

CRISPR-Cas9

- den revolutionerende gensaks

De fleste af os har hørt om det - enten i nyhederne, på nettet eller hos kollegaen. CRISPR-Cas9, det mest hypede klippeværktøj i den molekylære værktøjskasse i nyere tid. Men hvad er alt det "fuzz about"? Hvad er CRISPR-Cas9, og hvad er det, som gør CRISPR-Cas9 til det mest omtalte, revolutionerende og debatskabende fænomen i vores tidsalder?

Af Ida Lauritsen og Morten H.H. Nørholm, Danmarks Tekniske Universitet, The Novo Nordisk Center for Biosustainability

CRISPR-Cas9 revolutionerer biologien og har muliggjort, at vi nu meget effektivt og præcist kan "klippe og klistre" genetisk materiale ind og ud af et utal af organismer. Denne enestående egenskab stammer oprindeligt fra bakteriers immunforsvar, som beskytter mod fremmed DNA-indtrængen. Da kinesiske forskere i 2015 redigerede det genetiske materiale i menneskeceller fra et tidligt fosterstadium, skabte det stor debat verden over, men åbnede samtidig også muligheder for nye måder at bekæmpe genetiske sygdomme på. CRISPR-bølgen er over os og dette er kun begyndelsen.

"Hacking" af bakteriens immunforsvar

CRISPR-Cas9-systemet er oprindeligt en del af bakteriers immunforsvar og bruges til at genkende og tilintetgøre fremmede genetiske elementer ved at klippe dem i stykker [1]. Disse elementer kan f.eks. stamme fra virus, som angriber bakterier i naturen. Forkortelsen CRISPR står for "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats", som hentyder til bestemte gentagende DNA-sekvenser, der er blevet observeret i det genetiske materiale fra forskellige bakterier [2]. I 2005 lavede forskere forbløffende opdagelser, da de fandt ud af, at sekvenser som lå mellem disse gentagede sekvenser, matchede DNA-sekvenser fra forskellige vira - og især de såkaldte phager, som angriber bakterier [3]. Derved fandt man ud af, at information omkring angribende fremmede phager - et genetisk mønster - bliver gemt i bakteriens DNA. Hvis phagen angriber igen, vil bakterien genkende den og have sit beredskab klar til forsvar.

Men hvad er Cas9 så? Cas9 (*CRISPR-associated protein 9*) er det protein, der fungerer som den molekylære saks, der klipper det fremmede genetiske materiale i stykker, hvis bakterien angribes igen. Denne saks er så specifik, at den kun klipper, hvis den genkender et bestemt stykke DNA, som passer sammen med skabelonen i bakteriens DNA [4], figur 1. For at have et velfungerende CRISPR-Cas9 forsvarssystem i bakterien, er det nødvendigt at have to komponenter:

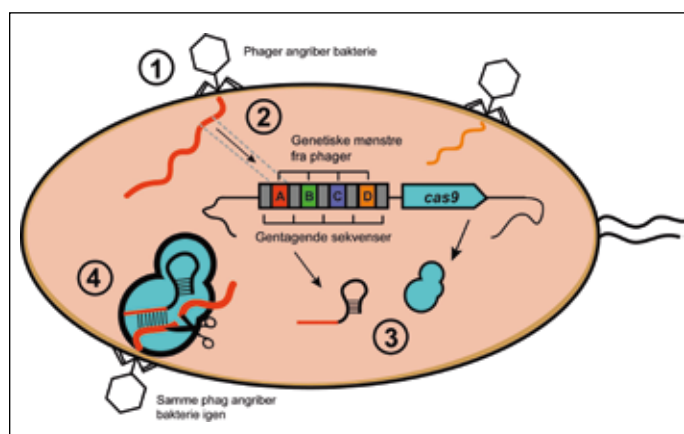
- 1) Cas9-gensaksen samt et tilhørende hjælperkompleks og
- 2) en guidesekvens, som leder Cas9 til den DNA-sekvens, som skal klippes.

I 2012 fik en forskergruppe i Californien en idé - hvad hvis man kunne "hacker" denne naturlige forsvarsmekanisme til at styre Cas9 og klippe bestemte DNA-sekvenser [5]?

Dette kunne man f.eks. bruge til at genmodificere organismer, så de kunne få nye, eller optimere, allerede-eksisterende egenskaber. Hurtigt derefter blev systemet testet i forskellige organismer, og det startede en biologisk revolution - en revolution, der muliggjorde, at man nu kunne modificere og ændre det genetiske arvemateriale yderst effektivt og med høj præcision. Og lige siden har det kun taget fart. Nu rider alle forskere inden for life-science med på CRISPR-bølgen.

