

***Clustered Regularly Interspaced Short
Palindromic Repeats- Associated
Protein Cas9 (CRISPR/Cas9)
Terenkapsulasi Nanopartikel Berbasis
Hibridisasi Polimer Lipid (LPNs)
sebagai Modalitas Mutakhir Terapi pada
Huntington's Disease***

Re Septian Ilhamsyah¹, Annisa Dewi Nugrahani¹, Ade
Firman Kurniawan¹

¹ Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, Bandung

ABSTRAK

Pendahuluan: *Huntington's Disease* (HD) merupakan penyakit neurodegeneratif langka yang dapat menyebabkan gangguan fungsi motorik, kognitif dan psikiatrik pada penderitanya akibat perpanjangan rantai CAG pada HTT sebagai manifestasi akibat adanya polimorfisme dari mutasi gen HTT (mHTT). Namun penanganannya saat ini masih bersifat simptomatik dan belum dapat menangani HD secara efektif dan efisien. Sebagai langkah intervensi mutakhir, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Associated Cas9 Protein* (CRISPR/Cas9) hadir sebagai revolusi pendekatan biomolekular yang prospektif dalam menangani *Huntington's Disease* (HD) didukung dengan vektor nanopartikel berbasis hibridisasi polimer lipid (LPNs) yang memiliki fitur yang sangat baik sebagai vektor CRISPR/Cas9 pada sistem saraf pusat.

Tujuan: Tujuan dari tinjauan pustaka ini adalah untuk mengetahui potensi CRISPR/Cas9 terenkapsulasi LPNs sebagai modalitas mutakhir dalam menangani HD.

Metode: Dengan melakukan analisis dan sintesis dari 81 jurnal *full-text* yang relevan dengan topik dan kurun waktu tidak lebih dari sepuluh tahun terakhir, penulis membuat kajian pustaka ini.

Pembahasan: CRISPR/Cas9 dapat mengintervensi area *N-Terminal* pada alel HTT yang mengalami mutasi (mHTT) secara spesifik. Hal ini mengakibatkan ekspresi dari mHTT teratenuasi secara signifikan sehingga dapat menurunkan ekspresi dari astrosit reaktif dan mencegah terbentuknya agregat mHTT secara lebih lanjut, sekaligus mengameliiorasi kondisi pada penderita HD. Dengan didukung oleh nanopartikel LPNs sebagai vektor dalam upaya melewati *Blood-Brain Barrier* (BBB) dengan sifat toksisitas dan imunogenisitas yang rendah, vektor ini mampu meningkatkan efektifitas dan efisiensi dari tatalaksana mutakhir ini.

Kesimpulan: CRISPR/Cas9 terenkapsulasi LPNs dapat menjadi kandidat utama modalitas kuratif mutakhir dalam penanganan kasus HD secara efektif, spesifik, aman, dan efisien.

Kata Kunci: *CRISPR/Cas9, huntingtin, Huntington's Disease, LPNs, mHTT*

ABSTRACT

Introduction: *Huntington's disease* (HD) is a rare neurodegenerative disease resulting in motoric, cognitive, and psychiatric dysfunction caused by CAG repeat elongation in the mutated HTT gene (mHTT). Currently, there has not been any effective and efficient curative treatment and there are only symptomatic treatments. To overcome this situation, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Associated Cas9 Protein* (CRISPR/Cas9) emerges as a prospective revolutionary biomolecular approach toward

Huntington's disease supported by Lipid Polymer Nanoparticles (LPNs) vector with excellent features as a vector that deliver CRISPR Cas9 to the central nervous system.

Objective: *As a solution, the objective of this literature review is to identify the potency of CRISPR/Cas9 encapsulated by LPNs as a novel therapeutic strategy against HD.*

Method: *The authors constructed this literature review by analyzing and synthesizing 81 full text journal published no longer than 10 years ago that are relevant with the topic discussed in this literature review.*

Discussion: *CRISPR/Cas9 is able to intervene the N-Terminal of the mutated HTT gene (mHTT) specifically this intervention results in attenuated expression of the mHTT significantly which hamper the expression of reactive astrocyte and prevent further aggregation of the mHTT, thus ameliorate the condition of HD's patients. LPNs play as vector that deliver CRISPR/Cas9 in order to be able to get through the blood brain barrier. Having low toxicity and immunogenicity, this vector could improve effectivity and efficiency of this novel therapeutic strategy.*

Conclusion : *CRISPR/Cas9 encapsulated by LPNs could be a promising novel therapeutic strategy to treat HD efficiently, effectively, and safely.*

Keywords: *CRISPR/CAS9, huntingtin, Huntington disease, LPNs, mHTT*

1. PENDAHULUAN

Huntington's disease (HD) adalah suatu bentuk neurodegeneratif yang dapat menyebabkan gangguan fungsi motor, kognitif dan psikiatrik pada penderitanya. Nama Huntington diambil dari nama "*huntingtin*", yaitu protein yang dihasilkan oleh gen HTT yang apabila bermutasi dapat bersifat toksik pada sel saraf terutama pada daerah striatum dan dapat berujung pada berbagai kelainan.^[1] Sebagai sebuah penyakit neurodegeneratif yang langka akibat kelainan autosom dominan, HD memiliki prevalensi yang sangat variatif di berbagai area di seluruh dunia.^[2,3] Penyakit ini umumnya diderita oleh ras kaukasia, khususnya di Amerika Utara (7.33/100.000, CI=95%), Australia (5.63/100.000, CI=95%), dan Eropa Barat (3.66/100.000, CI=95%).^[2] Khusus di Asia, HD memang sangat jarang terjadi karena berdasarkan studi, hanya terdapat sekitar 0,4 penderita di antara 100.000 penduduk.^[3] Setiap dekade, populasi HD diperkirakan akan meningkat sebanyak 15-20%.^[2,3] Kondisi ini tidak menutup kemungkinan bahwa Indonesia akan terkena dampaknya mengingat bahwa pada era globalisasi, penyakit genetik sudah mewabah selayaknya penyakit infeksi, memperluas jangkauan demografis akibat adanya hubungan seperti pernikahan antar ras yang berbeda,^[4] sehingga perlu mendapat perhatian khusus.

