

Diagnostik Thalassemia dengan Polymerase Chain Reaction

Sunarto

Laboratorium Ilmu Kesehatan Anak IUPF Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Macla
Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Sardjito, Yogyakarta

Keywords : – thalassemia – gene mutation and deletion – polymerase chain reaction – amplification refractory mutation system – covalent reverse dot-blot

PENGANTAR

Thalassemia adalah sindrom klinik yang disebabkan oleh defek gena yang menyandi sintesis globin dengan akibat sintesis globin berkurang atau tak ada sama sekali. Kekurangan sintesis globin pada penderita thalassemia telah dibuktikan secara *in vitro* pada retikulosit darah tepi penderita^(1,2,3).

Manifestasi klinik thalassemia sangat beraneka ragam dan keaneka ragaman tadi hanya dapat dijelaskan dengan studi molekular. Berbagai cara telah dikembangkan untuk kepentingan penelitian maupun untuk kepentingan praktis di lapangan, di antaranya adalah sequencing atau pengurutan DNA (*desoxyribonucleic acid sequencing*)⁽⁴⁻⁸⁾, dengan *probe* oligonukleotid radioaktif atau nonradioaktif⁽⁹⁻¹²⁾, *linkage analysis* dan deteksi langsung dengan *allele specific oligonucleotide primer* (primer ARMS)^(13,14,15).

Pada teknik diagnosis di atas, kecuali yang terakhir, DNA harus digandakan lebih dulu untuk memperoleh sejumlah DNA yang cukup untuk dianalisis. Sebelum teknik *polymerase chain reaction* (PCR) ditemukan, penggandaan DNA dilakukan dengan kloning^(6,8,16,17). Penggandaan DNA dengan kloning, rumit dan memerlukan waktu sampai 10 hari. PCR merupakan suatu prosedur penggandaan DNA secara *in vitro* yang praktis dan memerlukan waktu hanya kira-kira 3 jam. PCR baik sebagai cara penggandaan maupun untuk diagnostik amat praktis dan mempunyai akurasi tinggi^(15,18). Pada prosedur PCR berbagai masalah timbul, demikian pula pada pengembangannya sebagai uji diagnostik di lapangan.

Dalam makalah ini akan dibahas prinsip dan masalah PCR secara teknis, dasar kelainan genetik thalassemia, masalah dan kepentingan diagnostik thalassemia dengan menggunakan PCR.

