primitif” atau embrionik, berasal dari *yolk sac* yang sebagian besar terdiri atas sel-sel eritroid dan bersifat sementara/transien.
2. Hematopoiesis “Definitif” atau pascanatal, berasal dari sel stem hematopoetik (*Hematopoietic stem cells* = HSC) pluripoten. Semua sel hematopoetik pascanatal berasal dari sel HSC pluripoten ini yang mengalami diferensiasi melalui sejumlah jenis sel intermediat untuk menjadi sel-sel darah matur dari lini *limfoid* dan lini *myeloid*.

B. Hematopoiesis Embrionik

Hematopoiesis dimulai dari populasi HSC primitif transien yang dihasilkan di dalam *yolk sac*. Awal proses ini pada hari ke-14 sampai hari ke-19 dari embriogenesis dan menetap di sana sampai akhir minggu ke-12 masa kehamilan. *Yolk Sac* pertama kali menghasilkan sel eritroid berinti yaitu megaloblastik dan mengandung hemoglobin embrionik, yaitu Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$), dan Portland ($\zeta_2\gamma_2$). Eritropoiesis *Yolk Sac* disebut sebagai “primitif”. Pada waktu minggu ke-6 dan ke-7 masa kehamilan, pulau-pulau darah di dalam *yolk sac* juga mengandung beberapa megakaryosit. Aktivitas hemopoetik kemudian terjadi di dalam regio mesoderm *splancholeirial para-aortic*. Regio ini terdiri atas aorta

dorsal, jembatan gonadal dan mesonephros yang disebut *the aorta-gonad-mesonephros (AGM) regio*. Hemopoiesis di dalam regio AGM berkembang dari HSC definitif yang kelak berada di *Bone Marrow (BM)* dewasa. Beberapa HSC jenis-dewasa juga berkembang di dalam *yolk sac* dan plasenta.

Adapun HSC yang berasal dari AGM bermigrasi ke hepar dan fokus eritropoetik dapat terdeteksi pada saat minggu ke-6 masa kehamilan. Hepar memberi tempat utama untuk eritropoiesis dari bulan ke-3 sampai bulan ke-6 ketika eritroblas mencapai kira-kira 50% dari sel berinti di hepar. Eritroblas sebagian besar berada di ekstrasvaskuler, berlokasi di dekat dan di dalam sel Kupffer lalu maturasi mereka berlanjut di dalam sinusoid. Eritroblas, awalnya megaloblastik, namun berikutnya menjadi makronormoblas. Eritropoiesis hepatic fetal terkait dengan sintesis hemoglobin fetal (HbF, $\alpha_2\gamma_2$) dan menghasilkan sel darah merah makrositik berinti. Hepar melanjutkan menghasilkan sel darah merah dalam jumlah yang menurun setelah bulan ke-6 masa kehamilan hingga akhir minggu pertama setelah lahir (Gambar 2.1).



Gambar 2.1. Perkembangan hematopoiesis embrionik (D.E. Bauer et.al., 2012)

Fokus kecil sel eritropoeitik berada di dalam jaringan pengikat vaskular dari beberapa ruang-ruang BM dari 2.5 sampai 4 bulan kehamilan. Dari bulan ke-6, BM merupakan tempat utama hematopoeisis dan rasio myeloid/erythroid (M/E) kira-kira 1:4. Eritropoeisis pada BM fetal terjadi secara ekstra vaskular, adalah makronormoblastik dan menghasilkan sel darah merah makrositik yang mengandung HbF dan HbA ($\alpha_2\beta_2$). Volume sel rata-rata (*Mean Cell Volume*, MCV) di dalam darah tali pusat dari bayi baru lahir cukup bulan adalah 90-118 fl. Eritropoeisis di dalam BM fetal terjadi diatur oleh eritropoeitin yang dihasilkan dari ekstra renal, mungkin di dalam hepar. Dari bulan ke-6, terjadi proliferasi HSC di dalam hepar fetal yang menghasilkan sel eritroid, myeloid dan beberapa limfoid. Fokus kecil dari eritroblas, beberapa sel granulositopoeitik, dan kadang-kadang megakaryosit juga terjadi di beberapa jaringan dan organ embrionik maupun fetal (termasuk nodus limfe, limpa dan ginjal); namun demikian, kontribusi mereka terhadap keseluruhan aktivitas hemopoeitik adalah kecil.

C. Perubahan-perubahan di dalam Distribusi Sumsum Hemopoeitik Pascanatal

Saat lahir, semua ruang BM berisi sumsum merah yang sebagian besar terdiri atas sel hemopoeitik. Pada hakikatnya, setelah 1 tahun, semua sel hemopoeitik di dalam ujung phalang digantikan oleh sel lemak. Setelah 4 tahun pertama terdapat peningkatan sel lemak di antara sel-sel hemopoeitik dari ruang-ruang sumsum lainnya. Antara 10–14 tahun, sel hemopoeitik di dalam pertengahan dari shaft tulang-tulang panjang, hakikatnya secara lengkap digantikan oleh sel lemak. Selanjutnya, zona sumsum kuning non-hematopoeitik menyebar ke arah proksimal dan distal. Penyebaran ke distal adalah lebih cepat dan kira-kira setelah 25 tahun hanya regio dari tulang panjang yang mengandung sumsum hematopoeitik merah adalah proksimal *shaft* dari femur dan humeri. Tempat hematopoeisis lainnya pada orang dewasa adalah tulang tengkorak, klavikula, skapula, sternum, vertebra dan pelvis.

D. Karakteristik Umum Hematopoiesis

Pembentukan sel darah dari semua tipe terdiri atas 2 proses :

1. Proliferasi sel, yaitu proses melipatgandakan jumlah sel matur yang dihasilkan dari sebuah sel yang komit terhadap beberapa lini sel khusus.
2. Diferensiasi sel, atau perkembangan karakteristik biokimia, fungsional dan struktural yang progresif, yang spesifik terhadap jenis sel tertentu.

Selama kehidupan di intra uteri dan dalam tumbuh kembang anak, terdapat peningkatan progresif di dalam jumlah total sel hemopoetik dan sel darah. Pada orang dewasa normal, jumlah total sel hemopoetik dan sel darah masih relatif konstan. Terdapat pembaruan yang tetap dengan laju kehilangan sel matur yang relatif konstan (eritrosit, granulosit, monosit dan platelet) yang seimbang secara presisi oleh produksi sel baru.

E. Sel Stem Hematopoetik dan Sel Progenitor

Hematopoietic stem cells uncommitted/inkomit adalah pluripoten, yang mempunyai kapasitas terhadap swa-pembaruan, ia mempunyai kemampuan untuk diferensiasi menjadi *progenitor lineage-commited*. Ia tidak dikenali secara morfologi tetapi dapat diidentifikasi oleh profil ekspresi antigen. Diferensiasi HSC menghasilkan progenitor myeloid dan progenitor limfoid multipoten. Bukti terhadap adanya HSC pluripoten berasal dari sejumlah bukti-bukti berikut ini :

1. Penelitian sitogenetik dari leukemia myeloid kronik, yang menunjukkan bahwa kromosom Philadelphia (Ph) berada baik di dalam sel myeloid (granulositik, eritroid dan megaryositik) maupun sel limfoid.
2. Demonstrasi yang terjadi pada kasus anemi sideroblastik dengan mosaikisme *glucosa-6-fosfat-dehydrogenase* (G6PD), adalah sebuah izoenzim G6PD tunggal yang berada di dalam sel myeloid seperti halnya limfosit -B dan -T.

3. Penelitian model transplan xenogeneik pada hewan imunokompeten

Semua HSC pluripoten mengekspresikan antigen CD34. Fraksi kecil dari HSC pluripoten dengan aktivitas sel yang mendiami kembali dalam jangka panjang dikaitkan dengan fenotip CD34⁺/CD38⁺. Sel-sel ini sangat jarang di dalam BM normal (biasanya <0,1%), namun mungkin meningkat di dalam BM yang regenerasi dan di dalam sindrom myelodisplastik. Sel CD34⁺/CD45dim termasuk fraksi mayor sel progenitor yang telah komit terhadap lini hematopoetik spesifik (eritroid, neutrofil, monositik, sel dendritik, basofil, sel mast, eosinofil dan megakaryositik) dan jumlah yang berubah-ubah dari prekursor sel-B CD34⁺.

Hematopoetic stem cells multipoten atau pluripoten mengalami restriksi gradual di dalam potensial hemopoeitik mereka sampai saatnya berkembang menjadi sel progenitor unipoten. Keturunan dari HSC, kemudian dibatasi secara progresif menjadi satu lini sel dan mereka kehilangan kapasitas untuk swa-pembaruan. Percabangan paling awal di antara perkembangan myeloid dan limfoid adalah menjadi sel progenitor komit dari jenis myeloid atau limfoid adalah sebagai berikut:

1. *Common Myeloid Progenitor* (CMP) tumbuh menjadi sel dari semua lini myeloid (contohnya: granulosit⁴ eritroid, megakaryositik). Berikutnya CMP menghasilkan *granulocyte-macrophage progenitor* (GMP) dan *megakaryocyte-erythroid progenitor* (MEP).
2. *Common Lymphoid Progenitor* (CLP), tumbuh menjadi sel limfosit-T dan -B serta sel *natural killer* (NK).

⁴
Growth-promoting cytokines, seperti *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-SCF) dan *granulocyte colony stimulating factor* (G-SCF), sitokin lainnya, dan faktor transkripsi adalah regulator kunci dari hemopoeisis dan mungkin juga memperkuat beberapa fungsi dari sel matur.

BAB 3

BIOLOGI MOLEKULER ERITROPOEISIS

A. Pendahuluan

Eritrosit (Sel darah merah), merupakan sel yang paling melimpah (lebih dari 25 juta) di dalam tubuh manusia, dirancang secara unik agar dapat menahan perubahan-perubahan mikrosirkulasi guna membawa oksigen ke jaringan. Sel darah merah dihasilkan di BM, dimana sel ini mengalami maturasi progresif dari progenitor sampai secara morfologi disebut prekursor dan akhirnya menjadi eritrosit tak berinti. Eritrosit yang berada di sirkulasi tidak mempunyai inti maupun organela, tetapi terdiri atas hemoglobin untuk membawa oksigen dari paru-paru ke seluruh jaringan tubuh. Kandungan optimum sel darah merah di dalam darah kurang lebih 40–45 %. Bila kandungannya meningkat seiring bertambahnya sel darah merah, akan meningkatkan viskositas darah dan menyebabkan hambatan aliran darah serta membatasi oksigenasi jaringan. Hemoglobin tersusun dari empat rantai protein (globin), masing-masing mengandung cincin hem dengan molekul besi (fe) yang berfungsi untuk mengikat dan melepaskan molekul oksigen tanpa mengubah valensinya. Konsisten dengan peran sentral sel darah merah dalam oksigenasi jaringan, maka jumlah sel darah merah diatur oleh kadar oksigen di dalam tubuh. Ketika jaringan mengalami hipoksia, maka akan menyebabkan peningkatan produksi sel darah merah melalui hormon eritropoietin (EPO), yang dihasilkan terutama oleh ginjal tetapi bekerja di BM dimana sel darah merah disintesa di sana. Bila jumlah sel darah merah berkurang di dalam sirkulasi (misalnya: anemia) dapat menyebabkan penurunan kesehatan dan bila terjadi kehilangan jumlah sel

darah merah yang berat atau cepat, maka dapat mengancam jiwa. Sel darah merah pada mamalia bentuknya seperti kram bikonkaf dengan membran sel yang unik. Komponen luar dari membran sel darah merah terdiri atas lipid dua-lapis dengan protein yang tertanam termasuk band 3 dan *glikophorin*. Komponen dalam dari membran sel darah merah terdiri atas sitoskeleton yang tersusun terutama molekul alfa dan beta spektin yang menempel ke dalam lipid dua-lapis melalui protein jangkar. Sitoskeleton membantu mempertahankan bentuk sel darah merah, mengatur mobilitas lateral protein membran, dan mendukung struktur lipid dua-lapis. Deformabilitas selular, terkait dengan kelebihan membran yang berbentuk bikonkaf, sehingga sel darah merah mempunyai kemampuan dalam navigasi di jaringan kapiler dimana pertukaran gas terjadi. Mutasi pada gena yang mengkode komponen sitoskeletal dapat menyebabkan kerusakan membran sel yang mengarah pada penurunan deformabilitas dan meningkatkan kerusakan sel darah merah. Hemolisis normal terjadi saat usia sel darah merah kurang lebih 120 hari.

Ada 2 lini eritroid yang berbeda selama ontogeni mamalia. Pertama, lini eritroid primitif, dimulai selama awal embriogenesis pada *yolk sac* dan menghasilkan gelombang transien maturasi sel eritroid. Kedua, lini eritroid definitif, terjadi pada masa janin sampai kehidupan pasca lahir. Eritropoeitin adalah sitokin primer yang mengatur maturasi sel eritroid dengan cara sinyaling melalui reseptornya untuk mengaktifkan kaskade sinyaling intraseluler multipel. Eritropoeisis diatur juga oleh kompleks transkripsional yang terdiri atas GATA-1, SCL, EKLf dan faktor lainnya. Kompleks ini membantu dalam kreasi dari regio kromatin aktif secara transkripsional dan *upregulate* gena spesifik-eritroid. Saat ini, microRNA ditemukan di dalam sel eritroid dan menaikkan kemungkinan bahwa *downregulate* gena juga merupakan hal yang penting dalam lini maturasi. Pemahaman yang lebih baik dari pengaturan ekspresi gena globin di dalam embrio, janin dan saat dewasa akan mengarah dalam peningkatan terapi yang sempurna untuk pasien hemoglobinopati, termasuk anemia sel sabit dan talasemia.

B. Diferensiasi Lini Eritroid

Pada manusia dewasa, semua sel darah yang matur berasal dari sel stem hematopoietik. Diferensiasi sel stem hematopoietik mempunyai ciri restriksi progresif dalam kapasitas potensial dan proliferasi yang mengarah pada progenitor hematopoietik hanya komit terhadap lini tunggal. Produksi sel darah merah (eritropoiesis) pada mamalia dewasa terjadi di dalam BM dan bercirikan 3 tahap yang jelas.

Tahap pertama terdiri atas progenitor yang komit-lini digambarkan dengan kemampuan mereka dalam membentuk koloni pada media semisolid. Progenitor khusus eritrosit yang dikenal pertama kali adalah *The Burst-Forming Unit Erythroid* (BFU-E), yang berkembang menjadi koloni besar sel darah merah secara *in vitro* dalam waktu 7 hari (tikus) dan 14 hari (manusia). BFU-E menghasilkan lebih banyak *progenitor komit-eritroid* matur yang disebut *The Colony-Forming Unit Erythroid* (CFU-E), yang berkembang menjadi koloni besar sel darah merah secara *in vitro* dalam waktu 2 hari (tikus) dan 7 hari (manusia) kultur. CFU-E mempunyai potensi proliferasi terbatas yang ekstrim dibanding dengan BFU-E. Beberapa sitokin telah diketahui memperkuat pembentukan koloni dari BFU-E, termasuk IL-3, SCF dan EPO konsentrasi tinggi. Sebaliknya, kelangsungan hidup CFU-E tergantung hampir secara eksklusif pada konsentrasi EPO yang rendah.

Tahap ke-2 dari diferensiasi *erythroid* terdiri atas prekursor eritroid berinti yang berkembang dari proeritroblas menjadi bentuk basofilik, polikromatofilik dan orthokromatik. Pada mamalia, ditandai dengan 3 tahap khusus pada tahap diferensiasi ini. *Proses pertama*, adalah akumulasi hemoglobin secara progresif, yang membentuk lebih dari 90 % isi protein yang dikandung sel darah merah matur. *Proses ke-2* adalah ekspansi sejumlah eritroblas melalui sejumlah divisi sel yang terbatas. Oleh karena itu, prekursor eritroid berlanjut membelah sesuai diferensiasi mereka. *Proses ke-3* adalah piknosis inti progresif dan kehilangan inti sel secara sempurna.

Prekursor eritroid matur bersama-sama dengan sel makrofag di dalam “*erythroblast islands*” yang melayani sebagai suatu *stromal microenvironment* di dalam ruang BM. Faktanya, setiap prekursor

eritroid di dalam sumsum adalah dalam kontak secara fisik dengan sel makrofag. Beberapa interaksi adesif telah menjelaskan bahwa hal ini membantu interaksi makrofag-eritroblas. Yang pertama terjadi antara integrin $\alpha 4 \beta 1$ terekspresi pada eritroblas dan kontra reseptornya yaitu *vascular adhesion molecule 1* (VCAM-1) terekspresi pada sel makrofag. Ketika sebuah antibodi monoklonal diarahkan ke masing-masing $\beta 1$ -integrin dan VCAM-1, mengganggu *erythroblast islands* secara in vitro. Yang ke-2, molekul yang melakukan mediasi interaksi adesif antara sel eritroblas dan makrofag adalah *erythroblast macrophage protein* (Emp). *erythroblast macrophage protein* adalah sebuah protein transmembran berat 36-kD yang terekspresi oleh kedua sel baik sel eritroblas maupun sel makrofag. Selanjutnya, kultur eritroblas manusia tanpa sel makrofag maupun dengan sel makrofag dan antibodi yang bekerja memblok Emp menghasilkan suatu tanda penurunan proliferasi eritroblas dan enukleasi serta peningkatan apoptosis. Hasil-hasil tersebut mendukung gagasan bahwa interaksi eritroblas-makrofag adalah hal yang penting dalam maturasi, kelangsungan hidup dan enukleasi eritroblas. Emp berfungsi secara autonom baik pada sel makrofag maupun eritroblas. Pada akhir kehamilan, fetus yang kekurangan Emp berkembang menjadi pucat dan memiliki peningkatan sel eritroid berinti di sirkulasi. Interaksi adhesif eritroblas-makrofag yang ke-3 terjadi antara *the erythroid-specific isoform of intercellular adhesion molecule 4* (ICAM-4) dan αv integrin pada sel makrofag. Penambahan peptida αv integrin memblok interaksi ini dan mengganggu integritas *erythroblast island* secara in vitro. Gangguan yang ditargetkan ke ICAM-4 menyebabkan 50% penurunan jumlah *erythroblast islands* pada BM. Namun demikian, keadaan-kesetimbangan eritropoeisis tidak terpengaruh pada orang dewasa.

Interaksi sel-sel di dalam eritroblas telah dikemukakan untuk memfasilitasi baik pada tahap awal maupun tahap akhir dari maturasi eritroid. Mengenai tahap awal maturasi eritroid, penelitian dengan mikroskop elektron pada *erythroblast island* telah mendukung bahwa makrofag mungkin sebagai “perawat” eritroblas dengan cara memberi suplai besi. Pada proses ini, diawali istilah “*rhopheocytosis*” yang sekarang dikenal sebagai *micropinocytosis*, suatu proses dimana eritroblas imatur mengakumulasi besi melalui sebuah reseptor asam

feritin khusus. Ini juga telah dikemukakan, walau tidak ada bukti, bahwa sel makrofag sentral mungkin berperan sebagai sumber penting dari sitokin, khususnya EPO, yang mendukung maturasi eritroid. Lebih jauh, penempelan terhadap sel makrofag membawa sel-sel eritroblas menjadi sangat dekat secara fisik sehingga membantu interaksi di antara sel-sel eritroblas. Kepentingan dari interaksi ini telah didukung oleh regulasi sejumlah sel eritroid dengan cara sistem sinyaling Fas-FasL. Ekspresi FasL pada tahap akhir eritroblas dapat menghantarkan sinyal kematian terhadap eritroblas imatur berdekatan yang mengekspresi Fas. Kadar EPO yang tinggi dapat melindungi eritroblas imatur dari jalur sinyal ini dan mengarah pada peningkatan kelangsungan hidup sel eritroid. Lebih jauh, ko-kultur eritroblas dengan sel makrofag mencegah apoptosis eritroblas dan meningkatkan proliferasinya.

Enukleasi merupakan ciri khas dari eritropoeisis definitif pada mamalia dan membedakan sel darah merah mamalia dewasa dari sel darah merah spesies nonmamalia. Enukleasi dimulai ketika nukleus menjadi mudah bergerak secara bebas di dalam eritroblas tahap akhir, sebuah kejadian yang bersamaan dengan hilangnya filamen-filamen vimentin intermediat sehingga membentuk sangkar di seputar nukleus. Segera setelah itu, nukleus menjadi asentris dan vakuola-vakuola menyatu dengan membran baru lalu membentuk alur antara nukleus dan retikulosit insipien. Kemudian nukleus dipaksa keluar dengan cincin tipis dari sitoplasma dan sekeliling membran plasma. Nukleus yang dipaksa keluar ini sejatinya adalah sebuah sel intak yang saat ini disebut “*pyrenocyte*”. Selama enukleasi, sebuah cincin aktin terbentuk antara *nascent pyrenocyte* dan retikulosit, dan inhibisi polimerasi aktin memblokir enukleasi secara bermakna.

Proses enukleasi eritroblas juga melibatkan segregasi sitoskeletal dan protein permukaan sel di antara membran plasma inti dan *incipient reticulocyte*. Yang menarik, hampir semua protein sitoskeletal utama, termasuk band 3, spectrin, ankyrin, dan 4.1, menjauhi/terpisah, walaupun Emp, β 1-integrin dan glikokonjugat dikenali oleh *concanavalin* sebuah partisi terhadap *nascent pyrenocyte*. *Pyrenocyte* secara cepat kehilangan fosfatidilserin asimetri di dalam plasma membrannya, mengirimkan sinyal “*eat me*” ke makrofag sentral. Bila terjadi defek ini yaitu

ketidakmampuan makrofag dalam memakan *pyrenocyte*, maka akan menyebabkan anemia berat dan kematian dalam rahim saat akhir kehamilan. Oleh karena itu, hal tersebut mendukung bahwa *engulfment* dan pemecahan *pyrenocyte* berperan penting dalam regulasi eritropoiesis tahap akhir.

Tahap ke-3 diferensiasi eritroid terdiri atas maturasi retikulosit dan sirkulasi dari sel darah merah matur. Transkripsi menghentikan dengan membongkar mesin ribosomal saat retikulosit transisi menuju akhir eritrosit terdiferensiasi, kehilangan organel internal secara aktif termasuk retikulum endoplasmik dan mitokondria yang terjadi melalui degradasi internal disebut *autophagy*. Saat ini telah dikemukakan bahwa klirens mitokondrial pada retikulosit memerlukan protein NIX yang terkait-BCL2. Saat retikulosit matur dari bentuk sel multilobul menjadi suatu *disk bikonkaf*, terdapat restrukturisasi sitoskeleton membran yang secara signifikan menghasilkan kehilangan membran sel yang bermakna terkait dengan hilangnya protein permukaan sel khusus melalui eksosomes. Retikulosit memasuki aliran darah dengan cara migrasi melalui endotel sinusoid BM. Dalam waktu 24–48 jam setelah memasuki sirkulasi, retikulosit manusia kehilangan ribosom sisanya dan berlanjut transisi menjadi eritrosit matur yang beredar kurang lebih selama 120 hari. Saat usia eritrosit tersebut, di sana terjadi kehilangan membran sel, isi hemoglobin dan ekspresi CD47 secara progresif. Akhirnya, *senescent* eritrosit mengekspresikan *fosfatidilserin* pada permukaan sel mereka dan segera dikenali dan ditelan oleh sel makrofag dari sistem retikuloendotelial.

C. Ontogeni Sel Eritroid

Berbeda dengan eritrosit tak berinti pada mamalia, sel darah merah yang beredar pada ikan, amfibi dan burung ternyata masih berinti. Sel darah merah tak berinti, kecil dan beredar secara kontinyu selama dalam kandungan dan setelah lahir, disebut eritropoeisis “definitif”, yang dibedakan dari eritropoeisis “primitif” mempunyai ciri, sel darah merah berinti, besar dan beredar hanya sebentar, yang mula-mula berada di *yolk sac*.

1. Eritropoeisis Primitif

Progenitor eritroid primitif (EryP-CFC), kemampuan membentuk koloni-koloni dari sel eritroid primitif teridentifikasi pertama kali ketika sel-sel *yolk sac* tikus dikultur di media semisolid. eryP-CFC tikus membentuk koloni-koloni merah padat dalam waktu 5 hari terdiri atas sel-sel eritroid dewasa yang teekspresi baik pada globin embrionik maupun dewasa. Sebaliknya, BFU-E dan CFU-E membentuk koloni-koloni yang terdiri atas sel-sel merah kecil yang terekspresi hanya pada globin dewasa. EryP-CFC muncul selama awal gastrulasi pada embrio tikus, lalu bertambah banyak pada *yolk sac*, dan hilang dalam waktu 48 jam. Hal ini menunjukkan bahwa lini eritroid primitif adalah sementara/transien dan berbeda dari lini eritroid definitif.

Tempat lokasi sel-sel eritroid primitif terbukti pada *yolk sac* tikus sebagai “*blood islands*”. Setelah 24 jam berikutnya, mereka berdiferensiasi menjadi *proeritroblas* primitif tak bersarung melalui pleksus vascular primer. Eritroblas primitif memasuki sirkulasi segera setelah onset kontraksi jantung. Selanjutnya mereka membelah di dalam aliran darah, dibuktikan dengan adanya gambaran mitotik di dalam sirkulasi, *thymidine incorporatin*, dan penelitian siklus sel. Akumulasi eritroblas primitif meningkatkan jumlah hemoglobin dan menjadi rendah basofilik secara progresif.

Analisis morfologik menunjukkan bahwa eritroblas primitif menjadi matur dalam kohort semisinkron saat mereka berada dalam sirkulasi aliran darah. Sel darah merah primitif mencapai kadar keadaan-kesetimbangan hemoglobin 80–100pg per sel, kira-kira 6 kali jumlah hemoglobin yang ditemukan pada eritrosit tikus dewasa. Dengan menggunakan pendekatan imunohistokimia dan transgenik, ditemukan bahwa sel eritroid primitif tak berinti pada embrio tikus dan berlanjut sampai sirkulasi sebagai eritrosit dalam beberapa hari setelahnya. Saat ini, dicatat bahwa *pyrenocyte* primitif ditemukan hanya sesaat di aliran darah fetal, konsisten dengan dugaan bahwa prekursor eritroid primitif, seperti pasangannya yaitu eritroid definitif, bahwa tak berinti melalui ekstrusi inti.

