

Cluster Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat – Association 9 (CRISPR/Cas9)
Teknologi Terbaru *Editing Gen Human Pluripotent Stem Cells (Hpsc)* Sebagai Terapi
Penyakit Diabetes Mellitus Tipe 1

Nurul Hidayah, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Indonesia
nurulhidayah484@gmail.com

ABSTRAK

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit metabolik yang terdiri dari DM Tipe 1 yang disebabkan oleh reaksi autoimun sel β pankreas, dan DM Tipe ke-2 karena ketidakmampuan tubuh menggunakan insulin secara maksimal. Pada tahun 2010, 113.000 anak menderita DM Tipe 1, dan diperkirakan akan mengalami peningkatan sebanyak 18.000 anak. Diabetes melitus tipe 1 merupakan penyakit yang membutuhkan proses *editing* gen pada pengobatannya. CRISPR/CAS9 diketahui efektif dalam perubahan gen hPSCs (gen sel stem progenitor) DM Tipe 1. CRISPR/Cas9 terdapat di bakteri dan *aracea* yang berperan dalam imunitas adaptif. Proses perbaikan sel pankreas membantu pengaturan insulin tubuh sekaligus mengobati penyakit DM Tipe 1. Metode yang digunakan dalam *literature review* ini yaitu *review article* yang terdiri dari 16 jurnal dan 2 buku dan didapatkan melalui google scholar, Pubmed, serta Mendeley.. Metode pengeditan gen bermacam-macam salah satunya yaitu CRISPR/Cas9 dan TALEN. Terdapat 3 jenis sel progenitor (sel hPSCs) pankreas yang diketahui mampu menghasilkan insulin adalah sel NKX6.1-GFP HUES8, sel H1, dan sel Nocodazole. Pada CRISPR/Cas9, keberadaan GFP menunjukkan hasil perbaikan dari DSB yang dilakukan dengan adanya donor NHEJ. GFP berperan dalam derivasi sel progenitor pancreas (sel NKX6.1-GFP HUES8) dengan mengalami peningkatan sebesar 47.6%. Pada sel H1 menunjukkan adanya perbedaan peningkatan sel sebanyak 17.77%. Terakhir, pada sel Nocodazole diketahui terdapat peningkatan differensiasi sebanyak 54.64% dibandingkan dengan metode editing TALEN. Sehingga CRISPR/Cas9 dapat menjadi metode editing gen efektif khususnya dalam terapi DM Tipe 1.

Kata Kunci: Diabetes Mellitus Tipe 1, CRISPR/Cas9, Sel hPSC

1. PENDAHULUAN

Diabetes Mellitus (DM) merupakan penyakit metabolik yang ditandai dengan adanya peningkatan kadar glukosa darah (*hiperglicemia*) yang terjadi secara perlahan, dan dalam waktu yang lama sebagai akibat dari kegagalan pankreas untuk memproduksi insulin dengan cukup atau tubuh tidak dapat menggunakan insulin secara efektif (Kee, et al., 2015). Penderita diabetes melitus setiap tahunnya mengalami peningkatan. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh *World Health organization* (WHO) pada tahun 1995 Indonesia menempati posisi ke-7 dari 10 negara yang mengidap DM yakni sebesar 4.5 juta penderita, sedangkan pada tahun 2025 Indonesia akan berada pada urutan ke-5 dengan total penderita 12.4 juta (Drucker, 2003). Estimasi terakhir yang dilakukan oleh *International Diabetes Federation* (IDF), bahwa pada tahun 2013 terdapat 382 orang menderita diabetes, lalu pada tahun 2035 jumlah tersebut akan naik menjadi 592 juta orang, sedangkan 175 juta diantaranya belum terdiagnosa sehingga dapat terancam berkembang progresif menjadi komplikasi yang tidak disadari dan tanpa pencegahan (Kementrian kesehatan RI, 2014). Di Indonesia, prevalensi diabetes tertinggi terdapat di Daerah Istimewa Yogyakarta sebanyak 2.6%, dilanjutkan dengan DKI Jakarta (2.5%), Sulawesi Utara (2.4%), dan Kalimantan Timur (2.3%) (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2013)

Penyakit diabetes melitus secara umum dibagi menjadi 2 tipe. Tipe 1 yaitu diabetes tipe 1 (T1D) yang disebabkan oleh reaksi autoimun yang menyebabkan kerusakan pada sel β pankreas, dan menimbulkan terjadinya resistensi insulin. Tipe ke-2 yaitu diabetes tipe 2 (T2D) yang timbul karena ketidakmampuan tubuh untuk menggunakan insulin secara maksimal (Kumar et al., 2012).