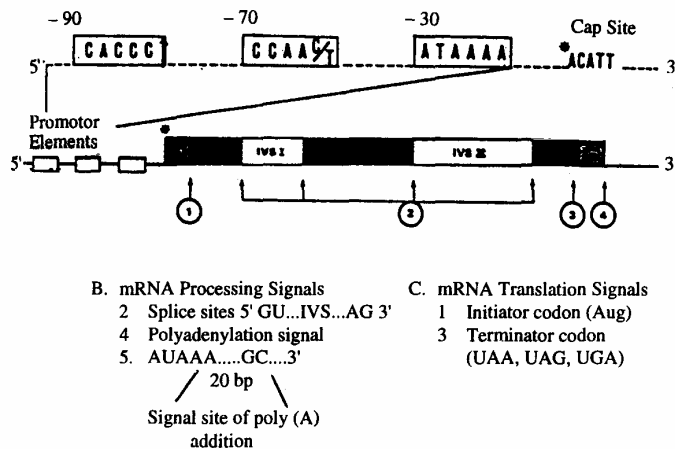
PEMBAHASAN

Dasar molekular thalassemia

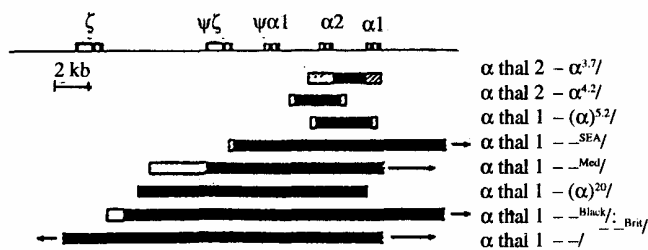
Hemoglobin terdiri atas haem dan globin. Globin pada orang normal terdiri atas sepasang rantai polipeptid- α dan sepasang rantai non- α (β , δ , γ atau ϵ). Sintesis globin disandi oleh gena yang unik; gena yang menyandi sintesis polipeptid α bersama ξ terletak pada lengan pendek kromosom 16, menempati regio 16-25 kb (*kilo base pair*). Gena yang menyandi sintesis rantai β , δ , γ atau ϵ terletak pada lengan pendek kromosom 11 menempati regio 55-60 kb. Rantai- ϵ dan rantai- ξ hanya disintesis pada awal kehidupan janin. Analisis urutan nukleotid semua gena globin telah sangat luas dilakukan dan struktur gena itu telah didokumentasikan sepenuhnya⁽¹⁹⁾. Gena globin terdiri atas 3 exon, yaitu bagian yang diekspresikan atau menyandi sintesis polipeptid globin, dan di antara ketiga exon tadi terdapat intron atau *intervening sequence* (IVS) yang tak diekspresikan. Di samping itu di sebelah hulu ujung 5' dan hulu ujung 3' terdapat *non-coding DNA* atau *flanking DNA*⁽²⁰⁾ (**Gambar 1**).

Thalassemia terjadi bila gena globin mengalami delesi (terutama pada thalassemia- α) atau mutasi noktah (*point mutation*) (terutama thalassemia- β). Delesi genaglobin dapat mengenai hanya sebagian dari gena atau satu gena seutuhnya, bahkan dapat mengenai beberapa gena bersama-sama⁽²¹⁾ (**Gambar 2**).

Mutasi yang berakibat thalassemia dapat terjadi pada exon, pada IVS, pada flanking DNA ujung 5' maupun 3'^(9,21,22). Kelainan-kelainan tersebut akan menyebabkan mRNA globin tidak atau sedikit sekali terbentuk atau terbentuk mRNA abnormal yang tidak berfungsi, tidak stabil dan akan dihancurkan; akibatnya terjadi defisiensi sintesis globin^(23,24). Poladelesi maupun mutasi



Gambar 1. Bagan gena globin



Gambar 2. Beberapa tipe delesi pada gena- α

bervariasi untuk berbagai populasi/ras dan wilayah geografi dan variasi ini menyebabkan manifestasi thalassemia yang beraneka ragam pula⁽²⁰⁾.

PRINSIP PCR

PCR diperlukan pada diagnosis molekular, termasuk thalassemia. Cara ini diperkenalkan pertama kali oleh Saiki et al., dari kelompok Cetus, tahun 1984_1985⁽²⁵⁾. Pada awalnya PCR dikembangkan sebagai cara untuk menggandakan DNA secara *in vitro*, sebagai alternatif dan cara *in vivo* yang rumit dan memerlukan waktu lama.

Prinsip PCR dapat dijelaskan sebagai berikut⁽²⁵⁾ : bila DNA dicampur dengan oligonukleotid yang komplementer dan diberi kondisi yang sesuai, maka oligonukleotid tadi akan berperan sebagai titik awal (*primer*) sintesis *copy* DNA target dengan DNA target sebagai cetakan (*template*). Dengan menggunakan dua *primer*, satu di sebeih hulu (5') dan satu di sebelah hilir (3'), segmen DNA yang terietak di antara kedua *primer* tadi akan tergandakan.

Dalam pelaksanaannya DNA bersama *deoxynucleosid triphosphate* (dATP = *deoxyadenosine triphosphate*, dCTP = *deoxycytidine triphosphate*, dGTP = *deoxyguanosine*

triphosphate, dan dTTP = *deoxythymidine triphosphate*), enzim polimerase, garam, bufer dan sepasang *primer* dicampur dalam tabung reaksi. Campuran itu diberi suhu yang berselang-seling, mula-mula 95°C selama 15 detik, kemudian suhu diturunkan menjadi 54°C selama 15 detik dan kemudian dinaikkan lagi menjadi 72°C selama 30 detik⁽¹⁵⁾. Pada suhu 95°C DNA untai ganda akan terurai menjadi DNA untai tunggal (proses denaturasi); pada suhu 54°C *primer* akan menempel pada segmen DNA yang komplementer (*annealing*) dan selanjutnya pada suhu 72°C di bawah pengaruh enzim polimerase *primer* akan mengalami pemanjangan (*extension*). Ketiga langkah ini merupakan satu siklus dan akan menghasilkan untai DNA tunggal yang komplementer dengan segmen DNA target (*copy* DNA target). Dalam satu siklus, satu untai DNA tunggal akan tergandakan menjadi 2 untai. Dengan n siklus, dari satu untai DNA teoretis akan dihasilkan lebih dari 30 juta *copy* untai DNA tunggal, cukup banyak untuk proses analisis selanjutnya.

