

Aplikasi Teknologi Crispr/Cas9 Dalam *Anti-Aging Medicine*

¹Ferbian Milas Siswanto, ^{2*}Bambang Hadi Kartiko

¹Department of Biomedical Chemistry, School of Science and Technology, Kwansei Gakuin University

²Faculty of Health, Science and Technology, Dhyana Pura University

*E-mail: dr.bhkmb@gmail.com; Phone: +628123981012

ABSTRAK

Seiring dengan proses penuaan, kemampuan gen yang mengontrol viabilitas sel mengalami penurunan, sejalan dengan meningkatnya aktivitas gen yang menyebabkan kematian sel dan berujung pada patogenesis penyakit. Dengan memanipulasi aktivasi dan non-aktivasi gen yang terlibat dalam proses penuaan, maka kesehatan akan meningkat dan proses penuaan dapat dihambat bahkan dikembalikan. Saat ini telah ditemukan teknologi CRISPR/Cas-9 yang memungkinkan manipulasi pada tingkat genetik. CRISPR sebenarnya merupakan bagian proses fisiologis pada bakteri, yang merupakan salah satu sistem imunitas bakteri. Namun saat ini CRISPR telah banyak dibuktikan dan diaplikasikan untuk reprogram DNA pada sel mamalia dan dapat mengembalikan perubahan genetik yang tidak diinginkan.

Kata kunci: Penuaan, CRISPR/Cas-9, anti-aging medicine, manipulasi genetik

ABSTRACT

As all living thing undergo aging, genes that maintain cellular viability and vitality are downregulated, in line with upregulated expression of genes that promote cells senescence and disease-related pathogenesis. By manipulating the initiation and inhibition of aging-related gene expression, the youthful health may be systemically restored. Recently, a new technology called CRISPR is found to be usefull for manipulating gene and rapidly transform senescent cells to regain youthful function and structure. CRISPR is originally developed in nature by bacteria as a way to destroy the DNA of viruses which part of their immune system. A natural version of CRISPR has been adapted by scientists to enable the reprogramming of cellular DNA to rid cells of unfavorable genetic changes.

Keyword: Aging, CRISPR/Cas-9, anti-aging medicine, genetic manipulation

PENUAAN DAN ANTI AGING MEDICINE

Proses penuaan merupakan akumulasi secara progresif berbagai perubahan patologis di dalam sel dan jaringan yang terjadi dengan berjalannya waktu. Menjadi tua atau *aging* adalah suatu proses menghilangnya kemampuan jaringan secara perlahan untuk memperbaiki atau mengganti diri dan mempertahankan struktur serta fungsi normalnya. Akibat penurunan fungsi tersebut, muncul berbagai tanda dan gejala proses penuaan, yang pada dasarnya dibagi atas dua bagian besar yaitu tanda psikis dan tanda fisik. Tanda psikis antara lain yaitu menurunnya gairah hidup, sulit tidur, mudah cemas, mudah tersinggung dan merasa tidak berarti lagi. Sedangkan tanda fisik antara lain, yaitu penurunan massa otot, peningkatan

lapisan lemak, daya ingat berkurang, fungsi seksual terganggu, kemampuan kerja menurun, masalah sakit tulang dan timbulnya kerutan pada kulit (Pangkahila, 2011).

Telah banyak sekali dilakukan penelitian dan mendapatkan hasil bahwa kerusakan genom berkaitan dengan penuaan dan induksi artifisial dari kerusakan genom tersebut dapat menginduksi beberapa keadaan patologis yang berkaitan dengan mempercepat penuaan. Terdapat bukti hasil penelitian yang menunjukkan bahwa perbaikan faktor yang terlibat dalam pengaturan segregasi kromosom saat pembelahan sel dapat meningkatkan harapan hidup pada mamalia (Baker *et al.*, 2013). Intervensi terhadap sistem DNA *repair* telah terbukti berdampak pada proses penuaan dini (Lopez-Otin *et al.*, 2013). Selain itu,

