

## CRISPR/Cas9 dengan *Dual-sgRNAs* Bertarget Gen E6 dan E7 Virus HPV 16 Sebagai Inovasi Terapi Gen Upaya Menurunkan Angka Kanker Serviks Global

Fachreza Aryo Damara

Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran

E-mail: fachrezaaryo21@gmail.com

**Abstract.** Cervical cancer is the second most common female cancer. 80% of the cases were occur in developing countries. Moreover, 62% of the cases were caused by HPV type 16 viruses. Currently, the limitation and adverse effects of chemotherapy and radiotherapy in cervical cancer patients causing need for further innovation of more effective and low-cost therapy. CRISPR/Cas9 has become the effective and affordable gene therapy approach by interfere the target DNA to treat many diseases including cancer. This paper is aimed to describe the author's innovation and its potential of CRISPR/Cas9 therapy using HPV16 E6 and E7 genes-directed dual sgRNAs for Cervical Cancer. This paper is written by literature review study based on analysis and synthesis from various references related to key searches. Studies about deletion of HPV16 E6 and E7 genes using CRISPR/Cas9 separately had proven that there are markedly reducing tumor volume and induced apoptosis in cervical cancer cells. Therefore, using dual-sgRNAs targeting HPV16 E6 and E7 genes could be an effective and low-cost therapy for cervical cancer to suppress the number of cervical cancer cases and deaths worldwide.

**Abstrak.** Kanker serviks merupakan kanker dengan insidensi terbesar kedua pada wanita di dunia. 80% dari kasus kanker serviks terjadi pada negara berkembang. Sebanyak 62% dari kasus kanker serviks disebabkan oleh virus Human Papilloma Virus (HPV) tipe 16. Hingga saat ini, keterbatasan dan efek samping dari tatalaksana kemoterapi dan radioterapi terhadap pasien kanker serviks menyebabkan masih dibutuhkannya inovasi terapi yang lebih efektif dan terjangkau. CRISPR/Cas9 telah menjadi pendekatan terapi gen yang efektif dan spesifik serta memakan biaya produksi yang kecil dengan mengintervensi DNA target terhadap berbagai penyakit termasuk kanker. Tujuan dari makalah ini adalah untuk membahas potensi dari inovasi terapi gen menggunakan CRISPR/Cas9 dengan *dual-sgRNAs* bertarget delesi gen E6 dan E7 pada virus HPV16 terhadap pasien kanker serviks. Makalah ini disusun dengan metode tinjauan pustaka dengan menganalisa dan sintesis dari berbagai referensi yang sesuai dengan kata kunci. Hasil penelitian terhadap delesi gen E6 dan E7 pada HPV16 secara terpisah menunjukkan terjadinya penurunan ukuran tumor yang signifikan dan menginduksi proses apoptosis dari sel kanker serviks. Sehingga penggunaan dual-sgRNAs bertarget kedua gen pada HPV16 dapat menjadi terapi efektif dan terjangkau terhadap pasien kanker serviks untuk menurunkan angka kasus kanker serviks global.

**Kata Kunci:** *CRISPR/Cas9, Gen HPV16, Kanker Serviks*

Kanker serviks masih menjadi salah satu tantangan terbesar dalam penyakit tidak menular di dunia. Kanker serviks merupakan neoplasia yang tumbuh pada jaringan leher rahim (NIH, 2014). Data yang diperoleh dari WHO pada 2012 menunjukkan bahwa Kanker serviks merupakan kanker dengan angka insidensi dan kematian tertinggi kedua pada wanita di dunia setelah kanker payudara dan mencakup 8% dari semua jenis kanker pada pria dan wanita (WHO,2016). Terlebih lagi, lebih dari 80% kejadian kanker serviks terjadi pada negara-negara berkembang, termasuk Indonesia. Berdasarkan InfoDATIN Kemenkes RI, kanker serviks merupakan menduduki angka kejadian tertinggi kedua yakni

mencakup 10,3% dari seluruh kanker wanita di Indonesia pada tahun 2016 (Kemenkes RI,2016). Dan angka-angka tersebut di atas diperkirakan akan terus meningkat bila penanganan yang tepat tidak segera ditemukan.