Pada awal pengembangan PCR timbul masalah yang sangat menghambat pelaksanaan, yaitu rusaknya enzim polimerase (fragmen Kienow) akibat suhu yang tinggi, sehingga sejumlah enzim baru harus selalu ditambahkan seteah setiap satu siklus. Hal ini amat merepotkan. Dengan ditemukannya enzim Taq (berasal dari bakteri *Thermoaquatus*) yang tahan panas sampai 100°C, maka permasalahan tersebut teratasi. Enzim Taq yang dicampurkan pada awal pengerjaan dapat bertahan sampai selesai, sehingga otomatisasi pengerjaan dapat diterapkan. Dengan enzim yang tahan panas segmen DNA berukuran sampai beberapa *kilo base pair* (kb) dapat digandakan⁽²⁶⁾.

Prosedur PCR dapat dilakukan terhadap setiap sel berinti (yang mengandung DNA) seperti sel mukosa pipi, leukosit, sel dalam cairan amnion, viii koralis, bahkan dari bahan fosil yang masih mengandung DNA. Hal ini sangat memudahkan dalam memperoleh cuplikan. Metode ini sangat sensitif sehingga membutuhkan hanya sejumlah kecil cuplikan saja; DNA sejumlah 1 ug telah cukup. Dari *single copy genes* dapat diperoleh sejumlah *copy* DNA cukup untuk dianalisis⁽⁸⁾. Setetes darah kering pada kentas saring cukup untuk mendeteksi genotip penderita thalassemia⁽¹⁰⁾. DNA produk PCR dapat disimpan dan dapat digunakan sebagai cuplikan untuk digandakan lagi.

Sensitivitas yang amat tinggi dan PCR menyebabkan berbagai masalah^(15,25,26). DNA kontaminan yang amat sedikitpun akan ikut tergandakan sehingga terbentuk sejumlah *copy* dari DNA kontaminan. DNA kontaminan dapat berasal dari sel dalam ludah, serpih kulit dari pemeriksa, dan sebagainya. Karena itu pengerjaan PCR harus benar-benar teliti. Penempelan primer secara nonspesifik pada segmen DNA non target akan menghasilkan sejumlah *copy* DNA non target; hal ini dapat dihindari dengan membuat primer sespesifik mungkin, antara lain dengan menggunakan oligonukieotid yang tidak terlalu panjang maupun terlalu pendek dan dengan memasukkan *mismatched nucleotide*, misalnya nukieotid -4 dari ujung 3'⁽¹⁵⁾. Pada percobaan dengan siklus yang amat banyak, misalnya kalau cuplikan DNA terlalu sedikit, dapat terbentuk dimer dan *primer*; dimer akan terlihat sebagai DNA dengan ukuran kira-kira 40 bp, dan biasanya

mudah dikenali sehingga tidak terlalu mengganggu. Selain masalah di atas kekurangan aktivitas polimerase dari Taq akan menyebabkan terjadinya salah baca dan penggabungan basa yang salah (*misincorporation*); karena itu polimerase harus ditangani dengan amat cermat, misalnya dalam hal penyimpanan bahan-bahan yang digunakan.

PCR PADA THALASSEMIA

Sebelum cara PCR ditemukan analisis DNA dilakukan dengan prosedur yang panjang dan rumit, yaitu pertama-tama membentuk perpustakaan (*library construction*) melalui digesti dengan endonuklease restriktif dan kloning, kemudian skrining, *mapping*, subkloning dan terakhir sekuensing. PCR dapat meningkatkan proses tersebut: dengan PCR, yang masih menggunakan fragmen Klenow, dapat diperoleh fragmen DNA yang langsung dapat disubklon⁽²⁷⁾. Pada prosedur PCR sekarang, dengan menggunakan enzim Taq, subkloning tidak diperlukan lagi.

Tipe delesi pada thalassemia- α yang terbanyak di Asia Tenggara adalah $-\alpha^{3,4}$ dan $-\alpha^{4,2}$. Dengan menggunakan dua primer – satu di hulu dan satu di hilir dan delesi – akan dihasilkan segmen DNA yang sekian bp lebih pendek daripada normal. Pada hidrop fetalis Hb Bart tidak terbentuk *copy* dan gena- α sebagai produk PCR⁽¹⁸⁾. karena penderita sama sekali tidak mempunyai gena- α . Winichagoon et al. (1989) membuktikan bahwa PCR mampu mendeteksi delesi hanya sepanjang 4bp pada kodon 41/42 (-CTTT) dan gena- β ⁽²⁸⁾.