apoptosis yang merupakan indikasi dari proses penuaan fisiologis juga melibatkan kerusakan genom. Meningkatnya *serine protease* adalah salah satu penyebab penuaan karena *serine protease* menginduksi terjadinya kondensasi, fragmentasi dan degradasi DNA di dalam inti sel yang dapat diamati pada tahap akhir apoptosis (Moffitt et al., 2007). Protein p53 sering disebut sebagai *guardian of the genome* karena merupakan faktor penting dalam menjaga stabilitas genom yang akan menginduksi *cell senescence* dan apoptosis bila terjadi instabilitas genom, dimana hal ini akan menginduksi proses penuaan (Efeyan et al., 2007). Secara garis besar, instabilitas dan kerusakan genome telah banyak diketahui dapat menyebabkan penuaan (Maslov and Vjig, 2009; Vjig and Suh, 2013), sehingga upaya untuk mencegah atau bahkan memperbaiki kerusakan di tingkat genomic akan sangat bermanfaat dalam mencegah patogenesis penuaan.

Berkembangnya ilmu kedokteran dalam hal ini *Anti Aging Medicine* (AAM), telah membawa konsep baru dalam dunia kedokteran. Penuaan diperlakukan sebagai penyakit, sehingga dapat dan harus dicegah dan diobati bahkan dikembalikan ke keadaan semula, sehingga usia harapan hidup dapat menjadi lebih panjang dengan kualitas hidup yang lebih baik (Goldman dan Katz, 2007; Pangkahila, 2011). Dengan mencegah proses penuaan, fungsi berbagai organ tubuh dapat dipertahankan agar tetap optimal. Hasilnya organ tubuh dapat berfungsi seperti pada usia biologis yang lebih muda, padahal usia sebenarnya bertambah. Dengan demikian penampilan dan kualitas hidupnya lebih muda dibandingkan dengan usia sebenarnya (Pangkahila, 2011).

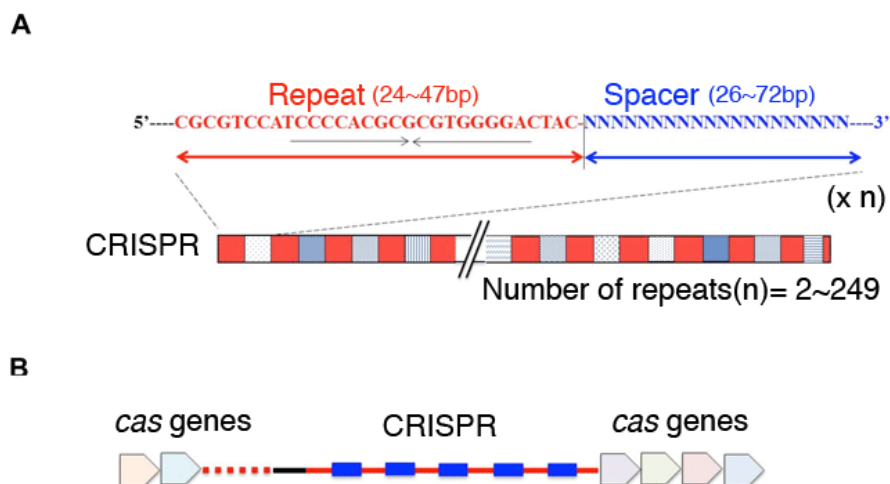
Namun hingga saat ini, fokus *Anti Aging Medicine* (AAM) lebih banyak diarahkan pada intervensi di tingkat fenotip, salah satu contohnya adalah dengan mengatur pola hidup dan intervensi lainnya seperti *hormone replacement therapy* (HRT). Perkembangan *Anti Aging Medicine* (AAM)

perlu diarahkan lebih dalam hingga tingkat genomik karena tidak bisa dipungkiri bahwa kerusakan yang terjadi pada tingkat genomik tidak dapat diselesaikan hanya dengan intervensi di tingkat fenotipik. Belakangan ini banyak berkembang teknologi *genome editing* yang dapat berguna untuk manipulasi dan intervensi hingga tingkat genomik. Salah satu teknologi yang muncul dengan tingkat akurasi yang tinggi dan mudah digunakan adalah teknologi *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9* (CRISPR/Cas9).