85% Kanker serviks disebabkan oleh infeksi virus *Human Papilloma Virus* (HPV) yang ditransmisikan melalui berbagai jalur. Diantara tipe virus HPV, sebanyak 62% kasus kanker serviks disebabkan oleh virus HPV tipe 16 (Castellsagué, 2008). Namun, sebelum kanker memasuki stadium lanjut atau tahap keganasan belum ada gejala-gejala yang signifikan terjadi pada pasien (Wong dkk, 2009). Sehingga, masyarakat cenderung untuk tidak melakukan

pemeriksaan dini terhadap diagnosa kanker serviks terlebih lagi permasalahan finansial yang menjadi penyebab bagi masyarakat di negara berkembang terutama di Indonesia. Setelah pasien baru melaksanakan pemeriksaan setelah mengalami gejala seperti pendarahan pervaginal, diagnosa pasien tersebut merupakan kanker dengan stadium lanjut. Sehingga, inovasi terapi yang lebih efektif dan terjangkau terhadap pasien kanker serviks sangat dibutuhkan.

Hingga saat ini, tatalaksana terhadap pasien penderita kanker serviks stadium lanjut adalah dengan pemberian radioterapi dan kemoterapi. Namun, radiasi dari radioterapi dapat menyebabkan kerusakan DNA pada sel-sel normal yang dapat menyebabkan pertumbuhan malignansi lainnya (NIH, 2010). Selain itu, penggunaan radioterapi cenderung mahal sehingga sulit dijangkau pasien. Selanjutnya, walaupun kemoterapi sudah digunakan bertahun-tahun, materi genetik pada sel kanker serviks dapat berevolusi yang berujung kepada status kemoresisten melalui jalur microRNA dan PI3K (Xia dkk. 2010, Shi dkk. 2012).

Terapi gen dapat digunakan terhadap berbagai penyakit karena mengintervensi pada tingkat materi genetik dari penyebab suatu penyakit. Perkembangan dari teknologi terapi gen menunjukkan hasil yang baik hingga dapat dijadikan agen terapi terhadap pasien penderita kanker (Ginn dkk. 2013). Dalam dekade terakhir Jennifer Doudna dan kolega berhasil mengembangkan teknologi terapi gen terbaru yang disebut dengan *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated with Cas9 protein (CRISPR/Cas9) system* (Doudna J, 2014). CRISPR/Cas9 berasal dari mekanisme natural suatu bakteri untuk melindungi dirinya sendiri dari serangan virus dengan memotong DNA virus yang diinjeksi (Wiedenheft dkk. 2009, Jore dkk. 2011). Karena produksinya yang berasal dari protein enzim yang dihasilkan oleh suatu bakteri, maka biaya produksi teknologi CRISPR/Cas9 ini jauh lebih kecil dibandingkan dengan teknologi pengeditan gen lainnya seperti TALEN dan ZFN. Maka

dalam hal ini, sangatlah menarik bila target intervensi CRISPR/Cas9 adalah gen yang menyebabkan pembentukan dan perkembangan sel kanker serviks, sehingga efek terapi yang ditimbulkan lebih spesifik terhadap gen penyebab terbentuknya sel kanker. Tujuan dari makalah ini adalah untuk mengetahui potensi inovasi terapi gen CRISPR/Cas9 dengan *dual-sgRNAs* bertarget gen E6 dan E7 pada virus HPV16.

## METODE PENELITIAN

Makalah ini disusun dengan metode kajian pustaka. Studi tinjauan pustaka melalui proses analisis dan sintesis dari berbagai referensi. Penulis memasukkan berbagai kata kunci ke dalam kolom pencarian yaitu *Cervical cancer, CRISPR/Cas9* dan *HPV16 Gene*. Berdasarkan jurnal yang didapatkan, penulis memilih jurnal yang berupa *full-text*, dan berkaitan dengan topik. Jurnal yang didapatkan juga dipastikan memiliki tahun publikasi dalam jangka waktu paling lama yaitu 10 tahun. Referensi didapatkan dari jurnal terakreditasi yang dipublikasikan secara global yang dapat diakses melalui *Google Scholar, International Library of Medicine (Pubmed), Clinical Key*, dan *PlosOne*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, virus HPV16 merupakan penyebab tertinggi dari kanker serviks. Virus HPV16 memasukkan materi genetiknya dan bekerja di dalam jaringan serviks yang menyebabkan terjadinya pembentukan sel kanker. Virus HPV16 memiliki berbagai jenis lokus gen yang berperan dalam proses kelangsungan hidup virus maupun dalam proses patogenesis kanker serviks. Terapi yang dibahas kali ini adalah gen yang berperan paling besar dalam proses patogenesis kanker serviks, yaitu gen E6 dan E7.

