

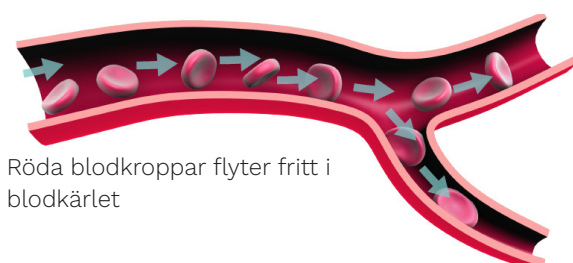
# CRISPR/Cas9

## – för behandling av sicklecellanemi

Även om man känner till orsaken till många genetiska sjukdomar har de tidigare inte kunnat botas. Istället har man försökt att lindra symptomen. I den här övningen får du följa hur man med hjälp av CRISPR/Cas9 försöker bota patienter med sicklecellanemi.

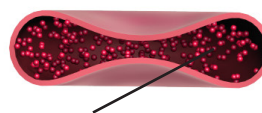
Sicklecellanemi är en ärftlig blodsjukdom som orsakas av en punktmutation. Formen på de röda blodkropparna förändras (se bild nedan) vilket leder till att de kan haka fast i varandra och täppa igen tunna blodkärl. När blodcirkulationen försämras kan syrebrist uppstå i kroppens vävnader vilket gör att man kan få akut smärta i olika delar av kroppen. Blodkropparna får också förkortad livslängd vilket ger blodbrist. Tillsammans kan detta leda till flera allvarliga komplikationer.

Hittills har patienter som lider av sicklecellanemi blivit behandlade med smärtstillande medel, blodtransfusioner eller stamcellstransplantationer. Nu finns världens första behandling baserad på gensaxen CRISPR/Cas9. Den heter Casgevy och är en behandling där patientens blodbildande stamceller redigeras utanför kroppen.

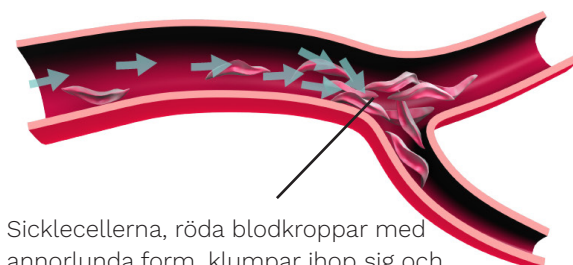


Röda blodkroppar flyter fritt i blodkärlet

Röd blodkropp i genomskärning



Röd blodkropp fylld med funktionellt hemoglobin.



Sicklecellerna, röda blodkroppar med annorlunda form, klumpar ihop sig och blockerar blodflödet

Sicklecell i genomskärning

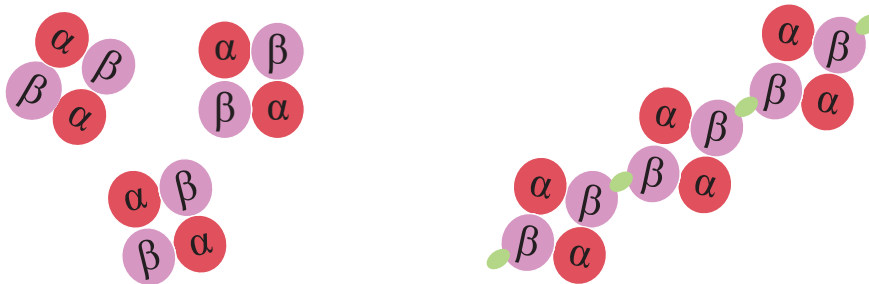


Icke-funktionellt hemoglobin bildar trådar i de röda blodkropparna som ger dem formen av en skära (eng. sickle).

