



UPPSALA
UNIVERSITET

CRISPR/Cas9- Ett revolutionerande system för biotekniken

Linn Syding

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2016
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

CRISPR/Cas9- Ett revolutionerande system för biotekniken

Linn Syding

Självständigt arbete i biologi 2016

Sammandrag

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) är en del av bakteriers och arkéers immunförsvar mot virus och invasiva plasmider. Delar av virusets genom eller plasmidens, tas upp och integreras i bakteriens/arkéens genom med lokalisering mellan korta palindromsekvenser. Utöver detta finns det gener intill dessa CRISPR-regioner som kodar för DNA-klyvande proteiner som kallas för Cas. Nästa gång bakterien eller arkéen blir attackerade av samma sorts virus, känns dess DNA-sekvens igen via basparning mellan de lagrade DNA-sekvenserna i CRISPR-regionerna och virusets genom. Vid en sådan hybridisering klyver sedan Cas-proteinet DNA-strängen. Denna metod har lånats från bakterier och arkéer för användning inom biotekniken för en mängd olika applikationer och verkar fungera på alla kända organismer. Tekniken används för att utföra genetiska manipulationer. Man har visat att CRISPR/Cas9 kan klippa sönder antibiotikaresistensgener hos bakterier och på så sätt göra dem mer känsliga för antibiotika. Tekniken har också visat att det går att inducera avbrott på gener inom bakteriers kromosomer och på så sätt selektivt avdöda en sorts bakterier i ett heterogent samhälle. Detta gör tekniken till ett lovande alternativ inom antimikrobbehandling men den behöver utvecklas ytterligare för att komma ifrån mutationsrisken hos bakterier, det vill säga att bakterierna muteras och på så sätt inte kan målsättas. Tekniken har dessutom bevisat att den kan användas för att föra in förändringar i gener i eukromatinet och heterokromatinet hos modellorganismer och har också visat sig fungera för att förändra gener i mänskliga celler. Eftersom effektiv modifiering av genomet är en förutsättning för xenotransplantationer mellan icke-mänskliga djur och människor, kan CRISPR/Cas9 således även vara användbart inom detta område.

Inledning

Vi lever i en tid då ny teknologi utvecklas i rasande fart och behovet av utveckling ökar i takt med att vi människor ökar i antal och lever längre liv. Vi lider stor brist på tillgängliga organ för transplantation och problem med mutationer i gener som orsakar sjukdomar. Ett annat brådskande hot är multiresistenta bakterier som inte längre svarar på klassisk antibiotika och utan nya tekniker kan en idag behandlingsbar infektion bli livshotande. En banbrytande teknologi som har börjat uppvisa potential för att angripa de ovannämnda problemen är CRISPR/Cas9 systemet. CRISPR är en förkortning på "Clustered regularly interspaced short palindromic repeats" och Cas9 är ett dubbelsträngat endonukleas som är associerat till CRISPR. Det finns flera olika varianter av CRISPR/Cas i naturen men generellt är CRISPR loci ungefär det namnet antyder; palindromsekvenser som är regelbundet åtskilda av sekvenser som inte är palindromer, så kallade "spacers" och i den här uppsatsen kommer de att bli refererade till som avståndssekvenser. Dessa loci finns i genomet som sedan transkriberas, hos ungefär 46 % av alla bakterier och i nästan 90 % av arkéer. (Barrangou *et al.* 2013). Inom biotekniken går det att utnyttja egenskaperna hos det här systemet. Man kan till exempel syntetisera CRISPR-RNA (crRNA) specifikt för en målsekvens som man vill bryta ned med hjälp av cas9, och sedan artificiellt återskapa sekvensen för att leverera till den cell man vill åt. Olika leveranssätt finns men en av de genomgående är leverans genom injektion.

Antibiotikaresistens är ett verkligt problem eftersom allt fler bakterier inte svarar på behandling längre och detta kräver nya tankesätt för att hantera infektioner. Ett alternativ är

CRISPR/Cas9 som kan klippa i bakteriers antibiotikaresistensgener och på så sätt återinföra känslighet för antibiotika. Ett annat sätt att angripa problematiken skulle kunna vara att direkt klippa i gener som är livsviktiga för bakterien och på så sätt döda specifika bakterier i en heterogen population. Ett annat intressant sätt att tillämpa CRISPR/Cas9 systemet är att använda det för genomredigeringar eftersom detta är en förutsättning för att kunna använda organ från icke-mänskliga djur för transplantation till människor, så kallade xenotransplantationer.