SEJARAH PERKEMBANGAN CRISPR /Cas9

CRISPR sebenarnya merupakan bagian proses fisiologis pada bakteri, yang merupakan salah satu sistem kekebalan (imunitas) bakteri. Keunikan proses ini membuat para peneliti berlomba-lomba mempelajari CRISPR. Dikatakan unik karena proses metode CRISPR yang awalnya ada pada bakteri ini mampu menggabungkan DNA asing kedalam keadaan lain bahkan bakteri juga mampu mengais DNA yang telah rusak dari lingkungannya (Barrangou & Marraffini 2014).

Kumpulan pengulangan yang merupakan cara kerja CRISPR ini pertama kali ditemukan pada tahun 1987 oleh Yoshizumi Ishino pada bakteri *Escherichia coli*. Namun pada saat itu Yoshima belum mengetahui fungsi dan manfaatnya. Di tahun 2000, proses pengulangan serupa diidentifikasi terjadi pada bakteri lain dan archaea. Kemudian peristiwa pengulangan ini diberi istilah SRSR atau *Short Regularly Spaced Repeats* dan diubah lagi istilahnya menjadi CRISPR pada tahun 2002. Sedangkan istilah Cas memiliki pengertian atau digunakan dalam satu set gen yang melakukan pengulangan CRISPR. Gen cas ini diduga mampu mengkodekan nuklease atau helikase dengan menggunakan enzim yang mampu memotong DNA (Doudna & Charpentier 2014; Sander & Joung 2014).



Gambar 1. CRISPR terdiri dari tiga komponen utama (Staals et al. 2013)

Tiga penelitian independen pada tahun 2005 juga menemukan spacer CRISPR yang berasal dari fag DNA dan DNA ekstrakromosomal seperti plasmid. CRISPR ini ditemukan pada spacer fragmen DNA dari virus yang sebelumnya mencoba menyerang sel. Dari sinilah diketahui bahwa sistem CRISPR atau cas mampu memberikan kekebalan adaptif pada bakteri. Usulan pertama untuk menggunakan *spacer* sebagai template untuk molekul RNA memiliki fungsi sama dengan sistem yang disebut RNA interferensi, dimana hal ini digunakan oleh sel-sel eukariotik yang di kemukakan oleh Koonin dan rekan-rekannya (Doudna & Charpentier 2014; Sander & Joung 2014).

Tepatnya di tahun 2007, ilmuwan dari industri makanan Danisco yaitu Barrangou dan Horvath serta Moineau's group di Universitas Laval Canada memperlihatkan bahwa mereka bisa memanfaatkan spacer DNA untuk mengubah *Streptococcus thermophilus* untuk menyerang fag.

Kemudian peneliti independen Doudna dan Charpentier mempelajari protein CRISPR terkait bagaimana suatu bakteri menggunakan spacer sebagai pertahanan kekebalan tubuh mereka. Mereka bersama-sama mempelajari sistem CRISPR sederhana yang bergantung pada protein yang disebut Cas9. Mereka juga menemukan bahwa bakteri menanggapi suatu fag yang akan menyerang dengan cara menyalin spacer dan DNA palindromic menjadi molekul RNA lama. Kemudian sel akan menggunakan tracrRNA dan Cas9 untuk

memotong molekul RNA lama menjadi potongan-potongan yang disebut crRNAs (Qi et al. 2013; Doudna & Charpentier 2014).