Eritropoeisis primitif pada manusia tidak dapat diungkap secara jelas seperti pada tikus, karena kendala etik ketidaktersedianya akses secara fisik. Sel eritroid primitif beredar di embrio manusia seluruhnya berada saat trimester pertama. Namun demikian, tidak diketahui dengan pasti, bila sel eritroid primitif manusia muncul dari populasi EryP-CFC transien atau bila mereka tak berinti untuk membentuk eritrosit primitif secara sempurna di dalam aliran darah fetal.

2. Eritropoeisis Definitif

Eritropoeisis primitif memenuhi fungsi kritis terhadap kelangsungan hidup dan pertumbuhan embrionik pasca implantasi awal, namun demikian, fetus membutuhkan peningkatan jumlah sel darah merah selama gestasi. Sebelum pembentukan kavitas BM, hepar berperan sebagai tempat maturasi sel eritroid definitif pada fetus. Sumber progenitor eritroid definitif ini adalah *yolk sac*, karena BFU-E ditemukan pertama kali di *yolk sac* sebelum onset sirkulasi dan berikutnya ditemukan jumlahnya meningkat di dalam aliran darah sebelum kolonisasi di hepar. Walaupun secara fundamental mirip, namun ada perbedaan antara progenitor eritroid fetal dengan pasangan imbangannya pada BM dewasa. Sebagai contoh, CFU-E pada janin tikus lebih sensitif terhadap EPO dibanding CFU-E dari BM. Di samping itu, BFU-E fetal kapasitas proliferasi yang lebih baik dan lebih cepat matur dibanding BFU-E dewasa. Terakhir, BFU-E dari hepar fetus mempunyai kemampuan lebih dari BFU-E dari BM dewasa dalam hal respon proliferasi terhadap EPO.

D. Sitokin pada Diferensiasi Eritroid

Telah lama dikenal bahwa terdapat hubungan terbalik yang muncul antara penghantaran oksigen di dalam tubuh dengan produksi sel darah merah. Mekanisme yang bertanggung jawab terhadap hubungan ini menjadi lebih jelas setelah kloning glikorotein hormon EPO dan pengenalan bahwa maturasi sel eritroid bergantung pada sitokin ini. Sintesis EPO diatur secara transkripsional oleh oksigen melalui

pengaturan *hipoxia inducible factor 1 α* (HIF1 α). Saat kondisi normal, HIF1 α diubiquitinasi dan didegradasi setelah hidroksilasi prolin dan mengikat protein *von Hippel Lindau*. Hidroksilasi ini memerlukan oksigen untuk fungsi enzimatisnya. Sebaliknya, pada saat hipoksia, HIF1 α tidak terhidroksilasi pada residu prolin dan oleh karena itu, bebas mengikat urutan *enhancer* dari gena EPO dan upregulasi transkripsi EPO. Jadi, setiap muncul sinyal untuk mensintesa EPO secara efektif terjadi *down-modulated* oleh kadar oksigen normal di jaringan.

Pada orang dewasa, EPO disintesa terutama di ginjal. Jadi, tempat sintesis hormon berada jauh dari kerjanya. Beberapa penelitian mengungkap bahwa hepar merupakan tempat pertama baik untuk maturasi sel eritroid primitif dan sintesis EPO. Sumber EPO untuk sel eritroid primitif di dalam *yolk sac* belum pernah digambarkan. Hilangnya sinyaling EPO mengarah pada penurunan jumlah sel eritroid primitif dan memblok komplit pada kemampuan prekursor eritroid definitif menjadi matur.

Pada orang dewasa, reseptor EPO (EPO-R) diekspresikan secara primer oleh CFU-E dan prekursor eritroid imatur. Baik BFU-E dan CFU-E membutuhkan EPO untuk membentuk koloni-koloni secara *in vitro*, namun demikian, hanya CFU-E responsif terhadap EPO secara *in vivo*. Hal ini jelas bahwa EPO bekerja sebagai faktor kelangsungan hidup kritikal terhadap CFU-E dan aktivitas ini diketahui menjadi mekanisme regulatori primer untuk mempertahankan homeostasis jumlah sel darah merah. Jadi, penurunan jumlah sel darah merah menyebabkan hipoksia jaringan, memacu peningkatan sintesis EPO dan menambah kelangsungan hidup CFU-E yang dapat matur menjadi eritrosit.

Eritropoeitin menempel di reseptornya sehingga terbentuk dimerisasi EPO-R, otofosforilasi Janus Kinase 2 (JAK2), dan fosforilasi beberapa residu tirosin dari porsi intrasitoplasmik EPO-R. Fosforilasi EPO-R mengarah pada rekrutmen berbagai molekul sinyaling, termasuk SAT5, Grb2-SOS dan p85. STAT5 translokasi menuju nukleus untuk mengatur transkripsi gena Bcl-x(L) antiapoptotik dan memperkuat kelangsungan hidup sel erithroid. Bcl-x(L) berfungsi untuk melindungi baik sel erithroid primitif maupun definitif dari apoptosis. Rekrutmen Grb2-SOS terhadap EPO-R memicu jalur sinyaling Ras/Raf dan MAP

kinase, sedangkan p85 terikat pada EPO-R akan mengaktivasi P13 kinase, yang pada gilirannya akan mengarah pada fosforilasi GATA-1 dan Foxo3a. P13 kinase mengaktivasi progenitor eritroid juga mengarah pada up-regulasi beberapa gena siklus sel sama seperti peningkatan transkripsi c-kit. Lyn, sebuah anggota tyrosine kinase famili Src juga terkait dengan EPO-R, memfosforilasinya dan STAT5. Sel eritroid yang kehilangan lyn menurunkan kadar beberapa faktor-faktor kunci transkripsi eritroid, termasuk STAT5, GATA-1 dan EKLF. Walaupun efek EPO terhadap CFU-E dan progenitor eritroid imatur telah banyak menyita perhatian yang luas, EPO mungkin juga berperan dalam maturasi eritroid tahap akhir. Hal ini diketahui, bahwa saat ini EPO memengaruhi ekspresi molekul adhesif, seperti *podocalixin* pada sel target dan membantu meningkatkan kecepatan retikulosit keluar dari BM menuju aliran darah. Dapat disimpulkan bahwa sinyaling EPO melalui reseptor khususnya akan memicu multipel kaskade sinyaling intrasel untuk melindungi sel eritroid dari apoptosis, menginduksi lebih cepat diferensiasi lini, dan memicu pelepasan retikulosit.

Beberapa sitokin yang telah ditunjukkan bersinergi dengan EPO untuk memperkuat diferensiasi sel eritroid, termasuk IL6, IL3, dan *stem cell factor* (SCF, juga disebut kit ligand seperti pada sel mast faktor pertumbuhan). SCF berinteraksi dengan reseptornya, c-kit, yang diekspresikan oleh berbagai progenitor hematopoietik termasuk BFU-E dan CFU-E. SCF bersinergi dengan EPO dan sitokin yang lain untuk memperluas jumlah dan ukuran koloni eritroid yang terbentuk secara in vitro dari BM, sebagai bagian dalam memacu proliferasi progenitor eritroid. SCF penting untuk pertumbuhan BFU-E in vitro saat tidak ada serum dan untuk mempercepat respon stres eritroid yang terjadi secara in vivo saat induksi anemia akut. Aksi ini terjadi melalui interaksi fisik dari c-kit dan EPO-R di dalam progenitor hematopoietik mengarah pada aktivasi EPO melalui fosforilasi tirosin. Lebih jauh, sinyaling SCF melalui c-kit muncul untuk mempertahankan ekspresi protein EPO-R dan STAT5, jadi memperkuat kelangsungan hidup progenitor eritroid dalam responnya terhadap EPO.

E. Faktor Transkripsi dalam Diferensiasi Eritroid

Diferensiasi lini di dalam sistem hematopoetik dan akhir maturasi sel eritroid diatur sebagian oleh ekspresi diferensial dan kerja kombinasi dari faktor-faktor transkripsi. Faktor transkripsi khusus eritroid sentral adalah GATA-1, yang membentuk kompleks dengan berbagai protein lainnya untuk up-regulasi ekspresi gena khusus-eritroid. Lebih jauh, beberapa faktor transkripsi Kruppel-like, khususnya Erythroid Kruppel-like Factor (EKLF,KLF1), juga berperan penting dalam regulasi gena khusus-eritroid.

GATA-1 adalah anggota pendiri dari famili faktor transkripsi GATA yaitu protein zinc finger rangkap yang mengikat sebuah motif konsensus WGATAR yang muncul pada semua gena khusus-eritroid yang penting. Kerusakan GATA-1 mengarah pada penghentian maturasi sel eritroid primitif pada tahap proeritroblas yang mengakibatkan kematian embrionik. Hilangnya GATA-1 pada sel stem embrionik gagal berkontribusi dalam eritropoeisis definitif. Oleh karena itu, jelas bahwa GATA-1 berperan proliferasi prekursor eritroid imatur dan diferensiasi terminal. Domain fungsional yang berbeda dari GATA-1 diperlukan untuk aktivasi gena target pada sel eritroid primitif melawan definitif, hal ini mendukung bahwa kompleks transkripsional yang berbeda mungkin bentuk di dalam lini ini.

Penapisan terhadap protein yang mengikat GATA-2 mengarah pada identifikasi *Friend of GATA* (FOG-1), sebuah protein *zinc finger nuklear* yang mengikat zinc finger amino dari GATA-1. Jadi, FOG-1 melakukan mediasi interaksi GATA-1 dengan kompleks MeCP1 yang dilibatkan dalam mediasi kerja represif gena.

GATA-1 juga dapat berinteraksi secara fisik dengan CREB-binding Protein (CBP), sebuah protein nuklear yang terekspresi tersebar dimana-mana, dengan aktivitas *asetiltransferase histon*. Sejak *asetilasi histon* dikaitkan dengan regio aktif secara transkripsional dari kromatin, penemuan ini mendukung bahwa GATA-1 mungkin juga berfungsi untuk merekrut modifier histon terhadap gena khusus-eritroid untuk memperkuat ekspresinya.

Selain itu ditemukan pula faktor transkripsi lainnya yaitu SCL, TAL1, Lbd1, ETO-2, Cdk9 dan LMO4. Juga ada famili dari faktor transkripsi Krupper-like (KLF2 dan KLF4). Oleh karena itu, identifikasi interaksi faktor-faktor transkripsi yang berkelanjutan akan memberikan pemahaman yang lebih baik lagi terhadap maturasi sel eritroid dan akan membantu meningkatnya konstruksi model kompleks dari jaringan pengatur genetik yang ada di dalam sel eritroid. Komposisi sederhana relatif dari seritrosit matur, kehilangan inti dan organel intrasel, dan mengandung hemoglobin sebagai protein predominan, hal ini membuat lini eritroid menjadi sebuah model menarik sebgus penelitian dari proteomik seluler.

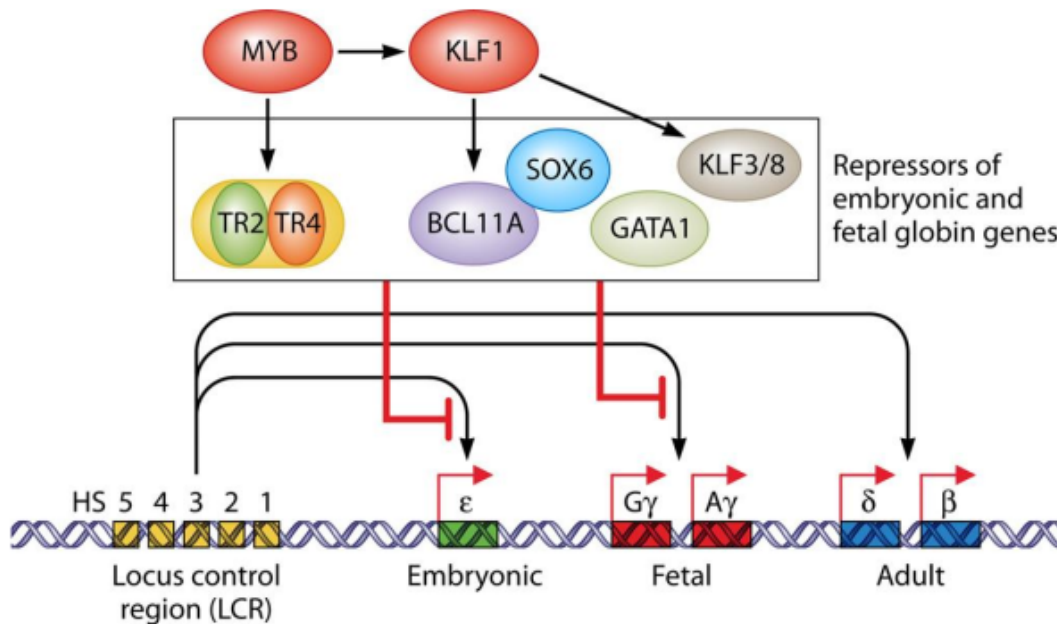
F. MicroRNA dan Eritropoeisis

MicroRNA adalah RNA non koding kecil endogen yang mempunyai target mRNA dengan cara memodulasi stabilitas atau kemampuannya hingga translasi. Ada lebih dari 100 microRNA yang berada di sel eritroid definitif. Namun hanya mir-451 yang terbanyak ditemukan dalam *upregulated* selama maturasi sel eritroid. Over ekspresi mir-451 menginduksi maturasi sel eritroleukemik tikus in vitro. Hal ini mendukung bahwa mir-451 berperan penting dalam maturasi sel eritroid. Mir-451 dan mir-144 saat ini teridentifikasi sebagai urutan pengatur GATA-1. Namun hanya mir-451 secara in vivo maupun in vitro terindikasi penting untuk eritropoeisis terminal dan maturasi lini hematopoeitik, sehingga saat ini penelitian microRNA berpotensi penting dalam *downregulation* gena selama maturasi sel eritroid.

G. Regulasi Gena Globin

Molekul hemoglobin mengandung rantai globin yang berasal dari lokus gena globin α dan β . Klaster gena globin- β berperan sebagai sistem model prototipikal untuk penelitian sel jenis khusus dan regulasi gena developmental tahap khusus. Keseluruhan struktur lokus globin- β telah dijelaskan dan ditemukan mengandung berbagai gena globin β -like yang berdekatan dan sebuah *upstream Locus Control Region* (LCR) yang mengandung beberapa tempat hipersensitif DNase I. Tempat hipersensitif

ini masing-masing mengandung berbagai motif ikatan faktor transkripsi, termasuk untuk GATA1 dan NFE2. Locus globin- β manusia berisi 5 gena aktif (ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ dan β) yang berlokasi secara tandem dalam urutan ekspresi mereka selama perkembangan. Gena globin- ϵ diekspresikan selama awal embriogenesis, diikuti oleh gena globin- γ saat fetus, dan gena globin- δ dan β saat dewasa. Regulasi “globin switching” telah menjadi area aktif penelitian dalam 3 dekade terakhir.

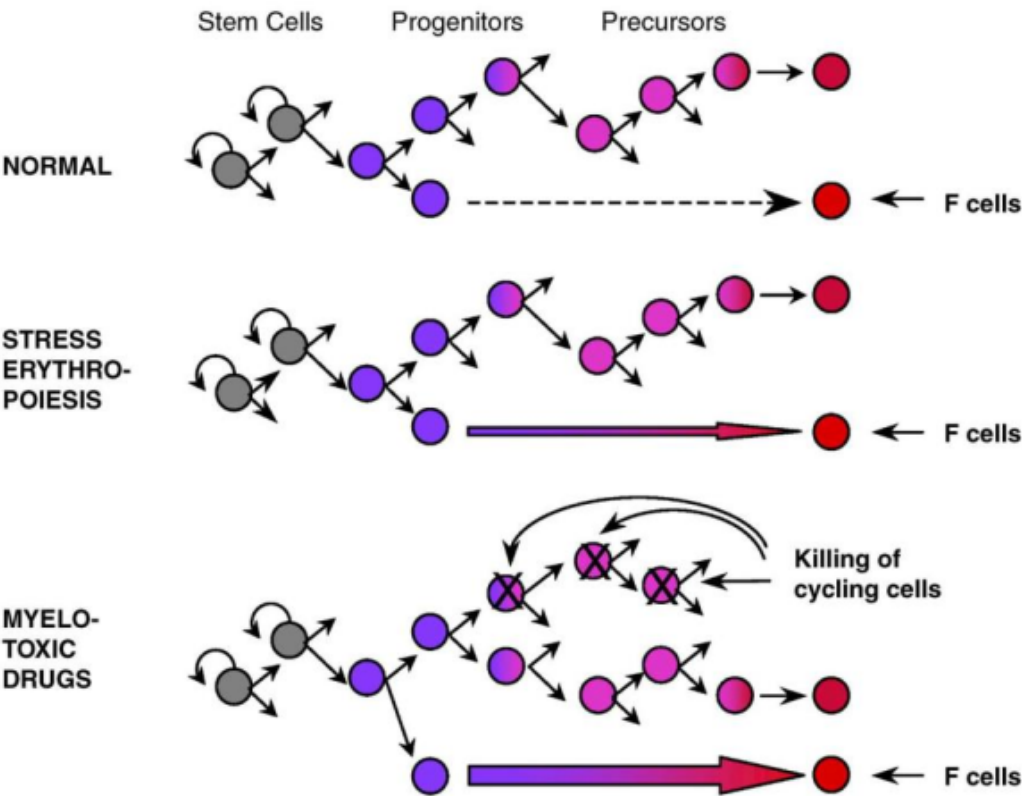


Gambar 3.1. Model pengaturan gen globin (M. Suzuki *et al.*, 2014)

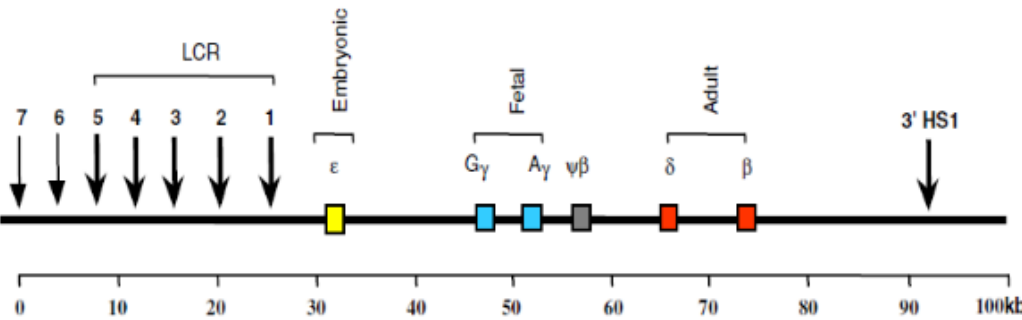
Locus *Control Region* (LCR) memfasilitasi ekspresi tingkat tinggi dari gena globin- β pada sel eritroid, hilangnya LCR pada tikus menyebabkan penurunan 100 kali lipat ekspresi gena globin. Oleh karena itu, LCR diketahui berfungsi untuk membawa regulator transkripsional di tempat yang sangat dekat dengan mesin transkripsional basal segera dalam *upstream* berbagai gena globin. Tempat hipersensitif individual di dalam LCR tampak mempunyai peran berbeda dalam remodeling kromatin dan kontrol *switching* gena globin. Tikus transgenik yang mempunyai 1 atau 2 transgena globin tandem *downstream* elemen LCR telah memberikan bukti dalam mendukung suatu model kompetisi dari regulasi gena globin- gena globin berkompetisi terhadap interaksi LCR

berdasarkan kedekatannya terhadap LCR. Di samping kompetisi, ada bukti lain, bahwa gena globin embrionik dan fetal diatur oleh *autonomous silencing*. Sebagai contoh, gena globin- ϵ embrionik dibungkam di dalam sel eritroid dewasa oleh reseptor nuklear orphan TR2 dan TR4.

Sel darah merah definitif fetal dan dewasa pada tikus, tidak seperti pada manusia, bahwa hanya diekspresikan globin dewasa saja ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$). Sebaliknya, sel darah merah primitifnya diekspresikan baik pada globin embrionik ($\beta H1$, ϵy , ζ) maupun dewasa. Perbedaan ekspresi gena globin di dalam sel eritroid definitif dan primitif, mendukung bahwa mekanisme regulatori di dalam lini yang berbeda juga berakibat berbeda pula. Analisis ekspresi gena globin pada sel eritroid primitif tikus murin menunjukkan bahwa gena globin- ζ dan $-\beta H1$ digantikan oleh gena globin- $\alpha 1$, $-\alpha 2$ dan gena globin- ϵy saat sel-sel ini matur di dalam aliran darah. Proses maturasional *switching* globin ini terjadi di dalam sel yang sama saat mereka menyempurnakan diferensiasi terminal mereka. Perubahan-perubahan dalam tingkatan transkrip globin ini dikaitkan dengan perubahan di dalam densitas RNA polimerase pada promoter mereka. Lebih jauh, gena globin- $\beta H1$ dan $-\epsilon y$ di dalam sel eritroid primitif berada di dalam domain hiperasitulasi besar tunggal, sehingga mendukung bahwa *switching* maturasional globin diatur oleh adanya faktor transkripsi yang berubah daripada asesibilitas kromatin. Sebaliknya, gena globin embrionik pada sel eritroid definitif berada di luar domain hipersetilasi dan tidak diekspresikan di dalam sel eritroid definitif. Sel eritroid primitif pada embrio manusia, juga muncul sampai maturasional gena globin *switching*, dari globin- ζ menjadi globin- α dan globin- ϵ menjadi globin- γ , yang telah dijelaskan antara 5–7 minggu kehamilan. Sel eritroid definitif juga mengalami *switching* lebih halus maturasional dari globin- γ menjadi $-\beta$ saat differensiasi terminal. Pemahaman yang lebih baik mengenai mekanisme regulasi aktivasi dan *silencing* gena globin embrionik, fetal dan dewasa mempunyai kepentingan klinis yang sangat penting untuk penatalaksanaan dan merawat pasien dengan hemoglobinopathi, khususnya penyakit *sickle cell* dan sindrom talasemia.



Gambar 3.2. Model regulasi produksi hemoglobin F pada individu dewasa, yang diaplikasikan untuk *treatmen hidroksiurea* pada penyakit sel sabit (Stamatoyannopoulos, 2005).



Gambar 3.3. Diagram lokus globin β manusia (Stamatoyannopoulos, 2005)

BAB 4

REGULASI ERITROPOEISIS

A. Pendahuluan

Eritropoeisis diatur oleh kombinasi dari faktor lingkungan mikro (*microenvironmental*) dan faktor pertumbuhan (*growth factor*) dalam rangka untuk meningkatkan kelangsungan hidup, proliferasi dan atau diferensiasi progenitor eritroid serta faktor nuklear pengatur transkripsi gena yang terlibat dalam penentuan fenotip eritroid. Eritropoeisis merupakan salah satu dari jalur terbaik dalam penelitian hematopoietik, baik pada tingkat molekuler maupun seluler, karena ada 4 alasan berikut ini: *pertama*, walaupun terdapat berbagai tahap eritropoeisis yang berbeda, namun semuanya dapat ditentukan oleh marker fenotip; *ke-2*, penyakit pada jaringan eritroid telah dikenali dengan baik dan saat ini ditemukan penyebab molekuler mereka; *ke-3*, diferensiasi eritroid terminal hanya tergantung pada faktor pertumbuhan eksogen yaitu eritropoeitin; *ke-4*, hampir sebagian besar faktor transkripsi yang mengatur eritropoeisis tidak diketahui. Apabila dapat memahami sistem yang kompleks ini, maka akan dapat mengetahui prinsip-prinsip biologi seluler dasar dan patofisiologi berbagai penyakit termasuk penyakit degeneratif dan kanker.

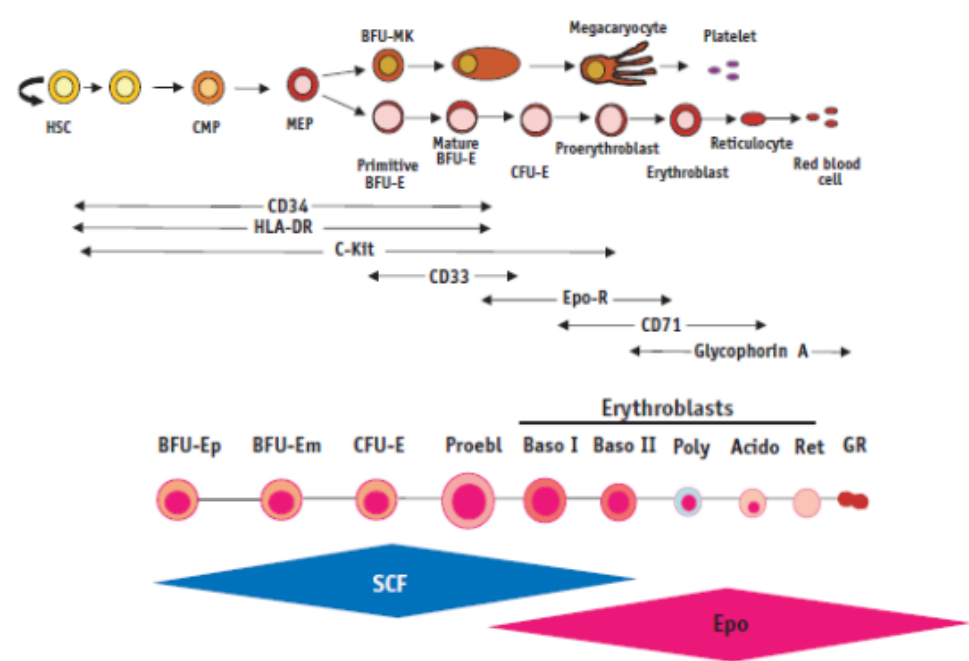
1. Gambaran Eritropoeisis Dewasa pada Tingkat Seluler

Produksi eritrosit merupakan *output* terbesar dari sistem hematopoeitik dengan perkiraan laju produksinya sebanyak 2×10^{11} eritrosit per hari. Frekuensi progenitor makrofag-granulosit *committed* 3 kali lebih banyak dari progenitor eritroid *committed* di *Bone Marrow* (BM), namun dinetralkan oleh indek proliferaatif yang tinggi pada akhir tahap transisional perkembangan eritroid. Waktu yang diperlukan untuk siklus sel eritroblas diperkirakan 6-7 jam, yang unik pada orang dewasa di bawah kondisi *steady state* dan sangat menyerupai sel embrionik. Bagaimana diferensiasi dan aktivasi program ekspresi gena khusus dikoordinasi dengan pertumbuhan sel, ini masih perlu diklarifikasi, meskipun pengetahuan yang detail dari jaringan faktor transkripsi yang mengatur ekspresi gena lini telah diketahui. Progenitor eritroid *committed* dapat terdeteksi oleh kemampuannya membentuk koloni eritroid pada kultur in vitro di dalam metil-selulose, dan disebut *burst forming unit-erythroid* (BFU-E) dan *colony forming unit-erythroid* (CFU-E). BFU-E adalah sel hematopoeitik yang hampir semuanya imatur dimana siap komit kepada lini eritroid. BFU-E hanya 0,03% dari sel hematopoeitik BM dan hanya 40% yang menjalani siklus, sedangkan CFU-E sebanyak 0,3% dari sel hematopoeitik BM dan sebagian besar dari mereka aktif menjalani siklus. Proses seluler yang kontinyu terjadi dari awal BFU-E sampai akhir CFU-E tetapi kebutuhan faktor pertumbuhan untuk BFU-E dan CFU-E sangat berbeda. BFU-E membutuhkan *stem cell factor* (SCF) dan beberapa faktor pertumbuhan hematopoeitik untuk pertumbuhan dan diferensiasi mereka, sebaliknya CFU-E sangat bergantung dengan eritropoeitin (Epo). CFU-E akan berdiferensiasi pertama kali menjadi sel lini eritrosit yaitu pro-eritroblas, kemudian berdiferensiasi menjadi eritroblas basofilik, eritroblas polikhromatofilik, dan eritroblas asidofilik yang merupakan sel berinti terakhir dari lini eritrosit mamalia. E nukleasi eritroblas asidofilik terus tumbuh menjadi retikulosit yang matur dan akhirnya menjadi sel darah merah. Proses ini terjadi di dalam *erythroblast*

blood island pada BM, dimana makrofag dikelilingi eritroblas pada semua tahap maturasi.