Diabetes melitus tipe 1 (T1D) memiliki tingkat resiko yang tinggi. Asia tenggara merupakan wilayah yang memiliki prevalensi tertinggi untuk T1D. Diketahui bahwa pada tahun 2010 terdapat 113.000 anak dibawah 15 tahun yang menderita T1D dengan perkiraan mengalami peningkatan setiap tahunnya sebanyak 18.000 anak. T1D merupakan penyakit yang tidak dapat disembuhkan, melainkan dikendalikan. Dalam perkembangannya T1D dapat menyebabkan terjadinya penyakit jantung, kerusakan saraf (*Neuropathy*), dan kerusakan ginjal (*Nephropathy*) (World Health Organization, 2006).

Oleh karena itu, perlu adanya penelitian terbaru yang dapat membantu dalam mengobati diabetes melitus tipe 1. Salah satu hal yang dapat dilakukan adalah dengan melakukan pengeditan genetik menggunakan CRISPR/CAS9.

Sistem *Cluster Regulary Interspaced Short Palindromic Repeat* (CRISPR) – CRISPR-assosiasi (Cas) terdapat di bakteri dan aracea (misal, *E.coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Neisseria meningitides*, dan *Treponema denticola*) yang berperan dalam imunitas adaptif (Xiao-Jie et al., 2015; Kee et al. 2015). Penggunaan CRISPR/Cas sebagai pengedit gen dimulai sejak tahun 2013, dengan sistem CRISPR tipe II dari *S.Thermophilus* dan *S.Pyogenes* dapat digunakan dalam teknik pengubahan gen mamalia (Gens, 2015). CRISPR/CAS9 diketahui efektif dalam pengubahan gen *human pluripotent stem cell* (hPSCs) (Kee et al. 2015). Proses pengubahan gen hPSCs yang terkait dengan T1D meliputi 3 tahapan: (1) penurunan hiPSCs dari pasien dengan T1D, (2) memicu perbaikan kontrol isogen, dan (3) berdeferensiasi ke dalam sel pancreas (Kee et al. 2015). Proses perbaikan dari sel pankreas dapat membantu dalam pengaturan insulin dalam tubuh. Sehingga, dapat membantu pasien dalam mengobati penyakit diabetes tipe 1.

2. METODE

Metode yang digunakan dalam *literature review* ini yaitu *review article*. Dengan melakukan pengumpulan referensi sebanyak 16 jurnal dan 2 buku. Referensi tersebut didapatkan melalui *google scholar*, *Pubmed*, dan *mendeley*. Dengan kata kunci meliputi Diabetes mellitus, DM tipe 1, *genome editing*, CRISPR/Cas9, hPSCs dan editing gen beta pancreas. Data akan dipilih dan kemudian dianalisis sampai mencapai tujuan karya ini.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Mikroba memiliki berbagai macam strategi dalam mempertahankan hidup selama terpapar oleh unsur genetik asing. Strategi yang dilakukan yaitu dengan pencegahan adsorpsi, pemblokiran injeksi, dan kegagalan infeksi terhadap virus (Horvath & Barrangou, 2010). Hal ini disebabkan kemampuan mikroorganisme dalam melakukan perkembangan selama berada di lingkungan dengan paparan eksogen DNA yaitu dengan cara transduksi, konjugasi, dan transformasi. Paparan tersebut telah membuat mikroba memiliki sistem pertahanan yang memungkinkannya untuk mengenali dan membedakan DNA asing dan DNA diri (Horvath & Barrangou, 2010). Kemampuan mikroba untuk membedakan DNA asing dan diri dimanfaatkan sebagai metode baru untuk mengobati penyakit berhubungan dengan gen (Gens, 2015).

