



UPPSALA
UNIVERSITET

Hur kan CRISPR-Cas9 användas inom genterapi?

Adrian Silberman

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2015
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Hur kan CRISPR-Cas9 användas inom genterapi?

Adrian Silberman

Självständigt arbete i biologi 2015

Sammandrag

Genterapi är ett relativt nytt forskningsområde, där målet är att det ska kunna appliceras inom sjukvården för att bota genetiska sjukdomar. Behandling genomförs genom att ersätta en felaktig eller skadad nukleotidsekvens i DNA som kodar för en sjukdomsfenotyp, mot en korrekt DNA-sekvens som kodar för en frisk fenotyp. Då människor är målgruppen för denna forskning krävs det att metoderna är robusta och pålitliga samt att resultaten från preliminära studier är noga granskade, innan detta kan tillämpas inom sjukvården. Genom att introducera specifika endonukleas i celler går det att klippa i DNA på önskade ställen. Olika typer av proteiner som transkriptionsaktivator-liknande effektorer med nukleasdomän (TALENs) och zinkfingernukleas (ZFNs) kan konstrueras för att klyva DNA på specifika ställen. Senare forskning har även visat att "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats"-CRISPR associerat protein 9 (CRISPR-Cas9) är ett liknande verktyg som skulle kunna ersätta TALENs och ZFNs då CRISPR-Cas9 är enklare och billigare att använda. Dock finns det fortfarande många frågetecken kring hur olika mekanismer samspelar och hur modifieringar i Cas9 och enkla guide-RNA (sgRNA) skulle kunna förbättra systemet, men nya studier bidrar till en utökad förståelse och kunskap inom området. Det har nämligen visat sig att Cas9 har endonukleasaktivitet och kan bli guidat av RNA till specifika sekvenser i DNA för att introducera dubbelsträngsbrott. Studier har även visat att det kan finnas hinder med att använda CRISPR-Cas9 då det har upptäckts att det även under vissa omständigheter kan ske bindning och klyvning av DNA på oönskade ställen. Olika modifieringar av Cas9 har även breddat proteinets funktioner till att bli ett nickas och endast kunna klippa i en DNA sträng, eller ingen alls för att då kunna användas för genreglering istället. I denna översiktssuppsats beskrivs den nuvarande kunskapen om CRISPR-Cas och hur dessa insikter har bidragit till att nya användningsområden har upptäckts. Mer kunskap inom detta område skulle kunna leda till en mer sofistikerad modell för att kunna bota genetiska sjukdomar.

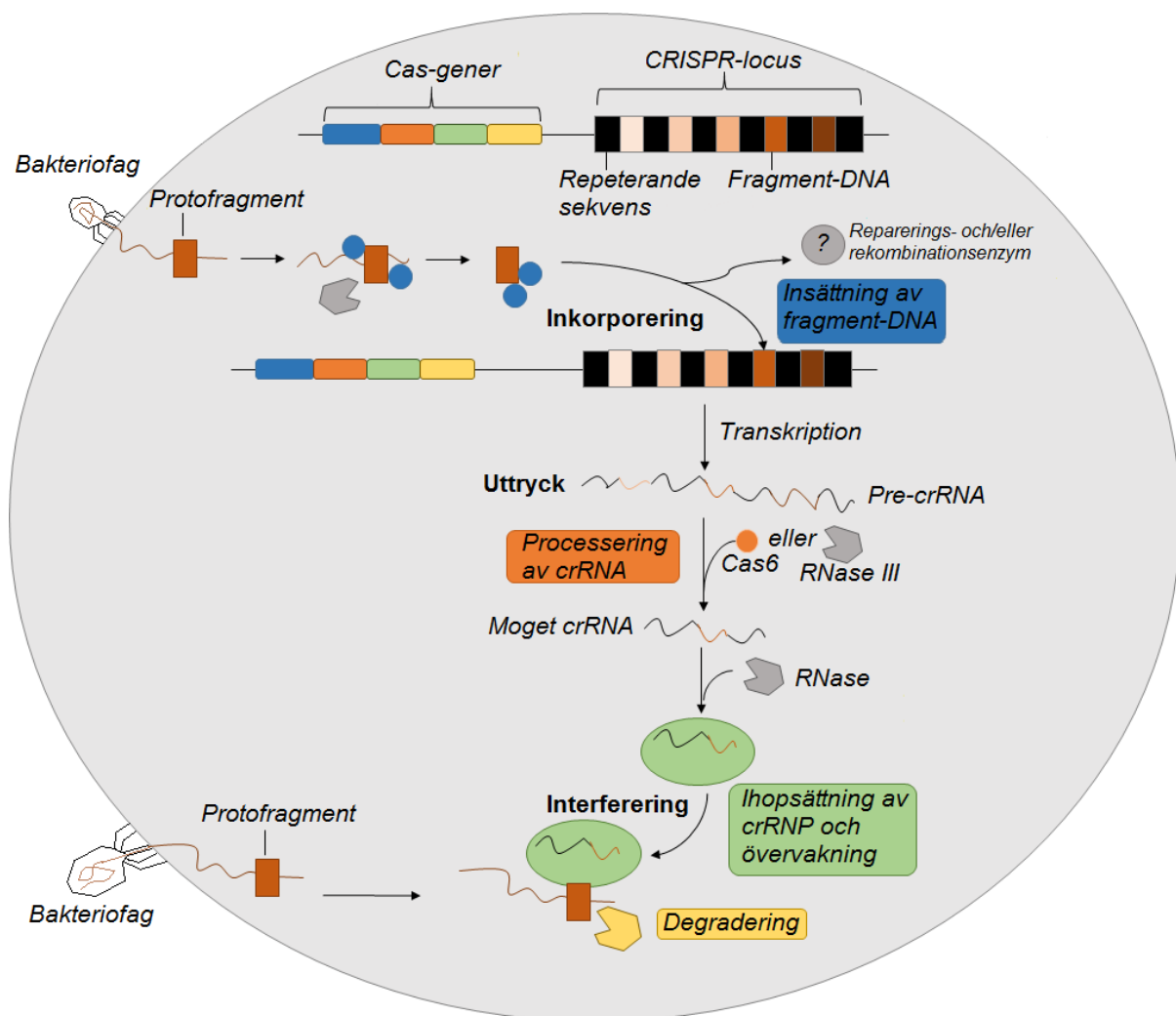
Inledning

Det har under en lång tid funnits mediciner som kunnat råda bot på en mängd olika sjukdomar. Epidemier och pandemier har undvikits då det har tagits fram vaccin som bromsat och förhindrat dessa utbrott. Det har dock inte funnits något effektivt och/eller billigt tillvägagångssätt för att bota genetiska sjukdomar som sicklecellanemi, thalassemi och cystisk fibros. Dock ser framtiden ljus ut då ny forskning bidrar till att nya metoder utvecklas och vi hela tiden tar steg som för oss närmare en behandling av genetiska sjukdomar (Jinek *et al.* 2012, Schwank *et al.* 2013, Wu *et al.* 2013). De senaste åren har strålkastarljuset legat på ett nytt system som hittades i prokaryoter och som har en stor potential att kunna bli nästa generations genterapi, men det finns fortfarande hinder som måste lösas (Jinek *et al.* 2012, Fu *et al.* 2013, Pattanayak *et al.* 2013).

