

EDITORIAL KHUSUS 2024

VBio

Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

**BAHAN
PENELITIAN**
Jamur yang
menginvasi batu

**GENETIKA
TANAMAN**
Membuat urutan
genom terlihat

EKSPERIMEN
Pauline dan
para pelarian

BIOLOGI

DI MASA KITA

CRISPR-Cas

... Lebih dari
sekadar
pertahanan

Penyembuhan untuk Anemia Sel Sabit dan Talasemia- β

Bagaimana penyuntingan gen CRISPR menjanjikan penyembuhan permanen

MARCUS ZIEMANN | WOLFGANG R. HESS

Rekayasa genetika telah membuat banyak kemajuan dalam beberapa dekade terakhir. Dengan terapi gen yang kini telah disetujui untuk anemia sel sabit dan talasemia- β , terapi gen telah mengambil satu langkah lebih maju. Setelah hanya lima tahun pengujian, tim internasional di CRISPR Therapeutics telah berhasil mendapatkan otorisasi medis untuk kedua penyakit tersebut di Inggris, Amerika Serikat, Uni Eropa dan banyak negara lainnya.

Fenomena anemia sel sabit (juga dikenal sebagai penyakit sel sabit) dan dasar genetiknya mungkin merupakan contoh pertama yang ditemukan ketika berurusan dengan penyakit genetik. Hal ini disebabkan karena sebagian termasuk penyakit yang relatif mudah dijelaskan pada tingkat molekuler, dan sebagian lagi karena pembawa sifat tersebut menunjukkan peningkatan resistensi terhadap malaria dan oleh karena itu penyakit ini juga dapat mewakili keuntungan evolusioner di daerah-daerah dengan beban malaria yang tinggi. Banyak aspek genetik yang dapat dijelaskan dan dipahami berdasarkan pola penyakit ini. Pada waktu yang sama, malaria juga merupakan penyakit yang paling banyak didasari oleh mutasi gen tunggal dengan lebih dari 7,7 juta orang yang terkena dampaknya di seluruh dunia [1, 2].

Oleh karena itu, tidak mengherankan jika anemia sel sabit kini juga menjadi target terapi gen berbasis CRISPR yang pertama kali disetujui [1]. Pada bulan November 2023, Inggris menerima terapi baru ini [3], diikuti oleh Amerika Serikat [4] dan persetujuan bersyarat dari European Medicines Agency (EMA) di Uni Eropa [5]. Tetapi, terapi seperti apakah itu?

Gambaran klinis dari anemia sel sabit

Berbagai jenis penyakit sel sabit telah diketahui; namun, penyebab paling umum adalah mutasi titik pada gen untuk protein- β hemoglobin (E6V) [1, 6]. Karena mutasi ini, hemoglobin S (HbS) yang tidak lazim dapat berpolimerisasi ketika oksigen dilepaskan, menyebabkan sel darah merah berubah bentuk dan membentuk bentuk sabit yang khas. Bentuk sabit ini dapat menyebabkan oklusi pembuluh darah, yang mengakibatkan kurangnya pasokan oksigen ke jaringan, kerusakan permanen, dan rasa sakit yang parah [6]. Harapan hidup mereka yang terkena dampaknya seringkali hanya sekitar 50 tahun [7].

Hemoglobin adalah protein tetramerik dalam sel darah merah dan diperlukan untuk mengangkut oksigen ke seluruh tubuh. Strukturnya terdiri dari dua rantai- α (α_2) dan sepasang rantai protein. Pada orang dewasa, protein ini terutama adalah HbA ($\alpha_2\beta_2$) [1]. Namun, pada janin dan bayi baru lahir, terutama hemoglobin janin

RINGKASAN

- Anemia sel sabit disebabkan oleh mutasi titik pada hemoglobin - β (gen)
- Hingga saat ini, penyembuhannya hanya mungkin dilakukan pada kasus-kasus yang jarang terjadi.
- Dengan bantuan CRISPR-Cas, pemrograman ulang gen hemoglobin F janin pada pasien sel sabit berhasil dilakukan untuk pertama kalinya.
- Sebagai hasilnya, gejala penyakit ini berkurang atau hilang sepenuhnya.
- Terapi ini telah disahkan di Amerika Serikat dan Inggris.