Pada tahun 2002, Jansen dan rekannya melakukan perkembangan penelitian *editing* gen yang dilakukan oleh Nakata pada tahun 1987 (Jansen et al., 2002). Nakata melakukan penelitian terhadap enzim iap yang menyebabkan pengulangan rangkaian gen (Ishino et al., 1987). 5 tahun kemudian Jensen dan tim menemukan bahwa pengulangan yang terjadi pada gen tersebut sama halnya dengan CRISPR (*Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats*), yang mana pada saat itu fungsi dari CRISPR belum sepenuhnya diketahui (Jansen et al. 2002). Beberapa tahun selanjutnya, Bolotin (2005) menemukan adanya gen Cas (*CRISPR associating*) yang menyandi DNA endonuclease, menunjukkan adanya interaksi kuat dalam kerusakan DNA asing yang menjadi fungsi utama dari CRISPR Cas.

CRISPR/Cas9

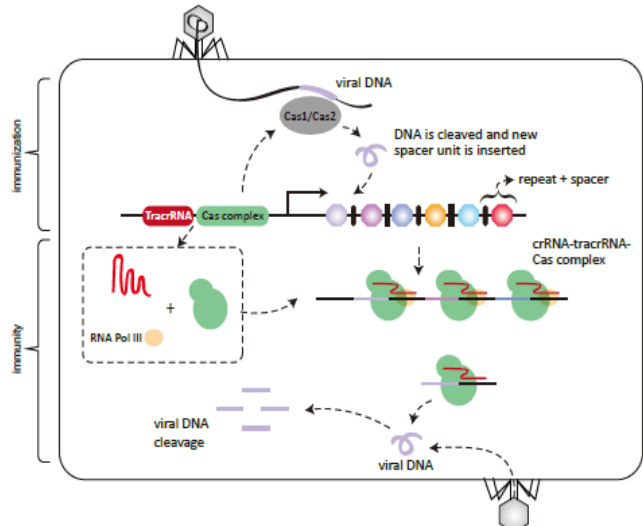
CRISPR ditemukan pertama kali oleh Ishino dan Jensen di bakteri *Escherichia Coli* (Jansen et al. 2002; Ishino et al. 1987; Khan et al. 2016; Gens, 2015). Pada tahun 2013 CRISPR/Cas9 diuji coba pertama kali kepada organisme mamalia. Di tahun ini, manfaat dari CRISPR telah banyak diketahui salah satunya yaitu sederhana, mudah untuk digunakan, dan memungkinkan untuk dilakukan pengubahan multipel gen secara bersamaan (Xiao-Jie et al. 2015).

Lokus CRISPR diketahui dapat menangkap rangkaian *spacer* (pemberian jarak) dari serangan virus dan menggunakannya sebagai *memory* untuk memberikan tempat inang bagi bakteri atau *archaea* untuk mengembangkan sistem kekebalan adaptif melalui protein Cas dan membuat *Double Stranded DNA Breaks* (DSBs) (Khan et al. 2016; Cannan & Pederson, 2016). Kombinasi CRISPR dengan protein Cas membentuk sistem CRISPR/Cas (Horvath & Barrangou, 2010). Sistem ini dapat ditemukan dikromosom dan plasmid DNA bakteri (Horvath & Barrangou, 2010; Rath et al., 2015), sedangkan pada virus dan sel eukariotik CRISPR tidak dapat ditemukan (Jansen et al. 2002). Sistem CRISPR yang terdapat pada bakteria telah diidentifikasi memiliki 3 tipe yaitu Tipe I, II, dan III (Gens, 2015; Horvath & Barrangou, 2010). Pada CRISPR tipe II dari *S.Thermophilus* dan *S.Pyogenes* (SpCas) dapat berperan dalam teknik pengeditan gen mamalia. Kemampuan sistem tersebut dalam mengubah gen mamalia dimanfaatkan oleh para ahli dalam upaya terapi penyakit genetik. CRISPR/Cas memungkinkan dalam terapi berbagai macam penyakit, salah satunya yaitu penyakit hematologi, kanker, AIDS, Diabetes, kelainan jantung, dan penyakit neurodegenerative (Xiao-Jie et al. 2015).

Pada *literature review* ini, akan dijelaskan lebih dalam mengenai peran CRISPR/Cas9 dalam mengatasi penyakit diabetes melitus tipe 1 (T1D).