Gen E6 merupakan onkogen yang akan menginaktivasi dan mendegradasi supresor tumor p53 (Narisawa-Saito, 2007). Protein dari gen E6 akan membentuk kompleks dengan enzim

ubiquitin ligase yang disebut dengan E6 Associated Protein atau E6AP (Beaudenon, 2008). Kompleks ini akan berinteraksi dengan berbagai molekul untuk memicu pertumbuhan dan perkembangan sel tumor. E6AP akan mendegradasi protein p53 dengan bantuan enzim ligase sehingga menyebabkan gagalnya proses apoptosis dari sel tumor.

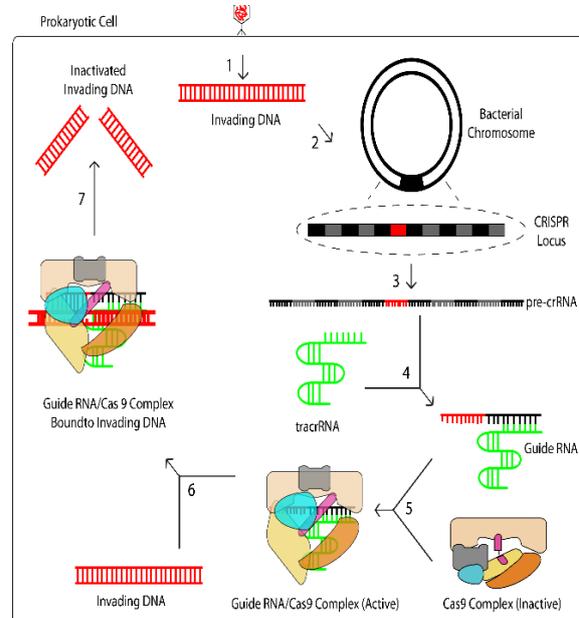
Gen E7 menginduksi pertumbuhan sel tumor dengan menginaktivasi supresor tumor protein Retinoblastome (pRB) (Narisawa-Saito, 2007). Pada keadaan normal, pRB akan berikatan dengan faktor transkripsi E2F yang akan menghambat ekspresi dari gen penyebab pertumbuhan sel tumor (Teissier dkk. 2007). Namun, gen E7 pada HPV16 akan merusak pRB dengan enzim cystein protease kalpain teraktivasi kalsium (McLaughlin-Drubin, 2009).

*Prinsip dan Mekanisme Kerja CRISPR/Cas9*

CRISPR/Cas9 merupakan suatu mekanisme kompleks yang secara umum bekerja dengan memotong DNA target. CRISPR/Cas9 berasal dari mekanisme natural suatu bakteri untuk melindungi dirinya dari infeksi virus (Garneau dkk. 2010, Cong dkk. 2013). Bakteri akan menghasilkan *single-guide RNA* (sgRNA) yang memiliki sekuens yang sama dengan DNA virus yang masuk. sgRNA pada CRISPR/Cas9 memiliki 2 segmen RNA, yaitu CRISPR RNA (crRNA) dan tracrRNA (Ran dkk. 2013). Sehingga dalam proses penggunaan CRISPR/Cas9 sebagai terapi, kita harus mendesain sgRNA yang memiliki sekuens yang sama dengan DNA target, dalam hal ini adalah gen E6 dan E7 pada virus HPV16.

Mekanisme pemotongannya dimulai dari sintesis sgRNA yang sesuai. Setelah itu sgRNA akan membentuk kompleks dengan protein Cas9. Selanjutnya, setelah sikuens DNA target yang cocok bertemu dengan kompleks Cas9, sistem CRISPR/Cas9 akan memotong DNA target dengan menggunakan enzim endonuklease pada protein Cas9 (Jinek dkk. 2012). Agar kompleks sgRNA dan Cas9 berhenti pada sekuens DNA yang sesuai, maka dibutuhkan sebuah “penanda” yang menjadi situs pemberhentian mereka untuk