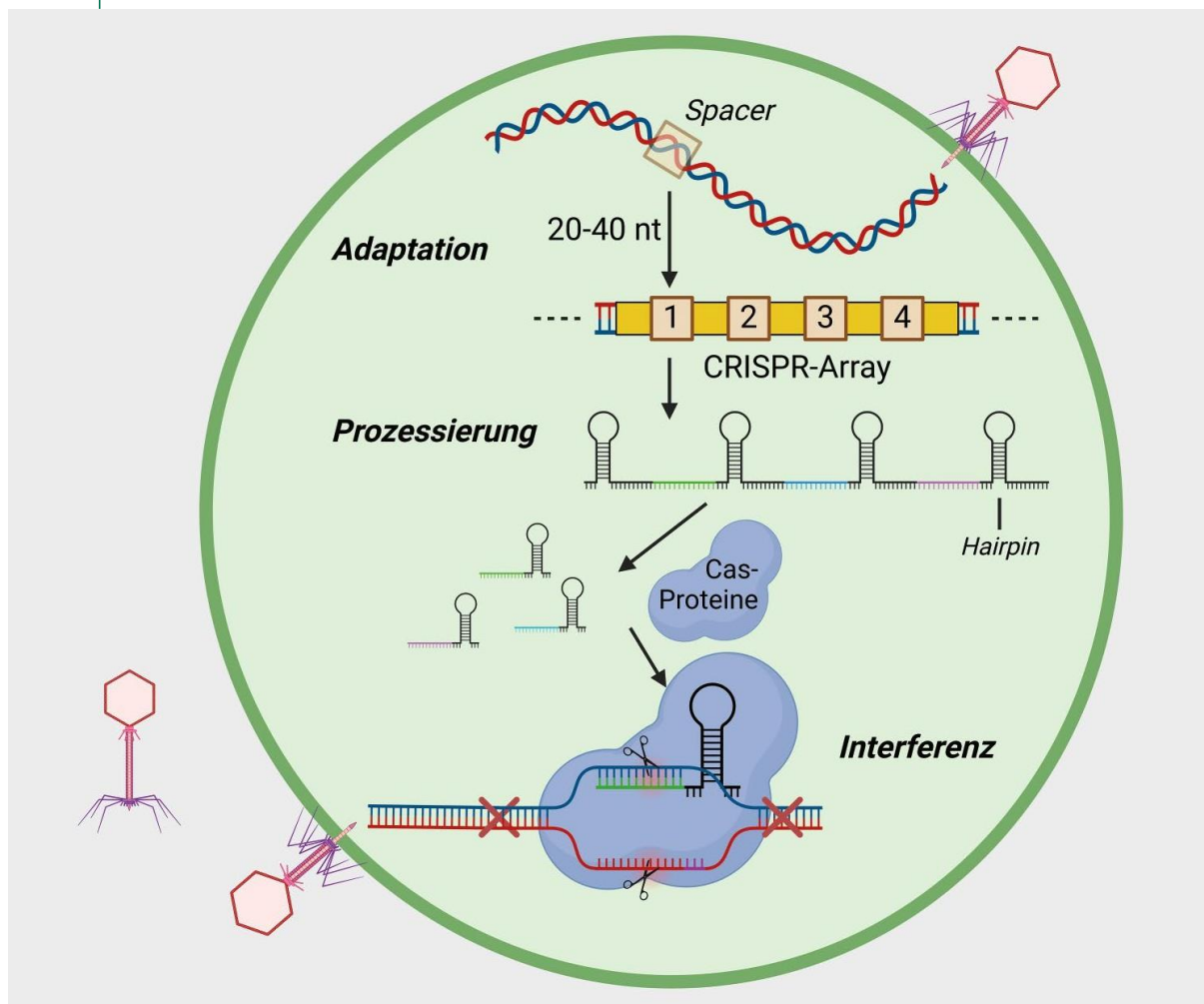
HbF ($\alpha_2\gamma_2$), yang secara bertahap digantikan oleh HbA dalam beberapa bulan pertama kehidupan. Alasan perubahan ini adalah karena HbF memiliki afinitas oksigen yang lebih tinggi sehingga memungkinkan janin menyerap oksigen dengan baik [8]. Mutasi sel sabit hanya ada pada rantai- β , Inilah sebabnya mengapa penyakit ini hanya memengaruhi HbA (juga dikenal sebagai HbS dalam kasus mutasi) dan oleh karena itu hanya bermanifestasi pada anak-anak berusia sekitar 3 bulan [1]. Namun, ada juga kasus-kasus yang diketahui di mana HbF diproduksi dalam jumlah besar oleh orang dewasa, yang secara signifikan mengurangi efek anemia sel sabit [9].