Mekanisme Kerja CRISPR/Cas9

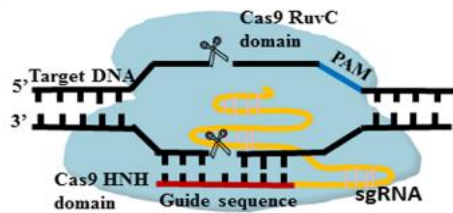
Sistem kerja dari CRISPR meliputi 2 fase yaitu imunisasi dan imunitas (Gambar 1) (Gens, 2015). Fase yang pertama yaitu imunisasi. Pada fase ini, setelah dilakukan proses penyisipan DNA eksogen dari virus atau plasmid, protein Cas membentuk suatu kompleks Cas yang kemudian akan melakukan proses pengenalan dan pembelahan DNA asing. DNA asing tersebut



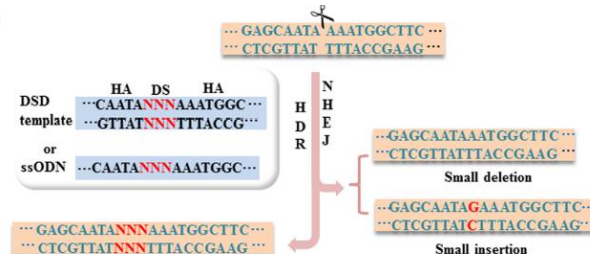
Gambar1-Mekanisme CRISPR mediasi imunitas dalam bakteri(Genscript.com 2015)

kemudian bergabung kedalam lokus CRISPR bakteri sebagai unit *repeat-spacer*. Lalu, masuk ke fase kedua yaitu fase imunitas. Pada fase imunitas dengan diikuti adanya infeksi kembali oleh bakteri, unit *repeat-spacer* bertranskripsi membentuk pre-CRISPR RNA (pre-crRNA). Cas9 endonuklease dan trans-aktivasi crRNA (tracrRNA) kemudian berikatan dengan pre-crRNA. Kompleks crRNA-Cas9-tracrRNA yang matang kemudian terbentuk, mengikuti pembelahan oleh RNA polymerase. Kompleks ini dapat menyebabkan kerusakan DNA asing di sel target (Gens, 2015; Horvath & Barrangou, 2010; Khan et al. 2016; Sander & Joung, 2014).

Inti dari komponen CRISPR/Cas9 adalah nuklease Cas9 yang berisi dua katalitis aktif yaitu RuvC dan HNH, dan turunan dari CRISPR RNA (crRNA) serta trans-aktivasi CRISPR RNA (tracrRNA) yaitu *single guide* RNA (sgRNA) (gambar 2) (Xiao-Jie et al. 2015). Keberadaan *protospacer-adjacent* motif (PAM) pada untaian berlawanan, menyebabkan sgRNA mengatur Cas9 untuk berikatan di lokasi yang tepat pada target. Ikatan tersebut menimbulkan adanya *Double strand breaks* (DSBs) yang akan diperbaiki oleh *Homologous directed repair* (HDR) atau *non-homologous end joining* (NHEJ) (Gambar 3) (Xiao-Jie et al. 2015).



Gambar 2-Pemotongan sisi spesifik DNA oleh nuklease 9(Xiao-Jie et al. 2015)



Gambar 3-Terbentuknya DBS oleh Cas 9 yang dapat diperbaiki dengan HDR atau NHEJ(Xiao-Jie et al. 2015)