Syfte

I den här uppsatsen beskrivs hur CRISPR/Cas9 systemet kan användas inom två valda områden. Uppsatsen kommer att behandla hur tekniken kan användas för att slå ut antibiotikaresistensgener hos bakterier och på så sätt fungera som ett komplement till klassisk antibiotikabehandling. Tekniken kan dessutom tillämpas för att direkt döda bakterier vilket är ett annat sätt att motverka svårbehandlade infektioner utan att överhuvudtaget behöva använda antibiotika. Dessutom kommer det att beskrivas hur CRISPR/Cas9 kan användas för genomredigering för att producera organ. Först beskrivs experiment på modellorganismer för att sedan beskriva genomredigering i djurceller och i mänskliga celler. Genomredigering kopplas därefter samman med lovande applikation inom fältet xenotransplantationer. Syftet är således att utforska ifall CRISPR/Cas9 skulle kunna vara ett framgångsrikt verktyg inom ovannämnda områden.

En teknik tagen från bakteriens immunologi

För att förstå hur CRISPR/Cas9 kan användas inom olika områden är det viktigt att gå igenom hur det är uppbyggt och dess generella mekanism. CRISPR/Cas9 teknologin är lånad från bakterier och arkéer som använder det för att skydda sig mot fager (Barrangou *et al.* 2013). Bakterier och arkéer har som bekant inte ett immunförsvar som påminner om immunsystem som återfinns hos djur men deras immunförsvar har visat sig vara väldigt specifikt. Orsaken till specificiteten återfinns i avståndssekvenserna. Avståndssekvenserna härrör från invasiva element såsom virus eller plasmider och integreras in mellan palindromsekvenserna som ofta är runt 20 nukleotider långa (Bikard *et al.* 2014). När bakterien eller arkéen blir utsatt för angrepp av ett virus sparas en del av virusets arvsmassa och ger på så sätt immunitet nästa gång en liknande angripare försöker sig på att infektera värden. Associerat till CRISPR loci finns Cas-gener som kodar för uttryck av en viss typ av aktiva proteiner. Cas-proteinerna inducerar ett dubbelsträngat eller enkelsträngat avbrott på målsekvensens DNA när avståndssekvenser är komplementärt till ett mål-RNA och på så sätt elimineras dessa invasiva element. CRISPR RNA (crRNA) binder till målsekvenserna genom Watson/Crick basparning mellan komplementära nukleotider.

CRISPR/Cas kommer i olika typer

Det finns olika CRISPR/Cas system, men generellt fungerar alla på liknande sätt genom ett tre-stegssystem, nämligen:

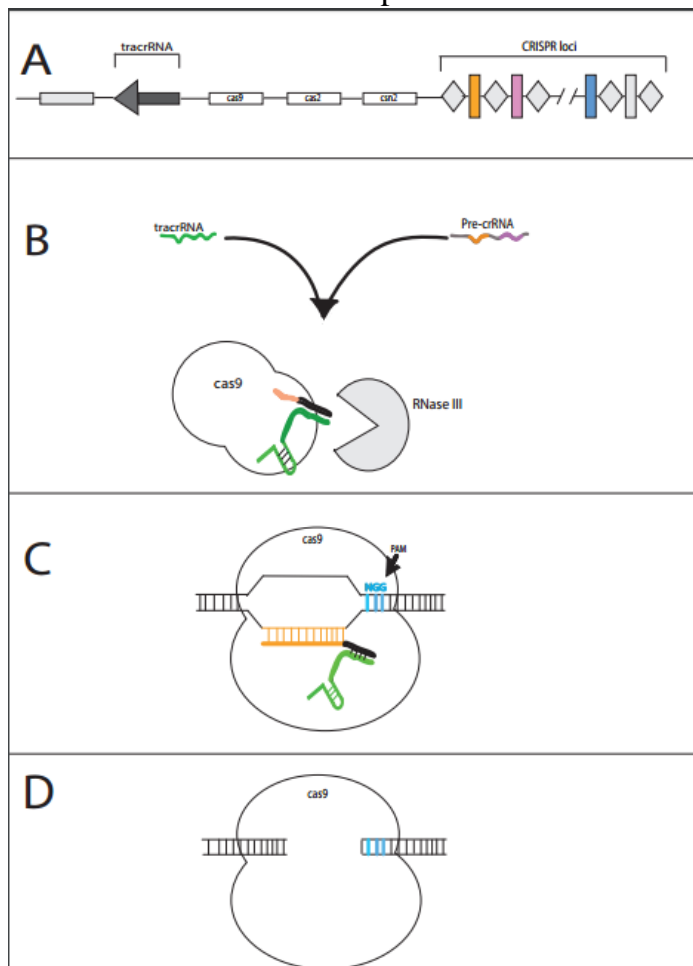
- i) *Adaption* - nya avståndssekvenser integreras in i CRISPR loci.
- ii) *Uttryck* - CRISPR loci transcriberas till RNA och genomgår sedan modifiering till moget crRNA.
- iii) *Interferens* - crRNA vägleder Cas-proteiner till komplementära nukleotidsekvenser som då klyvs av Cas-proteinet.