Ketika mutasi HbS terjadi, harus dibedakan antara gambaran klinis heterozigot dan homozigot. Orang yang hanya memiliki satu alel hemoglobin yang bermutasi (β^S) membentuk sel sabit yang jauh lebih sedikit, karena selain

HbS ($\alpha_2\beta^S_2$) dan HbA ($\alpha_2\beta_2$) terbentuk, tidak berpolimerisasi dan dengan demikian menghalangi pembentukan sel sabit [6, 10].

Gambaran klinis yang terkait adalah Talasemia- β , di mana terdapat terlalu sedikit atau hampir tidak ada hemoglobin- β yang diproduksi [11]. Pasien tidak membentuk sel sabit, tetapi juga menderita anemia yang terus-menerus dan dengan demikian mengalami gangguan pertumbuhan dan sistem kekebalan tubuh yang lemah. Pengobatan yang biasa dilakukan untuk Talasemia- β dan anemia sel sabit adalah transfusi darah secara teratur atau transplantasi sumsum tulang [11]. Pengobatan yang terakhir ini dapat memberikan kesembuhan permanen, tetapi donor yang cocok tidak dapat ditemukan untuk setiap pasien. Di sinilah CRISPR berperan.

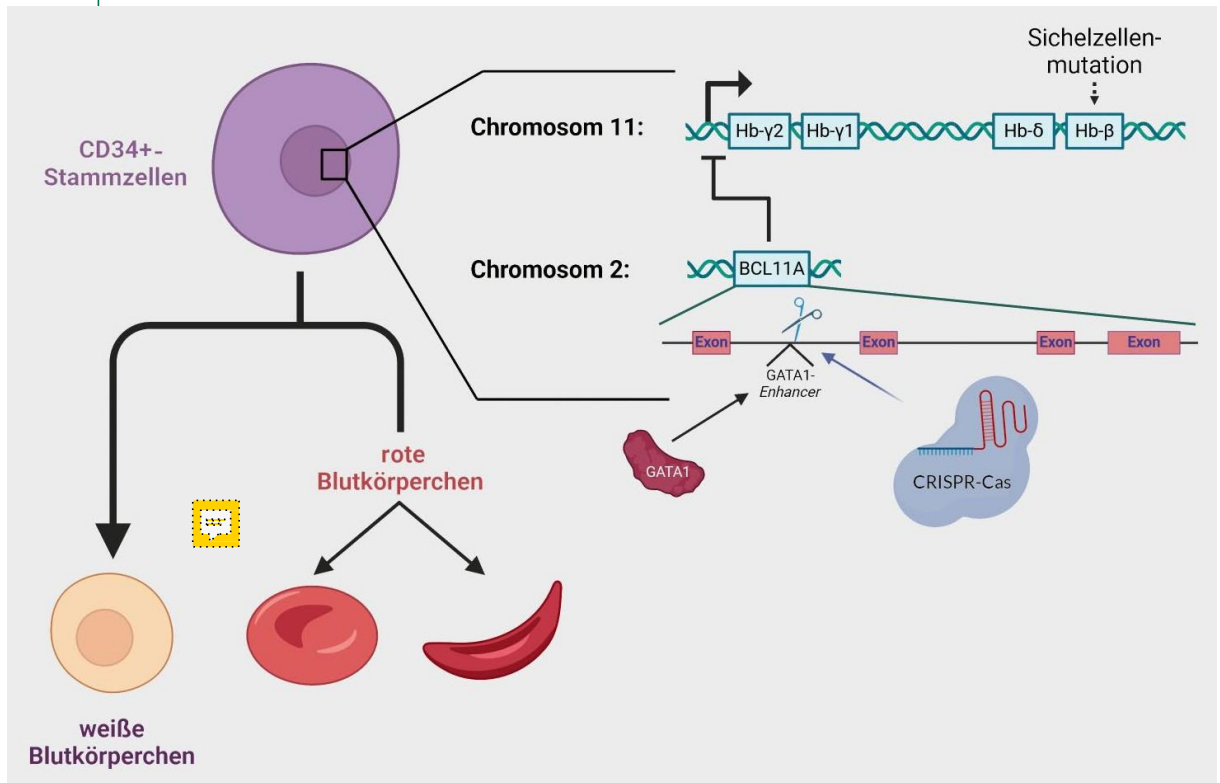
ABB. 1 | SISTEM CRISPR-CAS DALAM SEL BAKTERI