2. **Gambaran Eritropoeisis Dewasa pada Tingkat Transkripsional**

Selama diferensiasi eritroid, pola ekspresi gena khusus-eritroid mengikuti waktu yang presisi dimana sebagian besar diatur saat tingkat transkripsional. Penelitian pada faktor-faktor *acting* baik *cis* maupun *trans* yang mengatur gena khusus-eritroid, bersama-sama dengan gangguan eritropoeisis pada penyakit leukemia dan penyakit eritroid hereditas dan di dalam model hewan coba, telah meningkatkan pengetahuan tentang regulasi transkripsional dari eritropoeisis. Penemuan yang paling menarik dari penelitian ini adalah pentingnya interaksi diantara protein di dalam regulasi transkripsional dan hubungannya dengan leukaemogenesis.



Gambar 4.1. Proses eritropoeisis (Vandekerckhove *et al.*, 2009)

a. Sekuens Cis-acting Terlibat di Dalam Regulasi Gena Khusus-eritroid

Analisis fungsional dari gena khusus-eritroid dan megakaryositik telah mengungkap sekuens yang penting yaitu 5' A/T GATA 3', saat ini disebut motif GATA, di dalam lini ekspresi khusus gena-gena ini. sekuens ini terkait dengan sekuens mirip-GT atau CACC pada gena khusus-eritroid, meskipun ini terkait dengan tempat binding Ets pada gena khusus megakaryositik. Saat ini, kedua asosiasi tersebut dipercaya sebagai *hallmarks erythroid* atau regio regulatori khusus-megakaryositik. Motif lainnya, 5' TGAC/GTCAGC 3', juga ditemukan di dalam inti regio promotor atau *enhancer* gena yang mengekspresi eritroid dan ini penting untuk efisien transkripsi gena khusus-eritroid yang mengandung motif ini. Tidak ada motif lainnya yang ditemukan secara berulang pada sekuens regulatori dari gena khusus eritroid atau pun khusus megakaryositik. Tiap-tiap motif *binding*, diidentifikasi sebagai sekuens berulang dari gena eritroid atau megakaryositik, famili dari faktor nuklear yang mengenali motif yang telah ditandai. Hal yang penting adalah tidak ada faktor *trans-acting* yang teridentifikasi mempunyai ekspresi terbatas terhadap lini eritroid atau megakaryositik, yang mengindikasikan bahwa spesifisitas ekspresi gena di dalam eritropoeisis dan megakaryopoeisis, seperti pada lini hematopoeitik yang lain, ditentukan oleh kombinasi khusus faktor-faktor *trans-acting* lebih dari faktor-faktor khusus lini.

b. Faktor *Trans-acting* yang Mengatur Ekspresi Gena Khusus-eritroid

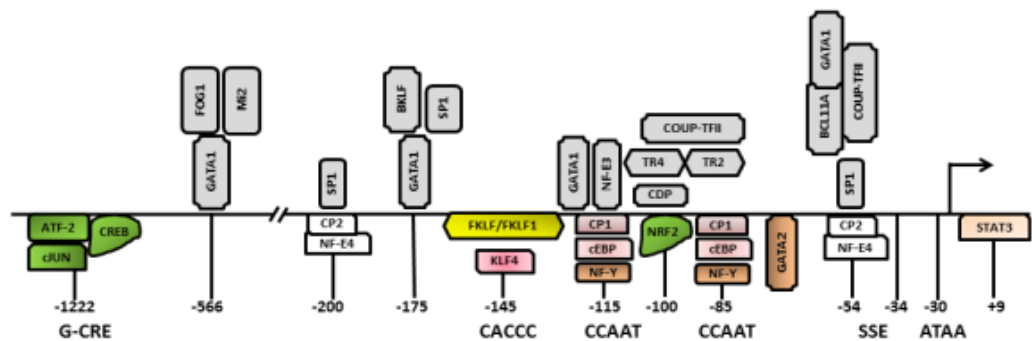
1) GATA-1 dan GATA-2

Famili faktor transkripsi GATA terdiri 6 faktor transkripsi yaitu GATA-1 sampai -6, yang dapat mengikat sekuens konsensus 5' A/T GATA A/G 3'. Protein ini terdiri 2 motif *conserved zinc fingers* (Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cys) spesifik terhadap famili GATA. Terminal karboksil *zinc finger* bertanggung jawab terhadap stabilisasi interaksi DNA/GATA.

Regio luar *zinc finger*, konservasi di antara faktor GATA adalah lemah tetapi setiap faktor dikonservasi di antara spesies. Dalam hal eritropoeisis, hanya GATA-1 dan GATA-2 yang menunjukkan peran penting baik dalam determinasi eritrositik maupun dalam diferensiasi terminal.

Selama eritropoeisis, ada sekuensial namun *overlapping* ekspresi GATA-1 dan GATA-2. Gata-2 diekspresikan awal lini eritroid dan ekspresinya menurun seiring dengan meningkatnya ekspresi GATA-1. Beberapa penelitian melaporkan bahwa GATA-2 terlibat dalam proliferasi progenitor eritroid *committed* dan *non-committed*, sebaliknya GATA-1 adalah kritikal untuk maturasi terminal sel eritroid. Pada tingkat molekuler, cross talk antara GATA-1 dan GATA-2 terjadi pada tingkat transkripsional, GATA-2 menghambat transkripsi gena GATA-1 dan GATA-1 mempunyai efek sama terhadap gena GATA-2. Jaringan regulatori antara GATA-1 dan GATA-2 selama eritropoeisis hasil di dalam substitusi sekuensial GATA-2 oleh GATA-1 di dalam regio regulatori beberapa gena spesifik eritroid. Ketiadaan GATA-1 menimbulkan kematian sel secara apoptosis yaitu dengan cara memblokade diferensiasi eritroid pada tahap pro-eritroblas. Aktivitas GATA-1 selama eritropoeisis diatur ketat saat tingkat transkripsi, translasi dan pasca translasi. GATA-1 mengatur secara positif transkripsi dari gena melalui tempat GATA yang berada di dalam regio promoter dan enhancer dari gena GATA-1. GATA-1 memiliki sebuah tempat inisiasi translasi alternatif yaitu pada methionin 84 dan protein GATA-1 yang dihasilkan tidak berfungsi secara penuh, seperti saat protein ini tidak dapat mengarahkan diferensiasi eritroid ketika tereksresi pada kadar normal. Aktivitas dan kadar GATA-1 harus diatur ketat untuk mencegah akumulasi kontinyu dari GATA-1 di dalam sel, yang mana mungkin memblokade diferensiasi eritroid secara sempurna.

Aktivitas GATA-1 diatur dengan cara asetilasi. Asetilasi GATA-1 oleh P300 atau protein CREB-binding tampaknya memperkuat asosiasi diri GATA-1 dan selanjutnya aktivitas transkripsionalnya. Demikian juga, mutasi tempat utama asetilasi mengeliminasi kemampuan GATA-1 untuk mengikat semua tempat target selular yang diuji in vivo, termasuk gena yang secara normal diaktivasi dan direpresi oleh GATA-1 selama diferensiasi eritroid. Selain itu, GATA-1 terasetilasi ditargetkan untuk degradasi via jalur *ubiquitin/proteosome*. Asetilasi secara positif merupakan sinyal *ubiquitinasi*, hal ini mendukung bahwa aktivasi oleh asetilasi secara simultan menandai GATA-1 untuk degradasi. Asetilasi sendirian tidak cukup untuk memberi sinyal degradasi, tetapi MAPK fosforilasi GATA-1 bekerja sama dengan asetilasi untuk *ubiquitinasi* yang efisien.



Gambar 4.2. Faktor transkripsi pada promotor gena globin-Y (Makala *et al.*, 2014)

Penelitian biokimia mengungkap bahwa GATA-1 difosforilasi pada 6 residu serin pada sel eritroleukemia tikus yang tidak terdiferensiasi. Akt secara langsung memfosforilasi GATA-1 pada serin 310 in vitro maupun in vivo dan memperkuat aktivitasnya pada sel eritroid. GATA-1 ser³¹⁰ fosforilasi bukan esensial untuk keseluruhan ekspresi gena eritroid (*major late erythroid genes*) tetapi ia secara absolut diperlukan untuk subset gena seperti gena TIMP-1. Akhirnya,

aktivitas GATA-1 dalam beberapa lingkungan diatur oleh pemotongan yang dimediasi-caspase selama diferensiasi eritroid terminal.

Aktivitas GATA-1 juga tergantung pada interaksi protein-protein. Beberapa protein yang telah diungkap mempunyai interaksi secara fisik dengan GATA-1 di antaranya adalah FOG-1, LMO-2, TAL-1, Gfi-1b, PU-1, ZBP-89 dan CBP. Di antara kesemuanya, ternyata fokus pada interaksi GATA-1/FOG-1. FOG-1 (*Friends of GATA-1*) adalah protein *multiple zinc finger*. Fungsi berbeda dari GATA-1/FOG-1 dimediasi oleh 2 kompleks nuklear yang berbeda, yaitu yang pertama, kompleks GATA-1/FOG-1/MeCP1 melakukan represi transkripsi; sisi yang lain, GATA-1/FOG-1, melakukan link untuk aktivasi transkripsi. Keberadaan dari dua kompleks yang berbeda ini dengan berlawanan dalam aktivitas transkripsional menjelaskan bahwa GATA-1 secara simultan mengaktivasi dan merepresi gena target selama eritropoeisis. Namun demikian, timbul pertanyaan, bagaimana menjelaskan bahwa beberapa gena berlabuh pada ikatan GATA lalu diaktivasi, sedangkan tempat berlabuh yang lain masih terbuka saat direpresi.

2) TAL-1, LMO-2, LMO-4, EKLF, NFE-2, Gfi-1B, ZBP-89 dan Id2

Pada tingkat molekuler, TAL-1 bekerja melalui mekanisme dependen dan independen *binding*-DNA dan dapat mengaktivasi maupun merepresi transkripsi. Pada sel eritroid awal, kompleks TAL-1 bergabung dengan regio regulatori spesifik eritroid seperti promotor GPA atau HS-26 dari lokus globin- α .

LMO-2, suatu faktor nuklear domain LIM, telah teridentifikasi terlibat dalam kasus jaang dari T-ALL manusia. TAL-1 telah diungkap menginduksi diferensiasi eritroid, sedangkan LMO-2 muncul untuk mensupres eritropoeisis fetal. Yang menarik, baik TAL-1 maupun LMO-2 mampu

menekan diferensiasi myeloid parsial, mempunyai implikasi bahwa mereka mengaktifkan diferensiasi eritroid di dalam progenitor BM *committed*.

EKLF terikat sangat kuat terhadap tapak CACCC yang ditemukan di promoter gena globin- β manusia. Mutasi dari sekuens ini pada manusia ditemukan terkait dengan talasemia- β . Di samping perannya sebagai aktivasi gena globin dan *switch* ekspresi gena globin fetal ke dewasa, EKLF juga diperlukan untuk diferensiasi eritroid tahap akhir—tetapi tidak untuk proliferasi—dan secara langsung mengatur gena yang terlibat di dalam metabolisme hemoglobin dan stabilitas membran.

NFE-2 adalah anggota famili *leucine-zipper* dari aktivator transkripsional dan mengenali sekuens konsensus TGCTGA(G/C)TCA yang berlokasi di dalam sekuens regulatori dari sejumlah gena spesifik eritroid, termasuk LCR dari kedua gena globin- α dan - β .

GF1-1B (*growth factor independence 1B*) adalah famili Gfi repressor transkripsional yang mengandung domain SNAG yang melakukan mediasi represi transkripsional dan domain zinc finger pada terminal karboksil untuk DNA binding ke sekuens rekognisi TAAATC(A/T)GCA. Kerusakan Gfi-1B berakibat kematian janin terkait dengan kegagalan pembentukan sel darah merah memperkuat ekspresi Gfi-1B pada sel progenitor eritroid awal menginduksi ekspansi progenitor eritroid awal tetapi meng-apoptosis masif prekursor eritroid berikutnya, mereduksi ekspresi Bclxl dengan signifikan, meskipun tanpa sekuens konsensus yang resmi ditemukan pada promoter gena Bclxl. Aktivasi GATA-1, awalnya menginduksi Gfi-1B sementara/transien, selanjutnya diikuti induksi Bclxl selama maturasi eritroid pada sel G1ER. Kadar konstan GATA-1 mengikat promoter Bclxl secara keseluruhan selama periode induksi, meskipun Gfi-1B secara transien terkait dengan promoter pada awal fase. Ekspresi yang terus menerus dari Gfi-1B menghapuskan ekspresi Bclxl

yang diinduksi GATA-1. GATA-1 terikat pada motif GATT tidak resmi dari promotor Bclxl untuk *trans-activation*. Ekspresi Gfi-1B pada kadar yang meningkat direkrut ke promotor Bclxl melalui keterkaitannya dengan GATA-1, melakukan supresi transkripsi Bclxl. Namun demikian, *down regulation* Gfi-1B pada akhir fase maturasi eritroid penting untuk induksi Bclxl. Secara keseluruhan, Gfi-1B memainkan peran yang kompleks di dalam *eritropoeisis*. Pada progenitor eritroid imatur, melalui domain zinc finger, Gfi-1B akan melakukan *trans-activate* gena target yang berimplikasi pada proliferasi sel untuk ekspansi eritroblas. Pada onset diferensiasi, Gfi-1B akan mengatur gena yang direpresi untuk induksi diferensiasi.

Faktor transkripsi *zinc finger* jenis Kruppel ZBP-89 adalah komponen kompleks mult²rotein yang menyertai GATA-1 dan kofaktor esensialnya FOG-1. Gata-1 dan ZBP-89 merupakan *co-occupy* elemen *cis-regulatory* dari gena spesifik eritroid tertentu, termasuk sebagai *enhancer* dari gena GATA-1 itu sendiri.

Anggota famili dari Inhibitor of *DNA Binding* (Id) adalah kunci regulator proliferasi dan diferensiasi seluler. Aktivitas ini terkait dengan kemampuan protein Id menjadi protein E antagonis dan faktor transkripsi lainnya. Id2 secara instrinsik mengatur perkembangan eritroid melalui interaksi dengan protein target yang berbeda. Overekspresi Id2 memperkuat perkembangan eritroid, meskipun penurunan kadar ID2 mengganggu perkembangan eritroid normal.

B. Regulasi Eritropoeisis

Seperti yang telah dibahas, bahwa proses pembuatan sel darah merah merupakan orkestrasi dari jaringan kompleks faktor-faktor transkripsi. Di antaranya bahwa GATA-1 memainkan peran kritikal dalam mengatur gena yang terlibat tidak hanya pada diferensiasi eritroid, namun juga pada siklus sel, dan kelangsungan hidup sel. Program

diferensiasi ini harus diatur secara positif dan negatif untuk memastikan keberlanjutan tetapi pengendalian produksi sel darah merah dalam menjaga oksigen harus dipastikan tetap berada pada tingkat fisiologis di jaringan perifer.

1. Peran Sel Stromal pada Regulasi Eritropoeisis

Pada manusia dewasa, eritropoeisis definitif terjadi secara esensial tetapi tidak eksklusif di dalam lingkungan mikro BM. Pada tingkat ini, sel stromal dan sel imun berperan penting dalam menjaga faktor-faktor yang meliputi integrin dan atau ligan serta sitokin. Faktor-faktor ini yang mampu menginduksi proliferasi dan kelangsungan hidup, memungkinkan program diferensiasi progenitor eritroid berperan di sana. Pulau eritroblastik, suatu ceruk khusus prekursor proliferasi, diferensiasi dan enuklease, tersusun dari eritroblas yang mengelilingi makrofag sebagai pusatnya. Pulau eritroid berlokasi tidak hanya pada regio terdekat terhadap sinusoid BM, tetapi juga regio sumsum secara keseluruhan. Eritroblas mengekspresi molekul adhesi yang melakukan mediasi baik interaksi eritroblas/eritroblas maupun eritroblas/makrofag. Emp (*erythroblast macrophage protein*) berperan penting dalam eritropoeisis. Interaksi antara integrin VLA-4/ICAM-4 dan VCAM-1/ αv antara eritroblas dan makrofag sentral berkontribusi terhadap integritas pulau. Suatu yang memperkuat proliferasi eritroblas terkait terhadap kontak dengan makrofag telah menunjukkan terjadi pada semua konsentrasi Epo yang dihasilkan dari pengurangan waktu transit pada fase G0/G1 siklus sel dengan mekanisme yang berbeda dari efek anti-apoptotic Epo.

Penelitian saat ini, mengungkap bahwa ada peran dari DNase II di dalam maturasi dan khususnya dalam proses enukleasi yang terjadi pada tahap sangat akhir dari maturasi eritroid. Tikus dengan defisiensi DNase mengalami kematian akibat anemia berat dan menunjukkan tanda penurunan sel darah merah di sirkulasi yang terkait dengan adanya eritroblas berinti definitif di dalam sirkulasi, sebuah jenis sel yang harusnya secara normal hanya ada di BM dan

tidak berada di dalam sirkulasi darah perifer. Makrofag sentral berada dalam pulau eritroblastik mungkin mewakili sumber DNase dan kemudian bertanggung jawab terhadap penelanan inti yang dipaksa keluar melalui pengenalan serin fosfatidil nukleus yang terbuka saat mereka kerjakan untuk sel apoptotik.

Abnormalitas diferensiasi makrofag dapat mengarah gangguan fungsi pulau eritroid dan berpengaruh terhadap diferensiasi eritroid. Protein Rb, suatu regulator diferensiasi makrofag adalah penting untuk maturasi eritroid. Gena Rb yang menjadi target kerusakan, mengarah terjadinya kematian tikus pada embrionik karena anemia yang disebabkan kegagalan enukleasi. Protein Rb berperan juga sebagai intrinsik sel di dalam eritropoeisis dimediasi oleh proses kopling dari biogenesis mitokondrial sampai keluar dari siklus sel. Ketidadaannya menimbulkan eritropoeisis menjadi tidak efektif, dengan cara memblok diferensiasi pada saat transisi dari awal sampai akhir eritroblas.

2. Maturasi dan Enukleasi Terminal

Sel eritroid yang berjalan menuju akhir diferensiasi menunjukkan konkuren *up-regulation* transkripsional dari Bclxl anti-apoptotik dan BH3 pro-apoptotik hanya mirip faktor Nix. Jadi nix merupakan regulator negatif eritropoeisis melalui modulasi apoptosis. Nix juga diperlukan untuk klirens mitokondrial selektif selama maturasi retikulosit, dengan cara memicu inkorporasi mitokondria masuk autofagosom diikuti oleh maturasi autofagosom.

Penelitian terbaru mengungkap adanya peran penting dari Rac GTPase dan protein efekturnya (mDIA2) dalam enukleasi eritroblas fetal yaitu dengan memengaruhi pembentukan cincin aktin kontraktil pada akhir dari tahap eritroblas. Rac GTPase berada pada keadaan yang dinamik *on* dan *off* dan setiap inhibisi atau ekksesif aktivasi dari Rac GTPase mengarah pada inhibisi enukleasi.

C. Regulasi Positif Eritropoeisis pada Tingkat Seluler

Berbagai komponen diperlukan untuk memastikan produksi sel darah merah secara konstan yaitu meliputi zat besi untuk sintesis hemoglobin, asam folat dan vitamin B12 untuk sintesis DNA. Insulin *growth factor* 1 bersinergi dengan sitokin lainnya untuk meningkatkan proliferasi progenitor eritroid awal dan mungkin mengkoordinasi produksi sel darah merah selama perkembangan dan peningkatan massa tubuh. Hormon steroid melalui reseptor nuklernya mungkin juga memperkuat produksi sel darah merah tetapi tak satupun dari molekul ini terlibat dalam regulasi eritropoeisis yang jelas. Namun demikian, produksi androgen mungkin menjelaskan mengapa hematokrit lebih tinggi pada laki-laki dibanding perempuan. Mirip dengan di atas, glukokortikoid mungkin berkontribusi terhadap peningkatan produksi eritroid selama stress eritropoeisis. Ada juga bukti peran dari sistem renin angiotensin dalam regulasi eritropoeisis. Angiotensin II menstimulasi proliferasi progenitor eritroid normal dan kekurangan enzim konverting-angiotensin (ACE) mungkin menyebabkan anemia. Angiotensin II berperan dalam regulasi produksi EPO oleh ginjal, konsisten dengan efek terapeutik inhibitor ACE pada eritrositosis sekunder pasca transplantasi ginjal.

Sitokin berperan penting dalam regulasi positif eritropoeisis. Mereka bekerja pada progenitor eritroid dan prekursor pada semua tahap maturasi. (BFU-E, CFU-E dan prekursor eritroid) untuk mencegah apoptopsis, menginduksi proliferasi dan meningkatkan atau menghambat/menunda diferensiasi. Penundaan dalam diferensiasi mungkin berperan penting dalam memungkinkan *self-renewal* dan ekspansi progenitor eritroid sebelum maturasi terminal, sehingga menyebabkan produksi sel darah merah meningkat. Sitokin sebagian besar diproduksi oleh sel stromal dan sel endotelial BM, di dalam lingkungan BM, tetapi juga oleh sel imun termasuk makrofag dan limfosit, serta oleh organ di luar BM, khususnya liver dan ginjal yang berturut-turut menghasilkan thrombopoietin (TPO) dan Epo.

Beberapa sitokin yang telah dijelaskan mempunyai aktivitas *burst-promoting*, yaitu: mereka bekerja pada progenitor eritroid awal untuk meningkatkan jumlah BFU-E, ini meliputi TPO, IL-3, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, GM-CSF. Namun demikian, tidak satupun dari mereka yang berperan kritikal dalam perkembangan eritroid in vivo. Pendekatan biokimiawi dan genetik, mengungkap bahwa, sebaliknya, SCF (*Stem Cell Factor*) dan Epo, yang bekerja pada reseptornya masing-masing c-Kit dan Epo-R, secara mutlak diperlukan untuk produksi sel eritroid. Tikus dengan mutasi gena SCF, atau pada gena reseptornya c-Kit berkembang menjadi anemia berat sebagai ciri eritropoeisis yang tertekan. Tikus dengan *Knock Out* pada Epo dan Epo-R mati karena gagal pembentukan eritrosit hepar saat fetal.

1. SCF dan c-Kit

Stem Cell Factor (SCF) adalah sitokin yang diproduksi oleh sel stromal, SCF berinteraksi dengan reseptornya (c-Kit). C-Kit diekspresikan sebagian besar pada progenitor hematopoietik CD34⁺ dan ekspresinya dipertahankan pada kadar tinggi selama tahap diferensiasi dari BFU-E sampai CFU-E; pada tahap akhir diferensiasi selama maturasi CFU-E, ekspresi c-Kit berkurang secara progresif dan hilang eritroblas polikromatofilik dan ortokromatik. Jadi, SCF berpengaruh pada sel eritroid sebagian besar selama awal dan akhir tahap diferensiasi progenitor eritroid, dan mungkin juga bekerja pada prekursor eritroid imatur.

Ada 2 isoform dari SCF yang dikode saat *splicing* mRNA, yaitu bentuk solubel dan terkait-membran. Pentingnya, tikus mutan yang kekurangan SCF terkait-membran, tetapi mempunyai bentuk solubel yang normal, ternyata menderita anemia berat. Meskipun belum diketahui secara jelas tentang perbedaan ini, mungkin ini berhubungan dengan kinetika aktivasi c-Kit. Aktivasi c-Kit oleh SCF terkait-membran mengakibatkan internalisasi dan degradasi yang lambat dan dalam hal peningkatan aktivasi ketika dibandingkan dengan aktivasi yang diinduksi bentuk solubel.

Pada tingkat seluler, SCF menginduksi peningkatan proliferasi dan kelangsungan hidup sel progenitor dan prekursor eritroid awal hingga CFU-E, dan tahap proeritroblas saat maturasi. Pada saat yang sama, SCF menunda diferensiasi dan maturasi eritroid. Efek ini memungkinkan *self-renewal* dari progenitor dan prekursor eritroid awal sebelum mereka mencapai tahap dimana sel tidak mampu lebih lama membelah lagi. Pada akhir tahap maturasi, peran utamanya adalah untuk mencegah apoptosis dan untuk menginduksi proliferasi, dan ini bersinergi dengan Epo.

Saat ini, tidak ada bukti bahwa produksi SCF diatur oleh kebutuhan terhadap sel darah merah dan oksigenasi di dalam BM. Sintesis CSF mungkin lebih konstitutif, meskipun tidak ada bukti, kadar SCF yang tersedia sangat mungkin tergantung pada konsumsi dari sejumlah protein c-Kit yang terekspresi pada prekursor eritroid. Faktanya, sekarang disetujui bahwa regulasi eritropoeisis terjadi pada tingkat CFU-E tergantung secara esensial pada kadar Epo yang tersedia.

