

# Kelebihan Rantai A pada Talasemia $\beta$

Ismawati\*

## ABSTRACT

Beta - thalassemia is an inherited human disorder which is characterized by a deficient production of hemoglobin  $\beta$  chains and an attendant accumulation of structurally normal  $\alpha$  chains. Oxidative damage induced by free globin chains has been implicated in the pathogenesis of the membrane abnormalities observed in  $\beta$  thalassemia. Morphologic, biochemical and metabolic changes of the erythrocyte membrane contribute to the premature destruction of thalassemic erythrocytes. This destruction might be ameliorated by increasing the intracellular proteolysis of the excess  $\alpha$  subunits. Invitro study shows degradation of globin  $\alpha$  chains in thalassemic reticulocyte is did by proteasome.

**Key words :** thalassemia,  $\alpha$  globin, oxidative denaturation, proteasome

Hemoglobin merupakan protein pengangkut oksigen pada sel darah merah. Hemoglobin (Hb) terdiri atas globin dan hem. Hemoglobin adalah protein tetramerik. Pada manusia terdapat 3 macam Hb normal, mulai yang terbanyak Hb A, Hb F (2 % dari Hb total), Hb A<sub>2</sub> (3 % dari Hb total). Hb A terdiri atas 2 rantai globin  $\alpha$  dan 2 rantai globin  $\beta$  ( $\alpha_2\beta_2$ ). Hb F terdiri dari 2 rantai globin  $\alpha$  dan 2 rantai globin  $\gamma$  ( $\alpha_2\gamma_2$ ). Hb A<sub>2</sub> terdiri dari 2 rantai globin  $\alpha$  dan 2 rantai globin  $\delta$  ( $\alpha_2\delta_2$ ).<sup>1,2</sup>

Talasemia merupakan kelainan genetik yang menyebabkan gangguan sintesis rantai globin  $\alpha$  atau  $\beta$ . Gangguan sintesis rantai  $\alpha$ , yang mengakibatkan produksi rantai  $\alpha$  berkurang atau tidak ada disebut talasemia  $\alpha$ . Gangguan sintesis rantai  $\beta$ , yang mengakibatkan produksi rantai  $\beta$  berkurang atau tidak ada disebut talasemia  $\beta$ <sup>1</sup>. Pada kelainan ini sintesis rantai globin  $\alpha$  dan  $\beta$  tak sebanding sehingga terjadi kelebihan salah satu rantai. Pada talasemia  $\alpha$ , terjadi kelebihan rantai globin  $\beta$ , sedangkan pada talasemia  $\beta$  terjadi kelebihan rantai globin  $\alpha$ . Rantai globin yang tidak berpasangan ini tidak stabil dan mudah mengalami oksidasi dan selanjutnya mengakibatkan perubahan struktur dan fungsi membran sel darah merah. Perubahan ini berperan pada destruksi prematur sel darah merah.<sup>3,4</sup>

Akibatnya, usia rata-rata sel darah merah memendek.

Usia sel darah merah yang memendek ini menyebabkan banyak penderita talasemia memerlukan transfusi secara teratur. Namun transfusi dapat menimbulkan efek samping berupa penumpukan besi dalam jaringan-jaringan yang mengakibatkan gangguan fungsi organ dan dapat berakibat fatal bila tidak disertai dengan pemberian kelator besi. Walaupun tindakan transplantasi sumsum tulang menjanjikan kesembuhan penyakit ini namun keberhasilannya hanya dapat diharapkan pada penderita yang mendapatkan donor sumsum tulang identik. Sedangkan penerapan terapi gen untuk mengoreksi kelainan genetik pada penyakit ini masih memerlukan waktu lama karena sulit untuk mengidentifikasi seluruh sekuens yang diperlukan untuk ekspresi gen yang stabil dan mengembangkan vektor yang efektif dan aman untuk mentransfer gen.<sup>5</sup>

Oleh karena patofisiologi talasemia pada tingkat sel dan secara klinis merupakan konsekuensi langsung dari ketidakseimbangan rantai globin maka peningkatan degradasi kelebihan rantai globin mungkin dapat memperpanjang usia sel darah merah pada talasemia. Penelitian in vitro memperlihatkan degradasi rantai globin  $\alpha$  pada retikulosit penderita talasemia  $\beta$  dilakukan oleh proteasom dan pemberian ubikuitin aldehid ternyata meningkatkan degradasi ini. Hal ini mungkin dapat dikembangkan menjadi pendekatan terapi talasemia.<sup>6</sup>