Bakteriofag menginfeksi sel dan sistem CRISPR-Cas dapat memasukkan sebagian kecil (spacer) genom fag ke dalam larik CRISPR (adaptasi). Larik ini kemudian dapat ditranskripsi dan diproses menjadi RNA pendek dengan struktur penjepitan yang khas (pemrosesan). Enzim tertentu mengenali ini dan memotong fragmen RNA menjadi segmen pengulangan yang lebih pendek, yang kemudian membentuk kompleks CRISPR-Cas. Jika terjadi infeksi fag baru, kompleks ini kemudian dapat mengenali area yang cocok dengan spacer dan menghancurkan DNA fag (gangguan).

Gambar dibuat dengan BioRender.com.

ABB. 2 | PENGATURAN HEMOGLOBIN DALAM SEL CD34+



Sel punca CD34+ berkembang menjadi berbagai sel darah putih dan sel darah merah. Ketika berkembang menjadi sel darah merah, sel induk ini menghasilkan hemoglobin. Gen hemoglobin terutama terletak pada kromosom 11. Pembentukan hemoglobin janin ($\alpha_2\gamma_2$) membutuhkan produksi hemoglobin- γ (Hb γ). Ekspresinya dihentikan setelah periode neonatal pada manusia oleh BCL11A. Gen ini dikendalikan oleh regulator universal GATA1. GATA1 mengaktifkan gen *bcl11A* dengan mengikat daerah penambah di antara dua ekson di dalam gen *bcl11A*. Wilayah penambah ini adalah antarmuka terapi Casgevy. Gambar dibuat dengan BioRender.com.

Penyuntingan gen dengan sistem CRISPR-Cas9

Terobosan besar telah dicapai dengan sistem CRISPR-Cas9. Sistem CRISPR-Cas sebenarnya membentuk mekanisme yang ditemukan pada bakteri dan archaea untuk pertahanan terhadap bakteriofag dan virus. Sistem ini bekerja dalam tiga langkah: Integrasi, pemrosesan, dan interaksi [12]. Langkah pertama terjadi setelah sel bersentuhan dengan bakteriofag atau virus dan selamat dari serangannya. Kemudian ia dapat mengintegrasikan fragmen yang lebih kecil dari DNA antagonis, biasanya sepanjang 20 hingga 40 nukleotida, ke dalam genomnya sendiri. Langkah ini saja sudah spektakuler: bakteri membangun memori genetik untuk “mengingat” infeksi sebelumnya di kemudian hari. Fragmen-fragmen pendek ini (disebut spacer) disimpan dalam segmen-segmen, di mana mereka dipisahkan oleh pengulangan palindromik yang pendek (Gambar 1). Susunan CRISPR ini (pengulangan palindromik pendek yang dikelompokkan secara teratur dan berselang-seling) memberi nama pada sistem ini dan diekspresikan serta diedit pada langkah kedua dalam bentuk RNA. Elemen pengulangan membentuk struktur penjepitan yang khas karena

urutan palindromiknya, yang dikenali oleh protein terkait CRISPR tertentu (Cas), yang kemudian membentuk apa yang disebut kompleks CRISPR-Cas, yang terdiri dari protein Cas dan fragmen RNA pendek, yang terdiri dari pengulangan yang dipotong dan urutan fag asli. Pada langkah ketiga, kompleks tersebut sekarang dapat mengenali infeksi fag dengan membandingkan fragmen RNA dengan DNA dalam sel melalui pasangan basa. Jika kompleks mengenali urutan ini, maka ia akan memotong DNA pada titik ini dan dengan demikian mencegah ancaman fag [12].