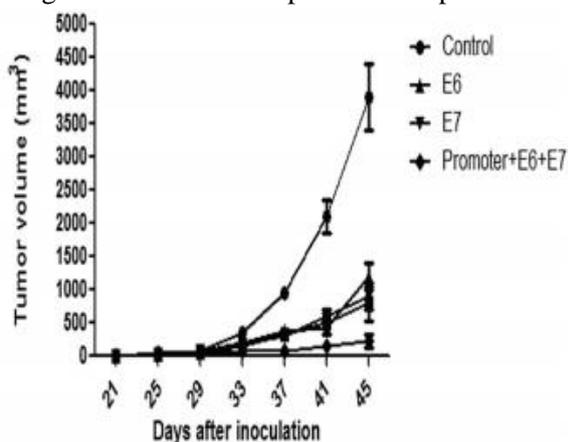
melakukan pemotongan yang disebut dengan *Protospacer Adjacent Motif* (PAM). Setelah kompleks menempel pada sekuens DNA yang tepat, maka “gunting” dari enzim endonuklease yang akan memotong DNA target akan memotong pada 17 hingga 23 pasangan nukleotida setelah PAM (Gambar 1) (Cencic dkk. 2014, Marraffini, 2010). Setelah DNA target berhasil dipotong, gen akan melakukan reparasi yang disebut dengan *Error-prone* dengan mekanisme *Non-Homologous End Joining* (NHEJ) sehingga hasil reparasi DNA target tidak akan mengembalikannya menjadi fungsinya seperti semula, dan dalam kasus ini, fungsi dari gen E6 dan E7 pada sel kanker serviks akan terinaktivasi (Sander, 2014).



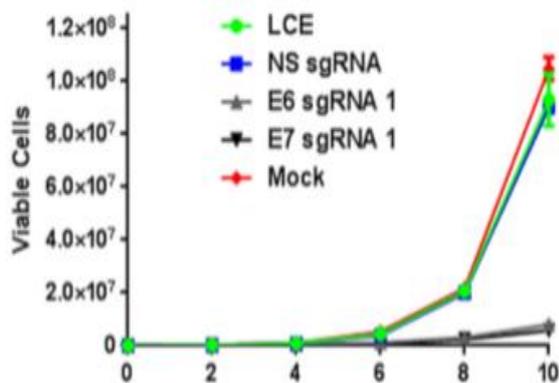
Gambar 1 : Mekanisme inaktivasi DNA target dengan menggunakan CRISPR/Cas9 (Marraffini, 2010).

Setelah membahas mekanisme kerja dari CRISPR/Cas9 sebagai agen terapi, sehingga kita menggunakan dua sgRNA atau *dual-sgRNAs* yang spesifik terhadap gen E6 dan E7 pada virus HPV16. Penelitian sebelumnya telah menguji dengan melakukan delesi pada gen E6 dan E7 secara terpisah dengan menggunakan CRISPR/Cas9. Hasil penelitian tersebut menunjukkan tidak hanya terhambatnya proses

pertumbuhan sel kanker, namun ukuran sel kanker serviks juga berkurang akibat peningkatan dari aktivitas apoptosis dari efek yang diberikan oleh p53 dan pRB yang tidak lagi dihambat oleh gen E6 dan E7 (Grafik 1 dan 2). CRISPR/Cas9 bersirkulasi dengan bantuan vektor virus Adenovirus (AAV). Mekanisme administrasi dari CRISPR/Cas9 adalah dengan cara injeksi intravena dengan dosis yang sesuai dengan kondisi dan komposisi tubuh pasien



Grafik 1: Reduksi volume tumor kanker serviks setelah pemberian CRISPR/Cas9 bertarget E6 dan E7 (Zhen dkk. 2014).



Grafik 2: Peningkatan aktivitas apoptosis sel kanker setelah pemberian CRISPR/Cas9 bertarget gen E6 dan E7 (Kennedy dkk. 2014).

## KESIMPULAN

Kanker serviks merupakan kanker tertinggi kedua pada wanita di dunia. 80% kasus kanker serviks terjadi pada negara berkembang. Penyebab dari kanker serviks adalah 85% oleh

infeksi virus HPV dengan 62% diantaranya virus HPV tipe 16. Sehingga tatalaksana terapi efektif dan terjangkau sangat dibutuhkan. CRISPR/Cas9 telah menjadi agen terapi gen yang efektif yang berasal dari mekanisme perlindungan natural suatu bakteri. Dalam makalah ini, penulis mengagaskan inovasi terapi gen menggunakan CRISPR/Cas9 dengan *dual-sgRNAs* bertarget gen E6 dan E7 pada HPV16. Penelitian sebelumnya telah menguji delesi gen E6 dan E7 secara terpisah dengan menggunakan CRISPR/Cas9 dan menunjukkan efek yang signifikan terhadap penurunan volume jaringan kanker dan peningkatan aktivitas apoptosis. Sehingga, penggunaan terapi gen berbasis CRISPR/Cas9 dengan *dual-sgRNAs* bertarget gen E6 dan E7 pada virus HPV16 dapat menjadi modalitas terapi efektif dan terjangkau. Namun, tentunya penelitian lebih lanjut sangat dibutuhkan agar agen terapi ini dapat segera diimplementasikan guna menurunkan angka insidensi dan kematian kanker serviks global.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Dr. med. Muhammad Hasan Bashari, dr., M.Kes. yang telah membimbing penulis dalam proses pembuatan artikel ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- National Cancer Institute (NIH). 2014 Cervical Cancer Treatment. NCI. <https://www.cancer.gov/types/cervical/patient/cervical-treatment-pdq>
- World Health Organization (WHO). 2016 Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer fact sheet. WHO. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes RI). 2016. InfoDATIN : Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. Kemenkes RI.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes RI). 2016. Panduan