Ett adaptivt immunförsvar i bakterier

"Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats" (CRISPR) är DNA-segment som består av repeterande palindromiska sekvenser med mellanliggande fragment-DNA (på eng. Spacer DNA). Det finns även CRISPR associerade (Cas) proteiner som interagerar med CRISPR (Jansen *et al.* 2002). Tillsammans utgör de CRISPR-Cas system. Upptäckten av dessa system har gett insikten att det finns bakterier som har ett adaptivt immunförsvar.

Mekanismerna bakom bakteriens försvarar mot främmande DNA som kommer från bland annat bakteriofager och plasmider är många och kan skilja sig åt (van der Oost *et al.* 2014). Några av dessa är däremot snarlika och fungerar i sin helhet på ett liknande sätt: Bakterien tar först upp eller blir infekterad av okänt DNA. Segmenten från det främmande DNA:t inkorporeras sedan i bakteriens DNA vid CRISPR loci. Detta transkriberas sedan och bildar ett förstadium till CRISPR RNA (Pre-crRNA). Efter det bryts det ned av enzym till CRISPR RNA (crRNA) och bildar ett CRISPR ribonukleoprotein (crRNP)-komplex med Cas-protein. Detta komplex kan sedan känna igen DNA från liknande bakteriofager genom fragment-DNA som är komplementärt med främmande DNA (protofragment) och bryter sedan ned virus-DNA:t (Figur 1) (van der Oost *et al.* 2014).



Figur 1. En generell bild över CRISPR-Cas system och hur det fungerar som bakteriers adaptiva immunförsvar. Främmande viralt DNA från bakteriofager eller plasmider (i detta fall bakteriofag) bryts ned av protein och en del av detta DNA (fragment-DNA) sätts sedan in i CRISPR-locus med hjälp av Cas proteiner. När CRISPR-locus transkriberas bildas ett förstadium till CRISPR RNA (pre-crRNA) som processeras till ett moget crRNA av Cas6 i Typ I och Typ III, men av RNase III i Typ II. Det bildas sedan ett komplex med RNA och ribonukleoprotein(er) som känner igen och bryter ned främmande DNA med en liknande sekvens som fragment-DNA:t. Omritad efter van der Oost *et al.* (2014).

Det finns tre olika typer av CRISPR-Cas system: Typ I, Typ II och Typ III och dessa skiljer sig från varandra i hur de fungerar (van der Oost *et al.* 2014). Typ I och Typ III är dock mer lika varandra än Typ II, då dessa använder sig av Cas6 för bearbetning av pre-crRNA till mogna crRNA. Typ II använder istället RNase III, som inte är ett Cas-protein, för att utföra detta (Figur 1). En annan likhet mellan Typ I och III är att crRNP-komplexet som känner igen och bryter ned främmande DNA består av flertalet olika Cas protein. I Typ II består crRNP endast av Cas9, vilket gör det unikt och intressant ur en bioteknologisk synvinkel (van der Oost *et al.* 2014). Cas9 är ett RNA-guidat endonukleas som finns i vissa bakterier (Ex. *Streptococcus pyogenes* [*S. pyogenes*]) och klyver främmande dubbelsträngat DNA. Proteinet består av två subenheter som har strukturer med nukleasaktivitet. Dessa två domäner har liknande strukturer som andra nukleaser. Den ena subenheten liknar RuvC endonukleas som klyver hollidaykors vid homolog rekombination. Den andra liknar endonukleas från HNH familjen. Dessa är endonukleas som virus, bakterier, arkéer och eukaryoter använder sig av och som har liknande egenskaper som Cas9 domänerna (Iwasaki *et al.* 1991, Dalgaard *et al.* 1997, Makarova *et al.* 2006). Kunskapen om Typ II systemets enkelhet och relativt få komponenter har bidragit till att CRISPR-Cas9 hamnade i fokus för utveckling av ett nytt bioteknologiskt redskap.

CRISPR-Cas9 utnyttjar det prokaryota CRISPR-Cas typ II maskineriet (Cong *et al.* 2013). Typ II loci innehåller gener som kodar för Cas9 endonukleas, trans-aktiverande crRNA (tracrRNA) och pre-crRNA. Dessa tre gener är essentiella för bakterier som använder sig av Typ II som en del av det adaptiva immunförsvaret och medierar klyvning av viralt DNA. Pre-crRNA blir sedan till flera mogna crRNA efter interaktion med Rnase III. Mogna crRNA består av 24 nukleotider som är komplementära med tracrRNA vilket gör att dessa basparar och skapar en tracrRNA:crRNA hybrid. Denna hybrid guidar sedan Cas9 till ett specifikt ställe i genomet som har en homolog sekvens med guide-sekvensen på 20 nukleotider (Figur 3), där Cas9 klippar DNA molekylen (Deltcheva *et al.* 2011, Cong *et al.* 2013).