HD merupakan penyakit neurodegeneratif yang menyerang pada usia produktif manusia. Gejala utama yang menegakkan diagnosis HD adalah adanya gerakan tak disadari (*chorea*) yang biasanya dimulai di usia 20 - 60 tahun dengan rata - rata usia 40 tahun.^[5] Bahkan dalam beberapa kasus, gejala awal sudah muncul pada usia anak-anak dan balita.^[6] Meskipun diagnosis HD ditegakkan ketika adanya kelainan motorik, tetapi gangguan kognitif dan psikologis sudah dimulai bertahun-tahun sebelum gejala motorik muncul. Hal ini dapat berdampak pada perubahan interaksi dengan orang lain terutama keluarga yang dapat berujung pada ketidakharmonisan rumah tangga.^[7] Studi menunjukkan bahwa lebih dari 50 % orang dewasa dengan resiko HD memiliki riwayat kejadian buruk pada masa kanak-kanak meliputi konflik dengan anggota keluarga, teman, dan orang tua, serta mengalami kesulitan dalam aktivitas sehari-hari.^[8]

Namun hingga saat ini belum ada terapi kuratif yang dapat menyembuhkan HD. Tatalaksana saat ini masih berupa penanganan simptomatik untuk mengurangi gangguan motorik, kognitif dan psikologis. Penderita HD pada umumnya tidak sanggup untuk melakukan pekerjaannya beberapa tahun setelah muncul gejala dan membutuhkan penanganan intensif 24 jam pasca 10 tahun semenjak munculnya gejala motorik.^[9] Perjalanan HD tergolong lama apabila dibandingkan

dengan penyakit neurodegeneratif lainnya dengan durasi rata-rata 15 tahun dari awal ditegakkan diagnosis hingga akhir hayat.^[5] Meskipun tergolong penyakit yang langka, gejala awal yang dimulai pada usia produktif, disertai penanganan penyakit yang berkepanjangan dan relatif mahal dapat menyebabkan penderita HD berkontribusi menjadi beban bagi keluarga atau bahkan negara di usia yang seharusnya dia dapat menjadi tulang punggung. Tetapi, hal ini dapat diatasi dengan hadirnya teknologi yang mampu mengatenuasi sekaligus mengameliiorasi gen HTT yang bermutasi dengan biaya yang lebih murah sehingga dapat menyembuhkan dan mengurangi waktu serta biaya perawatan pasien HD.

Sebagai sebuah prospektif, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats–Associated Cas9 Protein* (CRISPR/Cas9) hadir sebagai agen terapeutik melalui pendekatan biomolekular sekaligus sebagai revolusi teknologi rekayasa genetik paling mutakhir yang dapat memotong fragmen gen dengan bantuan protein Cas9 secara akurat dengan dipandu oleh *guide RNA nuclease* (gRNA). CRISPR/Cas9 pada HD bekerja dengan cara memotong N-terminal atau HTT Exon1 dari gen HTT secara efektif dan presisi yang tinggi.^[10] Akan tetapi, *Blood Brain Barrier* (BBB) yang dibentuk oleh sel astrosit dan endotelium kapiler yang tersusun rapat sehingga tidak memungkinkan adanya aktivitas transitis, merupakan tantangan besar dalam administrasi terapi pada penyakit sistem saraf pusat. Keberadaan BBB mampu melindungi neuron dan sel glia dari toksin bakteri, agen infeksi, dan zat asing, termasuk komponen obat,^[11] sehingga diperlukan vehikulum agar suatu obat mampu mencapai *site of action* miliknya.

Sebagai solusinya, nanopartikel berbasis hibridisasi polimer lipid (LPNs) merupakan terobosan vehikulum (vektor) terbaru yang dapat mengantarkan molekul seperti CRISPR/Cas9 melewati BBB karena ukurannya yang kecil dan sifatnya yang memiliki integritas tinggi, sehingga mampu mengontrol pengeluaran substansi terenkapsulasi dengan biokompatibilitas yang tinggi.

Tentunya kombinasi dari CRISPR/Cas9 yang terenkapsulasi oleh nanopartikel LPNs hadir sebagai solusi mutakhir yang memiliki prospektif tinggi untuk menangani HD.^[12] Oleh karena itu, tujuan kami melakukan tinjauan pustaka ini adalah untuk mengetahui potensi dari CRISPR/Cas9 yang terenkapsulasi dengan vektor nanopartikel berbasis hibridisasi polimer lipid (LPNs) sebagai modalitas mutakhir untuk atenuasi ekspresi gen mHTT pada penderita HD.

2. METODE

Sebagai sebuah literatur, karya tulis ini merupakan hasil analisis dan sintesis dari berbagai referensi. Penulis menggunakan beberapa kata kunci berupa CRISPR/Cas9, huntingtin, *Huntington's Disease*, LPNs, mHTT yang diketik pada mesin pencarian seperti untuk mendapatkan jurnal-jurnal yang berkaitan. Jurnal-jurnal tersebut diseleksi oleh penulis melalui proses inklusi dan eksklusi lalu dipilihlah 81 jurnal *full text* yang berhubungan dengan topik yang dibahas. Referensi-referensi tersebut diambil dari Pubmed, *Google Scholar*, dan *Clinical Key* dengan tahun publikasi dalam kurun waktu 10 tahun terakhir. Kemudian, penulis menganalisis dan membuat literatur berdasarkan jurnal-jurnal tersebut.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Patogenesis dari Huntington's Disease (HD)

Secara molekular, HD disebabkan oleh terlalu banyaknya pengulangan asam amino CAG pada gen HTT yang berjumlah 40 atau lebih. Gen HTT terletak pada kromosom 4p16.3 dan mengodekan protein huntingtin.^[13] Protein huntingtin yang utuh terdiri dari domain utama teratur yang tersusun secara selang-seling diantara fragmen protein lain yang tidak teratur. Bagian yang teratur disebut HEAT (huntingtin, *Elongation factor 3*, protein fosfatase 2A dan TOR1), sedangkan pada bagian fragmen protein yang tidak teratur merupakan tempat dimana terjadinya *Post-Translational Modifications* (PTM) seperti pemotongan proteolisis, glikosilasi dan fosforilasi.^[14] Pada huntingtin, proteolisis oleh

caspase, endoprotease dan caspain merupakan PTM yang paling umum terjadi. PTM merupakan proses fisiologis untuk mengaktifkan, menonaktifkan atau mengangkut suatu protein.^[15] Salah satu hasil pemotongan proteolisis segmen tak teratur pada huntingtin adalah N-terminal atau biasa disebut dengan HTT exon1 yang merupakan hasil transkripsi exon pertama dari gen HTT. HTT exon1 terdiri dari 3 domain; pertama, domain dengan 17 asam amino (N17/ HTT^{NT}); kedua, domain polyQ; dan yang ketiga adalah proline rich domain (PRD). PolyQ atau polyglutamine dikodekan oleh rantai CAG yang termasuk dalam exon pertama gen HTT.^[16] Pada kondisi normal, HTT mengandung rantai CAG sebanyak 6-35 unit. Glutamine akan ditranskripsikan oleh setiap rantai CAG; semakin panjang polyQ maka semakin cepat HTT exon1 menjadi agregat/inklusi dan bersifat toksik.^[5]

