

Terapi Gen pada Hemoglobinopati

Christopher A. Manukiley¹, Roro Rukmi W²

¹Mahasiswa, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

²Bagian Ilmu Kesehatan Anak, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

Abstrak

Menurut World Health Organization (WHO), anemia adalah suatu kondisi dimana jumlah sel darah merah atau kapasitas oksigen tidak mencukupi untuk memenuhi kebutuhan fisiologis, yang bervariasi menurut umur, jenis kelamin, ketinggian, merokok, dan status kehamilan. Gejala yang samar pada anemia ringan hingga sedang menyulitkan deteksi sehingga meningkatkan risiko kematian pada anak. Terapi genetika, yang memanfaatkan sel pasien sendiri, merupakan pilihan terapeutik yang menarik. Akhir akhir ini, hemoglobinopati telah berhasil diobati dengan Hematopoietic Stem Cell Transplant (HSCT), yang mirip dengan banyak teknik terapi gen. Efisiensi transfer gen paling baik dengan vektor virus, karena mereka telah berevolusi selama jutaan tahun untuk dapat dengan mudah memasuki sel. Sebagian besar vektor virus dalam studi praklinis dan uji klinis berasal dari *Retroviridae*, keluarga virus yang dapat secara permanen berintegrasi ke dalam genom seluler. Kemajuan dalam Induced Pluripotent Stem Cells (iPSC) dan teknologi pengeditan gen telah menawarkan kesempatan yang menjanjikan untuk memperbaiki cacat genetik dengan menggunakan sel somatik *autologus*. Menjanjikan teknologi baru seperti induced pluripotent stem cells dan genome editing dapat mengantarkan era baru di bidang terapi gen.

Kata kunci: hemoglobinopati, sel punca, terapi gen

Gene Therapy in Hemoglobinopathy

Abstract

According to WHO, anemia is a condition in which the number of red blood cells or oxygen capacity is not sufficient to meet physiological needs, which vary by age, sex, height, smoking, and pregnancy status. The faint symptoms of mild anemia are making it difficult to detect the cause of the increased risk of death in children. Genetic therapy, which utilizes the patient's own cells, is an attractive therapeutic option. Lately, hemoglobinopathy has been successfully treated with Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT), which is similar to many gene therapy techniques. The efficiency of gene transfer is best with viral vectors, as they have evolved over millions of years to be able to easily enter cells. Most viral vectors in preclinical studies and clinical trials of Retroviridae, family viruses that can permanently integrate into the cellular genome. Advances in Induced Pluripotent Stem Cells (iPSC) and gene editing technology have offered promising opportunities to correct genetic deficiencies by using autologous somatic cells. Promising new technologies such as induced pluripotent stem cells and genome editing can lead to a new era in the field of gene therapy.

Keywords: genetic therapy, hemoglobinopathy, pluripotent

Korespondensi: Christopher A. Manukiley | Jln. Griya Fantasi IID/14 WHP, Bandar Lampung | HP 081273274052 e-mail: christ_lexy@yahoo.com

Pendahuluan

Anemia adalah keadaan dimana darah memiliki sel darah merah yang kurang dari normal atau kurangnya kandungan hemoglobin.¹ Menurut WHO, anemia adalah suatu kondisi dimana jumlah sel darah merah atau kapasitas oksigen tidak mencukupi untuk memenuhi kebutuhan fisiologis, yang bervariasi menurut umur, jenis kelamin, ketinggian, merokok, dan status kehamilan.²

Prevalensi anemia pada balita di Indonesia mengalami peningkatan pada tahun 2013 menjadi 28,1% berdasarkan hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas).³ Thalassemia dan hemoglobinopati merupakan penyakit kelainan gen tunggal (*single gene disorders*) terbanyak jenis dan frekuensinya di dunia. Penyebaran

penyakit ini mulai dari Mediterania, Timur Tengah, Anak Benua (*sub-continent*) India dan Burma, serta di daerah sepanjang garis antara Cina bagian selatan, Thailand, semenanjung Malaysia, kepulauan Pasifik dan Indonesia.⁴ Di Indonesia, *thalassemia* merupakan kelainan genetik yang paling banyak ditemukan. Angka pembawa sifat *thalassemia* adalah 3-5%, bahkan di beberapa daerah mencapai 10%, sedangkan angka pembawa sifat HbE berkisar antara 1,5-36%. Data Pusat *Thalassaemia*, Departemen Ilmu Kesehatan Anak, FKUI-RSCM, mencatat usia tertua pasien mencapai 40 tahun dan bisa berkeluarga serta memiliki keturunan. Jumlah pasien yang terdaftar di Pusat *Thalassaemia*, Departemen Ilmu Kesehatan Anak, FKUI-RSCM,

sampai dengan bulan Agustus 2009 mencapai 1.494 pasien dengan rentang usia terbanyak antara 11-14 tahun. Jumlah pasien baru terus meningkat setiap tahunnya mencapai 100 orang/tahun.

