

Analisis haplotip dikaitkan dengan mutasi pada thalassemia- β

Sunarto

Bagian/Unit Pelayanan Fungsional Ilmu Kesehatan Anak,
Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada/RSUP Dr. Sardjito, Yogyakarta

ABSTRACT

Sunarto – Analysis of haplotype associated with mutation in β -thalassemia.

β -thalassemia is mainly caused by point mutation of β -gene. There are more than 130 mutations, while only a little more than 20 haplotypes in β -gene. Many types of mutation are associated with one haplotype. On the other hand, one type of mutation may be associated with more than one chromosome haplotypes. The association of mutation and haplotype raises many questions. An analysis of haplotype has proved to be very useful to discover many aspects of thalassemia. The occurrence of certain mutation in a population might be predicted from the common haplotype of the population. Haplotype has been used to answer the question whether a certain mutation has multiple or single origin; for example the multiple origin of β^E -gene in Cambodian population and the single origin of codon 39(CAG \rightarrow TAG) are associated with nine different haplotypes in Sardinia. It is suggested that haplotype probably influences the manifestation of thalassemia resulting in thalassemia intermedia.

Key words: thalassemia – haplotype – point mutation – recombination – phenotype

(Berita Ilmu Kedokteran, Vol. 27, No. 3:165-71, September 1995)

PENGANTAR

Thalassemia disebabkan oleh kelainan pada gena yang menyandi sintesis globin. Dasar molekular dari thalassemia- β yang terutama disebabkan oleh mutasi noktah, telah banyak diketahui demikian pula haplotip dari *cluster* gena ϵ - β . Berbagai populasi mempunyai pola variasi mutan pada gena- β , baik mengenai jenis mutan maupun frekuensi masing-masing mutan. Pada populasi Cina paling sedikit terdapat 15 macam alel- β , India Asia 10 macam, kulit hitam 13 dan Mediterania 31. Pola haplotip dari *cluster* gena ϵ - β juga menunjukkan variasi pada berbagai populasi. Pada tiap kelompok etnik ada sekitar 10 jenis haplotip pada *cluster* gena ϵ - β normal, dan kebanyakan dari jenis haplotip umum itu terdapat pula pada kromosom thalassemia ϵ - β ¹.

Macam mutan yang telah ditemukan pada thalassemia- β lebih dari 130², sedangkan macam kerangka haplotip hanya sekitar 20. Beberapa mutan dapat terkait dengan satu haplotip tertentu, tetapi dapat pula mutan tertentu terkait dengan beberapa haplotip. Antara kerangka haplotip yang sering terdapat pada populasi tertentu tidak selalu berbanding langsung dengan mutan yang sering ditemukan pada populasi tersebut. Pada populasi Sardinia frekuensi haplotip -+++ ++ hanyalah 6% saja dari haplotip yang ada, tetapi 64% dari thalassemia- β di sana terkait dengan haplotip tersebut; di lain pihak haplotip +---- ++ merupakan 32% dari haplotip β^N , tetapi hanya 22% dari penderita thalassemia di sana mempunyai haplotip ini³. Berbeda dengan di Sardinia, pada populasi Sicilia haplotip -+++ ++ merupakan haplotip dari 21% β^N dan 30% β^{Thal} ⁴. Pada populasi India Asia haplotip +---- ++ terdapat pada 18,2% β^N dan 64% β^{Thal} , sedangkan

Sunarto, Department of Child Health, Faculty of Medicine, Gadjah Mada University, Yogyakarta.

pada populasi Cina angka tersebut adalah 31% β^N dan 34,4% β^{hal} . Sebaliknya +----++ merupakan haplotip dari β^N dan β^{Thal} berturut-turut 30,3% dan 7%, sedangkan pada populasi Cina Hong-kong persentase tersebut berturut-turut 27% dan 47%⁵.

Fakta tersebut di atas menimbulkan pertanyaan apakah antara terjadinya mutasi ada kaitan dengan haplotip, apakah setiap jenis mutan mempunyai asal-usul tunggal atautkah sebaliknya mempunyai asal usul multipel dan tak ada kaitan dengan haplotip, apakah mutan dan haplotip mempunyai peran terhadap timbulnya manifestasi thalassemia dan sebagainya.