Cas9 sendiri sebenarnya merupakan nuklease, yaitu sebuah enzim khusus yang mampu memotong DNA. Cas9 juga mempunyai dua situs aktif pemotong yaitu HNH dan RuvC dimana hanya dibutuhkan satu pemotong untuk setiap helai helix ganda dari DNA. Tim ini menunjukkan bahwa mereka mampu menonaktifkan satu maupun kedua situs tadi sambil menjaga kemampuan Cas9 tetap diatas DNA target. Berikutnya Jinek et al mengusulkan bahwa sistem ini seperti panduan RNA sintesis yang dapat digunakan untuk mengedit DNA. Jinek mengkombinasikan tracrRNA dan spacer RNA menjadi single-guide RNA dimana molekul yang dicampur dengan Cas9 mampu menemukan dan memotong DNA target dengan benar (Jinek et al. 2012).

Di tahun 2012 CRISPR pertama kali digunakan untuk bekerja sebagai rekayasa genom atau alat editing pada kultur sel manusia. Sejak saat itu, pemanfaatan CRISPR mulai berkembang dan digunakan dalam berbagai organisme termasuk penggunaan CRISPR pada ragi roti (*S. cerevisiae*), Zebrafish (*D. rerio*), lalat (*D. melanogaster*), axolotl (*A. mexicanum*), nematoda (*C. elegans*), tanaman, monyet, tikus, embrio, serta organisme lainnya. Selain itu juga CRISPR telah dimodifikasi untuk dapat membuat faktor transkrip terprogram yang memungkinkan para ilmuwan untuk

dapat mengaktifkan dan menargetkan editing pada gen tertentu (Doudna & Charpentier 2014).

BIOLOGI DASAR TEKNIK CRISPR/Cas9

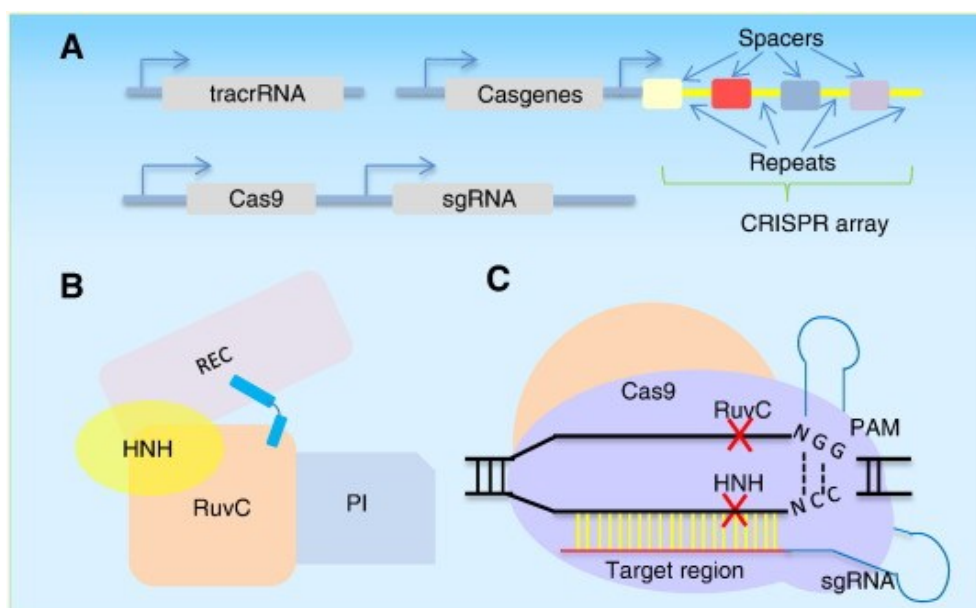
CRISPR associated proteins yang disingkat menjadi Cas adalah enzim endonuklease yang dihasilkan oleh gen dari "cas operon". Gen cas terdapat dua kelas, yakni kelas 1 yang merupakan sistem kompleks untuk memotong materi genetik asing, sedangkan kelas 2 hanya menggunakan protein tunggal dengan tujuan yang sama. Masing-masing kelas tersebut dibagi lagi menjadi tipe cas (Staals *et al.* 2013).