Skillnaden mellan de olika varianterna av CRISPR/Cas systemen utgår från användandet av att olika slags Cas-proteiner som klyver på olika sätt. Det är viktigt att förstå är att CRISPR loci varierar mycket inom organismen och mellan organismer. Antal avståndssekvenser och antal palindrom skiljer sig åt och är dessutom inte statiska, utan kan bytas ut och läggas till

efter behov, till exempel beroende på om en viss angripare finns i närmiljön (Barrangou *et al.* 2013).

I vissa CRISPR/Cas-typer, bland annat de som utnyttjar Cas9 som protein, måste en protospacer adjacent motif (PAM) finnas intill målsekvensen för att Cas9 ska klippa DNA fragmentet. Detta system skyddar Cas9 från att klippa i värdens eget CRISPR loci. En PAM är en sekvens som finns bredvid målsekvensen. PAM-sekvenser finns i alla genom då PAM är NGG, där N står för vilken godtycklig nukleotid som helst och G är guanin och eftersom det är en chans på $1/4 * 1/4 = 1/16$ att två G står bredvid varandra är det som väntat väldigt vanligt med PAM-sekvenser i arvsmassan. Specificiteten kommer därför uteslutande från avståndssekvensen. De olika komponenterna som behövs för CRISPR/Cas9 är följande: i) Cas9 som dessutom fungerar som ett helikas och scannar DNA-strängen hos målorganismen tills en PAM med tillhörande matchande sekvens hittas. ii) crRNA som basparar till målet. iii) tracrRNA (som transkriberas från CRISPR loci och behövs för mognaden hos crRNA samt kopplar Cas9 till målet) och PAM.

När proteinet, crRNA och tracrRNA kommer in i målorganismen kommer crRNA att klyvas av värdens RnasIII, ett vanligt endonukleas, som då klipper upp crRNA från plasmiden och crRNA, tracrRNA och Cas9 bildar komplex (Barrangou *et al.* 2013). För att få en klarare bild av hur de olika komponenterna ser ut och verkar se figur 1.



Figur 1. Schematisk bild över CRISPR/Cas9. (A) CRISPR loci tillsammans med proteinkodande delar för cas och tracrRNA. I CRISPR loci symboliserar ruterformerna palindromsekvenserna som blir separerade av avståndssekvenser. (B) CRISPR och tracrRNA blir transkriberade, vilket resulterar i ett pre-crRNA och i ett tracrRNA. (C) pre-crRNA och tracrRNA bildar komplex som sedan blir modifierat av cas9 och av RnasIII. (D) Cas9, crRNA och tracrRNA-komplexet binder till den komplementära sekvensen i måldNA-strängen där PAM (NGG) finns bredvid. (E) När det basparat inducerar Cas9 ett dubbelsträngat avbrott på måldNA-strängen, vilket genererar två ändar (Lander 2016).