Untuk mendeteksi mutan, yang merupakan dasar utama kelainan genetik pada thalassemia- β mula-mula segmen tempat

mutasi digandakan dan kemudian dianalisis dengan *probe*, dengan endonuklease restriksi atau sekuensing. Prosedur yang praktis untuk mendeteksi mutan secara langsung dari produk PCR telah dikembangkan, yaitu *amplification refractory mutation system* (ARMS)^(13,15). Pada sistem ini digunakan primer ARMS, yaitu oligonukleotid – terdiri atas 20–30 bp – yang komplementer dengan DNA mutan (*allele specific oligonucleotide* = ASO); nukleotid ujung 3' dan primer ARMS komplementer dengan nukleotid yang mengalami mutasi. Primer ARMS untuk mutan tertentu akan merupakan *primer* atau *amplimer* bagi mutan itu saja, dan tidak bagi DNA normal maupun mutan lain, karena ujung 3' primer ARMS mutan tidak komplementer dengan DNA normal maupun mutan lain. Satu primer ARMS yang komplementer dengan segmen hilir DNA mutan tertentu bersama dengan satu *common primer* (yang punya urutan nukleotid sama dengan segmen DNA target di hulu) akan menggandakan segmen DNA mutan yang terletak di antara kedua primer tersebut.

Untuk mendeteksi mutasi IVS-1 nt5 (G \rightarrow C) pada gena- β misalnya, digunakan primer ARMS, 5' CTCCTTAAACCTGTCTTGTAACCTTGTTAG 3' dan *common primer* 5' ACCTCACCTGTGGAGCCAC 3'⁽¹⁵⁾. Proses PCR digambarkan sebagai berikut (**Gambar 3**).

Dengan primer di atas akan diperoleh sejumlah besar *copy* dari segmen DNA target dengan ukuran 285 bp, hanya kalau pada DNA target terdapat mutasi IVS1 ntl (G \rightarrow C); DNA normal tidak akan digandakan. Sebaliknya d tabung yang mengandung primer normal yang ujung 3'-nya C (komplementer dengan



Gambar 3. Bagan deteksi mutan dengan prosedur ARMS: a/ penempelan primer ARMS pada DNA target [gena-b dengan mutasi pada IVS-1 nt-5 (G \rightarrow C)] dan seterusnya ekstensi primer ARMS \rightarrow terbentuk DNA yang komplementer dengan DNA target; b/ *common primer* menempel pada DNA hasil ekstensi primer ARMS dan seterusnya ekstensi *common primer* menghasilkan DNA dengan panjang 285 bp. (c)

subyek yang diteliti dapat diidentifikasi jenis mutasi dari 67 subyek dengan frekuensi mutan sesuai dengan hasil penelitian Lie-Injo et al⁽²⁹⁾ dengan teknik PCR dan *probe* oligonukleotid menemukan tipe mutasi berturut-turut dari yang tersering IVS1nt1 (G→C), Kodon 26(HAH→AAG), IVS2nt654(C→T), IVS1nt1 (G→T), Kodon 15(TGG→TAG), Kodon 17(AAG→TAG), Kodon30(AGG→ACG), IVS1nt1(G→A), Kodon 35(-C), Kodon41/42(-CTTT). Berdasarkan penelitian itu, jika teknik ARMS diterapkan di Indonesia primer yang terutama perlu disediakan adalah:

5' TTAAACCTGTCTTGTAACCTFGATACGAAG 3' untuk mutan IVS1 ntl(G→C),

5' GAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTATGGT 3' untuk mutan IVS2 nt654(C→T),

5' TTAAACCTGTCTTGTAACCTFGATACGAAA 3' untuk mutan IVS1 ntl(G→T),

5' CCACCAACTTCATCCACGTTCACTTGGCCT 3' untuk mutan kodon 15(G→A), dan

5' TAACCTTGATACCAACCTGCCAGGGCTT 3' untuk mutan kodon 26(GAG→AAG) atau HbE.