Från ett adaptivt immunförsvaret till ett biologiskt verktyg

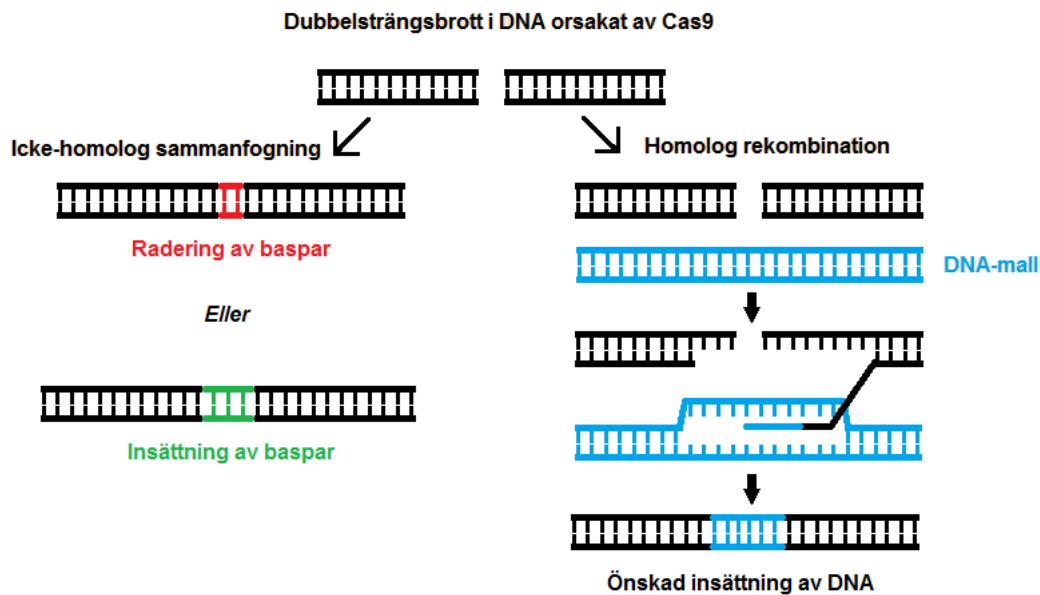
I och med upptäckterna om att CRISPR-Cas är en del av ett adaptivt immunförsvaret hos vissa bakterier har man de senaste åren kunnat utveckla verktyget CRISPR-Cas9. Detta verktyg har flertalet appliceringar, eller möjliga appliceringar, inom biologisk forskning, bioteknologi samt medicin. Möjligheterna är många och det finns studier som visar att redigering, reglering och inmärkning av genom är genomförbart och kan utföras med hög precision (Sander & Joung 2014). Metoder som har använts förut inom denna typ av geneditering har varit bland annat transkriptionsaktivator-liknande effektorer med nukleasdomän (TALENs) och zinkfingernukleas (ZFNs). De transkriptionsaktivator-liknande effektorerna (TALENs) i TALENs är DNA bindande proteiner som binder till specifika nukleotider. Genom att införa modifieringar i TALEs går det att göra dem specifika för utvalda sekvenser i DNA. TALEs har sedan fuserats ihop med endonukleaset FokI för att bilda TALENs. Tillsammans med ett till TALEN, som är komplementärt och klyver i den andra DNA-strängen, går det att introducera dubbelsträngsbrott i DNA på specifika ställen (Moscou & Bogdanove 2009, Christian *et al.* 2010). Zinkfingernukleas består av DNA-bindande zinkfingerprotein som fuserats ihop med FokI likt TALENs. Zinkfingerproteinerna binder till tre specifika nukleotider. Genom att sätta ihop flera av dessa proteiner och sedan fästa dem till ett nukleas går det att dirigera klyvningen av DNA till önskvärd sekvens (Kim *et al.* 1996). Dessa två metoder kan i hög utsträckning ersättas av CRISPR-Cas9, då det är ett lättare verktyg att

använda och som endast kräver små förändringar för att kunna få nya tillämpningar (Ding *et al.* 2013).

RNA interferens (RNAi) har använts och används i stor utsträckning för att reglera genuttryck i celler. Metoden går ut på att använda sig av dubbelsträngat RNA med komplementära sekvenser med utvalda budbärar-RNA (mRNA). När dessa två sedan interagerar inaktiveras mRNA och genuttrycket regleras (Fire *et al.* 1998). Genom denna reglering går det att studera förändring i fenotyp då olika gener tystas ned och dess funktion kan då karakteriseras. CRISPR interferens (CRISPRi) är ett liknande tillvägagångssätt som använder en version av Cas9 och som skulle kunna utmana RNAi i framtiden med genuttrycksreglering (Boettcher & McManus 2015). Det finns dock fortfarande flertalet förbättringsområden.

CRISPR-Cas9, ett biologiskt multiverktyg

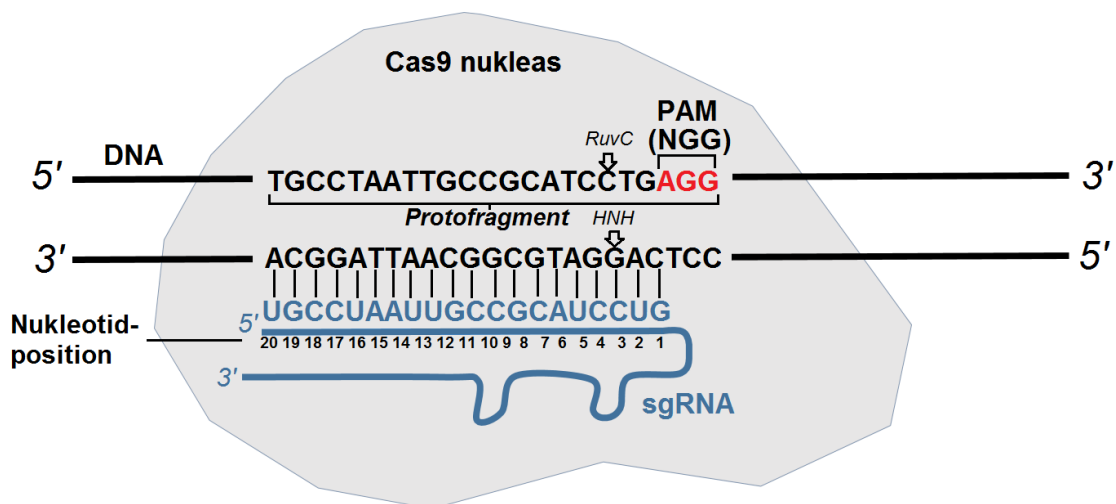
Inom biotekniken har man lyckats skapa ett enkelt guide-RNA (sgRNA) som fungerar på ett liknande sätt som tracrRNA:crRNA hybriderna (Jinek *et al.* 2012). Det som krävs för att Cas9, som ett bioteknologiskt verktyg, ska kunna klippa är inte endast sgRNA, utan den behöver även en sekvens i DNA som den kan känna igen. Dessa korta sekvenser ligger intill protofragment ("protospacer adjacent motifs", PAMs) (Mojica *et al.* 2009). När Cas9 klipper bildas ett dubbelsträngsbrott i DNA och det finns två mekanismer som sedan kan reparera detta. Det är antingen genom homolog rekombination (HDR) eller icke-homolog sammanfogning (NHEJ). NHEJ är det som sker i störst utsträckning då DNA klyvs i bägge strängar och ger i stor grad upphov till införande eller radering av baspar (insertion-deletion; indel). HDR som reparationsmekanism kan däremot utnyttjas om en punktmutation eller insättning av sekvenser vid ett specifikt ställe är önskvärt (Figur 2) (Veres *et al.* 2014). Metoden går ut på att man introducerar Cas9 i önskad cell tillsammans med ett modifierat sgRNA som har en homolog guide-sekvens (på eng. Seed sequence) med DNAt man vill klippa ut. Cas9 kommer då klippa i genomet på denna site och valfritt DNA kan då sättas in genom homolog rekombination. Genom att utnyttja homolog rekombination kan man därmed byta ut gener som ger upphov till en sjukdomsfenotyp mot gener som ger uttryck för en frisk fenotyp. Är det endast önskvärt att införa eller radera baspar (bp) för att slå ut genens funktion kan NHEJ användas. Flertalet lyckade försök med CRISPR-Cas9 har gjorts i olika organismer som bakterier, svampar, växter och djur. Detta visar att möjligheterna för Cas9 som ett verktyg att redigera gener är många och kan tillämpas inom ett flertal områden.