Universel gensaks

Ud over at kunne klippe hvilken som helst DNA-sekvens, så er en af de mest fascinerende egenskaber ved CRISPR-Cas9-



Figur 1. CRISPR-Cas9-systemet som del af bakteriens immunforsvar.

(1) Phager angriber bakteriecellen og inficerer med deres genetiske elementer (rød og orange).

(2) Phagerens unikke genetiske mønster (A, B, C, D i forskellige farver) bliver indsat i bakteriens DNA med gentagende sekvenser imellem sig (grå). Her i DNA'et findes også genet, som koder for Cas9-proteinet.

(3) De unikke genetiske mønstre fra phagerne bliver lavet til en guidesekvens og samlet i et CRISPR hjælperkompleks. Samtidig bliver Cas9 (blå) proteinet produceret i cellen.

(4) Hvis den samme phag angriber bakterien igen, matcher guidesekvensen phagens inficerende genetiske element, som derved genkendes og klippes af Cas9.

systemet, at det fungerer i et utal af organismer. Dette er blandt andet bakterier som *Escherichia coli*, gær, svampe, planter, dyr - ja selv i menneskeceller [6]. Dette betyder altså, at systemet er universelt - ligesom DNA er. På Center for Biosustainability (CFB) på Danmarks Tekniske Universitet bruger vi dagligt CRISPR-Cas9 til at designe og optimere cellefabrikker. "Cellefabrikker" er celler fra forskellige organismer, der bruges som arbejdsheste til at producere forskellige værdifulde stoffer, som f.eks. medicin, brændstoffer eller kemikalier i industriel skala. Ved at udnytte cellefabrikker kan man producere store mængder af stoffer som måske naturligt kun forekommer i små mængder i den oprindelige organisme, under ekstreme eller ikke-miljøvenlige forhold.

Klassiske eksempler på sådanne stoffer er artemisinin og lycopen, som henholdsvis er et anti-malaria medikament og en vigtig antioxidant, der begge oprindeligt er produceret i langsomtgroende planter i begrænsede mængder [7].

Et klip i DNA'et kan give en produktiv cellefabrik

Det genetiske arvemateriale for alle organismer består af ufattelig mange gener, der koder for proteiner. Disse proteiner kan være enzymer, der kan omdanne ét stof til et andet. For at kunne producere stoffer i cellefabrikker, som ikke naturligt kodes for i en organismes genetiske arvemateriale, må man "tilføje" nye enzymer, redigere eller fjerne de allerede eksisterende. Dette kræver molekylære værktøjer, som kan modificere de gener, der koder for enzymerne. Værktøjer til at udføre genetisk redigering har eksisteret længe, men det som gør CRISPR-Cas9-systemet så enestående til dette formål, er,

at genetisk redigering kan gøres med meget stor præcision og er billigt. Der er ikke behov for dyre maskiner, og teknologien er tilgængelig for alle forskere - da CRISPR-Cas9-komponenterne kan bestilles på internettet.

CRISPR-Cas9-systemet klipper ved en bestemt kort DNA-sekvens, styret af en guidesekvens. Et klip i vores genetiske arvemateriale - DNA'et - forårsaget af CRISPR-Cas9 kan være fatalt for de fleste organismer. Men hvordan udnyttes systemet så til at kunne ændre det genetiske materiale?

Dette afhænger af måden, som cellen reparerer skaden i DNA'et på. Der findes forskellige måder at reparere skaden, hvor den mest velkendte involverer brugen af et DNA-erstatningsstykke, som passer ind i den position, hvor klippet er sket [8]. Gær er en eukaryot (organisme med en cellekerne) og mester til at bruge stykker af erstatnings-DNA til at fikse et klip. Hermed kan vi indsætte en ny DNA-sekvens eller fjerne en sekvens i den position, hvor klippet er sket, figur 2a, side 16. Med CRISPR-Cas9 kan vi derfor "klippe og klistre" de gener, vi gerne vil have ind og ud af organismens DNA - vi kan lave genetisk redigering.