Struktur sistem ini berarti bahwa setiap urutan sekuen dapat ditentukan dalam DNA dengan memasukkan urutan yang sesuai ke dalam larik CRISPR. Sistem ini dapat diprogram ulang secara lebih langsung jika mengandung satu sekuens untuk pencarian target, ini disebut sebagai RNA pemandu tunggal [1]. Ada banyak area aplikasi untuk sistem CRISPR-Cas yang diprogram ulang ini, tetapi mungkin yang paling menarik adalah modifikasi materi genetik, yang dikenal sebagai penyuntingan genom. Untuk tujuan ini, sistem diberi gen atau

sekuens, yang dipotong. Celah yang dihasilkan pada awalnya diperbesar oleh peralatan perbaikan DNA dari sel, tetapi kemudian bagian DNA yang berdekatan bergabung kembali [13]. Jika sel juga menawarkan fragmen DNA pengubah yang sesuai, fragmen ini dapat disisipkan ke dalam area pemotongan. Untuk tujuan ini, fragmen akan disisipkan di antara dua daerah DNA yang sesuai dengan daerah di sekitar lokasi pemotongan [13]. Sistem perbaikan mengenali kemiripan dan menyisipkan fragmen tersebut di tempat pemotongan asli [13].

Sistem CRISPR-Cas terdapat banyak pada bakteri dan archaea, tetapi ini bukanlah sistem yang universal. Hingga saat ini, enam jenis dengan lebih dari 33 subkategori telah diketahui, yang juga dapat menjalankan fungsi alternatif seperti pertahanan plasmid atau degradasi RNA [12]. Sistem yang paling banyak diteliti adalah tipe II, karena kompleks CRISPR-Cas hanya terdiri dari satu protein (Cas9). Sistem ini juga telah digunakan untuk terapi gen sel sabit.

Terapi gen Casgevy untuk pengobatan anemia sel sabit dan talasemia- β

Terapi gen Casgevy (kadang-kadang juga dikenal sebagai Exa-cel) telah digunakan selama lima tahun terakhir untuk mengobati anemia sel sabit dan Talasemia- β dan disetujui untuk pasien sejak usia dua belas tahun [3]. Sel induk sel darah merah (CD34+) diangkat dan dimodifikasi di luar tubuh menggunakan pengeditan genom yang diinduksi CRISPR-Cas9 [1]. Sel punca CD34+ yang tersisa di dalam tubuh pasien ditekan dengan obat dan kemudian sel yang telah dimodifikasi dikembalikan ke pasien. Perawatan CRISPR di luar tubuh memastikan bahwa tidak ada sel lain yang terpengaruh oleh perubahan tersebut. Materi genetik dalam garis keturunan pasien tidak terpengaruh; oleh karena itu, pengobatan ini hanya memengaruhi pasien itu sendiri dan bukan keturunannya yang potensial.

Namun, prosedur terapi Casgevy tidak seperti yang diasumsikan orang mengubah gen hemoglobin- β yang bermutasi, melainkan menstabilkan pasien dengan mengaktifkan hemoglobin janin (HbF) [1]. Telah diketahui sejak lama bahwa ekspresi HbF pada pasien sel sabit setelah masa bayi menyebabkan penekanan pembentukan sel sabit dan beberapa obat yang telah disetujui telah memanfaatkan fakta ini [9]. Untuk mempertahankan efek ini dalam jangka panjang, terapi CRISPR mengintervensi regulator BCL11A, yang bertanggung jawab atas represi hemoglobin- γ dan oleh karena itu juga HbF (Gambar 2). Secara lebih rinci, wilayah pengaturan, penambah GATA1, yang terletak di luar bingkai pembacaan bcl11A, terganggu [1]. Wilayah penambah ini diperlukan untuk represor BCL11A diproduksi dalam sel punca eritrosit, tetapi tidak dalam sel darah lainnya [14]. Hal ini memiliki keuntungan bahwa tubuh mempertahankan regulator ini dan hanya

gagal pada jenis sel ini. Represor yang hilang memungkinkan HbF diproduksi dan pembentukan sel sabit dapat dicegah.

Dalam penelitian, 75 pasien diobati dengan terapi ini. 44 pasien dengan Talasemia- β dan 31 dengan anemia sel sabit dan diamati dalam jangka waktu yang lebih lama (pada saat publikasi: antara 1 hingga 36 bulan) [15]. Tak satu pun dari pasien anemia sel sabit yang mengalami krisis oklusi pembuluh darah selama periode ini, yang sebelumnya terjadi rata-rata hampir empat kali dalam setahun, dan hanya dua dari pasien Talasemia- β yang masih membutuhkan transfusi darah setelahnya, meskipun jumlah transfusi yang dibutuhkan secara signifikan lebih rendah. Jumlah transfusi yang diperlukan jauh lebih rendah. Jumlah HbF yang relevan dengan kesehatan terdeteksi dalam darah semua pasien [15]. Ini berarti terapi berhasil pada semua pasien.