Tatalaksana *thalassemia* mayor adalah transfusi sel darah merah secara reguler untuk menjaga kadar Hb tetap > 9 g/dl, diiringi dengan terapi kelasi besi intensif parenteral menggunakan *deferoxamine*. Tindakan splenektomi perlu dipertimbangkan bila kebutuhan transfusi meningkat melewati batas yang diharapkan. Pasien *thalassemia* juga memerlukan suplemen asam folat yang dibutuhkan untuk eritropoiesis, imunisasi terhadap infeksi Pneumokokus dan *Hemophilus influenzae B*, pemberian penisilin untuk profilaksis dan vaksinasi hepatitis B. Intervensi terhadap defisiensi endokrin akibat penumpukan zat besi dan komplikasi lainnya diintervensi tergantung kasus.⁵ Transplantasi sumsum tulang bersifat kuratif, namun terbatas pada pasien dengan donor yang tepat.

Terapi genetika, yang memanfaatkan sel pasien sendiri, merupakan pilihan terapeutik yang menarik. Sejumlah terapi dalam saat ini sedang dalam uji klinis atau dalam pengembangan, termasuk terapi yang menggunakan penggantian gen dengan menggunakan lentivirus dan teknik pengeditan gen terbaru. Selain itu, sedang dikembangkan metode yang mungkin dapat memperluas penggunaan terapi gen kepada mereka yang memiliki akses perawatan medis yang buruk, sehingga berpotensi menurunkan beban penyakit secara signifikan.⁶

Isi

Istilah talasemia berasal dari kata Yunani yaitu *Thalassa* (laut) dan *Haema* (darah) yang mengacu pada adanya gangguan sintesis dari rantai globin (rantai α dan rantai β) yang merupakan subunit dari hemoglobin Hb A ($\alpha_2\beta_2$). Gen untuk sintesis rantai globin terletak di kromosom 11 (β) dan 16 (α). Sindrom *Thalasemia* diklasifikasikan berdasarkan adanya gangguan dari rantai globin, α atau β . *Thalasemia* adalah kelainan hereditas yang ditandai dengan tidak adekuatnya sintesis dari satu atau lebih rantai dari globin. Kelainan hemoglobin dapat ditemukan pada keadaan:⁷

1. Kelainan pada struktural molekul pada hemoglobin. Subunit yang terkena biasanya pada alpha (α) atau beta (β)

yang disebut mutasi. Terkadang perubahan pada satu asam amino dapat mengganggu secara drastis pada molekul hemoglobin dan membuat suatu kelainan seperti *sickle hemoglobin*.

2. Berkurangnya produksi 1 dari 2 subunit dari molekul hemoglobin. Hal ini disebut talasemia, dimana ketidakseimbangan dari rantai hemoglobin merusak dan menghancurkan sel darah merah sehingga terjadi anemia.
3. Kelainan pada asosiasi dari subunit normal. Pada keadaan kurangnya salah satu subunit hemoglobin, subunit lainnya yang berlebihan akan berikatan satu sama lain dan membuat rantai hemoglobin menjadi tidak berfungsi dan tidak mampu membawa oksigen.