CRISPR/Cas9- ett nytt redskap inom biotekniken

Trots att CRISPR/Cas9-systemet som molekylärbiologiskt redskap bara är några år gammalt finns det redan en betydande mängd forskning på detta område. CRISPR-systemen, i bemärkelsen att vara en del av bakteriers/arkéers immunologi, har varit känt redan sedan 90-talet (Lander 2016). Det var dock först 2010 som den första artikeln, publicerad av Emanuelle Charpentier, dök upp. Hon hade då hittat interaktionen mellan tracrRNA och crRNA vilket gör detta system enkelt att jobba med. Hon insåg innebörden av vad hon hade hittat och inledde ett samarbete med Jennifer Doudna, för att vidare utforska hur systemet kan appliceras inom genterapi (Abbott 2016).

Problematiken inom antibiotikaresistensen

Efter att Alexander Fleming upptäckte penicillinet har människans hälsa och livslängd förbättrats dramatiskt. Från att tidigare ha kunnat dö av relativt enkla infektioner har vi efter antibiotikans intåg kunnat kurerat svåra infektioner och väsentligt ökat överlevandegraden i den mänskliga populationen. Efter penicillinets upptäckt har en mängd alternativa antibiotika identifierats och utforskats, varav många utnyttjar andra typer av molekylära och cellulära mekanismer. Några av dessa mekanismer verkar genom att påverka bakteriens ämnesomsättning, proteinsyntes, cellväggsyntes eller cellmembranfunktion (Blair *et al.* 2015). Vid ökad användning av antibiotika har bakterierna utvecklat försvar mot dessa föreningar och många av dess resistensmekanismer har visat sig vara horisontellt överförbara genom överföring av antibiotikaresistensgener på plasmider.

Antibiotikaresistens och CRISPR/Cas9

Hos bakterier och arkéer finns, som nämnts ovan, CRISPR loci med tillhörande Cas-gener naturligt som en del av deras immunsystem. Hos flercelliga eukaryoter förekommer inte detta och för att användas av oss behöver generna först syntetiseras för att sedan introduceras i målorganismen. Detta gäller också i de fall där målorganismen i sig är en bakterie och att man t.ex. vill inducera ett avbrott på bakteriens plasmid eller ändra i organismens arvsmassa.

I ett experiment har forskarna använt sig av CRISPR/cas9 tekniken för att neutralisera ”extended-spectrum beta-laktamases” (ESBL) producerande bakterier (Kim *et al.* 2016). Beta-laktamas är ett enzym som detoxifierar beta-laktamaser som är den aktiva molekylen i många antibiotika. Beta-laktamas förhindrar cellväggsyntesen hos bakterier genom att störa peptidoglykansyntesen. ESBL-gener sitter på plasmid DNA-strängen och överförs därför lätt bakterier i mellan. ESBL-gener bär på många olika punktmutationer vilket gör dem ännu svårare att behandla eller att utveckla nya antibiotika för dem. Punktmutationer kan göra det möjligt att förändringar sker i genuttryck vilket då påverkar målet som antibiotikan ska verka på. Dessutom brukar plasmider som innehåller ESBL-gener även bära på resistens mot andra antibiotika också. Detta är ett stort problem och hot mot vår hälsa (Zapun *et al.* 2008).

Kim *et al.* (2016) undersökte vidare sina olika ESBL-mutanter och upptäckte att det bland deras prover fanns över 1000 stycken olika varianter, vilket gör CRISPR/Cas9 tekniken olämplig att använda i praktiken då det blir för många crRNAs att syntetisera. ESBL-gener kommer också i många olika varianter. I den här studien valde forskarna att rikta in sig på ”TEM” och ”SHV” typer. Detta betyder att bakterierna har en slags beta-laktamas-aktivitet. De tog sedan reda på om det fanns en sekvens sparad i alla mutanter för de bägge typerna av ESBL-gen-bärande bakterier och hittade en sekvens som låg 20 nukleotider ifrån en PAM sekvens. De valde då en representativ sekvens som matchade ett segment i både

TEM och SHV typerna så att de syntetiserade två olika plasmider. De gjorde en negativ kontroll som de döpte till pCAS9 som endast kodade för cas9 proteinet och en plasmid som kodade för cas9 och som också innehöll crRNA, vilken fick heta pRESAFR_{ESBL}. Som mottagarcell valde de en *Escherichia coli* (*E. Coli*) och donatorplasmiden togs från bakterien *Klebsiella Pneumoniae* (*K. Pneumoniae*). De blandade ihop mottagar- och donatorcellerna och lät inkubera dem. Sedan spreds cellerna på plattor som innehöll ampicillin. De *E. Coli* som innehöll ESBL-gener blev transformerade med pRESAFR_{ESBL} där crRNA basparade till en konserverad del i ESBL. Dessa blev sedan utstrukna på plattor med ampicillin igen och forskarna räknade ut framgången av pRESAFR_{ESBL} genom att räkna antalet kolonier dagen efter.