## Hemoglobin i röda blodkroppar

Röda blodkroppar är fyllda med hemoglobinmolekyler (Hb). De är tätt packade men flyter fritt inuti cellen. Det är hemoglobin som transporterar syre till kroppens celler och underlättar transporten av koldioxid från cellerna till lungorna. Proteinet består av fyra polypeptider, två  $\alpha$ -globinkedjor och två  $\beta$ -globinkedjor. Generna som kodar för polypeptiderna heter *HBA1*, *HBA2* och *HBB*. Det är mutationer i *HBB* som kan leda till sicklecellanemi.

Har man en mutation i *HBB*-genen påverkas  $\beta$ -globin. Det blir ”klibbigt” och gör att hemoglobinmolekylerna fastnar i varandra i långa kedjor inuti de röda blodkropparna. Formen på blodkroppen ändras från att vara tillplattad och rund till att se ut som en halvmåne eller en skära (sickle på engelska).

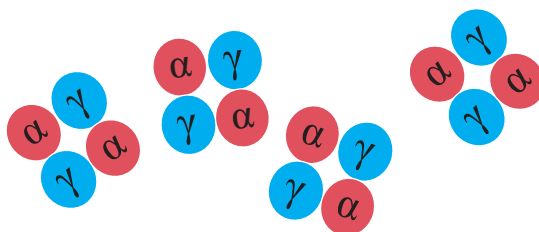


Friskt hemoglobin (bilden till vänster) flyter fritt omkring i de röda blodkropparna, medan den mutation som ger upphov till sicklecellanemi gör att  $\beta$ -globin i en hemoglobinmolekyl lätt fäster till  $\beta$ -globin i en annan hemoglobinmolekyl (vid de gröna prickarna) och bildar långa kedjor (bilden till höger).

## Hemoglobin hos foster

Fetalt hemoglobin (HbF) är en typ av hemoglobin som vanligtvis bara finns hos foster och mycket små barn. Ett par månader efter förlossningen slutar barnets blodbildande celler bilda fetalt hemoglobin och övergår till att bilda adult (vuxet) hemoglobin (HbA) istället (se bild på nästa sida).

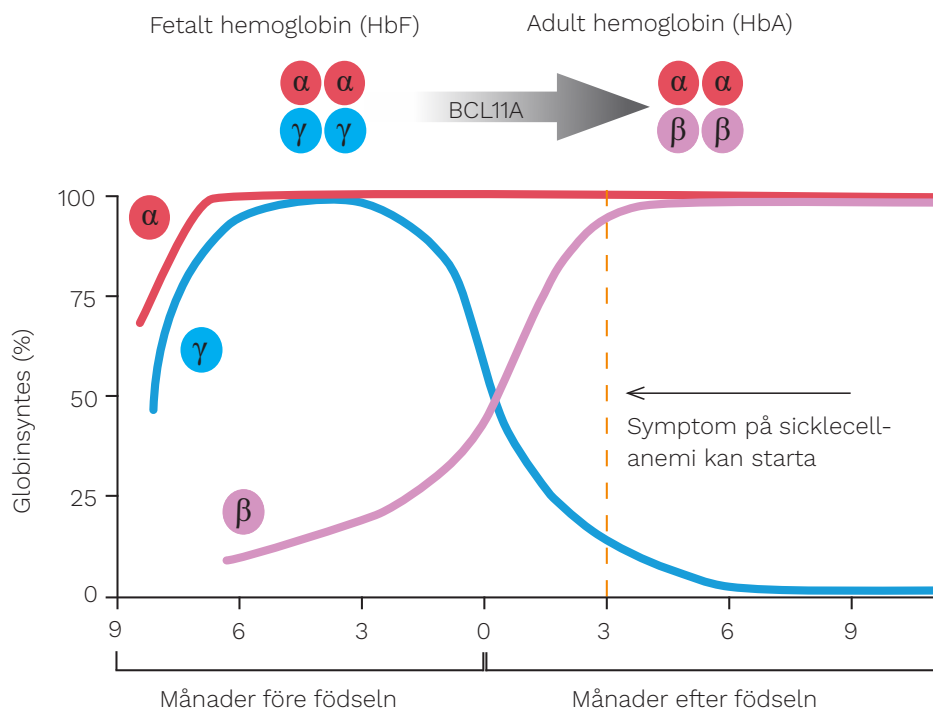
I båda formerna av hemoglobin ingår  $\alpha$ -globin, men i fetalt hemoglobin ingår  $\gamma$ -globin istället för  $\beta$ -globin. BCL11A är en transkriptionsfaktor som stänger av produktionen av fetalt hemoglobin några månader efter födseln till förmån för adult hemoglobin.