Dalam makalah ini akan dibahas analisis haplotip cluster gena ϵ - β dalam kaitan dengan mutasi- β dan pengaruhnya terhadap manifestasi thalassemia.

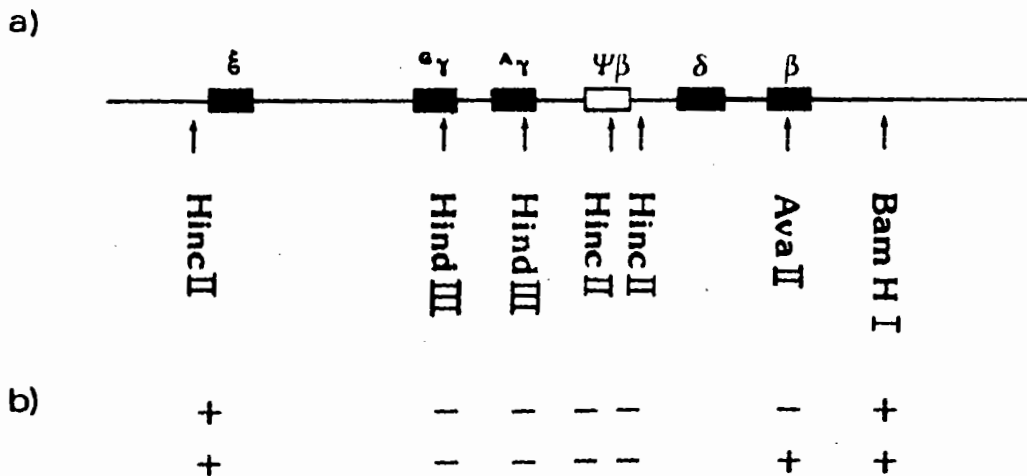
PEMBAHASAN

Haplotip gena- β

DNA antar gena maupun pada IVS (*intervening sequence*) dapat memperlihatkan variasi urutan nukleotid dari satu individu ke individu lain tanpa menyebabkan kelainan fenotip dari gena yang bersangkutan. Diperkirakan satu di antara 200 sampai 400 nukleotid DNA ekstrakromosomal pada dua individu menunjukkan perbedaan. Variabilitas urutan nukleotid menyebabkan variabilitas sisi restriksi (*restriction site*) dari endo-

nuklease restriktif dalam arti ada atau tidaknya sisi restriksi untuk endonuklease tertentu. Pola yang menunjukkan ada tidaknya sisi restriksi pada kromosom atau segmen kromosom tadi adalah khas untuk berbagai populasi, sehingga merupakan petanda (*marker*) atau sidik jari dari genom individu dalam populasi. Petanda semacam ini dinamakan haplotip (*haplotype*) kromosom⁶. Dengan adanya variabilitas itu maka ukuran fragmen DNA antar individu yang dihasilkan oleh endonuklease restriktif berbeda pula (*restriction fragment length polymorphism* = RFLP). Polimorfisme yang dihasilkan oleh berbagai endonuklease restriktif merupakan dasar penentuan haplotip kromosom. Pada orientasi haplotip cluster gena- β digunakan endonuklease restriktif. Hinc II dan Hind III yang mempunyai sisi kerja pada DNA 5' (sebelah hulu) dari gena- β (blok 5'); AvaII pada intron 2 gena- β dan BamHI hilir dari gena- β (blok 3')^{3,6}.

Meskipun terdapat banyak kombinasi dari polimorfisme sisi kerja endonuklease restriktif pada cluster gena- β , tetapi yang umum terdapat adalah haplotip 5' +----, -++++, -++++ pada berbagai populasi dan ----+ pada populasi Afrika^{1,7,8}. Haplotip 5' tersebut terangkai secara non random dengan blok 3' ++ (kerangka 1), +- (kerangka 2) atau -+ (kerangka 3 Asia). Asosiasi secara non random tadi memberi petunjuk adanya suatu titik panas (*hot spot*) untuk terjadinya rekombinasi atau *crossing-over* yang terletak di antara $\psi\beta$ dan β ^{3,8} (GAMBAR 1).



