

Anteckningar till PPT3

Så fungerar CRISPR/Cas9

1–2

Materialet har tagits fram i ett samarbete mellan Bioresurscentrum och Gentekniknämndens kansli. Gentekniknämnden är en myndighet som ska sprida kunskap om genteknik samt överse en etisk användning av genteknik. Mer information finns på www.genteknik.se. Illustrationer är gjorda av Gunilla Elam.

Detta är del 3 föreläsningsserien CRISPR/Cas9 och den gentekniska revolutionen.

3

Lärandemål PPT 3:

- Få en förståelse för CRISPR/Cas som en del av bakteriers immunförsvar
- Förstå de olika komponenterna när CRISPR/Cas9 används för genomredigering
- Förstå vad som händer när Cas9 klipper och hur cellen reparerar skadan
- Få kännedom om olika metoder för att få CRISPR-systemet in i cellen
- Få kännedom om fler användningsområden för CRISPR-systemet
- Känna till de utmaningar som finns för att få till ett lyckat försök

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

- Arvsmassans uppbyggnad samt ärftlighetens lagar och mekanismer. Celldelning, dna-replikation och mutationer. Genernas uttryck. Proteinsyntes, monogena och polygena egenskaper, arv och miljö.
- Genetikens användningsområden. Möjligheter, risker och etiska frågor.

Centrala innehållet i biologi 2

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

4

Några viktiga begrepp för eleverna att känna till:

- Vi säger genomredigering och inte genredigering. Det är samma sak, men det är mer korrekt att säga genomredigering eftersom det inte alltid är gener som ändras.
- Gensaxar är de verktyg som används för genomredigering
- Ibland skriver vi CRISPR/Cas och 9:an ”saknas”, det beror på att fler Cas-enzym kan användas
- CRISPR/Cas9 är den absolut vanligast gensaxen och den vi kommer att fokusera på.

5

- CRISPR/Cas utvecklades runt 2010. Sedan dess har det gått i en rasande fart och tekniken används av många forskare och inom många forskningsområden. Några nya produkter har tagits fram med hjälp av genomredigering med CRISPR/Cas9, till exempel:
 - en genterapi för behandling av ärftliga hemoglobinsjukdomar. (Extra: Sjukdomen innebär en brist på fungerande hemoglobin vars uppgift bl.a. är att transportera syre i kroppen. Forskare har med CRISPR/Cas9 stängt av en gen vilket resulterar i att kroppen börjar tillverka fungerande hemoglobin. Mer om detta i PPT 5.)
 - en rödbrax med ökad muskelmassa som finns att köpa som matfisk på den japanska marknaden. (Extra: forskare har med CRISPR/Cas9 stängt av en gen som hämmar muskeltillväxt vilket leder till att den får 20 % mer muskelmassa jämfört med en vanlig rödbrax.)
 - en tomat berikad med D-vitamin som även den säljs i Japan. (Extra: tomat-sorten har genomredigerats med CRISPR/Cas9 så att den tillverkar fem till sex ggr mer gammaaminosmörtsyra (GABA) – som sägs kunna sänka blodtrycket.)
 - en banan som inte mörknar när den utsätts för tryck. (Extra: forskare har använt CRISPR/Cas9 för att stängt av en gen som kodar för enzymet polyfenoloxidas hos banan som gör de inte mörknar.)
 - en potatis som är motståndskraftig mot bladmögel. (Extra: forskare har an-

- vänt CRISPR/Cas9 för att stängt av en känslighetsgen vilket gör att potatisen kan stå emot svampangrepp som orsakar bladmögel.)
- En ko som har kortare päls. (Extra: forskare har använt CRISPR/Cas9 för att inducera en mutation hos kor som gör att de får kortare päls året runt. Samma mutation har uppstått spontant hos kor i tropiskt klimat.)
 - Se PPT 4 för fler exempel.