Anvendelsen af CRISPR-Cas9-systemet til genetisk redigering er dog lidt anderledes i de fleste bakterier, som ofte ikke er gode til at reparere deres DNA - de dør af et klip i det genetiske materiale [9]. Dette skyldes blandt andet, at bakterier er prokaryoter (uden cellekerne) og mindre komplekse. Vi kombinerer derfor andre metoder med CRISPR-Cas9 for at kunne lave genetisk redigering i bakterier, hvor CRISPR-Cas9 bruges til at fjerne de celler, som ikke har fået ændret deres genetiske materiale, figur 2b, side 16. På denne måde kan vi

Redefining peristaltic pump technology for single-use downstream bioprocessing

- Flow linearity to 20 L/min at 3 bar
- Trace pulsation of ± 0.12 bar
- Ultra-low shear
- Single-use technology with class-leading validation



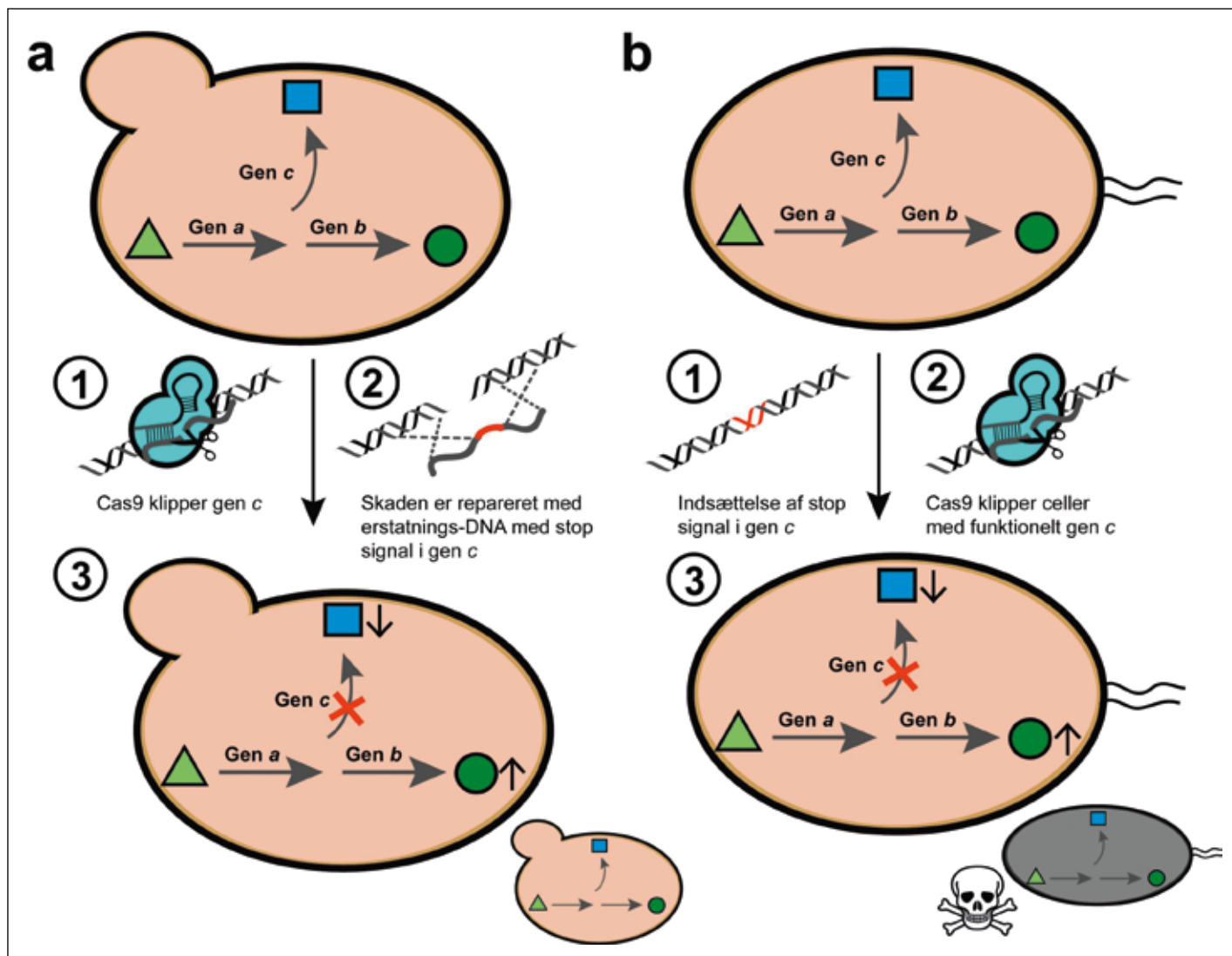
Quantum

ReNu
SU TECHNOLOGY

wmftg.com/Quantum
+45 4394 0065

**WATSON
MARLOW**

Fluid Technology Group



Figur 2. Brugen af CRISPR-Cas9 i cellefabrikker til produktion af værdifulde stoffer. Både gær- og bakteriecellen indeholder generne (*a* og *b*), der koder for enzymer, som omdanner substratet (illustreret som en lysegrøn trekant) til et værdifuldt stof (mørkegrønne cirkel). Dog har begge disse organismer et enzym (kodet af *gen c*), som omdanner substratet til et uønsket biprodukt (blå firkant). For at undgå at producere mindre af det værdifulde stof, må enzymet, kodet af *gen c*, inhiberes. Genetisk redigering bruges derfor til at indsætte et stopsignal i *gen c*, så det ikke kan producere et aktivt enzym.

a. (1) I gærcellen bruges CRISPR-Cas9 til at klippe i *gen c*, (2) og skaden reparerer med et stykke erstatnings-DNA, hvor et stopsignal (fremhævet i rød) er indsat. (3) Med et inhiberet *gen c* (rødt kryds) producerer cellen mindre af biproduktet (pil ned ved blå firkant) og mere af det værdifulde stof (pil op ved mørkegrøn cirkel). Gærceller, som ikke har brugt erstatnings-DNA'et til reparation af skaden, kan f.eks. fikse skaden ved at klistre DNA'et sammen igen, men disse producerer lige så meget værdifuldt stof som den oprindelige celle.

b. (1) I bakteriecellen bruges bestemte molekylære metoder til at indsætte et stopsignal i *gen c*, (2) og CRISPR-Cas9 bruges her til at fjerne de celler, som stadig har et funktionelt *gen c*. (3) Cellen med et inhiberet *gen c* producerer mere værdifuldt stof (pil op) og mindre af biproduktet (pil ned). Bakterieceller, som stadig har et funktionelt *gen c*, vil blive klippet i DNA'et og dø på grund af mangel på effektiv DNA-reparation (grå bakteriecelle).