Penderita pertama datang dengan keluhan anemia/pucat, tidak nafsu makan dan perut membesar. Keluhan umumnya muncul pada usia 6 bulan, kemudian dilakukan pemeriksaan fisis yang meliputi bentuk muka mongoloid (*facies Cooley*), ikterus, gangguan pertumbuhan, splenomegali dan hepatomegali. Pemeriksaan penunjang laboratorium yang dilakukan meliputi : Hb bisa sampai 2-3 g%, gambaran morfologi eritrosit ditemukan mikrositik hipokromik, sel target, anisositosis berat dengan makroovalositosis, mikrosferosit, polikromasi, *basophilic stippling*, benda *Howell-Jolly*, poikilositosis dan sel target. Pemeriksaan khusus juga diperlukan untuk menegakkan diagnosis meliputi : Hb F meningkat 20%-90%, elektroforesis Hb.⁸

Penderita *thalassemia* sampai saat ini belum ada obat yang dapat menyembuhkan secara total. Pengobatan yang dilakukan meliputi pengobatan terhadap penyakit dan komplikasinya. Pengobatan terhadap penyakit dengan cara tranfusi darah, splenektomi, induksi sintesa rantai globin, transplantasi sumsum tulang dan terapi gen. Pengobatan komplikasi meliputi mencegah kelebihan dan penimbunan besi, pemberian kalsium, asam folat, imunisasi. Pemberian vitamin C 100-250 mg/hari untuk meningkatkan ekskresi besi dan hanya diberikan pada saat kelasi besi saja. Vitamin E 200-400 IU/hari untuk memperpanjang umur sel darah merah. Transfusi harus dilakukan seumur hidup secara rutin setiap bulannya.⁹

Hemoglobinopati adalah kelainan pada gen yang menghasilkan hemoglobin abnormal dan anemia. Hemoglobinopati, merupakan target utama terapi gen karena berbagai alasan. Tingginya prevalensi, morbiditas dan mortalitas yang signifikan, dan biaya perawatan medis yang tinggi menunjukkan bahwa terapi kuratif dapat sangat meningkatkan hasil pasien dan secara signifikan mengurangi biaya medis terkait. Karena etiologi genetiknya, *Hematopoietic Stem And Progenitor Cells (HSPCs)* yang dimodifikasi secara genetik dapat meneruskan genom yang telah termodifikasi ke sel anak-anak, termasuk prekursor RBC. Mengingat kemampuan memperbarui diri dari HSPC, pengobatan tunggal bersifat kuratif. Berkaitan dengan strategi pengeditan gen, banyak mutasi yang menyebabkan hemoglobinopati adalah mutasi titik tunggal, yang biasanya memungkinkan efisiensi koreksi gen lebih besar daripada mutasi yang lebih kompleks.

Akhir akhir ini, hemoglobinopati telah berhasil diobati dengan *Hematopoietic Stem Cell Transplant (HSCT)*, yang mirip dengan banyak teknik terapi gen; Membutuhkan *engraftment* dari *Hematopoietic Stem Cell (HSCs)* yang resopulasi jangka panjang. Seperti yang akan dijelaskan, terapi gen untuk hemoglobinopati dapat dibagi menjadi empat kategori umum (1) penambahan gen, (2) *knockdown* gen untuk memperbaiki fenotip β -globinopati, (3) pengeditan gen globin, dan (4) pengeditan elemen peraturan gen globin. Penelitian di lapangan telah berlangsung lama dalam dekade terakhir, kondisi mendasar yang harus dipenuhi untuk transfer gen yang aman dan efisien diringkaskan sebagai berikut.^{10,11}

- Transduksi yang sangat efisien dan stabil
- Penargetan HSC yang efektif
- Ekspresi transgene terkontrol (spesifik erythroid, stadium-restricted, elevated, position-independent, dan sustained over time)
- Tidak ada atau rendahnya toksisitas genomik
- Koreksi fenotipe pada model praklinis dan pada tikus transgenik

Banyak vektor virus dan nonviral telah diupayakan untuk transfer gen ke dalam sel. Vektor nonviral meliputi plasmid atau DNA telanjang yang membutuhkan sarana fisik seperti elektroporasi untuk masuk ke sel. Efisiensi transfer gen paling baik dengan vektor

virus, karena mereka telah berevolusi selama jutaan tahun untuk dapat dengan mudah memasuki sel. Selain itu, teknik fisik terlalu keras untuk sel rapuh seperti HSC. Meskipun nanopartikel yang dapat membawa bahan genetik dalam perancah fosfolipid merupakan situasi yang menjanjikan, masih banyak pekerjaan yang diperlukan untuk meningkatkan efisiensi dan spesifisitasnya.