CRISPR/Cas9 induksi *Human Pluripoten Stem Cells (hPSCs)*

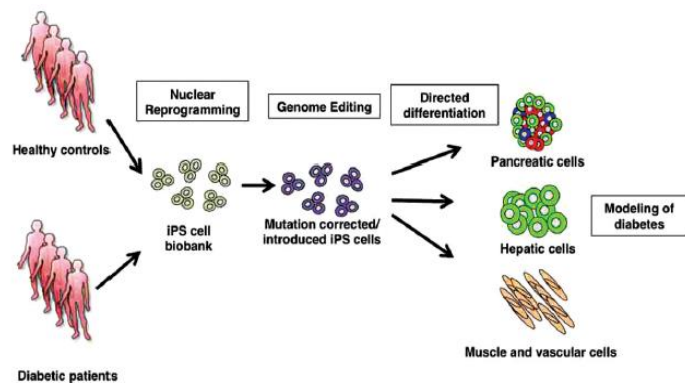
CRISPR dapat digunakan untuk proses diferensiasi sel induk (*stem cell*)(Kee et al. 2015). Diferensiasi sel induk membutuhkan aktivasi gen tertentu (Otonkoski, 2016). Aktifasi Nuklease Cas9 yang menyatu dengan domain transaktivasi dapat digunakan sebagai faktor aktivasi transkripsi untuk mengaktifasi gen yang terlibat dalam proses diferensiasi (gen pada sel hPSCs) (Otonkoski, 2016).

Sel induk yang diperoleh dari sel penderita dapat digunakan sebagai terapi yang spesifik. Sel induk ini dinamakan *human induced pluripotent stem cell (hiPSCs)*. hiPSCs merupakan derivat dari pasien yang mengalami mutasi gen, salah satunya yaitu pada penyakit Diabetes melitus tipe 1 yang dapat diperoleh melalui fibroblas dan sel darah(Otonkoski, 2016).

Diabetes melitus tipe 1 merupakan penyakit yang membutuhkan pengubah komponen gen dalam pengobatannya (Otonkoski, 2016). hiPSCs digunakan karena dapat diperoleh dari pasien penderita diabetes dengan mudah dan mampu berdiferensiasi menjadi tipe sel lain yaitu sel beta pancreas, miosit otot, adiposit, dan hepatosit (Musunuru, 2013).

CRISPR menjadi alat yang penting dalam meningkatkan diferensiasi karena telah diuji kemampuannya dalam pengobatan distrofi otot, dan sel induk hematopoietik dalam mengobati penyakit sel sabit. Pada penelitian terbaru diketahui bahwa CRISPR dapat digunakan untuk memperbaiki mutasi-mutasi yang bersifat merugikan (Musunuru 2013).

Mekanisme kerja dari CRISPR/Cas9 salah satunya menghasilkan DSB (*Double Stranded DNA Breaks*). DSB akan dengan cepat diperbaiki apabila melalui mekanisme NHEJ yang memicu delesi sel. Sebagai alternative, donor template secara bersamaan dapat menginduksi sel, menghasilkan insersi rangkaian dimana memberikan koreksi yang spesifik pada gen termutasi(Otonkoski 2016). Induksi sel stem pluripoten (hiPSCs) diperoleh dari pasien dengan memperhatikan faktor genotip nya. Kemudian hiPSCs berdiferensiasi menjadi tipe sel yang relevan, seperti misal sel islet pancreas, hepatosit, dan sel lainnya (gambar 4)(Otonkoski 2016).



Gambar 4-Penggunaan pengulangan sel dan pengubahan gen untuk penelitian diabetes secara eksperimen(Otonkoski 2016)

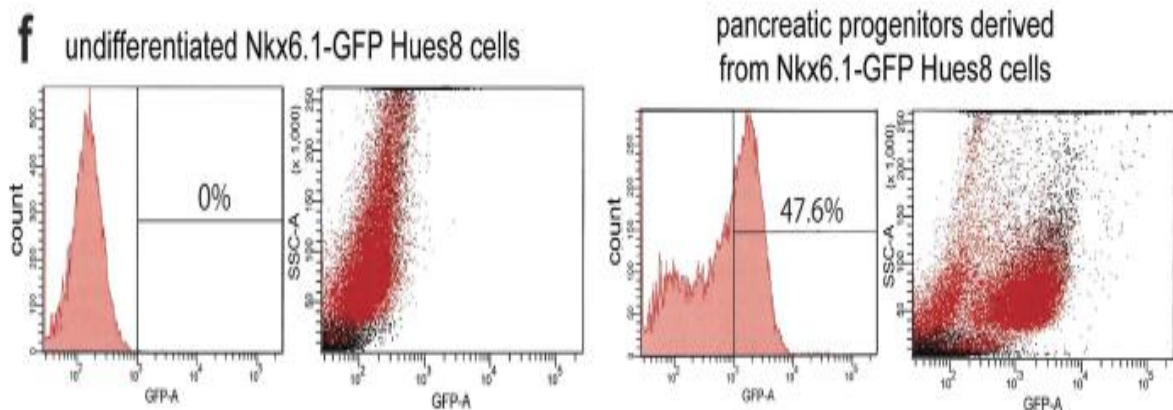
Berdasarkan gambar 4, fungsi dari dibedakannya sel pasien dengan sel kontrol adalah untuk mengetahui secara rinci pengaruh pengeditan sel termutasi(Otonkoski 2016). Proses diferensiasi sel tubuh selalu melalui suatu siklus sel. Di dalam siklus tersebut terdapat beberapa fase yang menyertainya salah satunya yaitu fase G2/M yang berperan dalam proses perbaikan DSB(Yang et al. 2016).

