



Gensaxar ändrar DNA

På 70-talet lyckades forskare tillverka de första genmodifierade bakterierna och sedan dess har utvecklingen gått snabbt. Mycket uppmärksamhet under de senaste åren har gensaxen CRISPR fått, en teknik som innebär att man kan göra exakta förändringar i DNA. Etiska frågor kring genteknikens möjligheter och risker diskuteras även livligt.

Diabetes, den form som drabbar barn och unga, är fortfarande en sjukdom som kräver noggrann kontroll och tillförsel av insulin. Idag är inte tillgången på insulin ett problem, så som det var i början av 1900-talet. Barn som drabbades av diabetes innan det fanns insulin att tillgå överlevde inte mer än ett par år. De tvingades hålla en sträng diet med mycket fett och så lite kolhydrater som möjligt, men dog snart av svält.

Insulinet upptäcktes i början av 1920-talet och inom något år hade man utvecklat en behandlingsmetod för diabetespatienter. Behovet av insulin var stort och tillverkning i större skala med utgångspunkt i slaktavfall kom snart igång. Inom några få år spreds behandlingsmetoden till allt fler länder och tidigare dödsjuka patienter fick nytt liv. Redan 1923 kunde patienter i Sverige behandlas kontinuerligt med insulin. Frederick Grant Banting och John Macleod vid universitetet i Toronto, Kanada, tilldelades Nobelpriset i fysiologi eller medicin 1923 för forskning kring insulin.

Nästa stora framsteg inom diabetesbehandlingen kom när tillverkning av insulin med hjälp av genmodifierade jästceller godkändes 1982. Det innebar att man inte längre var beroende av bukspottkörtlar från slaktavfall för insulinproduktion och att patienterna fick mänskligt insulin i stället för insulin från gris. Aktivt insulin från gris respektive från människa skiljer sig åt beträffande en aminosyra i insulinets aminosyrasekvens. Insulinet var det första läkemedlet som tillverkades med hjälp av en genmodifierad organism och som kom i kommersiell produktion.

Forskare berättar

När metoden CRISPR/Cas9 presenterades 2012 innebar det en revolution inom gentekniken. Förhoppningar knyts nu till att metoden ska kunna tillämpas inom många områden. I den följande artikeln beskrivs hur CRISPR-tekniken fungerar och exempel från växtförädling presenteras. Metoden kan också användas vid genterapi på människor, vilket beskrivs i den andra artikeln.

Genteknik i skolan

Styrdokumentet för biologi tar upp etiska frågor i samband med genteknikens användningsområden. Etiska frågor är viktiga att diskutera, men elever behöver också grundläggande kunskaper om genteknikens metoder, möjligheter och begränsningar för att kunna föra en initierad diskussion. Det gäller för elever på både grundskola och gymnasium. Öppna för samtal i skolan där åsikter beläggs med fakta och där fördelar och nackdelar vägs mot varandra på ett insiktsfullt sätt. Det är även viktigt att laborera för att elever ska få praktisk och konkret erfarenhet av att arbeta med gentekniska metoder. Försök med transformation av bakterier, PCR-reaktioner och separation av DNA-sekvenser med gelelektrofores är exempel på laborationer som kan genomföras, men som självklart kräver utrustning och erfarenhet. Omfattande databaser med DNA-sekvenser, proteiner och hela genom, samt bioinformatiska verktyg är fritt tillgängliga och gör det möjligt för elever att arbeta med intressanta frågeställningar. Några frågor och diskussionsämnen som kan aktualiseras utifrån den här delen:

- Vilka länder odlar en hög andel genmodifierade grödor och vilka grödor gäller det?
- I Sverige genomförs årligen fältförsök med genmodifierade grödor (se Jordbruksverkets hemsida). Vilka växter har man testat och vilka speciella egenskaper har de?
- Sommaren 2018 fattade man beslut inom EU om att växter som förändrats med hjälp av CRISPR-tekniker ska betraktas som genmodifierade. Vilka restriktioner finns för att odla genmodifierade växter inom EU? Hur ser länder i andra delar av världen på frågan?
- Det är inte tillåtet att åstadkomma genetiska förändringar hos människa som går i arv till kommande generationer, men hur blir det i framtiden? Förklara skillnaden mellan genetiska förändringar av kroppsceller respektive könsceller. Diskutera de etiska konsekvenserna för de båda fallen.

CRISPR

– introduktion till en mycket uppmärksammas metod

CRISPR är en genteknik som introducerar mutationer i DNA. Tekniken slog igenom bland forskare under 2013 och har snabbt kommit till användning inom både medicinsk och biologisk forskning. Många tror att forskarna bakom CRISPR kan komma att belönas med Nobelpriset i kemi. Men hur får tekniken användas? Lagstiftningen skiljer sig åt mellan länder.



Texten är skriven av:

Jens Sundström

Docent i växtfysiologi och samverkanslektor vid Institutionen för växtbiologi, Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) i Uppsala. Hans forskning är fokuserad på växternas reproduktiva utveckling, det vill säga kottsättning i barrträd och blomning i grödor och gömfröiga modellsystem. Inom ramen för sitt lektorat bedriver han även samverkan inriktad mot ämnet bioteknik och dess tillämpningar inom skog- och lantbruk.

Jenny Carlsson

Agronomie doktor i växtförädling och genetik, anställd av företaget Academy. Hon undervisar idag blivande konsulter inom läkemedelsbranschen i cellbiologi. Tidigare arbetade hon på den statliga myndigheten Gentekniknämnden, där hon följde utvecklingen inom genteknik. Dessförinnan ägnade hon sig åt växtforskning.



Förändringar av DNA i form av mutationer uppstår spontant i naturen. Dessa förändringar skapar till exempel olika varianter av gener. Mutationer är en av grundförutsättningarna för evolutionen. Mutationerna kan vara tysta, det vill säga den nya varianten bidrar inte med någon förändring av egenskapen. De kan i enstaka fall introducera positiva eller negativa förändringar.

Under historiens gång har vi människor på olika sätt utnyttjat uppkomsten av mutationer i växtförädling och djuravel. Till att börja med valde vi människor ut växter och djur som passade oss. Genom årtusendena blev urvalen allt mer systematiska, för att under 1800-talet utvecklas till urvalsförädling, och det som vi idag känner igen som växtförädling och djuravel.

Under 1900-talet började forskare ta fram metoder för att introducera mutationer för att slippa vänta på att de skulle uppstå spontant i naturen. Man använder sig av bland annat mutagenes, det vill säga kemikalier (som etylmetansulfonat, EMS) och strålning (som radioaktiv strålning) för att introducera förändringar av DNA. En annan teknik är genmodifiering. Alla dessa tekniker används fortfarande i djuravel och förädling av växter världen över. Numera tillhör också CRISPR en av dessa tekniker.