2. Eritropoeitin dan Reseptor Eritropoeitin

Produksi eritrosit harian, meskipun diatur sangat ketat, namun kehilangan darah akibat perdarahan atau hemolisis terkait dengan peningkatan produksi retikulosit di dalam beberapa hari. Saat peningkatan produksi retikulosit dalam rangka menormalkan jumlah eritrosit di sirkulasi, laju pembentukan retikulosit baru malah menurun. Hal ini untuk menghindari terjadinya polisitemia. Epo bertanggung jawab untuk menjaga jumlah eritrosit berada pada keadaan homeostasis dalam rangka oksigenasi jaringan. Oleh karena itu, ada hubungan terbalik antara eritropoeisis dengan transpor oksigen oleh darah. Rentang normal konsentrasi Epo serum relatif rendah (5-30 mU/mL) dan pada kondisi fisiologis, penurunan linier terhadap hematokrit akibat peningkatan eksponensial pada Epo serum. Ginjal sebagai tempat utama produksi Epo untuk eritropoeisis definitif. Epo juga dihasilkan di liver orang dewasa, merupakan organ penghasil Epo yang utama selama eritropoeisis fetal yang saat

itu dimana eritropoeisis berlokasi di liver fetal. Jumlah sel yang menghasilkan Epo meningkat secara eksponensial dengan penurunan linier terhadap hematokrit. Pada liver orang dewasa, sel penghasil Epo adalah sel hepatosit dan sel intersisial, jumlah mereka meningkat dramatis seiring penurunan hematokrit. *Hypoxia Inducible Factor* (HIF)-1 α diinduksi oleh hipoksia dan berinteraksi dengan promotor gena EPO untuk membentuk kompleks faktor transkripsi yang secara positif mengatur ekspresi gena EPO. Kecepatan induksi HIF-1 α oleh hipoksia dan hilangnya segera setelah teratasinya hipoksia adalah konsekuensi dari kecepatan *ubiquitinasi* oleh kompleks yang melibatkan protein von Hippel-Lindau, dan kemudian degradasi oleh proteosom. Ikatan HIF-1 α oleh protein von Hippel-Lindau tergantung pada hidroksilasi 2 prolin khusus oleh prolin hidroksilase. Di dalam kompleks transkripsional, HIF-1 α dihidroksilasi pada residu asparagin oleh asparaginase hidroksilase, yang sebagai konsekuensinya adalah menghambat HIF-1 α terikat pada protein lain dari kompleks faktor transkripsi. Jadi, sel-sel normal mempunyai oksigen yang cukup untuk hidroksilasi HIF-1 α yang mengarah pada degradasi dan inaktivasi cepat, sedangkan sel hipoksik tidak mempunyai cukup oksigen untuk reaksi ini, HIF-1 α nonhidroksilasi tetap hidup dan melakukan mediasi transkripsi dari gena EPO. Dengan menarget gena EPO bahwa Epo tidak penting pada tahap eritropoeisis paling awal, termasuk BFU-E, demikian juga, pemberian Epo in vivo mempunyai pengaruh kecil terhadap jumlah BFU-E. Sebaliknya, pemberian EPO meningkatkan jumlah CFU-E dan prekursor eritroid secara dramatis sampai pada tahap eritroblas basofilik, terutama dengan cara mencegah apoptosis mereka. Progenitor dan prekursor eritroid menunjukkan sensitivitas Epo dengan rentang yang luas. Rentang sensitivitas Epo ini sesuai dengan rentang konsentrasi Epo serum eksponensial ditemukan pada keadaan anemia dan normal. Saat konsentrasi Epo rendah, hanya progenitor dan prekursor hipersensitif saja yang bisa hidup.

Namun demikian, regulasi apoptosis dari sel progenitor dan prekursor eritroid selama perkembangan mereka dari ketergantungan Epo, jelas cepat namun populasi eritrosit dalam respon terhadap hipoksia, hiperoksia dan anemia diatur secara ketat tanpa memerlukan beberapa pengaruh Epo pada siklus dan diferensiasi sel.

BAB 5

STRUKTUR NORMAL DAN REGULASI KLASTER GENA GLOBIN MANUSIA

A. Pendahuluan

Gena-gena yang mengkode rantai globin yang berbeda dari hemoglobin adalah anggota famili gena kuno. Pada bab ini, akan dijelaskan gambaran struktural dari gena globin, dengan perhatian khusus pada sekuens yang diperlukan untuk regulasi ekspresi gena yang tepat.

B. Struktur dan Fungsi

Kebutuhan oksigen yang bervariasi selama kehidupan saat embrionik, fetal dan dewasa dicerminkan dalam sintesis hemoglobin dengan struktur yang berbeda-beda pada masing-masing tahap perkembangan manusia. Namun demikian, mereka semua mempunyai struktur tetramerik umumnya sama, terdiri atas 2 pasang rantai globin yang berbeda, masing-masing menempel pada satu molekul hem. Hemoglobin fetal dan dewasa mempunyai rantai- α berkombinasi dengan rantai- β (HbA, $\alpha_2\beta_2$), dengan rantai- δ (HbA₂, $\alpha_2\delta_2$) dan rantai- γ (Hb F, $\alpha_2\gamma_2$). Pada saat embrio, rantai mirip- α disebut rantai- ζ yang kombinasi dengan rantai- γ menghasilkan Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$), atau kombinasi dengan rantai- ϵ membentuk Hb Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$), kadang-kadang rantai- α dan $-\epsilon$ membentuk Hb Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$). Hemoglobin fetal adalah heterogen, ada 2 varietas rantai- γ yang berbeda hanya pada komposisi asam amino pada posisi 136, yang ditempati glisin atau alanin, rantai- γ yang mengandung

glisin pada posisi ini disebut rantai $^G\gamma$, sedangkan bila ditempati alanin disebut rantai $^A\gamma$.¹²

Sintesis tetramer hemoglobin terdiri atas 2 pasang rantai globin yang tidak sama adalah mutlak penting/esensial untuk fungsi hemoglobin sebagai pengangkut oksigen. Kurva dissosiasi oksigen berbentuk sigmoid klasikal, yang mencerminkan sifat alosterik dari molekul hemoglobin, memastikan bahwa, pada saat tekanan oksigen tinggi di paru-paru, oksigen siap diambil dan akhirnya kemudian dilepaskan secara efektif di jaringan saat menemui tekanan di sana lebih rendah. Bentuk kurva ini sungguh berbeda pada myoglobin, suatu molekul yang terdiri atas rantai globin tunggal dengan terlekat hem padanya, mirip hemoglobin abnormal yaitu rantai yang mirip homotetramer, mempunyai kurva disosiasi hiperbola.

Sel darah merah fetal mempunyai afinitas terhadap oksigen lebih kuat dibandingkan sel darah merah pada dewasa, meskipun hemoglobin fetal yang dimurnikan mempunyai kurva dissosiasi oksigen mirip dengan hemoglobin dewasa. Perbedaan ini menyesuaikan terhadap kebutuhan oksigen fetus, tercermin dari kemampuan relatif dari Hb F berinteraksi dengan 2,3-DPG dibanding Hb A. Hal ini disebabkan rantai- γ dari Hb F kekurangan tempat ikatan khusus terhadap 2,3-DPG.

Singkat cerita, transpor oksigen dapat dimodifikasi oleh berbagai fitur-fitur adaptif pada sel darah merah yang meliputi interaksi antara molekul hem yang berbeda, efek CO_2 dan perbedaan afinitas terhadap 2,3-DPG. Perubahan-perubahan ini, bersama-sama dengan lebih banyak mekanisme umum yang melibatkan sistem kardiovaskular, menyediakan basis utama untuk adaptasi fisiologis terhadap anemia.

C. Kontrol Genetik Hemoglobin

Rantai globin mirip- α dan mirip- β adalah produk dari 2 famili gena yang berbeda dan ditemukan dalam famili gena yang berbeda pula. Gena-gena globin mirip- β membentuk sebuah klaster yang terhubung satu dengan lainnya pada kromosom 11, menyebar luas kira-kira 60kb (1000 basa nukleotid).¹⁸ α -gena yang berbeda tersebut dalam klaster ini tersusunurut dari $5'-\epsilon-^G\gamma-^A\gamma-\psi\beta-\delta-\beta-3'$. Gena-gena globin mirip- α juga

membentuk klaster yang terhubung satu dengan lainnya pada kromosom 16, dalam urutan 5'ζ-ψζ-ψα₁-α₂-α₁-3'. Gena ψβ, ψζ, dan ψα adalah pseudogena, yang mana mereka mempunyai sekuens yang kuat dan homolog dengan gena β, ζ, α tetapi mengandung sejumlah perbedaan bahwa mencegahnya dari mengarahkan sintesis dari berbagai produk. Mereka mencerminkan sisa-sisa dari gena yang fungsional pada tahap paling awal dari evolusi manusia.

Struktur gena globin manusia, yang pokok adalah mirip dengan hampir semua gena mamalia. Mereka tersusun dari untai nukleotida yang panjang dibagi ke dalam regio koding, atau ekson, dan regio sisipan non-koding yang sering disebut *intervening sequences* (IVS) atau intron. Gena globin mirip-β berisi 2 intron, salah satunya 122–130 pasangan basa antara kodon 30 dan 31 dan yang lainnya 850–900 pasangan basa antara kodon 104 dan 105 (kodon ekson sejumlah urutan dari 5' ke akhir gena 3', contohnya dari kiri ke kanan). Mirip dengan itu, meskipun lebih kecil, intron yang ditemukan dalam gena globin-α dan -ζ. Intron dan ekson ini, bersama-sama dengan sekuens non-koding yang pendek pada 5' dan 3' akhiran gena, mewakili regio fungsional dari gena-gena khusus. Namun demikian, ada sekuen regulatori penting sangat ekstrim yang melayani fungsi-fungsi ini yang berada di luar gena tersebut.

Pada gena globin regio non-koding (*flanking*) 5', terdapat pada semua gena mamalia, ada blok nukleotid homolog. Pertama, TATA box, kira-kira 30 basa *upstream* (ke kiri) dari kodon inisiasi, yang mana sebagai kata “*start*” untuk mengawali sintesis protein. Kedua, CCAAT box, kira-kira 70 pasangan basa upstream dari akhir 5' dari gena. Kira-kira 80–100 basa jauh *upstream*, di sana ada sekuens GGGGTG atau CACCC yang mungkin terbalik atau duplikasi. Ketiga sekuens DNA yang dilindungi sangat ketat ini disebut elemen promotor, mereka terlibat dalam inisiasi transkripsi dari gena individual. Terakhir, pada regio non-koding 3' dari semua gena globin di sana terdapat sekuens AATAAA, yang merupakan sinyal untuk *cleavage* dan penambahan polyA pada transkrip RNA.

Klaster gena globin juga mengandung beberapa urutan yang menyusun elemen regulatori, yang mana berinteraksi untuk meningkatkan ekspresi gena spesifik-eritroid dan koordinasi dari

perubahan di dalam aktivitas gena globin selama perkembangan. Di sini meliputi gena globinnya sendiri dan elemen promoternya disebut *enhancer* (sekuens regulatori yang meningkatkan ekspresi gena walaupun berlokasi pada tempat yang sangat jauh dari gena) dan sekuens regulatori “*master*”, pada kasus klaster gena globin- β , disebut *Locus Control Region* (LCR). Pada kasus gena- α , HS40 (tempat hipersensitif-nuklease di dalam DNA 40kb dari gena globin- α). Masing-masing sekuen ini mempunyai struktur modular yang membuat bagus suatu array motif pendek yang mewakili tempat ikatan terhadap aktivator atau represor transkripsi.

D. Kerja Gena dan Sintesis Globin

Ketika gena globin ditranskripsi, RNA messenger (mRNA) disintesis dari salah satu pita, suatu proses yang dimulai dengan pembentukan kompleks transkripsi yang terdiri atas berbagai protein regulatori bersama-sama dengan enzim disebut RNA polimerase. Transkrip primer adalah prekursor mRNA besar yang masih mengandung baik sekuens ekson maupun intron. Selama di dalam inti sel, molekul ini mengalami berbagai modifikasi. Pertama, intron diambil dan ekson dipotong secara bersamaan. Sambungan intron/ekson selalu mempunyai sekuens yang sama yaitu GT pada akhir 5' dan AG pada akhir 3'. Di sini menjadi penting untuk akurasi pemotongan (*splicing*), bila tempat ini mengalami mutasi, maka proses selanjutnya tidak akan terjadi. *Splicing* mencerminkan suatu kompleks serial dari tahap intermediat dan interaksi dari sejumlah protein inti yang berbeda. Setelah ekson disambung, mRNA dimodifikasi dan distabilkan, pada akhir 5' dibentuk struktur komplek CAP, sebaliknya pada akhir 3' ditambahkan pita residu asam adenilat (polyA). mRNA diproses pada jalan ini bergerak menuju sitoplasma, dimana ia bekerja sebagai cetakan (*template*) untuk produksi rantai globin. Karena peran dari pasangan basa (contohnya: cytosine selalu berpasangan dengan thymine, dan guanine dengan adenine), struktur mRNA mencerminkan salinan yang sesuai dari kodon DNA seperti yang disintesis, hanya perbedaannya pada RNA urasil (U) menggantikan thymine (T).

Asam amino dibawa ke cetakan mRNA oleh suatu pembawa yang disebut RNA transfer (tRNA), di sana tRNA khusus membawa asam amino tertentu, karena kode genetiknya *redundant* (misalnya, lebih dari 1 kodon dapat mengkode satu asam amino khusus), untuk beberapa asam amino ada beberapa tRNA individual yang berbeda. Permintaan rantai globin ditentukan oleh permintaan kodon di dalam mRNA. tRNA berisi 3 basa, yang bersama-sama membentuk antikodon, antikodon ini sesuai cocok dengan kodon mRNA untuk asam amino tertentu. Mereka membawa asam amino menuju cetakan/*template*, dimana mereka menemukan posisi yang tepat oleh karena pasangan basa kodon-antikodon. Ketika tRNA pertama pada posisi, merupakan kompleks inisiasi yang dibentuk antara beberapa faktor inisiasi protein yang bersama-sama dengan 2 subunit ribosom. tRNA ke-2 bergerak di sampingnya dan 2 asam amino yang mereka bawa membentuk ikatan peptid di antara mereka, rantai globin sekarang mempunyai panjang sebanyak 2 residu asam amino. Proses ini terus menerus berlanjut sepanjang mRNA dari kiri ke kanan, dan menambah panjang ikatan peptida dari satu tRNA yang datang terus berlanjut ke berikutnya, sampai semua mRNA ditranslasi dari 5' sampai 3'. Ada kodon inisiasi (AUG) dan kodon terminasi (UAA, UAG dan UGA). Ketika ribosom mencapai kodon terminasi, maka translasi putus/berhenti, rantai globin lengkap dilepaskan dan subunit ribosom didaur ulang. Rantai globin individual bergabung dengan hem, yang disintesa melalui jalur yang terpisah dan kemudian mereka berinteraksi dengan satu rantai yang mirip dan dua rantai yang tidak mirip untuk membentuk tetramer hemoglobin lengkap.

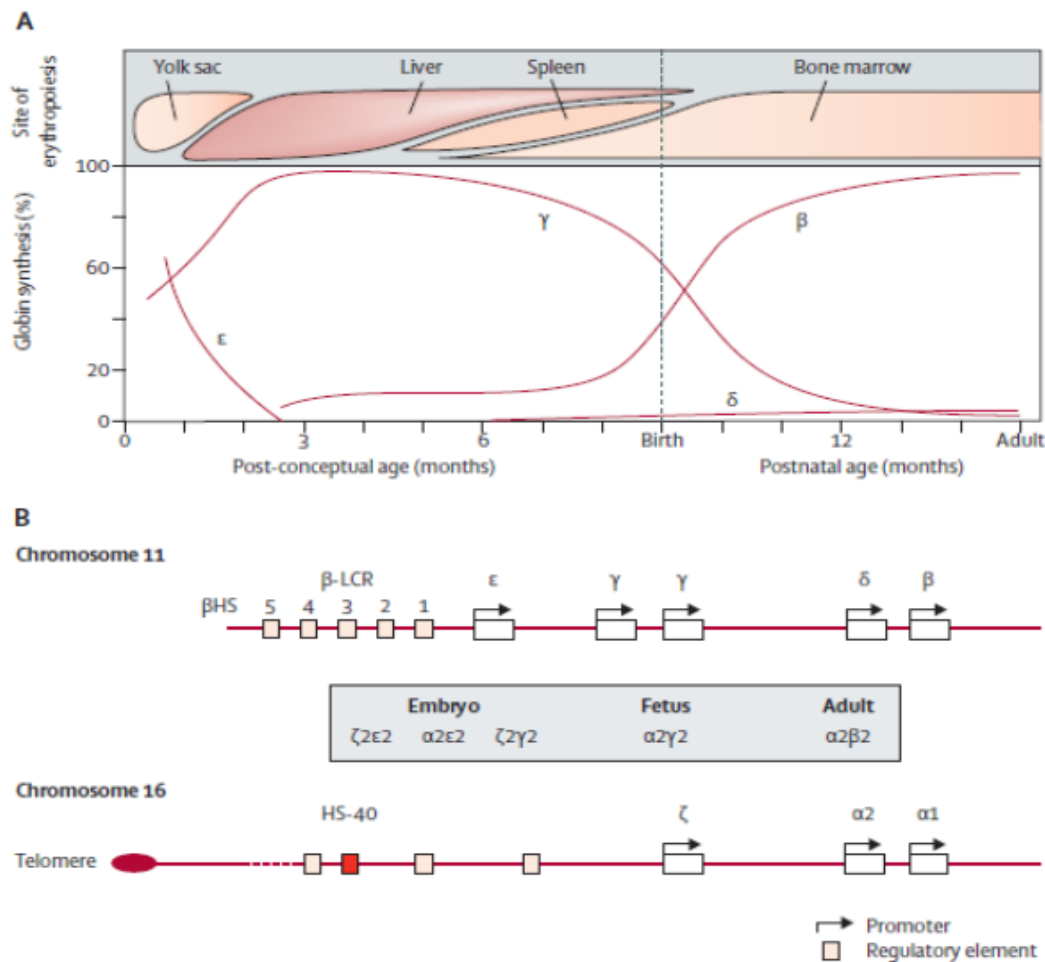
E. Regulasi Sintesis Hemoglobin

Regulasi ekspresi gena globin dimediasi sebagian besar pada tahap transkripsional, dengan beberapa penyesuaian selama translasi dan modifikasi produk gena pascatranslasi. DNA yang tidak terlibat dalam transkripsi disimpan sangat kuat dalam suatu bentuk paket yang padat, dimodifikasi secara kimiawi, tidak bisa diakses terhadap faktor transkripsi dan polimerase, serta dimetilasi secara kuat. Aktivasi gena tertentu dicerminkan oleh perubahan struktur dari kromatin

sekeklilingnya, yang dapat diidentifikasi dengan cara memperkuat sensitivitas terhadap nuklease. Tempat-tempat hipersensitif-nuklease lini eritroid-khusus ditemukan pada beberapa lokasi di dalam klaster gena globin- β . ada 4 yang didistribusikan lebih dari 20 kb *upstream* dari gena globin- ϵ pada regio LCR globin- β . Regio regulatori vital ini mampu menegakkan domain aktif secara transkripsional merentang pada keseluruhan klaster gena globin- β . Beberapa sekuens *enhancer* telah teridentifikasi pada klaster ini. berbagai protein regulatori terikat pada LCR, dan pada regio promoter dari gena globin serta pada sekuens *enhancer*. Hal ini diketahui bahwa LCR dan regio *enhancer* lainnya menjadi berlawanan terhadap promoter untuk meningkatkan laju transkripsi gena yang berkaitan.

Regio regulatori ini berisi motif sekuens untuk berbagai faktor transkripsi terbatas-eritroid dan tersebar dimana-mana. Tempat ikatan faktor-faktor ini telah teridentifikasi pada masing-masing promoter gena globin dan pada regio tempat-hipersensitif dari berbagai elemen regulatori. Sejumlah faktor yang terikat pada area ini ditemukan pada semua jenis sel. Mereka terdiri atas Sp1, Yy1 dan Usf. Sebaliknya, sejumlah faktor transkripsi telah teridentifikasi, meliputi GATA-1, EKLF dan NF-E2, yang terbatas dalam distribusinya terhadap sel eritroid dan dalam beberapa kasus pada sel megakaryosit serta sel mast. Tumpang-tindihnya tempat ikatan faktor-yang tersebar dimana-mana dan khusus-eritroid pada beberapa kasus mendukung bahwa ikatan kompetitif berperan penting sebagai bagian dalam regulasi gena khusus-eritroid. Faktor ikatan lainnya, *Stage Selector Protein* (SSP), muncul untuk berinteraksi secara khusus dengan gena ϵ dan γ . Beberapa elemen melibatkan kromatin dan asetilasi histon untuk mengakses protein regulatori ini telah teridentifikasi. Ikatan dari faktor-faktor khusus-hematopoeitik mengaktivasi LCR, sehingga membuat keseluruhan klaster gena globin- β menjadi aktif secara transkripsional. Faktor-faktor ini terikat pada sekuens *enhancer* dan promoter, yang bekerja tandem untuk mengatur ekspresi dari gena individual di dalam klaster. Hal ini mirip bahwa beberapa faktor transkripsional berhubungan dengan perkembangan tahap-khusus dan oleh karena itu mungkin bertanggung terhadap ekspresi yang berbeda-beda dari gena globin embrionik, fetal

dan dewasa. Kluster gena globin- α juga mengandung elemen, HS40, yang mempunyai beberapa fitur-fitur struktural yang umum sama dengan LCR β , meskipun berbeda pada aspek strukturnya. Sejumlah sekuens mirip-*enhancer* juga telah diidentifikasi, meskipun menjadi jelas bahwa ada perbedaan mendasar pada pola regulasi dari dua kluster gena globin ini.



Gambar 5.1. Regulasi sintesis Hemoglobin (Higgs *et al.*, 2012)

Selain itu, ada juga perbedaan *outline* sekuens regulatori di atas, yaitu ada sekuens yang mungkin terlibat secara khusus dengan gena “silencing”, tercatat itu untuk hemoglobin embrionik, selama perkembangan. Beberapa tingkatan regulasi juga dimediasi oleh perbedaan dalam laju inisiasi dan translasi dari mRNA yang berbeda, dan pada tingkat pasca-transkripsional oleh karena perbedaan afinitas

terhadap sub unit protein yang berbeda. Namun demikian, jenis penyesuaian/penyetelan yang tepat mempunyai peluang dalam memainkan peran sedikit relatif dalam menentukan keseluruhan output dari produk gena globin.

F. Regulasi Perubahan Perkembangan Ekspresi Gen Globin

Selama perkembangan, tempat produksi sel darah merah berpindah dari *yolk sac* menuju hepar dan limpa fetal, dan selanjutnya menuju sumsum tulang saat dewasa. Sintesis hemoglobin embrionik, fetal dan dewasa kira-kira dihubungkan dalam waktu terhadap perubahan ini di dalam tempat eritropoeisis, meskipun sungguh jelas bahwa berbagai pergantian, antara sintesis hemoglobin embrionik dan fetal, maupun antara fetal dan dewasa, tersinkronisasi secara bagus melalui tempat yang berbeda ini. Sintesis hemoglobin fetal menurun selama bulan-bulan akhir dari kehamilan dan HbF digantikan dengan HbA dan Hb A₂, pada saat akhir dari tahun pertama kehidupannya. Kesepakatan besar dari penelitian, bahwa sangat kecil diketahui tentang regulasi penggantian yang berbeda ini dari satu gena globin ke gena globin lainnya selama perkembangan. Aksi dari berbagai sumber-sumber yang berbeda mendukung bahwa mungkin ada regio khusus pada klaster gena globin- α dan $-\beta$ yang responsif terhadap kerja faktor transkripsi, beberapa di antaranya mungkin menjadi berkembang pada tahap khusus. Namun demikian, protein dari jenis ini bisa jadi tidak terisolasi, dan tidak diketahui mengenai regulasi mereka dan bagaimana ia dimediasi selama perkembangan.

BAB 6

PATOLOGI MOLEKULER HEMOGLOBIN

A. Pendahuluan

Pada hampir sebagian besar kasus penyakit monogenik, gangguan hemoglobin yang diturunkan terbagi menjadi 2 kelas besar. **Pertama**, akibat dari pengurangan *output* dari satu atau lebih gena globin, kemudian yang **ke-2** adalah akibat dari produksi rantai globin yang abnormal strukturnya, dan ini mempunyai rentang kondisi yang luas serta jenis penyakitnya tergantung pada bagaimana perubahan khusus yang terjadi dalam struktur protein sehingga mengganggu stabilitas dan fungsinya. Oleh karena itu, tidak ada klasifikasi secara biologi yang memuaskan secara keseluruhan dalam mendefinisikan gangguan hemoglobin. Ada beberapa varian struktur hemoglobin yang disintesa dengan laju yang berkurang dan selanjutnya terkait dengan gambaran klinis mirip dengan talasemia. Ada pula kelas mutasi lainnya yang secara sederhana memengaruhi transisi normal dari sintesis hemoglobin fetal ke dewasa, selanjutnya sering disebut hemoglobin fetal persisten hereditas. Lagi pula, penyakit ini semuanya adalah hal umum dan terjadi bersama-sama dalam populasi tertentu, hal ini bukan tidak umum bagi individu untuk menurunkan sebuah gena terhadap satu atau lebih bentuk talasemia dan hemoglobin varian strukturalnya.

Akhir-akhir ini, determinasi patologi molekuler dari 2 bentuk talasemia yang umum terjadi yaitu alfa dan beta, memberikan gambaran yang luar biasa dari daftar mutasi yang dapat mendasari penyakit monogenik pada manusia. Selanjutnya, akan dijelaskan lebih rinci

tentang bentuk-bentuk perbedaan patologi molekuler yang mendasari masing-masing keadaan tersebut.

B. Talasemia Beta (β)

Talasemia beta dibagi dalam 2 kelas besar yaitu talasemia β^0 , yang mana tidak ada produksi rantai globin- β , dan talasemia β^+ , yang mana ada reduksi bervariasi pada *output* rantai globin- β . Mutasi gena globin- β mungkin menyebabkan reduksi *output* produk gena pada tingkat transkripsi atau mRNA *processing*, translasi, atau melalui stabilitas produk gena globin.