I ett fosters röda blodkroppar finns fetalt hemoglobin där  $\gamma$ -globin ingår istället för  $\beta$ -globin.

Sedan tidigare vet man att patienter med sicklecellanemi som fortsätter producera fetalt hemoglobin även i vuxen ålder (på grund av en mutation som minskar uttrycket av transkriptionsfaktorn BCL11A) har mildare eller inga symtom alls av sjukdomen. Man vet alltså att fetalt hemoglobin kan kompensera för bristen av ett fungerande adult hemoglobin.

Istället för att korrigera *HBB*-genen valde forskarna som utvecklat Casgevy att redigera *BCL11A*-genen genom att stänga av den med CRISPR/Cas9. De ville få de blodbildande stamcellerna att starta upp produktionen av fetalt hemoglobin igen.



Bildkälla: Bioresurs efter en bild från artikeln: Frangoul et al., CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and  $\beta$ -Thalassemia. NEJM Dec 5 2020

Under fosterstadiet produceras mest fetalt hemoglobin (HbF) som består av 2 subenheter,  $\alpha$ - och  $\gamma$ -globin. När barnet blivit några månader gammalt förändras hemoglobinet och framförallt adult hemoglobin bildas istället. Det består av samma  $\alpha$ -globin, men den andra subenheten är istället  $\beta$ -globin. Vid cirka 3 månaders ålder kan en bebis få symptom på sicklecellanemi.

## Hängde du med?

Frågor om sicklecellanemi och hemoglobin. Ringa in de rätta svaren (ibland finns flera rätta svar):

1. Vilka subenheter bygger upp adult hemoglobin?

$\alpha$ -globin       $\beta$ -globin       $\gamma$ -globin

2. Vilka subenheter bygger upp fetalt hemoglobin?

$\alpha$ -globin       $\beta$ -globin       $\gamma$ -globin

3. Vilken gen är muterad när man har sicklecellanemi?

*HBA1*      *HBA2*      *HBB*      *BCL11A*

4. Vilket protein stänger av produktionen av fetalt hemoglobin när man är nyfödd?

$\alpha$ -globin       $\beta$ -globin       $\gamma$ -globin      BCL11A

5. Hur påverkas produktionen av fetalt hemoglobin när det bildas mycket BCL11A-protein?

Det bildas mycket fetalt hemoglobin.

Det bildas lite fetalt hemoglobin.

6. Forskarna som utvecklat Casgevy vill öka produktionen av fetalt hemoglobin hos patienter med sicklecellanemi (äldre än 3 månader). På vilket sätt?

Forskarna vill öka produktionen av BCL11A-protein.

Forskarna stänger av genen som kodar för BCL11A.

Forskarna vill korrigera HBB-genen som kodar för  $\beta$ -globin.

## CRISPR/Cas-systemet

För att förstå vad forskarna har gjort behöver du känna till CRISPR/Cas-systemet som finns i bakterier. Precis som människor kan bakterier nämligen drabbas av virusinfektioner. När ett DNA-virus tar sig in i en bakterie klipper bakteriens Cas-enzym sönder virusets DNA, som en försvarsmekanism. Olika bakterier har olika Cas-enzym. Vissa öppnar upp och klipper DNA medan andra klipper i RNA (försvarsmekanism mot RNA-virus). En kort DNA-sekvens från de virus som tidigare infekterat bakterien sparas i ett genetiskt bibliotek. Biblioteket kallas för CRISPR (Clustered regularly interspaced palindromic repeats).