Försvar mot virus

CRISPR, som är en förkortning av engelskans "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats", förekommer i naturen och är ett av flera sätt för bakterier att skydda sig mot virus. Med hjälp av CRISPR-systemet kan bakterier känna igen virus som tidigare har infekterat cel-

len, och på ett effektivt sätt bryta ner dessa. Systemet kan jämföras med det immunförsvar som vi människor har.

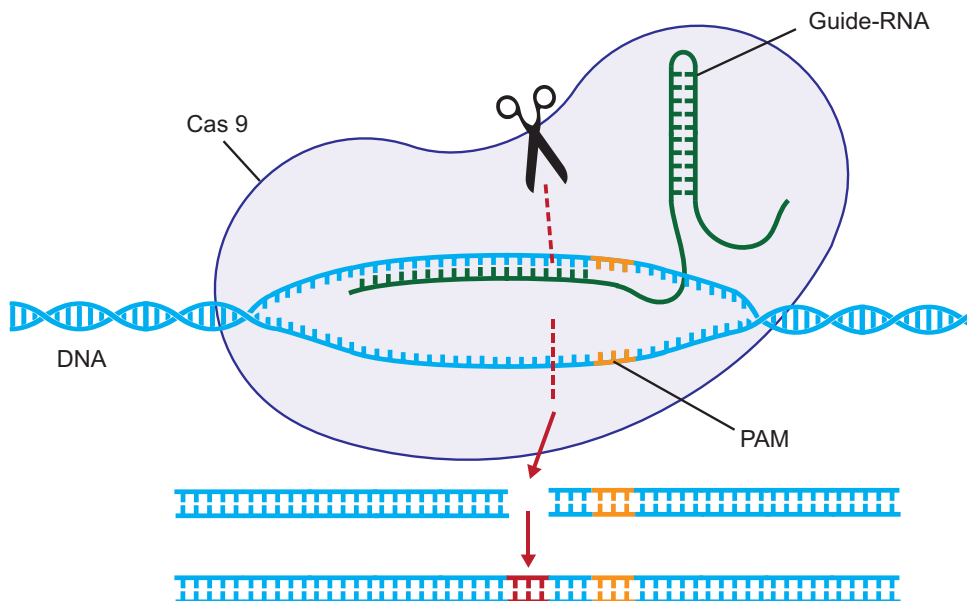
Forskare har anpassat CRISPR till andra organismer och tekniken används för att introducera mutationer hos till exempel djur och växter. Detta kallas genom-editering. På engelska kan man se namnet site-directed mutagenesis (SDM). Andra namn för CRISPR är genkniv och gensax. Många tror att utvecklingen av CRISPR-tekniken kan resultera i Nobelpriset i kemi. Blir det ett Nobelpris går det förmodligen till Emmanuelle Charpentier, Jennifer Doudna och Feng Zhang.

Introducerar mutationer

CRISPR tillhör en grupp tekniker där ett protein eller ett RNA känner igen en specifik DNA-sekvens och ett nukleas klipper av DNA-strängen vid denna sekvens (se figur bredvid). Nukleas är enzymer som klipper av nukleinsyror (det vill säga DNA och RNA). Brottet i DNA-kedjan som uppstår lagas av cellens eget reparationssystem. I vissa fall blir det fel när DNA-kedjan ska lagas och mindre förändringar kan uppstå. Ibland byts en nukleotid ut mot en annan eller också kan ett fåtal nya nukleotider föras in, eller så kan det försvinna nukleotider. Förutom CRISPR och dess Cas9-enzym så finns det andra nukleaser, exempelvis TALEN och ZFN, som på ett liknande sätt kan användas för att klippa av DNA. TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) och ZFN (Zinc-Finger Nucleases) har precis som CRISPR biologiska funktioner i organismer.

Vad kan vi göra nu?

CRISPR-tekniken slog igenom 2013 men redan nu kan vi se kommande tillämpningar. Forskare vid SLU i Alnarp har tagit fram en potatis med förändrad stärkelsesammansättning med hjälp av CRISPR-tekniken. I vanlig potatis finns stärkelsen i två former, amylos och amylopektin. För att kunna använda sådan stärkelse för industriella ändamål måste man först stabilisera stärkelsen med kemiska metoder. Genom att introducera en mutation i en gen



Figur 1.

Illustration: Cajsa Lithell, Red Cap Design

SÅ FUNGERAR CRISPR-TEKNIKEN

CRISPR kan till exempel användas för att introducera riktade mutationer där en viss gen stängs av eller för att på ett precist sätt ändra några enstaka baspar. Ett guide-RNA designas för att binda in till en specifik plats i arvsmassan och föra med sig Cas9-enzymet till DNA-strängen. Cas9-enzymet klipper av DNA-strängen där guide-RNA:t bundit in. För att Cas9-enzymet ska kunna klippa krävs även att det finns en så kallad PAM-sekvens i närheten av den plats där guide-RNA:t bundit in. När Cas9-enzymet klippt i DNA-strängen lagar cellens eget reparationssystem skadan. Lagningen blir inte alltid exakt, utan med en viss frekvens kan några få baspar försvinna eller läggas till och då skapas det en mutation (punkt 1 nedan). Det går även att föra in en DNA-sekvens i cellen tillsammans med Cas9-enzymet och guide-RNA:t. Detta DNA fungerar då som en mall när cellens reparationssystem ska laga skadan (punkt 2 nedan). (Det finns fler enzymer än Cas9 som kan användas inom CRISPR.)