„Berapa biaya yang harus dikeluarkan?“

Pada awal tahun 2024, ada banyak pembicaraan di media tentang tingginya biaya perawatan ini. Perkiraan saat ini menempatkan biaya per perawatan sekitar 1,5 hingga 2 juta euro [3]. Sekilas, ini terdengar sangat mahal, perawatan yang tidak terjangkau oleh orang biasa. Namun, harus diingat bahwa perawatan konvensional juga tidak gratis. Sebuah penelitian menyimpulkan bahwa biaya pengobatan seumur hidup pasien anemia sel sabit mencapai sekitar 1,6 hingga 1,7 juta dolar AS (sekitar 1,5 juta euro) [7]. Ditambah lagi dengan masa rawat inap yang lama di rumah sakit, sistem kekebalan tubuh pasien yang lebih lemah, yang membuat mereka lebih rentan terhadap penyakit lain, sering tidak masuk kerja dalam waktu yang lama, dll. Di sisi lain, tentu saja, tidak boleh dilupakan bahwa potensi biaya di kemudian hari untuk terapi ini belum dapat diketahui. Misalnya, apakah jumlah HbF dapat dipertahankan dalam jangka waktu yang lebih lama atau apakah efek samping jangka panjang yang potensial masih terjadi. Juga harus dipertimbangkan bagaimana asuransi kesehatan dapat mengkompensasi biaya tambahan ini. Dengan mengingat hal ini, tentu saja harus disebutkan bahwa ini bukan hanya tantangan bagi Jerman. Anemia sel sabit dan Talasemia- β jauh lebih banyak ditemukan di Afrika, Mediterania timur dan India bagian selatan. Dalam jangka menengah, akan menjadi tugas untuk memungkinkan daerah-daerah ini melakukan perawatan secara lokal. Perkiraan keuangan yang jelas tentu tidak mudah pada saat ini, tetapi terapi ini tidak mustahil untuk dibiayai seperti yang terlihat pada pandangan pertama.

Tidak dapat dipungkiri bahwa terapi ini dapat membantu banyak orang, termasuk di Jerman, dan secara signifikan meningkatkan kualitas hidup dan umur mereka. Fakta bahwa kita baru berada di awal perkembangan medis yang revolusioner ini memungkinkan kita untuk menatap masa depan dengan optimisme.

Rangkuman

Anemia sel sabit dan talasemia- β adalah penyakit yang disebabkan oleh mutasi titik pada gen hemoglobin. Kedua penyakit ini secara signifikan memengaruhi kesehatan mereka yang terkena dampaknya dan tersebar luas di seluruh dunia. Dengan menggunakan teknologi CRISPR-Cas, gen hemoglobin F janin diaktifkan kembali dalam sel punca CD34+, sehingga bentuk hemoglobin ini dapat menggantikan varian β yang bermutasi. Sel-sel tersebut dipanen untuk prosedur ini dan kemudian dikembalikan kepada pasien sehingga garis keturunan pasien tidak terpengaruh. Semua pasien yang diobati menghasilkan jumlah hemoglobin F yang sehat dan menunjukkan gejala penyakit yang berkurang secara signifikan atau tidak ada sama sekali. Uni Eropa, Inggris dan Amerika Serikat telah mengesahkan terapi CRISPR-Cas yang pertama ini

Summary

Healing sickle cell anemia and β -thalassemia:

Sickle cell anemia and β -thalassemia are diseases caused by point mutations in the hemoglobin β gene. Both diseases significantly affect the health of patients and are widespread worldwide. Using CRISPR-Cas technology, the fetal hemoglobin F gene was reactivated in CD34+ stem cells, allowing this form of hemoglobin to replace the mutated β variant. The cells were harvested for this procedure and later returned to the patient so that the patient's germline was not affected. All treated patients produced a health-relevant amount of hemoglobin F and showed significantly reduced or no symptoms at all of the disease. The EU, the UK and the USA have already approved this first CRISPR-Cas therapy.