6

- Varför är CRISPR/Cas9 så revolutionerande? Jo – tekniken kan användas för att inducera mutationer, alltså ändra i DNA-sekvensen i alla sorts organismer: svampar, växter, bakterier och människor och andra djur.
- Ändringen sker när CRISPR/Cas9 klipper itu DNA-sekvensen inne i cellen och cellens reparationssystem lagar skadan. Lagningen blir sällan perfekt och några baser försvinner eller tillkommer, en mutation har då uppstått. Mutationen är riktad vilket innebär att den uppkommer på ett specifikt ställe som bestämts på förhand.
- CRISPR/Cas9 är väldigt flexibel, och går snabbt att ”rikta om” till olika platser i genomet. Tekniken är också relativt enkel och billig.
- CRISPR/Cas9 är inte den första tekniken som kan användas för att rikta mutationer. Tekniker som till exempel TALEN och ZNF (förkortningar av: transcription activator-like effector nuclease och zink-finger nuclease) har funnits sedan 90-talet men de är inte lika flexibla och har inte alls fått samma spridning inom så många områden som CRISPR/Cas9. Vi ska återkomma till varför CRISPR/Cas9 är så flexibel senare.

7

- Nya mutationer kan ge nya egenskaper. Det här undulaterna har inte genomredigerats, men illustrerar hur ett 30-tal mutationer som uppstått spontant ger dem deras variationsrika fjäderdräkt.
- Mer om mutationer finns i PPT 1 och PPT 5.
- <https://www.genteknik.se/genetik-och-genteknik/genetik/genetisk-variation/>

8

- CRISPR/Cas9 finns naturligt hos bakterien *Streptococcus pyogenes* och är en del i bakteriens försvar mot virus.
- Liknande försvar finns hos andra sorters bakterier och även hos arkeer. Precis som allt annat levande kan de drabbas av virusinfektioner.
- Viruset fäster då på ytan och sprutar in sitt genetiska material i bakterien. Viruset själv kan inte tillverka proteiner till nya virus-partiklar som kan spridas vidare, så dess livsstrategi är att skicka in sitt DNA eller RNA i en värdcell och kapa cellens proteintillverkning.

- CRISPR/Cas9's funktion i bakterier och arkeér är att upptäcka och klippa itu DNA som kommer från virus. Det leder till att viruset elimineras. CRISPR/Cas9 har alltså en igenkänningsfunktion som är i form av en kort RNA-sekvens som binder till virusets DNA. CRISPR/Cas9 har även en klipp-funktion som är i form av enzymet Cas9 som klipper av virusets DNA på den plats där RNA-sekvensen binder.
- Små bitar av virusets DNA sparas i bakterien eller arkeéns eget genom som ett minneskort. Det lokus där virus-DNA:t inkorporeras heter CRISPR. Från varje minneskort bildas nya RNA som känner igen just det virus som minneskortet kommer ifrån och de används för att upptäcka nya infektioner.

Extra:

- Arkeér är små encelliga mikroorganismer som saknar cellkärna. Deras celler fungerar annorlunda än bakterier och de räknas som en helt egen livsdomän.
- De virus som infekterar bakterier kallas bakteriofager, eller bara fager.
- Det genetiska materialet hos virus kan vara DNA eller RNA. Sars-cov-19 som orsakar covid-19 är t.ex. ett RNA-virus.
- CRISPR = Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats (förklaras på sidan 26)

9

- De här två forskarna är de som främst förknippas med CRISPR/Cas9. Jennifer Doudna och Emmanuelle Charpentier. De "uppfann" inte CRISPR/Cas9 men översatte det till en teknik.
- Tillsammans förenklade och programmerade de om CRISPR/Cas9 så att det kan användas för att söka upp och klippa itu DNA-sekvenser från alla organismer, alltså inte bara virus.
- Att en DNA-sekvens helt går av, ett så kallat dubbelsträngsbrott, är den värsta skadan på DNA en cell kan råka ut för. Hos alla flercelliga organismer och även hos bakterier finns därför snabba och effektiva reparationsmekanismer som lagar brottet. En mutation uppkommer ofta när lagningen inte blir helt perfekt, en eller ett par baser kanske tillkommer eller försvinner.
- Där är genomredigeringen! Guide-RNA:t riktar in Cas9 på en specifik sekvens som den klipper och i lagningen uppstår en mutation. DNA-sekvensen har ändrats.