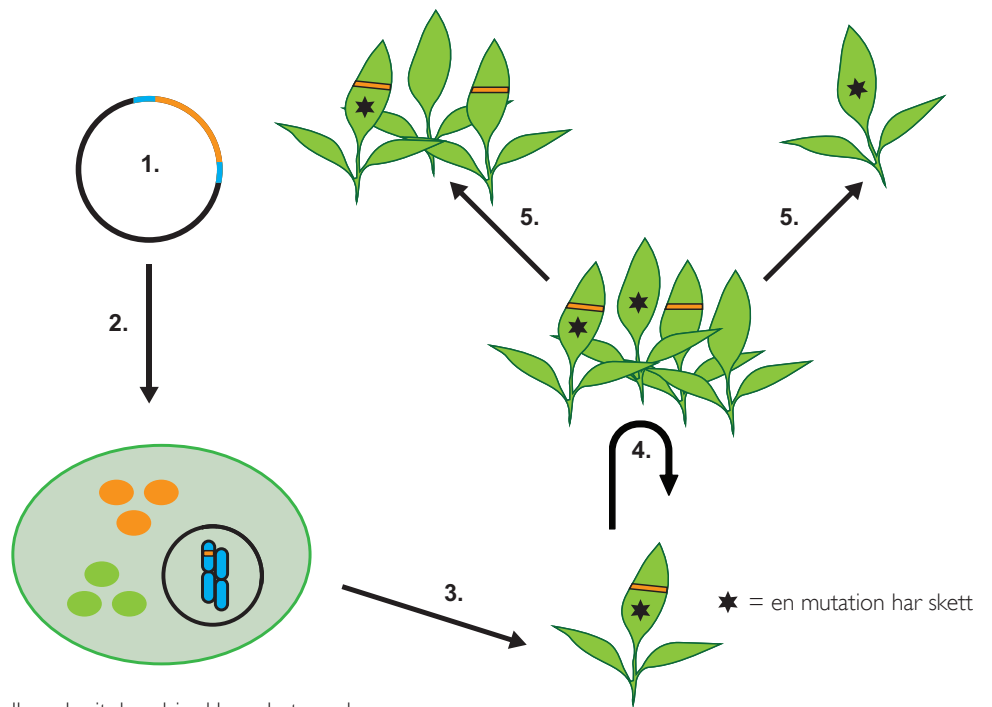
Två olika sätt att skapa mutationer:

1. CRISPR kan användas för att klippa av DNA på ett visst ställe, för att sedan låta cellen reparera brottet. Därefter studerar man om och vilka punktmutationer som har uppstått. Detta har man gjort för att stänga av genen som gör amylos i potatis. Resultatet har gett en potatis som i huvudsak producerar amylopektin, vilket är av värde för stärkelseindustrin. Med hjälp av TALEN har man stängt av genen som ger nötkreatur horn. På detta sätt har man fått fram kalvar utan horn. Hornlösa nötkreatur minskar risken för skador på djur och människor.
2. CRISPR kan också användas för att klippa av DNA på ett visst ställe, föra in en mall och låta cellen laga brottet med hjälp av mallen. På så sätt kan man rätta till en skadlig mutation eller föra in en specifik mutation för att få önskade egenskaper. Detta har man gjort i mänskliga blodstamceller för att rätta den mutation som leder till blodsjukdomen sickelcellanemi. De muterade cellinjerna fördes in i möss som led av sjukdomen. Mössen kunde efter behandlingen tillverka tillräckligt många normala röda blodkroppar för att må bättre.

TILLÄMPNING

CRISPR-konstruktionen kan föras in i växt- eller djurceller på samma sätt som när man gör en transgen växt eller ett transgent djur, det vill säga som när man får en genetiskt modifierade organism (GMO). När generna som kodar för Cas9-enzymet och guide-RNA uttrycks kommer genomediteringen av DNA att ske, och den planerade förändringen eller mutationen uppstår. I detta exempel modifieras en växt.

1. Gör en DNA-plasmid som kodar för Cas9-enzymet och guide-RNA (orange färg).
2. För in DNA-plasmiden i växtcellen. Sekvensen som kodar för Cas9-enzymet och guide-RNA förs över från plasmiden till cellens kromosomer. En genmodifierad eller transgen cell har bildats.
3. Låt de genmodifierade växtcellerna växa upp till nya genmodifierade plantor. Varje cell ger en planta.
4. Kors plantorna med sådana som inte modifierats. Detta resulterar i fyra typer av plantor: plantor med en CRISPR-konstruktion, plantor med en mutation, plantor med både CRISPR-konstruktion och mutation, samt plantor utan vare sig det ena eller det andra.
5. Välj ut plantor som bär på mutationen, men som saknar CRISPR-konstruktionen. Spara dessa plantor och kasta övriga. Man vill inte ha med Cas9-proteinet och guide-RNA:t i de plantor man väljer att spara eftersom de över tid kan ackumulera oförutsedda mutationer.



Växtcell med mitokondrier, kloroplaster och cellkärna med två kromosomer. En av kromosomerna bär på en CRISPR-konstruktion.

Figur 2.

Illustration: Cajsa Lithell, Red Cap Design

som styr vilken sorts stärkelse som bildas har man tagit fram en potatis som endast producerar amylopektin. En sådan stärkelse är stabil i sig själv och behöver inte behandlas kemiskt för att kunna användas inom industrin. Med en stärkelsepotatis som endast producerar en form av stärkelse kan man därmed minska användningen av kemikalier.

CRISPR-tekniken kan användas för att domesticera nya grödor. Det finns ett behov att utöka mångfalden av de arter vi odlar och använder som föda, men många vilda arter lämpar sig inte att odla. Forskare i USA har använt CRISPR-tekniken för att påverka egenskaper i en vild släkting till dagens odlade tomat. Bland annat har man använt tekniken för att påverka plantans tillväxt, blomningen och fruktens storlek. Förhoppningen är att detta ska ge en ökad diversitet och nya tomatorter med förbättrad motståndskraft mot skadeinsekter och sjukdomar som samtidigt ger en bra skörd.

Vad säger lagstiftningen?

Räknas en växt eller ett djur där man introducerat en mutation med hjälp av CRISPR-som en genetiskt modifierad organism (GMO)?

Traditionellt har man ansett att GMO är organismer där man tillfört nytt DNA på annat sätt än genom korsningar eller naturlig rekombination. Metoder för att introducera mutationer med hjälp av radioaktiv strålning och mutagena kemikalier har varit undantagna från reglering.

Sommaren 2018 avgjorde Europadomstolen ett rättsfall där frågan gällde om grödor som tagits fram med den nya CRISPR-tekniken ska regleras som GMO eller om de ska jämföras med grödor som tagits fram med hjälp av radioaktiv strålning eller mutagena kemikalier. Enligt Europadomstolens beslut ska grödor som tagits fram med den nya CRISPR-tekniken regleras som GMO.

Myndigheter i bland annat USA, Japan och flera länder i Sydamerika har gjort en annan bedömning och jämför CRISPR-tekniken med andra tekniker för mutationsförädling. En växt eller ett djur där man introducerat en mutation med hjälp av CRISPR räknas därmed som en GMO i Europa men inte i stora delar av övriga världen. Europadomstolens beslut kan därmed komma att få konsekvenser både för forskningen och växtförädlingen här i Europa, samt vår handel med övriga delar av världen.



Blir det ett Nobelpris går det förmodligen till Emmanuelle Charpentier, Jennifer Doudna och Feng Zhang.

CRISPR mot Alzheimers sjukdom?

Omkring 50 miljoner människor i världen och ungefär 85 000 i Sverige tros vara drabbade av den vanligaste demenssjukdomen av alla – Alzheimers sjukdom. I sällsynta fall är orsaken en mutation i en av tre gener. Nu pågår forskning där CRISPR/Cas9 används för att förstöra den muterade genen, i syfte att bota sjukdomen.