\* Penulis untuk korespondensi: Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran UNRI, e mail:ismawati@yahoo.com. Hp: 085217065890

Kelebihan rantai globin memegang peranan penting pada patofisiologi talasemia. Mengingat patofisiologi yang berbeda antara talasemia  $\alpha$  dan  $\beta$  maka pada makalah ini pembahasan dibatasi pada talasemia  $\beta$ . Pengetahuan tentang berbagai aspek dari kelebihan rantai globin ini dapat memberikan informasi untuk pengembangan terapi talasemia.

### Patologi Molekuler

Gen globin  $\beta$  terdapat pada kromosom 11, meliputi  $\pm 60.000$  basa nukleotida. Hampir 200 jenis mutasi telah diketahui pada talasemia  $\beta$ . Mutasinya kebanyakan berupa substitusi tetapi ada juga yang berupa delesi. Mutasi tersebut menyebabkan tidak disintesisnya rantai globin  $\beta$  (talasemia  $\beta^0$ ) atau berkurangnya sintesis rantai globin  $\beta$  (talasemia  $\beta^+$ ).<sup>5</sup> Talasemia  $\beta^+$  umumnya akibat defek pada pematangan mRNA atau promotor gen. Pada beberapa kasus, talasemia  $\beta^+$  terjadi akibat mutasi pada intron gen globin  $\beta$ . Talasemia  $\beta^0$  bisa disebabkan oleh beberapa hal, misal mutasi pada *nonsense* menyebabkan rantai globin  $\beta$  yang dihasilkan tidak lengkap. Hal ini mengakibatkan kelebihan rantai globin  $\alpha$  yang seharusnya berpasangan dengan rantai globin  $\beta$ .<sup>1</sup>

### Denaturasi Oksidatif Rantai Globin $\alpha$

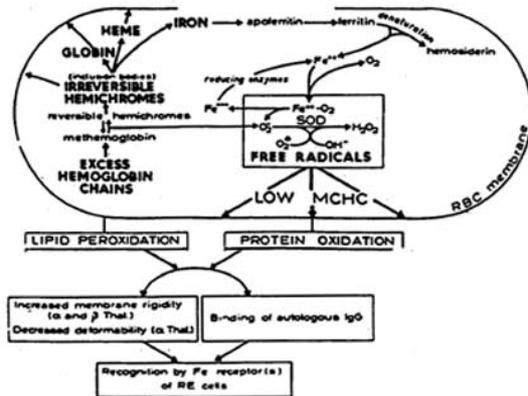
Radikal bebas adalah suatu atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan yaitu suatu elektron yang berada sendiri pada suatu orbital. Molekul radikal ditandai dengan titik ( $\cdot$ ) dan umumnya bersifat kurang stabil dibandingkan dengan molekul non radikal. Beberapa molekul yang termasuk radikal bebas adalah radikal hidroksil ( $\text{OH}^\cdot$ ), superoksida ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), nitrogen dioksida ( $\text{NO}_2^\cdot$ ), nitrit oksida ( $\text{NO}^\cdot$ ) dan triklorometil ( $\text{CCl}_3^\cdot$ ). Apabila molekul radikal dan non radikal bereaksi maka terjadilah reaksi radikal berantai. *Reactive oxygen species* (ROS) merupakan molekul radikal yang mengandung oksigen, seperti  $\text{OH}^\cdot$  dan  $\text{O}_2^{\cdot-}$  dan beberapa turunan oksigen yang bersifat non radikal namun bersifat reaktif seperti seperti  $\text{H}_2\text{O}_2$  dan ozon ( $\text{O}_3$ ).<sup>7</sup>

Pada talasemia  $\beta$ , rantai globin  $\alpha$  yang tidak berpasangan pada awalnya sebagian besar berupa rantai  $\alpha$  ( $\text{Hb-}\alpha$ ). Oleh karena struktur primer globin