De fann att 99 % av bakterierna som blivit transformerade med pRESAFR_{ESBL} dog av ampicillin medan de som blivit utsatta för kontrollbehandlingen överlevde ampicillin. De testade därefter att odla transformanterna på cephalosporinplattor som också visade sig ha en avdödande effekt. Resistens mot cefalosporin var inte målsatt i pRESAFR_{ESBL} hos någon av ESBL typerna och var därför inte väntad. I många fall ligger, hos bakterierna, antibiotikaresistensgenerna på samma plasmid och därför antogs det att det kan vara möjligt att det inducerade avbrottet på målsekvensen gör att hela plasmiden blir förstörd, vilket i så fall förklarar den nya känsligheten för cephalosporinet (Kim *et al.* 2016). Detta var något forskarna ville följa upp varför de provade att bland annat målsätta genen som finns i plasmiderna de valde att arbeta med. De transformerade *E.coli* bakterier med två plasmider som bekräftats innehålla antibiotikaresistenta gener som är kända sen tidigare och *bla*-genen (Kim *et al.* 2016). De såg också till att det inte fanns en homolog sekvens till *bla*-genen i *E.colis* genom. De konstruerade sedan tre nya plasmider, två negativa kontroller som antingen innehöll endast Cas9 eller endast crRNA och en plasmid som innehöll singel guide RNA (sgRNA) som är en ihopsättning av crRNA och tracrRNA och Cas9 och som de döpte till pRESAFR_{bla}. De fick i de nya försöken fram att de återigen endast gav effekt då bakterierna blev behandlade med pRESAFR_{bla} där 99 % av bakterierna dog vid inkubering med ampicillin och ingen skillnad uppmättes med de negativa kontrollerna. De testade dessutom att inkubera de olika behandlade bakterierna med tetracyklin och fick liknande resultat. Då *bla*-genen, som i sig själv inte medierar antibiotikaresistens, återfanns i plasmiderna drog de slutsatsen att det är riktigt att det inducerade avbrottet på plasmiden förstör hela plasmiden och inte bara genen som målsätts samt att åter-ligering inte förekommer.

Specifik avdödning och immunisering av bakterier

Möjligheten att kunna ta död på patogena bakterier är onekligen mycket viktigt men trots det är det en stor del bakterier som vi behöver i våra kroppar och man kan nästan säga att vår bakterieflora i sig självt är ett extra organ. Upprepade störningar av vår mikroflora i de gastrointestinala trakterna kan leda till bland annat tarminflammationer eller fetma (Mondot *et al.* 2013). Om bakterierna är mottagliga tar antibiotika död på dem utan någon som helst specifitet. Som visat ovan går det att vara mycket specifik med CRISPR/Cas9 systemet och klippa bort utvalda gener på plasmider, vilket återinför känsligheten hos bakterierna så att de sedan kan avdödas med antibiotika. Det gör bakterien i sig känslig för antibiotika och den dör, samtidigt dör dock många andra ”goda” bakterier. Men hur skulle det se ut om det skulle kunna finnas ett sätt att ta död på mer specifikt utvalda bakterier eller till och med om man skulle kunna sprida immunitet för horisontell genöverföring av resistensgener utan att döda bakterierna i fråga?

