

Strategi Terapeutik Berasaskan CRISPR: Sempadan Baru Dalam Rawatan Kanser Payudara (CRISPR-Based Therapeutic Strategies: A New Frontier in Breast Cancer Treatment)

¹Chia Yuh Cai, ¹Saiful Effendi Syafruddin, ^{1*}M. Aiman Mohtar

¹UKM Medical Molecular Biology Institute (UMBI), Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Yaacob Latiff, Cheras 56000
Kuala Lumpur, Malaysia

*Pengarang koresponden: Dr M. Aiman Mohtar
E-mel: m.aimanmohtar@hctm.ukm.edu.my

Abstrak

Kanser payudara kekal sebagai salah satu punca utama morbiditi dan kematian berkaitan kanser di seluruh dunia. Kepelbagaian molekul dan genetiknya yang kompleks menjadi cabaran besar dalam membangunkan rawatan yang berkesan. Terapi konvensional seperti kemoterapi, terapi hormon, dan ubat sasaran sering menghadapi rintangan seperti kerintangan terhadap ubat dan kebolehan tumor untuk berulang. CRISPR/Cas9, satu teknologi penyuntingan gen yang revolusioner, telah muncul sebagai alat yang berpotensi untuk memajukan rawatan kanser payudara. Ulasan ini meneroka bagaimana CRISPR boleh digunakan untuk merawat kanser payudara dengan menumpukan kepada tiga aspek utama: menyasarkan onkogen bagi menghentikan pertumbuhan tumor, memulihkan fungsi gen penindas tumor yang sering dinyahfungsi akibat mutasi, dan mengatasi rintangan terhadap ubat. Selain itu, kami membincangkan inovasi terkini dalam sistem penghantaran CRISPR yang meningkatkan ketepatan dan kecekapannya. Walau bagaimanapun, seperti mana-mana teknologi canggih, terdapat cabaran yang perlu ditangani, termasuk kesan luar sasaran dan pertimbangan etika berkaitan penyuntingan genom. Dengan ketepatan CRISPR, penyelidik kini sedang membangunkan strategi terapeutik baharu yang boleh menjadikan rawatan kanser payudara lebih berkesan dan disesuaikan dengan individu. Seiring dengan perkembangan bidang ini, CRISPR berpotensi untuk mengubah landskap rawatan kanser payudara, memberikan harapan kepada pesakit untuk terapi yang lebih tepat.

Kata Kunci: CRISPR, Kanser Payudara, Penyuntingan Gen, Perubatan Jitu, Rintangan Ubat

Abstract

Breast cancer remains a leading cause of cancer-related illness and death worldwide. Its complexity at the molecular and genetic levels presents major challenges in developing effective treatments. Traditional therapies, including chemotherapy, hormone therapy, and targeted drugs, often face hurdles such as drug resistance and tumor recurrence. CRISPR/Cas9, a revolutionary gene-editing technology, has emerged as a promising tool to advance breast cancer treatment. This review explores the potential of CRISPR to transform breast cancer therapy. Specifically, we discuss how CRISPR can be used to target oncogenes, restore the function of tumor suppressor genes, and combat drug resistance, which is a significant barrier to successful treatment. Additionally, we highlight the latest innovations in CRISPR delivery systems that enhance its precision and efficiency. However, as with any cutting-edge technology, challenges remain, including potential off-target effects and ethical considerations surrounding genome editing. By leveraging the precision of CRISPR, researchers are developing novel therapeutic strategies that could make breast cancer treatments more effective and tailored to individual patients. As the field continues to evolve, CRISPR holds the potential to reshape the future of breast cancer therapy, offering hope for more precise treatments.

Keywords: Breast Cancer, CRISPR, Drug Resistance, Gene editing, Precision Medicine

PENGENALAN

Kanser payudara adalah penyakit kompleks, dicirikan oleh kepelbagaian genetik dan klinikal yang berpunca daripada pelbagai jenis sel dan subjenis tumor. Menurut laporan GLOBOCAN 2022 (Bray et al. 2024; Filho et al. 2025), kanser payudara adalah antara kanser kedua paling kerap didiagnosis di seluruh dunia, dengan anggaran 2.30 juta kes baharu setiap tahun serta kelaziman lima tahun sebanyak 8.18 juta merentasi kedua-dua jantina. Walaupun ia menduduki tempat keempat dalam kematian kanser global, kanser payudara kekal sebagai punca utama kematian berkaitan kanser di kalangan wanita. Di Amerika Syarikat umpamanya, ia merupakan punca kematian kanser kedua tertinggi di kalangan wanita tetapi mencatat kadar kematian tertinggi di kalangan wanita kulit hitam dan Hispanik. Sementara itu, laporan Pendaftaran Kanser Kebangsaan Malaysia (MNCR 2017-2021) yang dikeluarkan oleh Institut Kanser Negara menunjukkan bahawa kanser payudara adalah jenis kanser yang paling kerap didiagnosis di Malaysia, dengan anggaran 16,430 kes baharu (Mohd Anis Haron @ Harun 2024). Pengesanan awal kanser payudara biasanya dikaitkan dengan prognosis yang lebih baik, dengan kadar kelangsungan hidup lima tahun melebihi 80%. Walau bagaimanapun, hampir 30% pesakit yang didiagnosis dengan kanser payudara peringkat awal mengalami kekambuhan (*recurrence*) atau lebih parah lagi, penyakit mereka merebak ke organ yang lain (metastasis). Pesakit dengan metastasis sering mempunyai prognosis yang buruk, dengan kadar kelangsungan hidup yang terhad, biasanya lima tahun selepas penyakit berulang (Bray et al. 2024; Filho et al. 2025).

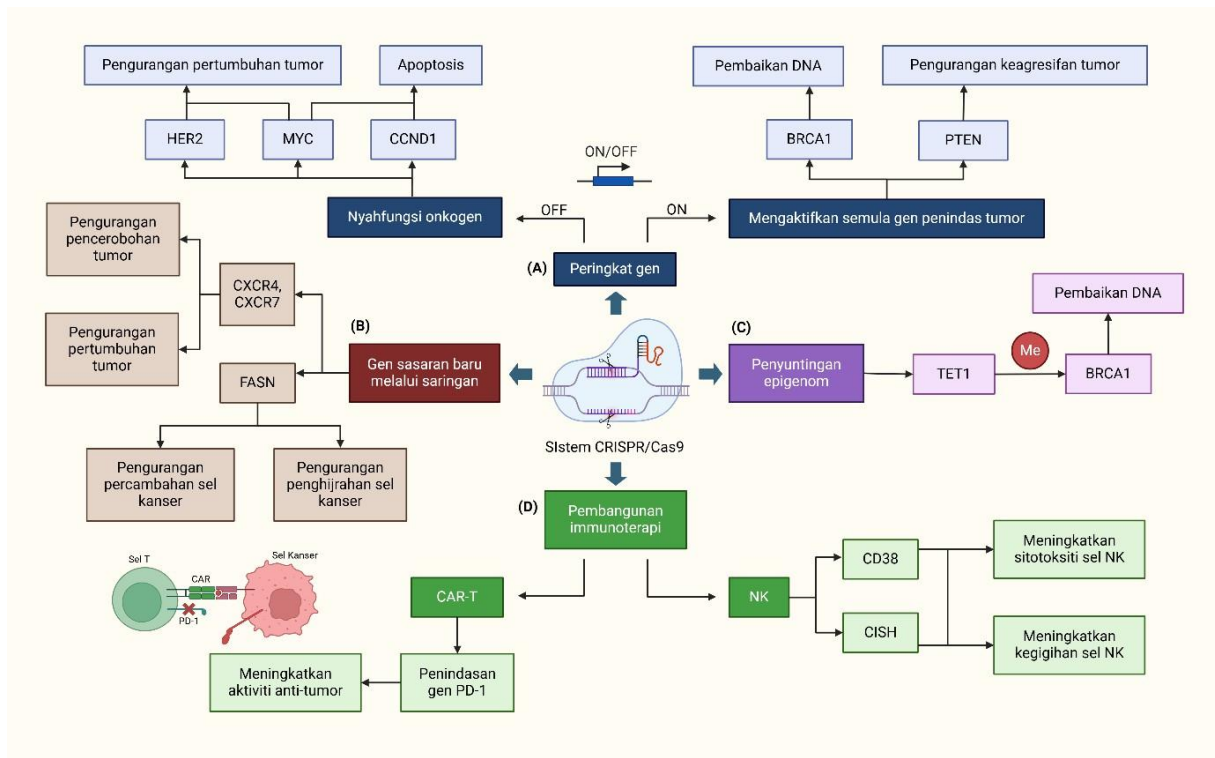
Kanser payudara boleh dikategorikan kepada beberapa subjenis berdasarkan ekspresi reseptor hormon, iaitu reseptor estrogen (ER), reseptor progesteron (PR), dan faktor pertumbuhan epidermis manusia 2 (HER2). Penilaian subjenis ini dilakukan melalui analisis imunohistokimia (Jung et al. 2024; Shaath et al. 2021). Subjenis utama termasuk luminal A, luminal B, HER2-positif, dan kanser payudara negatif tiga serangkai (TNBC), masing-masing mempamerkan tingkah laku klinikal dan tindak balas terapeutik yang berbeza. Subjenis luminal A dan B, yang mengekspresikan reseptor hormon, secara amnya kurang agresif dan mempunyai prognosis yang lebih baik berbanding subjenis HER2-positif atau TNBC (Roy et al. 2023; Zhang et al. 2014). Sebaliknya, TNBC, yang tidak mempunyai ekspresi hormon reseptor ER, PR, dan HER2, terkenal dengan sifatnya yang agresif, kadar kekambuhan yang tinggi, serta prognosis yang lebih buruk (Derakhshan & Reis-Filho 2022; Foulkes et al. 2010). Walaupun kemajuan dalam

rawatan seperti terapi sasaran dan imunoterapi telah meningkatkan kadar kelangsungan hidup bagi beberapa subjenis, cabaran dalam menangani rintangan ubat dan perkembangan penyakit masih menjadi isu utama dalam rawatan kanser payudara (Dastjerd et al. 2022; Zahari et al. 2023).