Alzheimers sjukdom leder till att nervceller dör och hjärnvävnad försvinner, vilket bland annat ger problem med minnet och andra kognitiva funktioner. Sjukdomen tros bero på att det börjar bildas och lagras så kallade plack och nystan i hjärnbarken, av proteinerna amyloid- β och tau.

Genetiska orsaker

I sällsynta fall kan neurodegenerativa sjukdomar, det vill säga sjukdomar där nervceller förstörs, orsakas av mutationer i vissa gener. För Alzheimers sjukdom har tre sådana gener beskrivits: *APP*, *PSEN1* och *PSEN2*. Mutationer i dessa gener leder till dominant nedärvda sjukdomsvarianter. Det innebär att om en förälder bär på en av dessa muterade gener, har barnen 50 procents risk att insjukna, vilket vanligtvis sker redan mellan 40 och 60 års ålder. Sjukdomsbilden vid dessa tidiga, ärftliga former av sjukdomen är dock lik den man ser vid högre åldrar.

Orsaken till att man drabbas av sjukdomen så tidigt i livet är att de genetiska störningarna leder till en ökad bildning av proteinet amyloid- β .

Patienter som bär på en Alzheimersmutation utgör en minoritet av alla Alzheimerspatienter. Men genom att undersöka dem får vi en tydlig molekylär förklaring till sjukdomen och kan därmed identifiera olika sätt att behandla den. Förhoppningen är att denna kunskap även ska komma till nytta för den stora majoritet av patienter som inte har den ovanliga sjukdomsvarianten.

Behovet av nya behandlingsmetoder är stort, eftersom de två nuvarande typerna av läkemedel mot Alzheimers sjukdom inte angriper själva sjukdomsorsakerna.

Dels används så kallade acetylkolinerterashämmare, som ökar mängden av signalsubstansen acetylkolin, som finns i vissa nervceller. Därmed förstärks kommunikationen mellan de nervceller som finns kvar.

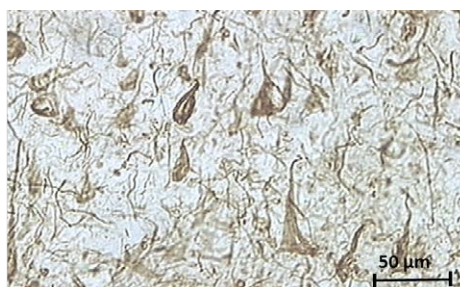
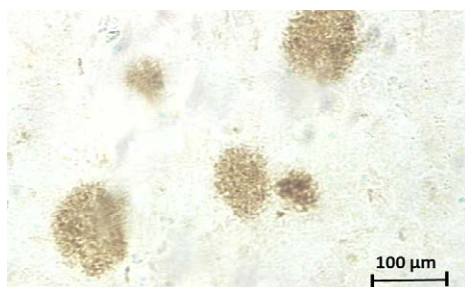


Texten är skriven av:

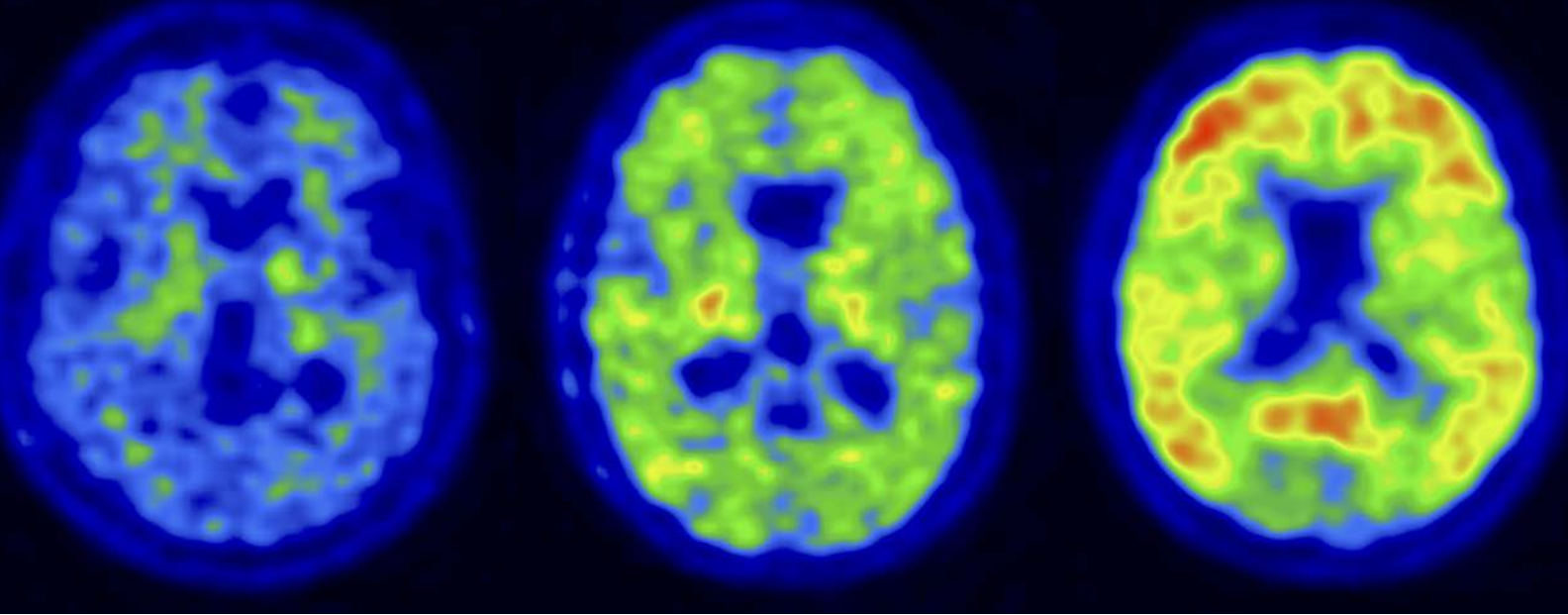
Martin Ingelsson

Professor i geriatrik vid Institutionen för folkhälso- och vårdvetenskap vid Uppsala universitet samt överläkare vid Akademiska sjukhuset

Hans forskargrupp är intresserad av att bättre förstå de molekylära processerna vid Alzheimers sjukdom och Parkinsons sjukdom, eftersom en ökad kunskap kring de underliggande sjukdomsmekanismerna är en nödvändig förutsättning för att kunna utveckla ny framtida behandling och diagnostik.



Plack, till vänster (figur 3), och nystan, till höger (figur 4), i vävnadssnitt från en hjärna drabbad av Alzheimers sjukdom.