$\alpha$  yang baru terbentuk normal maka dapat berikatan dengan hem. Tetapi rantai  $\alpha$  ini sangat mudah mengalami autooksidasi yaitu berubah menjadi bentuk feri (met hemoglobin) serta diikuti oleh penglepasan superoksida<sup>6</sup>. Meskipun proses ini juga terjadi pada eritrosit normal tetapi proses ini pada talasemia meningkat sehingga radikal yang dihasilkan lebih banyak. Methemoglobin akan mengalami destabilisasi menjadi hemikrom. Hemikrom merupakan derivat Hb feri yang ligan keenam hemnya adalah histidin distal (reversibel) atau residu asam amino lain dari globin (irreversibel). Pembentukan hemikrom bersifat spontan, hanya bergantung pada struktur methemoglobin.<sup>8</sup> Hemikrom ini dikenal sebagai badan inklusi atau *Heinz bodies*. Pada talasemia  $\beta$ , hemikrom cenderung untuk mengendap dan melekat dengan berbagai komponen membran sel darah merah melalui interaksi hidrofobik<sup>2,9</sup>. Badan inklusi dapat merusak fungsi membran secara kimia dan fisik. Substansi ini menurunkan deformabilitas sel sehingga terjadi destruksi prematur sel darah merah (Gambar 1).<sup>9</sup>

Hemikrom juga dapat berdisosiasi menjadi hem dan globin yang melekat pada membran sel darah merah. Hem dalam bentuk bebas dapat berinteraksi dengan lipid membran atau protein sitoskeleton membran seperti spektrin, aktin dan protein 4.1. Meskipun pengaruh langsung molekul hem terhadap kerusakan oksidatif masih belum jelas, tetapi besi yang dihasilkan dari pemecahan molekul ini memegang peranan utama pada oksidasi sel darah merah.<sup>2</sup>

Besi merupakan agen penyebab dihasilkannya ROS endogen yang dapat menimbulkan kerusakan oksidatif pada sel darah merah. Besi ternyata terdapat dalam jumlah besar pada eritrosit matang, retikulosit, normoblast penderita talasemia, baik berupa partikel bebas atau gumpalan feritin dan endapan hemosiderin. Disamping dalam sel, ternyata juga terdapat peningkatan kompleks besi yang terikat longgar pada protein plasma. Besi ini kemudian bereaksi dengan oksigen dalam eritrosit menimbulkan toksisitas oksigen. Besi mengkatalisis peroksidasi lipid dan protein melalui reaksi Fenton<sup>2</sup>.



Gambar 1. Skema rangkaian oksidatif pada talasemia<sup>2</sup>

## Pengaruh Oksidasi Terhadap Membran Sel Darah Merah

### 2.3.1. Perubahan Pada Lipid Membran

Banyak data menunjukkan bahwa terjadi peningkatan peroksidasi lipid pada sel darah merah talasemia. Peningkatan *Malonyldialdehyde* (MDA) pada sel darah merah talasemia dapat digunakan sebagai salah satu indikator peningkatan peroksidasi lipid, karena MDA merupakan hasil pemecahan sekunder peroksidasi lipid yang meningkat pada pemberian  $H_2O_2$ .<sup>2,7</sup> Selain itu, terdapat penurunan kadar asam lemak tak jenuh jamak dan fosfatidiletanolamin (FE). Kedua senyawa tersebut rentan terhadap peroksidasi dan penurunannya menunjukkan peningkatan peroksidasi<sup>2</sup>. Penurunan asam lemak tak jenuh jamak juga mengurangi fluiditas membran sehingga kelenturannya berkurang yang selanjutnya mengurangi deformabilitas membran. Pada talasemia ternyata juga terjadi perubahan distribusi fosfolipid membran yaitu fosfatidilkolin (FK) banyak ditemukan pada lapis dalam, sedangkan FE dan fosfatidilserin terdapat pada lapis luar membran.<sup>2,10</sup>