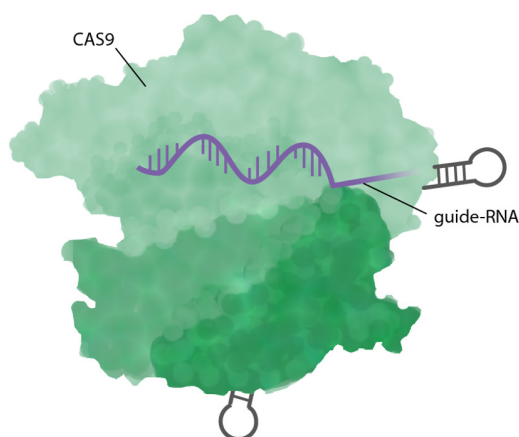
### CRISPR/Cas9 som genomredigering

Det var de två forskarna, och Nobelpristagarna, Jennifer Doudna och Emmanuelle Charpentier som översatte det här försvarssystemet i bakterier till en genomredigeringsteknik som kan användas även i eukaryota celler. De visade hur man med hjälp av en modifierad RNA-molekyl kan matcha en DNA-sekvens och därmed styra ett Cas-enzym (Cas9) till att klippa i genomet (arvsmassan) vid en speciell plats.

Den modifierade RNA-molekylen kallas för guide-RNA och är en 20 baser lång RNA-sekvens som binder komplementärt (basparar) med den DNA-sekvens man vill ändra, till exempel en bit av en gen. Forskare kan designa och låta tillverka ett nytt guide-RNA till varje redigering.

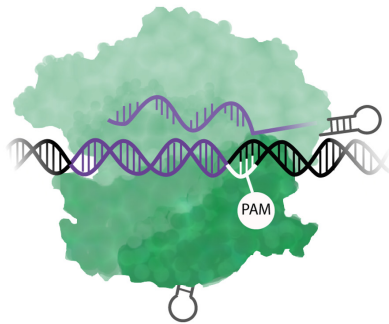
Enzymet de valde att använda heter Cas9 och är från bakterien *Streptococcus pyogenes*. För att Cas9 ska fungera behöver det vara bundet till guide-RNA som viker ihop sig, hakar tag och fäster i enzymet. När guide-RNA sitter ihop med enzymet Cas9 kan det känna igen och öppna DNA-spiralen vid en speciell sekvens, som förkortas PAM. Den PAM-sekvens Cas9 känner igen är 5'-NGG-3', där N kan vara vilken nukleotid som helst (A, T, C eller G).

Cas9-enzymet binder till PAM-sekvensen på DNA och öppnar upp DNA-strängarna för att guide-RNA sedan ska kunna binda till DNA. Om de 20 nukleotiderna i guide-RNA är komplementära till DNA-sekvensen klipper Cas9 av DNA-strängen – om inte, lämnas strängarna orörda och återgår till dubbelsträngad form (se figur nedan och på nästa sida).

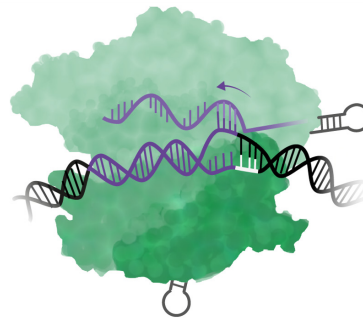


CRISPR/Cas9 består i huvudsak av två komponenter, enzymet Cas9 och ett guide-RNA:

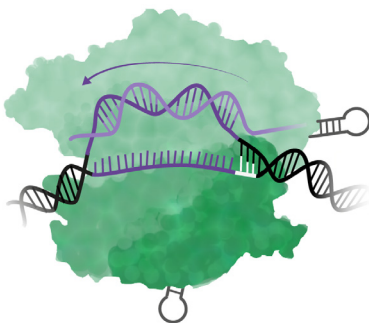
- Cas9 är en typ av enzym som klipper DNA. Det har flera olika domäner med olika funktioner, till exempel en domän som öppnar upp den dubbla DNA-strängen, en som kopplar till ett guide-RNA och en domän som utför själva klippet.
- Ett guide-RNA är en 20 baser lång RNA-sekvens som har designats så att det basparar med (binder komplementärt till) exakt den sekvens som man vill redigera. Det är själva sökfunktionen hos CRISPR/Cas9 som gör tekniken specifik.