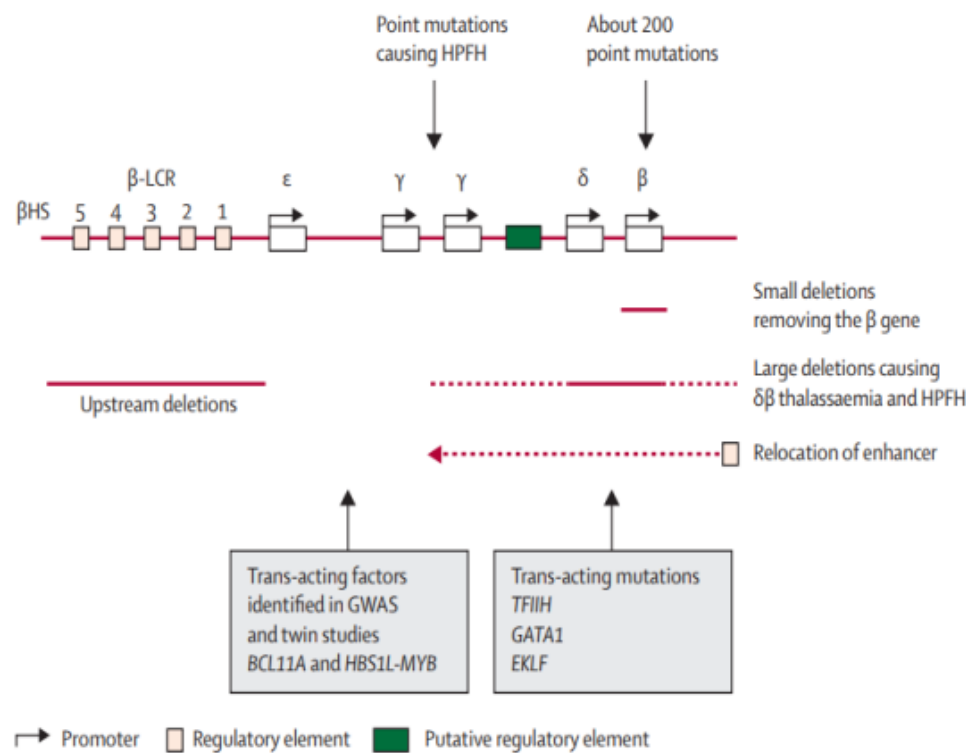
1. Defektif Transkripsi Gena Globin- β

Terdapat variasi mekanisme yang mengganggu transkripsi normal dari gena globin- β . **Pertama**, gena mungkin masing-masing delesi lengkap atau sebagian. Secara keseluruhan, delesi gena globin β tidak umum ditemukan pada pasien dengan talasemia β , dengan pengecualian: sebuah delesi 619-bp termasuk akhir 3' dari gena yang sering ditemukan pada populasi Sind di India dan Pakistan, dimana ini terdapat kira-kira 30% dari alel talasemia β , delesi lainnya sangat jarang.

Kedua, ada beberapa grup mutasi yang menyebabkan penurunan laju transkripsi gena globin β secara moderat, termasuk substitusi nukleotid tunggal di dalam atau dekat TATA box kira-kira -30 nukleotid (nt) dari tempat dimulainya transkripsi, atau pada elemen promoter proksimal atau distal kira-kira -90 nt dan -105 nt. Mutasi ini mengakibatkan pengurangan produksi mRNA globin β , dengan rentang 10–25% dari *output* normal. Jadi, mereka biasanya dikaitkan dengan bentuk talasemia β^+ ringan, khususnya terdapat pada populasi Afrika. Salah satu mutasi khusus, C→T pada posisi -101 nt menuju gena globin β , menyebabkan defisit mRNA globin β terlalu ringan. Oleh karena itu, alel ini ringan sehingga pada karier menjadi *silent* lengkap dan hanya dapat diidentifikasi oleh interaksi mereka dengan lebih banyak alel talasemia β berat yang bergabung dalam heterozigot.

2. Mutasi yang Menyebabkan *Processing mRNA Abnormal*

Seperti yang telah dijelaskan di awal, bahwa batas-batas antara ekson dan intron ditandai oleh dinukleotid invariant GT pada tempat donor (5') dan AG pada tempat akseptor (3'). Mutasi yang memengaruhi masing-masing tempat ini secara lengkap menghapus *splicing* normal dan menghasilkan fenotip talasemia β^0 . Transkripsi dari gena yang membawa mutasi ini muncul normal, tetapi terjadi inaktivasi *splicing* yang lengkap pada sambungan yang terkena.



Gambar 6.1. Pola mutasi yang terjadi pada gena globin- β (Higgs *et al.*, 2012)

Jenis mutasi lainnya adalah *splice site consensus sequences*. Meskipun hanya dinukleotid GT adalah invariant pada tapak *splice* donor, namun di sana terdapat konservasi nukleotid-nukleotid perbatasan dan umumnya disebut *consensus*, sekuens dari regio ini yang dapat diidentifikasi. Mutasi di dalam sekuens ini dapat

menurunkan efisiensi *splicing* sampai berbagai tingkat karena mereka mengarah terhadap *splicing* alternatif pada tempat yang tidak jelas di sekitarnya. Sebagai contoh, mutasi nukleotid pada posisi 5 dari IVS-1 (*the first intervening sequence*), G→C atau T, menyebabkan reduksi produksi rantai β yang jelas sehingga menimbulkan fenotip talasemia β^+ berat. Di lain tempat, substitusi C terhadap T pada posisi 6 dari IVS-1 mengarah hanya pada reduksi ringan dari output rantai β .

Mekanisme lainnya yang mengarah pada *splicing* abnormal termasuk *cryptic splice site*. Ini adalah regio DNA, yang jika terjadi mutasi, diasumsikan fungsi dari tapak *splice* pada regio yang tidak tepat dari prekursor mRNA. Sebagai contoh, variasi mutasi yang mengaktivasi tempat yang tidak jelas pada rentang kodon 24–27 ekson 1 dari gena globin β . Tempat ini mengandung dinukleotida GT, dan substitusi perbatasan yang mempengaruhinya, maka ini lebih menyerupai konsensus tapak *splice* donor sehingga mengaktifkannya, meskipun tapak *splice* normalnya masih intact. Mutasi pada kodon 24 GGT→GGA, walaupun ia tidak memengaruhi asam amino yang ditemukan secara normal pada posisi rantai globin β (glycin), memungkinkan beberapa *splicing* terjadi pada tempat ini, daripada perbatasan ekson-intron. Hal ini menyebabkan produksi mRNA globin β yang terpotong menjadi normal dan abnormal sehingga selanjutnya menimbulkan fenotip klinis talasemia β yang berat. Yang menarik, mutasi pada kodon 19, 26 dan 27 menyebabkan penurunan produksi mRNA normal (berhubungan dengan *splicing* abnormal) dan substitusi asam amino ketika mRNA yang terpotong secara normal ditranslasi menjadi protein. Hemoglobin abnormal yang dihasilkan berurutan-turut adalah Hb Malay, Hb E dan Hb Knossos. Semua varian ini terkait dengan fenotip talasemia β -like β^+ ringan. Mutasi ini menggambarkan bagaimana perubahan sekuens koding lebih banyak daripada sekuens intervening dalam mempengaruhi RNA *processing* dan menggarisbawahi pentingnya kompetisi di antara sekuens tapak *splice* yang berpotensi dalam membangkitkan varietas mRNA globin β normal maupun abnormal.

Tapak *splice* yang tidak jelas di intron mungkin juga membawa mutasi yang mengaktifkannya meskipun tapak *splice* normalnya masih intak. Mutasi yang biasa dari jenis ini terdapat pada populasi mediterania meliputi substitusi basa pada posisi 110 di dalam IVS-1. Regio ini mengandung sekuens yang mirip tempat akseptor 3', meskipun ia kekurangan dinukleotida AG invarian. Perubahan G menjadi A pada posisi 110 menciptakan dinukleotida ini. Akibatnya adalah kira-kira 90% transkrip RNA dipotong pada tempat khusus ini dan hanya 10% pada tempat normal, menghasilkan fenotip talasemia β^+ berat (Gambar 5.3). Beberapa mutasi talasemia β lainnya telah dijelaskan terjadi pada tempat donor baru di dalam IVS-2 dari gena globin β .

Mutasi lainnya yang mengganggu *processing* gena globin β meliputi sekuens AAUAAA pada regio 3' *untranslated*, yang merupakan sinyal untuk *cleavage* dan *polyadenylation* transkrip gena globin β . Bagaimanapun juga, mutasi ini menimbulkan destabilisasi transkrip. Sebagai contoh, substitusi T $\rightarrow$ C pada sekuens ini mengarah hanya pada 1/10 jumlah normal dari transkrip mRNA globin β dan selanjutnya menimbulkan fenotip talasemia β^+ berat moderat. Contoh lain adalah mutasi yang mungkin mengarah pada defektif *processing* dari fungsi mRNA globin β yaitu substitusi basatunggal A $\rightarrow$ C di dalam tempat CAP. Walaupun belum dimengerti sepenuhnya bagaimana mutasi ini menyebabkan penurunan laju transkripsi gena globin β .

Ada mutasi yang lain walaupun sangat jarang yaitu melibatkan regio 3' *untranslated* dari gena globin β dan ini terkait dengan bentuk talasemia β ringan relatif. Diketahui bahwa mutasi ini mengganggu transkripsi namun mekanismenya tidak diketahui dengan pasti.

3. Mutasi yang Mengakibatkan Translasi mRNA Globin- β Abnormal

Ada 3 kelas besar mutasi jenis ini. Substitusi basa mengubah kodon asam amino menjadi kodon rantai terminasi sehingga mencegah translasi mRNA globin β dan menimbulkan fenotip talasemia β^0 . Beberapa mutasi dari jenis ini, telah dijelaskan paling sering terjadi pada kodon 17, yang banyak terdapat pada populasi Asia Tenggara, kemudian ada kodon 19 yang sering terjadi di Mediterania.

Klas ke-2 yaitu meliputi insersi atau delesi dari satu, dua atau empat nukleotida yang mengkode regio gena globin β . Hal ini akan merusak *reading frame*, menyebabkan *frameshift* dan selanjutnya mengganggu translasi mRNA globin β . Akibat akhir adalah insersi anomali asam amino setelah *frameshift* hingga kodon terminasi dicapai pada *frame reading* yang baru. Tipe mutasi ini selalu mengarah pada fenotip talasemia β^0 .

Yang terakhir, ada beberapa mutasi yang terlibat dalam kodon inisiasi gena globin β , diperkirakan dapat menurunkan efisiensi translasi.

4. Varian Rantai Globin- β *Unstable*

Beberapa bentuk talasemia β akibat dari sintesis rantai globin β *unstable* yang terlalu banyak sehingga menyebabkan ketidakmampuan membentuk tetramer hemoglobin dan cepat terdegradasi dan selanjutnya menimbulkan fenotip talasemia β^0 . Tentu saja, pada beberapa keadaan ini tidak ada produk rantai globin yang abnormal, ini dapat ditunjukkan dengan analisis protein dan patologi molekuler telah menginterpretasikan secara sederhana pada basis sekuens yang berasal dari rantai β varian, diperoleh dari analisis DNA.

Penelitian terkini, banyak mengungkap fenotip klinis kompleks akibat sintesis produk globin β tidak stabil. Sebagai contoh, ada spektrum gangguan akibat mutasi di ekson 3 yang menimbulkan bentuk talasemia β berat moderat pada *heterozigot*. Ini

ditemukan bahwa mutasi nonsense atau *frameshift* pada ekson I dan II terkait dengan ketadaan mRNA dari sitoplasma prekursor sel darah merah. Hal ini terjadi pada mekanisme adaptif yang disebut *non-sense mediated decay*, dimana mRNA abnormal jenis ini tidak ditransportasikan ke sitoplasma, dimana ia bekerja sebagai template untuk produksi produk gena yang tidak lengkap. Namun demikian, pada kasus mutasi di ekson III, rupanya karena proses ini membutuhkan adanya ekson *upstream* intact, mRNA abnormal ditransportasikan ke sitoplasma dan selanjutnya dapat bekerja sebagai template produksi rantai globin β tidak stabil. Akhirnya presipitat pada prekursor sel darah merah bersama-sama dengan kelebihan rantai α untuk membentuk badan inklusi, dan selanjutnya terjadi ketidakseimbangan rantai globin yang cukup pada *heterozigot* sehingga menghasilkan tingkat anemia yang berat moderat.

5. Hubungan Genotip-Fenotip pada Talasemia β

Seperti yang sudah diketahui bahwa defek dasar yang menimbulkan lebih dari 200 mutasi yang berbeda adalah berkurangnya produksi rantai globin β . Sintesis rantai globin α berproses secara normal, sehingga menimbulkan ketidakseimbangan *output* rantai globin dengan kelebihan rantai α . Rantai α yang tidak punya pasangan membentuk gumpalan baik pada prekursor sel darah merah maupun progeni mereka sehingga menghasilkan badan inklusi. Hal ini mengganggu berbagai jalur kompleks kehidupan maupun maturasi sel yang normal. Menempelnya badan inklusi ke membran sel darah merah menyebabkan gangguan strukturnya dan produk degradasinya, yaitu heme, hemin (heme teroksidasi) dan zat besi, menyebabkan kerusakan oksidatif terhadap isi dan membran sel darah merah. Interaksi ini menyebabkan destruksi prekursor sel darah merah intramedulla dan memperpendek kelangsungan hidup mereka saat mencapai darah perifer. Akibat akhirnya adalah anemia dengan berbagai tingkat keparahan. Selanjutnya, akan menyebabkan hipoksia jaringan dan memproduksi eritropoeitin dalam jumlah relatif besar. Akhirnya akan mengarah terjadinya ekspansi yang

masif dari sumsum tulang secara tidak efektif, sehingga menimbulkan deformitas tulang, keadaan hipermetabolik dan fragilitas tulang.

Proporsi besar dari hemoglobin pada darah penderita talasemia β adalah dari varietas fetal. Individu normal menghasilkan Hb F kira-kira 1%, yang didistribusikan tidak merata di antara sel-sel darah merah. Pada sumsum tulang pasien talasemia β , setiap prekursor sel darah merah yang mensintesis rantai γ menjadi di bawah seleksi yang kuat sehingga menyebabkan mereka berkombinasi dengan rantai α untuk menghasilkan hemoglobin fetal dan kemudian tingkat ketidakseimbangan rantai globin dapat berkurang. Selanjutnya, kemungkinan produksi rantai γ tampak meningkat di dalam eritroid sumsum tulang. Hal ini sepertinya adalah 2 faktor kombinasi yang dilakukan untuk meningkatkan output Hb F secara relatif pada gangguan ini. Namun demikian, karena ia mempunyai afinitas yang lebih tinggi terhadap oksigen daripada Hb A, maka selanjutnya pasien talasemia β tidak mampu beradaptasi pada kadar hemoglobin yang rendah.

Lebih jauh, akibat tidak efektifnya eritrosit akan menyebabkan peningkatan laju absorpsi zat besi dan ditambah dengan zat besi dari transfusi, menyebabkan tumpukan progresif dari zat besi di jaringan sehingga menimbulkan kerusakan liver, jantung dan endokrin.

Akibat masuknya sel darah merah abnormal secara konstan dan banyak, menimbulkan hipertropi limpa selanjutnya terjadi splenomegali progresif akibat peningkatan volume plasma dan terjabaknya massa sel darah merah yang beredar dalam sirkulasi di dalam limpa. Ini memperburuk keadaan anemia. Semua mekanisme patofisiologi, kecuali penimbunan zat besi, dapat didaur ulang oleh transfusi darah reguler, namun mempunyai efek penghentian sumsum tulang inefektif dan konsekuensinya.

Keberagaman fenotipe, meskipun sebagian besar pasien homozigot mutasi talasemia β atau gabungan heterozigot terhadap 2 mutasi yang berbeda mempunyai fenotip ketergantungan yang berat terhadap transfusi, tetapi masih ada beberapa pengecualian. Beberapa pasien jenis ini mempunyai keadaan yang lebih ringan,

hanya membutuhkan sedikit atau bahkan sama sekali tidak perlu transfusi, keadaan ini disebut talasemia β intermedia. Contoh keadaan khusus yang penting ini adalah digambarkan oleh penemuan klinis pada orang yang diturunkan dari salah satu orang tuanya menderita talasemia β dan yang lainnya menderita Hb E, gangguan ini disebut talasemia β /HbE. Karena mutasi yang menghasilkan Hb E juga mengungkap suatu alternatif tapak *splice* di ekson pertama dari gena globin β , ini disintesa pada kecepatan yang rendah dan oleh karena itu berjalan seperti bentuk talasemia β yang ringan. Ini merupakan varian hemoglobin yang paling sering terjadi secara global dan talasemia β /Hb E adalah bentuk talasemia berat yang paling sering terjadi di beberapa negara Asia. Ia mempunyai variabel fenotip yang tidak biasa, mempunyai rentang dari kondisi yang tidak dapat dibedakan pada talasemia β mayor sampai salah satu dari yang paling ringan yaitu pasien tumbuh dan berkembang sangat normal dan tidak pernah memerlukan transfusi.

Sampai saat ini, suatu kesepakatan besar telah dicapai mengenai beberapa mekanisme yang terlibat dalam variabilitas fenotip yang luar biasa besar ini. Singkat cerita, hal itu mencerminkan adanya kerja dari modifikasi gena dan variabilitas dalam adaptasi terhadap anemi, dan yang paling dipercaya adalah efek dari lingkungan. Berdasar kompleksitas dari interaksi ini, ada baiknya untuk membagi modifier genetik fenotip talasemia β menjadi 3 kelas yaitu primer, sekunder dan tertier.

Modifier primer adalah alel yang berbeda dari talasemia β yang dapat berinteraksi bersama-sama. Sebagai contoh, gabungan heterozigot untuk mutasi talasemia β^0 yang berat dan salah satu yang lebih ringan mungkin mempunyai bentuk intermediat dari talasemia β dengan berbagai variasi yang tergantung pada tingkat reduksi sintesis globin β di bawah kerja alel yang lebih ringan. Hal ini adalah salah satu mekanisme yang tidak diragukan untuk keparahan yang bervariasi dari talasemia β /Hb E, ini secara sederhana mencerminkan kerja variabel dari mutasi talasemia β yang diturunkan bersama-sama dengan Hb E. Namun demikian, penjelasan ini tidak relevan

pada kasus pasien dengan mutasi talasemia β identikal yang mempunyai disparitas fenotip yang luas.

Modifier sekunder adalah yang secara langsung memengaruhi tingkat ketidakseimbangan rantai globin. Pasien dengan talasemia β yang juga mewarisi satu atau lebih bentuk talasemia α cenderung mempunyai fenotip yang lebih ringan karena reduksi kelebihan gena globin α yang disebabkan oleh alel talasemia α yang hidup berdampingan. Mirip dengan ini, pasien dengan bentuk talasemia berat yang mewarisi lebih banyak gena α dibanding dengan normal karena orang tuanya terdapat susunan gena α *triplicated* dan *quadruplicated* cenderung mempunyai fenotip yang lebih berat. Pasien lainnya dengan alel talasemia berat nampak menjadi lebih ringan karena secara genetika menentukan kemampuan untuk menghasilkan lebih banyak rantai- γ dan selanjutnya menjadi hemoglobin fetal, sebuah mekanisme yang juga menyebabkan penurunan tingkat ketidakseimbangan rantai globin. Sekarang jelas bahwa beberapa lokus gena terlibat dalam mekanisme ini, ciri yang paling khas adalah polimorfisme pada promotor regio gena globin γ yang muncul untuk meningkatkan *output* dari lokus ini di bawah kondisi stres hemopoeitik. Namun demikian, ada gena lain yang jelas terlibat dalam meningkatkan *output* Hb F. Penelitian terbaru tentang genom menyatakan dengan jelas bahwa ada bukti yang menentukan pada kromosom 6 dan 8 serta suatu hubungan yang sangat kuat telah ditemukan dengan adanya BCL11A, sebuah faktor transkripsi yang diketahui terlibat dalam hematopoiesis. Mekanisme nyata adalah telah ditetapkan adanya kaitan dengan peningkatan Hb F pada pasien talasemia β dan anemia sel sabit.

Modifier tertier adalah tidak mempunyai efek terhadap sintesis hemoglobin tetapi memodifikasi beberapa komplikasi yang berbeda pada talasemia β , meliputi osteoporosis, absorpsi zat besi, *jaundice*, dan kerentanan terhadap infeksi.

Meskipun sampai saat ini masih diabaikan, ini juga muncul bahwa variasi pada adaptasi terhadap anemia dan lingkungan juga berperan penting dalam modifikasi fenotip pada talasemia β . Sebagai contoh, pasien dengan talasemia β /Hb E mempunyai kadar Hb F

relatif rendah dan selanjutnya kurva disosiasi oksigen mereka menjadi lebih besar bergeser ke arah kanan daripada pasien dengan bentuk talasemia β intermedia dengan kadar Hb F lebih tinggi secara bermakna. Penelitian sangat terbaru juga mendukung bahwa respon eritropoeitin terhadap anemia berat untuk memperoleh kadar hemoglobin dipercaya bervariasi menurut usia, pasien selama tahun pertama kehidupannya mempunyai respon lebih tinggi yang bermakna terhadap kadar hemoglobin yang sama daripada pasien yang lebih tua. Penelitian ini mungkin mempunyai beberapa cara untuk menjelaskan variasi di dalam fenotip saat usia berbeda yang telah ditunjukkan pada pasien dengan talasemia β /Hb E. Akhirnya, ini jelas bahwa penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memisahkan efek pada fenotip dari modifier genetik dan faktor lingkungan.

Jadi variabilitas fenotip talasemia β memcerminkan beberapa lapis dari interaksi kompleks yang melibatkan *modifier* genetik bersama-sama dengan variasi dalam adaptasi dan hampir pasti adalah lingkungan.

C. Talasemia Alfa (α)

Patologi molekuler talasemia- α lebih kompleks dibanding dengan talasemia- β , karena secara sederhana di sana terdapat 2 gena globin- α per haploid genom, jadi, genotip globin α normal dapat ditulis $\alpha\alpha/\alpha\alpha$. Seperti halnya pada talasemia- β , ada 2 varietas utama dari talasemia α yaitu talasemia- α^+ dan $-\alpha^0$. Pada talasemia- α^+ , salah satu dari gena globin *linked- α* hilang, bisa karena delesi (-) atau mutasi (T). Genotip heterozigot dapat ditulis $-\alpha/\alpha\alpha$ atau $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$. Pada talasemia- α^0 , kedua gena globin hilang karena delesi, genotip heterozigot ditulis $--/\alpha\alpha$. Pada populasi dimana delesi khusus, terjadi khususnya pada populasi Asia Tenggara (SEA) atau di Mediterania (MED), ditambahkan penulisannya menjadi $--^{SEA}/\alpha\alpha$ atau $--^{MED}/\alpha\alpha$. Untuk selanjutnya, bila dikatakan “gena talasemia α ” akan merujuk pada haplotip bahwa hal itu, pernyataan dan fungsi dari kedua gena globin α linked.

1. Talasemia- α^0

Ada 3 patologi molekuler yang utama, semua meliputi delesi, ditemukan untuk mendasari fenotip talasemia- α^0 . Mayoritas kasus akibat dari delesi yang mengangkat kedua gena globin α dan klaster globin α panjangnya bervariasi. Namun demikian, kadang-kadang klaster gena globin- α intak, tetapi diinaktifkan oleh delesi yang melibatkan regio regulatori utama HS40, 40kb *upstream* dari gena globin- α , atau gena globin- α mungkin hilang sebagai bagian dari terpotongnya ujung lengan pendek kromosom 16.

Telah ditemukan bahwa 5' *breakpoint* dari jumlah delesi klaster gena globin α berlokasi kira-kira sama jaraknya dan sama urutannya sepanjang kromosom seperti itu juga untuk 3' *breakpoint*, hal ini mirip dengan yang ditemukan pada delesi klaster gena globin- β . Delesi ini akibat dari kejadian rekombinasi yang tidak sah (*illegitimate*) sehingga mengarah delesi dari keseluruhan loop kromatin saat mereka melewati titik tempel nuklear selama replikasi kromosomal. Delesi panjang yang lain telah diketahui berciri yaitu potongan baru dari 2 *breakpoint* jembatan DNA pada klaster gena globin- α . Sekuens yang menyisip dimulai *upstream* dari klaster gena globin- α , dimana normalnya ditemukan di dalam orientasi *inverted* dengan menghormati terhadap yang ditemukan di antara *breakpoint* delesi. Jadi, ini muncul untuk digabungkan ke dalam jembatan dalam suatu cara yang mencerminkan sangat dekat jarak terhadap regio *breakpoint* delesi selama replikasi. Delesi lainnya, tampak terkait dengan famili Alu-repeats, sekuens ulangan sederhana yang secara luas tersebar sepanjang genom, satu delesi muncul akibat dari rekombinasi homolog sederhana di antara 2 ulangan dari jenis ini, biasanya terpisah 62 kb.

Sejumlah bentuk talasemia- α^0 akibat dari pemotongan terminal dari lengan pendek kromosom 16 di tapak kira-kira 50kb distal terhadap gena globin- α . Sekuens konsensus telomerik TTAGGG, ditambahkan secara langsung pada tapak dari *breakpoint*. Sejak mutasi ini stabil diturunkan, maka muncul bahwa DNA telomerik sendiri cukup untuk menstabilkan akhiran dari kromosom yang terpotong.

Terbaru, 2 mekanisme molekuler yang lain diidentifikasi sebagai penyebab talasemia- α^0 , meskipun jarang namun mungkin mempunyai implikasi yang penting terhadap pemahaman patologi molekuler dari penyakit genetik lainnya. Pada satu kasus, delesi pada klaster gena globin- α diakibatkan gena terekspresi secara luas (LUC7L) menjadi sejajar terhadap gena globin α yang normal secara struktural. Meskipun yang terakhir itu menyimpan semua elemen regulatori yang penting, ekspresinya *silence*. Pada kasus lain dari talasemia- α^0 , yang mana tidak ada defek molekuler yang terdeteksi di dalam klaster gena globin α , tetapi ada kelebihan fungsi regulatori polimorfisme ditemukan pada regio di antara gena globin- α dan elemen regulatori *upstream*nya. Perubahan ini menciptakan suatu elemen *like-promoter* baru yang mengganggu aktivasi normal dari semua *downstream* gena globin *like- α* .

Singkat cerita, analisis detail dari patologi molekuler talasemia- α^0 telah tersedia bukti yang terukur tidak hanya tentang seberapa besar delesi dari klaster gena disebabkan, tetapi juga mengenai beberapa mekanisme kompleks yang mungkin menjadi dasar kasus dimana klaster gena α masih intak, tetapi fungsi mereka tertekan secara lengkap.

2. Talasemia- α^+

Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, talasemia- α^+ akibat dari inaktivasi salah satu dari gena globin- α yang mengalami duplikasi baik oleh delesi maupun mutasi titik.