Panjang rantai CAG pada HTT berbanding terbalik dengan usia awal serangan HD, meskipun baik huntingtin normal maupun abnormal sama-sama mengalami fragmentasi pada HTT exon1. Individu dengan panjang CAG berjumlah 40 sampai 49 akan mengalami gejala awal HD di usia sekitar 30-50 tahun. Panjang CAG berjumlah 50 sampai 59 akan memulai gejala awal di usia 20-30 tahun sedangkan jumlah CAG yang melebihi 60 akan menyebabkan *Juvenile Huntington's Disease* (JHD) yaitu ketika gejala awal terjadi pada usia dibawah 21 tahun.^[17]

Pengaruh panjang polyQ terhadap konformasi HTT exon1 yang dapat mempercepat terjadinya agregasi huntingtin masih diperdebatkan untuk menjadi penyebab utama HD.^[18] Mekanisme bagaimana panjang polyQ mampu menyebabkan serangan dini dari HD masih belum banyak diketahui. HTT exon1 dihasilkan melalui fragmentasi proteolisis dari huntingtin utuh, namun bila terjadi pemanjangan CAG, mRNA pada nukleus mampu mentranskripsikan HTT exon1 saja tanpa elemen lain, sehingga mempersingkat proses pembentukan HTT exon1.^[9] Fragmen huntingtin ini dapat mengganggu fungsi sel baik pada sitoplasma maupun nukleus. Di dalam nukleus, fragmen ini mengalami oligomerisasi dan agregasi yang berujung pada pembentukan inklusi

sehingga mampu mengganggu proses transkripsi melalui interaksinya dengan protein regulator transkripsi seperti p53, *cAMP response element-binding*, dan *CREB binding protein*.^[19] HTT exon1 juga berinteraksi dengan protein yang berperan dalam transkripsi untuk proliferasi dan keberlangsungan hidup sel seperti; PGC-1 α yang berperan untuk metabolisme energi, Sp1 dan koaktivatornya, serta cystathionine γ -lyase yang merupakan enzim biosintesis untuk cystein.^[20] Di dalam sitoplasma, fragmen tersebut juga akan mengalami oligomerisasi dan fragmentasi yang berujung pada kerusakan sel dengan mengganggu sistem degradasi protein pada sel yaitu sistem ubiquitin-proteosom dan autofagi.^[21] Agregat fragmen yang mengandung polyQ juga berinteraksi dengan membran luar mitokondria, sehingga menyebabkan gangguan aliran ion kalsium yang dapat mengakibatkan gangguan pembentukan ATP dan menginduksi apoptosis. Selain itu, degenerasi neuron juga dapat terjadi karena fragmen polyQ merusak organel transport axonal.^[22,23] Keberadaan agregat fragmen huntingtin mengganggu berbagai fungsi sel seperti transkripsi, komunikasi intrasel, sekresi, daur ulang endositik, sistem pertahanan, dan disfungsi sinaps.^[24] Berbagai macam gangguan yang timbul seperti eksitotoksik sel saraf akibat kerusakan pada jaras impuls dan sel autonom menyebabkan gejala neurologis dan non-neurologis pada HD.^[25]

Gen HTT yang bermutasi (mHTT) merupakan penyebab utama terjadinya HD, maka dari itu beberapa percobaan dilakukan untuk merekayasa mHTT dengan berbagai metode. Walaupun sejauh ini fungsi fisiologis dari huntingtin normal belum banyak diketahui secara pasti, studi terbaru mengindikasikan bahwa eradikasi gen HTT normal pada otak mencit dewasa tidak mengganggu kelangsungan hidup dan pertumbuhan baik neuron mencit ataupun mencit itu sendiri.^[26,27] Hal ini mengimplikasikan bahwa intervensi pada mHTT tidak akan mengganggu fungsi fisiologis tubuh.^[26,27]



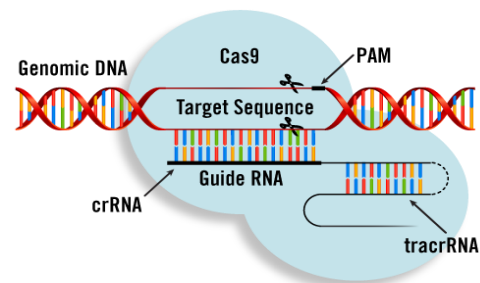
3.2 Potensi Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Associated Cas9 Protein (CRISPR/Cas9) dalam Proses Intervensi Huntington's Disease (HD): Struktur dan Mekanisme Aksi dalam Atenuasi Ekspresi mHTT

Sebagai langkah intervensi mutakhir, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Associated Cas9 Protein* (CRISPR/Cas9) hadir sebagai pendekatan biomolekular yang prospektif dalam menangani *Huntington's Disease* (HD) dengan mengintervensi area *N-Terminal* pada alel HTT yang mengalami mutasi (mHTT).^[28,29,30,31] CRISPR/Cas9 merupakan teknik rekayasa genetika yang diadopsi dari sistem imunitas adaptif prokariot yang terdiri dari repetisi sekuens basa^[32,33,34] yang dipandu oleh *guide RNA* nuklease (gRNA) untuk memotong substansi genetik asing.^[33,35,36] Terdapat tiga tipe sistem CRISPR yang telah diidentifikasi pada prokariot, namun CRISPR II merupakan tipe yang terbaik karena walaupun hanya terasosiasi dengan satu protein Cas9, sistem ini melakukan kinerjanya secara efektif.^[33,47]