Dalam bidang penyelidikan kanser, sistem CRISPR/Cas9 telah merevolusikan kejuruteraan genetik dengan ketepatan yang tinggi dalam penyuntingan DNA (Wang et al. 2022). Pada asalnya, teknologi ini digunakan sebagai alat penyelidikan untuk memahami fungsi gen, namun kini ia sedang diterokai sebagai platform terapeutik yang berpotensi dalam menangani asas genetik kanser, termasuk kanser payudara (Dekkers et al. 2020; Kennedy et al. 2014; Sabit et al. 2021). Ulasan ini membincangkan penerapan strategi berasaskan CRISPR dalam rawatan kanser payudara, dengan memberi tumpuan kepada kemajuan terkini, sistem penghantaran CRISPR yang inovatif, serta cabaran yang masih dihadapi dalam bidang ini.

2. PENGEDITAN GEN BERASASKAN CRISPR UNTUK TERAPI KANSER PAYUDARA

Teknologi CRISPR/Cas9 pada asalnya dibangunkan sebagai alat penyelidikan bagi penyuntingan gen dengan menyasarkan jujukan DNA tertentu untuk mengganggu fungsinya (Jinek et al. 2012). Walau bagaimanapun, teknologi ini telah berkembang menjadi platform penyuntingan genom yang serba boleh, membolehkan pengubahsuaian genetik yang lebih tepat seperti penyuntingan bes (*base editing*), penyuntingan perdana (*prime editing*), dan modulasi gen menggunakan efektor protein tertentu (Anzalone et al. 2019; Cai et al. 2023; Rees et al. 2021). Kemajuan dalam teknologi CRISPR kini membolehkan pengaktifan atau penindasan transkripsi tanpa mengubah jujukan DNA, memperluaskan potensinya daripada sekadar penyasaran gen kepada penggunaan terapeutik, kajian genomik fungsian, penggunaan diagnostik, serta pembangunan model penyakit (Gilbert et al. 2014). Perkembangan ini menjadikan CRISPR sebagai alat utama dalam perubatan ketepatan dan bioteknologi. Dalam konteks kanser payudara, CRISPR/Cas9 telah menunjukkan potensi luar biasa dalam menyasarkan onkogen dan gen penindas tumor, sekali gus memajukan penyelidikan asas dan aplikasi bersifat translasi (Das et al. 2022). Teknik ini beroperasi melalui pelbagai mekanisme, termasuk nyahfungsi gen, penindasan ekspresi gen, pengaktifan semula gen, serta pengubahsuaian epigenetik (Anzalone et al. 2019; Cai et al. 2023; Rees et al. 2021). Perbincangan berikut menghuraikan beberapa mekanisme utama tersebut (Rajah 1):



Rajah 1. Pengeditan gen berasaskan CRISPR untuk terapi kanser payudara. (A) Nyahfungsi onkogen dan mengaktifkan semula gen penindas tumor. (B) Gen sasaran baru melalui saringan genetik CRISPR. (C) Penyuntingan Epigenom CRISPR. (D) Pembangunan Terapi CAR-T dan NK. Rajah ini dibuat dengan menggunakan BioRender (<https://biorender.com/>).

2.1 Nyahfungsi Onkogen

Onkogen seperti HER2, MYC, dan CCND1 sering diekspresikan secara berlebihan dalam kanser payudara dan ini menyumbang kepada pertumbuhan dan perkembangan tumor (Schuijers et al. 2018; Wang & Sun 2017; Yuan et al. 2020). Penyuntingan gen berasaskan CRISPR/Cas9 telah menunjukkan kejayaan dalam menasaskan gen ini dan seterusnya menghasilkan kesan terapeutik yang positif.

Sebagai contoh, CRISPR/Cas9 telah digunakan untuk menasaskan HER2 dalam sel kanser payudara HER2-positif selanjar BT-474 dan SK-BR-3, dan menunjukkan perencatan pertumbuhan sel serta gangguan isyarat hiliran melalui mutasi dominan-negatif tanpa semestinya menurunkan paras protein HER2 (Wang & Sun 2017). Dalam kajian mekanistik lain, penggangguan tapak 'enhancer-docking' berasaskan CTCF pada lokus MYC melalui penyuntingan genetik/epigenetik CRISPR/Cas9, mengurangkan interaksi penggalak super, menurunkan ekspresi MYC, serta menghambat percambahan sel dalam model sel tumor, termasuk konteks kanser payudara (Schuijers et al. 2018). Kajian menunjukkan kestabilan Cyclin D1 dikawal oleh paksi SHP2-PI3K/AKT/GSK3 β , menyokong kepentingan laluan Cyclin D1-CDK4/6 sebagai sasaran terapeutik (Yuan et al. 2020). Analisis pergantungan berasaskan CRISPR/RNAi menunjukkan sel payudara sensitif ubat palbociclib

lebih cenderung bergantung kepada CCND1-CDK4/6 (Foy et al. 2024). Selain itu, penyuntingan gen TTK/MPS1 menggunakan CRISPR/Cas9 di dalam sel kanser payudara TNBC MDA-MB-231, telah menunjukkan pengurangan ketara dalam percambahan sel, peningkatan apoptosis, dan penurunan pembentukan koloni secara in vitro. Kesan ini turut diterjemahkan kepada penurunan pertumbuhan tumor dalam model xenograft, menekankan potensi TTK sebagai sasaran terapeutik baharu untuk TNBC (Morrison et al. 2017; Sabit et al. 2021).

2.2 Pengaktifan Semula Gen Penindas Tumor

Gen penindas tumor seperti TP53 dan BRCA1 memainkan peranan penting dalam mencegah pertumbuhan sel kanser payudara dan mempertahankan kestabilan genom, dan kehilangan fungsinya sering dikaitkan dengan kanser payudara yang lebih agresif. Untuk memulihkan aktiviti gen-gen ini, pendekatan CRISPR berasaskan pengaktifan transkripsi/epigenetik menggunakan varian Cas9 tidak aktif (dead Cas9 (dCas9)) yang digandingkan dengan efektor protein telah dilakukan. Contohnya, gabungan CRISPR/dCas9 dengan efektor protein TET1 telah digunakan untuk menasaskan promoter BRCA1, menghasilkan penurunan metilasi pada tapak CpG tertentu dan peningkatan ekspresi transkripsi BRCA1 dalam sel selanjar HeLa dan MCF-7 (Choudhury et al. 2016).

Di samping itu, sistem pengaktifan gen CRISPR *activation* (CRISPRa), yang menggabungkan dCas9 dengan efektor protein VPR, telah diterapkan untuk mengaktifkan gen penindas tumor seperti PTEN dalam model barah payudara dan barah lain. Dalam kajian lain, penggunaan CRISPRa pada sel selanjara TNBC SUM159 membawa kepada peningkatan ekspresi PTEN dan penghambatan laluan onkogenik hiliran, tanpa bukti kesan luar sasaran (*off-targets*) yang signifikan (Moses et al. 2019).

Sebagai tambahan sokongan, dalam kajian saringan CRISPR seluruh genom yang dilakukan pada model xenograft TNBC, penyekatan beberapa gen penekan tumor atau modul teladan (mTORC2/RICTOR/Sestrin3/GATOR2/WDR59) dikombinasikan dengan pendekatan farmakologi, menunjukkan penurunan pertumbuhan tumor secara bermakna dalam model haiwan, memperkuat konsep kerentanan gen penindas sebagai sasaran terapeutik (Dai et al. 2021).

Walaupun bagaimanapun, masih terdapat kekangan seperti kecekapan pengaktifan gen, kawalan luar sasaran, dan keberkesanan untuk menembusi kepelbagaian jenis komponen sel dalam kanser payudara (*tumor heterogeneity*). Penyelidikan masa depan harus memfokus kepada pengoptimuman sistem gabungan dCas9-efektor protein dan penggunaan strategi kombinasi seperti imunoterapi untuk memperkuat impak terapeutik.

2.3 Penemuan Sasaran Baharu Melalui Saringan Genetik CRISPR

Pendekatan saringan genetik berasaskan CRISPR telah membantu mengenal pasti sasaran molekul baharu untuk terapi kanser payudara. Sebagai contoh, CXCR4 dan CXCR7, yang dikaitkan dengan metastasis, telah disasarkan secara serentak menggunakan CRISPR/Cas9 dalam sel selanjara TNBC MDA-MB-231, yang seterusnya mengubah paksi CXCL12–reseptor dan menunjukkan pengurangan agresif dalam migrasi dan invasi berbanding sel selanjara kawalan, dan juga perubahan dalam pembentukan koloni serta pertumbuhan sel (kitaran sel G1/S diperlambatkan). Kesan ini menyokong potensi paksi CXCR4/CXCR7 sebagai sasaran terapeutik dalam TNBC (Yang et al. 2019). Selain itu, FASN, gen utama dalam metabolisme lipid, telah disasarkan menggunakan CRISPR/Cas9 dalam sel selanjara Luminal A MCF-7, menyebabkan pengurangan percambahan dan migrasi sel serta pengurangan ciri agresif yang disokong oleh analisis transkriptom. Penemuan ini menegaskan peranan metabolisme lipid sebagai pendorong onkogenik di dalam kanser payudara (Gonzalez-Salinas et al. 2020).

Beberapa kajian turut mengesahkan MCL1 sebagai gen pergantungan kritikal dalam kanser

payudara. Penghapusan atau perencatan MCL-1 membawa kepada peningkatan apoptosis yang bergantung kepada BAX/BAK dan penindasan pertumbuhan tumor dalam model payudara, menekankan MCL1 sebagai sasaran terapi yang berpotensi (Campbell et al. 2021).