Figur 5. Tre hjärnor undersökta med positronemissionstomografi (PET) i syfte att avgöra om individen är drabbad av Alzheimers sjukdom. I detta fall har man använt den så kallade PIB-liganden, som binder till amyloid- β . Den vänstra bilden tyder på frånvaro av plack medan de två bilderna till höger påvisar varierande grader av amyloid- β -inlagring hos patienter med sjukdomen. Bilderna är tagna vid sektionen för molekylär diagnostik/BFC, vid Akademiska sjukhuset i Uppsala.

Positronemissionstomografi (PET) – en medicinsk avbildningsteknik där kroppen tillförs ett radioaktivt spårämne, oftast via ett blodkärl. Upptag och fördelning av ämnet i kroppens celler eller organ kan sedan observeras.

Lipoproteinlipasbrist – en sällsynt sjukdom som bland annat kan ge akut och mycket smärtsam inflammation i bukspottkörteln.

CAR-terapi – innebär att T-celler, som är en del av immunförsvaret, tas ut, vanligtvis från patienten själv. Därefter modifieras de genetiskt för att bli effektivare på att hitta och döda tumörceller och återförs sedan till patienten.

Spinal muskeltrofi – en ärftlig sjukdom där nervceller bryts ner, vilket leder till muskelsvaghet och muskelförtvining.

Dels används så kallade NMDA-receptorantagonister. NMDA står för N-metyld-aspartat och är en av flera receptorer som aminosyran glutamat verkar genom. Enligt en teori utövar glutamat en skadlig effekt på nervceller vid Alzheimers sjukdom och genom att blockera dessa receptorer kan man motverka de skadliga effekterna.

Immunterapi mot sjukdomen

Den behandlingsmetod som hittills sett mest lovande ut, och som det fortfarande ställs stora förhoppningar till, utgörs av immunterapi. När antikroppar som binder till amyloid- β används på musmodeller för sjukdomen har man kunnat visa att de sjukdomsrelaterade förändringarna i hjärnan bromsas effektivt. Ett flertal studier har genomförts, medan vissa fortfarande pågår, även på människor. De största utmaningarna har varit att inkludera patienterna tillräckligt tidigt, innan det uppstått alltför stor skada i hjärnan, samt att säkerställa att endast patienter med Alzheimerförändringar ingår i studierna. Med hjälp av nya tekniker, som gör det möjligt att avbilda förändringarna i hjärnan med **positronemissionstomografi (PET)**, har man i en rad pågående studier kunnat utesluta att patienter utan Alzhei-

merförändringar i hjärnan blir inkluderade i studierna.

Utveckling av genterapi

Alltsedan 1980-talet har det funnits stora förhoppningar om att genterapi ska kunna användas mot en rad olika sjukdomar. Men det är först under de allra senaste åren som denna utveckling har börjat bära frukt.

I Europa godkändes 2012 det första genterapeutiska preparatet, Glybera, som används mot den ovanliga sjukdomen **lipoproteinlipasbrist**. Detta preparat har följts av framgångsrika behandlingsmetoder mot framför allt olika typer av leukemier, så kallad **CAR-terapi**, och sedan 2017 finns även en fungerande genterapi, Spinraza, mot den neurologiska sjukdomen **spinal muskeltrofi**. Ovan angivna exempel är baserade på att man antingen

- ersätter det som cellerna lider brist på, så kallad substitutionsterapi (Glybera),
- tillför en markör som gör cellerna mer benägna att bekämpa tumörer (CAR-terapi) eller
- med små RNA-molekyler påverkar genernas proteinproduktion (Spinraza).

En ytterligare möjlighet utgörs av genditering, en metod där molekyler utnytt-

jas för att åstadkomma exakta dubbelsträngade brott i DNA-kedjan och därmed förhindra produktion av protein.

Tre sådana tekniker har utvecklats, zinkfingernukleaser, TALEN och CRISPR/Cas9. Det amerikanska företaget Sangamo Therapeutics har initierat ett flertal kliniska studier mot sjukdomar som HIV och Huntingtons sjukdom där zinkfingernukleaser används. På senare tid har CRISPR/Cas9 kommit att få mycket uppmärksamhet för sin potential att utnyttjas för generapeutiska syften.

Utvecklingen av CRISPR/Cas9 som generterapi befinner sig ännu i sin linda. De allra första kliniska prövningarna har startat i Kina och olika läkemedelsföretag förbereder ytterligare studier på amerikanska patienter. Hittills har det handlat om att ta ut patienternas egna blodbaserade stamceller och förändra dem för att sedan återföra dem till patienten. Förhoppningen är att de ska etablera sig och bilda nya friska kloner av celler som ska motverka fortsatta sjukdomseffekter.

För att kunna utnyttja CRISPR/Cas9 som behandling även mot hjärnans sjukdomar, det vill säga där man inte har möjlighet att behandla cellerna utanför kroppen, behöver man utveckla metoder för att

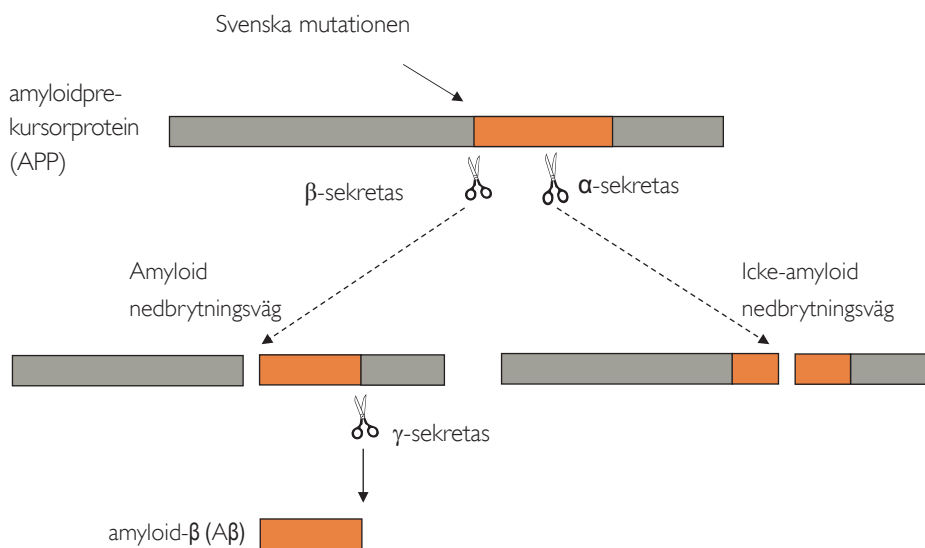
transportera behandlingsmolekylerna till centrala nervsystemet (CNS). Detta kan åstadkommas med hjälp av specialutvecklade viruspartiklar, som utnyttjas som bärare av genetisk information men som berövat sina infektiösa egenskaper. Framför allt adenoassocierat virus (AAV) används redan som bärare av DNA för olika terapeutiska molekyler i ett antal kliniska prövningar.