lettere finde de celler, som er blevet ændret. Som eksempel skal man uden CRISPR-Cas9-systemet søge 100 celler for at finde én celle, som er korrekt genetisk modificeret, hvorimod man med CRISPR-Cas9 kun skal lede 10 igennem eller færre [10]. I vores forskningsgruppe arbejder vi med bakterier og bruger CRISPR-Cas9-systemet, når vi laver genetisk redigering for at skabe bestemte bakteriestammer, hvor f.eks. et gen er inaktiveret. Dermed kan vi studere betydningen af enzymet, som netop dette gen koder for. Vi gør dette for at udvikle og teste nye molekylære værktøjer til brug i cellefabrikker samt for at studere gener, som kan være vitale for cellens evne til at mutere sit genetiske materiale for at tilpasse sig et bestemt nyt miljø.

Hvad er næste skridt?

Umiddelbart lyder CRISPR-Cas9-systemet til at have åbnet

utallige døre inden for biologien. Systemet er veltestet i både bakterier, dyreceller samt gær, men bliver stadig optimeret og videreudviklet. Nu findes der sågar versioner af systemet, som kan bruges til at op- og nedregulere udtrykkelsen af bestemte gener uden at klippe dem, men hvor man udnytter den specifikke DNA-findende egenskab [11,12]. Udover brugen i cellefabrikker, kan man bruge CRISPR-Cas9-systemet til f.eks. at lave planter, der er mere robuste i ekstreme miljøer som tørke, mere næringsrige grøntsager der smager af mere samt undersøge grundlæggende spørgsmål vedrørende ældning, evolution og udviklingen af kræft [13].

Et af de mest omdiskuterede CRISPR-Cas9-baserede eksperimenter fra 2015 involverede en kinesisk forskningsgruppe, som formåede at fjerne et sygdomsgen i menneskeceller fra et tidligt fosterstadium i et reagensglas [14].

Dette eksperiment startede etiske diskussioner vedrørende brugen af CRISPR-Cas9. Men uanset hvor kontroversielt dette eksperiment var, viste det tydeligt, at teknologien kan bruges til at modificere sygdomsgener i de tidligere stadier af udviklingen, og allerede i 2016 gav det amerikanske medicinske forskningsråd *National Institutes of Health* grønt lys til at påbegynde brugen af CRISPR-Cas9 i menneskeforsøg til bekæmpelse af kræft [15].