10

- På följande bilder beskrivs CRISPR/Cas9 mer detaljerat. Länken leder till en animering som kan visas innan eller efter följande bildserie.
<https://media.hhmi.org/biointeractive/click/CRISPR/>
- CRISPR/Cas9 består i huvudsak av två komponenter, enzymet Cas9 och ett guide-RNA.
- Cas9 är ett endonukleas, en typ av enzymer som klipper i DNA. Det har flera

olika domäner som har olika funktioner, till exempel en domän som öppnar upp den dubbla DNA-helixen, en som kopplar till ett guide-RNA och två domäner som utför själva klippet, en i var sträng av DNA:t.

- Ett guide-RNA är en 20 baser lång RNA-sekvens som har designats på förhand inför varje redigering. Det är själva sök-funktionen hos CRISPR/Cas9 som gör tekniken specifik. Ett guide-RNA har designats så att det basparar, alltså binder komplementärt till, exakt den sekvens som man vill redigera. Vi ska titta på hur det här går till steg för steg.

11

- Enzymet Cas9 rör sig längs DNA-molekylen och söker efter ett särskilt motiv som kallas för PAM-sekvens.
- PAM är en förkortning av engelskans *protospacer adjacent motif* och är en 3 nukleotider lång DNA-sekvens som känns igen av Cas9.
- PAM-sekvensen förekommer frekvent i genomsekvensen
- PAM-sekvensen för Cas9 skrivs ibland ut som "NGG" vilket indikerar att den kan börja med vilken bas som helst (A, T, G, C) men slutar med GG. Andra Cas-enzym som klipper i DNA har andra PAM-sekvenser.

12

- När Cas9 hittar en PAM-sekvens öppnar det upp den dubbla DNA-spiralen. På så sätt exponeras kvävebaserna i DNA-sekvensen och det guide-RNA som Cas9 är kopplat till försöker baspara.

13

- Om inte alla 20 baser i guide-RNA:t kan baspara med DNA-sekvensen vid just denna PAM, så släpper Cas9.
- DNA-strängarna sluts samman igen och Cas9 letar vidare efter nästa PAM.

14

- Om det blir en perfekt matchning mellan guide-RNA och DNA-sekvensen så klipper Cas9 av den dubbla DNA-spiralen tre baspar uppströms (5´) om PAM.

15

- Vid ett dubbelsträngsbrott så träder en av två olika reparationsmekanismer i cellen in för att laga skadan. Det som oftast händer är att DNA-sekvensen bara fogas samman igen, det kallas för icke-homolog sammanfogning (på engelska: non-homologous end-joining, NHEJ).
- Den här typen av reparation kan äga rum när som helst under cellcykeln.

- Lagningen blir sällan perfekt utan en eller ett par baser läggs till eller försvinner, det är en sorts mutation som kallas för en *insertion* respektive en *deletion*. När baser försvinner och läggs till i en gen så förskjuts läsramen och ett nytt stoppkodon uppkommer i regel i sekvensen som gör att transkriptionen avslutas och genen i princip stängs av.
- Om lagningen blir perfekt, finns möjlighet för CRISPR/Cas9-komplexet att åter försöka baspara och sedan klippa upp DNA:t här.
- Om vi tänker tillbaka på bilden av exemplen på produkter som tagits fram med CRISPR/Cas9 (bild 5) – så var strategin bakom alla produkter att stänga av en gen och på så sätt ändra en egenskap. Det är det hittills vanligaste och enklaste sättet att använda CRISPR/Cas9 på.