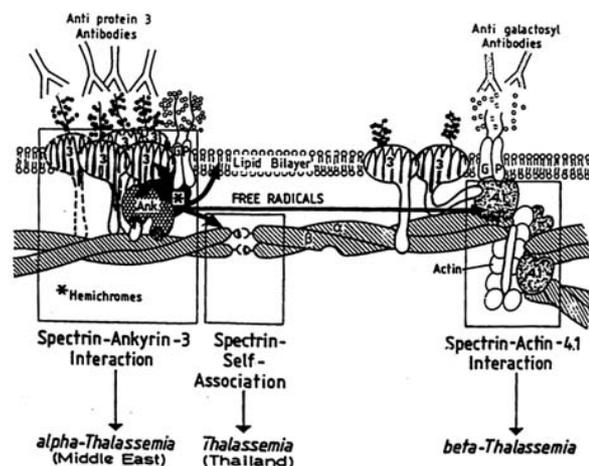
Peroksidasi lipid dapat menyebabkan polimerisasi komponen membran sehingga deformabilitas sel darah merah berkurang dan rigiditasnya meningkat. Penurunan deformabilitas dapat mengganggu lewatnya sel darah merah melalui sinusoid organ retikuloendotelial sehingga terperangkap di dalamnya dan kemudian dihancurkan.<sup>10</sup> Disamping itu, terjadinya perubahan asimetri fosfolipid merupakan faktor penting bagi

pengenalan sel darah merah oleh makrofag. Penelitian secara *in vitro* memperlihatkan bahwa sel darah merah dengan distribusi lipid abnormal mempunyai kecepatan difagositosis empat kali lebih cepat dari normal.<sup>2</sup>

## Perubahan Pada Protein Membran

Morfologi abnormal dan bentuk ireguler sel darah merah talasemia menunjukkan kemungkinan terjadinya kerusakan pada skeleton membran, karena skeleton merupakan faktor penting deformabilitas dan stabilitas sel darah merah. Apalagi terdapat bukti yang mendukung bahwa oksidasi sel darah merah dapat mempengaruhi struktur dan fungsi protein skeleton. Analisa sitoskeleton sel darah merah talasemia menunjukkan peningkatan globin yang melekat pada sitoskeleton, yaitu sampai 11,6 % dari total protein membran sel darah merah. Hasil yang sama dapat diperoleh jika sel darah merah dipaparkan pada beban oksidatif.<sup>2</sup>

Protein-protein sitoskeleton saling berinteraksi satu sama lain, dengan protein membran lain dan dengan lapisan dwilapis lipid (Gambar 2). Pada talasemia  $\beta$  terjadi defek pad interaksi protein sitoskeleton. Protein 4.1 berkurang kemampuannya untuk berikatan dengan spektrin (48% kontrol). Hal ini kemungkinan disebabkan terjadinya perubahan struktur protein 4.1 akibat oksidasi.<sup>2</sup>

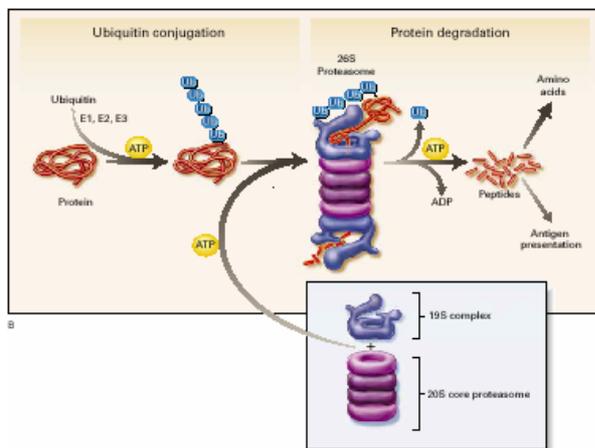


Gambar 2. Struktur membran sel darah merah pada talasemia<sup>2</sup>

## Degradasi Rantai $\alpha$

Penelitian invitro memperlihatkan bahwa degradasi rantai  $\alpha$  yang berlebih pada retikulosit talasemia membutuhkan ATP. Penelitian selanjutnya memperlihatkan bahwa degradasi  $\alpha$  tersebut tidak hanya membutuhkan ATP, tetapi juga ubiquitin. Hal ini menunjukkan bahwa rantai  $\alpha$  didegradasi melalui jalur proteasom.<sup>6</sup>