Beberapa kajian khusus payudara menggunakan CRISPR menunjukkan fungsi intrinsik tumor bagi gen PD-L1 (CD274), selain modulasi imun mikropersekitaran. Penyasaran PD-L1 melalui CRISPR/Cas9 di dalam MDA-MB-231 mengurangkan ciri *epithelial–mesenchymal transition* (EMT) dengan peningkatan E-cadherin/Claudin-1, penurunan Snail, menurunkan proliferasi dan pertumbuhan secara *anchorage-independent*; pemulihan ekspresi PD-L1 menyelamatkan fenotip ini (Chen et al. 2021). Penemuan ini menyokong kebolehcapaian PD-L1 sebagai molekul sasaran dan membuka ruang gabungan pendekatan CRISPR-PD-L1 dengan imunoterapi (Xu et al. 2022).

Akhir sekali, kajian fungsi KMT2C menunjukkan bahawa kehilangan KMT2C in vivo mendorong EMT, disfungsi mitokondria dan mengubah respons terhadap lapatinib dalam model kanser payudara, sejajar dengan peranan KMT2C sebagai penindas tumor. Walaupun bukan hasil skrin CRISPR berskala besar dalam payudara, bukti ini menyokong KMT2C sebagai sasaran biologi yang relevan untuk diteroka (Simigdala et al. 2023).

Dalam sel selanjara MDA-MB-231, nyahfungsi EZH2 menggunakan CRISPR mengurangkan proliferasi dan migrasi in vitro dan memperlambatkan pertumbuhan xenograft in vivo (Mao et al. 2023). Penemuan ini mencadangkan fungsi onkogenik EZH2 dalam kanser payudara subjenis TNBC.

2.4 Penyuntingan Epigenetik CRISPR

Pendekatan epigenetik banyak dilakukan dengan menggunakan variasi dCas9 yang digabungkan dengan efektor protein yang boleh mengubah kromatin/DNA. Sebagai contoh, gabungan dCas9-TET1 telah digunakan untuk menyahmetilasi lokus-spesifik pada promotor BRCA1, menghasilkan penurunan metilasi CpG yang ketara, peningkatan kandungan 5-hmC di tapak sasaran, dan kenaikan ekspresi BRCA1 yang disahkan dengan qPCR dalam sel selanjara MCF-7 dan Hela. Hasil ini menunjukkan bahawa pengaktifan semula gen penindas tumor dapat dicapai melalui pengubahsuaian epigenetik terarah (Choudhury et al. 2016). Di samping itu, penggunaan dCas9-VPR (pengaktifan) dan dCas9-KRAB (penindasan), membolehkan peningkatan atau penekanan transkripsi secara kuat dan terpilih (Good et al. 2018). Secara umum, CRISPR interference (CRISPRi) boleh mencapai ≈ 90 –99% penurunan transkrip dalam sistem sel mamalia, menunjukkan keupayaan kuantitatif yang tinggi

untuk modulasi ekspresi (Bendixen et al. 2023; Gilbert et al. 2014). Dalam konteks garis sel payudara, platform CRISPRa/i telah digunakan untuk mengaktifkan FOXP3 sambil menindas XIST dalam sel selanjut MCF-7/HCC202, dengan perubahan ekspresi diukur secara kuantitatif dari masa ke masa menggunakan qPCR, seterusnya menyerlahkan kebolehlaksanaan modulasi transkripsi berasaskan dCas9 dalam model payudara (Cui et al. 2022).

Walaupun dCas9-TET1 berkesan mengaktifkan semula gen yang disenyapkan melalui demetilasi, TET1 sendiri boleh mengaktifkan laluan onkogenik dalam TNBC melalui hipometilasi global/gen-spesifik (Good et al. 2018). Oleh itu, pemilihan efektor epigenetik lain (cth. KRAB, DNMT3A, p300, LSD1) dan tapak sasaran perlu konteks-spesifik serta disokong oleh bukti fenotip (proliferasi, apoptosis, pembentukan koloni) dan profil luar sasaran yang disahkan eksperimen sebelum aplikasi translasi.

2.5 Pembangunan Terapi Sel Berasaskan CAR-T dan NK

Teknologi CRISPR telah memperkukuh imunoterapi sel untuk kanser payudara melalui pengubahsuaian tepat sel imun T (CAR-T) dan sel pembunuh semula jadi (NK). Dalam TNBC, penghapusan PD-1 berasaskan CRISPR/Cas9 pada mesothelin-CAR-T meningkatkan fungsi efektor dan kawalan tumor in vivo berbanding CAR-T kawalan. Ini menunjukkan peningkatan pengekangan pertumbuhan tumor dan pencegahan relaps dalam model praklinikal (Hu et al. 2019).

Selanjutnya, strategi melepaskan blokade PD-1 dalam situ memperbaiki prestasi CAR-T terhadap tumor pepejal (*solid tumor*). Sebagai contoh, CAR-T anti-ROR1 yang direka bentuk untuk merembeskan anti-PD-1 berbentuk *single chain variable fragment* (scFv) secara teraruh menunjukkan pengurangan pertumbuhan tumor dan pemanjangan kelangsungan hidup dalam xenograft MDA-MB-231 (model TNBC) berbanding rejimen kawalan (Harrasser et al. 2022).

Bagi sel NK, pengubahsuaian molekul titik semakan imun (*immune checkpoint*) intrinsik menggunakan CRISPR telah meningkatkan fungsi anti-tumor. Penghapusan CISH (CISH^{-/-}) dalam iPSC-NK manusia mempertingkatkan pensinyalan IL-15, kelangsungan in vivo, dan aktiviti anti-tumor dalam model tikus, menyokong potensi aplikasi terhadap tumor pepejal (termasuk kanser payudara) sebagai terapi pelengkap atau alternatif kepada CAR-T (Zhu et al. 2020).

Di samping itu, penyasaran CD38 (pengurangan gen sebanyak ~75–92%) di dalam

sel NK menunjukkan kecekapan pengeditan tinggi dan mengurangkan fratrisid yang disebabkan oleh antibodi CD38. Pendekatan ini membolehkan peningkatan ADCC setelah kejuruteraan tambahan (cth. integrasi CD16 berafiniti tinggi). Walaupun data keberkesanan in vivo yang terperinci lebih mapan dalam model hematologi, ia menyediakan bukti konsep penting untuk pengoptimuman NK ke arah kanser pepejal (Naeimi Kararoudi et al. 2020).

Akhir sekali, di peringkat klinikal awal untuk kanser payudara dan kanser pepejal, CAR-T dengan gangguan PD-1 dan TCR menggunakan CRISPR telah diuji dalam kajian fasa I. Hasil awal menunjukkan kebolehlaksanaan dan profil keselamatan yang sangat baik. Data ini juga menyokong trajektori translasi titik semakan imun dan penyuntingan berasaskan CRISPR dalam persekitaran tumor pepejal, walaupun data khusus kanser payudara masih terhad (Wang et al. 2021).

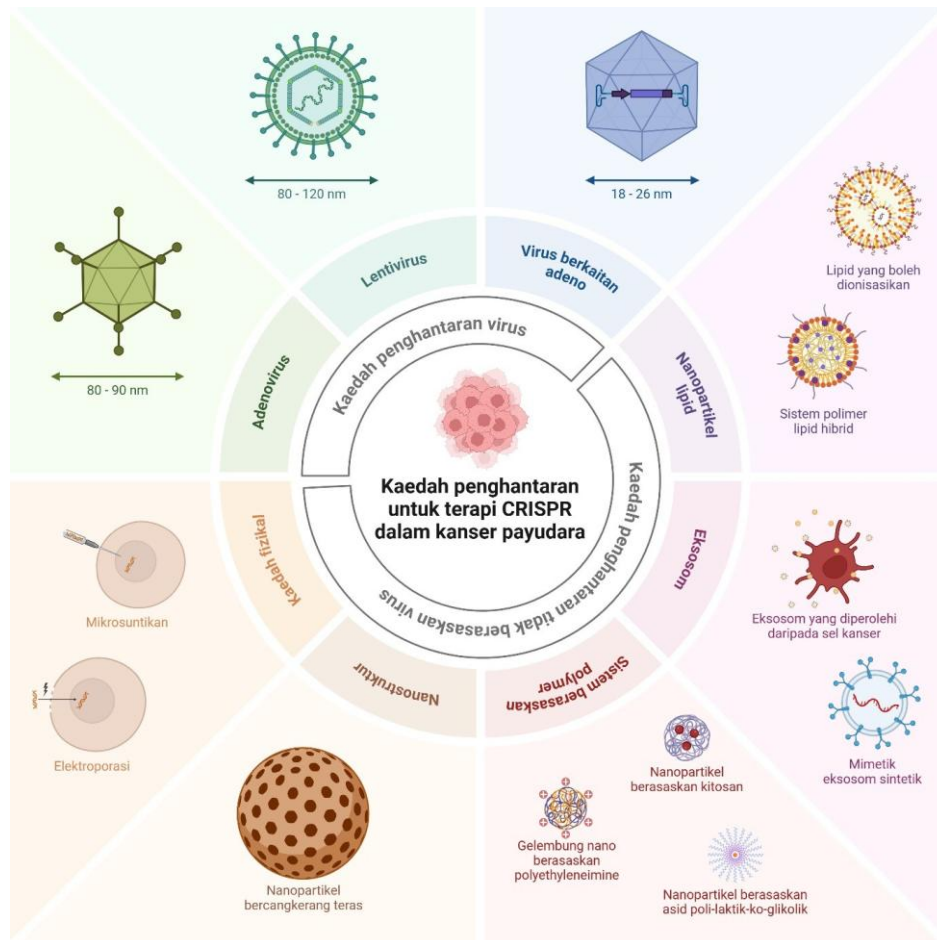
3. KAEDAH PENGHANTARAN UNTUK TERAPI CRISPR DALAM KANSER PAYUDARA

Walaupun aplikasi klinikal CRISPR masih berada pada peringkat awal, teknologi ini telah menunjukkan potensi besar dalam penyelidikan asas dan pra-klinikal untuk memahami fungsi gen dan membangunkan strategi terapeutik baharu. Pada masa ini, kebanyakan penggunaan CRISPR dalam kanser payudara masih tertumpu kepada kajian asas bagi menyahfungsikan gen onkogen atau mengaktifkan semula gen penindas tumor bagi menilai peranan molekul tertentu dalam biologi kanser. Namun begitu, pendekatan penghantaran yang sama turut menjadi asas kepada pembangunan terapi translasi, di mana sistem penghantaran CRISPR digunakan untuk menyasarkan gen secara langsung dalam tisu pesakit.