16

- Den andra reparationsmekanismen kallas homologistyrd reparation (på engelska *homology directed repair, HDR*) och är betydligt mindre frekvent. Vid den lagningen används en mall, till exempel samma sekvens i systerkromatiden.
- Här ges också tillfälle att föra in en ny DNA-sekvens så att resultatet av reparationen blir möjlig att styra.
- Homologistyrd reparation kan bara ske under vissa faser av cellcykeln (G2 och S-fasen) så det gäller att optimera förhållandena i cellen samt tillsätta en mall till lagningen som kallas för donator-DNA.

17

- För att göra en genomredigering med CRISPR/Cas9 så behövs sekvensinformation. Det finns ju för många organismer, inklusive människa, tillgängligt i öppna databaser tillsammans med mycket annan information om geners funktion, uppbyggnad och vanliga genetiska variationer i gener. Med sekvensinformationen och online-program kan du designa ett guide-RNA för den redigering du vill göra och kontrollera att det är specifikt.
- Flera on-line program kan hjälpa till i design av ett specifikt guide-RNA, kvalitetskontroll och analys av potentiella *off-targets*. Off-targets innebär att CRISPR inte klipper på rätt plats i genomet.
- Att designa ett nytt guide-RNA går snabbt och är enkelt och billigt jämfört med att sätta upp experiment med andra genomredigeringstekniker som TALEN och ZFN. De teknikerna använder båda protein och inte RNA som igenkänningsmolekyl. Inför varje nytt experiment måste ett protein tillverkas och kopplas samman med ett enzym som utför klippet.
- Det är guide-RNA:t som ger CRISPR/Cas9 dess oerhörda flexibilitet och gör tekniken så användbar.

18

- CRISPR/Cas9 behöver också ta sig in i cellen där DNA finns och där redige-

ringen ska ske. Det kan föras in i olika form, vanligt är att gener som kodar för guide-RNA och Cas9 klistras in i en plasmid och transporteras in med hjälp av avväpnade virusvektorer som modifierats så att de inte orsakar sjukdom, men har kvar virusets förmåga att ta sig in i och infektera celler.

- Väl inne i cellen så transkriberas generna till ett guide-RNA och ett Cas9-mRNA. Cas9-mRNA används av ribosomerna för att tillverka det färdiga proteinet, alltså enzymet Cas9.
- CRISPR/Cas9 kan också föras in till exempel med en lipid nanopartikel i RNA-form, guide-RNA är då i sin färdiga form och ett mRNA för Cas9 översätts inne i cellen till det färdiga enzymet.
- Det går också att använda elektroporering, då görs tillfälliga små hål på cellmembranet med hjälp av elektrisk spänning och CRISPR/Cas9 i sin färdiga form kan slinka in.
- Mer fakta om transport in till celler finns i PPT 4 och PPT 5.

19

- Till växtceller kan en speciell bakterie användas som heter *Agrobacterium tumefaciens*. Det är en jordbakterie vars livsstrategi bygger på att modifiera värdväxtens genom. Den tar sig in i växtceller och sätter in sina egna gener i växtens genom så att växten börjar tillverka mer näring till bakterien (mer information i PPT 4). Växtforskare kan få bakterien att i stället sätta in de gener som forskaren vill. I det här fallet en gen som kodar för Cas9 och en gen som kodar för guideRNA:t. Växten blir då transgen i och med att den bär de här generna. Om man önskar en icke-transgen växt kan växten när genomredigeringen utförts korsas med en icke-transformerad, och så får man hålla reda på genomredigeringen och Cas9-GuideRNA-generna i avkomman, och selektera i en senare generation den växt som har genomredigeringen men inte generna för Cas9 och guideRNA:t.
- En genkanon kan också användas på växtceller. Det innebär att man skjuter in mycket små guldpartiklar. Dessa kan vara täckta med DNA, som kan integrera i genomet, men de kan också bära med sig enzymet Cas9 och guide-RNA direkt.
- Det går också att använda elektroporering, då görs tillfälliga små hål på cellmembranet med hjälp av elektrisk spänning och CRISPR/Cas9 kan slinka in.
- Om CRISPR/Cas9-komplexet förs in direkt kan det utföra genomredigeringen och sedan degraderas de komponenterna och späds ut med celldelning och försvinner.
- Hur tar sig CRISPR/Cas9 in i cellkärnan? Jo Cas9 har fått en kärnlokaliseringssignal (kallas på engelska för NLS som är en förkortning av engelskans nuclear localization signal), en specifik signal-peptid i proteinet som inne i cellen berättar att det proteinet ska till cellkärnan.