Figur 2. Dubbelsträngsbrott i DNA orsakat av Cas9 kan repareras genom två olika mekanismer; Icke-homolog sammanfogning (NHEJ) och homolog rekombination (HDR). NHEJ är benägen att introducera radering eller insättning av baspar vid reparation. HDR använder en DNA-mall vid reparation och kan därmed användas om insättning av en specifik sekvens är önskvärt.

CRISPR-Cas9 och dess komponenter

Cas9, sgRNA och PAM är några av de essentiella delarna som är med och bidrar till den mängd DNA som klyvs och var detta sker. Forskning kring hur dessa komponenter kan bli ännu mer specifika och effektiva pågår med det långsiktiga målet att få en mer djupgående förståelse för hur dessa komponenter fungerar och samspelar.



Figur 3. En översiktsbild över hur Cas9 kan fungera som ett verktyg för att klyva DNA på önskade ställen. Cas9 nukleas är guddat till ett protofragment i DNA med hjälp av en PAM sekvens i DNAt samt ett enkelt guide-RNA (sgRNA) som har 20 nukleotider (guide-sekvens) som är komplementära med protofragmentet. RuvC samt HNH är de strukturer i Cas9 som har nukleasaktivitet och kommer därmed att klippa DNA på dessa specifika ställen. Omritad efter Sander & Joung (2014).

Cas9 kan fungera som ett nukleas eller nickas

Genom att introducera mutationer i RuvC-domänen har man lyckats konvertera om Cas9 nukleaset till ett nickas som endast klyver en av DNA-strängarna (Cong *et al.* 2013). Detta möjliggör en användning av parade Cas9 nickas, istället för nukleas, vilket kan göra modifieringarna ännu mer specifika och minska indel-mutationer som annars hade uppkommit med nukleas. De parade nickasen blir mer specifika då det kräver att de klipper sekvenser i DNA som ligger nära varandra för att introducera dubbelsträngsbrott. Ifall ett av nickasen hade klippt en av strängarna på ett oönskat ställe krävs det därmed att ett annat nickas klipper en sekvens i den komplementära strängen i närheten av var den första hade klippt. Då detta inte kommer ske i lika hög grad, kommer färre oönskade klyvningar av bägge DNA-strängarna att genomföras då nickas används (Cho *et al.* 2014).

sgRNA - ett artificiellt RNA som kan guida Cas9

I bakteriens adaptiva immunförsvar används en hybrid av crRNA och tracrRNA för att guida Cas9 till protofragment i DNA. Slår man ihop egenskaperna hos tracrRNA och crRNA går det att bilda ett artificiellt sgRNA med liknande funktion som hos tracrRNA:crRNA hybrid. Det går därmed att enkelt guida Cas9 till önskat ställe i genomet genom att ändra guide-sekvensen i sgRNA (Jinek *et al.* 2012).

Det har även gjorts försök till förbättrade versioner av sgRNA där man använt sig av trunckerade varianter. Dessa sgRNA betecknas tru-gRNA och är normala sgRNA, men med nukleotider borttagna från guide-sekvensen i 5'-ändan. I stället för 20 nukleotider som är komplementära till det önskade klyvningsstället i DNAt, har dessa trunckerade varianter 17-18 komplementära nukleotider. Förändringarna kan minska eventuella oönskade klyvningar utan att påverka effektiviteten som uppnås med de ursprungliga sgRNA (Fu *et al.* 2014).

PAM – återkommande sekvenser i DNA som Cas9 kan känna igen

Sekvenserna som Cas9 kan känna igen och binda in till i DNA är PAMs och består av ett fåtal nukleotider. Dessa små sekvenser skiljer sig åt mellan olika CRISPR-Cas system, vissa består av tre baspar och andra av flera. Dessa korta sekvenser återfinns direkt efter eller med en nukleotids mellanrum mellan protofragment. Det har visat sig att sekvensen 5'-NGG-3' är vanligt förekommande och något som bland annat *S. pyogenes* använder sig av. Dessa tre nukleotider, där N kan vara varierande, men GG återfinns i stor utsträckning, befinner sig direkt efter det 20 nukleotider långa protofragmentet (Figur 3) (Mojica *et al.* 2009).

Geneditering med CRISPR-Cas9

Det har gjorts ett flertal studier de senaste åren där CRISPR-Cas9 har använts för att genmodifiera människoceller. Mycket av forskningen görs på mänskliga embryoniska njurceller (HEK) (Jinek *et al.* 2013, Mali *et al.* 2013, Cho *et al.* 2013), men det har även gjorts forskning på mänskliga embryon (Liang *et al.* 2015). Cas9 från *S. pyogenes* används i stor utsträckning när det kommer till modifieringar av människoceller, men på grund av dess storlek har man aktivt sökt efter mindre "versioner" av Cas9 proteinet. Det har visat sig att *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) använder sig av ett Cas9 som är mindre än det hos *S. pyogenes*. Dess lilla storlek förenklar användandet av nukleaset då det enklare kan packas in i vektorer som kan transportera Cas9 med sgRNA till de önskade cellerna. Adeno-associerade virus (AAV) är några av dessa vektorer som det går att använda för transport till celler som ska genmodifieras (Ran *et al.* 2015). Dessa AAV-vektorer är intressanta att använda då de inte är patogena, men är potenta och lätta att modifiera (Senís *et al.* 2014).

Genterapi – visar hopp, men väcker även frågor

Cystisk fibros är en sjukdom som orsakas av olika mutationer i en gen som kodar för ett stort transmembranprotein ("cystic fibrosis transmembrane conductance regulator", CFTR). Detta protein fungerar som en jonkanal med uppgift att bland annat transportera kloridjoner över membran i epitelceller. Kan denna transport inte ske leder det till sjukdomen (Cheng *et al.* 1990). Lyckade försök har genomförts där mutationer som ger upphov till ett icke-funktionellt protein byts ut mot en sekvens som kodar för ett fullt fungerande. Detta gjordes genom att introducera Cas9 med sgRNA i mänskliga stamceller (Lgr5⁺) extraherade från inälvorna hos patienter med cystisk fibros. Utbytet av en muterad CFTR till en funktionell CFTR allel genomfördes med hjälp av homolog rekombination efter att Cas9 guidats att klyva DNA vid mutationen som gav upphov till sjukdomen (Schwank *et al.* 2013).