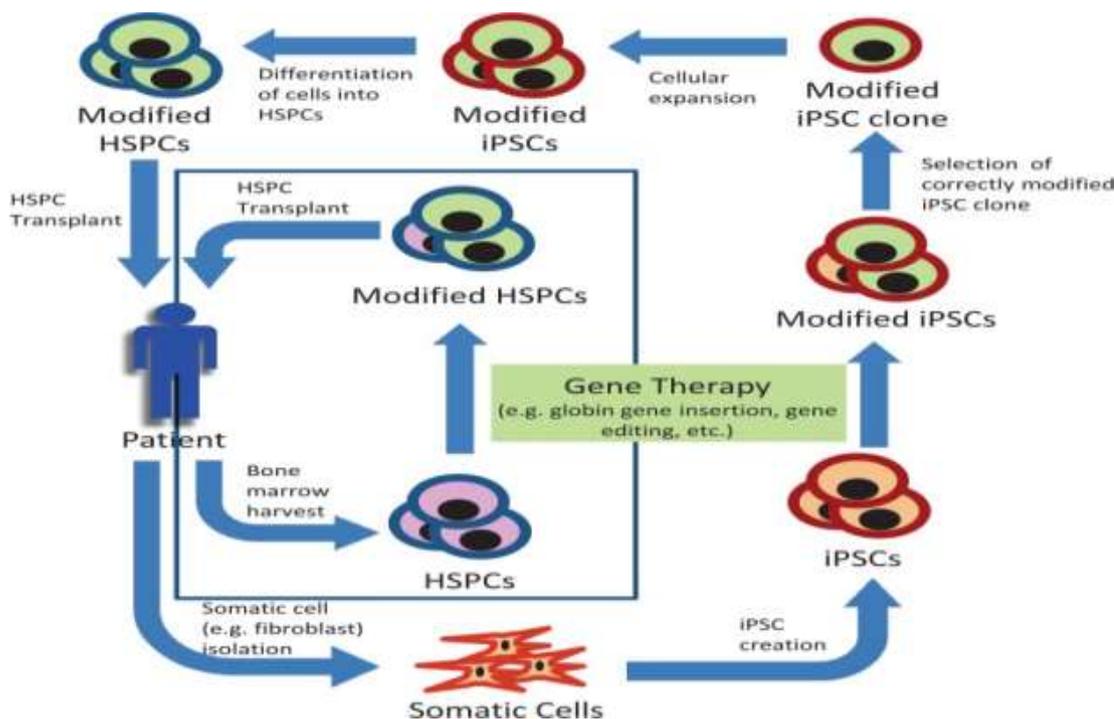
Sebagian besar vektor virus dalam studi praklinis dan uji klinis berasal dari Retroviridae, keluarga virus yang dapat secara permanen berintegrasi ke dalam genom seluler. Vektor virus lainnya termasuk adenovirus, virus herpes simpleks, vaccinia, virus cacar, dan virus terkait adeno, namun kekurangan peralatan integrasi. Virus dalam keluarga *Retroviridae* yang saat ini digunakan dalam uji klinis atau pengujian praklinis lanjutan mencakup vektor retrovirus (RV), LV, dan Foam virus (FV). Vektor virus ini adalah partikel virus rekayasa secara biomolekuler dimana elemen genetik yang dibutuhkan untuk patogenisitas dan replikasi dikeluarkan dan digantikan oleh transgen seluler yang diinginkan. Dengan menggunakan vektor virus ini, dokter dapat menggunakan mesin virus untuk memasuki sel dan menyelesaikan penyampaian dan integrasi permanen transgen yang menarik ke dalam genom manusia, sehingga memperbaiki cacat genetik yang mendasarinya.

Vektor RV adalah vektor pertama yang digunakan dalam uji klinis. Vektor memiliki LTR virus utuh, yang mengandung enhancer kuat di mana-mana di kedua ujungnya, dengan beberapa elemen kemas dan transgen yang menarik. Meskipun vektor LTR-utuh ini memediasi tingkat ekspresi transgen yang tinggi yang mengarah ke perbaikan klinis, keberhasilan dalam uji coba segera dirusak oleh masalah keamanan dari onkogenesis sisipan dari transaktivasi onkogen seluler oleh RV LTR. Proliferasi dan leukemia limfatik pada X-SCID dan WS dianggap berasal dari aktivasi penyisipan onkogen LMO₂. Dalam uji coba terapi gen untuk CGD, setelah keberhasilan awal, terjadi pembungkaman ekspresi transgen yang disebabkan oleh metilasi promotor virus, dan mielodisplasia dikembangkan dengan monosomi 7 sebagai Hasil dari aktivasi penyisipan situs integrasi virus ecotropik 1.¹²