Proteasom terutama menggunakan ubiquitin sebagai petanda protein yang akan didegradasinya. Ubiquitin adalah suatu polipeptida yang terdiri atas 76 asam amino yang terdapat di seluruh eukariota. Protein yang akan didegradasi terutama adalah protein yang telah mengikat ubiquitin pada residu lisinnya. Ubiquitin selanjutnya ditambahkan hingga terbentuk poliubiquitin. Protein yang telah mengikat poliubiquitin ini akan dikenal dan didegradasi oleh proteasom. Ubiquitin selanjutnya akan dilepaskan sehingga dapat digunakan kembali. Proses pengikatan ubiquitin dan degradasi protein target membutuhkan ATP (Gambar 3).<sup>11,12</sup>



**Gambar 3. Jalur proteolisis ubiquitin-proteasom**

Protein yang akan didegradasi melalui jalur ubiquitin-proteasom pertama-tama dikonjugasikan dengan ubiquitin. Proses pengikatan ubiquitin pada residu lisin protein target melibatkan enzim E1, E2 dan E3. Proses ini berulang sehingga terbentuk rantai ubiquitin. Protein yang telah terkonjugasi dengan ubiquitin akan dikenal dan diikat oleh kompleks 19 s yang melepaskan rantai ubiquitin dan mengkatalis masuknya protein ke proteasom 20 s.<sup>12</sup>

Pengikatan ubiquitin merupakan sinyal utama untuk degradasi protein oleh proteasom. Stabilitas

suatu protein ditentukan oleh pengikatan ubiquitin pada protein tersebut. Pengikatan ubiquitin oleh protein merupakan suatu proses yang bertahap. Pertama ubiquitin diaktifkan oleh enzim  $E_1$  yang mengikat ubiquitin. Kemudian ubiquitin ditransfer kepada *ubiquitin conjugating enzyme* ( $E_2$ ). Transfer terakhir ubiquitin kepada protein target dikatalisis oleh enzim ligase ubiquitin ( $E_3$ ) yang menentukan selektifitas protein target.<sup>11</sup>

Proteasom eukariota merupakan kompleks protease dengan 3 aktivitas katalitik yang berbeda : *chymotryptic like* dengan aktivitas katalitik setelah residu hidrofobik, *tryptic like* dengan aktivitas katalitik setelah residu basa dan *postglutamyl* dengan aktivitas katalitik setelah residu asam. Pada mamalia terdapat 2 tambahan aktivitas katalitik yaitu *branched chain amino acid preferring activity* (BrAAP) dan *small neutral amino acid preferring activity* (SNAAP). Aktivitas *chymotryptic*, *tryptic* dan *postglutamyl* masing-masing terdapat pada subunit  $\beta_5$ ,  $\beta_2$  dan  $\beta_1$ . Aktivitas BrAAP terdapat pada subunit  $\beta_5$  dan  $\beta_1$ , sedangkan SNAAP terdapat pada  $\beta_2$ . Jadi 3 dari 7 subunit cincin  $\beta$  berfungsi sebagai katalis sedangkan 4 subunit yang lain belum diketahui fungsinya. Analisa kristalografi sinar x menunjukkan gugus amino terminal treonin pada subunit  $\beta$  berfungsi sebagai situs aktif.<sup>13</sup>

Penelitian pada otot jantung yang mengalami iskemia menunjukkan terjadinya penurunan aktivitas *chymotryptic like*, *postglutamyl* dan *trypsin like* proteasom. Penurunan aktifitas *trypsin like* diduga karena modifikasi oksidatif pada enzim tersebut, sedangkan penurunan aktivitas *chymotryptic like* dan *postglutamyl* diduga akibat adanya inhibitor enzim atau substrat.<sup>14</sup> Pada iskemia tersebut terjadi peningkatan produksi radikal bebas dan hal yang sama terjadi pada talasemia  $\beta$ , tetapi apakah pada talasemia juga terjadi penurunan aktifitas proteasom belum diketahui.