GAMBAR 1. - Bagan cluster gena ϵ - β : a) Lokus polimorfik yang digunakan untuk menentukan haplotip. b) Dua haplotip gena- β yang sering terdapat di Asia. + menunjukkan enzim memotong pada sisi itu, - menunjukkan bahwa enzim tidak memotong sisi itu⁸.

Mutasi pada gena-β

Mutasi pada gena-β dapat terjadi pada berbagai titik mulai dari sisi promotor (*promoter site*) sampai hilir dari sisi poliadenilasi (*polyadenylation site*)^{9,1}. Pada beberapa populasi macam mutan yang sering ditemukan hanya sedikit, misalnya pada populasi Melanesia 87% dari jenis mutan adalah IVS1nt5(G→C), pada Sardinia 95% adalah mutan nonsens kodon 39(CAG→TAG), pada Cypriot 80% adalah IVS1nt110^{3,8}. Pada populasi lain terdapat jenis mutan umum yang sangat beragam, misalnya di India, Cina dan Asia Tenggara terdapat lebih dari 5 jenis mutan umum. Mutasi IVS2nt654(C→T) yang banyak terdapat di Cina dan Asia Tenggara tidak ditemukan pada populasi India¹⁰. Sebaliknya delesi -619bp yang banyak terdapat pada populasi India tidak umum pada Cina. Pada Yahudi Kurdis ditemukan banyak mutasi pada -29 (kotak TATA) yang menimbulkan talasemia ringan.

Analisis haplotip dan mutasi-β

Haplotip bermanfaat untuk menerangkan asal-usul suatu mutan apakah berasal multipel (*multiple origin*) ataukah tunggal. Pada TABEL 1^{8,11,12,13} dapat dilihat keterkaitan mutan tertentu dengan haplotip yang sering dijumpai pada berbagai populasi.

Seringnya suatu mutan terkait dengan haplotip tertentu menimbulkan dugaan bahwa mutasi terjadi satu kali dan kemudian mutan itu menyebar bersama migrasi penduduk. Di Melanesia misalnya, IVS1nt5(G→C) merupakan 87% dari jenis mutan di sana dan berkaitan dengan haplotip +---- ++¹⁴. Haplotip +---- ++ merupakan haplotip umum ras Melayu. Kalau keterkaitan itu konsisten, maka dapat diramalkan bahwa IVS1nt5 (G→C) akan sering ditemukan pada populasi dengan latar belakang etnik Malayo-Polinesia seperti Malaysia, Indonesia dan Filipina⁸. Terbukti memang IVS1nt5(G→C) merupakan jenis

TABEL 1. – Kaitan mutan-β dengan haplotip pada berbagai etnik

Mutasi talasemia-β	Kerangka haplotip ^a						
	Thai	China	Burma	Malaysia	India	Melanesia	Indonesia
Kodon 41/42	+---- -+ +---- ++	+---- -+ +---- ++	+---- -+ +---- ++	+---- ++ +---- +-	+---- ++ +---- +-	tak ada	+---- ++b
Kodon 17	+---- -+	+---- -+	+---- -+	belum tahu	tak ada	tak ada	tak ada
IVS2 nt654	+---- ++	+---- ++	+---- ++	+---- +-	tak ada	tak ada	+---- ++ +---- -+
ATA nt-28	-+--- -+ +---- -+	-+--- -+	+---- -+	tak ada	tak ada	tak ada	tak ada
IVS1 nt5	sedikit	sedikit	+---- -+ -+--- -+ ^b -+--- -+ ^b	+---- -+ +---- ++	+---- -+ -+--- -+ + ^b	+---- ++	+---- -+ +---- ++
IVS1 nt1	sedikit	tak ada	+---- ++ -+--- ++ ^b -+--- + ^b	+---- ++	-+--- ++	tak ada	+---- ++
Delesi 619bp	tak ada	tak ada	tak ada	tak ada	+---- -+	tak ada	belum tahu
Kodon 8/9	tak ada	tak ada	tak ada	tak ada	+---- -+ -+--- ++ ^b -+--- ++ ^b	tak ada	belum tahu
Kodon 19	sedikit	tak ada	tak ada	-+--- +-	tak ada	tak ada	belum tahu