År 2013 lyckades även Wu *et al.* (2013) att vara de första som botat en ärftlig genetisk sjukdom med hjälp av CRISPR-Cas9. De lyckades nämligen att byta ut en dominant mutation i *Crygc* genen som ger upphov till katarakt (grå starr) hos möss. För att kunna bota en genetisk sjukdom på individnivå krävs det att mutationen som ger upphov till sjukdomen är utbytt i alla celler som kan ge upphov till den. Därför injicerades zygoter med Cas9 samt sgRNA. Zygoterna de injicerade hade en dominant mutation i en av *Crygc* allelerna, i form av en 1 bp radering som resulterade i ett för tidigt stoppkodon. Då Wu *et al.* (2013) ville ersätta mutationen med en sekvens som inte gav upphov till katarakt testade de flertalet sgRNA. Detta då olika sgRNA kan inducera olika typer av mekanismer för reparation av DNA; HDR och NHEJ. Då mutationen endast var på en av allelerna kunde de använda ett sgRNA som gav upphov till HDR. Den recessiva allelen kunde därmed fungera som en mall för att ersätta sekvensen med mutationen. De kunde även se att de behandlade mössen var fertila och att även dess avkomma saknade sjukdomsgenotypen. En annan intressant upptäckt var att det går att använda en syntetiserad oligonukleotidsekvens som DNA-mall för HDR. Det är därmed möjligt att applicera denna metod i genom som har sekvenser som ger upphov till sjukdomen i bägge alleler (Wu *et al.* 2013).

En studie utförd av Liang *et al.* (2015) väckte stor uppmärksamhet då experiment utfördes på mänskliga embryon. Dessa embryon var tänkta att användas i in vitro-fertilisering, men på grund av att de hade blivit befruktade av två spermieceller används de ej. Liang *et al.* (2015) försökte, med hjälp av CRISPR-Cas9, genmodifiera β -globin genen (HBB). Avsaknad eller mutationer av HBB kan leda till att blodsjukdomen beta-thalassemi utvecklas som då ger en defekt produktion av hemoglobin hos den drabbade (Wong *et al.* 1987). Efter att ha sekvenserat alla proteinkodande gener i genomet (på eng. exome sequencing) kunde forskningsgruppen dra slutsatsen att flertalet oönskade mutationer hade uppkommit, samt att endast ett fåtal (14,3 %) av de mutationer de eftersträvade hade genomförts korrekt genom HDR, men att DNA segmenten hade ett mosaikliknande mönster där rätt fragment var insatt, men i fel ordning (Liang *et al.* 2015).

Det finns även andra medicinska fördelar

Geneditering kan även göras i andra organismer i syftet att minska riskerna med transplantationer från djur till människa (xenotransplantationer) (Yang *et al.* 2015). Ett viktigt djur som har organ med liknande utseende och funktion som våra egna är grisens. Det finns dock ett problem med att använda sig av dessa organ då de har endogena retrovirus från grisar (PERVs) som skulle kunna föras över till mänskliga celler (Lee *et al.* 2011). Genom att studera epitelceller från grislure (PK15) kunde 62 stycken PERVs hittas (Yang *et al.* 2015). Retrovirusen har en gen (*pol*) som kodar för ett omvänt transkriptas som är essentiellt för virusets infektions- och replikationsförmåga. Genom att använda CRISPR-Cas9 gick det att

klyva samtliga 62 PERVs simultant i respektive *pol*. Då transplantationerna är tänkta för människor ville de sedan se om de modifierade PK15 cellerna minskade virusets förmåga att infektera HEK celler. Det visade sig då att de celler som hade blivit modifierade med CRISPR-Cas9 överförde 1000-faldigt mindre virus till de mänskliga cellerna än de som inte hade genmodifierats (Yang *et al.* 2015).

Det mänskliga genomet är till stor del känt tack vare ”Human Genome Project” (Consortium 2004). Med den informationen kan sedan olika mänskliga geners funktion fastställas. För att ta reda på geners roll och funktion går det att slå ut generna ifråga genom att införa eller radera baspar som förändrar proteinets funktion. Det går även att reglera genuttrycket hos specifika gener för att sedan studera effekterna. Genom att skapa bibliotek av sgRNA går det att slå ut gener på ett enkelt och effektivt sätt. Tillämpas det sedan i cancerceller går det att ta reda på vilka gener som är vitala för cellens överlevnad och delning (Shalem *et al.* 2014, Wang T *et al.* 2014). Denna metod underlättar därmed sökandet efter vilka faktorer som orsakar cancer och eventuella tillvägagångssätt för att kunna reglera dessa.

Selektiv märkning av genomet och reglering av genuttryck

CRISPR-Cas9 är mer än ett verktyg som kan klippa gener på specifika ställen. Det går nämligen att använda ett modifierat Cas9 som saknar endonukleasaktivitet, även kallat katalytiskt dött Cas9 (dCas9). Denna modifiering görs genom att införa mutationer i HNH- och RuvC-domänerna som annars har nukleasaktivitet. Genom att sedan guida dCas9 med RNA till gener kan dessa tystas ned genom att blockera transkriptionen. Det visade sig vara ett effektivt tillvägagångssätt i bakterier, men det visade sig däremot inte ha lika hög effekt i celler från däggdjur. Metoden där dCas9 används för att reglera genuttryck kallas CRISPR interferens (CRISPRi) (Qi *et al.* 2013a). Fusering av andra proteiner till det inaktiverade nukleaset är möjligt och kan även det användas till att reglera genuttryck. Genom att koppla en transkriptionshämmare till dCas9 går det att tysta gener genom specifik bindning till DNA i människoceller. Istället för att dCas9 fungerar genom att blockera transkriptionen steriskt, använder sig denna variant av ett annat protein som interagerar med transkriptionsfaktorer. På liknande sätt går det att aktivera transkription av gener då transkriptionshämmaren byts ut mot transkriptionsaktiverare. Detta leder då till ett högre uttryck av önskad gen. På ett sådant sätt går det därmed att använda versioner av dCas9 till att påverka och förändra genuttrycket i människoceller (Gilbert *et al.* 2013). Det har även visat sig att dessa går att inducera och att de är reversibla (Qi *et al.* 2013a).

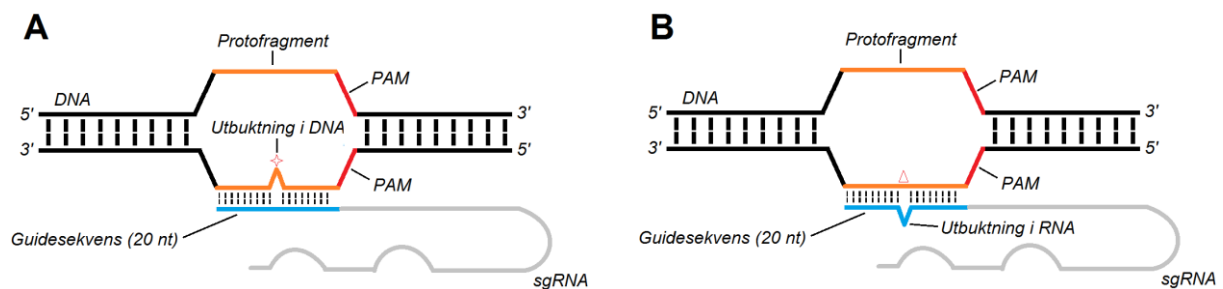
Det går även att använda dCas9 till att märka in utvalda sekvenser genom att fästa ett fluorescerande protein till dCas9 och tillsammans med ett sgRNA guidas till utvalt ställe. I och med detta går det att märka in sekvenser genom att använda olika fluorescerande markörer (Chen *et al.* 2013).