Sejauh ini, CRISPR/Cas9 menjadi terapi melalui pendekatan biomolekular yang mudah, paling efektif, paling murah, serta paling akurat dibandingkan dengan pendekatan lainnya seperti *Zinc Finger Nuclease* (ZFN) dan *TALENs*.^[32,33,48,49] Walaupun siRNA dan *antisense oligonucleotide* pada kasus *Huntington's Disease* sudah teruji memiliki efek terapeutik yang cukup baik, modalitas ini masih memiliki ketergantungan terhadap *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) serta tidak mampu membedakan alel normal HTT dengan alel HTT mutan yang terekspansi lebih lanjut sehingga CRISPR/Cas9 menjadi kandidat paling unggul sebagai agen terapeutik pada HD.^[28,29,40,41]

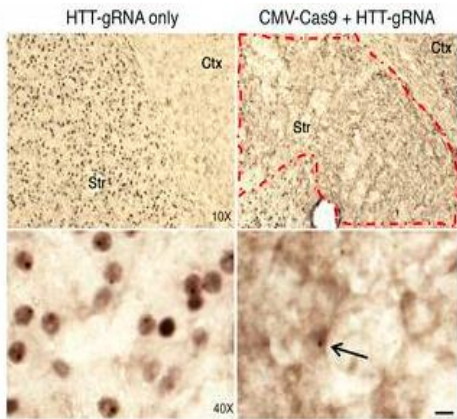
Secara struktural, sistem ini terdiri atas dua komponen utama yaitu gRNA yang terdiri dari crRNA dan tracrRNA serta protein Cas9 sebagai enzim endonuklease untuk memotong

sekuens target.^[32,33,38,39] crRNA terdiri dari 20 unit sekuens basa untuk mengarahkan protein Cas9 agar berikatan dengan DNA target melalui *Watson-Crick Base Pairing* yang difiksasi oleh tracrRNA sehingga membentuk area yang kemudian akan dipotong oleh protein Cas9.^[32,33,38,39] Namun, CRISPR/Cas9 membutuhkan *Protospacer Adjacent Motif* (PAM) yang terdiri dari 2-6 pasang basa (NGG) yang spesifik terhadap protein Cas9 dan diikuti oleh sekuens DNA target untuk menginisiasi pengikatan antara gRNA dengan DNA target pada proses tersebut secara spesifik.^[32,33,35,49]



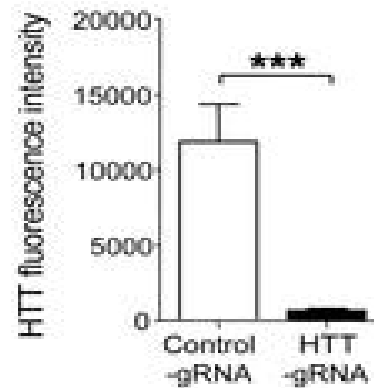
Gambar 1. Skema struktur dari CRISPR/Cas9.^[42]

Pada eksperimen yang dilakukan oleh Yang *et al* (2017)^[28], disusunlah empat gRNA sebagai bagian dari CRISPR/Cas9 yang menargetkan empat area DNA, yaitu T1, T2, T3, T4 pada alel mHTT yang mengekspresikan exon 1 disertai dengan repetisi CAG (area polyQ) sebanyak 120 pasang disertai dengan kontrol (Lampiran 1).^[28] Berdasarkan hasil studi *in vitro* pada sel lini HEK293 yang ditransfeksikan dengan gRNA dan Cas9 (CRISPR/Cas9), didapatkan penurunan ekspresi dan agregat dari mHTT secara sangat signifikan dibandingkan dengan kontrolnya khususnya dengan menggunakan kombinasi dual gRNA spesifik T1 dan T3 secara bersamaan pada vektor yang sama.^[28]

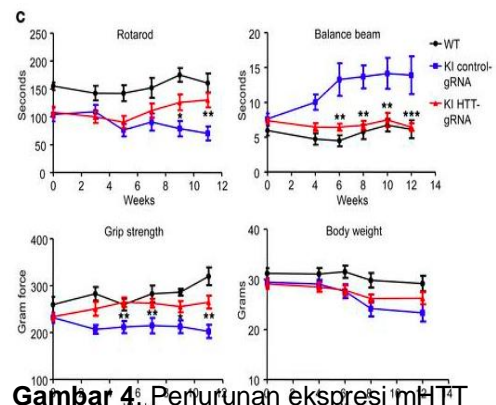


Gambar 2. Penurunan ekspresi dan agregat dari mHTT secara signifikan pasca transfeksi CRISPR/Cas9 pada sel lini HEK293 dibandingkan dengan kontrol (HTT – gRNA) pada preparat mikroskopis.^[28]

Tidak hanya pada eksperimen *in vitro*, mencit HD140Q-KI^[43] yang telah diinduksi oleh mHTT secara homozigot dan heterozigot, kemudian ditransfeksikan dengan gRNA/Cas9 (CRISPR/Cas9) dengan promotor CMV untuk mencit homozigot mHTT dan promotor *methyl-CpG-binding protein* (*Mecp2*) untuk mencit heterozigot mHTT melalui injeksi di kedua sisi striatum.^[28,43,44,45] Tiga minggu pasca transfeksi, didapatkan bahwa terjadi penurunan ekspresi mHTT secara dramatis pada mencit yang ditransfeksikan gRNA/cas9 (CRISPR/Cas9) dibandingkan dengan kontrolnya, baik pada mHTT homozigot maupun heterozigot (target spesifik T1 dan T3) pada gambar 3.^[28,43,44] Hal ini pun berbanding lurus dengan meningkatnya kemampuan motorik mencit^[43,44,45,46] yang terpapar oleh CRISPR/Cas9 dibuktikan dengan peningkatan hasil pada tes rotarod, keseimbangan balok (*balance beam*), dan kekuatan genggam (*grip strength*) serta penurunan reduksi berat badan (gram) pada mencit (gambar 4) sebagai dampak dari atenuasi ekspresi mHTT secara signifikan khususnya pada area striatum.^[28,43,44,45,46]



Gambar 3. Penurunan secara dramatis dari ekspresi mHTT yang ditransfeksikan dengan gRNA/Cas9 (CRISPR/Cas9) dibandingkan dengan kontrol pada studi *in vivo* mencit HD140Q-KI mHTT homozigot dan heterozigot. (***) $P < 0.001$ ^[28]



Gambar 4 Penurunan ekspresi mHTT secara signifikan yang berbanding lurus dengan peningkatan kemampuan motorik pada tes rotarod, balance beam, dan grip strength, serta penurunan reduksi berat badan pada studi *in vivo* mencit HD140Q-KI. (**) $P < 0.012$, (***) $P < 0.001$ ^[28]