Dengan menggunakan teknik hibridisasi RDB Maggio et al. (1993) dapat mengidentifikasi sembilan mutasi pada gena-β yang sering terdapat pada populasi Sicilia, berturut-turut dari yang terbanyak mutasi kodon 39, IVS1nt110, IVS1nt6, IVS1nt1, mutasi IVS2nt745 dan mutasi nt-87. Persentase dari masing-masing mutan ternyata sesuai dengan penelitian sebelumnya. Hal ini menunjukkan keakuratan dari cara tersebut⁽¹¹⁾.

Karena prosedur PCR amat praktis maka besar harapan akan dapat diimplementasikan sebagai prosedur rutin di Indonesia khususnya untuk diagnosis prenatal bila alternatif pengendalian thalassemia melibatkan diagnosis tersebut. Apabila polimerase Taq dan primer/*probe* dapat ditekan harganya maka biaya tiap satuan analisis akan tidak mahal⁽¹⁸⁾.

KESIMPULAN

PCR merupakan cara enzimatik yang sangat sensitif dan spesifik untuk menggandakan DNA. Dengan ditemukannya polimerase Taq prosedur ini makin praktis, sehingga kini cara tersebut telah luas digunakan dan merupakan alternatif yang praktis untuk memperoleh DNA dalam jumlah yang cukup guna kepentingan studi molekular, termasuk thalassemia. Berdasarkan prinsip PCR telah dikembangkan cara diagnostik molekular yang terbukti sangat akurat. Dengan prosedur ARMS yang menggunakan *allele specific oligonucleotide* sebagai primer mutan dapat dideteksi secara langsung. Teknik hibridisasi RDB terhadap DNA produk PCR dengan menggunakan *allele specific oligonucleotide* sebagai *probe* merupakan cara diagnostik molekular yang relatif mudah. Untuk penyediaan primer maupun *probe* yang sesuai bagi populasi atau ras tertentu, macam dan frekuensi mutasi gena pada populasi yang bersangkutan harus telah diketahui lebih dahulu.

KEPUSTAKAAN

1. Conconi F, Bargellesi A, Del Senno L, Menegatti E, Pontremoli S, Russo G. Globin chain synthesis in Sicilian thalassemic subjects, Br J Haematol.

1970; 19: 469-75.

2. Friedman SH, Schwartz E, Ahern V, Ahern E. Globin synthesis in the Jamaican Negro with I-thalassemia, Br J Haematol. 1974; 28: 505-13.

3. Todd D, Chan V, Schneider RG, Dozy AM, Kan YW, Chan TK. Globin synthesis in hemoglobin New York ($\beta 113^{\text{valin}} \rightarrow \text{glutamic acid}$), Br J Hematol. 1980; 46: 557-64.

4. Cheng TC, Orkin SH, Antonarakis SE, Potter MJ, Sexton JP, Markham AF, Giardina PJV, Li A, Kazazian Jr HH. β -thalassemia in Chinese use of in vivo mRNA analysis and oligonucleotide hybridization in systemic characterization of molecular defects. USA: Proc Natl Acad Sci 1984; 81: 2821-25.

5. Chan V, Chan TK, Kan YW, Todd. A novel β -thalassemia frameshift mutation (codon 14/15), detectable by direct visualization of abnormal restriction fragment in amplified genome DNA. Blood 198; 72: 1420-23.

6. Fucharoen S, Kobayashi Y, Fucharoen G, Ohta Y, Miyazono K, Fukimaki F, Takaku. A single nucleotide deletion in codon 123 of -g1obin gene causes an inclusion bodies 3-thalassemia trait: A novel elongated globin chain Makabe. Br J Haematol. 1990; 75: 393-99.

7. Romeo L, Almeida L, Higgs DR, Levinha J, Liebhauer SA. α -thalassemia resulting from deletion of regulatory sequences far upstream of the α -globin structural gene Blood 1991; 7: 1589-95.

8. Wong C, Antonarakis SE, Goff SC, Orkin SH, Forget BG, Nathan DG, Giardina PJV, Kazazian Jr HH. β -thalassemia due to two novel nucleotide substitutions in consensus acceptor splice sequences of the -globin gene Blood 1989; 73: 914-18.

9. Cal SP, Zhang JZ, Doherty M, Yuet WK. A new TATA box mutation detected at prenatal diagnosis for -thalassemia. Hum Genet 1989; 45: 112-14.

10. Huang SZ, Zhou XD, Thu H, RenZR, Zeng YT. Detection of β -thalassemia mutations in Chinese using amplified DNA from dried blood specimens, Hum Genet 1989; 84: 129-31.

