

Anteckningar till PPT 2

En historisk översikt

1–2

Undervisningsmaterialet har tagits fram av Gentekniknämndens kansli och Nationellt resurscentrum för biologiundervisning (2024). Gentekniknämnden är en myndighet som ska sprida kunskap om genteknik samt överse en etisk användning av genteknik. Mer information finns på www.genteknik.se.

Detta är del 2 i föreläsningsserien CRISPR/Cas9 och den gentekniska revolutionen.

3

Lärandemål PPT 2:

- Få en översikt över några viktiga historiska upptäckter inom genetik och genteknik, från Gregor Mendel till dagens CRISPR/Cas.
- Se exempel på att biologiska upptäckter och den tekniska utvecklingen hänger tätt samman.

Innehållet kan kopplas till:

Ämnesplanen i biologi för grundskolan:

- Kunskaper om biologins begrepp och förklaringsmodeller för att beskriva och förklara samband i naturen och människokroppen.
- Förmåga att använda biologi för att granska information, kommunicera och ta ställning i frågor som rör miljö och hälsa.

Centrala innehållet i biologi för åk 7-9:

- Några gentekniska metoder samt möjligheter, risker och etiska frågor kopplade till genteknik.

Ämnesplanen i biologi för gymnasiet:

- Kunskaper om biologins begrepp, modeller, teorier och arbetsmetoder samt förståelse av hur dessa utvecklas.
- Kunskaper om biologins betydelse för individ och samhälle.

Centrala innehållet i biologi 1:

- Genetikens användningsområden. Möjligheter, risker och etiska frågor.

Centrala innehållet i biologi 2:

- Cell- och molekylärbiologins användningsområden. Möjligheter, risker och etiska frågor.

4-5

- 2020 fick Jennifer Doudna och Emmanuelle Charpentier ta emot Nobelpriset i kemi för att de utvecklat CRISPR/Cas9.
- Hela CRISPR/Cas9-systemet har sitt ursprung i bakteriers immunförsvar. För-lagan till CRISPR/Cas9 finns naturligt i bakterier som en del av deras immun-försvar.
- Precis som oss drabbas bakterier av virusinfektioner. När det sker är en av bakteriernas försvarsmekanismer att ett Cas-enzym klipper sönder virus-DNA. En liten snutt DNA från varje virus som infekterat bakterien sparas i en gene-tiskt bibliotek hos bakterien. Biblioteket kallas för CRISPR och är en akronym för Clustered regularly interspaced short palindromic repeats. Den lilla snut-ten virus—DNA fungerar som en igenkänningsmolekyl som hänger ihop med ett Cas-enzym, så nästa gång samma sorts virus infekterar bakterien så känns viruset igen, och klipper sönder det.
- Upptäckten av detta system hos bakterier utvecklades till en genteknik i bör-jan av 2010-talet av Jennifer Doudna och Emmanuelle Charpentier.
- Igenkänningsmolekylen kallade de guide-RNA. De kopplade ihop den mole-kylen med restriktionsenzymet Cas9. De visade att de enkelt kunde ompro-grammera guide-RNA:t så att det känner igen vilken DNA-sekvens som helst – och eftersom Cas9 klipper där mRNA markerar så kan man alltså få Cas9 att klippa i vilken DNA-sekvens som helst.
- Helt plötsligt har man en specifik gensax som kan användas till att söka upp och klippa itu vilken DNA-sekvens som helst.
- Mer om hur CRISPR/Cas9 fungerar i detalj beskrivs i PPT 3.