Hal ini diakibatkan karena gRNA/Cas9 (CRISPR/Cas9) mampu secara spesifik mendeteksi DNA target dengan adanya sekuens PAM dan gRNA (tepatnya pada bagian crRNA) yang akan berusaha untuk berikatan dengan DNA target yang berkomplemen dan kemudian protein Cas9 akan memotong area tersebut dan regio yang sejajar dengannya sehingga terjadi mutasi *frameshift* diikuti oleh rekombinasi gen secara non-homolog (NHEJ).^[47-52] Sebagai dampaknya, ekspresi dari

mHTT teratenuasi secara signifikan sehingga menurunkan ekspresi dari astrosit reaktif dan mencegah terbentuknya agregat mHTT secara lebih lanjut.^[28,43,44,45] Tentunya, kondisi ini dapat mengameliiorasi kondisi neuron sekaligus meningkatkan kemampuan motorik tanpa efek samping yang berarti karena area yang akan diintervensi telah dipastikan aman melalui NCBI *Blast* dengan aktivasi *off-target* yang minimum atau bahkan tidak ada.^[53-55]

3.3 Nanopartikel Berbasis Hibridisasi Polimer Lipid (Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles/ LPNs) sebagai Platform Vektor Terapi Gen CRISPR/Cas9 Terbaru

Sebagai sebuah prospektif dalam suatu tatalaksana penyakit, terapi gen seperti CRISPR/Cas9, sangat terasosiasi dengan kapasitas pengembangan vehikulum (vektor) yang aman dan efisien dalam melindungi substansi terapeutik dari paparan eksogen yang berbahaya serta meningkatkan dampak yang menguntungkan pada sel dan jaringan target.^[56,57] Sebagai terobosan terkini, nanoteknologi berupa nanopartikel hadir sebagai teknologi yang sedang intensif dikaji sebagai vehikulum terbaik dari berbagai agen terapeutik karena keuntungan-keuntungan yang dimilikinya.^[46,57-62]

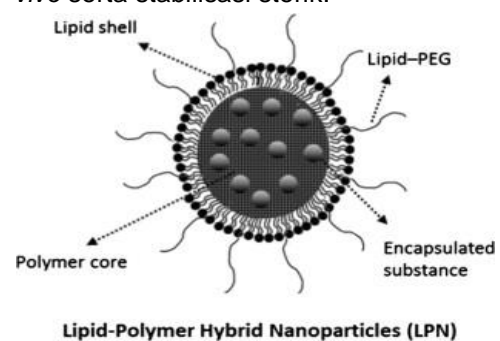
Nanopartikel merupakan material yang memiliki ukuran berkisar di antara 1-100 nm.^[63,64] Akibat ukurannya yang kecil, substansi ini mampu menembus *Blood Brain Barrier* (BBB) sebagai tantangan terbesar dalam terapi neurologis,^[58,65,66] menuju *site of action* dengan efektifitas yang tinggi dengan sifat imunoinert yang rendah sehingga dapat menghindari penangkapan sistem retikuloendotel, alhasil bioavailabilitas agen terapeutik menjadi tinggi.^[58,60,65,67]

Berbagai substansi organik, anorganik, ataupun hibrid melalui proses polimerisasi digunakan sebagai bahan baku produksi nanopartikel.^[58-67] Semua jenis nanopartikel dapat diproduksi dalam berbagai ukuran dan varietas yang dapat digunakan sebagai vehikulum agen terapeutik terapi gen seperti CRISPR/Cas9 yang berkelanjutan dan dapat bertahan dalam jangka waktu yang lama.^[60] Di antara

substansi tersebut, nanopartikel hibrid menjadi kandidat utama karena efisiensi transfer yang tinggi, proses sintesis yang mudah, serta tingkat toksisitas yang rendah dibandingkan dengan material lainnya dan sejauh ini sudah teruji baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.^[60,68,69,70]

Nanopartikel berbasis hibridisasi polimer lipid (*Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles/ LPNs*) merupakan salah satu jenis dari nanopartikel hibrid yang cukup mudah untuk disintesis dan merupakan kombinasi dari nanopartikel polimer yang memiliki durasi sirkulasi yang berkepanjangan^[71,72] dan nanopartikel liposom yang masih memiliki keterbatasan karena mudahnya tereliminasi oleh sistem retikuloendotel walaupun memiliki biokompabilitas yang baik karena merupakan analog dari membran sel^[73,74] sehingga kombinasi keduanya merupakan solusi terbaik dalam mengatasi kekurangan masing-masing material dan meningkatkan efektifitas.^[60] LPNs disintesis melalui proses nanopresipitasi, emulsifikasi-pelarutan-evaporasi,^[75,76,77] maupun *two-step methods* dengan proses *spray drying* dan *soft lithography*.^[78]

Secara struktural, LPNs terdiri dari (1) inti polimer tempat agen terapeutik seperti terapi gen terenkapsulasi, (2) lapisan lipid dalam untuk menyokong biokompatibilitas inti polimer sekaligus sebagai tameng pencegah kebocoran substansi yang terenkapsulasi, (3) dan lapisan lipid-PEG luar sebagai pembungkus yang meningkatkan waktu sirkulasi secara *in vivo* serta stabilisasi sterik.^[60,79]



Gambar 3. Skema struktur dari LPNs.^[60]

Oleh karena struktur tersebut, LPNs memiliki fitur yang dengan integritas tinggi, kapabilitas untuk mengontrol pengeluaran substansi

terenkapsulasi, biokompatibilitas dan bioavailabilitas yang tinggi [58-67], disertai dengan adanya modifikasi rantai PEG pada lapisan lipid terluar menggunakan grup methoxyl, sehingga dapat menurunkan imunogenisitas yang sudah terbukti oleh berbagai studi baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.^[79,80] Selain itu, substansi ini dapat menembus BBB, memiliki sifat toksisitas yang rendah, disertai dengan peluang produksi dalam skala besar. Apabila dilihat dari perspektif molekular, ikatan di dalam LPNs sangat prospektif sebagai vektor dalam terapi gen CRISPR/Cas9 khususnya pada HD.^[58-81] Seluruh keuntungan yang dimiliki oleh CRISPR/Cas9 berupa efektifitas yang sangat baik disertai sifatnya yang memiliki presisi tinggi dalam mengintervensi suatu area gen yang bersifat sangat molekular dan tidak menimbulkan efek samping yang berarti karena minimnya *off-target*, didukung dengan berbagai keuntungan dari vektor LPNs, tentunya hal ini menjadikan terapi CRISPR/Cas9 yang terenkapsulasi dengan LPNs sebagai kandidat utama dengan prospektif yang sangat tinggi untuk menangani HD secara efektif dan efisien.^[53-55, 58-81]