CRISPR och Alzheimers

I en nyligen publicerad studie kunde vi visa att CRISPR/Cas9-systemet även kan utnyttjas för att selektivt oskadliggöra den så kallade svenska mutationen i *APP*-genen – en ny tänkbar strategi att behandla denna form av Alzheimers sjukdom. Genom att odla bindvävsceller (fibroblaster) från patienter med mutationen och sedan tillföra dem guide-RNA och Cas9-DNA-vektorer kunde vi med hög precision inducera dubbelsträngt brott i muterat DNA. Patientens friska genkopia lämnades opåverkad.

Förutom att åstadkomma den genetiska förändringen kunde vi även påvisa att cellernas halter av amyloid- β sänktes markant. Genom att mäta mängderna av amyloid- β i tillväxtmediet från cellkulturerna kunde vi konstatera att nivåerna motsvarade de man

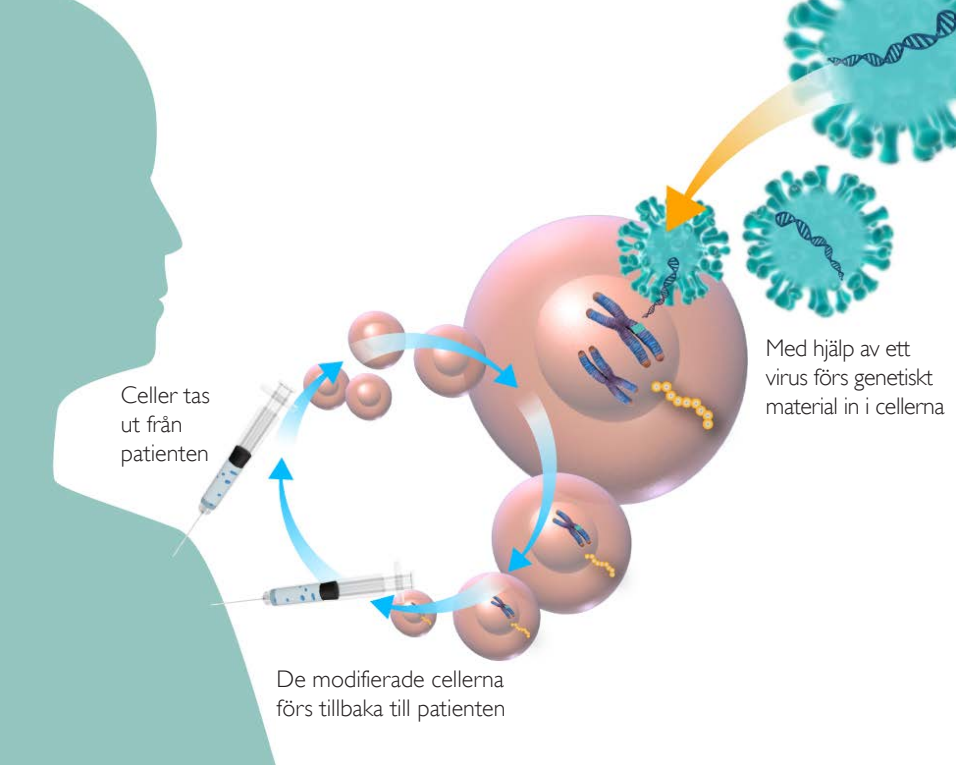
BILDNING AV AMYLOID- β UR AMYLOIDPREKURSORPROTEINET (APP)



Figur 6. Även i den friska hjärnan sker enzymatisk nedbrytning av amyloidprekursorproteinet, APP, via både en amyloidbildande och en icke-amyloidbildande process.

Genom klyvning med enzymerna β - och γ -sekretas bildas amyloid- β , A β , medan inget A β kan bildas vid α -sekretas-klyvning.

Vid den ärftliga formen av Alzheimers sjukdom som orsakas av den svenska mutationen i APP, ökar klyvningen med β -sekretas, vilket leder till ökad bildning av A β .



Figur 7. Vid genterapi kan virus användas för att föra in genetiskt material i cellerna. På bilden tas cellerna först ut ur patienten och justeras sedan genetiskt utanför kroppen innan de förs tillbaka. Detta är dock inte möjligt vid behandling av nervcellerna i hjärnan.

Martin Ingelsson och hans forskargrupp studerar därför effekterna av att injicera viruspartiklar direkt i hjärnan på en musmodell för Alzheimers sjukdom, för att kunna behandla nervcellerna med CRISPR/Cas9-teknik.

Illustration: Gunilla Elam

MER FAKTA

Information om Alzheimers sjukdom tillhandahålls till exempel av Alzheimerfonden, Demenscentrum, Demensförbundet och Hjärnfonden.

kunde förvänta sig från den kvarvarande friska genkopians uttryck.

I nästa steg genererade vi AAV-partiklar (virus som kan användas för att transportera genetiskt material in i celler) som innehöll samma guide-RNA och Cas9-molekyler. Vi valde dels AAV1, en form av AAV som fungerar bra på odlade nervceller, dels AAV9, en form vars egenskaper är särskilt lämpade för CNS hos levande möss. Tidigare studier på möss har visat att AAV9 leder till ett högt genuttryck i hjärnans celler efter att man tillfört DNA med AAV9-vektorer i musens svansven eller bukhåla.

I syfte att undersöka möjligheten att överföra vår behandlingsstrategi till CNS på en levande organism utnyttjade vi en musmodell för Alzheimers sjukdom. Dessa möss är transgent förändrade att uttrycka just den svenska mutationen och var således en lämplig modell att testa behandlingsprincipen på.

Till att börja med odlade vi nervceller från embryon till dessa möss och förde in AAV9-partiklarna i dessa. Efter DNA-analys kunde vi konstatera att *APP*-genen med den svenska mutationen kunde klippas sönder även i dessa celler med hög precision. Därefter använde vi samma musmodell för att även undersöka om sjukdomsgenen

kunde påverkas i nervceller i levande möss. För att optimera chanserna injicerade vi AAV-partiklarna direkt i hjärnan på mössen. Vi valde hippocampus, ett område i hjärnan som är centralt i utvecklingen av Alzheimers sjukdom. Fem möss behandlades och efter sex veckor avlivades de. DNA-analys av hjärnvävnaden visade på effekt i upp till drygt två procent av det totala DNA:t. Denna andel kan synas låg, men kan förklaras av det faktum att dessa transgena djur har en mycket kraftig överproduktion av muterat humant APP.