Jika rantai  $\alpha$  yang berlebih tidak didegradasi maka rantai yang tidak berpasangan dengan rantai  $\beta$  tersebut sangat mudah mengalami autooksidasi. Ternyata degradasi protein yang teroksidasi juga menggunakan jalur proteasom. Meskipun masih merupakan pertentangan apakah degradasi protein teroksidasi membutuhkan ubiquitin sebagai petanda protein target atau tidak. Jika menggunakan jalur proteasom 20 s maka degradasi protein teroksidasi

ini tidak membutuhkan ubiquitin. Sebaliknya jika menggunakan jalur proteasom 26 s maka dibutuhkan ubiquitin sebagai petanda protein target. Diduga bahwa protein yang teroksidasi ringan akan menghasilkan motif yang dikenali oleh ubiquitin ligase, akan didegradasi oleh proteasom 26 s dan menggunakan ubiquitin sebagai petanda protein target. Protein yang teroksidasi berat akan didegradasi oleh proteasom 20 s tanpa petanda ubiquitin karena oksidasi luas akan membuka lipatan protein.<sup>15</sup>

## PENUTUP

Patofisiologi talasemia pada tingkat sel dan secara klinis merupakan konsekuensi langsung dari ketidakseimbangan rantai globin maka peningkatan degradasi kelebihan rantai globin mungkin dapat memperpanjang usia sel darah merah pada talasemia. Hasil penelitian secara invitro memperlihatkan bahwa degradasi kelebihan rantai  $\alpha$  pada retikulosit talasemia  $\beta$  dilakukan oleh proteasom. Hal ini mungkin dapat dikembangkan menjadi pendekatan terapi talasemia. Meskipun demikian, banyak aspek peranan proteasom pada talasemia yang belum diketahui dan membutuhkan penelitian lebih lanjut.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Fucharoen, S, Winichagoon, P. Thalassaemia and abnormal hemoglobin. *International Journal of Hematology* vol 76. 2002: 83-89.
2. Shinar, E, Rachmilewitz, E. A. Oxidative denaturation of red blood cells in thalassaemia. *Seminars in Hematology* vol 27 no 1. 1990: 70-80.
3. Schrier, S. L. Thalassaemia : pathophysiology of red cell changes. *Annu. Rev. Med.* vol 45 (1994) : 211-218.
4. Olivieri, O, Franceschi, L.D, Capellini, M. D dkk. Oxidative damage and erythrocyte membrane transport abnormal in thalassaemias. *Blood* vol 84 no 1. 1994: 315-320.
5. Olivieri, N. F. The  $\beta$  thalassaemias. *The New England Journal of Medicine* vol 341 no 2. 1999: 99-109.
6. Schaeffer, J. R, Cohen, R. E. Ubiquitin aldehyde increases adenosine triphosphate dependent proteolysis of Hb  $\alpha$  subunits in  $\beta$  thalassaemic hemolysates. *Blood* vol 90 no 3. 1997: 1300-1308.
7. Halliwell B, Gutteridge, J. M. C. Free radicals in biology and medicines, 3<sup>rd</sup> edition. Clarendon press Oxford. 1999, 1-35.
8. Winterbourn, C. C. Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias ; the unstable hemoglobins. *Seminars in Hematology* vol 27 no 1. 1990: 41-50.
9. Winterbourn, C. C, Carrel, R. W. Studies of hemoglobin denaturation and heinz body formation in the unstable hemoglobins. *The Journal of Clinical Investigation* vol 54. 1974: 678-689.
10. Kuypers, F. A, Yuan, J, Lewis, R. A dkk. Membrane phospholipid asymmetry in thalassaemia. *Blood* vol 91 no 8. 1998: 3044-3051.
11. Cooper, G. M. *The cell: molecular approach*. Second edition. Washington ; Sinaver. 2000.305-308.
12. Mitch, W. E dan Goldberg, A. L. Mechanisms of muscle wasting. *The New England Journal of Medicine* vol 335 no 25. 1996: 1897-1905.
13. Lupas, A, Flanagan, J, M, Tamura, T dkk. Self compartmentalizing proteases. *Trens in Biochemistry* 22. 1997: 399-404.
14. Bulteau A. L, Lundberg, K. C, Humphries, K. M dkk. Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/ reperfusion. *The Journal of Biological Chemistry* vol 276 no 32. 2001: 30057-30063.
15. Iwai, K. An ubiquitin ligase recognizing a protein oxidized by iron : implications for the turnover of oxidatively damaged proteins. *J. Biochem.* Vol 34. 2003: 175-182.