Komponen protein Cas9 tersusun atas empat yakni terdiri dari dua domain protein utama yakni REC dan RuvC (Gambar 2). REC dan RuvC dihubungkan oleh daerah yang kaya akan asam amino arginin (warna biru). Sementara dua komponen berikutnya

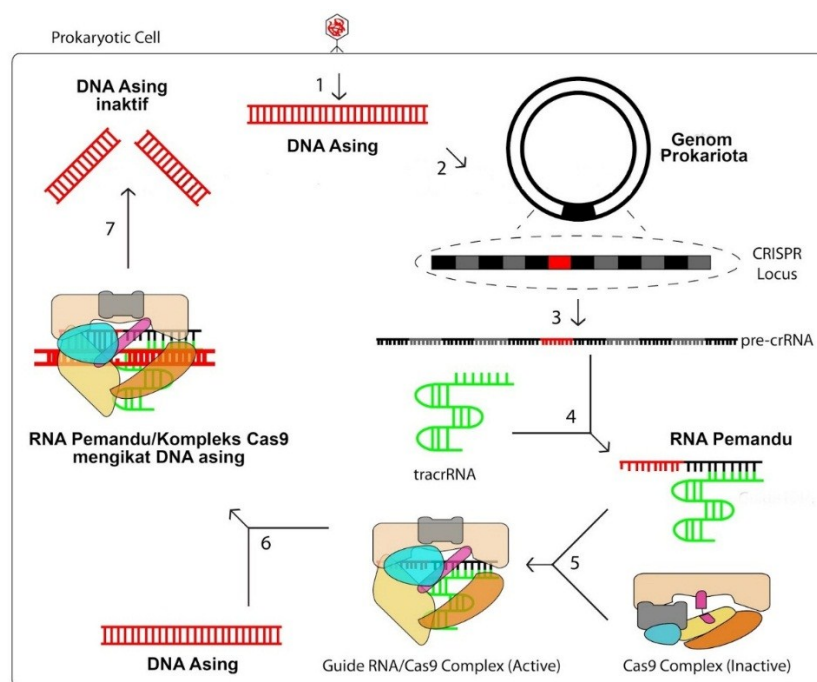
yakni HNH dan PAM (*Protospacer-Adjacent Motif*) yang merupakan urutan DNA yang tersusun 2-6 bp (Song *et al.* 2016).

Fungsi masing-masing komponen Cas9 yakni REC dan HNH berfungsi sebagai endonuklease (memotong DNA); RuvC berfungsi sebagai daerah sisi pengenalan (*recognition site*); PAM berfungsi untuk menyisipi urutan DNA target dengan segera ketika Cas9 mengenali DNA asing yang dijadikan target. PAM juga sebagai pengunci dalam proses sistem CRISPR/Cas9 (Song *et al.* 2016).

Sistem CRISPR-Cas9 adalah dua komponen penting yang sinergis untuk menghancurkan materi genetik asing. Secara alami, pada saat bakteri atau archaea terinfeksi materi genetik asing seperti bakteriofag, maka proses kerja CRISPR-Cas9 ada tiga mekanisme utama yakni akuisisi DNA, pemrosesan crRNA, dan interferensi (Gambar 3).



Gambar 2. Struktur protein Cas9 (Song et al. 2016)



Gambar 3. Mekanisme kerja CRISPR-Cas9 pada Prokariota (Marraffini 2015)

Pada saat DNA asing masuk ke dalam sel (Gambar 3.1), maka dengan segera fragmen DNA asing tersebut akan direkam sebagai memori genetik dan disimpan dalam spacer yang disebut dengan tahapan akuisisi DNA (Gambar 3.2). Ketika ada virus dengan fragmen DNA yang sudah pernah direkam, langkah selanjutnya adalah pemrosesan crRNA (Gambar 3.3). Gen CRISPR akan melakukan transkripsi menghasilkan CRISPR RNA (crRNA) sedangkan gen Cas9 akan menghasilkan protein Cas9 (Gambar 3.4). tracrRNA juga disintesis dan bergabung dengan crRNA. Gabungan kedua RNA tersebut dinamakan guide RNA (gRNA) atau disebut RNA Pemandu (Gambar 3.5). Selanjutnya, RNA pemandu akan bergabung dengan Cas9 (Gambar 3.6). Kompleks RNA Pemandu/Cas9 akan mengikat DNA asing dan memotongnya menjadi DNA inaktif (Gambar 3.7) (Cong *et al.* 2013; Barrangou & Marraffini 2014; Marraffini 2015).