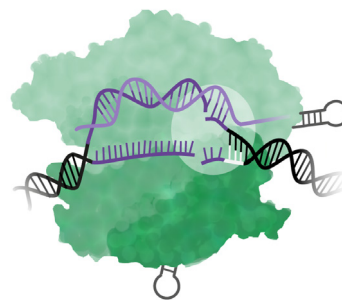
- ① Igenkänning av PAM. Enzymet Cas9 rör sig längs DNA-molekylen och söker PAM-sekvensen som är NGG.



- ② Basparning. När Cas9 hittar en PAM-sekvens öppnar det upp den dubbla DNA-spiralen



- ③ 20 nukleotider måste matcha. Om inte alla 20 baser i guide-RNAt kan baspara med DNA-sekvensen vid just denna PAM, så släpper Cas9. DNA-strängarna sluts samman igen och Cas9 letar vidare efter nästa PAM-sekvens.



- ④ DNA-strängen klipps. 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.

## CRISPR/Cas9 i en blodbildande stamcell

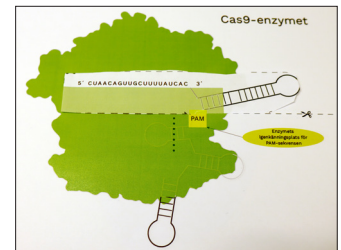
För att minska symtomen av sicklecellanemi ville forskarna få kroppens blodbildande stamceller att åter börja producera  $\gamma$ -globin. Kunde man göra det genom att påverka transkriptionsfaktorn BCL11A som stänger av produktionen av  $\gamma$ -globin? Man kom fram till att försöka redigera patientens blodbildande stamceller genom att klippa i en reglerande DNA-sekvens som styr uttrycket av BCL11A. Om den reglerande DNA-sekvensen är klippt och muterad kan inte transkriptionsfaktorer (aktivatorer) binda lika bra, vilket behövs för att genen BCL11A ska uttryckas. Med mindre av den reglerande transkriptionsfaktorn hoppades man att cellerna skulle starta igång produktionen av  $\gamma$ -globin igen.

Patientens blodbildande stamceller redigerades utanför kroppen i en så kallad *ex vivo* behandling. Då isoleras de blodbildande stamcellerna och förändras genetiskt i laboratoriet innan de förökas upp och förs tillbaka till patienten som behandling. En fördel med att behandla utanför kroppen är att man enklare kan kontrollera vilken typ av celler som förändras och att bara modifierade celler förs tillbaka till patienten.

## Övning 1. CRISPR/Cas9 klipper DNA

Plocka fram sax, tejp, penna och en enkelsidig utskrift av *Cas9-enzymet*, *guide-RNA 1* och *DNA-sekvens 1*. Syftet med pappersmodellen är att simulera hur CRISPR/Cas9 klipper DNA.