Framtida studier

I denna första studie på musmodell för Alzheimers sjukdom analyserades varken amyloid- β -nivåer eller effekter på beteende eller kognition. För att bättre kunna undersöka sådana effekter behöver man använda en annan musmodell, där man i stället för ett kraftigt överuttryck av genen ersätter musens egen gen med den mänskliga varianten (i muterad form). En sådan så kallad knock-in musmodell kommer att användas i planerade studier för att undersöka om vår behandlingsstrategi kan leda till gynnsamma effekter även på proteinnivåer och beteende hos mössen.

Sammantaget utgör CRISPR/Cas9 en ny intressant möjlighet till genterapi. Dock befinner vi oss ännu bara i början på en lång väg mot en fungerande behandling mot denna form av Alzheimers sjukdom och andra ärftliga hjärnsjukdomar. Ytterligare arbete återstår innan vi kan starta de första läkemedelsprövningarna.

Framför allt finns en befogad oro för att även oavsiktliga DNA-skador kan uppkomma till följd av behandlingen. Sådana effekter på andra gener är troligen mestadels ofarliga men kan sannolikt även ge upphov till genetiska förändringar som kan öka risken för till exempel cancersjukdomar. Forskare inom området är nu sysselsatta med att utveckla metoder som på förhand ska kunna avgöra vilka sådana skador som kan förväntas uppstå vid en specifik behandling. För att denna genetiska ingenjörskonst ska bli allmänt accepterad hos befolkningen krävs att sådana metoder blir tillförlitliga.

Uppgifter till avsnittet om CRISPR-teknik



GM-WEBBEN PÅ BIORESURS HEMSIDA

I Bioresurs hemsida ingår GM-webben, som handlar om genmodifierade växter. En av delarna innehåller temasideor om sex genmodifierade växter. Dessa kan fungera som exempel för elevarbeten. Lärarhandledningen är omfattande och ger förslag på hur man kan arbeta med elever kring kontroversiella frågor i ett samhällsperspektiv.

PRAKTISKA FÖRSÖK

Laborationer som anknyter till genteknik finns på vår hemsida, exempelvis *Extraktion av DNA* från kindceller eller vetegroddar, *Genteknik med enkla medel* och *DIS80 – en genetisk markör*. Se även försök med Mendels ärtor i föregående del.

SYNTETISK BIOLOGI

Inom det område som kallas för syntetisk biologi arbetar man med färdiga DNA-sekvenser, som enkelt kan beställas, för att genmodifiera organismer. DNA-sekvenserna kallas Biobricks eller "bioklossar". Målet är att tillföra nya egenskaper till organismer såsom uttrycket av färg, ändrad ämnesomsättning och tillverkning av olika nya proteinprodukter. Förhoppningen är att i framtiden kunna använda den här metoden för att tillverka läkemedel, miljövänliga bränslen och mat.

I denna övning används legobitar som modeller för bioklossar för att bygga olika genvarianter. Som exempel på vad eleverna ska konstruera är "en bakterie som producerar plast, men som dör om den skulle bli utsläppt i naturen" eller "en växt som signalerar när den kommer i kontakt med miljögifter som tungmetaller".

Förutom att uppgiften ger en inblick i området syntetisk biologi är också ett syfte med denna övning att få en bättre förståelse för hur våra gener är uppbyggda och hur proteinsyntesen påverkas av olika signaler.

GENDRIVARE

CRISPR/Cas9-tekniken har på kort tid fått enormt genomslag i forskarvärlden eftersom den förenklar processen att modifiera DNA. För att få en bättre förståelse för hur metoden fungerar kan man titta på animeringar, se länkar på vår hemsida. Med denna teknik har det bland annat blivit möjligt att konstruera gendrivare, något som testats på exempelvis malariamyggor.

Enligt de mendelska ärftlighetslagarna kommer en viss allel att föras vidare till 50 procent av avkomman. Men vissa DNA-sekvenser har utvecklat en förmåga att öka sina chanser till nedärvning. Gendrivare är den term som används för alla processer, naturliga eller designade, som resulterar i att en viss allel i en organism ärvs i större utsträckning än förväntat. En gendrivare har förmågan att sätta in en kopia av sig själv på en vald plats i genomet och på det viset sprida sig genom många generationer till alla individer i en population.

Bioresurs har tagit fram en övning som illustrerar hur nedärvningen förändras av en gendrivare och hur den skiljer sig från mendelsk nedärvning. Övningen kan användas för att ge elever förståelse för nedärvning men den kan också vävas in i ett större sammanhang, där man diskuterar exempelvis invasiva arter som påverkar ekosystem eller allvarliga smittsamma sjukdomar som sprids av sexuellt reproducerande arter.

ÖVNINGAR I BIOINFORMATIK

Molekylärbiologins snabba utveckling har genererat stora mängder biologiska data i form av till exempel DNA- och aminosyrasekvenser, som samlats i databaser. Bioinformatiken ger verktyg att hantera dessa omfattande datamängder. Många databaser är fritt tillgängliga och kan användas i skolan. På Bioresurs hemsida har vi flera exempel på övningar i bioinformatik med jämförelse och tolkning av DNA- eller aminosyrasekvenser.

Några exempel på övningar är att studera släktskap mellan olika arter och skapa fylogenetiska träd eller att ta reda på mer om människans genom och jämföra kromosomernas innehåll med andra närbesläktade arter. Bioinformatik kan också användas för att jämföra fungerande gener med varianter som orsakar sjukdomar. I uppgifterna *Alexanders sjukdom* och *Tay-Sachs sjukdom* får eleverna jämföra olika gensekvenser och leta efter eventuella skillnader.

FÖRDJUPNINGSUPPGIFTER

Ta reda på mer om genmodifierade djur och växter, som exempelvis: Var står forskningen idag? Vad finns på marknaden – är det möjligt att köpa livsmedel i Sverige som tillvekat av genmodifierade organismer? Hur skiljer sig lagstiftningen mellan Europa och andra länder som exempelvis USA?

Ta reda på!