- Penatalsanaan Kanker Serviks. Komite Penanggulangan Kanker Nasional.
- Castellsagué, X. 2008. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic oncology*, 110(3), S4-S7.
- de Sanjose, S., Quint, W. G., Alemany, L., Geraets, D. T., Klaustermeier, J. E., Lloveras, B., ... & Vallejos, C. S. 2010. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The lancet oncology*, 11(11), 1048-1056.
- Wong, L. P., Wong, Y. L., Low, W. Y., Khoo, E. M., & Shuib, R. 2009. Knowledge and awareness of cervical cancer and screening among Malaysian women who have never had a Pap smear: a qualitative study. *Singapore medical journal*, 50(1), 49.
- National Cancer Institute. 2010 Radiation Therapy for Cancer. NCI. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy>
- Xia, S., Zhao, Y., Yu, S., & Zhang, M. 2010. Activated PI3K/Akt/COX-2 pathway induces resistance to radiation in human cervical cancer HeLa cells. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 25(3), 317-323.
- Shi, M., Du, L., Liu, D., Qian, L., Hu, M., Yu, M., ... & Wang, L. 2012. Glucocorticoid regulation of a novel HPV-E6-p53-miR-145 pathway modulates invasion and therapy resistance of cervical cancer cells. *The Journal of pathology*, 228(2), 148-157.
- Ginn, S. L., Alexander, I. E., Edelstein, M. L., Abedi, M. R., & Wixon, J. 2013. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012—an update. *The journal of gene medicine*, 15(2), 65-77.
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096.
- Wiedenheft, B., Zhou, K., Jinek, M., Coyle, S. M., Ma, W., & Doudna, J. A. 2009. Structural basis for DNase activity of a conserved protein implicated in CRISPR-mediated genome defense. *Structure*, 17(6), 904-912.
- Jore, M. M., Lundgren, M., Van Duijn, E., Bultema, J. B., Westra, E. R., Waghmare, S. P., ... & Beijer, M. R. (2011). Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. *Nature structural & molecular biology*, 18(5), 529-536.
- Narisawa- Saito, M., & Kiyono, T. 2007. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer science*, 98(10), 1505-1511.
- Beaudenon, S., & Huibregtse, J. M. 2008. HPV E6, E6AP and cervical cancer. *BMC biochemistry*, 9(1), S4.
- Teissier, S., Khalifa, Y. B., Mori, M., Pautier, P., Desaintes, C., & Thierry, F. 2007. A new E6/P63 pathway, together with a strong E7/E2F mitotic pathway, modulates the transcriptome in cervical cancer cells. *Journal of virology*, 81(17), 9368-9376.
- McLaughlin-Drubin, M. E., & Münger, K. 2009. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*, 384(2), 335-344.
- Garneau, J. E., Dupuis, M. E., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., ... & Moineau, S. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320), 67-71.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... & Zhang, F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9

- system. *Nature protocols*, 8(11), 2281-2308.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821.
- Cencic, R., Miura, H., Malina, A., Robert, F., Ethier, S., Schmeing, T. M., ... & Pelletier, J. 2014. Protospacer adjacent motif (PAM)-distal sequences engage CRISPR Cas9 DNA target cleavage. *PLoS one*, 9(10), e109213.
- Sander, J. D., & Joung, J. K. 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature biotechnology*, 32(4), 347-355.
- Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. 2010. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*, 463(7280), 568-571.
- Zhen, S., Hua, L., Takahashi, Y., Narita, S., Liu, Y. H., & Li, Y. 2014. In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by CRISPR/Cas9. *Biochemical and biophysical research communications*, 450(4), 1422-1426.
- Kennedy, E. M., Kornepati, A. V., Goldstein, M., Bogerd, H. P., Poling, B. C., Whisnant, A. W., ... & Cullen, B. R. 2014. Inactivation of the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells by using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided endonuclease. *Journal of virology*, 88(20), 11965-11972.