1. Ta fram sidan med Cas9-enzymet. Klipp längs den streckade linjen ända fram till pilspetsen. Den lilla gula fyrkanten markerar enzymets igenkänningsplats för PAM-sekvensen, alltså det ställe i enzymet som känner igen och interagerar med PAM-sekvensen i främmande DNA.
2. Klipp ut guide-RNA 1 längs den streckade linjen. Klipp också ett snitt fram till den gula rutan. Passa ihop de klippta bitarna (lägg omlott) så att de gula rutorna passar till varandra (se bild). Enzymet binder till ett guide-RNA.
3. Klipp ut DNA-sekvens 1. Sekvensen på remsan motsvarar en styrsekvens som reglerar uttrycket av transkriptionsfaktorn BCL11A.
4. Placera DNA-remsan tvärs över Cas9-modellen i det ljusgröna fältet. Skjut DNA-remsan från vänster till höger tills PAM-rutan på Cas9-enzymet matchar en PAM-sekvens (5' -NGG) på DNA. Alla PAM-sekvenser är gulmarkerade.
5. Dra remsan till du ser att guide-RNA matchar DNA-sekvensen. Kontrollera att hela DNA-sekvensen är komplementär till RNA-sekvensen (U-A och C-G). Stanna när du ser att PAM-sekvensen är på rätt ställe och att DNA och RNA är komplementära. Vänd på DNA-sekvensen om du inte hittar den komplementära RNA-sekvensen.
6. Cas9 gör nu ett dubbelsträngsbrott i DNA. Det gör den 3 baspar uppströms (mot 5' -ändan) av strängen med PAM-sekvensen. Den prickade linjen visar var Cas9 klipper DNA-strängarna. Använd en penna för att rita en vertikal linje över båda strängarna vid denna position.
7. Klipp DNA-remsan vid den platsen. Behåll bitarna till del 2.



## Frågor om CRISPR/Cas9

1. Hur många nukleotider lång är den guidande regionen på guide-RNA?
2. Binder guide-RNA till PAM-sekvensen?
3. Var finns PAM-sekvensen och vad har den för funktion?
4. Var klipper Cas9 DNA i förhållande till PAM-sekvensen?
5. Vilken PAM-sekvens gäller för Cas9?
6. Efter vilken PAM-sekvens klippte Cas9-enzymet i detta exempel (fyll i kvävebaserna)?

5' \_ \_ \_ 3'



## Reparation och mutation

När den eukaryota cellen upptäcker att DNA har blivit klippt startar den sitt reparationssystem. Den vanligaste reparationsmekanismen kallas för NHEJ (Non homologous end joining). När cellen lagar DNA på det sättet slutar det ofta med att en mutation skapas då det läggs till eller tas bort några få kvävebaser. Det kallas för indel (insertion eller deletion). En sådan mutation kan förstöra funktionen för just den genen.

Patientens blodbildande stamceller redigeras så att den reglerande DNA-sekvensen för BCL11A klipps itu. När den har klippts itu (och reparerats med en mutation som följd) minskar uttrycket av transkriptionsfaktorn BCL11A, som vanligtvis hämmar tillverkningen av  $\gamma$ -globinkedjor. Detta leder till att cellen åter startar tillverkning av  $\gamma$ -globinkedjor. De nya  $\gamma$ -globinkedjorna kopplar ihop sig med  $\alpha$ -globinkedjor och bildar fetalt hemoglobin (HbF).

## Övning 2. Reparera och mutera

1. Titta på den översta sekvensen för BCL11A nedan. Ta fram DNA-sekvens 1 som du har klippt isär.
2. Du ska skapa en deletion genom att klippa bort några nukleotider från båda ändarna i din DNA-remsa där Cas9 gjorde ett dubbelsträngsbrott. Ofta är det 0–5 nukleotider från varje sida av dubbelsträngsbrottet som läggs till eller tas bort.
3. Lägg ihop de två ändarna igen. Jämför din DNA-sekvens 1 med den översta sekvensen nedan. Markera vilka nukleotider som saknas.
4. Titta på båda sekvenserna nedan och jämför dem. Ringa in skillnaden i den muterade DNA-sekvensen. Är det en insertion eller en deletion?
5. Hur begränsar en PAM-sekvens möjligheten att rikta Cas9 till den DNA-sekvens man vill klippa?
6. Reparationsmekanismen NHEJ introducerar slumpvisa förändringar. Efter försöket behöver man därför kontrollera om cellerna producerar RNA för BCL11A. Förklara varför.
7. I forskningsfasen är det också viktigt att kontrollera att det inte finns några off-target-effekter. Fundera. Vad innebär det?