Se Bioresurs hemsida för fullständiga beskrivningar och länkar: www.bioresurs.uu.se

Bildförteckning

Omslagsbild. Foto: Peshkov, Adobe Stock

GENTEKNIKENS UTVECKLING

Introduktionsbild: Instrument på SNP&SEQ-teknologiplattformen på SciLifeLab i Uppsala. Foto: Bioresurs

Porträttbild Kerstin Lindblad-Toh. Foto: Broad Institute

Porträttbild Karin Mossler. Foto: Anders Rockström

Figur 1. Silverlax. Foto: Fredrik Sundström och Mare Löhmus

Figur 2. Genetisk transformering av växter. Illustration: Fredrik Saarkoppel

Figur 3. Acute leukemia-ALL av VashiDonsk, CC BY-SA 3.0, Wikimedia Commons

Figur 4. Sammetssnigeln *Elysia chlorotica*. Källa: Pelletreau KN, Weber APM, Weber KL, Rumpho ME (2014) Lipid Accumulation during the Establishment of Kleptoplasty in *Elysia chlorotica*. *PLoS ONE* 9(5): e97477. doi:10.1371/journal.pone.0097477

Figur 5. SOD1. Källa: The Human Protein Atlas

Figur 6. mi-RNA-reglering. Eget montage grundat på följande artikel: Margarida Pujol-López, Luis Ortega-Paz, Manel Garabito, Salvatore Brugaletta, Manel Sabaté, Ana Paula Dantas. miRNA Update: A Review Focus on Clinical Implications of miRNA in Vascular Remodeling. *AIMS Medical Science*, 2017, 4(1): 99-112. doi: 10.3934/medsci.2017.1.99

Figur 7. Röd panda. Foto: Pixabay

Figur 8. Jättepanda. Foto: Pixabay

Figur 9. Analogy: When is a thumb a thumb? Källa: Understanding Evolution. 2018. University of California Museum of Paleontology. 20 August 2018. evolution.berkeley.edu/evolibrary/article/analogy_06

Figur 10. Släkträd. Eget montage grundat på följande artikel: Yibo Hu, Qi Wu, Shuai Ma, Tianxiao Ma, Lei Shan, Xiao Wang, Yonggang Nie, Zemin Ning, Li Yan, Yunfang Xiu, Fuwen Wei. Comparative genomics reveals convergent evolution between the bamboo-eating giant and red pandas. *PNAS* January 31, 2017 114 (5) 1081-1086. doi.org/10.1073/pnas.1613870114

CRISPR-TEKNIK

Introduktionsbild: Mikroförökning och kloning av karelsk björk. Foto: Mulderphoto, Adobe Stock

Figur 1. CRISPR-tekniken. Illustration: Cajsa Lithell, Red Cap Design

Figur 2. Tillämnning av CRISPR-konstruktionen. Illustration: Cajsa Lithell, Red Cap Design

Figur 3. Plack vid Alzheimers sjukdom. Källa: Martin Ingelsson

Figur 4. Nystan vid Alzheimers sjukdom. Källa: Martin Ingelsson

Figur 5. Positronemissionstomografi (PET). Bilderna är tagna vid sektionen för molekylär diagnostik/BFC, vid Akademiska sjukhuset i Uppsala. Källa: Martin Ingelsson

Figur 6. Den svenska mutationen. Källa: Martin Ingelsson

Figur 7. Genterapi. Illustration: Gunilla Elam

EPIGENETIK

Introduktionsbild: Tvillingsystrar. Foto: Liubov Levvytska, Adobe Stock
Gulsporre. Foto: Bioresurs

Porträttbild Birgitta Mc Ewen. Foto: Anders Heder

Porträttbild Karin Broberg. Foto: Kennet Ruona

Porträttbild Joëlle Rüegg. Foto: Anna Persson

Figur 1. Epigenetiska mekanismer. Källa: National Institutes of Health. Figuren är bearbetad av Bioresurs.

Figur 2. Waddingtons epigenetiska landskap. Källa: Waddington, C. H. *The Strategy of the Genes* (Geo Allen & Unwin, London, 1957), se sidorna 29 och 36 i archive.org/details/in.ernet.dli.2015.547782. Vit blodkropp. Foto: Luk Cox, Adobe Stock. Övrigt, eget montage.

Figur 3–7. Perfluorooctanesulfonic-acid-3D-balls av Jynto, Bisphenol A av Edgar181, Protein ESR1 PDB 1a52 av Emw (CC BY-SA 3.0), Wikimedia Commons

UTVECKLINGSBIOLOGI

Introduktionsbild: Zebrafisk. Foto: Roy Francis

Porträttbild Tatjana Haitina. Foto: Vitalii Makaganiuk

Figur 1. Axolotl. Foto: lapis2380, Adobe Stock

Figur 2. Embryonalutveckling. Källa: The evolution of man: a popular exposition of the principal points of human ontogeny and phylogeny. Ernst Haeckel. 1879, archive.org/stream/evolutionofmanpo01haecuoft#

Figur 3. Uttryck av *fgf8a* i ett zebrafiskyngel. Källa: Howe DG, Bradford YM, Conlin T, Eagle AE, Fashena D, Frazer K, Knight J, Mani P, Martin R, Moxon SA, Paddock H, Pich C, Ramachandran S, Ruef BJ, Ruzicka L, Schaper K, Shao X, Singer A, Sprunger B, Van Slyke CE, Westerfield M. (2013). ZFIN, the Zebrafish Model Organism Database: increased support for mutants and transgenics. *Nucleic Acids Res.* Jan;41(Database issue):D854-60

Figur 4. Developmental tree of early zebrafish embryogenesis. Källa: Jeffrey A. Farrell, Yiqun Wang, Samantha J. Riesenfeld, Karthik Shekhar, Aviv Regev, Alexander F. Schier. Single-cell reconstruction of developmental trajectories during zebrafish embryogenesis. *Science* 01 Jun 2018: Vol. 360, Issue 6392, eaar3131, doi: 10.1126/science.aaar3131 (Research article summary). Reprinted with permission from AAAS. The translation is not an official translation by AAAS staff, nor is it endorsed by AAAS as accurate. In crucial matters, please refer to the official English-language version originally published by AAAS.

Figur 5. The Third Cleavage Patterns of the Dextral and Sinistral L. stagnalis Embryos and Their Adult Snails. Källa: Yuichiro Shibazaki, Miho Shimizu, Reiko Kuroda. Body Handedness Is Directed by Genetically Determined Cytoskeletal Dynamics in the Early Embryo. *Current Biology* Volume 14, Issue 16, 24 August 2004, Pages 1462-1467. doi: 10.1016/j.cub.2004.08.018. Reproduced with permission from Elsevier:

Figur 6. The neural crest is a multipotent cell population. Källa: Marcos Simões-Costa, Marianne E. Bronner. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development* 2015 142: 242-257. doi: 10.1242/dev.105445. Reproduced with permission from Development

Figur 7. Representation of NC migrating in a cephalic stream. Källa: Adam Shellard, Roberto Mayor. Chemotaxis during neural crest migration. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 55 (2016) 111-118. doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.01.031. Reproduced with permission from Elsevier:

Figur 8–9. Zebrafisk. Foto: Ghazal Aalavioon

Figur 10–12. Zebrafisk. Foto: Judith Habicher