Oönskad klyvning och dess effekter

Att det går att klippa DNA på specifika ställen är en sak, men att sedan undersöka om det endast binder in och klipper på det stället är en faktor som är minst lika viktig att ta reda på. Därför har det gjorts ett flertal studier som undersöker om CRISPR-Cas9 även är benäget att binda och klippa på oönskade ställen som har liknande DNA sekvenser som det önskade klyvningsstället (Fu *et al.* 2013, Pattanayak *et al.* 2013, Cho *et al.* 2014, Lin *et al.* 2014, Veres *et al.* 2014, Wang X *et al.* 2015). Vetskap om eventuella brister i ett system gör att nya metoder kan utvecklas som gör det mer exakt och effektivt.

I en studie som genomfördes 2013 konstaterades att koncentrationen av sgRNA-Cas9 komplex och att mängden sgRNA har en betydande roll för klyvningen (Pattanayak *et al.* 2013). När det uttrycks sgRNA och Cas9 i stor mängd kan det därmed bli en större risk att den klipper på andra ställen än vad som önskas. Det finns även en koppling mellan koncentration av sgRNA och hur mycket DNA som klyvs. Vid mer sgRNA klyvs DNA i högre grad, både vid den önskade siten och på oönskade siter. Vid lägre koncentrationer klyvs dock DNA till högre del vid önskade ställen än oönskade (Pattanayak *et al.* 2013).

Oönskade mutationer har även uppkommit då det funnits liknande sekvenser i genomet som målsekvensen fast med ett baspars skillnad (Cho *et al.* 2014). Det har även visat sig att klyvningar fortfarande kan uppkomma med hjälp av samma sgRNA efter ett införande eller radering av baspar gjorts i den önskade DNA sekvensen (protofragmentet). Detta då antingen DNA eller sgRNA bildar sekundära strukturer i form av utbuktningar och då fortfarande klyver på samma ställe. Utbuktningarna leder till att sgRNA och protofragment fortfarande kan baspara med varandra och oönskad klyvning kan då ske. Då en radering av ett baspar i DNA gjordes bildades dessa sekundära strukturer i sgRNA vilket gjorde att den fortfarande kunde baspara. När en insättning av ett baspar gjordes i DNA bildades utbuktningarna i DNAt (Figur 4) (Lin *et al.* 2014). Detta visar att Cas9-komplexet kan binda in och klyva andra sekvenser än den site som är önskad genom att bilda sekundära strukturer i antingen sgRNA eller DNA.



Figur 4. Oönskade klyvningar av DNA kan ske då DNA eller sgRNA bildar sekundära strukturer och därmed möjliggör basparning mellan dessa två. (A) En insättning av en nukleotid i protofragment kan ge upphov till en utbuktning i DNA vilket leder till att sgRNA fortfarande kan binda in. (B) En radering av en nukleotid i protofragment kan ge upphov till en utbuktning i sgRNA och kan då fortfarande baspara med DNAt. Omritad efter Lin *et al.* (2014).

I sekvenser där två baspar hade bytts ut kunde dock inte liknande grad av oönskad klyvning ses i en studie (Cho *et al.* 2014), dock har en annan studie gjorts där de fann att Cas9 hade klyvt ställen där flera baspar mellan DNA och sgRNA inte hade matchat med varandra (Wang X *et al.* 2015). Antalet oönskade klyvningar skiljer sig åt i studierna och detta kan bero på att olika genom har olika sekvenser och det kommer därför att finnas andra sekvenser där DNAt kan klyvas. Det kan även vara beroende av vilka protofragment man väljer som målsekvenser för klyvningen (Lin *et al.* 2014). Systemet blir ännu mer specifikt om Cas9 nickas används på grund av att det då behövs två stycken specifika och aktiva sgRNA (Cho *et al.* 2014). Andra modifieringar har även gjorts av Cas9 för att minska oönskad klyvning. En av dessa gjordes genom att fusera FokI till dCas9. Detta innebär att dCas9 fungerar som ett protein som endast binder till DNA och inte har någon endonukleasaktivitet. FokI är ett restriktionsenzym som kan klyva DNA och som tidigare fuserats ihop med bland annat TALEs samt zinkfingerproteiner som nämnts tidigare. Då dCas9 sätts samman med FokI behövs två av dessa komplex för att tillsammans kunna klyva varsin DNA-sträng. Denna teknik har visat sig ha ökat precisionen av klyvning i jämförelse mot Cas9, men har liknande aktivitet som parade Cas9 nickas (Guilinger *et al.* 2014).

Diskussion

Forskning om CRISPR-Cas9 som ett bioteknologiskt verktyg har inte pågått i mer än fyra år och är därmed i utvecklingsstadiet. Det är därför extra viktigt att ha en kritisk inställning till studier som berör detta ämne och till resultat som presenteras i artiklar. Då det är ett nytt och intressant forskningsfält publiceras nya studier i en rask takt och verktyget förbättras löpande genom att bli mer specifikt och effektivt i de olika användningsområdena.

Efter upptäckten av endonukleaset Cas9 gjordes studier där resultaten tydde på att det gick att guida detta protein till specifika DNA-sekvenser för att utföra dubbelsträngsbrott (Jinek *et al.* 2012, Cong *et al.* 2013, Mali *et al.* 2013). Det hade tidigare gjorts med hjälp av TALENs och ZFNs (Kim *et al.* 1996, Moscou & Bogdanove 2009, Christian *et al.* 2010). För att kunna inducera specifik dubbelsträngsklyvning av DNA med hjälp av TALENs och ZFNs behöver man dock ändra proteinet för att det ska kunna guidas till en ny sekvens. Detta kräver att ett nytt protein designas och syntetiseras för varje gång ett nytt ställe i DNA ska redigeras, vilket kan vara tidskrävande och inte särskilt kostnadseffektivt (Kim *et al.* 1996, Christian *et al.* 2010). Det som gör CRISPR-Cas9 bra i jämförelse med dessa två är att det enda som behöver syntetiseras är ett sgRNA. Det går därför att enkelt ändra i RNA-sekvensen och på ett sådant sätt guida Cas9 till ett helt annat ställe (Jinek *et al.* 2012). Det går även att introducera flertalet sgRNA simultant för klyvning på olika ställen i genomet. Forskningsresultat som visade att Cas9 kunde fungera som ett endonukleas guidat av RNA gav sedan upphov till ett flertal nya studier som visade att det kan finnas hinder med detta tillvägagångssätt då klyvningen av DNA även kan ske på oönskade ställen, vilket skulle kunna ha förödande effekter om denna teknik skulle appliceras på människor (Fu *et al.* 2013, Pattanayak *et al.* 2013, Cho *et al.* 2014, Lin *et al.* 2014, Veres *et al.* 2014, Wang X *et al.* 2015). Då Liang *et al.* (2015) gjorde kliniska studier på mänskliga embryon väckte det debatt i forskarvärlden, och i samhället i övrigt, för vad som är acceptabelt och vad som inte är det när det kommer till geneditering i mänskliga celler (Reardon 2015). Detta är viktiga frågor som hela tiden behöver ställas och diskuteras för att rättfärdiga forskningen (Se etikbilaga). Eftersom att tekniken går fort fram är det därför viktigt att de etiska perspektiven inte glöms bort eller inte hinner utvärderas innan forskningen tillämpas i praktiken.