Del av reglerande sekvens för BCL11A:

```

3' ... TCGTGGTGCACGTTGCTTTATCACAGGCTCCAGGAAGCGTTTGGCCTCTGATTAGGG... 5'
|||||
5' ... TAGTCCAGTGCAAGCTAACAGTTGCTTTATCACAGGCTCCAGGAAGCGTTTGGCCTCTGATTAGGG... 3'

```

En muterad sekvens:

```

3' ... TCGTGGTGCACGTTGCTTTACTCACAGGCTCCAGGAAGCGTTTGGCCTCTGATTAGGG... 5'
|||||
5' ... TAGTCCAGTGCAAGCTAACAGTTGCTTTACTCACAGGCTCCAGGAAGCGTTTGGCCTCTGATTAGGG... 3'

```



### Övning 3. Skapa ett eget guide-RNA

Ta fram sax, tejp, penna, överstrykningspenna och en enkelsidig utskrift av *guide-RNA 2* och *DNA-sekvens 2*. När forskare vill använda CRISPR/Cas9 för att störa en DNA-sekvens testar de vanligtvis flera olika guide-RNA.

1. Ta bort guide-RNA 1 från Cas9-enzymet.
2. Klipp ut guide-RNA 2. Denna guide är tom. Passa ihop de klippta bitarna så att den gula rutan passar till varandra.
3. Klipp ut DNA-sekvens 2. Den del av sekvensen som är markerad med en rosa ruta vet man är extra känslig för förändringar. Man har märkt att en förändring i detta lilla område av DNA-sekvensen ofta leder till minskad produktion av BCL11A.
4. Använd en överstrykningspenna och markera alla PAM-sekvenser på DNA-remsa 2.
5. Placera DNA-remsan tvärs över Cas9-modellen i det ljusgröna fältet. Skjut DNA-remsan från vänster till höger till PAM-rutan på Cas9-enzymet matchar en PAM-sekvens (5' -NGG) på DNA.
6. Fyll i den sekvens du skulle välja på guide-RNA för att få Cas9-enzymet att klippa DNA-strängen inom det markerade området.
7. Vad är viktigt att tänka på i sekvensen när man konstruerar ett guide-RNA?

## Patientpåverkan

Det som du har gjort i den här övningen motsvarar den genomredigerande behandling av sicklecellanemi som under hösten 2023 godkändes av läkemedelsmyndigheter i Storbritannien och USA, och i EU i början av 2024.

De blodbildande stamcellerna som ska redigeras finns normalt inte i blodet utan i benmärgen. För att de ska vandra ut i blodet och kunna isoleras från ett blodprov krävs att patienten förbehandlas med läkemedel som leder till kraftig celldelning i benmärgen. Stamcellerna tar sig då ut i blodbanan och skördas efter cirka en vecka, vilket innebär att blodet cirkulerar genom en maskin, stamcellerna sorterar ut och övriga blodkroppar förs tillbaka till kroppen.

Efter att stamcellerna isolerats redigeras de i ett laboratorium. De återförs sedan till patienten som en stamcellstransplantation vilket kräver att man försöker få bort så mycket av de kvarvarande stamcellerna som möjligt, de som har sjukdomsmutationen. Detta kallas konditionering och görs oftast med cytostatika. De biverkningar som har registrerats i samband med Casgevy kommer från det här aggressiva steget i behandlingen.

Ett hundratal patienter har redan fått behandlingen i kliniska prövningar och effekten har varit mycket positiv. Efter behandlingen har patienterna följts noga för att se om blodcellerna har fått med sig förändringen.

### Hur har det gått för patienterna?

- 1 år efter behandlingen finns redigerade celler kvar i stabila nivåer.
- Fetalt hemoglobin tillverkas och den totala koncentrationen av hemoglobin har ökat.
- Av de patienter med sicklecellanemi som genomgick behandlingen var alla utan smärtlindring ett år senare.

### Tips

- Läs mer om hur CRISPR/Cas9 fungerar:

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

- Läs mer om den första godkända CRISPR/Cas9-genterapin:

<https://www.genteknik.se/varldens-forsta-crispr-terapi-godkand-i-storbritannien/>