Catatan: a Hanya haplotip yang predominan dicantumkan. Haplotip DNA dan kerangka sesuai dengan Antonarakis⁸: HincII/ε, HindIII/δ, HindIII/α, HindIII/μ, AvalI/β, dan BamHI/2' β.

b Kerangka haplotip sedikit dijumpai

	5'	ϵ	$G\gamma$	$A\gamma$	$\psi\beta_1$	δ	β	3'	
		↑	↑	↑	↑ ↑	↑ ↑ ↑	↑		JUMLAH KROMOSOM
		1	2	3	4 5	6 7 8	9		
(a)	-		+	-	+	+	+	-	11
(b)	+		-	-	-	-	+	+	6
(c)	-		+	-	+	+	+	-	6
									TOTAL 23

GAMBAR 2. - Haplotip β^E pada populasi Kamboja (20) 1, 4 dan 5 sisi kerja HincII; 2 dan 3 sisi kerja HindIII; 6, 7, 8 dan 9 berturut-turut sisi kerja HinfI, HgiAI, AvaII dan BamHI

mutan terbanyak di Indonesia dan Malaysia^{8,12,15}

Berlawanan dengan di atas, keterkaitan suatu mutan dengan beberapa haplotip menimbulkan pertanyaan apakah asal-usul mutan itu multipel.

Di Subbenua India IVS1nt5(G->C) merupakan kira-kira 38% dari jenis mutan di sana¹⁰ dan terkait dengan haplotip -+++ -, berbeda dengan haplotip di Melanesia. Demikian pula halnya dengan IVS1nt5(G->C) dan kodon 41/42 (-CTTT), pada populasi India mutan tersebut terkait dengan haplotip yang berbeda dengan pada Cina^{8,16,17,18}. Terdapatnya suatu mutan pada dua atau lebih haplotip, seperti kodon 17(A->T) pada -+++ -+ dan -+++ -+ pada populasi Thailand¹⁹ atau kodon 41/42(-CTTT) pada haplotip ---- -, ----+ ++ pada populasi Cina serta Thai dan dengan ----+ +- serta +++++ +- pada populasi India Asia dipandang oleh para ahli mempunyai 3 kemungkinan: i) mutan tersebut mempunyai asal usul multipel; ii) mula-mula terjadi mutasi pada satu haplotip umum, kemudian terjadi rekombinasi dengan haplotip lain; iii) terjadi melalui konversi gena.

Berdasarkan keterkaitan HbE dengan haplotip (a), (b) dan (c) pada populasi Kamboja (GAMBAR 2), Antonarakis et al.²⁰ membuat analisis dengan perhitungan matematik untuk membuktikan bahwa asal-usul mutan 26(GAG->AAG)

atau HbE adalah multipel. Adanya β^E yang terkait dengan blok 3'(framework) yang sama (+-), yaitu (a) -++++ β^E - dan (b) +----- β^E - dapat diterangkan dengan peristiwa mutasi pada b) yang terjadi lebih dulu (haplotip +----- lebih predominan daripada -+++) kemudian diikuti rekombinasi atau *crossing over*, menghasilkan haplotip a); tetapi adanya β^E pada dua framework, yaitu ++ dan +- lebih mendukung asal-usul yang multipel dari alel itu. Jika mutasi terjadi hanya satu kali saja, maka diperlukan dua peristiwa rekombinasi untuk menghasilkan salah satu kerangka tersebut dari yang lain.