4. SIMPULAN

Huntington's Disease (HD) merupakan penyakit neurodegeneratif langka akibat adanya mutasi pada gen HTT (mHTT) yang terletak pada kromosom 4p16.3 sehingga menyebabkan terjadinya elongasi dari rantai CAG yang dapat bermanifestasi berupa timbulnya gangguan fungsi motorik, kognitif dan psikiatrik pada penderita HD di usia produktif. Walaupun kondisi ini memerlukan perhatian khusus akibat beban yang ditimbulkan akibat HD, sejauh ini tatalaksana yang ada saat ini belum mampu menangani HD secara efektif dan efisien sehingga diperlukan solusi mutakhir dalam menangani kondisi ini.

Oleh karena itu, CRISPR/Cas9 hadir sebagai revolusi pendekatan biomolekular paling mutakhir yang dapat mengintervensi dan mengatenuasi ekspresi mHTT pada HD secara spesifik, akurat, aman, dan efisien sekaligus mengameliiorasi kondisi penderita HD

secara efektif. Dengan didukung oleh vektor nanopartikel berbasis hibridisasi polimer lipid (LPNs), CRISPR/Cas9 yang terenkapsulasi oleh substansi ini mampu menembus BBB dengan sifat toksisitas yang rendah, disertai dengan peluang produksi dalam skala besar, sehingga modalitas ini berprospektif sangat tinggi untuk menjadi kandidat utama modalitas terapeutik mutakhir pada penderita HD. Sehingga dapat disimpulkan dari 81 jurnal yang telah disintesis dan dianalisis bahwa CRISPR/Cas9 terenkapsulasi nanopartikel efektif menurunkan ekspresi mHTT pada HD.

5. SARAN

Tentunya, hal ini memicu perkembangan ilmu pengetahuan karena dibutuhkan studi lebih lanjut khususnya pada fase uji klinis untuk mengoptimalkan kinerja dari sistem ini. Selain itu pendekatan holistik melalui kerja sama dengan pemerintah dan sosialisasi kepada masyarakat sangat dibutuhkan agar inovasi ini dapat segera diterapkan kepada pasien mengingat urgensi yang ditimbulkan oleh penyakit ini cukup tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pringsheim T, Wiltshire K, Day L, Dykeman J, Steeves T, Jette N. The incidence and prevalence of Huntington's disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders*. 2012;27(9):1083-1091.
2. Rawlins M, Wexler N, Wexler A, Tabrizi S, Douglas I, Evans S et al. The Prevalence of Huntington's Disease. *Neuroepidemiology*. 2016;46(2):144-153.
3. WHO | Genes and human disease [Internet]. Who.int. 2016 [cited 24 March 2018]. Available from: <http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index2.html>
4. Goldin I, Mariathasan M. *The Butterfly Defect : How Globalization Create Systemic Risks, and What To Do About It*. New Jersey: Princeton University Press; 2014.
5. Peggy C. et al. *Huntington disease : A Single - Gene Degenerative*



- Disorder of the Striatum. *Clinical Research*. 2016.
6. Quarrell O, O'Donovan KL, Bandmann O, Strong M. The prevalence of juvenile Huntington's disease: a review of the literature and meta-analysis. *PLoS Curr*. 2012;4.
 7. Quaid, K. A. et al. Living at risk: concealing risk and preserving hope in Huntington disease. *J. Genet. Couns.* 2008; 17, 117–128.
 8. Van der Meer, L. B., van Duijn, E., Wolterbeek, R. & Tibben, A. Adverse childhood experiences of persons at risk for Huntington's disease or BRCA1/2 hereditary breast/ovarian cancer. *Clin. Genet*. 81. 2012; 18–23.
 9. Gillian P. Bates, Ray Dorsey, et al. *Huntington Disease. Primer*. 2015.
 10. Kolli N, Lu M, Maiti P, Rossignol J, Dunbar G. CRISPR-Cas9 Mediated Gene-Silencing of the Mutant Huntingtin Gene in an In Vitro Model of Huntington's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(4):754.
 11. Junqueira. *Basic Histology Text and Atlas 13th*. 2013;179.
 12. Zhang L, Zhang L. Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Applications. *Nano LIFE*. 2010;01(01n02):163-173.
 13. Ross, C. A. et al. Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. *Nat. Rev. Neurol.* 2014; 10, 204–216.
 14. Aiken, C. T. et al. Phosphorylation of threonine 3: implications for huntingtin aggregation and neurotoxicity. *J. Biol. Chem*. 2009; 284.
 15. Wetzel, R. & Mishra, R. in *Huntington's Disease* (eds Bates, G. P., Tabrizi, S. J. & Jones, L). 2014; 274–322.
 16. Zuccato, C. & Cattaneo, E. in *Huntington's Disease* (eds Bates, G. P., Tabrizi, S. J. & Jones, L). 2014; 243–273.
 17. Nicolas G, Devys D, Goldenberg A, et al. Juvenile Huntington disease in an 18-month-old boy revealed by global developmental delay a reduced cerebellar volume. *Am J Med Genet A*. 2011;155A(4):815-818.
 18. Klein, F. A. C. et al. Linear and extended: a common polyglutamine conformation recognized by the three antibodies MW1, 1C2 and 3B5H10. *Hum. Mol. Genet.* 2013; 22, 4215–4223.
 19. Paul BD, Sbodio JI, Xu R, Vandiver MS, Cha JY, Snowman AM, Snyder SH. 2014. Cystathionine g-lyase deficiency mediates neurodegeneration in Huntington's disease. *Nature*. 2014; 96–100.
 20. Chaturvedi RK, Calingasan NY, Yang L, Hennessey T, Johri A, Beal MF. Impairment of PGC-1 α expression, neuropathology and hepatic steatosis in a transgenic mouse model of Huntington's disease following chronic energy deprivation. *Hum Mol Genet* 19.2010; 3190–3205.
 21. Maria J.S, Floriana L. et al. *Huntington's Disease: Mechanisms of Pathogenesis and Therapeutic Strategies*. 2018.
 22. Morfini GA, You YM, Pollema SL, Kaminska A, Liu K, Yoshioka K, Björklom B, Coffey ET, Bagnato C, Han D, et al. Pathogenic huntingtin inhibits fast axonal transport by activating JNK3 and phosphorylating kinesin. *Nat Neurosci*. 2009; 864–871.
 23. Liot G, Zala D, Pla P, Mottet G, Piel M, Saudou F. Mutant Huntingtin alters retrograde transport of TrkB receptors in striatal dendrites. *J Neurosci*. 2013; 6298–6309.
 24. Campesan S, Green EW, Breda C, Sathyaikumar KV, Muchowski PJ, Schwarcz R, Kyriacou CP, Giorgini F. 2011. The kynurenine pathway modulates neurodegeneration in a *Drosophila* model of Huntington's disease. *Curr Biol*. 2011; 961–966.
 25. Wang, N. et al. Neuronal targets for reducing mutant huntingtin expression to ameliorate disease in a mouse model of Huntington disease. *Nat. Med*. 2014; 536–541.
 26. Wang G. et al. Ablation of Huntingtin in adult neurons is nondeleterious but its deletion in young mice causes acute pancreatitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(12):3359-3364.
 27. Liu X. et al. N-terminal huntingtin knock-in mice: implications of removing the N-terminal region of