20

- Ungefär 50 % av alla bakterier, och 90 % av arkeer verkar ha någon form av CRISPR/Cas-system. CRISPR/Cas9 har utforskats och använts flitigast och har sitt ursprung i bakterien *Streptococcus pyogenes* – men det finns fler med andra nära besläktade nukleas till exempel Cas13a, Cas12a, Cas14a, Cas12b.
- CRISPR/Cas12a kommer från bakterien *Francisella novicida* och skiljer sig från CRISPR/Cas9 på flera sätt. Det har till exempel en annan PAM-sekvens och ett mindre guide-RNA (endast crisprRNA och inte tracrRNA).
- Ett annat exempel är CRISPR/Cas13 som finns naturligt i bakterien *Leptotrichia shahii* och som klipper i RNA istället för DNA och det behöver ingen PAM-sekvens.
- Nya endonukleas och CRISPR/Cas-system med andra egenskaper än CRISPR/Cas9 upptäcks kontinuerligt av forskare och verktygslådan utökas hela tiden med uppdaterade tekniker.

21

- Utvecklingen av CRISPR/Cas9 till en teknik för genomredigering var startskottet för många uppföljare. Flera tekniker använder sig bara av CRISPR/Cas9's förmåga att söka upp en specifik sekvens utan att klippa av den.
- Ett exempel är så kallade bas-redigerare som kan ändra enskilda baser på ett kontrollerat sätt, de kan ändra C till T eller A till G. Cas9 är i en basredigerade inaktiverat och klipper inte utan har ett annat enzym, deaminase, kopplat till sig som utför själva redigeringen.

22

- Ett annat verktyg är CRISPR off och CRISPR on. Det baseras på ett inaktiverat Cas9 enzym som inte klipper itu DNA-strängarna.
- I CRISPROff är Cas9 utbytt mot ett annat protein som fäster en metylgrupp (CH₃), intill en gen. Det kallas för DNA-metylering och det är guide-RNA:t som visar vid vilken gen metylgruppen ska fästas.
- Uttrycket av den genen kommer då hämmas av metylgrupperna som sitter i vägen för transkriptionsfaktorer. Metylgrupper som fäster vid DNA är den vanligaste formen av epigenetisk förändring.
- Med CRISPR-on är det möjligt att istället ta bort metylgrupper vilket gör att genen transkriberas.
- <https://www.genteknik.se/crisproff-ett-nytt-verktyg-for-att-stanga-av-gener>

23

- Nu har vi talat mest om tekniken CRISPR/Cas9 som utvecklats från ett för-

svarssystem i en bakterie. Nu går vi vidare med hur olika CRISPR/Cas fungerar i bakterier och arkeér.

- Från och med nu säger vi CRISPR/Cas för att det inte längre bara gäller CRISPR/Cas9 och hänvisar till bakterier, men det kan lika gärna vara arkeér.

24

- Virus som infekterar bakterier, kallas för bakteriofager eller bara fager.
- De fäster vid bakteriens yta och injicerar sitt DNA (eller RNA om RNA-virus) in i bakterien. Viruset kapar sedan bakteriens proteinfabriker så att de börjar tillverka proteiner som viruset använder för att dela sig (replikera) och spridas vidare.
- I samband med att viruset sprids, sker en lysering av bakterien och viruset infekterar nästa bakterie.