6

- På 1800-talet undersökte den österrikiska munken Gregor Mendel hur egen-skaper ärvs hos ärtor som han odlade i klosterträdgården. Mendel fastslog genetiska principer och myntade begrepp som vi använder än idag – till exem-pel att en egenskap kan vara dominant eller recessiv.
- Under Mendels tid kände man ännu inte till DNA-molekylen eller gener eller hur generna ärvs vidare, kunskapen om hur det fungerar på molekylär nivå kom först 100 år efter att munken Mendel levde.
- I mitten på 1900-talet fastslogs det att DNA är ”ärftlighetens molekyl” (se kommande bilder).
- I och med det stora genombrottet tog den moderna molekylärbiologins era fart. Flera forskares arbete ledde fram till att vi idag vet exakt hur DNA-mole-kylen är uppbyggd, hur den kopieras och ärvs från föräldrar till avkomma. De forskare som stod bakom upptäckten var bland andra Francis Crick, James Watson, Maurice Wilkins och Rosalind Franklin. De tre första belönades år 1962 med ett Nobelpris för sina insatser.

7

- Friedrich Miescher (1844–1895, schweizisk biokemist och professor i Basel) lyckades öppna cellkärnor och fann där en substans med oerhört mycket fosfor och kväve. Han kallade substansen för nuklein.
- Intressant nog så spekulerade han senare i sitt liv i att nuklein kunde vara inblandat i ärftlighet och att det kunde finnas något som liknade ett alfabet som kunde förklara den variation vi ser runt oss.

8

- I början på 1900-talet upptäckte Phoebus Levene (1869–1940, rysk-amerikansk biokemist) att substansen nuklein består av tre delar; en fosfatgrupp, sockerarten deoxiribos och en kvävebas som kan vara antingen Adenin, Tymin, Guanin, eller Cytosin.
- Han beskrev hur socker och fosfat binder samman kvävebaserna i långa strängar. Han kallade varje grupp för nukleotid.

9

- År 1951 fotograferade Rosalind Franklin (1920–1958, brittisk biofysiker) och Maurice Wilkins (1916–2004, nyzeeländsk-brittisk fysiker och molekylärbilog) DNA-strukturen med hjälp av röntgenstrålar. Det var avgörande för beskrivningen av hur DNA-molekylen ser ut och fungerar.
- Rosalind Franklin dog ung och var inte med och delade Nobelpriset med Maurice Wilkins och Watson & Crick (nästa bild).

10

- James Watson (född 1928, amerikansk biolog) och Francis Crick (1916–2004, brittisk biofysiker) beskrev hur DNA är uppbyggt och i stora drag hur den kopieras och nedärvs.
- De visade att strukturen av DNA är en dubbelhelix där två långa kodsträngar är tvinnade runt varandra som en vriden stege.
- Kvävebaserna på den ena strängen är kopplade till kvävebaserna på den andra strängen via vätebindningar som utgör stegpinnarna. Socker och fosfat bildar stegens sidor. Tomrummet mellan stegpinnarna gör att andra molekyler kan läsa av och kopiera koden.
- DNA vrider sig åt höger och baserna är riktade inåt i dubbelspiralen. Kvävebaserna kopplas i stegpinnen enligt ett givet mönster, ett A på ena strängen kopplar till ett T på den andra, och C kopplar till G. Det bildar på så sätt baspar och det kallas att de binder till varandra ”komplementärt”. Den ena strängen lagrar information uppifrån och ner och den andra nerifrån och upp (upp är 5' och ner är 3').

- Nu har vi kommit fram till mitten av 1900-talet och nu vet vi att DNA är ärftlighetens molekyl och att den bär på en kod som består av långa sekvenser av nukleotider. Men vad betyder koden?

11

- Marshall Nirenberg (1927–2010, amerikansk biokemist), gav oss en nyckel till vad koden betyder.
- Han visade att DNA lagrar information som ”ord” om tre bokstäver som svarar mot någon av de 20 aminosyror som bygger upp de proteiner en organism består av. Varje enhet med tre ”bokstäver” kallade han kodon.
- Det finns kodon för start och stopp och 60 olika andra kodon som svarar mot de 20 aminosyror.