- huntingtin for therapy. *Plos Genet.* 2016;12(5):e1006083.
28. Yang S, Chang R, Yang H, Zhao T, Hong Y, Kong H et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *Journal of Clinical Investigation.* 2017;127(7):2719-2724.
 29. Monteys AM, Ebanks SA, Keiser MS, Davidson BL. CRISPR/Cas9 editing of the mutant huntingtin allele in vitro and in vivo. *Mol Ther.* 2017;25(1):12–23.
 30. Carroll JB, et al. Potent and selective antisense oligonucleotides targeting single-nucleotide polymorphisms in the Huntington disease gene/allele-specific silencing of mutant huntingtin. *Mol Ther.* 2011;19(12):2178–2185.
 31. Drouet V, et al. Allele-specific silencing of mutant huntingtin in rodent brain and human stem cells. *PLoS One.* 2014;9(6):e99341.
 32. Wang X, Gong Y, Jin B, Wu C, Yang J, Wang L, et al. Long non-coding RNA urothelial carcinoma associated 1 induces cell replication by inhibiting BRG1 in 5637 cells. *Oncology reports.* 2014;32(3):1281-90.
 33. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols.* 2013;8(11):2281-308.
 34. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096):816-21.
 35. Kunin V, Sorek R, Hugenholtz P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome biology.* 2007;8(4):R61.
 36. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature reviews Genetics.* 2010;11(3):181.
 37. Shah SA, Erdmann S, Mojica FJ, Garrett RA. Protospacer recognition motifs: mixed identities and functional diversity. *RNA biology.* 2013;10(5):891-9.
 38. Cox DBT, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nature medicine.* 2015;21(2):121-31.
 39. Karvelis T, Gasiunas G, Siksnys V. Methods for decoding Cas9 protospacer adjacent motif (PAM) sequences: a brief overview. *Methods.* 2017.
 40. Skotte N, Southwell A, Østergaard M, Carroll J, Warby S, Doty C et al. Allele-Specific Suppression of Mutant Huntingtin Using Antisense Oligonucleotides: Providing a Therapeutic Option for All Huntington Disease Patients. *PLoS ONE.* 2014;9(9):e107434.
 41. Skotte N, Southwell A, Østergaard M, Carroll J, Warby S, Doty C et al. Allele-Specific Suppression of Mutant Huntingtin Using Antisense Oligonucleotides: Providing a Therapeutic Option for All Huntington Disease Patients. *PLoS ONE.* 2014;9(9):e107434.
 42. Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science.* 2010 Jan 8;327(5962):167-70.
 43. Chan A, Jiang J, Chen Y, Li C, Prucha M, Hu Y et al. Progressive Cognitive Deficit, Motor Impairment and Striatal Pathology in a Transgenic Huntington Disease Monkey Model from Infancy to Adulthood. *PLOS ONE.* 2015;10(5):e0122335.
 44. Rangel-Barajas C, Rebec G. Dysregulation of Corticostriatal Connectivity in Huntington's Disease: A Role for Dopamine Modulation. *Journal of Huntington's Disease.* 2016;5(4):303-331.
 45. Morigaki R, Goto S. Striatal Vulnerability in Huntington's Disease: Neuroprotection Versus Neurotoxicity. *Brain Sciences.* 2017;7(12):63.
 46. Suelves N, Kirkham-McCarthy L, Lahue R, Ginés S. A selective inhibitor of histone deacetylase 3 prevents cognitive deficits and suppresses striatal CAG repeat expansions in Huntington's disease mice. *Scientific Reports.* 2017;7(1).