Pada bulan Juni 2007, terapi gen pertama yang berhasil untuk hemoglobin dependen berbasis transfusi (Hb) $\beta_e\beta_0$ -talasemia dilakukan

dengan menggunakan vektor β -87_Q berbasis SIN LV. Efisiensi transduksi sekitar 30% dilaporkan. Pasien menerima pengkondisian busulfan mieloblatif diikuti dengan infus $3,9 \times 10^6$ CD34 + sel/kg HSC transduksi gen. Setelah engraftment, dia mengalami peningkatan bertahap dalam gen yang ditandai sel menjadi 10% sampai 20%, dan menjadi transfusi independen dengan hemoglobin stabil 8,5 sampai 9 g / dL selama 2 tahun setelah transfer gen. Meskipun fenotip thalassemia sebagian dikoreksi dengan terapi gen, ada masalah keamanan awal. Analisis lokasi

penyisipan menunjukkan ekspansi klon pada lokus AT-hook 2 (HMGA2) dengan mobilitas tinggi pada sel eritroid hingga 10% sampai 12%. Namun, kloning stabil dan, pada 5 tahun setelah terapi gen, hanya memberi kontribusi 2% sampai 3% dari sel nukleat yang bersirkulasi, dan pasien masih melakukan transfusi secara independen. Selain itu, ketidakstabilan elemen inti c73 inti tandem dicatat pada beberapa Sel. Sampai saat ini, 1 pasien lagi telah terdaftar dalam protokol ini, namun hasilnya tidak diketahui.¹³



Gambar 1. Terapi gen untuk gangguan hematopoietik.

Kemajuan dalam *Induced Pluripotent Stem Cells* (iPSC) dan teknologi pengeditan gen telah menawarkan kesempatan yang menjanjikan untuk memperbaiki cacat genetik dengan menggunakan sel somatik autologous. iPSC menawarkan potensi untuk persediaan sel induk tanpa henti untuk manipulasi gen dan strategi koreksi. iPSC dihasilkan dari sel somatik dewasa dengan pemrograman ulang gen yang dipaksakan untuk menginduksi potensial diferensiasi multilineage yang tertekan. Keuntungan utama iPSC dalam pengaturan terapi gen adalah bahwa ia menawarkan kemungkinan untuk menyaring dan memilih kloning ideal dengan integrasi yang aman dan profil ekspresi transgen yang tinggi.

Kelayakan pendekatan ini baru-baru ini ditunjukkan dengan menggunakan transfer gen

β -globin LV-mediated di iPSC dari pasien dengan talasemia β . Kemampuan untuk membuat jeda DNA yang berurutan untuk menjadi target (*benchmarked double-stranded DNA breaks / DSB*) dengan menggunakan pendekatan endonuklease yang diarahkan pada situs yang berbeda telah dieksploitasi oleh para peneliti untuk memperbaiki cacat pada gen target. ZFN, *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (TALENs), dan *Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeat* (CRISPR / Cas) endonucleases telah digunakan untuk membuat DSB spesifik lokasi. Setelah DSBs, jeda dalam DNA diperbaiki oleh 2 mekanisme: *Nonhomologous End Joining* (NHEJ) dan *Homology-Directed Repair* (HDR) / rekombinasi homolog. NHEJ memediasi penggabungan langsung DNA berakhir dalam DSB, yang menyebabkan insidensi penyisipan atau

penghapusan yang tinggi di tempat peristirahatan. Namun, di HDR, urutan homolog digunakan sebagai template untuk menghasilkan rangkaian DNA yang hilang pada titik impas. Ketika DSB yang diarahkan ke situs digabungkan dengan rekombinasi homolog yang difasilitasi dengan menggunakan elemen DNA perbaikan donor, frekuensi HDR dapat ditingkatkan secara signifikan. Sistem ZFN adalah yang pertama dari sistem ini yang dibuat, dan studi kelayakan yang dilakukan pada jalur iPSC manusia telah menunjukkan hasil awal yang menjanjikan.¹⁴