APLIKASI CRISPR/Cas9 DALAM ANTI AGING MEDICINE'

CRISPR-Cas9 dapat digunakan untuk memfasilitasi berbagai aplikasi teknik *targeted genome modification*. Wild-type Cas9 nuklease telah memungkinkan efisien

dan *targeted genome modification* di banyak spesies yang belum bisa dilakukan dengan menggunakan teknik manipulasi genetik tradisional. Kemudahan penargetan ulang Cas9 hanya dengan merancang urutan RNA pendek juga memungkinkan percobaan modifikasi genom skala besar untuk menyelidiki fungsi gen atau menjelaskan varian genetik kausal. Berbagai protein atau RNA dapat ditambahkan ke Cas9 atau sgRNA untuk mengubah aktivitas transkripsi lokus genomik tertentu, memantau aktivitas kromatin, atau bahkan mengatur ulang organisasi tiga dimensi dari genom (Ran *et al.* 2013).

Meskipun CRISPR-Cas9 telah banyak digunakan sebagai alat penelitian, arah masa depan yang sangat menarik adalah pengembangan CRISPR-Cas9 sebagai teknologi terapi. Meskipun penelitian pada sel eukariotik hanya sekitar tiga tahun belakangan ini, telah banyak ditemukan aplikasi potensial CRISPR-Cas9 untuk penyakit manusia termasuk kelainan genetik, kanker dan virus. Sejauh ini, CRISPR / Cas9 telah diterapkan untuk empat virus manusia HPV, HBV, EBV dan HIV. Untuk gangguan resesif monogenik karena kehilangan-of-fungsi mutasi (seperti penyakit Huntington,

cystic fibrosis, anemia sel sabit, atau Duchenne muscular dystrophy), Cas9 dapat digunakan untuk memperbaiki mutasi penyebab penyakit-penyakit ini (Hsu et al. 2014; Shin *et al.* 2016)

Pada awalnya hasil penelitian terkait CRISPR-Cas9 fokus pada kelainan bawaan dan tidak ada relevansinya dengan penuaan. Namun jika diamati konteks penggunaan teknologi, maka teknologi CRISPR-Cas9 dapat digunakan sebagai *tools* untuk menangani penyakit degeneratif terkait penuaan. Ini adalah contoh dari metodologi untuk terapi gen dewasa dengan CRISPR yang mudah dibawa keluar untuk laboratorium dan menghasilkan jaringan dan organ yang baik pada orang dewasa. Hal ini karena esensi semua terapi gen adalah memungkinkan kita untuk mengobati dan mengimbangi kerusakan yang berkaitan dengan usia dan penurunan, seperti *myostatin deletion* untuk meningkatkan pertumbuhan otot, menambahkan reseptor lisosomal untuk meningkatkan autofagi dan menghambat penuaan sel, atau memindahkan gen mitokondria ke nukelus, sekarang secara teknik sangat mungkin dilakukan dengan metode CRISPR-Cas9.

Penelitian yang dilakukan oleh Harel et al. (2015) menemukan bahwa penggunaan teknologi CRISPR-Cas9 untuk meng-edit dan meng-*knock out* gen-gen terkait penuaan dan penyakit degeneratif pada *turquoise killifish* secara signifikan meningkatkan *lifespan* yang menunjukkan bahwa penggunaan teknologi CRISPR-Cas9 dapat secara efektif meningkatkan harapan hidup dan mencegah proses penuaan (Harel *et al.* 2015).