Keberkesanan terapi berasaskan CRISPR bergantung pada sistem penghantaran yang cekap dan tepat bagi memastikan penyasaran gen dalam sel atau tisu kanser payudara dilakukan dengan optimum (Khoshandam et al. 2023). Kaedah penghantaran ini secara umum dikategorikan kepada kaedah berasaskan virus dan kaedah bukan virus, masing-masing menawarkan kelebihan, kekangan dan tahap kesiediaan klinikal yang berbeza. Seksyen berikut menghuraikan pelbagai pendekatan penghantaran CRISPR yang digunakan dalam penyelidikan asas untuk memahami fungsi gen serta dalam penyelidikan translasi yang bertujuan memperkukuh potensi terapeutik CRISPR terhadap kanser payudara (Rajah 2 dan Jadual 1).

Jadual 1. Kelebihan dan cabaran kaedah penghantaran berasaskan virus dan bukan berasaskan menggunakan teknologi CRISPR.

Kaedah	Kelebihan	Cabaran / Kekurangan
Viral (AAV, Adenovirus, Lentivirus)	• Kecekapan daya penghantaran/transduksi tinggi • Integrasi stabil (<i>lentivirus</i>) • AAV: keutamaan tisu tertentu (tropisme) • Banyak digunakan dalam kajian praklinikal & klinikal	• Risiko tindak balas imun & keradangan • Potensi sisipan mutagenik (<i>insertional mutagenesis</i>) • Saiz muatan terhad (cth: AAV ≤ 4.7 kb) • Kos pengeluaran tinggi & cabaran penskalaan
Nanopartikel Lipid (LNP)	• Kecekapan tinggi untuk Cas9/sgRNA (RNP) • Dapat mengelak perangkap endosom • Sudah diuji dalam klinikal mRNA	• Ketoksikan hati pada dos tinggi • Risiko pengaktifan sistem imun • Penembusan terhad dalam tumor pepejal
Eksosom	• Vesikel semula jadi, bioserasi • Penyampaian spesifik dengan modifikasi permukaan • Ketoksikan sistemik rendah	• Sukar untuk pengeluaran skala besar • Variasi biologi tinggi antara sumber eksosom • Risiko penghantaran ke organ lain (<i>off-target biodistribution</i>)
Polimer (PEI, PLGA, Kitosan)	• Mudah direkayasa & diubahsuai • Kos lebih rendah berbanding nanostruktur kompleks • Meningkatkan kestabilan komponen CRISPR	• Sitotoksik pada kepekatan tinggi • Interaksi tidak spesifik dengan protein serum • Ketidakstabilan in vivo tanpa perlindungan tambahan
Nanostruktur (teras-kerang, magnetik, silika)	• Boleh menggabungkan CRISPR dan ubat kemoterapi (kesan sinergistik) • Penghantaran terarah menggunakan medan magnet/optik	• Reka bentuk kompleks & mahal • Kebimbangan biodegradasi jangka panjang • Potensi pengumpulan dalam hati/splina
Kaedah Fizikal (Elektroporasi, Mikrosuntikan)	• Sangat berkesan untuk penghantaran in vitro • Mikrosuntikan berguna untuk model haiwan pra-penyelidikan	• Tidak sesuai untuk aplikasi sistemik • Elektroporasi boleh merosakkan sel/tisu • Invasif & sukar diaplikasi dalam klinikal
Kaedah Baharu & Inovatif (HTVI, Nanoclews DNA, gRNA menggunakan AI)	• HTVI membolehkan penghantaran genetik sistemik dalam model in vivo • Nanoclews DNA meningkatkan kestabilan dan kecekapan penghantaran CRISPR melalui struktur RCA • Reka bentuk gRNA berasaskan AI mengurangkan kesan luar sasaran dan meningkatkan ketepatan penyasaran	• HTVI terhad kepada model haiwan kerana keperluan akses vaskular dan tekanan infusi tinggi • Nanoclews masih di peringkat pembangunan pra-klinikal tanpa data keselamatan manusia • Algoritma AI memerlukan penilaian lanjut untuk kesahan biologi dan kesesuaian lintas-spesies



Rajah 2. Kaedah penghantaran untuk terapi CRISPR dalam kanser payudara. Secara amnya, kaedah ini dikategorikan kepada dua: kaedah penghantaran virus (adenovirus, lentivirus, dan virus berkaitan adeno) dan kaedah penghantaran tidak berasaskan virus (nanopartikel lipid, eksosom, sistem berasaskan polimer, nanostruktur, dan kaedah fizikal). Rajah ini dibuat dengan menggunakan BioRender (<https://biorender.com/>).

3.1 Kaedah penghantaran berasaskan virus

Kaedah penghantaran berasaskan virus (transduksi) untuk CRISPR lazimnya menggunakan adenovirus, lentivirus, dan virus berkaitan adeno (AAV). Setiap vektor mempunyai ciri biologi berbeza: lentivirus lazimnya menyepadukan bahan genetik yang dibawanya ke dalam genom hos (ekspresi stabil), manakala adenovirus dan AAV kebanyakannya episomal; namun AAV boleh berintegrasi pada frekuensi rendah, dan apabila digandingkan dengan DSB oleh Cas9, integrasi boleh meningkat pada tapak potongan. Ciri-ciri keselamatan ini perlu dipertimbangkan jika ingin digunakan secara in vivo (Hanlon et al. 2019; Uddin et al. 2020).

Dalam konteks kanser payudara, vektor virus kerap digunakan untuk ekspresi Cas9 dan sgRNA yang stabil bagi saringan kehilangan fungsi dan pengesahan sasaran. Sebagai contoh, saringan genom menyeluruh in vivo dalam model TNBC telah mengenal pasti kerentanan laluan utama (mTOR/Hippo) yang relevan untuk kombinasi terapeutik. Walau bagaimanapun, bukti terapi CRISPR berasaskan virus secara langsung dan

husus kepada kanser payudara masih terhad kepada kajian pra-klinikal (Dai et al. 2021).

Dari segi keselamatan, data klinikal AAV-CRISPR in vivo (EDIT-101) dalam penyakit retina berkaitan gen CEP290 melaporkan profil keselamatan yang baik tanpa toksisiti had dos serta isyarat keberkesanan awal dalam fungsi visual, menandakan kebolehlaksanaan klinikal dalam tisu tertentu yang kurang imunogenik (Pierce et al. 2024). Sebaliknya, pemberian AAV sistemik berdos tinggi dikaitkan dengan keradangan/ketoksikan imun (cth: keninggian enzim hati, komplikasi hematologi), dan beberapa laporan serius telah direkodkan dan menunjukkan keperluan pemilihan serotip, kawalan dos, serta regimen immunosupresif yang teliti (Duan 2023). Tambahan pula, kajian pra-klinikal menunjukkan integrasi AAV yang tinggi (hingga ~47%) pada tapak sasaran genom apabila digunakan bersama enzim Cas9, menegaskan risiko mutagenesis sisipan yang perlu dipantau (Hanlon et al. 2019).

Secara keseluruhan, vektor virus menawarkan kecekapan transduksi dan tropisme tisu yang baik untuk penyampaian CRISPR, tetapi keradangan/

reaksi imun, risiko integrasi (terutamanya AAV di tapak DSB), had saiz kargo, dan kos pengeluaran kekal sebagai cabaran utama yang menghadkan penerjemahan klinikal skala luas, khususnya untuk aplikasi sistemik dalam tumor pepejal seperti kanser payudara. Pendekatan masa depan perlu memasukkan pemilihan vektor/dos yang berhati-hati, reka bentuk Cas9/sgRNA berdaya tinggi, serta pemantauan luar sasaran dan varian struktur berasaskan penjujukan mendalam dalam setiap kajian klinikal.

3.2 Kaedah penghantaran tidak berasaskan virus

Sistem penghantaran bukan virus telah berkembang sebagai alternatif yang lebih selamat dan fleksibel bagi terapi CRISPR, namun masih menghadapi cabaran utama dari segi kecekapan penghantaran, kestabilan *in vivo*, dan kebolehskalaan (Khoshandam et al. 2023). Secara umum, kecekapan penghantarannya adalah lebih rendah berbanding vektor virus, menyebabkan banyak kajian bergantung pada sistem pemilihan sel (cth: antibiotik, pengasingan sel menggunakan *fluorescent activated cell sorter* (FACS) untuk memastikan ekspresi komponen CRISPR di dalam populasi sel berjaya dihantar. Seksyen berikut menghuraikan beberapa jenis kaedah penghantaran tidak berasaskan virus.

3.2.1 Nanopartikel lipid (LNP)

Nanopartikel lipid (LNP) termasuk lipid boleh dionisasikan dan sistem polimer lipid hibrid telah dikaji secara meluas untuk menghantar molekul CRISPR. Sebagai contoh, LNP yang merangkumi ribonukleoprotein (RNP) Cas9 telah berjaya menyasarkan onkogen MYC dalam model kanser payudara, mengakibatkan penindasan tumor yang ketara dengan kesan luar sasaran yang minimum (Im et al. 2024). Walaupun LNP mengelakkan perangkap endosom dengan lebih berkesan, ia masih menghadapi masalah ketoksikan hati pada dos tinggi, risiko pengaktifan sistem imun semula jadi, dan pengagihan tidak seragam dalam tumor padat. Tambahan lagi, LNP sukar menembusi halangan stromal dan vaskular dalam kanser payudara dan ini membatasi keberkesanan *in vivo* (Chaudhuri et al. 2022).