Terapi gen untuk gangguan hemoglobin telah membuat kemajuan besar, mulai dari penemuan awal elemen peraturan β -globin; Pengembangan LV, termasuk vektor HPV569 dan BB305 yang dijelaskan di sini; Transduksi efisien sel punca hematopoietik; bukti keberhasilan pada model tikus; Konversi pertama ke pasien dengan β -TM. Berhasil menerapkan strategi terapi gen untuk β -hemoglobinopati melibatkan pendekatan terpadu dalam rancangan, pembuatan, dan perancangan uji klinis, dan eksekusi.¹⁵

Simpulan

Terapi saat ini yang dilakukan tidak bersifat definitif melainkan memperbaiki kualitas hidup penderita. Berbagai penelitian pendekatan gen diharapkan menjadi terapi

definitif pada penderita talasemia. Pendekatan *induced pluripotent stem cell* diharapkan menjadi jalan keluar di kemudian hari pada penyakit hereditas ini.

Ringkasan

Hemoglobinopati adalah cacat genetik yang paling umum terjadi di seluruh dunia. Transplantasi sel induk hematopoietik, meskipun bersifat kuratif, dibatasi oleh ketersediaan donor yang sesuai. Modifikasi genetik HSC autologous dapat mengatasi masalah ketersediaan donor (setiap pasien adalah donor mereka sendiri) dan efek samping imunologis. Penentu yang unik untuk terapi gen pada hemoglobinopati adalah garis keturunan eritroid dan tingkat spesifik perkembangan ekspresi transgen yang spesifik dan pengkondisian penanaman genetika. Pengetahuan ilmiah tentang regulasi lokus gen globin dan peningkatan teknologi transfer gen telah menyebabkan pengembangan terapi gen aditif berbasis β - / γ -globin menjadi hasil klinis. Percobaan klinis dengan vektor lentivirus β - / γ -globin sekarang terbuka di banyak tempat dan kebebasan transfusi setelah terapi gen telah dilaporkan pada 1 pasien dengan talasemia β . Menjanjikan teknologi baru seperti *induced pluripotent stem cells* dan *genome editing* dapat mengantarkan era baru di bidang terapi gen.

Daftar Pustaka

1. National Heart Lung and Blood Institute. Anemia: Prevent, Treat, Control. NIH. Bethesda; 2011.
2. WHO. Anemia Prevention And Control. 2014. Available from: http://www.who.int/medical_devices/initiatives/anaemia_control/en/
3. Kemenkes RI. Laporan Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2013.
4. Weatherall D. The Thalassemias. Williams Hematology. Edisi Ke-6. Philadelphia: McGraw Hill; 2000.
5. Forget B. Hoffman Hematology Basic Principles and Practice. Edisi Ke-3. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000.
6. Goodman MA, Malik P. The potential of gene therapy approaches for the treatment of hemoglobinopathies: achievements and challenges. *Ther Adv Hematol*. 2016;7(5):3012–315.
7. Case SS, Price MA, Jordan CT, Yu XJ, Wang L, Bauer G, Dkk. Stable transduction of quiescent CD34+CD38– human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(6):2988–93.
8. Irawan H. Pendekatan diagnosis anemia pada anak. *Cermin Dunia Kedokt*. 2013;40(6):1-3.
9. Ruiz EF, Cervantes MA. Diagnostic approach to hemolytic anemias in the adult. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015;37(6):1-3.
10. Goodnough LT, Schrier SL. Evaluation and management of anemia in the elderly. *Am J Hematol*. 2014;89(1):88–96.
11. Lisowski L, Sadelain M. Locus control region elements HS1 and HS4 enhance the therapeutic efficacy of globin gene transfer in β -thalassemic mice. *Blood*. 2007;110(13):4175–8.
12. Stein S, Ott M, Schultze-Strasser S, Jauch A, Burwinkel B, Kinner A, Dkk. Genomic

- instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. Grez M Nat Med. 2010;16(2):198–204.
13. Payen E, Leboulch P. Advances in stem cell transplantation and gene therapy in the β -hemoglobinopathies. Hematol Am Soc Hematol Educ Program. 2012;1(1):276–83.
 14. Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, Dkk. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. Nature. 2005;435(1):646–51.
 15. Negre O, Eggimann AV, Beuzard Y, Ribeil JA, Bourget P, Borwornpinyo S, Dkk. Gene Therapy of the β -Hemoglobinopathies by Lentiviral Transfer of the β A(T87Q)-Globin Gene. Hum Gene Ther. 2016;27(2):148–65.