Laju rata-rata rekombinasi dari tiap pasangan basa diperkirakan 1×10^{-8} per generasi atau 4×10^{-10} per tahun. Perkiraan probabilitas dari rekombinasi dalam segmen sepanjang 70 nukleotid (antara sisi restriksi HgiAI di kodon 26 = S₁) adalah $70 \times 4 \times 10^{-10}$ (r₁) dan dalam segmen 382 nukleotid (antara kodon 26 dan sisi restriksi AvaII di IVS2 = S₂) adalah $382 \times 4 \times 10^{-10}$ (r₂). Jika diumpamakan mutan β^E yang pertama terjadi n tahun yang lalu, maka probabilitas dari *crossing-over* ganda sebagai suatu peristiwa tunggal untuk menempatkan mutan β^E kedalam framework 2 atau framework 3 Asian adalah kira-kira nr₁r₂ atau $4,2 \times 10^{-15}$ n. Kemungkinan lain adalah rekombinasi terjadi melalui 2 tahap: pertama dalam satu segmen dulu

(S₁ atau S₂) dan kemudian pada lainnya (S₂ atau S₁). Dalam hal ini, probabilitas teoretis untuk menghasilkan 2 alel globin-β^E, jika mutan β^E yang pertama terjadi n tahun yang lalu, adalah n²r₁r₂. Probabilitas mutasi kedua pada nukleotid sembarang, jika yang pertama terjadi n tahun yang lalu, diperkirakan nμ (μ = laju mutasi). Laju mutasi pada pasangan basa pertama dari suatu kodon diperkirakan setidaknya-tidaknya 0,7 × 10⁻⁹ mutasi/pasangan basa/tahun. Dengan demikian maka probabilitas mutasi menjadi globin-β^E yang kedua dibanding probabilitas peristiwa tunggal yang menghasilkan *crossing over* ganda adalah nμ/nr₁r₂ = 0,7 × 10⁻⁹/4,2 × 10⁻¹⁵ = 10⁵. Nilai ini adalah probabilitas maksimum yang menyokong hipotesis mutasi kedua pada kodon 26. Probabilitas dari mutasi kedua dibanding dengan dua peristiwa *crossing-over* tunggal yang terpisah adalah nμ/n²r₁r₂ = 163000/n. Karena mutan globin-β^E hampir selalu terbatas pada ras Mongoloid, dan Mongoloid terpisah dari Kaukasoid sekitar 55000 tahun yang lalu, maka mutasi menjadi β^E pertama terjadi tidak lebih dari 55000 tahun yang lalu. Karena itu probabilitas minimum yang menyokong mutasi kedua ke β^E adalah 163000/55000 = 3. Jadi, rentang probabilitas yang menyokong mutasi kedua (asal-usul multipel) yang menghasilkan β^E mempunyai nilai minimum 3 dan maksimum 10⁵.

Bukti lebih lanjut menentang kemungkinan rekombinasi sebagai mekanisme β^E berasosiasi dengan berbagai haplotip dan *framework*. Pertama, pada 23 kromosom-β^E yang pernah diteliti

tidak pernah ada ketidakselarasan (*discordance*) dari polimorfisme HgAI dan AvaII. Kedua, *framework 3 Asian* yang mengandung mutan β^E ditemukan hanya di Kamboja dan tidak pada populasi Asia Tenggara lain yang banyak memiliki β^E. Hal ini memberi petunjuk bahwa mutan itu mempunyai asal-usul multipel. Antonarakis et al.²⁰ berpendapat bahwa mutasi yang menghasilkan gena-β^E terjadi lebih baru dibanding mutasi yang menghasilkan sisi restriksi yang sangat polimorfik.

Di Sardinia mutan 39(CA→TAG) terkait dengan 9 macam haplotip kromosom (TABEL 2). Pirastu et al.³ berpendapat bahwa mutan 39 pada populasi Sardinia kurang mungkin disebabkan oleh seringnya terjadi mutasi pada gena-β. Kecuali pada kromosom 1' dan 2" semua haplotip mempunyai blok 3' yang sama, yaitu +++++ (TABEL 2). Kombinasi blok 3' itu dengan blok 5' dapat diterangkan dengan rekombinasi yang terjadi pada titik panas diantara ψβ dan β. Karena haplotip I (---+ +++++) adalah yang paling umum terdapat pada β³⁹, maka mungkin mutasi yang asli terjadi pada kromosom induk yang mempunyai haplotip ini. Timbulnya sisi restriksi Rsa I mungkin disebabkan oleh peristiwa rekombinasi antara sisi Rsa I dan Bam HI. Tidak adanya sisi restriktif HgiAI dan Ava II pada kromosom 2" mungkin disebabkan oleh mutasi atau oleh mekanisme lain yang mentransfer suatu konversi gena mutan 39(CAG→TAG) kedalam kromosom yang tidak mempunyai sisi HgiAI dan AvaII. Karena haplotip itu umum terdapat pada populasi