Talasemia α^+ yang berhubungan dengan delesi gena. Ada 2 bentuk umum dari talasemia- α^+ terkait dengan hilangnya satu atau lebih dari gena globin- α yang mengalami duplikasi, $-\alpha^{3.7}$ dan $-\alpha^{4.2}$, dimana 3.7 dan 4.2 menunjukkan ukuran delesi. Jalur delesi ini telah dihasilkan berdasar struktur dari komplek gena globin.

Masing-masing gena α berada di dalam perbatasan homolog, kira-kira panjangnya 4kb, kemungkinan dihasilkan oleh kejadian duplikasi masa lalu. Regio homolog, yang dibagi oleh sisipan kecil, didesain X, Y dan Z. Bagian boks Z duplikasi sebesar 3.7kb dan

bagian boks X sebesar 4.2kb. Sebagai hasil *crossover* tidak segaris (*misalignment*) dan timbal balik (*reciprocal*) di antara segmen-segmen tersebut pada saat meiosis, sebuah kromosom dihasilkan dengan masing-masing menjadi sebuah gena globin- α *single* ($-\alpha$) atau *triplicated* ($-aaa$). Jika *crossover* terjadi di antara homolog boks Z maka 3.7kb DNA akan hilang, kejadian ini disebut sebagai delesi ke arah kanan (*rightward deletion*), $-\alpha^{3.7}$. Demikian juga yang terjadi pada boks X maka hilang 4.2kb, disebut delesi ke arah kiri (*leftward deletion*), $-\alpha^{4.2}$. Mirip dengan itu untuk yang *triplicated*, susunan gena α disebut $aaa^{anti3.7}$ dan $aaa^{anti4.2}$. Variasi perbedaan titik *crossover* di dalam box Z menimbulkan perbedaan panjang delesi, tetapi masih meliputi 3.7kb.

Jenis **talasemia- α^+ non-delesi**. Gangguan ini akibat dari mutasi *single* atau *oligonucleotide* dari gena globin- α tertentu. Sebagian besar dari mereka melibatkan gena $\alpha 2$, namun sejak *output* dari lokus ini adalah 2 sampai 3 kali lebih besar dari gena $\alpha 1$. Hal ini mungkin secara sederhana mencerminkan bias penetapan yang berhubungan dengan efek fenotip yang lebih baik dan mungkin keuntungan selektif yang lebih baik. Secara keseluruhan, mutasi ini mengganggu fungsi gena globin- α , yang mirip dengan pengaruhnya pada gena globin- β . Mereka memengaruhi stabilitas transkripsi, translasi maupun pasca translasi dari produk gena. Ada famili mutasi yang melibatkan kodon terminasi gena globin $\alpha 2$, yaitu TAA. Perubahan kodon ini menyebabkan insersi asam amino dari rantai *terminating*. Ini diikuti dengan “*read-through*” dari mRNA globin- α , yang tidak ditranslasikan secara normal sampai mencapai kodon fase terminasi. Akibatnya terjadi elongasi rantai dengan menambahkan 31 residu di akhir terminal-C. Ada 5 hemoglobin varian dari jenis ini yang bisa diidentifikasi, di antaranya yang paling biasa yaitu Hb *Constant Spring* (di Asia Tenggara). Hal ini belum jelas sama sekali, mengapa *read-through* dari mRNA yang tidak ditranslasi secara normal, malah mengarah pada penurunan *output* dari gena $\alpha 2$, meskipun di sana sangat dipercaya terbukti bahwa ada beberapa jalur dalam destabilisasi mRNA.

3. Talasemia- α /Sindrom Retardasi Mental

Ada suatu famili ringan dari bentuk talasemia- α yang sungguh berbeda dari yang telah dijelaskan di muka, dan ini terkait dengan berbagai tingkat retardasi mental. Penelitian saat ini menunjukkan ada 2 varietas yang berbeda dari kondisi ini, yaitu satu encode di kromosom 16 (ATR-16) dan lainnya encode di kromosom X (ATR-X).

Sindrom ATR-16 mempunyai ciri *handicap* mental relatif ringan dengan konstelasi bervariasi pada *dismorfisme* muka dan tulang. Individu ini mempunyai delesi yang panjang melibatkan klaster gena globin- α , tetapi mengambil paling tidak 1-2Mb. Keadaan ini dapat terjadi dalam beberapa jalur, meliputi translokasi tidak seimbang melibatkan kromosom 16, pemotongan ujung kromosom 16, dan hilangnya klaster gena globin α dan bagian regio *flanking* dengan cara mekanisme lainnya.

Sindrom ATR-X akibat dari mutasi dalam gena pada kromosom X, Xq13.1-q21.1. Produk dari gena ini adalah salah satu dari famili protein yang terlibat dalam regulasi transkripsional yang dimediasi-kromatin. Protein ini berfungsi untuk menegakan dan atau menjaga metilasi genom. ATR-X juga berperan penting dalam awal perkembangan janin, khususnya sistem urogenital dan otak.

4. Talasemia- α dan Sindrom Mielodisplastik

Keadaan ini terjadi kebanyakan pada laki-laki dengan usia yang sudah lanjut. Pasien ini biasanya mempunyai mutasi yang melibatkan ATR-X. Hasil pemeriksaan hematologi biasanya ditemukan satu atau yang lain bentuk dari sindrom mielodisplastik. Hubungan antara mutasi ini dengan mielodisplastik masih harus ditentukan.

D. Bentuk Talasemia yang Lebih Jarang dan Gangguan yang Berkaitan

Ada beberapa keadaan lainnya yang melibatkan klaster gena globin β , meskipun tidak seperti talasemia β , namun memberikan informasi yang penting mengenai mekanisme patologi molekuler.

1. Talasemia- $\delta\beta$

Seperti talasemia- β , talasemia- $\delta\beta$ merupakan akibat dari sintesis rantai $-\delta$ dan $-\beta$ yang tidak efektif, dibagi 2 bentuk yaitu $-\delta\beta^+$ dan $-\delta\beta^0$.

Talasemia- $\delta\beta^+$ akibat dari ketidakseimbangan *crossover* antara lokus gena globin- δ dan $-\beta$ saat meiosis dengan produksi gena fusi $\delta\beta$. Akibat rantai fusi $\delta\beta$ menghasilkan kombinasi rantai α sehingga membentuk famili varian hemoglobin yang disebut Hemoglobin Lepore, diambil dari nama pasien yang pertama ditemukan dengan penyakit ini. Pasien mempunyai fenotip bentuk talasemia- $\delta\beta$ yang berat moderat.

Talasemia- $\delta\beta^0$ hampir semua akibat dari delesi panjang yang melibatkan kompleks gena globin- β . Kadang-kadang melibatkan rantai globin- $^A\gamma$ dan selanjutnya yang aktif hanya lokus $^G\gamma$. Pada kasus lain, lokus $^A\gamma$ dan $^G\gamma$ masih intak dan delesi sederhana mengmabil gena globin δ dan β , pada kasus ini kedua gena globin- $^A\gamma$ dan $^G\gamma$ masih fungsional. Untuk beberapa alasan, delesi panjang ini memungkinkan sintesis persisten dari gena globin γ dengan kadar yang relatif tinggi pada saat dewasa, yang membantu mengkompensasi terhadap ketidakadanya produksi rantai globin- δ dan $-\beta$. Selanjutnya dikelompokkan menurut jenis sesuai hemoglobin fetal dan mempunyai 2 jenis varietas yaitu talasemia- $^G\gamma(^A\gamma\delta\beta)^0$ dan $^G\gamma^A\gamma(\delta\beta)^0$, senada dengan bentuk lain dari talasemia, mereka digambarkan dengan baik oleh apa yang tidak dihasilkan yaitu talasemia- $(^A\gamma\delta\beta)^0$ dan $-(\delta\beta)^0$ secara berurutan. Homozigot hanya menghasilkan hemoglobin fetal, sedangkan heterozogot mempunyai gambaran darah *thalasemik* bersama-sama dengan kira-kira 5-15% Hb F.

2. ***Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin*** (HPFH)

Secara genetik, penentuan sintesis hemoglobin fetal persisten pada saat dewasa adalah tidak mempunyai implikasi secara klinis kecuali bahwa faktor yang menentukan genetiknya dapat berinteraksi dengan talasemia- β atau varian hemoglobin struktural, menyebabkan kadar tinggi dari produksi Hb F sering mengalami penurunan pada kondisi ini. Bentuk lain dari HPFH akibat dari setiap delesi panjang yang melibatkan klaster gena globin $\delta\beta$, mirip dengan itu menyebabkan talasemia- $(\delta\beta)^0$, atau dari mutasi titik yang melibatkan promoter dari gena globin- $^G\gamma$ dan $^A\gamma$. Pada kasus dimana tidak ada sintesis rantai globin- β maka dikelompokkan sebagai HPFH $(\delta\beta)^0$. Pada kasus dimana ada mutasi promoter yang melibatkan gena globin- γ , ada peningkatan produksi rantai globin- γ pada orang dewasa terkait dengan beberapa sintesis rantai- β dan $-\delta$ pada cis terhadap mutasi HPFH. Jadi, berdasar pada apakah mutasi titik melibatkan promoter dari gena globin- $^G\gamma$ atau $^A\gamma$, keadaan ini disebut berturut-turut $^G\gamma\beta^+$ HPFH dan $^A\gamma\beta^+$ HPFH.

E. **Hubungan Genotip-Fenotip pada Talasemia α**

Patofisiologi talasemia- α berbeda dari talasemia- β sebagian besar karena sifat-sifat dari kelebihan rantai globin yang dihasilkan sebagai akibat dari defektif sintesis rantai- α . Kelebihan rantai α yang dihasilkan pada talasemia- β adalah tidak stabil dan menggumpal, namun ini tidak terjadi pada kasus talasemia- α , yang mana kelebihan rantai γ atau rantai β mampu untuk membentuk homotetramer γ_4 yang larut (Hb Bart's) dan β_4 (Hb H). Varian ini, khususnya Hb H, meskipun tidak stabil dan menggumpal pada populasi sel darah merah yang tua, namun mereka masih mempunyai kondisi mudah larut yang cukup panjang untuk sel darah merah menjadi matur dan berkembang relatif normal. Selanjutnya di sana terjadi eritropoeisis inefektif jauh berkurang pada talasemia α dan penyebab utama anemia adalah hemolisis yang terkait dengan presipitasi Hb H pada sel darah merah yang lebih tua. Selain itu, tentu saja, ada reduksi pada sintesis hemoglobin normal yang menyebabkan eritrosit mikrositik hipokromik.

Faktor penting lainnya pada patofisiologi talasemia- α adalah kenyataan bahwa Hb Bart's dan Hb H adalah karier oksigen yang percuma, mempunyai kurva disosiasi mirip dengan mioglobin. Selanjutnya kadar hemoglobin sirkulasi mungkin memberi kesan pengaruh palsu dari kapasitas darah yang mengantarkan oksigen dan pasien mungkin menjadi mempunyai gejala pada saat kadar hemoglobin relatif tinggi.

Fenotip klinis yang berbeda dari talasemia- α adalah efek dari dosis gena. Heterozigot dinyatakan untuk talasemia α^+ dikaitkan dengan perubahan hematologi minimal. Talasemia- α^0 (hilang 2 gena globin α) mempunyai ciri mikrositosis hipokromia moderat, mirip apa yang terjadi pada talasemia- β trait. Bukan menjadi masalah apakah gena α hilang pada kromosom yang sama atau pasangan lawannya dari kromosom homolog. Selanjutnya homozigot dinyatakan untuk talasemia- α^+ , $-\alpha/-\alpha$, mempunyai fenotip yang mirip terhadap heterozigot yang dinyatakan untuk talasemia α^0 ($--/\alpha\alpha$).

Hilangnya 3 gena globin- α , biasanya akibat dari gabungan heterozigot yang dinyatakan untuk talasemia- α^0 dan $-\alpha^+$, terkait dengan anemia berat moderat dengan produksi kadar Hb H bervariasi. Keadaan ini, penyakit hemoglobin H, mempunyai ciri anemia bervariasi dan splenomegali dengan kelangsungan hidup sel darah merah lebih pendek secara jelas.

Akhirnya, homozigot yang dinyatakan untuk talasemia- α^0 , ($--/--$) mempunyai ciri meninggal saat dalam kandungan atau sesaat setelah lahir, dengan gambaran klinis hydrops fetalis. Bayi ini tidak menghasilkan rantai α dan hemoglobin mereka sebagian besar mengandung Hb Bart's dengan variabel persisten hemoglobin embrionik. Ini mencerminkan adanya hipoksia berat intra uteri, meskipun bayi ini mempunyai kadar hemoglobin kira-kira 8-9g/dl, sebagian besar darinya tidak mampu melepas oksigennya. Ini mencerminkan perubahan hidropik, suatu tumpahan masif dari sel darah merah berinti, dan hepatosplenomegali dengan hematopoeisis persisten pada hepar dan limpa.

F. Jumlah dan Lokasi Kromosomal Gena Globina Manusia

Hemoglobin adalah heterotetramer yang terdiri 2 sub unit polipeptid yang terkait dengan sub famili gena globin- α (α -like globin) dan 2 sub unit polipeptid yang terkait sub famili gena globin- β (β -like globin). Polipeptid globin mengikat hem, yang memungkinkan hemoglobin di dalam eritrosit mengikat oksigen secara reversibel dan mengangkutnya dari paru-paru untuk pernapasan jaringan. Pada manusia, seperti pada semua spesies vertebrata yang diteliti, perbedaan rantai globin like- α dan like- β disintesis pada tahap perkembangan progresif untuk menghasilkan hemoglobin karakteristik sel eritroid primitif (embrionik) dan definitif (fetal dan adult).

Jumlah dan komposisi sub unit dari hemoglobin manusia yang berbeda normal mendukung bahwa harus ada paling tidak satu gena globin pada masing-masing rantai globin yang berbeda : α , β , γ , δ , ϵ , dan ζ . Bukti dari penelitian varian hemoglobin dan heterogenitas biokimiawi dari rantai pada hemoglobin fetal (Hb F) menunjukkan bahwa gena globin- α dan $-\gamma$ adalah duplikat. Orang yang teridentifikasi memiliki sel darah merah yang mengandung lebih dari dua rantai globin- α yang berbeda secara struktural. Hal itu dapat dijelaskan dengan baik sebagai berikut, bahwa duplikasi lokus gena globin- α dan karakterisasi perbedaan struktural rantai globin- $^G\gamma$ dan $^{-A}\gamma$ dari Hb F membuat suatu kebutuhan terhadap duplikasi dari lokus gena globin- γ .

Penelitian mengenai pola pewarisan hemoglobin varian dari orang yang membawa baik varian 3 rantai α dan rantai β , mengungkap bahwa gena globin- α dan globin- β berada pada kromosom yang berbeda (atau sangat jauh terpisah bila mereka berada pada kromosom yang sama). Varian rantai globin- α dan globin- β selalu terlihat terpisah secara independen pada keturunan dari orang tua yang terdampak secara ganda.

Akhirnya setelah beberapa penelitian yang berjenjang, dipastikan bahwa lokasi regio khusus dari gena globin- β adalah klaster pada lengan pendek kromosom 11 (11p15.5), dan gena globin- α adalah klaster pada lengan pendek kromosom 16 (16p13.3). Urutan berikutnya DNA dari keseluruhan kromosom manusia dan penjajaran dengan peta peta dari pita kromosom menempatkan klaster gena globin- β pada 11p15.4. Klaster gena globin- α hanya kira-kira 150 kbp dari telomere lengan pendek kromosom 16.

BAB 7

MEKANISME REGULASI PRODUKSI HEMOGLOBIN FETUS (Hb F) SEBAGAI ALTERNATIF TERAPI PENYAKIT TALASEMIA-BETA TERKINI

A. Pendahuluan

Talasemia- β adalah salah satu penyakit yang diturunkan secara genetik dengan angka prevalensi yang cukup tinggi. Penyakit genetik hematologi hereditas yang cukup tinggi angka prevalensi pembawa sifat di Indonesia, dan khusus di Banyumas mencapai angka 8,2%. Ada beberapa tata laksana terkini pada penyakit ini yaitu dengan mengurangi akumulasi kelebihan globin- α bebas. Langkah ini dilakukan dengan cara mengatur produksi globin- γ (mirip dengan globin- β) sedemikian rupa hingga tercapai kombinasi dengan globin- α membentuk Hb F ($\alpha_2\gamma_2$).

Produksi Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) ditingkatkan dengan cara menginduksi kadar globin- γ hingga mencapai kadar yang seimbang dengan kadar globin- α bebas. Globin- γ secara fisiologis hanya dihasilkan ketika masih janin sampai beberapa bulan paska kelahiran, selanjutnya diganti dengan globin- β melalui mekanisme pengalihan hemoglobin (*Hb Switching*). Induksi kadar globin- γ , yang pertama melalui jalur GATA-1 (diketahui sebagai faktor transkripsi di 5'UTR globin- γ), bila jalur ini diinduksi maka terjadi peningkatan ekspresi gena globin- γ . Namun jalur ini dapat direpresi dengan peningkatan kadar STAT3 yang terikat pada 5'UTR globin- γ sehingga terjadi penurunan ekspresi gena globin- γ . Jalur yang

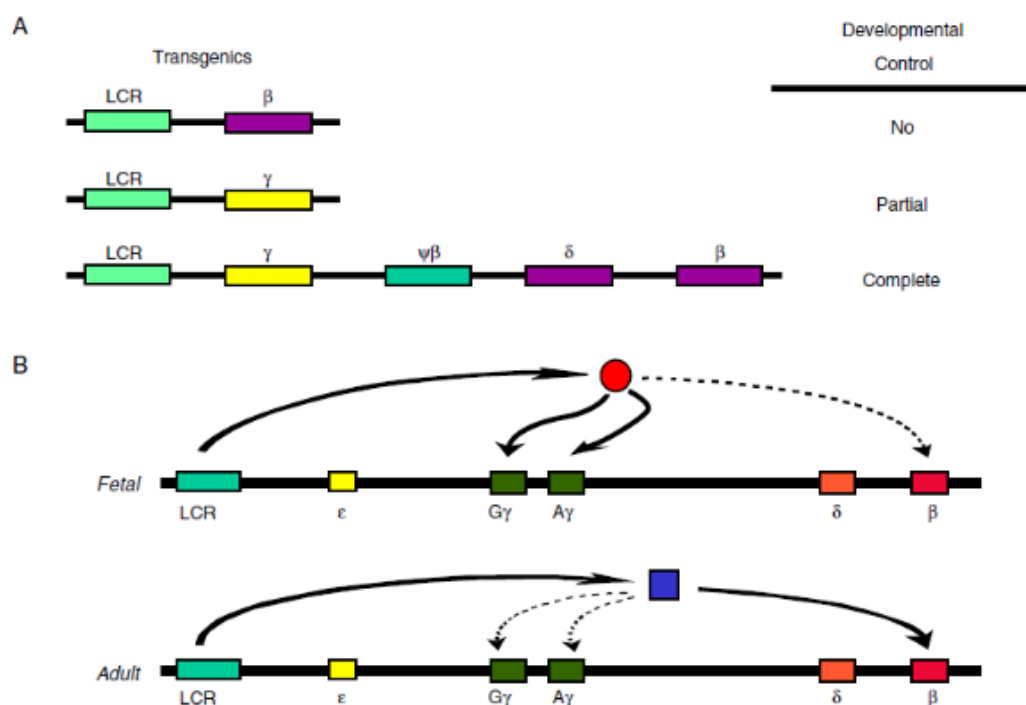
ke-2 adalah melalui jalur BCL11A yang akan mengurangi mRNA globin- γ , sehingga terjadi penurunan ekspresi gena globin- γ , berakibat produksi Hb F berkurang. Namun demikian ekspresi BCL11A dapat dihambat oleh miRNA-486-3p. Jalur ke-3 induksi ekspresi gena globin- γ adalah melalui jalur sinyal p38 MAPK/CREB yang akan memperkuat transkripsi globin- γ .

Senyawa aktif dari bahan herbal yaitu kurkumin dan 6-shogaol dapat memodulasi semua jalur induksi produksi Hb F di atas. Kurkumin dapat berperan dalam represi STAT3, meningkatkan miRNA dan juga menghambat P38 MAPK (tidak tergantung besarnya dosis). Efek 6-shogaol dapat menghambat STAT3 dan induksi ekspresi gena globin- γ dengan cara melalui jalur p38MAPK/CREB1. Kedua senyawa tersebut dapat digunakan dalam membantu memengaruhi seluruh faktor tersebut di atas sedemikian rupa sehingga dapat diduga mampu menginduksi produksi Hb F. Hal ini dapat digunakan sebagai alternatif penatalaksanaan penyakit talasemia yaitu mencegah penurunan Hb. Berangkat dari hal tersebut, maka alternatif terapi ini dapat mempunyai dampak yang besar dalam mengurangi komplikasi akibat terapi transfusi darah yang kontinyu sekaligus dapat meningkatkan kualitas hidup penderita talasemia maupun beban biaya yang ditanggung keluarga penderita dan pemerintah.

B. Hemoglobin Fetus (Hb F)

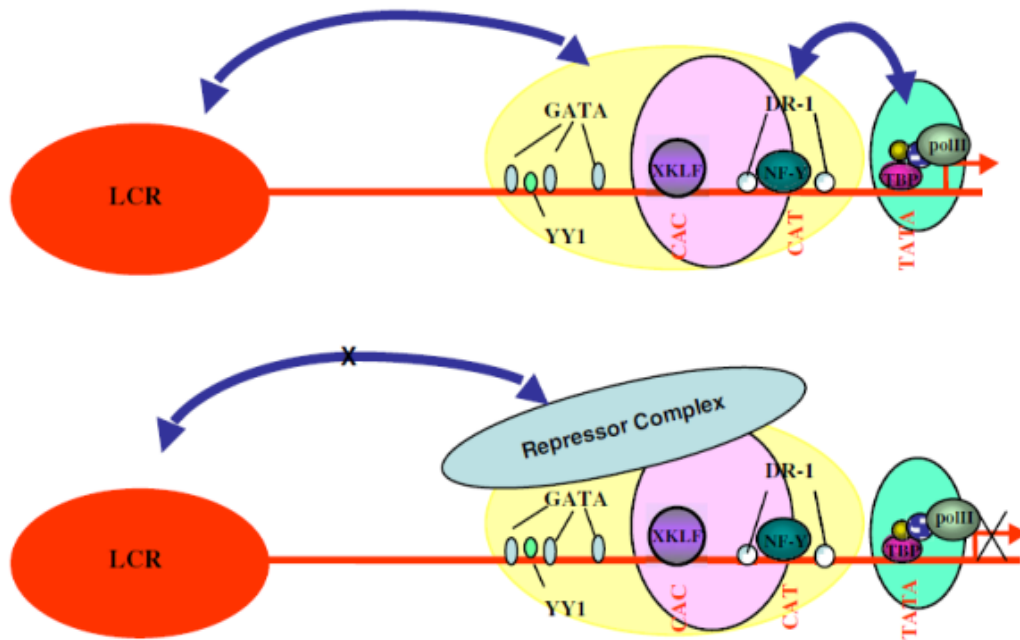
Saat di dalam kandungan, produksi rantai zetta (ζ) yang mirip dengan rantai globin- α embrionik berhenti lalu diganti dengan globin- α . Dalam waktu yang bersamaan, sintesis rantai epsilon (ϵ) – mirip globin- β embrionik juga berhenti lalu dan diganti dengan rantai globin- γ . Kedua rantai globin- α dan globin- γ ini bergabung maka terbentuk hemoglobin fetal ($\alpha_2\gamma_2$). Hemoglobin fetal ini yang bertanggung jawab atas transpor oksigen utama yang terjadi pada fetus manusia dalam waktu 11 bulan di dalam kandungan sampai 6 bulan setelah kelahiran. Secara fisiologis, Hb F mempunyai afinitas terhadap oksigen lebih tinggi dari kemampuan hemoglobin dewasa sehingga janin lebih kuat mengikat oksigen dari aliran darah ibunya. Ketika lahir, secara fisiologis produksi Hb F

dikurangi dan digantikan penuh oleh hemoglobin dewasa saat 6 bulan paska kelahiran. Namun pada kasus talasemia, produksi Hb F tetap dipertahankan sampai usia 3-5 tahun. Ketika dewasa, Hb F dapat diaktifkan kembali secara farmakologi seperti pada penatalaksanaan penyakit sel sabit. Pendekatan terapeutik induksi Hb F ini dimungkinkan karena pengembangan genetika manusia dapat mengungkap target molekuler melalui pendekatan terhadap regulator pengalihan/*Switching* Hb Fetal-Hb Adult) dan *Silencing* Hb F.



Gambar 7.1. Mekanisme kompetitif *switching* hemoglobin manusia saat fetal menjadi dewasa. (A). Tidak muncul kontrol perkembangan bila hanya salah satu gena globin- γ atau - β yang terhubung dengan LCR. Berbeda ketika kedua gena lengkap berada pada kromosom normalnya terhubung dengan LCR, gena globin- γ hanya diekspresikan saat tahap fetal dan gena globin- β saat tahap dewasa. (B). Ilustrasi untuk memperlihatkan interpretasi terbaik terjadinya kompetisi gena globin fetal dan dewasa. Bila ada ligkungan transkripsional yang baik untuk interaksi gena globin- γ dengan LCR pada tahap fetal, mengakibatkan *silencing* ekspresi gena globin- β , begitu juga sebaliknya (Stamatoyannopoulos, 2005).

Pada penderita talasemia beta, kadar Hb F yang lebih tinggi mempunyai dampak besar dalam mengurangi tingkat keparahan penyakit ini dan telah diketahui secara kuat dalam 20 tahun terakhir. Jadi, penting dan sangat diperlukan untuk mengaktifkan kembali atau reaktivasi globin- γ pada sel eritroid dewasa yang menguntungkan bagi individu penderita hemoglobinopathi- β , termasuk talasemia.