11. Maggio A, Giambona A, Cal SP, Wall J, Kan YW, Chebab FF. Rapid and simultaneous typing of hemoglobin S, hemoglobin C, and seven Mediterranean -thalassemia mutations by covalent reverse dot-blot analysis: Application to prenatal diagnosis to Sicily, Blood 1993; 81: 239-42.

12. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf Si, Higuchi R, Ham GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988b; 239: 487-91.

13. Old JM, Varawalla NY, Weatherall DJ. Rapid detection and prenatal diagnosis of β -thalassemia: studies in Indian and Cypriot populations in the UK. Lancet 1990; II: 834-37.

14. Sofro ASM, Lanni F, Ismadi. Globin gene mutations of β -thalassemia at Dr. Sardjito General Hospital Yogyakarta-Indonesia Hum Genet 1992; 51(Y) Supl A: 343.

15. Varawalla NY, Old JM, Sarkar R, Venkatesan R, Weatherall DJ. The spectrum of I-thalassemia mutations on the Indian subcontinent: the basis for prenatal diagnosis. Br J Haematol. 1991; 78: 242-7.

16. Nantomi Y, Nakashima H, Kagimoto M, Naito Y, Yokota E, Imamura T. A common chinese β -thalassemia mutation found in a Japanese family. Hum Genet 1990; 86: 480-83.

17. Wang C, Antonarakis SE, Goff SC, Orkin SH, Forget BG, Boehm CD, Kazazian Jr HH. On the origin of the spread of I-thalassemia: Recurrent observation on mutations in different ethnic groups, USA: Pro Natl Acad Sci 1986; 83: 6529-32.

18. Fucharoen S, Winichagoon P, Thonglairoam V, Siriboon W, Siritanarakul N, Kanokpongakdi S, Vantanasiri V. Prenatal diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathies in Thailand: Experiences from 100 pregnancies Southeast Asian, J Trop Med Pubi Health 1991; 22: 16-29.

19. Vogel F, Motulsky AG. Human Genetics Problem and Approaches 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 1986.

20. Fucharoen-Winichagoon P, Fucharoen S. Molecular mechanism of thalassemia in Thailand. Thailand: J Sc Soc 1986; 12: 9-21.

21. Bunn HF, Forget BG. Hemoglobin: genetic and clinical aspects 1st ed. Philadelphia: WB. Saunders Co 1986; pp 225-305.

22. Rosatelli MC, Oggiano L, Leoni GB, Tuveri T, Di Tucci A, Scalas MT, Dore E, Pistidda P, Massa A, Longinotti M, Cao A. Thalassemia intermedia resulting from a mild -thalassemia mutation Blood 1989; 73: 601-05.

23. Kazazian HH, Ginder GD, Snyder PG, Van Beneden Ri, Wodhead AP. Further evidence of quantitative deficiency of chain-specific globin mRNA

- in thalassemia syndromes, USA: Proc Nat Acad Sci 1975; 72: 567-71.
24. Nienhuis AW, Turner P, Benz Jr. EL Relative stability of α and β -globin messenger RNAs in homozygous β^0 -thalassemia. USA: Proc Natl Acad Sci 1977; 74: 3960-64.
 25. Arnheim N, Levenson CH. Polymerase chain reaction CAEN – Special Report, October 1990.
 26. Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, Warren IC, Boehm CD, Haig MS, Kazazian H, Ehrlich HA. Diagnosis of sickle anemia and β^0 -thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. N Engl J Med 1988a; 319: 537-41.
 27. Scarf SJ, Horn GT, Ehrlich HA. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. Science 1986; 233: 1076-78.
 28. Winichagoon P, Kownkon J, Yetchinsomanus P, Thonglairoam V, Siritanaratkul N, Fucharoen S. Detection of β^0 -thalassemia and hemoglobin E gene in Thai by a DNA amplification technique Hum Geret 1989; 82: 389-90.
 29. Lie-Injo LE, Cai SP, Iskandar Wahidiat, Moeslichan S, Lim ML, Evangelista I, Doherty M, Kan YM. β^0 -thalassemia mutations in Indonesia and their linkage to β -haplotype, Am J Hum Genet 1989; 45: 97 1-5.
 30. Wong C, Dowling CE, Saiki RK, Higuchi RG, Erlich HA, Kazazian Jr HH. Characterization of β^0 -thalassemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. Nature 1987; 330: 384-6.