47. Ran F, Hsu P, Wright J, Agarwala V, Scott D, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*. 2013;8(11):2281-2308.
48. Lalonde S, Stone O, Lessard S, Lavertu A, Desjardins J, Beaudoin M et al. Frameshift indels introduced by genome editing can lead to in-frame exon skipping. *PLOS ONE*. 2017;12(6):e0178700.
49. Bauer D, Canver M, Orkin S. Generation of Genomic Deletions in Mammalian Cell Lines via CRISPR/Cas9. *Journal of Visualized Experiments*. 2014;(83).
50. Su T, Liu F, Gu P, Jin H, Chang Y, Wang Q et al. A CRISPR-Cas9 Assisted Non-Homologous End-Joining Strategy for One-step Engineering of Bacterial Genome. *Scientific Reports*. 2016;6(1).
51. Geisinger J, Turan S, Hernandez S, Spector L, Calos M. In vivo blunt-end cloning through CRISPR/Cas9-facilitated non-homologous end-joining. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(8):e76-e76.
52. Maruyama T, Dougan S, Truttmann M, Bilate A, Ingram J, Ploegh H. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nature Biotechnology*. 2015;33(5):538-542.
53. Kaur K, Tandon H, Gupta A, Kumar M. CrisprGE: a central hub of CRISPR/Cas-based genome editing. *Database*. 2015;2015.
54. Nymark M, Sharma A, Sparstad T, Bones A, Winge P. A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae. *Scientific Reports*. 2016;6(1).
55. Naito Y, Hino K, Bono H, Ui-Tei K. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics*. 2014;31.1120-1123.
56. Jiménez Blanco J, Benito J, Ortiz Mellet C, García Fernández J. Molecular nanoparticle-based gene delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2017;42:18-37.
57. Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature*. 2015;526(7573):351-360.
58. Dizaj S, Jafari S, Khosroushahi A. A sight on the current nanoparticle-based gene delivery vectors. *Nanoscale Research Letters*. 2014;9(1):252.
59. Morachis JM, Mahmoud EA, Sankaranarayanan J, Almutairi A. Triggered rapid degradation of nanoparticles for gene delivery. *J Drug Deliv*. 2012;9:1-7.
60. Hadinoto K, Sundaresan A, Cheow W. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013;85(3):427-443.
61. Albanese A, Tang P, Chan W. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2012;14(1):1-16.
62. Nitta SK, Numata K. Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering. *Int J Mol Sci*. 2013;9(1):1629-1654. doi: 10.3390/ijms14011629.
63. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017;.
64. Moreno-Vega A, Gómez-Quintero T, Nuñez-Anita R, Acosta-Torres L, Castaño V. Polymeric and Ceramic Nanoparticles in Biomedical Applications. 2012.
65. The Use of Nanoparticles for Gene Therapy in the Nervous System. *Journal of Alzheimer's Disease*, vol 31. 2012;31:697-710.
66. Saraiva C, Praça C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release*. 2016;235:34-47.
67. Lönn P, Kacsinta A, Cui X, Hamil A, Kaulich M, Gogoi K et al. Enhancing Endosomal Escape for Intracellular Delivery of Macromolecular Biologic Therapeutics. *Scientific Reports*. 2016;6(1).



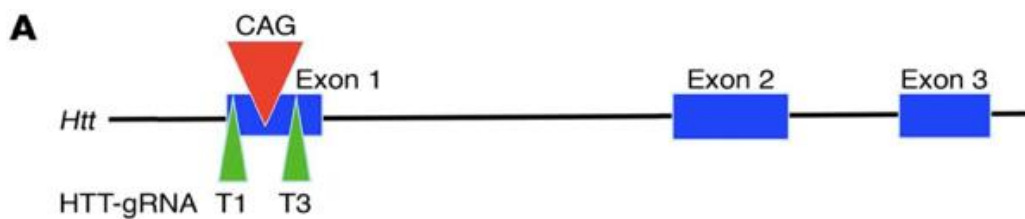
68. Qu X, Li P, Liu D, Liu C, Zhang N. Enhanced gene transfer with multilayered polyplexes assembled with layer-by-layer technique. *IET Nanobiotechnol.* 2012;9(3):122–128. doi: 10.1049/iet-nbt.2011.0031.
69. Gabizon A, Amitay Y, Tzemach D, Gorin J, Shmeeda H, Zalipsky S. Therapeutic efficacy of a lipid-based prodrug of mitomycin C in pegylated liposomes: Studies with human gastro-entero-pancreatic ectopic tumor models. *Journal of Controlled Release.* 2012;160(2):245-253.
70. Tros de Ilarduya C, Sun Y, Düzgüneş N. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2010;40(3):159-170.
71. Wang Q, Shen M, Zhao T, Xu Y, Lin J, Duan Y et al. Low toxicity and long circulation time of Polyampholyte-coated magnetic nanoparticles for blood pool contrast agents. *Scientific Reports.* 2015;5(1).
72. Lin W, Ma G, Ji F, Zhang J, Wang L, Sun H et al. Biocompatible long-circulating star carboxybetaine polymers. *Journal of Materials Chemistry B.* 2015;3(3):440-448.
73. Zylberberg C, Gaskill K, Pasley S, Matosevic S. Engineering liposomal nanoparticles for targeted gene therapy. *Gene Therapy.* 2017;24(8):441-452.
74. Yang J, Bahreman A, Daudey G, Bussmann J, Olsthoorn R, Kros A. Drug Delivery via Cell Membrane Fusion Using Lipopeptide Modified Liposomes. *ACS Central Science.* 2016;2(9):621-630.
75. Konwar R, Ahmed A. NANOPARTICLE: AN OVERVIEW OF PREPARATION, CHARACTERIZATION AND APPLICATION. *International Research Journal of Pharmacy.* 2016;4(4):47-57.
76. Sah E, Sah H. Recent Trends in Preparation of Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles by Mixing Polymeric Organic Solution with Antisolvent. 2015.
77. Aili D, Mager M, Roche D, Stevens M. Hybrid Nanoparticle–Liposome Detection of Phospholipase Activity. *Nano Letters.* 2011;11(4):1401-1405.
78. Li X, Anton N, Arpagaus C, Belleiteix F, Vandamme T. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *Journal of Controlled Release.* 2010;147(2):304-310.
79. Wang Y, Huang L. Composite Nanoparticles for Gene Delivery. *Nonviral Vectors for Gene Therapy - Lipid- and Polymer-based Gene Transfer.* 2014;:111-137.
80. Krishnamurthy S, Vaiyapuri R, Zhang L, Chan J. Lipid-coated polymeric nanoparticles for cancer drug delivery. *Biomaterials Science.* 2015;3(7):923-936.
81. Zhang L, Wang P, Feng Q, Wang N, Chen Z, Huang Y et al. Lipid nanoparticle-mediated efficient delivery of CRISPR/Cas9 for tumor therapy. *NPG Asia Materials.* 2017;9(10):e441.



LAMPIRAN

restriction sites. gRNA sequences are as follows: T1: GGCCTTCATCAGCTTTTCCAggg, T2: GGAAGGACTTGAGGGACTCGAagg, T3: GGCTGAGGAAGCTGAGGAGGcgg, T4: GCCCCCGCCGCCACCCGGCCcgg, and control gRNA: ACCGGAAGAGCGACCTCTTCT (PAM sequence are shown in lowercase). AAV-CMV-Cas9 vector was generated by replacing Mesp2 promoter (228 bp) in PX551 with CMV promoter (658 bp) using XbaI and AgeI restriction sites. These viral vectors were sent to the Viral Vector Core at Emory University for packaging and purification of viruses. The genomic titer of viruses was determined by PCR method.

Lampiran 1. Sekuens DNA target pada ekson 1 mHTT (T1-T4) dan kontrol.^[1]



Lampiran 2. Skema desain sekuens gRNA dengan target spesifik T1 dan T3 pada mHTT.^[1]