LNP telah mencapai ujian klinikal awal untuk terapi penyuntingan gen. Sebagai contoh, NTLA-2001, iaitu terapi berasaskan CRISPR-LNP untuk amyloidosis transthyretin, menunjukkan pengurangan protein TTR sebanyak ~87% dalam pesakit (Gillmore et al. 2021). Ini menandakan platform LNP sebagai antara sistem bukan virus yang paling hampir kepada aplikasi klinikal.

3.2.2 Eksosom

Eksosom, iaitu vesikel ekstraselular semula jadi, telah direka bentuk untuk menghantar komponen CRISPR/Cas9 dengan lebih spesifik, mengurangkan ketoksikan sistemik serta meningkatkan keberkesanan terapi (Balaraman et al. 2025). Eksosom bukan sahaja digunakan dalam kanser payudara tetapi juga dalam kanser lain seperti kanser otak (glioblastoma) dan kanser hati, namun ia telah terbukti meningkatkan penghantaran dan kesan terapeutik dengan menyasarkan onkogen serta memodulasi mikroperekitaran tumor (Horodecka & D  chler 2021). Masih terdapat kesukaran dalam pengeluaran besar-besaran, standarisasi muatan Cas9/sgRNA, dan kebolehubahan biologi antara sumber eksosom. Tambahan pula, terdapat risiko penghantaran ke organ lain (*off-target biodistribution*), kerana eksosom boleh diambil oleh organ hati dan limpa sebelum sampai ke tumor. Eksosom sedang diuji dalam beberapa percubaan klinikal sebagai pembawa siRNA/mRNA (contohnya EXO-CD24 untuk rawatan COVID-19), namun aplikasi spesifik CRISPR masih di peringkat pra-klinikal (Balaraman et al. 2025; Horodecka & D  chler 2021).

3.2.3 Sistem Berasaskan Polimer

Gelembung nano berasaskan polyethyleneimine (PEI), yang diubah suai secara khusus dengan ligan sasaran tumor, telah menunjukkan potensi tinggi dalam menyampaikan komponen CRISPR/Cas9. Sistem ini menyasarkan gen seperti CDH2 dalam model TNBC, meningkatkan kecekapan penyuntingan gen dengan memanfaatkan interaksi dengan reseptor kanser tertentu dan memudahkan pelolosan endosom (Fahira et al. 2022). Selain itu, nanopartikel polimer seperti kitosan dan polimer asid poli-laktik-ko-glikolik (PLGA) juga telah menunjukkan kejayaan dalam kajian praklinikal dengan meningkatkan kestabilan dan ketersediaan komponen CRISPR (Li et al. 2024).

3.2.4 Nanostruktur

Nanopartikel bercangkerang teras seperti yang diperbuat daripada silika atau teras magnetik, telah digunakan untuk penghantaran serentak CRISPR dan agen kemoterapi (Wang et al. 2025). Kaedah ini bukan sahaja meningkatkan kecekapan penghantaran, tetapi juga memberikan kesan anti-tumor sinergistik melalui gabungan penyuntingan gen dan terapi sitotoksik langsung. Sistem ini telah disahkan dalam model praklinikal kanser payudara dan paru-paru, dengan menunjukkan keberkesanan

terapeutik yang lebih tinggi serta pengurangan ketoksikan sistemik. Walaupun menarik, reka bentuk nanostruktur adalah kompleks dan mahal, dengan isu kebolehan biodegradasi jangka panjang serta potensi pengumpulan dalam organ retikuloendotelial (hati/splina).

3.2.5 Kaedah Fizikal

Selain kaedah biologi dan kimia, kaedah fizikal juga digunakan untuk penghantaran CRISPR dalam kanser payudara. Mikrosuntikan dan elektroporasi sering digunakan dalam kajian *in vivo* (Bhowmik & Chaubey 2022). Sebagai contoh, Cas9 mRNA dan gRNA telah disuntik terus ke dalam embrio peringkat satu sel bagi menghasilkan model tikus transgenik untuk kajian model TNBC (Annunziato et al. 2020; Qin et al. 2016). Walau bagaimanapun, mikrosuntikan embrio ini masih dalam peringkat praklinikal dan bukan kaedah terapi langsung untuk pesakit kanser.

Sebaliknya, kaedah elektroporasi yang menggunakan denyutan elektrik untuk membuka liang sementara dalam membran sel, telah digunakan secara meluas dalam pemindahan gen dan penghantaran komponen CRISPR ke dalam sel tumor (Sayed et al. 2022). Dalam *in vitro*, ia kerap digunakan untuk memperkenalkan binaan CRISPR ke dalam sel kultur dengan membuka liang sementara pada membran sel menggunakan denyutan elektrik (Zeng et al. 2020). Dalam *in vivo*, elektroporasi telah disesuaikan untuk menyampaikan komponen CRISPR terus ke tisu tertentu, seperti otot atau kulit, selepas suntikan bahan genetik (Sharma et al. 2023). Namun begitu, kaedah ini bersifat invasif, sukar diaplikasikan secara sistemik, dan boleh menyebabkan kematian sel/tisu jika denyutan elektrik tidak dioptimumkan. Oleh itu, penggunaannya lebih sesuai untuk kajian *in vitro* atau penyampaian tempatan *in vivo*, tetapi bukan untuk terapi sistemik.

3.2.6 Kaedah Penghantaran Baru dan Inovatif

Strategi penghantaran baharu, seperti suntikan urat ekor hidrodinamik (HTVI), menawarkan kaedah penghantaran CRISPR yang lebih cekap dalam konteks penggunaan tertentu. HTVI digunakan secara meluas dalam model *in vivo* kerana keupayaannya untuk menghantar bahan genetik secara sistematik ke seluruh tubuh melalui infusi tekanan tinggi yang pantas. Kaedah ini amat sesuai untuk menyasarkan organ tertentu seperti hati, tetapi penggunaannya dalam eksperimen *in vitro* adalah terhad kerana pergantungannya terhadap akses vaskular (Niola et al. 2019).

Kemajuan dalam biologi sintetik juga telah membuka jalan kepada sistem penghantaran

CRISPR yang lebih efisien. Ini termasuk Nanoclews DNA iaitu bebenang nanopartikel DNA yang disintesis menggunakan *rolling circle amplification* (RCA), yang dapat meningkatkan kecekapan penghantaran CRISPR. Selain itu, panduan RNA (gRNA) yang dipacu kecerdasan buatan (AI) dapat membantu mengurangkan kesan luar sasaran dan meningkatkan ketepatan penghantaran CRISPR (Abbasi et al. 2025; Zhang et al. 2023).

4. MENGATASI RINTANGAN UBAT MENGGUNAKAN CRISPR

Rintangan ubat adalah halangan utama dalam rawatan kanser payudara, sering menyebabkan kegagalan terapi dan perkembangan penyakit. Teknologi CRISPR/Cas9 berupaya mengenal pasti dan menyasarkan mekanisme rintangan dengan memodifikasi perubahan genetik yang bertanggungjawab terhadap ketahanan ubat (Vaghari-Tabari et al. 2022).

Satu aplikasi CRISPR yang ketara ialah dalam menangani rintangan terapi hormon dalam kanser payudara reseptor ER-positif. Mutasi ESR1 adalah punca utama rintangan terhadap rawatan seperti tamoxifen dan perencat aromatase. CRISPR/Cas9 telah berjaya mengganggu alel mutan ESR1, sekali gus memulihkan sensitiviti terhadap terapi hormon dalam model praklinikal (Hanker et al. 2020). Selain itu, sasaran gen CDK7, pemacu penting dalam kanser payudara TNBC, oleh CRISPR menyebabkan penindasan pertumbuhan tumor yang ketara (Wang et al. 2015).

CRISPR juga telah digunakan untuk mengatasi rintangan terhadap terapi yang disasarkan HER2, seperti trastuzumab (Li et al. 2025). Rintangan terhadap trastuzumab boleh berpunca daripada mutasi dalam laluan isyarat seperti PIK3CA atau kehilangan PTEN. CRISPR/Cas9 telah digunakan untuk menyasarkan dan membaiki gen-gen ini, seterusnya meningkatkan keberkesanan terapi HER2 dan mengurangkan pertumbuhan tumor.

Selain itu, CRISPR telah menunjukkan potensi besar dalam menangani rintangan pelbagai ubat (MDR). Ekspresi berlebihan pengangkut ABC (seperti ABCB1) menyumbang kepada MDR dengan meningkatkan pengepaman keluar ubat kemoterapi, seterusnya mengurangkan keberkesanan rawatan. Nyahfungsi ABCB1 menggunakan CRISPR/Cas9 telah memulihkan sensitiviti sel kanser payudara terhadap ubat seperti doxorubicin dan paclitaxel (Liu et al. 2016; Yang et al. 2016).

Satu lagi aplikasi penting dalam kanser payudara adalah gabungan CRISPR dan rawatan sedia ada. Dalam kanser payudara yang kekurangan BRCA1, strategi gabungan CRISPR dengan inhibitor PARP telah meningkatkan kemosisitiviti,

membuka jalan baru untuk rawatan mutasi BRCA1 (Eskandari et al. 2024).

Secara keseluruhannya, CRISPR/Cas9 menawarkan pendekatan revolusioner dalam memahami dan mengatasi rintangan ubat dalam kanser payudara. Dengan penyuntingan gen yang tepat, terapi CRISPR dapat disesuaikan secara peribadi, sejajar dengan konsep perubatan jitu (Chen & Zhang 2018; Shirani-Bidabadi et al. 2023; Vaghari-Tabari et al. 2022).