12

- I början av 70-talet började man också bättre förstå restriktionsenzymer och hur dessa kan användas inom gentekniken.
- Werner Arber (född 1929, schweizisk mikrobiolog), Daniel Nathans (1928-1999, amerikansk genetiker) och Hamilton Smith (född 1931, amerikansk mikrobiolog) fick Nobelpris för detta 1978.
- Restriktionsenzymer är en del av bakteriers anti-virala försvar som kan utvinna och användas för att klippa av DNA-strängarna.
- Hundratals olika restriktionsenzymer har upptäckts och de kan användas inom molekylärgenetiken för att klippa itu DNA.

13

- Om DNA klipps av i en eukaryot cell så finns ett sofistikerat reparationsystem som lagar skadan på DNA-strängen.
- Det är en väldigt viktig aspekt i genomredigering eftersom mutationer kan uppstå vid lagningen.
- Hur detta går till visade bl.a. Tomas Lindahl (medicinsk molekylärbiolog från Sverige, född 1938), Paul Lawrence Mondrich (född 1946, amerikansk medicinsk molekylärbiolog) och Aziz Sancar (född 1946, turkisk-amerikansk medicinsk molekylärbiolog) under 70- och 80-talet.

14

1. Ett restriktionsenzym söker upp en specifik DNA-sekvens (en viss ordning av nukleotider) och klipper itu den. I bilden är det ljusgröna fältet en illustration av själva enzymet).
2. När enzymet klipper bildas två ”överhäng” på varje DNA-sträng. Överhängen är enkelsträngade.

3. (-4) De enkelsträngade fragmenten – som matchar, kan klistras ihop igen med hjälp av ett reparationsenzym som kallas DNA-ligas (det ljusblå fältet i bilden) som försluter sekvensen.
- Vad kan denna kunskap användas till?
 - Se fortsättning på nästa sida.

15

Man kan göra det här:

- Isolera och klippa upp en plasmid från en bakterie och klistra in en ny gen, kanske en gen från en helt annan art. Vårt och alla andra organisms DNA är ju uppbyggt på samma sätt.
- Prokaryoters DNA ligger fritt i cellen och består av en kromosom och några ringformade strukturer som kallas för plasmider.
- När plasmiden förs tillbaka in i en bakteriecell igen kan den börja producera proteinet från den gensekvens som har klistrats in i plasmiden.
- I det här exemplet klistras den humana genen för insulin in i en bakterieplasmid i syfte att få bakterien att tillverka insulin. Det här är ett sätt att tillverka insulin som ges till diabetiker, att låta en genetiskt modifierad bakterie göra det istället för att, som tidigare, utvinna insulin ur bukspottskörteln på slaktade grisar.
- När en DNA-sekvens integreras i en organisms genom bildas rekombinant DNA.
- För att proteinerna ska tillverkas från den rekombinanta plasmiden måste den transporteras in i en cell.
- De vita pilarna betyder att plasmiderna finns inuti bakterierna, och de måste tas ut från bakterierna för att klippas och klistras med. Dessutom är plasmidbilderna i mitten mycket förstörade i förhållande till mikroskopbilderna på bakterierna.

16

- Växtforskare upptäckte att en jordbakterie *Agrobacterium tumefaciens* är en naturlig genmodifierare som kunde användas för att transportera in en plasmid med en ny gen i en växt och på så sätt ändra växtens egenskaper.
- I naturen orsakar bakterien krongallsjuka, en sjukdom som yttrar sig som tumörartade utväxter på den infekterade växten.
- Bakterierna för in gener som kodar för proteiner som påverkar tillväxt och tillverkning av opiner i växtens genom. Generna för tillväxthormon gör att de celler som bakterierna modifierat delar sig okontrollerat och de opiner som produceras ger bakterierna näring. Bakterierna skaffar sig ett eget skafferi.
- Det forskarna gjorde var att byta ut de gener bakterierna för in i växten mot gener av intresse (den rekombinanta plasmiden) och lät bakterierna trans-

portera in plasmiden i växtens celler. Jordbakterien integrerar den nya genen slumpmässigt i växtens genom.