Kata Kunci

CRISPR-Cas, terapi gen, anemia sel sabit, Talasemia- β

Daftar Pustaka

- [1] H. Frangoul et al. (2021). CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *N Engl J Med* 384, 252-260.
- [2] A. M. Thomson et al. (2023). Global, regional, and national prevalence and mortality burden of sickle cell disease, 2000-2021: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Haematology* 10, e585-e599.
- [3] C. Sheridan (2024). The world's first CRISPR therapy is approved: who will receive it? *Nat Biotechnol* 42, 3-4.
- [4] S. Reardon (2023). FDA Approves First CRISPR Gene Editing Treatment for Sickle Cell Disease. *Scientific American*.
- [5] V. Simon. Erste Genshere-Therapie soll in der EU zugelassen werden. *tagesschau.de*, <https://www.tagesschau.de/wissen/forschung/crispr-eu-100.html>
- [6] R. E. Ware et al. (2017). Sickle cell disease. *The Lancet* 390, 311-323.
- [7] K. M. Johnson et al. (2023). Lifetime medical costs attributable to sickle cell disease among nonelderly individuals with commercial insurance. *Blood Advances* 7, 365-374.
- [8] E. Pritišanac et al. (2021). Fetal Hemoglobin and Tissue Oxygenation Measured With Near-Infrared Spectroscopy - A Systematic Qualitative Review. *Front. Pediatr.* 9, 710465
- [9] Akinsheye et al. (2011). Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood* 118, 19-27.
- [10] M. Suhail (2024). Biophysical chemistry behind sickle cell anemia and the mechanism of voxelotor action. *Sci Rep* 14, 1861.
- [11] R. Origa (2017). β -Thalassemia. *Genetics in Medicine* 19, 609-619.
- [12] K. S. Makarova et al. (2020). Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology* 18, 67-83.
- [13] J. Y. Wang, J. A. Doudna (2023). CRISPR technology: A decade of genome editing is only the beginning. *Science* 379, eadd8643.
- [14] D. E. Bauer et al. (2013). An Erythroid Enhancer of BCL11A Subject to Genetic Variation Determines Fetal Hemoglobin Level. *Science* 342, 253-257.
- [15] J. De La Fuente et al. (2023). Efficacy and safety of a single dose of exagamglogene autotemcel for transfusion-dependent β -thalassemia and severe sickle cell disease. *HemaSphere* 7, 2-3.

Ditulis oleh:



Marcus Ziemann belajar biologi di Universitas Marburg dari tahun 2012 hingga 2019. Dalam tesis sarjananya, ia berfokus pada asam amino alternatif selenocysteine dalam kelompok kerja Johann Heider. Tesis masternya berfokus pada pengenalan sistem CRISPR-Cas tipe IV di laboratorium Lennart Randau. Sejak tahun 2019, ia telah menyelesaikan program dokornya di Albert Ludwig University of Freiburg di Departemen Bioinformatika Eksperimental di kelompok penelitian Wolfgang R. Hess dan meneliti sistem CRISPR-Cas pada cyanobacteria.



Wolfgang R. Hess belajar biologi di Universitas Rostock dan Universitas Humboldt Berlin dari tahun 1982 hingga 1987. Universitas Humboldt Berlin. Setelah memperoleh gelar doktor (Dr. rer. nat.) pada tahun 1990 dan habilitasi di bidang genetika pada tahun 1999, serta masa penelitian di Friedrich Miescher Institute di Basel, di CNRS Institute di Roscoff, Prancis, dan di MIT (Massachusetts Institute of Technology), Amerika Serikat, beliau bergabung dengan perusahaan bioteknologi Amerika Serikat, New England Biolabs, pada tahun 2003. Hess telah menjadi Profesor Bioinformatika Eksperimental sejak tahun 2004 dan Profesor Genetika di Albert Ludwig University of Freiburg sejak tahun 2008.

Korespondensi:

Prof. Dr. Wolfgang R. Hess
Institut für Biologie 3
Genetik & Experimentelle Bioinformatik
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Schänzlestr. 1
79104 Freiburg
E-Mail: wolfgang.hess@biologie.uni-freiburg.de

Penerjemah dalam Bahasa Indonesia:

Anindya Kayla Eral, Stud. Med. merupakan Mahasiswa S1 Universitas Brawijaya Program Studi Kedokteran.

Kontak:

Malang, Jawa Timur
65141
Email: kaylaeral@student.ub.ac.id

Sumber Makalah:

Makalah ini awalnya diterbitkan dalam bahasa Jerman di *Biuz* Bd. 54 (2024), edisi khusus (<https://www.biuz.de/index.php/biuz/issue/view/486>)

Terjemahan dibantu oleh:

DeepL, Microsoft Word, dan KKBI (untuk mencari sinonim kata).