5. CABARAN DAN LIMITASI

Walaupun pelbagai pendekatan inovatif telah diperkenalkan untuk meningkatkan kecekapan penghantaran dan ketepatan penyuntingan CRISPR, beberapa cabaran kritikal masih perlu diatasi sebelum teknologi ini dapat diterjemahkan secara meluas ke dalam aplikasi klinikal. Antara cabaran utama ialah memastikan kekhususan tumor yang tinggi dan meminimumkan tindak balas imunogenik yang mungkin timbul akibat penghantaran komponen CRISPR ke dalam badan pesakit. Sistem penghantaran semasa termasuk kaedah berasaskan virus dan bukan virus, masih memerlukan pengoptimuman lanjut untuk mencapai keseimbangan keberkesanan penghantaran dan risiko kesan sampingan terhadap sel atau tisu sihat (Sharma et al. 2023; Zeng et al. 2020).

Di samping itu, kesan luar sasaran kekal menjadi kebimbangan utama kerana penyuntingan gen yang tidak diingini boleh menyebabkan ketidakstabilan genomik serta kesan fenotip yang tidak dijangka (Guo et al. 2023). Walaupun pembangunan varian Cas9 berdaya tinggi (*high fidelity*) dan panduan sgRNA berasaskan kecerdasan buatan telah mengurangkan risiko ini, tahap keselamatan yang optimum masih belum dicapai sepenuhnya (Jain et al. 2024). Tambahan pula, kepelbagaian genetik dan fenotip dalam sel kanser menyukarkan pembangunan terapi universal yang berkesan untuk semua jenis pesakit, sekali gus memerlukan pendekatan yang lebih bersasar dan disesuaikan mengikut konteks biologi tumor individu.

Di Malaysia, penyelidikan berasaskan CRISPR semakin berkembang dengan sokongan infrastruktur seperti biobank berskala besar, kemudahan genomik, kejuruteraan genetik, serta institusi penyelidikan molekul dan perubatan translasi yang setanding di peringkat serantau (Jamal et al. 2015; Kalidasan & Theva Das 2021). Malaysia juga mempunyai kepakaran yang semakin meningkat dalam bidang biologi molekul, bioinformatik, dan bioteknologi, hasil pelaburan kerajaan melalui Kementerian Pendidikan Tinggi (KPT) dan Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi (MOSTI). Walau

bagaimanapun, cabaran utama ialah kos teknologi yang tinggi, keperluan sumber manusia yang lebih meluas dalam pengendalian sistem klinikal berasaskan CRISPR, serta rangka kerja regulasi tempatan yang masih dalam fasa awal pembangunan untuk terapi gen. Justeru, kolaborasi dengan pusat penyelidikan antarabangsa, pemerkasaan latihan tenaga pakar tempatan, dan pembangunan garis panduan etika serta klinikal adalah langkah penting bagi memastikan Malaysia dapat bersedia menerima aplikasi klinikal CRISPR pada masa hadapan.

Isu etika dan regulasi juga menjadi penghalang utama, khususnya melibatkan penyuntingan sel germline yang menimbulkan kebimbangan moral dan keselamatan jangka panjang (Gostimskaya 2022; Uddin et al. 2020). Sebarang aplikasi klinikal CRISPR perlu mematuhi garis panduan antarabangsa dan rangka kerja perundangan yang ketat bagi memastikan keselamatan dan penerimaan masyarakat.

Akhir sekali, walaupun teknologi CRISPR asas telah menunjukkan potensi besar, variasi generasi baharu seperti penyuntingan bes dan penyuntingan perdana menawarkan ketepatan serta kecekapan yang lebih tinggi, sekali gus memperluaskan potensi aplikasi dalam terapi kanser payudara dan kanser lain (Anzalone et al. 2019; Gaudelli et al. 2017; Mohamad Zambari et al. 2024; Wong et al. 2021). Kemajuan teknologi ini, bersama-sama integrasi pendekatan pelbagai modaliti seperti imunoterapi CAR-T atau terapi sel NK, berpotensi membawa kepada pembangunan strategi rawatan kanser payudara yang lebih berkesan pada masa hadapan.

6. KESIMPULAN

Teknologi CRISPR/Cas9 membawa potensi transformatif dalam rawatan kanser payudara, membolehkan penyasaran genetik yang jitu terhadap onkogen dan gen penindas tumor. Walaupun cabaran seperti kesan luar sasaran dan sistem penghantaran masih wujud, penyelidikan yang berterusan berpotensi mengatasi batasan ini. Dengan inovasi dalam bioteknologi dan sistem penghantaran CRISPR, terapi ini boleh merevolusikan landskap rawatan kanser bukan sahaja untuk kanser payudara, tetapi juga kanser lain di seluruh dunia.

PENGHARGAAN

Penerbitan ini dibiayai oleh Dana Padanan Kolaborasi (DPK) Geran Pembiayaan Sepadan (GPS) GPS-DPK-2023-001 daripada Universiti Kebangsaan Malaysia.

RUJUKAN

- Abbasi, A. F., Asim, M. N. & Dengel, A. 2025. Transitioning from wet lab to artificial intelligence: a systematic review of AI predictors in CRISPR. *J Transl Med* 23(1): 153.
- Annunziato, S., Lutz, C., Henneman, L., Bhin, J., Wong, K., Siteur, B., Van Gerwen, B., De Korte-Grimmerink, R., Zafra, M. P., Schatoff, E. M., Drenth, A. P., Van Der Burg, E., Eijkman, T., Mukherjee, S., Boroviak, K., Wessels, L. F., Van De Ven, M., Huijbers, I. J., Adams, D. J., Dow, L. E. & Jonkers, J. 2020. In situ CRISPR-Cas9 base editing for the development of genetically engineered mouse models of breast cancer. *EMBO J* 39(5): e102169.
- Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., Chen, P. J., Wilson, C., Newby, G. A., Raguram, A. & Liu, D. R. 2019. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576(7785): 149-157.
- Balaraman, A. K., Babu, M. A., Moglad, E., Mandaliya, V., Rekha, M. M., Gupta, S., Prasad, G. V. S., Kumari, M., Chauhan, A. S., Ali, H. & Goyal, K. 2025. Exosome-mediated delivery of CRISPR-Cas9: A revolutionary approach to cancer gene editing. *Pathol Res Pract* 266: 155785.
- Bendixen, L., Jensen, T. I. & Bak, R. O. 2023. CRISPR-Cas-mediated transcriptional modulation: The therapeutic promises of CRISPRa and CRISPRi. *Mol Ther* 31(7): 1920-1937.
- Bhowmik, R. & Chaubey, B. 2022. CRISPR/Cas9: a tool to eradicate HIV-1. *AIDS Res Ther* 19(1): 58.
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I. & Jemal, A. 2024. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 74(3): 229-263.
- Cai, R., Lv, R., Shi, X., Yang, G. & Jin, J. 2023. CRISPR/dCas9 Tools: Epigenetic Mechanism and Application in Gene Transcriptional Regulation. *Int J Mol Sci* 24(19): 14865.
- Campbell, K. J., Mason, S. M., Winder, M. L., Willemsen, R. B. E., Cloix, C., Lawson, H., Rooney, N., Dhayade, S., Sims, A. H., Blyth, K. & Tait, S. W. G. 2021. Breast cancer dependence on MCL-1 is due to its canonical anti-apoptotic function. *Cell Death Differ* 28(9): 2589-2600.
- Chaudhuri, A., Kumar, D. N., Shaik, R. A., Eid, B. G., Abdel-Naim, A. B., Md, S., Ahmad, A. & Agrawal, A. K. 2022. Lipid-Based Nanoparticles as a Pivotal Delivery Approach in Triple Negative Breast Cancer (TNBC) Therapy. *Int J Mol Sci* 23(17): 10068.
- Chen, C., Li, S., Xue, J., Qi, M., Liu, X., Huang, Y., Hu, J., Dong, H. & Ling, K. 2021. PD-L1 tumor-intrinsic signaling and its therapeutic implication in triple-negative breast cancer. *JCI Insight* 6(8): 10068.
- Chen, Y. & Zhang, Y. 2018. Application of the CRISPR/Cas9 System to Drug Resistance in Breast Cancer. *Adv Sci (Weinh)* 5(6): 1700964.
- Choudhury, S. R., Cui, Y., Lubecka, K., Stefanska, B. & Irudayaraj, J. 2016. CRISPR-dCas9 mediated TET1 targeting for selective DNA demethylation at BRCA1 promoter. *Oncotarget* 7(29): 46545-46556.
- Cui, X., Zhang, C., Xu, Z., Wang, S., Li, X., Stringer-Reasor, E., Bae, S., Zeng, L., Zhao, D., Liu, R., Qi, L. S. & Wang, L. 2022. Dual CRISPR interference and activation for targeted reactivation of X-linked endogenous FOXP3 in human breast cancer cells. *Mol Cancer* 21(1): 38.
- Dai, M., Yan, G., Wang, N., Daliah, G., Edick, A. M., Poulet, S., Boudreault, J., Ali, S., Burgos, S. A. & Lebrun, J. J. 2021. In vivo genome-wide CRISPR screen reveals breast cancer vulnerabilities and synergistic mTOR/Hippo targeted combination therapy. *Nat Commun* 12(1): 3055.
- Das, S., Bano, S., Kapse, P. & Kundu, G. C. 2022. CRISPR based therapeutics: a new paradigm in cancer precision medicine. *Mol Cancer* 21(1): 85.
- Dastjerd, N. T., Valibeik, A., Rahimi Monfared, S., Goodarzi, G., Moradi Sarabi, M., Hajabdollahi, F., Maniati, M., Amri, J. & Samavarchi Tehrani, S. 2022. Gene therapy: A promising approach for breast cancer treatment. *Cell Biochem Funct* 40(1): 28-48.
- Dekkers, J. F., Whittle, J. R., Vaillant, F., Chen, H. R., Dawson, C., Liu, K., Geurts, M. H., Herold, M. J., Clevers, H., Lindeman, G. J. & Visvader, J. E. 2020. Modeling Breast Cancer Using CRISPR-Cas9-Mediated Engineering of Human Breast Organoids. *J Natl Cancer Inst* 112(5): 540-544.
- Derakhshan, F. & Reis-Filho, J. S. 2022. Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. *Annu Rev Pathol* 17: 181-204.
- Duan, D. 2023. Lethal immunotoxicity in high-dose systemic AAV therapy. *Mol Ther* 31(11): 3123-3126.
- Eskandari, F., Aali, M., Hadisadegh, S. N. & Azadeh, M. 2024. Advances in breast cancer research using CRISPR/Cas9 system. *Nano Select* 5(10): 2400015.
- Fahira, A. I., Amalia, R., Barliana, M. I., Gatera, V. A. & Abdulah, R. 2022. Polyethyleneimine (PEI) as a Polymer-Based Co-Delivery System for Breast Cancer Therapy. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 14: 71-83.
- Filho, A. M., Laversanne, M., Ferlay, J., Colombet, M., Piñeros, M., Znaor, A., Parkin, D. M., Soerjomataram, I. & Bray, F. 2025. The GLOBOCAN 2022 cancer estimates: Data sources, methods, and a snapshot of the cancer burden worldwide. *Int J Cancer* 156(7): 336-1346.
- Foulkes, W. D., Smith, I. E. & Reis-Filho, J. S. 2010. Triple-negative breast cancer. *N Eng J Med* 363(20): 1938-1948.
- Foy, R., Lew, K. X. & Saurin, A. T. 2024. The search for CDK4/6 inhibitor biomarkers has been hampered by inappropriate proliferation assays. *NPJ Breast Cancer* 10(1): 19.
- Gaudelli, N. M., Komor, A. C., Rees, H. A., Packer,