TABEL 2. - Haplotip dari mutasi nonsens β³⁹ pada etnik Sardinia (3)

Haplotip	HincII 5' ε	HindIII G _γ	A _γ	HincII yb	3' ψβ	HgiAI b	Ava II β	Hpa I 3' β	HindIII 3' β	BamHI 3' β	Rsa I 3' β
1	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
1'	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	[+]
2	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
2'	+	-	[↑]†	-	-	+	+	+	+	+	-
2"	+	-	-	-	-	[-]	[-]	+	+	+	-
3	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
4	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
5	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
5'	- [3γ]‡	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-

β³⁹ terletak di antara sisi HgiAI dan AVA II
Tanda ' atau " menunjukkan subtip pada tiap haplotip
[] menunjukkan perbedaan antar subtip

Sardinia non thalassemia dan peristiwa-peristiwa konversi gena pada gena globin manusia pernah ditemukan, mungkin sekali peristiwa semacam itulah yang menyebabkan haplotip 2".

Keadaan yang sesuai dengan penjelasan diatas adalah keterkaitan IVS1nt5(G->C) dengan haplotip +---- +, -+++ -+ atau -+++ -+ pada populasi Burma (TABEL 1). Karena haplotip +----- merupakan haplotip umum pada populasi tersebut, maka mungkin pertama-tama mutasi terjadi pada haplotip tersebut baru kemudian terjadi rekombinasi dengan haplotip 5' -+++ dan -+++.

Haplotip diduga juga mempunyai pengaruh terhadap manifestasi thalassemia. Mutasi -29 (A->G) yang umum terdapat pada thalassemia- β^+ ras kulit hitam yang tidak tergantung transfusi, menyebabkan sintesis globin- β turun hingga tinggal kira-kira 25%⁶. Di lain pihak, mutan yang sama pada seorang Cina menimbulkan thalassemia yang tergantung transfusi²¹. Diduga subhaplotip 5' -+++ pada sisi HindIII di γ dan A_γ dan sisi HincII pada $\psi\beta$ dan 3' dari $\psi\beta$ mempunyai pengaruh sehingga pada talasemia ras kulit hitam manifestasi yang timbul ringan^{1,21}. Mutasi kodon nonsens 39(CAG->TAG) menimbulkan manifestasi thalassemia- β^0 , tetapi mutan tersebut pada satu populasi di Itali berakibat manifestasi ringan dan ini berkaitan dengan haplotip globin- β 5' -+++ . Heterozigot ganda mutan posisi -87 dengan kodon nonsens 39 pada penderita Sardinia dengan subhaplotip -+++ dapat menimbulkan thalassemia ringan tanpa perlu transfusi, perlu transfusi kadang-kadang atau perlu transfusi rutin pada umur lebih tua²².

KESIMPULAN

Populasi tertentu mempunyai pola haplotip tertentu, demikian pula dengan pola mutasi- β . Hubungan antara haplotip dan mutasi- β masih mengandung banyak pertanyaan untuk diteliti. Analisis haplotip dapat menerangkan asal-usul suatu mutan apakah *single* ataukah *multiple origin*. Haplotip tertentu diduga juga mempunyai pengaruh terhadap fenotip.

UCAPKAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada dr. A. Salam M. Sofro, PhD yang telah membaca dan menyampaikan koreksi, saran serta kritik atas tulisan ini.