	Wnt5a	NeuroD1	Nkx6.1	Insulin	Oct4
Cells targeted	1. H1	1. H1	1. H1 2. HUES8	1. H1	1. FUCCI-H9
	2. NPCs	2. HUES8	3. DiPSCs	2. HUES8	
		3. DiPSCs	3. DiPSCs		
Targeting strategy	1. CRISPR nickase (D10A, S. pyogenes)	1. CRISPR (S. pyogenes) 2. CRISPR (N. meningitides)	1. ZFNs	1. CRISPR (S. pyogenes) 2. TALENs	1. CRISPR (S. pyogenes)
Average fold increase in efficiency with synchronization	3.75	4.66	5.32	4.61	5.86

Tabel 1-siklus sel memicu target editing gen oleh 3 macam alat pengubah gen(Yang et al. 2016)

Editing Gen Sel Progenitor Pankreas (hPSCs)

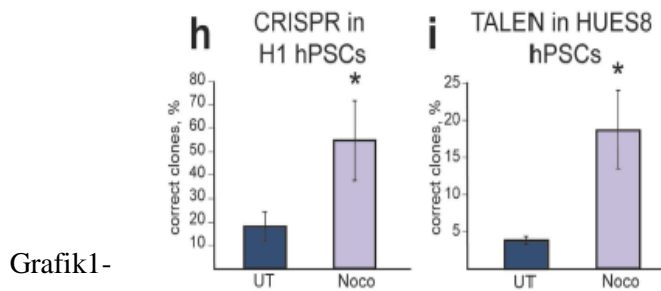
Teknologi pengeditan gen ada bermacam-macam salah satunya yaitu TALEN, dan CRISPR. Alat tersebut dapat memicu peningkatan dan perbaikan untuk penyakit diabetes(Yang et al. 2016). Terdapat 3 jenis sel progenitor (sel hPSCs) pankreas yang diketahui mampu menghasilkan insulin adalah sel NKX6.1-GFP HUES8, sel H1, dan sel Nocodazole. Salah satu penanda terjadinya diferensiasi secara invitro pada CRISPR adalah dengan adanya GFP. GFP merupakan hasil perbaikan dari DSB yang dilakukan dengan adanya donor NHEJ pada penggunaan CRISPR/Cas9. GFP berperan dalam derivasi sel progenitor pancreas (sel NKX6.1-GFP HUES8) (Yang et al. 2016).



Gambar5-Sinkronisasi G2/M meningkatkan efisiensi target dari sel NKX6.1 dengan CRISPR/Cas9(Yang et al. 2016)

GFP tidak diekspresikan pada sel *NKX6.1-GFP HUES8* sehingga tidak menunjukkan adanya perkembangan progenitor pancreas (gambar5). Akan tetapi, identifikasi lebih lanjut menunjukkan peningkatan GFP sel progenitor pankreas secara *in vitro* setelah proses induksi diferensiasi sel oleh CRISPR/Cas9. GFP secara spesifik mengalami peningkatan sebanyak 47.6% dari total sel yang mengekspresikan eGFP, sehingga sel *Hues8* digunakan sebagai target perbaikan sel untuk menghasilkan insulin dengan menggunakan CRISPR *S.Pyogene*. Selain itu, uji coba dengan sel lain yaitu sel H1 menunjukkan adanya perbedaan. Perbedaan sel H1 dengan CRISPR menunjukkan angka 17.77% klon positif untuk dua luaran PCR dengan menetapkan integrasi yang

benar dari KO dan gen seleksi. Kemudian total klon yang teranalisa (n=300) dibandingkan dengan sel Nocodazole dan didapatkan hasil sebanyak 54.64% menunjukkan peningkatan yang signifikan pada penggunaan metode editing CRISPR dibandingkan metode editing TALEN (Grafik 1) (Yang et al. 2016).