Denne udvikling kan potentielt vise sig at have stor betydning for, hvordan vi kommer til at bekæmpe og behandle genetiske sygdomme fremover.

Hvordan fremtiden ser ud vedrørende brugen af CRISPR-Cas9 vides ikke, men hvad der er ganske sikkert, er, at CRISPR-Cas9 har ændret biologien, og hvor lang tid vi fortsat vil ride på CRISPR-bølgen, kan kun tiden vise.

E-mail:

Ida Lauritsen: idla@biosustain.dtu.dk

Morten H. H. Nørholm: morno@biosustain.dtu.dk

Referencer

1. R. Barrangou and J. Van Pijkeren, "Exploiting CRISPR – Cas immune systems for genome editing in bacteria," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 37, pp. 61-68, 2016.
2. R. Jansen, J.D.A. Van Embden, W. Gaastra, and L.M. Schouls, "Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes," *Mol. Microbiol.*, vol. 43, no. 6, pp. 1565-1575, 2002.
3. A. Bolotin, B. Quinquis, A. Sorokin, and S. Dusko Ehrlich, "Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin," *Microbiology*, vol. 151, no. 8, pp. 2551-2561, 2005.
4. J.D. Sander and J.K. Joung, "CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes," *Nat. Biotechnol.*, vol. 32, no. 4, pp. 347-355, 2014.
5. M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J.A. Doudna, and E. Charpentier, "A Programmable Dual-RNA - Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity," *Science*, vol. 337, no. August, pp. 816-822, 2012.
6. V. Singh, D. Braddick, and P.K. Dhar, "Exploring the potential of genome editing CRISPR-Cas9 technology," *Gene*, vol. 599, pp. 1-18, 2017.
7. J.A. Chemler and M.A. Koffas, "Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 19, no. 6, pp. 597-605, 2008.
8. Z. Liu, Y. Liang, E.L. Ang, and H. Zhao, "A New Era of Genome Integration - Simply Cut and Paste!," *ACS Synth. Biol.*, vol. 6, no. 4, pp. 601-609, 2017.
9. J.M. Peters, M.R. Silvis, D. Zhao, J.S. Hawkins, C.A. Gross, and L.S. Qi, "Bacterial CRISPR: Accomplishments and prospects," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 27, pp. 121-126, 2015.
10. C. Ronda, L.E. Pedersen, M.O.A. Sommer, and A.T. Nielsen, "CRISPR: CRISPR Optimized MAGE Recombineering," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 19452, 2016.
11. L.A. Gilbert, M.A. Horlbeck, B. Adamson, J.E. Villalta, Y. Chen, E.H. Whitehead, C. Guimaraes, B. Panning, H.L. Ploegh, M.C. Bassik, L.S. Qi, M. Kampmann, and J.S. Weissman, "Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation," *Cell*, vol. 159, no. 3, pp. 647-661, 2014.
12. L.S. Qi, M.H. Larson, L.A. Gilbert, J.A. Doudna, J. S. Weissman, A.P. Arkin, and W.A. Lim, "Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression," *Cell*, vol. 152, no. 5, pp. 1173-83, 2013.
13. V. Lau and J.R. Davie, "The discovery and development of the CRISPR system in applications in genome manipulation," *Biochem. Cell Biol.*, vol. 8, no. October, pp. 1-8, 2016.
14. P. Liang, Y. Xu, X. Zhang, C. Ding, R. Huang, Z. Zhang, J. Lv, X. Xie, Y. Chen, Y. Li, Y. Sun, Y. Bai, Z. Songyang, W. Ma, C. Zhou, and J. Huang, "CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes," *Protein Cell*, vol. 6, no. 5, pp. 363-372, 2015.
15. S. Reardon, "First CRISPR clinical trial gets green light from US panel," *Nature News*, 2016. [Online]. Available: <http://www.nature.com/news/first-crispr-clinical-t>

DRIFTON

THE SCIENCE OF DISPENSING

Attraktive priser
på pumper og
laboratorieglass

Tag en snak med os på LabDays 2017

Og få -15% rabat på GLASSCO frem til den 1. oktober 2017

Stand nr. 50

NYHED

GLASSCO - Høj kvalitet til lav pris
QR-koder holder styr på certifikaterne!



Drifton A/S

Tlf. +45 3679 0000

info@drifton.dk

www.drifton.dk

www.drifton.dk/de

www.drifton.eu