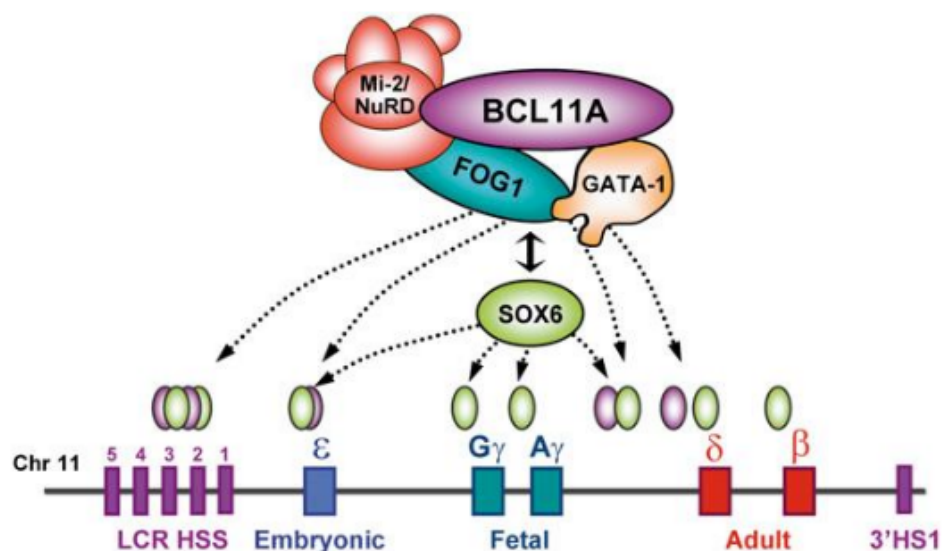
Gambar 7.2. Mekanisme *silencing autonom* dari *switching* hemoglobin. Semua urutan yang diperlukan untuk silencing harus berada di dalam proksimal sampai elemen regulatori gena. Silencing terjadi secara otonom, tidak ada kompetisi diantara gena globin yang terlibat. Ilustrasi ini untuk memperlihatkan *silencing* otonom pada gena globin- ϵ . Faktor transkripsional terikat pada urutan silencing yang berlokasi pada proksimal sampai distal promoter gena globin- ϵ dan membentuk suatu komplek represor yang merusak interkasi antara gena dengan LCR, berakibat penghentian ekspresi gena globin- ϵ (Stamatoyannopoulos, 2005).

C. Pengaturan Molekular Ekspresi Gena Globin- γ

Regulasi reaktivasi ekspresi globin- γ menjadi penting untuk dibahas dalam rangka terapi alternatif pasien talasemia beta, Prinsip dasar terapi melalui pengaturan ekspresi gen globin- γ adalah melakukan induksi globin- γ sehingga akan mengikat globin- α yang bebas membentuk Hb F. Kadar Hb F yang tinggi berefek terhadap perbaikan manifestasi klinis yang berat seperti yang terjadi pada penderita anemia sel sabit dan talasemia. Oleh karena itu, penting dibahas faktor-faktor transkripsi dan protein regulatori baik yang secara langsung terikat dalam promotor maupun regio regulatori lainnya. Regulator ekspresi gena globin- γ dibagi dalam 2 kelompok yaitu regulator negatif dan regulator positif.

1. Regulator Negatif Ekspresi Gena Globin- γ

a. Gena BCL11A



Gambar 7.3. Peran BCL11A dalam proses *silencing* ekspresi globin- γ melibatkan interaksi yang panjang dengan klaster globin- β dan interaksi lokal dengan protein SOX6 terkait-kromatin (Xu *et al.*, 2010).

Gena BCL11A (juga dikenal sebagai Evi9, Ctif1 suatu *encoding zinc finger transcription factor*) yang berfungsi sebagai regulator ekspresi Hb F ini posisinya ada di kromosom 2. Ekspresi bentuk *full-length* BCL11A yang melimpah berkembang pada sel eritroid dewasa. Pada prekursor eritroid manusia dewasa, *Down-Regulation* ekspresi BCL11A mengarah pada induksi Hb F secara sehat. Proses *silencing* ekspresi globin- γ melibatkan interaksi lokal dengan protein SOX6 terkait-kromatin dan interaksi yang panjang dengan kluster globin- β .

b. MicroRNA (miRNA/miR)

MicroRNA diketahui mempunyai fungsi dalam mengatur ekspresi multi gena pascatranskripsional. MicroRNA merupakan RNA non koding pendek rantai tunggal endogenus dengan panjang 19-25 nukleotid. miRNA matur mengatur ekspresi gena dengan cara terikat pada 3'UTR RNA target. Peeristiwa ini menyebabkan degradasi mRNA atau menghambat translasi menjadi protein fungsional seperti diferensiasi, pertumbuhan, proliferasi dan apoptosis sel.

Ada beberapa microRNA (miR) mempunyai peran penting dalam proses hematopoiesis, yaitu mempunyai implikasi terhadap proliferasi, diferensiasi spesifikasi sel, lalu etiologi dan progresi kanker. Bila terjadi perubahan yang spesifik pada ekspresi miR, maka akan menghasilkan fenotip defek hematopoetik yang berat. Beberapa miR teridentifikasi diduga kritikal terhadap perkembangan dan maturasi eritroid. Eritropoesi dapat ditingkatkan oleh miR-451 dan miR-144, namun dikontrol negatif oleh miR-150, miR-221, miR-223, dan miR-224.

Ada beberapa miR yang telah diketahui berperan penting dalam ekspresi gena globin, khususnya reaktivasi ekspresi gena globin- γ yang terkait dalam induksi sintesis Hb F. Berikut ini pernah dilaporkan terkait dalam induksi globin- γ yaitu miR-210, miR-221 dan miR-222. Peningkatan ekspresi miR-15a dan miR-16-1 pada sel eritroid manusia juga pernah dilaporkan dapat meningkatkan ekspresi gena hemoglobin embrional dan fetal.

Selain itu, miR-96 teridentifikasi sebagai regulator ekspresi Hb F yaitu melalui penghambatan secara langsung mRNA globin- γ pasca transkripsional. Penelitian genetik terkini fokus pada regulator pada *switching* hemoglobin maupun *silencing* ekspresi globin- γ pada orang dewasa, yaitu BCL11A. Peningkatan ekspresi yang berlebihan dari miR-486-3p yang terikat pada 3' UTR BCL11A pada sel eritroid berakibat penurunan kadar protein BCL11A, dan terkait dengan peningkatan ekspresi gena globin- γ .

2. Regulator Positif Ekspresi Gen Globin- γ

a. p38 MAPK

Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) adalah salah satu famili dari Ser/Thr kinase yang mempunyai anggota di antaranya yaitu p38, ERK, dan cjun amino terminal kinase (JNK). Awalnya teridentifikasi sebagai protein kinase yang diaktivasi oleh stress, tapi belakangan diketahui bahwa sinyaling p38 MAPK mengkoordinasikan respon selular selama eritropoeisis, terutama untuk sintesis hemoglobin. p38 MAPK berperan dalam memperkuat transkripsi gena dengan dengan cara memfosforilasi *cAMP response element binding protein 1* (CREB1) pada Ser 133 untuk mediasi aktivasi transkripsional. Sinyaling p38 mengatur transkripsi globin-G γ yaitu melalui CREB1 yang mengikat G γ -Globin cAMP response element (G-CRE) sehingga mengaktivasi ekspresi Hb F.

D. Curcumin dan 6-Shogaol

Curcumin merupakan senyawa polifenol dari tanaman *Curcuma Longa*, selain dapat digunakan sebagai obat-obat tradisional, pewarna makanan alami dan bumbu rempah-rempah, juga berfungsi sebagai anti inflamasi, antikanker, anti oksidan, anti virus; dan sitoprotektif. Selain itu, *curcumin* juga dilaporkan sebagai pengatur jalur sinyaling intra sel yang terkait dengan berbagai penyakit kronis, penghambat sinyaling p38 MAPK sehingga

menurunkan sinyal imun COX-2 dan iNOS pada *chronic experimental colitis*, serta penghambat sinyaling STAT3.

Curcumin memainkan peran ¹⁶ga dalam ekspresi gena melalui interaksi langsung dengan faktor-faktor transkripsi seperti *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*(*NF-⁷κB*), modulasi epigenetik melalui penghambatan terhadap *DNA methyltransferase I* (DNMT1), *histone acetyltransferase* (HAT), kompleks *histone deacetylase* (HDAC). Berbagai target molekular kurkumin di ant⁷anya adalah inflamasi (Il-1,-2,-6,-8, TNF α), aktivitas kinase (MAPK, PKA, JAK), faktor transkripsi (CREB, STAT3, PPARY), aktivitas enzim (COX-2, INOS, MMP), dan lainnya (VEGF, adiponectin, ROS). Kurkumin dilaporkan secara bermakna mengembalikan ekspresi mir-199 dan -200 dengan gena target yang terkait sampai mendekati kadar normal. Kurkumin merupakan inhibitor STAT3 pada domain SH2. Penghambatan domain SH2, tidak hanya mengganggu aktivasi namun juga dimerisasi faktor transkripsi.

Di samping itu, *curcumin* juga bisa digunakan sebagai kemoprevensi berbagai sel kanker, mengatur ekspresi gena yang terlibat dalam jalur sinyaling selular melalui miRNA. Profil ekspresi miRNA dipengaruhi oleh *curcumin* pada sel kanker pankreatik dengan cara *up-regulation* maupun *down-regulation*. *Curcuminoid* juga dilaporkan menginduksi mRNA globin-γ dan peningkatan kadar Hb F pada kultur sel eritroid manusia. Senyawa *6-shogaol* mempunyai efek penghambatan terhadap STAT3 dan memacu ekspresi gena globin-γ melalui jalur p38MAPK/CREB1

Senyawa aktif bahan herbal lainnya yang mempunyai target molekuler terkait regulasi Hemoglobin F adalah *6-shogaol*. *6-shogaol* merupakan bagian dari senyawa aktif gingerol yang ditemukan dalam jumlah sedikit pada akar jahe merah segar, namun ditemukan dalam jumlah besar pada akar jahe merah yang sudah dikeringkan secara termal, dengan *6-shogaol* yang paling banyak. Bila dibandingkan dengan analognya seperti *6-gingerol*, *8-gingerol* dan *10-gingerol*, ternyata *6-shogaol* merupakan penghambat aktivasi STAT3 yang paling poten. Di samping itu, dilaporkan juga bahwa *6-*

shogaol menekan ekspresi produk gena yang diatur oleh STAT3. Juga dilaporkan bahwa *6-shogaol* menyebabkan aktivasi JNK, p38 dan ERK, serta *downregulating* ekspresi p38 MAPK, NF- κ B dan COX-2 (Ha *et al.*, 2012). Oleh karena itu, *6-shogaol* dapat berperan dalam induksi Hemoglobin F.

E. Efek ⁵ *curcumin* dan *6-shogaol* terhadap Kadar Hemoglobin F pada Sel line K562

Curcumin berpengaruh terhadap penurunan ekspresi mRNA gena STAT3 dan kadar p-p38 MAPK secara signifikan, serta peningkatan kadar Hb F. Namun demikian, *curcumin* berpengaruh tidak signifikan terhadap peningkatan ekspresi mRNA gena *Globin- γ* . Senyawa *6-shogaol* berpengaruh secara signifikan terhadap penurunan ekspresi mRNA gena STAT3 dan peningkatan kadar Hb F. Namun demikian, *6-shogaol* berpengaruh tidak signifikan terhadap penurunan kadar p-p38 MAPK, dan peningkatan ekspresi mRNA gena *Globin- γ* . Berdasarkan hal tersebut, dapat diambil kesimpulan bahwa *curcumin* dan *6-shogaol* dapat menginduksi Hb F melalui jalur STAT3, namun kurkumin lebih kuat pengaruhnya dibandingkan *6-shogaol* pada sel line K562 dalam waktu 96 jam.

F. Induksi Hemoglobin F sebagai Alternatif Terapi Talasemia-Beta Terkini

Pasien talasemia beta mengalami kerusakan sel eritrosit karena presipitasi akibat kelebihan rantai globin- α bebas di dalam prekursor eritroid sehingga menimbulkan anemia kronis. Saat ini terapi yang diberikan adalah transfusi sel darah merah secara rutin sepanjang hayat, ditambah obat khelasi besi. Alternatif terapi pada pasien talasemia-beta akibat kelebihan globin- α bebas adalah dengan reaktivasi/induksi ekspresi gena *Globin- γ* dengan obat tertentu maupun bahan herbal, transplantasi sel punca hematopoetik allogenik dan terapi gen. Indonesia sebagai salah satu negara yang sedang berkembang mempunyai banyak keterbatasan dalam terapi

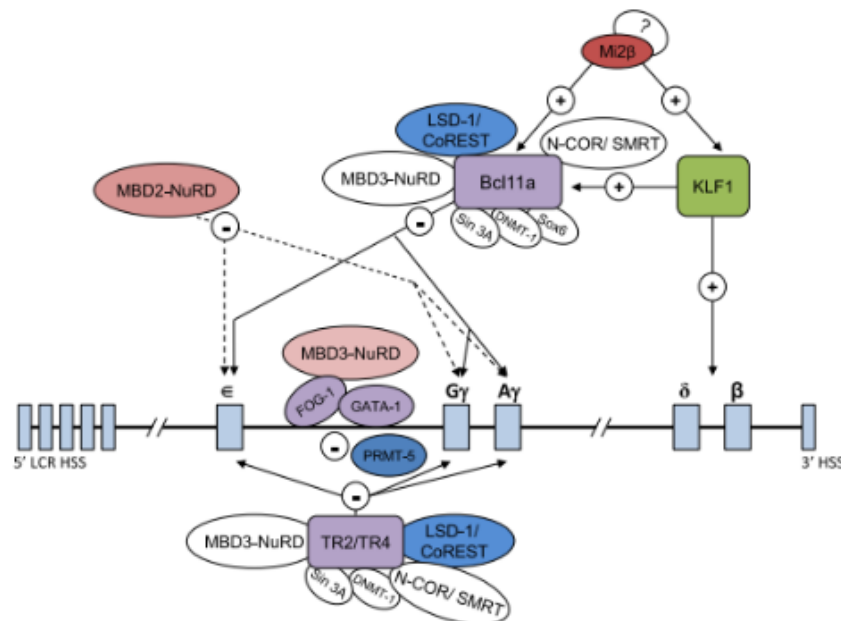
transplantasi maupun terapi gena. Oleh karena, itu pilihan terbaik terapi pasien talasemia beta adalah reaktivasi/induksi Globin- γ . Dengan demikian Globin- α bebas dapat bergabung dengan Globin- γ menggantikan Globin- β yang tidak terbentuk. Berangkat dari hal tersebut, maka induksi Hb F merupakan alternatif terapi yang paling *feasible* melalui agen farmakologi maupun herbal.

Salah satu agen farmakologi yaitu *Hydroxyurea* (HU) dapat menginduksi ekspresi Hemoglobin F. *Hydroxyurea* dapat melalui beberapa jalur molekular utama yaitu modifikasi epigenetik, jalur sinyaling dan proses pasca transkripsional. Terapi kombinasi antara HU dengan *knockdown* HDAC2 dapat meningkatkan ekspresi globin- γ . Selain itu, pada sel CD34+ dilakukan terapi dengan HU dan MS-275 (inhibitor HDAC 1,2 dan 3) dapat terjadi peningkatan relatif ekspresi gena *Globin- γ* . Pada sel K562, HU juga bisa meningkatkan diferensiasi eritroid melalui aktivasi p38 kinase.

Induksi Hemoglobin F kemungkinan juga dapat diatur secara pasca transkripsional, yaitu melalui jalur *the eukaryotic initiation factor 2 α* (eIF2 α) sebagai regulator pasca transkripsional Hb F. *Salubrinal*, sebagai agen aktivator *sinyaling* eIF2 α secara selektif dapat meningkatkan jumlah ribosom yang mentranslasi aktif pada mRNA *Globin- γ* melalui induksi eIF2 α terfosforilasi (p-eIF2 α). Melalui jalur ini, *Salubrinal* bisa meningkatkan translasi mRNA *Globin- γ* hingga kadar Hb F meningkat 4,5 kali lipat dengan tidak ada perubahan kadar mRNA $\gamma/(Y+\beta)$, diferensiasi sel, maupun isi Hb total.

Mekanisme lain dari induksi HbF adalah melalui penghambatan kerja protein DNMT1 dan LSD1. Protein ini memainkan peran penting dalam proses *silencing* gen pembentuk Hb F yang akan digantikan Hb A saat menjelang kelahiran manusia. Oleh karena itu, bila terjadi penghambatan terhadap protein DNMT1 dan LSD1, maka produksi HbF tetap tinggi. Eksplorasi interaksi antara *curcumin* dan *6-shogaol* terhadap protein DNMT1 dan LSD1 dapat dilakukan dengan metode *in silico* penambatan molekul. Metode ini mampu memprediksi ikatan kompleks antara protein

dengan senyawa dengan mempunyai kelebihan pada biaya murah dan waktu singkat dengan hasil cukup baik.

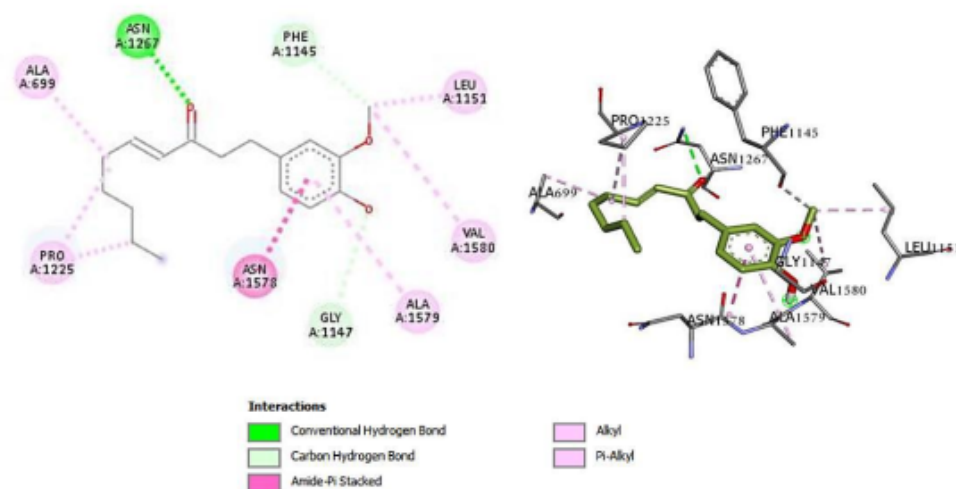


Gambar 7.4. Penghambatan ekspresi globin- γ oleh DNMT1 dan LSD1 (Ginder, 2015)

G. Hasil Penambatan *Curcumin* dan *6-Shogaol* terhadap Protein DNMT1 dan LSD1

Tiap ligan *curcumin* dan *6-shogaol* ditambatkan pada protein DNMT1 dan LSD1. Proses penambatan ini memakai aplikasi *AutoDock Vina*, menghasilkan sejumlah konformasi senyawa beserta energi ikatan yang ada pada setiap konformasi tersebut. Bila terdapat hasil konformasi dengan energi ikatan yang paling rendah, maka ini adalah konformasi terbaik. *Curcumin* mempunyai energi ikatan yang lebih rendah dibandingkan *6-shogaol* dalam hal pengikatan terhadap protein DNMT1 dan LSD1. Energi ikatan terendah dari *curcumin* dan *6-shogaol* terhadap protein DNMT1 berturut-turut -8,0 kkal/mol dan -6,5 kkal/mol. Adapun energi ikatan terendah dari *curcumin* dan *6-shogaol* terhadap protein LSD1 berturut-turut -10,1 kkal/mol dan -8,2 kkal/mol.

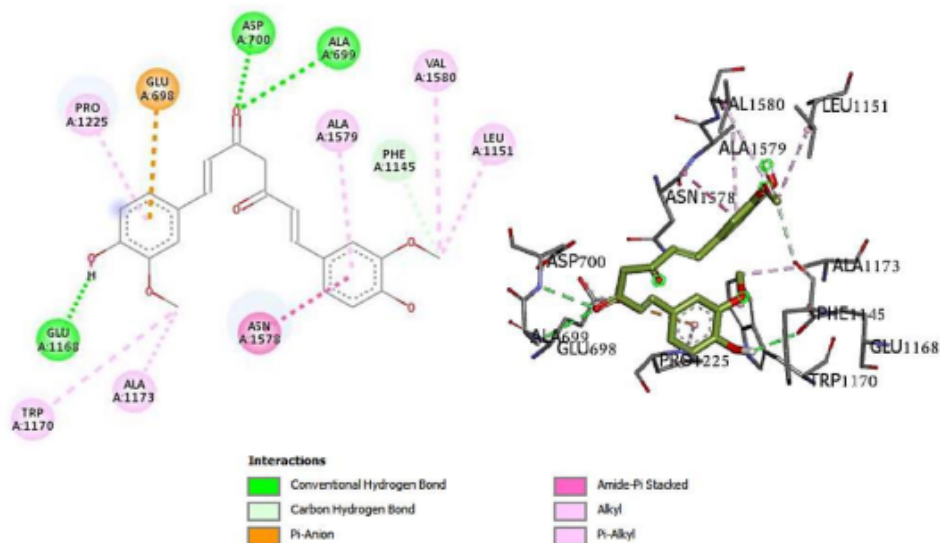
H. Visualisasi *Curcumin* dan *6-Shogaol* terhadap Protein-Protein DNMT1 dan LSD1



Gambar 7.5. Hasil visualisasi penambatan DNMT1 dengan 6-shogaol 2 dimensi dan 3 dimensi (Setyono *et. al*, 2021)

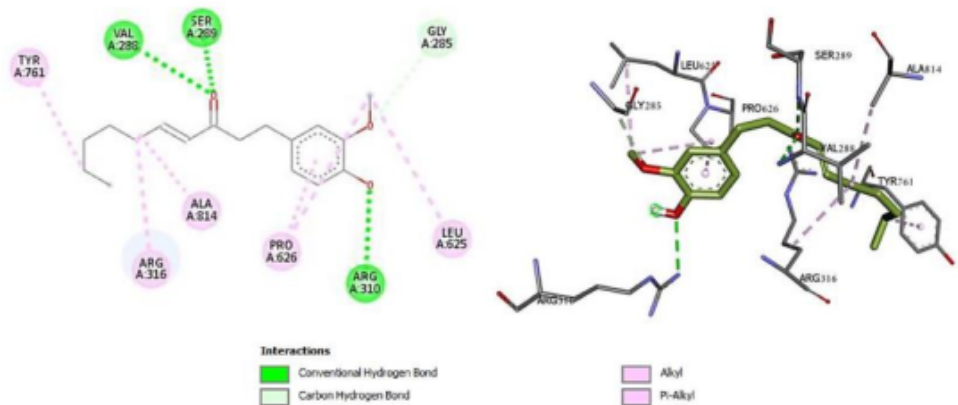
Ada 2 jenis ikatan/interaksi antara senyawa *6-shogaol* dengan protein DNMT1 kode 3SWR adalah ikatan hidrogen pada asam amino Asn1267, Phe1145, Gly1147 dan ikatan hidrofobik pada Asn1578, Ala1579, Val1580, Leu1151, Ala699, Pro1225. Berikut adalah asam amino-asam amino yang berperan penting dalam mengikat ligan inhibitor pada DNMT1 adalah Phe1145, Gly1147, Asn1578, Ala1759, Val1580, dan Pro1225. Asam amino tersebut sama dengan hasil penambatan dengan *6-shogaol*.

Ada 2 jenis ikatan/interaksi antara senyawa *curcumin* dengan protein DNMT1 kode 3SWR adalah ikatan hidrogen pada asam amino Asp700, Glu1168, Ala699, Phe1145 dan ikatan hidrofobik pada Pro1225, Trp1170, Ala1173, Asn1578, Ala1579, Val1580 dan Leu1151. Berikut adalah asam amino-asam amino yang berperan penting dalam mengikat ligan inhibitor pada DNMT1 adalah Glu1168, Phe1145, Pro1225, Trp1170, Asn1578, Ala1579 dan Val1580. Asam amino tersebut sama dengan yang terikat pada hasil penambatan dengan *curcumin*.



Gambar 7.6. Hasil visualisasi penambatan DNMT1 dengan *curcumin* 2 dimensi dan 3 dimensi (Setyono *et. al*, 2021)

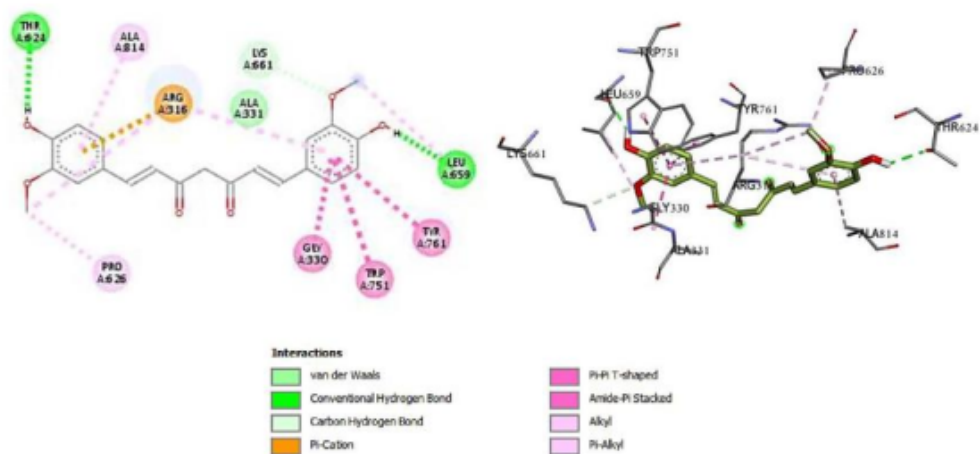
Ikatan yang terjadi antara senyawa *6-shogaol* dengan protein LSD1 kode 6KGP yaitu ikatan hidrogen pada Val288, Ser289, Arg310 dan Gly285. Berikut ini adalah asam amino yang berperan penting dalam peningkatan aktivitas inhibitor terhadap protein LSD1 adalah Val288, Ser289, Gly314, Tyr624 dan Lys661. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa *6-shogaol* mempunyai peran penting dalam aktivitas inhibitor protein LSD1, karena hasil penambatan memperlihatkan adanya ikatan dengan dua asam amino tersebut.



Gambar 7.7. Hasil visualisasi penambatan LSD1 dengan *6-shogaol* 2 dimensi dan 3 dimensi (Setyono *et. al*, 2021)

Ikatan yang terjadi antara senyawa *curcumin* dengan protein LSD1 kode 6KGP yaitu ikatan hidrogen pada Thr624, Leu659, dan Lys661. Berikut ini adalah asam amino yang berperan penting dalam peningkatan aktivitas inhibitor terhadap protein LSD1 yaitu Thr624 dan Lys661. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa *curcumin* mempunyai peran penting dalam aktivitas inhibitor protein LSD1, karena hasil penambatan memperlihatkan adanya ikatan hydrogen dengan dua asam amino tersebut.