KEPUSTAKAAN

1. Kazazian Jr.HH. The thalassemia syndromes: Molecular basis and prenatal diagnosis. In: Seminar in hematology 1990; 27:209-28.
2. Thein SL, Wood WG, Wickramasinghe SN, & Galvin MC. β -thalassemia unlinked to the β -globin gene in a English Family Blood 1993; 82:961-7.
3. Pirastu M, Galanello R, Doherty MA, Tuveri T, Kao A, & Kan JW. The same B-globin gene mutation is present on nine different β -thalassemia chromosome in a Sardinian population. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84:2882-85.
4. Maggio A, Acuto S, Di Marzo R, LoGioco P, Giambona A, Sammarco P, et al. β -thalassemia mutations in Sicily. Birth Defects 1988, 23:107-110.
5. Liu VWS, Woo YK, Lam VMS, Huang CH, Chan AS, Lam STS, et al. Molecular studies of Chinese patients. Birth Defects 1988, 23:87-92.
6. Bunn HF, Forget BG. Hemoglobin : genetic and clinical aspects, 1st ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co, 1986.
7. Laig M, Sanguanserm Sri T, Wiangnon S, Hundrieser J, Pape M, & Flatz G. The spectrum of β -thalassemia mutations in northern and northeastern Thailand. Hum Genet 1989; 84:47-50.
8. Winichagoon P, Fucharoen S, Thonglairoam V, Siritanaratkul N, & Fucharoen S. β -thalassemia in Thailand. Ann NY Acad Sci 1990;612:31-42.
9. Fucharoen S & Winichagoon P. The molecular basis of thalassemias. Indian J Pediatr 1989; 56:693-706.
10. Varawalla NY, Old JM, Sarkar R, Venkatesan R, and Weatherall DJ. The spectrum of β -thalassemia mutations on the Indian subcontinent: The basis for prenatal diagnosis. British J Haemat 1991; 78:242-7.
11. Chan V, Chan TK, Chebab FF, & Todd D. Distribution of β -thalassemia mutations in South China and their association with haplotypes Hum Genet 1987; 41:678-85
12. Lie-Injo LE, Cai SP, Iskandar Wahidiyat, Moeslichan S, Lim ML, Evangelista L, et al. β -thalassemia mutations in Indonesia and their linkage to β -haplotype. Am J Hum Genet 1989;45: 971-5.
13. Kazazian HH, Dowling CE, Waber PG, Huang S, and Lo WHY. The spectrum of β -thalassemia genes in China and Southeast Asia. Blood 1986; 68:964-6.
14. Hill AVS, Bowden DK, O'Shaughnessy DFS, Weatherall DJ, and Clegg JB. β -thalassemia in

- Melanesia: Association with malaria and characterization of a common variant (IVS-1 nt 5 G->C). *Blood* 1988;72:9-14.
15. Sofro ASM, Lanni F and Ismadi. Globin gene mutations of beta-thalassemia at Dr. Sardjito General Hospital Yogyakarta-Indonesia. *Hum Genet* 1992; 51(Y) Suppl A:343.
 16. Cheng TC, Orkin SH, Antanarakis SE, Potter MJ, Sexton JP, Markham AF, et al. β -thalassemia in Chinese use of in vivo mRNA analysis and oligonucleotide hybridization in systemic characterization of molecular defects. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:2821-5.
 17. Wong CE, Antonarakis SE, Coff SC, Orkin SH, Forget BG, Nathan DG, et al. On the origin and spread of β -thalassemia: Recurrent observation of four mutations in different ethnic groups. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:6529-32.
 18. Fukimaki Y, Matsunaga E., Takihara Y, Nakamura T, Takagi Y, Tanphaichitr VS, et al. Multiple origin of the β -thalassemia gene with a four nucleotide deletion in the second exon. *Birth Defects* 1988, 23:81-5.
 19. Lynch J, Tate VE, Weatherall DJ, Fucharoen S, Tanphaichitr VS, Isarangkura P, et al. Molecular basis of β -thalassemia in Thailand. *Birth Defects* 1988, 23:71-9.
 20. Antonarakis SE, Orkin SH, Kazazian Jr.HH, Coff SC, Boehm CD, Waber PG, et al. Evidence for multiple origins of β^E -globin gene in Southeast Asia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:6608-11.
 21. Safaya F, Bietler RS, Dowling CF, Kazazian Jr HH, & Adam III JG. Homozygous β -thalassemia without anemia. *Blood* 1989;73:374-7.
 22. Rosatelli MC, Oggiano L, Leoni GB, Tuveri T, DiTucci A, Scalas MT, et al. Thalassemia intermedia resulting from a mild β -thalassemia mutation. *Blood* 1989; 73:601-605.