- M. S., Badran, A. H., Bryson, D. I. & Liu, D. R. 2017. Programmable base editing of A*T to G*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 551(7681): 464-471.
- Gilbert, L. A., Horlbeck, M. A., Adamson, B., Villalta, J. E., Chen, Y., Whitehead, E. H., Guimaraes, C., Panning, B., Ploegh, H. L., Bassik, M. C., Qi, L. S., Kampmann, M. & Weissman, J. S. 2014. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell* 159(3): 647-661.
- Gilbert, L. A., Horlbeck, M. A., Adamson, B., Villalta, J. E., Chen, Y., Whitehead, E. H., Guimaraes, C., Panning, B., Ploegh, H. L., Bassik, M. C., Qi, L. S., Kampmann, M. & Weissman, J. S. 2014. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell* 159(3): 647-661.
- Gillmore, J. D., Gane, E., Taubel, J., Kao, J., Fontana, M., Maitland, M. L., Seitzer, J., O'connell, D., Walsh, K. R., Wood, K., Phillips, J., Xu, Y., Amaral, A., Boyd, A. P., Cehelsky, J. E., Mckee, M. D., Schiermeier, A., Harari, O., Murphy, A., Kyratsous, C. A., Zambrowicz, B., Soltys, R., Gutstein, D. E., Leonard, J., Sepp-Lorenzino, L. & Lebowitz, D. 2021. CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med* 385(6): 493-502.
- Gonzalez-Salinas, F., Rojo, R., Martinez-Amador, C., Herrera-Gamboa, J. & Trevino, V. 2020. Transcriptomic and cellular analyses of CRISPR/Cas9-mediated edition of FASN show inhibition of aggressive characteristics in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 529(2): 321-327.
- Good, C. R., Panjarian, S., Kelly, A. D., Madzo, J., Patel, B., Jelinek, J. & Issa, J. J. 2018. TET1-Mediated Hypomethylation Activates Oncogenic Signaling in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res* 78(15): 4126-4137.
- Gostimskaya, I. 2022. CRISPR-Cas9: A History of Its Discovery and Ethical Considerations of Its Use in Genome Editing. *Biochemistry (Mosc)* 87(8): 777-788.
- Guo, C., Ma, X., Gao, F. & Guo, Y. 2023. Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing. *Front Bioeng Biotechnol* 11: 1143157.
- Hanker, A. B., Sudhan, D. R. & Arteaga, C. L. 2020. Overcoming Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Cancer Cell* 37(4): 496-513.
- Hanlon, K. S., Kleinstiver, B. P., Garcia, S. P., Zaborowski, M. P., Volak, A., Spirig, S. E., Muller, A., Sousa, A. A., Tsai, S. Q., Bengtsson, N. E., Loov, C., Ingelsson, M., Chamberlain, J. S., Corey, D. P., Aryee, M. J., Joung, J. K., Breakefield, X. O., Maguire, C. A. & Gyorgy, B. 2019. High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks. *Nat Commun* 10(1): 4439.
- Harrasser, M., Gohil, S. H., Lau, H., Della Peruta, M., Muczynski, V., Patel, D., Miranda, E., Grigoriadis, K., Grigoriadis, A., Granger, D., Evans, R. & Nathwani, A. C. 2022. Inducible localized delivery of an anti-PD-1 scFv enhances anti-tumor activity of ROR1 CAR-T cells in TNBC. *Breast Cancer Res* 24(1): 39.
- Horodecka, K. & D  chler, M. 2021. CRISPR/Cas9: Principle, Applications, and Delivery through Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci* 22(11): 6072.
- Hu, W., Zi, Z., Jin, Y., Li, G., Shao, K., Cai, Q., Ma, X. & Wei, F. 2019. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances human mesothelin-targeted CAR T cell effector functions. *Cancer Immunol Immunother* 68(3): 365-377.
- Im, S. H., Jang, M., Park, J. H. & Chung, H. J. 2024. Finely tuned ionizable lipid nanoparticles for CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein delivery and gene editing. *J Nanobiotechnology* 22(1): 175.
- Jain, Y., Izzath, F. a. M., Wilson, L. O. W. & Bauer, D. C. 2024. Data Visualization of CRISPR-Cas9 Guide RNA Design Tools. *Stud Health Technol Inform* 310: 770-774.
- Jamal, R., Syed Zakaria, S. Z., Kamaruddin, M. A., Abd Jalal, N., Ismail, N., Mohd Kamil, N., Abdullah, N., Baharudin, N., Hussin, N. H., Othman, H., Mahadi, N. M. & Malaysian Cohort Study, G. 2015. Cohort Profile: The Malaysian Cohort (TMC) project: a prospective study of non-communicable diseases in a multi-ethnic population. *Int J Epidemiol* 44(2): 423-431.
- 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.
- Jung, M., Song, S. G., Cho, S. I., Shin, S., Lee, T., Jung, W., Lee, H., Park, J., Song, S., Park, G., Song, H., Park, S., Lee, J., Kang, M., Park, J., Pereira, S., Yoo, D., Chung, K., Ali, S. M. & Kim, S. W. 2024. Augmented interpretation of HER2, ER, and PR in breast cancer by artificial intelligence analyzer: enhancing interobserver agreement through a reader study of 201 cases. *Breast Cancer Res* 26(1): 31.
- Kalidasan, V. & Theva Das, K. 2021. Is Malaysia Ready for Human Gene Editing: A Regulatory, Biosafety and Biosecurity Perspective. *Front Bioeng Biotechnol* 9: 649203.
- Kennedy, E. M., Kornepati, A. V., Goldstein, M., Bogerd, H. P., Poling, B. C., Whisnant, A. W., Kastan, M. B. & 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. *J Virol* 88(20): 11965-11972.
- Khoshandam, M., Soltaninejad, H., Mousazadeh, M., Hamidieh, A. A. & Hosseinkhani, S. 2023. Clinical applications of the CRISPR/Cas9 genome-editing system: Delivery options and challenges in precision medicine. *Genes Dis* 11(1): 268-282.
- Li, X., Zhang, X., Yin, S. & Nie, J. 2025. Challenges and prospects in HER2-positive breast cancer-targeted therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 207: 104624.
- Li, Y., Li, C., Yan, J., Liao, Y., Qin, C., Wang, L., Huang, Y., Yang, C., Wang, J., Ding, X., Yang, Y. Y. & Yuan, P. 2024. Polymeric