Secara keseluruhan, masing-masing hasil penambatan antara senyawa *curcumin* dan *6-shogaol* dengan DNMT1 adalah terdiri atas empat ikatan hidrogen dan tujuh interaksi hidrofobik. Khusus kurkumin dengan DNMT1 mempunyai ikatan elektrostatik pada asam amino Glu698 dan ini tidak dimiliki oleh 6-shogaol. Selain itu, ikatan hidrogen konvensional mendominasi pada *curcumin* dengan tiga ikatan, padahal ikatan jenis ini lebih kuat dibandingkan ikatan hidrogen karbon. Pada senyawa *6-shogaol* yang mendominasi adalah ikatan hidrogen karbon sebanyak tiga ikatan.



Gambar 7.8. Hasil visualisasi penambatan LSD1 dengan *curcumin* 2 dimensi dan 3 dimensi (Setyono *et. al.*, 2021)

Hasil penambatan dengan protein LSD1, *curcumin* mempunyai dua buah ikatan hidrogen konvensional dengan atom H-O yang terlibat, telah diketahui bahwa kedua atom ini mempunyai perbedaan keelektronegatifan yang besar dan dapat diartikan bahwa ikatan ini lebih

kuat dibandingkan dengan N-O. *Curcumin* mempunyai satu buah ikatan hidrogen karbon dengan LSD1. Pada 6-shogaol, hasil penambatan dengan protein LSD1 walaupun mempunyai tiga ikatan hidrogen konvensional tetapi melibatkan dua atom N-O yang mempunyai perbedaan keelektronegatifan lebih kecil dibandingkan H-O. Ada kelebihan lain dari kurkumin dibandingkan dengan 6-shogaol yaitu kurkumin mempunyai satu buah ikatan elektrostatik pada Arg316 dan jumlah interaksi hidrofobik yang lebih banyak.

Berdasarkan hal tersebut di atas, maka dapat diketahui bahwa *curcumin* berpotensi menghambat protein DNMT1 dan LSD1 yang lebih kuat dibandingkan dengan 6-shogaol disebabkan *curcumin* mempunyai energi ikatan yang lebih rendah dan jenis ikatan yang terlibat lebih kuat. Selanjutnya apabila protein DNMT1 dan LSD1 yang berikatan dengan BCL11A dihambat, maka dapat diharapkan berpotensi penghentian mekanisme *switch off* hemoglobin fetal oleh BCL11A. Oleh sebab itu, *curcumin* dan 6-shogaol berpotensi dapat menginduksi produksi HbF dengan melakukan penghambatan terhadap protein DNMT1 dan LSD1, sehingga dapat digunakan sebagai alternatif terapi pada penyakit talasemia beta.

BAB 8

KESIMPULAN

Induksi Hb F berpotensi sebagai alternatif terapi talasemia beta saat ini. Mekanisme regulasi induksi Hb F dapat melalui berbagai jalur ekspresi gena *Globin- γ* . Ekspresi gena *Globin- γ* dapat ditingkatkan melalui penghambatan STAT3, peningkatan fosforilasi p38-MAPK dan penghambatan BCL11A. Ada jalur lainnya yaitu melalui jalur *the eukaryotic initiation factor 2 α* (eIF2 α) yang merupakan regulator pasca transkripsional Hb F. Bila jalur ini diaktifkan, maka terjadi peningkatan translasi mRNA *Globin- γ* sehingga terjadi peningkatan kadar Hb F. Beberapa senyawa telah ditemukan sebagai agen induksi Hb F, baik senyawa dari bahan herbal maupun obat. Senyawa tersebut adalah *curcumin*, 6-shogaol, salubrinal dan hidroxyurea. Langkah selanjutnya adalah mengembangkan senyawa tersebut menjadi preparat dalam bentuk, tablet, sirup maupun sediaan lain yang dapat digunakan sebagai terapi pada pasien talasemia beta.

DAFTAR PUSTAKA

- Aman, A.K., 2003, *Klasifikasi, Etiologi dan Aspek Laboratorik pada Anemi Hemolitik*, Repository FK USU, Medan.
- Basak, A. and Sankaran, V. G., 2016, "Regulation of the Fetal Hemoglobin Silencing Factor" BCL11A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1368 (1) : 25–30, DOI: 10.1111/nyas.13024.
- Bauer, D.E., Kamran, S.C., and Orkin, S.H., 2012, "Reawakening Fetal Hemoglobin : Prospects for New Therapies for The β -Globin Disorders", *Blood*, 120 (15) : 2945 – 2953. DOI 10.1182/blood-2012-06-292078.
- Bauer, D.E., and Orkin, S.H., 2015, "Hemoglobine Switching's Surprise : The Versatile Transcription Factor BCL11A is a Master Repressor of Fetal Hemoglobin", *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 33: 62-70. DOI : 10.1016/j.gde.2015.08.001.
- Cao, A., and Moi, P., 2002, "Regulation of the Globin Genes", *Pediatr Res*, 51(4): 415–421.
- CDC, 2015, *Hemoglobinopathies : Current Practice for Screening, Confirmation and Follow-up*, Association of Public Health Laboratories, USA.
- Dreuzy, E., Bhukhai, K., Leboulch, P., and Payen, E., 2016, "Current and Future Alternative Therapies for Beta-Thalassemia Major", *Biomed. J.*, 39 : 24-38, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bj.2015.10.001>.
- Drew Provan, John Gribben, 2010, *Molecular Hematology*, 3rd Ed, Willey-Blackwell, UK.
- Ernst, P., (auth.), Wickrema, A., Kee, B (eds.), 2009, *Molecular Basis of Hematopoiesis*, Springer-Verlag, New York.

- Ginder G. D. 2015, 'Epigenetic Regulation of Fetal Globin Gene Expression in Adult Erythroid Cells', *Translational research : the Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, Vol. 165, No. 1, pp. 115–125, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2014.05.002>.
- Hattangadi, S.M., Wong, P., Zhang, L., Flygare, J., and Lodish, H.F., 2011, "From Stem Cell to Red Cell: Regulation of Erythropoiesis at Multiple Levels by Multiple Proteins, RNAs, and Chromatin Modifications", *Blood*, 118 (14) : 6258-6268 DOI 10.1182/blood-2011-07-356006.
- Higgs, D.R., Engel, J.D., and Stamatoyannopoulos, G., 2012, "Thalassaemia", *Lancet*, 379: 373–83. DOI:10.1016/S0140-6736(11)60283-3
- Hoffman, R., Furie, B., McGlave, P., Silberstein, L.E., Shattil, S.J., Benz Jr, E.J., Heslop, H., 2009, *Hematology Basic Principles and Practice*, 5th Edition, Churchill Livingstone
- Ivanovs, A., Rybtsov, S., Ng, E.S., Stanley, E.G., Elefanty, A.G., and Medvinsky, A., 2017, "Human Haematopoietic Stem Cell Development: from the Embryo to The Dish", *Development*, 144, 2323-2337 doi:10.1242/dev.134866.
- Liang, R., and Ghafarri, S., 2016, "Advances in Understanding The Mechanisms of Erythropoiesis in Homeostasis and Disease", *British Journal of Haematology*, 174:661–673 doi: 10.1111/bjh.14194
- Makala, L.H., Torres. C.M., Clay, E.L., Neumert, C., and Pace, B.S., 2014, "Fetal Hemoglobin Induction β -Hemoglobinopathies : From Bench to Bedside", *J Hematol Transfus*, 2 (2):1018,
- Metcalf, D., 1998, "Regulatory Mechanisms Controlling Hematopoiesis: Principles and Problems", *Stem Cells*, 16(suppl 1):3-11
- Mussolino, C., and Strouboulis, J., 2021, "Recent Approaches for Manipulating Globin Gene Expression in Treating

- Hemoglobinopathies”, *Front Genome Ed.* 3:618111. doi: 10.3389/fgeed.2021.618111
- Porwit, A., McCullough, J., Erber, W.N., 2011, *Blood and Bone Marrow Pathology*, 2nd Edition, Churchill Livingstone.
- Rujito, L., Sunnaya, J., Basalamah, M., Setyono, J., dan. Siswandari, W., 2014, “Deteksi Pembawa Sifat Thalassaemia di Banyumas Menggunakan Capillary Electrophoresis”, *J Indon Med Assoc*, 64 (6) : 275-280
- Rujito, L., 2019, *Talasemia : Genetik Dasar dan Pengelolaan Terkini*, Unsoed,
- Sankaran, V.G., Xu, J., and Orkin, S.H., 2010, “Advances in The Understanding of Haemoglobin Switching”, *Br J Haematol.* 149(2): 181–194.
- Sankaran, V.G., and Nathan, D.G., 2010, “Reversing the Hemoglobin Switch”, *N Engl J Med*, 363 (23) : 2258 – 2260.
- Sarmoko, Ekowati H, Setiono J, 2014, “The Synergistic Effect of Curcuma xanthorrhiza, Curcuma longa, Zingiber Officinale As Co-chemotherapy Agent with Doxorubicin on MCF-7 Cell Line”, The International Conference New Development of Pharmaceutical Care in Pharmacogenetic and Pharmacogenomic Approach, UMM, Malang.
- Setyono, J., Harini, I.M., Sarmoko, S., and Rujito, L., 2019, “Supplementation of Curcuma Domestica Extract Reduces Cox-2 and inos Expression on Raw 264.7 Cells”, *J. Phys. Conf. Ser.*, 1246 012059, IOP Publishing. doi:10.1088/1742-6596/1246/1/012059
- Setyono, J., Sadewa, A. H., Meiyanto, E. and Mustofa, M., 2020, “Curcumin and 6-Shogaol Increase Hemoglobin F Levels by Inhibiting Expression of STAT3 mRNA Gene in K562 Line Cell””, *IJPHRD*, DOI: 10.37506/v11/i1/2020/ijphrd/194002
- Setyono, J., Nurani, S.C., Fareza, M.S., Fadlan, A., and Sarmoko., 2021, “Molecular Docking of 6-Shogaol and Curcumin on DNMT1 and

- LSD1 as Potential Agents for Thalassemia Treatment”, *JKPK*, 6 (3) : 326-334.
- Smith, B.R., 1990, “Regulation of *Hematopoiesis*”, *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 63, 371-380.
- Stamatoyannopoulos, G., 2005, “Control of Globin Gene Expression During Development and Erythroid Differentiation”, *Exp Hematol*, 33(3): 259. doi:10.1016/j.exphem.2004.11.007.
- Stefanska, M., Batta, K., Patel, R., Florkowska, M., Kouskoff, V., and Lacaud, G., 2017, Primitive Erythrocytes are Generated from Hemogenic Endothelial Cells”, *Scientific Reports*, 7: 6401, DOI:10.1038/s41598-017-06627-9
- Steinberg, M.H., Forget, B.G., Higgs, D.R., Weatherall, D.J., 2009, *Disorders of Hemoglobin Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management*, 2nd Edition, Cambridge University Press.
- Suzuki, M., Yamamoto, M. and Engel, J.D., 2014, “Fetal Globin Gene Repressors as Drug Targets for Molecular Therapies to Treat the β -globinopathies”, *Mol. Cell. Biol*, 34 (19) : 3560–3569, DOI: 10.1128/MCB.00714-1.
- Tumburu, L., and Thein, S.L., 2017, “Genetic Control of Erythropoiesis”, *Curr Opin Hematol*, 24:173–182 DOI:10.1097/MOH.0000000000000333.
- Vandekerckhove, J., Courtois, G., Coulon, S., Ribeil, J-A., Hermine O., 2009, Regulation of Erythropoiesis: CAP.2, *EBMT*, 16 (03): 44 – 87, [http://www.esh.org/files/doc/ IRON2009_ CAP.2%2844-87%29.pdf](http://www.esh.org/files/doc/IRON2009_CAP.2%2844-87%29.pdf).
- Wilber, A., Nienhuis, A.W., and Persons, D.A., 2011, “Transcriptional Regulation of Fetal to Adult Hemoglobin Switching: New Oherapeutic Opportunities”, *BLOOD*, 117(15):3946-3953 DOI 10.1182/blood-2010-11-316893.
- Xu, J., Sankaran, V.G., Ni, M., Menne, T.F., Puram, R.V., Kim, W., and Orkin, S.H., 2010, “Transcriptional Silencing of γ -globin by

BCL11A Involves Long-range Interactions and Cooperation with SOX6”, *Genes Dev*, 24:783–798.

Yamane, T., 2020, “Cellular Basis of Embryonic Hematopoiesis and Its Implications in Prenatal Erythropoiesis”, *Int. J. Mol. Sci.*, 21: 9346; doi:10.3390/ijms21249346.

Zivot, A., Lipton, J., Narla, A., and Blanc, L., 2018, “Erythropoiesis: Insights into Pathophysiology and Treatments in 2017”, *Molecular Medicine*, 24:11 <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0011-z>.

DAFTAR ISTILAH (*GLOSSARIUM*)

Allogenic adalah sel yang diperoleh dari donor dengan spesies yang sama.

Antibodi monoklonal adalah antibodi monospesifik yang dapat mengikat satu epitop saja. Antibodi monoklonal ini dapat dihasilkan dengan teknik hybridoma.

Asam amino adalah senyawa organik yang memiliki gugus fungsi karboksil ($-\text{COOH}$) dan amina (biasanya $-\text{NH}_2$), serta rantai samping (gugus R) yang spesifik untuk setiap jenis asam amino.

Embriogenesis adalah pembuahan atau fertilisasi yang meliputi pembelahan sel dan pengaturan di tingkat sel.

Enukleasi adalah proses pengangkatan inti sel yang mengacu pada pelepasan inti dari sebuah sel.

Fosforilasi adalah penambahan gugus fosfat pada suatu protein atau molekul organik lain.

Gen adalah suatu lokasi tertentu pada genom yang berhubungan dengan pewarisan sifat dan dapat dihubungkan dengan fungsi sebagai regulator (pengendali), sasaran transkripsi, atau peran-peran fungsional lainnya.

Hemoglobin adalah metaloprotein (protein yang mengandung zat besi) di dalam sel darah merah yang berfungsi sebagai pengangkut oksigen dari paru-paru ke seluruh tubuh,[1] pada mamalia dan hewan lainnya.

Homeostasis adalah proses dan mekanisme otomatis yang dilakukan makhluk hidup untuk mempertahankan kondisi konstan agar tubuhnya dapat berfungsi dengan normal, meskipun terjadi perubahan pada lingkungan di dalam atau di luar tubuh.

Ikatan peptida adalah ikatan yang terbentuk ketika atom karbon pada gugus karboksil suatu molekul berbagi elektron dengan atom nitrogen pada gugus amina molekul lainnya. ikatan peptida hanya terdapat pada protein.

Ikatan hidrogen adalah sejenis gaya tarik-menarik antar molekul atau antar dipol-dipol yang terjadi antara dua muatan listrik parsial dengan polaritas yang berlawanan.

Khelasi adalah pengikatan suatu atom dengan suatu ligan yang mengikatnya pada dua atau lebih lokasi ikatan.

Kurkumin (bahasa Inggris: *diferuloylmethane*) adalah senyawa aktif yang ditemukan pada kunir, berupa polifenol dengan rumus kimia $C_{21}H_{20}O_6$.

microRNA atau miRNA, adalah segolongan asam ribonukleat (RNA) berkas tunggal berukuran kecil (panjang antara 21 hingga 24 nukleotida).

Ontogeni (atau ontogenesis, morfogenesis) adalah mendeskripsikan asal usul dan perkembangan organisme sejak dari telur yang dibuahi ke bentuk dewasanya.

Prekursor adalah senyawa yang berpartisipasi dalam reaksi kimia yang menghasilkan senyawa lain, merujuk lebih khusus pada senyawa kimia yang mendahului senyawa lain dalam suatu jalur metabolisme.

Protein adalah kelompok biomolekul berukuran besar yang terbentuk dari satu rantai panjang asam amino atau lebih.

Sel darah merah (eritrosit) adalah jenis sel darah yang paling banyak dan berfungsi mengikat oksigen.

Sel progenitor adalah sel dengan kemampuan untuk terdiferensiasi menjadi suatu jenis sel tertentu.

Sel stromal adalah sel yang membentuk jaringan penghantar atau stroma. Fibroblas, perisit, sel endotelial merupakan jenis umum sel stromal.

Sitokin adalah kategori luas dari protein kecil (~ 5-20 kDa) yang penting dalam pensinyalan sel. Pelepasan sitokin memengaruhi perilaku sel di sekitarnya.

Transkripsi adalah pembuatan RNA terutama mRNA dengan menyalin sebagian berkas DNA oleh enzim RNA polymerase.

Yolk sac adalah kantung bermembran yang melekat pada embrio, yang dibentuk oleh sel-sel dari hipoblas yang berdekatan.

INDEKS

6

6-shogaol, 2, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 83

A

allogenik, 2, 75
anemi sideroblastik, 7
antigen, 7, 8
autophagy, 14

B

BCL11A, 2, 57, 68, 71, 72, 73, 81, 83, 84, 88
BFU-E, 11, 15, 16, 17, 18, 25, 35, 36, 38
BPJS Kesehatan, 2

C

CFU-E, 11, 15, 16, 17, 18, 25, 35, 36, 37, 38
cincin hem, 9
Common Lymphoid Progenitor, 8
Common Myeloid Progenitor (, 8
CREB I, 3
curcumin, 2, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 83, 94

D

delesi, 49, 53, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64

differensiasi, 3, 4, 7, 11, 14, 18, 22, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 76
Differensiasi, 7, 11, 16, 19
distal, 6, 49, 59, 70
DNMT1, 74, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 86

E

EKLF, 10, 18, 19, 30, 31, 45
eIF2 α , 76, 83
embriogenesis, 4, 10, 21
Emp, 12, 13, 33
EPO, 9, 11, 13, 16, 17, 18, 35, 38
eritroid, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 42, 45, 55, 66, 70, 72, 74, 75, 76
Eritropoeisis, 4, 5, 6, 10, 15, 16, 20, 24, 25, 26, 32, 33, 35
eritropoeitin, 6, 9, 24, 25, 37, 54, 58
Eritrosit, 9
erythroblast macrophage protein, 12, 33
Erythroid Kruppel-like Factor, 19
erythroblast islands, 11

F

faktor transkripsi, 3, 8, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 27, 32, 38, 44, 45, 47, 57, 67, 71, 74
fosforilasi, 3, 17, 18, 29, 83

frameshift, 53, 54

G

GATA-1, 3, 10, 18, 19, 20, 27, 28, 29,
30, 31, 32, 45, 67
gena globin- α , 1, 22, 31, 42, 43, 46, 47,
58, 59, 60, 61, 62, 65, 66
Genotip, 54, 58, 64
gingerol, 74
globin- β , 1, 20, 21, 22, 31, 43, 45, 49,
50, 59, 61, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 71,
72
Gower I, 4
Gower II, 4
granulocyte colony stimulating factor,
8
*granulocyte-macrophage colony
stimulating factor*, 8
granulositik, 7, 8
Growth-promoting cytokines, 8

H

Hb switching, 2
HbA, 6, 40, 47
HDAC2, 76
Hematopoiesis, 4, 7
Hematopoietic stem cells, 4, 7, 8
hemoglobin, 1, 2, 3, 4, 5, 9, 11, 14, 15,
20, 23, 31, 35, 40, 41, 44, 46, 47, 48,
53, 55, 56, 57, 58, 61, 63, 64, 65, 66,
67, 68, 69, 70, 72, 73, 81, 84, 87
hemopoeitik, 4, 6, 7, 8, 57
HIF1 α , 17
Hydroxyurea, 76

I

ICAM-4, 12, 33
ikatan hidrofobik, 78

induksi Hb F, 2, 69, 72, 76, 83

J

janin, 10, 16, 31, 62, 67, 68
Janus Kinase, 17

K

khelasi besi, 2, 75
kromosom Philadelphia, 7

L

LCR, 20, 21, 31, 43, 45, 69, 70
ligan inhibitor, 78
Locus Control Region, 20, 21, 43

M

makronormoblastik, 6
makrositik, 5, 6
maturasi, 4, 5, 9, 10, 12, 14, 16, 17, 18,
19, 20, 26, 28, 31, 33, 34, 35, 36, 37,
54, 72
MCV, 6
megakaryosit, 4, 6, 45
megaloblastik, 4, 5
mesoderm, 4
MicroRNA, 20, 72
molekuler, 2, 3, 24, 28, 30, 48, 53, 58,
59, 60, 63, 69, 74
mutasi, 1, 29, 36, 43, 48, 49, 50, 51, 52,
53, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 64
myeloid, 4, 6, 7, 8, 31

N

natural killer, 8

O

Ontogeni, 14, 90
Overekspresi, 32

P

p38 MAPK, 3, 68, 73, 74, 75
pembawa sifat, 1, 67
penambatan, 76, 77, 78, 79, 80, 81
pluripoten, 4, 7, 8
Portland, 4, 40
progenitor, 7, 8, 9, 11, 16, 18, 24, 25, 28, 31, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 90
proksimal, 6, 49, 70
Proliferasi, 7

R

Rac GTPase, 34
Ras/Raf, 17
Regio, 4, 28, 45, 52, 60
remodeling, 21
retikulum endoplasmik, 14
ribosomal, 14

S

Salubrinal, 76
sel line K562, 75
sel punca, 2, 75
sel stem pluripoten, 4
shogaol, 2, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 83, 94
STAT, 3
stem cell factor, 18, 25
stromal microenvironment, 11

T

Talasemia, 1, 2, 49, 54, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 67, 75
talasemia- α , 1, 58, 59, 60, 61, 62, 64, 65
talasemia- β , 1, 2, 31, 58, 63, 64, 65
terapi gen, 2, 75
The Burst-Forming Unit Erythroid, 11
The Colony-Forming Unit Erythroid, 11
transplantasi, 2, 35, 75

U

upstream, 20, 21, 42, 45, 54, 59, 60

V

VCAM-1, 12, 33
visualisasi, 78, 79, 81

W

WHO, 1

X

Xq13, 62

Y

yolk sac, 4, 10, 14, 15, 16, 17, 47

Z

ZBP-89, 30, 32
zinc finger, 19, 27, 30, 31, 32, 72

Aspek Biomolekuler Hemoglobin dan Mekanisme Regulasi Produksi Hemoglobin Fetus (Hb F) sebagai Alternatif Terapi Penyakit Talasemia-Beta Terkini

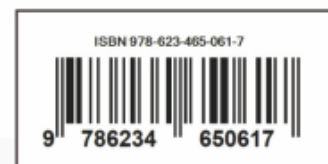
Saat ini ada beberapa alternatif terapi talasemia- β mayor yaitu pemberian transfusi beserta obat khelasi besi, transplantasi sel punca allogenik, induksi Hb F dan terapi gen. Pemberian transfuse darah dan obat khelasi besi berpotensi menimbulkan komplikasi dan berbiaya tinggi, sedangkan terapi transplantasi sel punca allogenik dan terapi gen berpotensi mengandung onkogen, maka salah satu pendekatan terapi terkini yang potensial pada talasemia- β yaitu stimulasi peningkatan produksi hemoglobin F. Induksi Hb F pada kadar yang tinggi adalah penting untuk menurunkan tingkat keparahan talasemia- β , sehingga menyebabkan perbaikan dalam mengurangi hemolisis, inefektivitas eritropoesis, dan akhirnya meningkatkan kadar hemoglobin total. Ada senyawa aktif dari herbal alami tanaman jahe merah dan temulawak yaitu *6-shogaol* dan *curcumin* yang dapat mempengaruhi produksi Hb F melalui beberapa jalur molekuler yang ada.

Produksi Hb F dapat diatur melalui beberapa jalur molekuler, di antaranya adalah aktivitas pengalihan hemoglobin (*Hb switching*) dari Hb Fetus ke Hb dewasa yang diatur oleh regulator baru yaitu BCL11A (*B-cell lymphoma/leukemia 11A*). Jalur ini dilaporkan mempunyai aktivitas sebagai represor globin- γ . Ada jalur lain dalam memengaruhi produksi Hb F yaitu melalui jalur *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT) dengan cara penghambatan ekspresi gena globin- γ . Selain BCL11A dan STAT ada jalur molekuler lain dalam mengatur transkripsi gena globin- γ yaitu jalur *p38 mitogen activated protein kinase* (p38 MAPK) melalui proses fosforilasi *cAMP response element binding protein 1* (CREB I). Adapau CREB I ini mengatur ekspresi dari GATA-1 dan GATA-1 merupakan master regulator faktor transkripsi diferensiasi eritroid sehingga berperan penting dalam hematopoiesis normal.

Berdasarkan mekanisme molekuler dan peran genetik yang terkait dengan pengaturan kadar Hb F di atas, maka diharapkan buku referensi ini dapat memberikan gambaran potensi terapeutik terkini talasemia beta yang lebih baik dalam rangka peningkatan kualitas hidup penderita dan memberikan gambaran jalur mekanisme molekuler yang mendasari pemahaman regulasi ekspresi gena globin pembentuk hemoglobin fetal.



UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN
Gd. UNSOED Press
Jalan Prof. Dr. H.R. Boenyamin 708 Purwokerto
Kode Pos 53122 Kotak Pos 115
Telepon (0281) 626070
Email: unsoedpresspwt@gmail.com



ORIGINALITY REPORT

2%

SIMILARITY INDEX

2%

INTERNET SOURCES

0%

PUBLICATIONS

%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

www.researchgate.net

Internet Source

<1%

2

docobook.com

Internet Source

<1%

3

doku.pub

Internet Source

<1%

4

basicmedicalkey.com

Internet Source

<1%

5

www.lppm.unsoed.ac.id

Internet Source

<1%

6

epdf.pub

Internet Source

<1%

7

www.ijphrd.com

Internet Source

<1%

8

dm-ambisius.blogspot.com

Internet Source

<1%

9

www.neliti.com

Internet Source

<1%

10

dokumen.pub

Internet Source

<1%

11

aakmalang.blogspot.com

Internet Source

<1%

12

stutzartists.org

Internet Source

<1%

13

ashpublications.org

Internet Source

<1%

14	idoc.pub Internet Source	<1 %
15	summer-absolutely.icu Internet Source	<1 %
16	text-id.123dok.com Internet Source	<1 %
17	karyatulisilmiah.com Internet Source	<1 %
18	David J Weatherall. "Haemoglobin and the Inherited Disorders of Globin Synthesis", Postgraduate Haematology, 03/03/2005 Publication	<1 %
19	Dina Mariana, Dwi Wulandari, Padila Padila. "Hubungan Pola Makan dengan Kejadian Anemia pada Ibu Hamil di Wilayah Kerja Puskesmas", Jurnal Keperawatan Silampari, 2018 Publication	<1 %

Exclude quotes	On	Exclude matches	< 10 words
Exclude bibliography	On		