Grafik1-

Sinkronisasi G2/Mmeningkatkan efisiensi

target dari sel NKX6.1 dengan CRISPR/Cas9(Yang et al. 2016)

4. KESIMPULAN

Diabetes Mellitus (DM) merupakan penyakit metabolik yang dapat menyebabkan terjadinya penyakit jantung, kerusakan saraf (*Neuropathy*), dan kerusakan ginjal (*Nephropathy*). Penelitian terbaru menunjukkan bahwa induksi gen sel hPSCs dengan bantuan CRISPR/Cas9 dapat memicu terjadinya perbaikan sel yang rusak atau penghilangan DNA asing pada tubuh manusia. Terdapat 3 jenis sel progenitor (sel hPSCs) pankreas yang diketahui mampu menghasilkan insulin adalah sel NKX6.1-GFP HUES8, sel H1, dan sel Nocodazole. Pada CRISPR/Cas9, keberadaan GFP menunjukkan hasil perbaikan dari DSB yang dilakukan dengan adanya donor NHEJ. GFP berperan dalam derivasi sel progenitor pancreas (sel NKX6.1-GFP HUES8) dengan mengalami peningkatan sebesar 47.6%. Pada sel H1 menunjukkan adanya perbedaan peningkatan sel sebanyak 17.77%. Terakhir, pada sel Nocodazole diketahui terdapat peningkatan differensiasi sebanyak 54.64% dibandingkan dengan metode editing TALEN. Sehingga CRISPR/Cas9 dapat menjadi metode editing gen efektif khususnya dalam terapi DM Tipe 1.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2013. Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) 2013. *Laporan Nasional 2013*, pp.1–384.
- Cannan, W.J. & Pederson, D.S., 2016. Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. *Journal of Cellular Physiology*, 231(1), pp.3–14.
- Drucker, D., 2003. *Diabetes Care.* , 26, pp.2929–2940.
- Genscript.com, 2015. CRISPR Handbook. *GenScript*, pp.1–32. Available at: <http://www.genscript.com/crispr-handbook.html>.
- Horvath, P. & Barrangou, R., 2010. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5962), pp.167–170.
- Ishino, Y. et al., 1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, 169(12), pp.5429–33. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=213968&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Jansen, R. et al., 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), pp.1565–1575.
- Kee, A. et al., 2015. Dissecting diabetes / metabolic disease mechanisms using pluripotent stem cells and genome editing tools. *Molecular Metabolism*, 4(9), pp.593–604. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2015.06.006>.
- Kementrian kesehatan RI, 2014. Infodatin-Situasi dan analisis diabetes.
- Khan, F.A., Pandupuspitasari, N.S. & Chun-jie, H., 2016. CRISPR / Cas9 therapeutics : a cure for cancer and other genetic diseases. *Oncotarget*, 7(32).
- Kumar, V., Cotran, R.S. & Robbins, S.L., 2012. *Robins Buku Ajar Patologi*,
- Musunuru, K., 2013. Genome editing of human pluripotent stem cells to generate human cellular disease models. *Disease models & mechanisms*, 6(4), pp.896–904. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3701209&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Otonkoski, T., 2016. New tools for experimental diabetes research : Cellular reprogramming and genome editing. , 9734(March), pp.0–5.
- Rath, D. et al., 2015. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117, pp.119–128. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025>.
- Sander, J.D. & Joung, J.K., 2014. review CRISPR-Cas systems for editing , regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2842>.
- World Health Organization, 2006. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia:Report of a WHO/IDF consultation. *Production*, pp.1–52.

Xiao-Jie, L. et al., 2015. CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. *Journal of medical genetics*, pp.289–296. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25713109>.

Yang, D. et al., 2016. Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases. *Scientific reports*, 6(February), p.21264. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4757933&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.