25

- Det finns många sätt som bakterier kan försvara sig på och ett av dem är med olika CRISPR/Cas.
- Vi ska titta vidare på vad CRISPR/Cas-systemet gör efter att viruset injicerat sitt genetiska material i bakterien.

26

- Nytt virus-DNA som kommer in i bakterien fångas upp av två Cas enzym (Cas1 och Cas2) som arbetar tillsammans. De cirkulerar fritt i bakterien och letar efter en PAM-sekvens, en sekvens som inte finns i bakteriens eget genom (på så vis förstör Cas inte "sitt eget" DNA).
- När enzymen hittar en PAM så betyder det att de stött på virus-DNA inne i cellen. Enzymen klipper då ut en bit virus-DNA bredvid PAM som fogas in i bakteriens genom som ett minneskort (kallas för en spacer, S).
- Lokuset som används som ett bibliotek för alla minneskort är CRISPR, det är alltså en plats i bakteriens genom.
- På varje sida om en spacer infogas repetitiva sekvenser (repeats, R).
- Förkortningen CRISPR kommer ifrån: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, som beskriver hur den delen av bakteriens genom ser ut som innehåller CRISPR (spacers och repeats). Gener som kodar för olika Cas ligger angränsande till CRISPR; Cas står för CRISPR-associerat protein.

27

Obs! I bilden finns texturor som är dolda i redigeringsläget men kommer fram i bildvisningsläge.

- När DNA-sekvensen som finns i CRISPR transkriberas bildas ett långt pre-

crispr-RNA. Olika Cas-enzymers klipper sedan upp den långa RNA-strängen i mindre delar med en spacer i varje och bildar komplex som cirkulerar i bakterien i jakt på virus-DNA.

- De repetitiva sekvenserna transkriberas till den del av crispr-RNA som utgör "hårnålen" eller "öglan". Dess funktion är bl.a. att ge RNA-molekylen stabilitet. De repetitiva sekvenserna kallas för en palindrom. De består av några baser som efterföljs av baser som är komplementära till de första – fast baklänges. (Palindrom i språk är ord som har samma betydelse vare sig man läser det fram- eller baklänges t.ex. "kajak" eller "naturrutan").
- Först nu är det möjligt att helt förstå vad förkortningen CRISPR kommer ifrån: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, som beskriver hur den delen av bakteriens genom ser ut som innehåller CRISPR (spacers och repeats). Gener som kodar för olika Cas ligger angränsande till CRISPR.
- När bakterien delar sig så kopieras allt DNA inklusive CRISPR och "minnet" av olika virusinfektioner nedärvs.
- Just CRISPR/Cas9-systemet i bakterier har inte palindrom-sekvenser och därför inga hårnålar i sitt crisprRNA. Därför behövs ytterligare ett RNA som kallas för tracrRNA, som i stället för att RNA:t basparar med sig själv, så basparar tracrRNA med den repeterade sekvensen och ger en dubbelsträngad molekyl här. I tekniken CRISPR/Cas9 har dessa två sammankopplats till en molekyl, ett guide-RNA.

28

- Varje spacer ger upphov till ett unikt crispr-RNA som kopplas samman med ett Cas. Tillsammans cirkulerar de inne i bakterien i jakt på främmande DNA.
- Cas letar efter en PAM-sekvens och öppnar upp DNA-spiralen för crispr-RNA som försöker baspara. Matchar crispr-RNA så klipper Cas.
- Cas9 gör ett klipp men andra Cas klipper på andra sätt. Cas3 till exempel fungerar mer som en gräsklippare som kör över och klipper sönder hela sekvensen som crispr-RNA basparar med. Resultatet är det samma: viruset eliminerar.

29

Här är en översiktsbild av vad som gått igenom:

- Hur CRISPR/Cas9 fungerar som en del av bakteriers immunsystem (prokaryot cell) och som teknik (eukaryot cell).

30

- Användbara länkar