- micellar nanoparticles for effective CRISPR/Cas9 genome editing in cancer. *Biomaterials* 309: 22573.
- Liu, T., Li, Z., Zhang, Q., De Amorim Bernstein, K., Lozano-Calderon, S., Choy, E., Hornicek, F. J. & Duan, Z. 2016. Targeting ABCB1 (MDR1) in multi-drug resistant osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system to reverse drug resistance. *Oncotarget* 7(50): 83502-83513.
- Mao, Q., Wu, P., Li, H., Fu, X., Gao, X. & Yang, L. 2023. CRISPR/Cas9-mediated EZH2 knockout suppresses the proliferation and migration of triple-negative breast cancer cells. *Oncol Lett* 26(2): 343.
- Mohamad Zamberi, N. N., Abuhamad, A. Y., Low, T. Y., Mohtar, M. A. & Syafruddin, S. E. 2024. dCas9 Tells Tales: Probing Gene Function and Transcription Regulation in Cancer. *CRISPR J* 7(2): 73-87.
- Mohd Anis Haron @ Harun, S. a. L. R., Nurulaisyah Binti Hamzah, Siti Maryam Binti Muhamat, Balqis Binti Bahtiar. 2024. Summary of The Malaysia National Cancer Registry Report (2017-2021). Institut Kanser Negara.
- Morrison, C. D., Chang, J. C., Keri, R. A. & Schiemann, W. P. 2017. Mutant p53 dictates the oncogenic activity of c-Abl in triple-negative breast cancers. *Cell Death Dis* 8(6): e2899.
- Moses, C., Nugent, F., Waryah, C. B., Garcia-Bloj, B., Harvey, A. R. & Blancafort, P. 2019. Activating PTEN Tumor Suppressor Expression with the CRISPR/dCas9 System. *Mol Ther Nucleic Acids* 14: 287-300.
- Naeimi Kararoudi, M., Nagai, Y., Elmas, E., De Souza Fernandes Pereira, M., Ali, S. A., Imus, P. H., Wethington, D., Borrello, I. M., Lee, D. A. & Ghiaur, G. 2020. CD38 deletion of human primary NK cells eliminates daratumumab-induced fratricide and boosts their effector activity. *Blood* 136(21): 2416-2427.
- Niola, F., Dagnæs-Hansen, F. & Frödin, M. 2019. In Vivo Editing of the Adult Mouse Liver Using CRISPR/Cas9 and Hydrodynamic Tail Vein Injection. *Methods Mol Biol* 1961: 329-341.
- Pierce, E. A., Aleman, T. S., Jayasundera, K. T., Ashimatey, B. S., Kim, K., Rashid, A., Jaskolka, M. C., Myers, R. L., Lam, B. L., Bailey, S. T., Comander, J. I., Lauer, A. K., Maguire, A. M. & Pennesi, M. E. 2024. Gene Editing for CEP290-Associated Retinal Degeneration. *N Engl J Med* 390(21): 1972-1984.
- Qin, W., Kutny, P. M., Maser, R. S., Dion, S. L., Lamont, J. D., Zhang, Y., Perry, G. A. & Wang, H. 2016. Generating Mouse Models Using CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing. *Curr Protoc Mouse Biol* 6(1): 39-66.
- Rees, H. A., Minella, A. C., Burnett, C. A., Komor, A. C. & Gaudelli, N. M. 2021. CRISPR-derived genome editing therapies: Progress from bench to bedside. *Mol Ther* 29(11): 3125-3139.
- Roy, M., Fowler, A. M., Ulaner, G. A. & Mahajan, A. 2023. Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clin* 18(4): 441-458.
- Sabit, H., Abdel-Ghany, S., Tombuloglu, H., Cevik, E., Alqosaibi, A., Almulhim, F. & Al-Muhanaa, A. 2021. New insights on CRISPR/Cas9-based therapy for breast Cancer. *Genes Environ* 43(1): 15.
- Sayed, N., Allawadhi, P., Khurana, A., Singh, V., Navik, U., Pasumarthi, S. K., Khurana, I., Banothu, A. K., Weiskirchen, R. & Bharani, K. K. 2022. Gene therapy: Comprehensive overview and therapeutic applications. *Life Sci* 294: 20375.
- Schuijers, J., Manteiga, J. C., Weintraub, A. S., Day, D. S., Zamudio, A. V., Hnisz, D., Lee, T. I. & Young, R. A. 2018. Transcriptional Dysregulation of MYC Reveals Common Enhancer-Docking Mechanism. *Cell Rep* 23(2): 349-360.
- Shaath, H., Elango, R. & Alajez, N. M. 2021. Molecular Classification of Breast Cancer Utilizing Long Non-Coding RNA (lncRNA) Transcriptomes Identifies Novel Diagnostic lncRNA Panel for Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 13(21): 5350.
- Sharma, A., Boelens, J. J., Cancio, M., Hankins, J. S., Bhad, P., Azizy, M., Lewandowski, A., Zhao, X., Chitnis, S., Peddinti, R., Zheng, Y., Kapoor, N., Ciceri, F., Maclachlan, T., Yang, Y., Liu, Y., Yuan, J., Naumann, U., Yu, V. W. C., Stevenson, S. C., De Vita, S. & Labelle, J. L. 2023. CRISPR-Cas9 Editing of the HBG1 and HBG2 Promoters to Treat Sickle Cell Disease. *N Eng J Med* 389(9): 820-832.
- Shirani-Bidabadi, S., Tabatabaee, A., Tavazohi, N., Hariri, A., Aref, A. R., Zarrabi, A., Casarcia, N., Bishayee, A. & Mirian, M. 2023. CRISPR technology: A versatile tool to model, screen, and reverse drug resistance in cancer. *Eur J Cell Biol* 102(2): 151299.
- Simigdala, N., Chalari, A., Sklirou, A. D., Chavdoula, E., Papafotiou, G., Melissa, P., Kafalidou, A., Paschalidis, N., Pateras, I. S., Athanasiadis, E., Konstantopoulos, D., Trougakos, I. P. & Klinakis, A. 2023. Loss of Kmt2c in vivo leads to EMT, mitochondrial dysfunction and improved response to lapatinib in breast cancer. *Cell Mol Life Sci* 80(4): 100.
- Uddin, F., Rudin, C. M. & Sen, T. 2020. CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future. *Front Oncol* 10: 387.
- Vaghari-Tabari, M., Hassanpour, P., Sadeghsoltani, F., Malakoti, F., Alemi, F., Qujeq, D., Asemi, Z. & Yousefi, B. 2022. CRISPR/Cas9 gene editing: a new approach for overcoming drug resistance in cancer. *Cell Mol Biol Lett* 27(1): 49.
- Wang, H. & Sun, W. 2017. CRISPR-mediated targeting of HER2 inhibits cell proliferation through a dominant negative mutation. *Cancer Lett* 385: 137-143.
- Wang, S. W., Gao, C., Zheng, Y. M., Yi, L., Lu, J. C., Huang, X. Y., Cai, J. B., Zhang, P. F., Cui, Y. H. & Ke, A. W. 2022. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer. *Mol Cancer* 21(1): 57.
- Wang, T., Chen, T., Li, D., Hang, X., Zhang, S.,

- Yi, H., Jiang, T., Ding, D. & Zhang, X. 2025. Core-shell vector-mediated co-delivery of CRISPR/Cas9 system and hydrophobic drugs against triple-negative breast cancer stem cells. *J Control Release* 378: 1080-1091.
- Wang, Y., Zhang, T., Kwiatkowski, N., Abraham, B. J., Lee, T. I., Xie, S., Yuzugullu, H., Von, T., Li, H., Lin, Z., Stover, D. G., Lim, E., Wang, Z. C., Iglehart, J. D., Young, R. A., Gray, N. S. & Zhao, J. J. 2015. CDK7-dependent transcriptional addiction in triple-negative breast cancer. *Cell* 163(1): 174-186.
- Wang, Z., Li, N., Feng, K., Chen, M., Zhang, Y., Liu, Y., Yang, Q., Nie, J., Tang, N., Zhang, X., Cheng, C., Shen, L., He, J., Ye, X., Cao, W., Wang, H. & Han, W. 2021. Phase I study of CAR-T cells with PD-1 and TCR disruption in mesothelin-positive solid tumors. *Cell Mol Immunol* 18(9): 2188-2198.
- Wong, P. K., Cheah, F. C., Syafruddin, S. E., Mohtar, M. A., Azmi, N., Ng, P. Y. & Chua, E. W. 2021. CRISPR Gene-Editing Models Geared Toward Therapy for Hereditary and Developmental Neurological Disorders. *Front Pediatr* 9: 592571.
- Xu, Y., Chen, C., Guo, Y., Hu, S. & Sun, Z. 2022. Effect of CRISPR/Cas9-Edited PD-1/PD-L1 on Tumor Immunity and Immunotherapy. *Front Immunol* 13: 848327.
- Yang, M., Zeng, C., Li, P., Qian, L., Ding, B., Huang, L., Li, G., Jiang, H., Gong, N. & Wu, W. 2019. Impact of CXCR4 and CXCR7 knockout by CRISPR/Cas9 on the function of triple-negative breast cancer cells. *Onco Targets Ther* 12: 3849-3858.
- Yang, Y., Qiu, J. G., Li, Y., Di, J. M., Zhang, W. J., Jiang, Q. W., Zheng, D. W., Chen, Y., Wei, M. N., Huang, J. R., Wang, K. & Shi, Z. 2016. Targeting ABCB1-mediated tumor multidrug resistance by CRISPR/Cas9-based genome editing. *Am J Transl Res* 8(9): 3986-3994.
- Yuan, Y., Fan, Y., Gao, Z., Sun, X., Zhang, H., Wang, Z., Cui, Y., Song, W., Wang, Z., Zhang, F. & Niu, R. 2020. SHP2 promotes proliferation of breast cancer cells through regulating Cyclin D1 stability via the PI3K/AKT/GSK3 β signaling pathway. *Cancer Biol Med* 17(3): 707-725.
- Zahari, S., Syafruddin, S. E. & Mohtar, M. A. 2023. Impact of the Cancer Cell Secretome in Driving Breast Cancer Progression. *Cancers (Basel)* 15(9): 2304633.
- Zhu, H., Blum, R. H., Bernareggi, D., Ask, E. H., Wu, Z., Hoel, H. J., Meng, Z., Wu, C., Guan, K. L., Malmberg, K. J. & Kaufman, D. S. 2020. Metabolic Reprogramming via Deletion of CISH in Human iPSC-Derived NK Cells Promotes In Vivo Persistence and Enhances Anti-tumor Activity. *Cell Stem Cell* 27(2): 224-237 e226.
- Zeng, J., Wu, Y., Ren, C., Bonanno, J., Shen, A. H., Shea, D., Gehrke, J. M., Clement, K., Luk, K., Yao, Q., Kim, R., Wolfe, S. A., Manis, J. P., Pinello, L., Joung, J. K. & Bauer, D. E. 2020. Therapeutic base editing of human hematopoietic stem cells. *Nat Med* 26(4): 535-541.
- Zhang, M. H., Man, H. T., Zhao, X. D., Dong, N. & Ma, S. L. 2014. Estrogen receptor-positive breast cancer molecular signatures and therapeutic potentials (Review). *Biomed Rep* 2(1): 41-52.
- Zhang, P., Guo, R., Zhang, H., Yang, W. & Tian, Y. 2023. Fluoropolymer Coated DNA Nanoclews for Volumetric Visualization of Oligonucleotides Delivery and Near Infrared Light Activated Anti-Angiogenic