Namun terapi gen akan menjadi sangat berpengaruh dalam dunia kedokteran, dimana terapi gen dapat diaplikasikan sebagai pengobatan hampir pada semua jenis penyakit dalam beberapa tahun ke depan. Dan, ini mungkin karena munculnya teknologi CRISPR yang dapat dikatakan murah dengan presisi yang akurat. Namun sementara ini, teknologi genome editing CRISPR-Cas9 hanya reliabel diaplikasikan pada embrio, dimana peneliti hanya perlu memastikan komponen genetik dari sejumlah kecil sel untuk membuat perubahan yang nantinya akan hadir di seluruh tubuh dewasa. Untuk memperoleh hasil yang sama dalam

terapi dikirim pada manusia yang sudah dewasa adalah sebuah tantangan yang cukup besar. Jika terapi gen gagal untuk mengubah persentase yang cukup besar dari sel-sel dalam individu dewasa, maka tidak akan ada efek klinis bermanfaat yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Baker, D.J., Dawlaty, M.M., Wijshake, T., Jeganathan, K.B., Malureanu, L., van Ree, J.H., Crespo-Diaz, R., Reyes, S., Seaburg, L., Shapiro, V. 2013. Increased expression of BubR1 protects against aneuploidy and cancer and extends healthy lifespan. *Nat. Cell Biol.* 15, 96–102
- Barrangou, R. & Marraffini, L.A., 2014. CRISPR-cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular Cell*, 54(2), pp.234–244.
- Cong, L. et al., 2013. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, 339(6121), pp.819–823. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1231143>.
- Doudna, J.A. & Charpentier, E., 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), pp.1258096–1258096. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1258096>.
- Efeyan A, Serrano M. 2007. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle*. 6(9):1006-10. Epub 2007 May 28.
- Goldmann, R., and Klatz, R. 2007. *The New Anti-Aging Revolution*. Theories of Aging: 19-32
- Harel, I. et al., 2015. A Platform for Rapid Exploration of Aging and Diseases in a Naturally Short-Lived Vertebrate. *Cell*, 160(5), pp.1013–1026. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867415001166>.
- Hsu, P.D., Lander, E.S. & Zhang, F., 2014. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, 157(6), pp.1262–1278. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867414006047>.
- Jinek, M. et al., 2012. A Programmable Dual-

- RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), pp.816–821. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1225829>.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013;153(6):1194–1217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
- Marraffini, L.A., 2015. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*, 526(7571), pp.55–61. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature15386>.
- Maslov AY, Vijg J. Genome instability, cancer and aging. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1790(10):963–969
- Moffitt, K.L., Martin, S.L., and Walker, B. 2007. The emerging role of serine proteases in apoptosis. *Biochem Soc Trans*. 35(Pt 3): 559–60.
- Pangkahila, W. 2011. Anti-Aging: Tetap Muda dan Sehat. PT Kompas Media Nusantara. Jakarta.
- Qi, L.S. et al., 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell*, 152(5), pp.1173–1183. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867413002110>.
- Ran, F.A. et al., 2013. Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell*, 154(6), pp.1380–1389. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867413010155>.
- Sander, J.D. & Joung, J.K., 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, 32(4), pp.347–355. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt.2842>.
- Shin, J.W. et al., 2016. Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. *Human Molecular Genetics*, p.ddw286. Available at: <http://hmg.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/hmg/ddw286>.
- Song, G. et al., 2016. CRISPR/Cas9: A powerful tool for crop genome editing. *The Crop Journal*, 4(2), pp.75–82.
- Staals, R.H.J. et al., 2013. Structure and Activity of the RNA-Targeting Type III-B CRISPR-Cas Complex of *Thermus thermophilus*. *Molecular Cell*, 52(1), pp.135–145.
- Vijg J, and Suh Y. 2013. Genome instability and aging. *Annu Rev Physiol*. 75:645–68.