Mediciner för en mängd olika sjukdomar finns, men det saknas fortfarande bra metoder för att behandla genetiska sjukdomar som bland annat cystisk fibros, thalassemi och sicklecellanemi. Det är även svårt att ta reda på alla geners funktioner och hur de samspelar med varandra för att ge upphov till olika sjukdomar. I och med detta är det av stor vikt att lösningar och nya metoder utvecklas som kan bemöta dessa problem. Forskning inom genterapi ser ut att bli ett allt större fält med goda potentialer att kunna skapa förutsättningar för framtidens behandling av genetiska sjukdomar. Möjligheten att kunna skapa specifika modifieringar och förmågan att reglera genuttryck i människoceller är några av grundstenarna inom genterapi och det är inom dessa områden som mycket av forskningen är fokuserad kring då det kan leda till nya behandlingsmetoder för genetiska sjukdomar. Andra användningsområden visar även en god potential med användandet av dCas9 för att reglera genuttryck och för att märka in sekvenser i genom (Qi *et al.* 2013b, Gilbert *et al.* 2013, Chen *et al.* 2013).

Framtidens utmaningar

Utmaningarna för framtiden är många innan det går att använda CRISPR-Cas9 som ett RNA-guidat endonukleas för att genmodifiera människoceller i syftet att bota genetiska sjukdomar. De oönskade klyvningarna är många och behöver studeras ännu närmare. Sekvensering av hela genom behöver göras efter att klyvning skett med hjälp av CRISPR-Cas9, istället för att endast sekvensera proteinkodande regioner för att få en fullständig bild över alla eventuella

oönskade klyvningar. Detta för att få en utökad förståelse över de oönskade effekterna. Ny design av sgRNA och Cas9 är även något som skulle kunna minska de negativa effekterna, som det redan gjorts med bland annat tru-gRNA och omvandlingen av Cas9 från ett nukleas till ett nickas (Cong *et al.* 2013, Fu *et al.* 2014). För att bli ännu mer effektivt gäller det att hitta vektorer som på ett säkert och smidigt sätt kan introducera Cas9 och sgRNA till de önskade cellerna. Cas9 är även beroende av PAMs vilket begränsar antalet ställen där DNA-strängen kan klyvas (Mojica *et al.* 2009). Genom att utveckla en metod för att komma runt detta hade det därmed gjort Cas9 effektivare. Då det görs försök till att hitta ortologa protein till Cas9 i andra värdorganismer skulle nya versioner av Cas9 kunna bredda antalet sekvenser som går att klyva (Ran *et al.* 2015). Detta då olika versioner av proteinet eventuellt använder sig av olika PAM sekvenser för att mediera bindning till DNA. Framtiden för användandet av CRISPR-Cas9 inom genterapi ser ljus ut då det finns många användningsområden som detta system kan tillämpas inom. Det finns dock även nackdelar som oönskad klyvning, men nya studier genomförs där utvecklande av metoder samt modifieringar av protein och RNA görs för att CRISPR-Cas9 ska bli mer specifikt och effektivt (Cong *et al.* 2013, Fu *et al.* 2014, Guilinger *et al.* 2014).

Tack

Anna Rosling, Magnus Eklund, Oskar Bergman, Tobias Grylling och Anghella Lambruschini Falcon för granskning samt återkoppling av texten.

Referenser

- Boettcher M, McManus MT. 2015. Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Mol Cell* 58: 575–585.
- Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, Zhang W, Li G-W, Park J, Blackburn EH, Weissman JS, Qi LS, Huang B. 2013. Dynamic Imaging of Genomic Loci in Living Human Cells by an Optimized CRISPR/Cas System. *Cell* 155: 1479–1491.
- Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O’Riordan CR, Smith AE. 1990. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63: 827–834.
- Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim J-S. 2013. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* 31: 230–232.
- Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, Kim J-S. 2014. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res* 24: 132–141.
- Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF. 2010. Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. *Genetics* 186: 757–761.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. 2013. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* 339: 819–823.
- Consortium IHGS. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931–945.

- Dalgaard JZ, Klar AJ, Moser MJ, Holley WR, Chatterjee A, Mian IS. 1997. Statistical modeling and analysis of the LAGLIDADG family of site-specific endonucleases and identification of an intein that encodes a site-specific endonuclease of the HNH family. *Nucleic Acids Res* 25: 4626–4638.
- Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471: 602–607.
- Ding Q, Regan SN, Xia Y, Ostrom LA, Cowan CA, Musunuru K. 2013. Enhanced Efficiency of Human Pluripotent Stem Cell Genome Editing through Replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell* 12: 393–394.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–811.
- Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. 2013. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 31: 822–826.
- Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK. 2014. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol* 32: 279–284.
- Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead EH, Doudna JA, Lim WA, Weissman JS, Qi LS. 2013. CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell* 154: 442–451.
- Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. 2014. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol* 32: 577–582.
- Iwasaki H, Takahagi M, Shiba T, Nakata A, Shinagawa H. 1991. *Escherichia coli* RuvC protein is an endonuclease that resolves the Holliday structure. *EMBO J* 10: 4381–4389.
- Jansen R, Embden JDA van, Gaastra W, Schouls LM. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 43: 1565–1575.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337: 816–821.
- Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife* 2: e00471.
- Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci* 93: 1156–1160.
- Lee D, Lee J, Yoon J-K, Kim NY, Kim G-W, Park C, Oh Y-K, Kim YB. 2011. Rapid Determination of Perv Copy Number From Porcine Genomic DNA by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Anim Biotechnol* 22: 175–180.
- Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, Lv J, Xie X, Chen Y, Li Y, Sun Y, Bai Y, Songyang Z, Ma W, Zhou C, Huang J. 2015. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triprenuclear zygotes. *Protein Cell* 6: 363–372.
- Lin Y, Cradick TJ, Brown MT, Deshmukh H, Ranjan P, Sarode N, Wile BM, Vertino PM, Stewart FJ, Bao G. 2014. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res* 42: 7473–7485.

- Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. 2006. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action | *Biology Direct* | Full Text. *Biol Direct*, doi 10.1186/1745-6150-1-7.
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. 2013. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science* 339: 823–826.
- Mojica FJM, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Almendros C. 2009. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* 155: 733–740.
- Moscou MJ, Bogdanove AJ. 2009. A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science* 326: 1501–1501.
- Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, Ma E, Doudna JA, Liu DR. 2013. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol* 31: 839–843.
- Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. 2013a. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell* 152: 1173–1183.
- Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. 2013b. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell* 152: 1173–1183.
- Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu X, Makarova KS, Koonin EV, Sharp PA, Zhang F. 2015. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* 520: 186–191.
- Reardon S. 2015. Gene-editing summit supports some research in human embryos. *Nature*, doi 10.1038/nature.2015.18947.
- Sander JD, Joung JK. 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* 32: 347–355.
- Schwank G, Koo B-K, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, Sasaki N, Boymans S, Cuppen E, van der Ent CK, Nieuwenhuis EES, Beekman JM, Clevers H. 2013. Functional Repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in Intestinal Stem Cell Organoids of Cystic Fibrosis Patients. *Cell Stem Cell* 13: 653–658.
- Senis E, Fatouros C, Große S, Wiedtke E, Niopek D, Mueller A-K, Börner K, Grimm D. 2014. CRISPR/Cas9-mediated genome engineering: An adeno-associated viral (AAV) vector toolbox. *Biotechnol J* 9: 1402–1412.
- Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F. 2014. Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. *Science* 343: 84–87.
- van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B. 2014. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 12: 479–492.
- Veres A, Gosis BS, Ding Q, Collins R, Ragavendran A, Brand H, Erdin S, Cowan CA, Talkowski ME, Musunuru K. 2014. Low Incidence of Off-Target Mutations in Individual CRISPR-Cas9 and TALEN Targeted Human Stem Cell Clones Detected by Whole-Genome Sequencing. *Cell Stem Cell* 15: 27–30.

- Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. 2014. Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR-Cas9 System. *Science* 343: 80–84.
- Wang X, Wang Y, Wu X, Wang J, Wang Y, Qiu Z, Chang T, Huang H, Lin R-J, Yee J-K. 2015. Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors. *Nat Biotechnol* 33: 175–178.
- Wong C, Dowling CE, Saiki RK, Higuchi RG, Erlich HA, Kazazian HH. 1987. Characterization of β -thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature* 330: 384–386.
- Wu Y, Liang D, Wang Y, Bai M, Tang W, Bao S, Yan Z, Li D, Li J. 2013. Correction of a Genetic Disease in Mouse via Use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell* 13: 659–662.
- Yang L, Güell M, Niu D, George H, Lesha E, Grishin D, Aach J, Shrock E, Xu W, Poci J, Cortazio R, Wilkinson RA, Fishman JA, Church G. 2015. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science* 350: 1101–1104.

Hur kan CRISPR-Cas9 användas inom genterapi?: etisk bilaga

Adrian Silberman

Självständigt arbete i biologi 2015

Är det okej att genmodifiera människor?

Genterapi har den senaste tiden utvecklats till ett allt större forskningsfält då tekniker för genmanipulering har blivit enklare och billigare. En av dessa är CRISPR-Cas9 som är ett RNA-guidat endonukleas och upptäcktes för bara fyra år sedan (Jinek *et al.* 2012). Det finns dock etiska perspektiv som är viktiga att diskutera för att kunna rättfärdiga forskningen. Är det till exempel försvarbart att använda dessa tekniker för att genmodifiera mänskliga embryon eller borde det förbjudas?

Ett hett ämne som väcker debatt

”International Summit on Human Gene Editing” var ett toppmöte som tillkallades efter att flertalet forskare ville få klarhet i hur tekniker som CRISPR-Cas9 får användas för att förändra mänskliga gener. Mötet ägde rum under tre dagar (1-3 dec, 2015) och beslutet som slutligen fattades var att genmodifiering på mänskliga embryon är etiskt försvarbart om embryona inte är tänkta att användas för fertilisering. En genomgående rapport kommer även att skrivas av mötets deltagare där en sammanställning av forskningsfältet kommer göras (Reardon 2015).

Borde det vara tillåtet eller ska det förbjudas?

Det finns både fördelar och nackdelar med att genmodifiera mänskliga embryon. En av dessa fördelar är att det för forskningen framåt. En ökad kunskap om teknikens applicerbarhet kan då fås. I dagsläget pågår en hel del forskning på mänskliga embryoniska njurceller för att kunna förstå tekniken samt de oönskade effekterna (Fu *et al.* 2013, Pattanayak *et al.* 2013, Lin *et al.* 2014, Wang *et al.* 2015). Dock kan dessa effekter skilja sig åt i embryon. Det kan därför vara av stor vikt att göra studierna i embryon från början. Nackdelarna är dock att det skulle kunna leda till att forskningsgrupper bestämmer sig för att använda tekniken till att modifiera embryon och sedan använda dessa för fertilisering. Detta skulle kunna leda till förödande konsekvenser om oönskade effekter skulle ses, då generna sedan skulle föras vidare till generationen efter. Att införa ett förbud mot denna forskning tror jag inte är rätt väg att gå då vi hade gått miste om potentiella framsteg inom området. Det hade därmed gjort det svårare att hitta behandlingar till genetiska sjukdomar. Jag tycker dock att det kan vara för tidigt att applicera CRISPR-Cas9 i mänskliga embryon tillsvidare innan fler studier har gjorts på oönskade effekter.

Forskningsetik

Jag tycker att jag har använt mig av tillförlitliga primärartiklar i min uppsats. Jag tycker även att jag har redovisat informationen på ett öppet sätt för att främja ett nyanserat arbete. Uppsatsen och mina egna argument har varit väl underbyggda med löpande hänvisningar i texten.

Referenser

Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. 2013. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 31: 822–826.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337: 816–821.

Lin Y, Cradick TJ, Brown MT, Deshmukh H, Ranjan P, Sarode N, Wile BM, Vertino PM, Stewart FJ, Bao G. 2014. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res* 42: 7473–7485.

Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, Ma E, Doudna JA, Liu DR. 2013. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol* 31: 839–843.

Reardon S. 2015. Gene-editing summit supports some research in human embryos. *Nature*, doi 10.1038/nature.2015.18947.

Wang X, Wang Y, Wu X, Wang J, Wang Y, Qiu Z, Chang T, Huang H, Lin R-J, Yee J-K. 2015. Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors. *Nat Biotechnol* 33: 175–178.