- Sedan dess har andra tekniker för att modifiera växter utvecklats, men forskare använder fortfarande i stor utsträckning naturens egen genmodifierare.
- <https://www.genteknik.se/genetik-och-genteknik/genmodifierade-organismer-gmo/historik-gmo/>
- <https://www.genteknik.se/genetik-och-genteknik/genmodifierade-organismer-gmo/tekniker/gentekniskt-modifiering-av-vaxter/>

17

- År 1977 utvecklades två sekvenseringsmetoder parallellt.
- Sekvenseringsmetoderna utvecklades för att bestämma ordningsföljden av kvävebaserna adenin (A), tymin (T), guanin (G) och cytosin (C). Med sekvensering kunde forskare bland annat studera enskilda gener och jämföra DNA mellan arter. Det blev också möjligt att koppla samman genetiska varianter med olika egenskaper och med sjukdomar.
- Den metod som kom att användas mest kallas för Sanger-sekvensering efter upphovsmannen Frederick Sanger (1918–2013, brittisk biokemist). Sanger fick Nobelpriset två gånger (1958 för bestämning av insulinets struktur, och 1980 för DNA-sekvensering)!
- Under de senaste två årtiondena har den tekniska utvecklingen inom DNA-sekvensering gått väldigt snabbt. Idag kan en organisms hela genom sekvenseras på bara några timmar med de nya metoderna som har samlingsnamnet *Next Generation Sequencing* (NGS). Mer om det på slide 19.
- <https://www.genteknik.se/genetik-och-genteknik/genmodifierade-organismer-gmo/tekniker/sekvensering-2/>

18

- Slutligen då PCR, Polymerase Chain Reaction, som utvecklades av Kary Mullis (1944–2019, amerikansk biokemist) på 80-talet.
- Tekniken gör det möjligt att kopiera upp utvalda DNA-sekvenser till miljontals kopior och ligger till grund för att sekvenseringsteknikerna tog fart och själva kartläggningen av arters hela genom kunde genomföras.
- Vid en PCR tillverkas miljontals kopior av en utvald DNA-sekvens med hjälp av enzymet DNA-polymeras, fria nukleotider (A, T, C, G), primers och upprepade temperaturcykler.
- Beroende på hur primer designas kopieras olika delar av DNA upp. Med stora mängder DNA kan många andra metoder ta vid i undersökningar.
- <https://www.genteknik.se/genetik-och-genteknik/genmodifierade-organismer-gmo/tekniker/pcr/>

19

- Sekvenseringstekniken har tagit några sjumilakliv sedan Sanger lanserade sin metod 1977 och idag kallas det för Next generation sequencing.
- Först ut att kartläggas var genomen från de klassiska modellorganismerna som backtrav, bananfluga och mus och det första utkastet till människans genom publicerades 2001, men inte förrän 2022 lades de sista pusselbitarna. Idag är genom från nästan 100 000 arter sekvensbestämda.
- Med hjälp av sekvensinformationen vet vi var, till exempel på vilken kromosom, en gen finns och det finns databaser som visar vilken funktion den har, vilka vanliga varianter som finns i genen, i vilka populationer och vilka fenotypiska konsekvenser de kan ha.
- Det är också intressant att se att antal gener eller storlek på genom inte kan kopplas till hur avancerad en art är. En gran har ungefär sju ggr så stort genom jämfört med oss och vete har många fler gener. Förutom att känna till generna och hur de fungerar har man genom att jämföra olika arter förstått hur andra delar av genomet fungerar, att det finns icke-kodande regioner som reglerar geners aktivitet till exempel.
- Sekvensering av hela genom är ett arbete som pågår och det är viktigt att förstå att vi inte vet vad alla gener gör, och hur de samspelar med varandra och med miljöfaktorer.

Exempel på vad man kan göra med sekvensdata:

- Diagnosticera genetiska sjukdomar molekylärt, det vill säga bekräfta att en patient har en mutation som man vet orsakar en viss sjukdom.
- Identifiera tidigare okända mutationer som orsakar en sjukdom.
- Identifiera källan till kontamination av mikroorganism, till exempel en bakterie, i en produkt.
- Karakterisera gener som ger vissa bakterier resistens mot antibiotika.
- Diagnosticera infektionssjukdomar genom att sekvensera DNA (eller RNA) från ett angripande virus eller bakterie. Resultatet är vägledande för vilken behandling patienten ska få.
- Karakterisera vilka bakterier som finns i tarmfloran hos en person.
- Konstruera fylogenetiska träd som visar hur olika arter är släkt med varandra.
- <https://www.genteknik.se/genetik-och-genteknik/genmodifierade-organismer-gmo/tekniker/sekvensering-2/>

20

- I början av 2000 var den molekylärgenetiska grunden för genomredigering lagd.
- Vi hade sekvensinformation (ordningen av nukleotider i hela genom), hur många gener ser ut, på vilken kromosom de finns i många olika arter, vad de

kodar för, vilka processer i cellen och kroppen de styr.

- Vi hade också lärt oss att klippa och klistra i DNA, att DNA lagas av cellen och att vi kan föra in nya gener i celler.
- Men, man saknade en effektiv metod för att göra små specifika förändringar eller föra in en ny gen på ett specifikt ställe.

21

- När Emmanuelle Charpentier studerade *Streptococcus pyogenes*, en bakterie som kan attackera blodceller och ge upphov till sjukdom och död, upptäckte hon en tidigare okänd molekyl, tracrRNA, som visade sig vara en del av CRISPR/Cas9. Ett tracrRNA är en del av den igenkänningsmolekyl som leder Cas9 till virus-DNA och som oskadliggör infekterande virus (bakteriofager) genom att klippa sönder deras DNA.
- En liten snutt DNA från varje virus som infekterat bakterien sparas i en genetiskt bibliotek hos bakterien. Biblioteket kallas för CRISPR och är en akronym för *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*. Den lilla snutten virus-DNA transkriberas (översätts) till RNA och kallas för crRNA. Den fungerar tillsammans med tracrRNA som en igenkänningsmolekyl som hänger ihop med ett Cas-enzym, så nästa gång samma sorts virus infekterar bakterien känns viruset igen, och klipps sönder.
- Charpentier publicerade upptäckten 2011. Samma år inledde hon ett samarbete med Jennifer Doudna, en erfaren biokemist med stor kunskap om RNA. Tillsammans lyckades de få gensaxen, Cas-enzymet, från bakteriens immunförsvar att fungera i ett provrör, och de förenklade saxens molekylära komponenter så att den blev lättare att använda.
- De kopplade till exempel ihop tracrRNA och crRNA till en enda RNA-molekyl som de namngav guide-RNA.
- I ett epokgörande experiment programmerar de sedan om gensaxen. I sin naturliga form känner gensaxen igen DNA från virus, men Charpentier och Doudna visar att det går att styra gensaxen så att den klipper av vilken DNA-molekyl som helst på ett förutbestämt ställe. Där klippet ligger är det sedan lätt att skriva om livets kod.
- Nu har man en specifik gensax som kan användas till att söka upp och klippa itu vilken DNA-sekvens som helst.
- 2020 fick Jennifer Doudna och Emmanuelle Charpentier motta Nobelpriset i kemi för att de utvecklat CRISPR/Cas9.
- Mer om hur CRISPR/Cas9 fungerar i detalj beskrivs i PPT 3.

22

- <https://www.genteknik.se/genetik-och-genteknik/genmodifierade-organismer-gmo/tekniker/genomredigering/>