CRISPR/Cas9 för celldöd

I en annan studie har man undersökt om det är möjligt att selektivt avdöda

antibiotikaresistenta och virulenta stammar av *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) i en heterogen population genom att utnyttja CRISPR/Cas9. Detta skulle i så fall kunna betyda att antibiotika inte behöver användas (Bikard *et al.* 2014). Dessa forskare studerade också om det är möjligt att sprida immunitet för antibiotikaresistens mellan bakterier (Bikard *et al.* 2014). Arbetet bygger på att det tidigare har bevisats att vid framgångsrika avbrott på *E. coli* och *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) kromosomer leder detta till celldöd (Gooma *et al.* 2014) då bakterier till skillnad från eukaryoter antingen har väldigt dåligt eller inget sätt att reparera dubbelsträngade avbrott i arvsmassan. Detta tas upp senare i arbetet. För att kunna behandla infektioner krävs ett bra sätt att leverera CRISPR systemet. I deras försök använde de sig av fagemider, vilket är plasmider som är designade att bäras av bakteriofager, för att leverera in cas9- och CRISPR-guiderna. De designade en fagemid med en cas9-gen, tracrRNA och crRNA som skulle baspara med *aph-3* kanamycin resistansgenen och packade in i bakteriofager och blandade med *S.aureus* celler. De mätte överlevnaden genom att mäta förhållandet mellan antal kolonibildande enheter mellan behandlade och icke behandlade celler. Då det är normalt att bakterier kan bli lyserade av bakteriofager och dö av infektionen skulle inte detta experiment säga så mycket om effektiviteten hos CRISPR/Cas9. Därför använde de *S.aureus* stammar som de visste var resistenta mot infektion av normala fager. De använde sig av TU/ul (överförda enheter av CRISPR/Cas9 i ul) som representerar antal partiklar av CRISPR/Cas9 per plackformad enhet av fager (PFU/ul). I försöket hade de 24 % TU/PFU. För att kunna kvantifiera hur mycket av TU som behövs för avdödandet så mätte de hur många TU det fanns per bakteriecell. Är det mer än en TU per bakteriecell räknas det som att bakterien blivit behandlad. I experimentet visades att ett TU högre än ett gav resultat, men att effektiviteten på dödandet blev högre ju fler TU man tillsatte per cell. Även om avdödningen ökade så fanns det fortfarande överlevande celler. Vilka faktorer kan ha bidragit till detta? De kom fram till fyra möjligheter, nämligen:

- i) Olika celler i populationen har olika affinitet för att ta upp fagemiderna och alla celler har alltså inte samma sannolikhet att ta upp det infekterande materialet
- ii) Fagemiden tas upp men kan förloras innan cas9 hinner klippa i genen
- iii) Fagemiderna hos de överlevande cellerna är undermåliga och CRISPR systemet fungerar inte som det ska.
- iv) Genom att inducera mutationer i den egna genen som CRISPR är målsatt till, kan bakterierna undkomma att bli avdödade.

Fagemiden innehöll också crRNA som var komplementärt med en bit av genen för kloramfenikolresistens i *S.aureus* stammarna de jobbade med. Således skulle, i de fall fagemiden togs upp, bakterierna ha blivit känsliga för kloramfenikol. För att undersöka detta strök de celler från de överlevande populationerna på plattor med kloramfenikol och fann att 6/8 kolonier blev påverkade av antibiotikan. De två överlevande kolonierna undersöktes med genetiska studier och man fann att ingen av bakteriecellerna hade muterats, det berodde troligen på scenario iii för dem kolonierna d.v.s. det var undermåligt CRISPR/Cas9-system i fagemiderna.

Immunisering av bakterier

pUSA02 är en plasmid som innehåller resistensgener mot tetracyklin som kan föras över horisontellt i *S.aureus* stam USA300. I en studie testade man om det gick att immunisera *S.aureus* stammar som inte har pUSA02 plasmiden för att kunna ta upp resistensgenerna via horisontell genöverföring (Bikard *et al.* 2014). De syntetiserade en fagemid som målsätter pUSA02 plasmiden och behandlade *S.aureus* celler som var både bärare och icke bärare av pUSA02 plasmiden. De cellerna som inte var bärare av den utsatta för fagemiden blandades sedan med celler som inte blivit behandlade men var bärare av

plasmiden. De spred sedan de bakterierna på tetracyklinplattor. Under sådana omständigheter brukar resistensplasmider överföra material mellan varandra. Men det visade sig att bakterierna dog av tetracyklinbehandlingen, slutsatsen blev att behandling av CRISPR/cas9 på naiva celler även förebyggde horisontell genöverföring. Den slutsatsen kunde dras då en kontrollgrupp som hade blivit utsatta för fagemider utan crRNA, under samma omständigheter, var resistenta mot tetracyklin.

Genomeditering med CRISPR/Cas9

Hittills har arbetet behandlat hur CRISPR/Cas9 kan användas som antibiotikakomplement eller som en ny sort antibiotikafri antimikrob-behandling. Den inriktningen och applikationen av tekniken är bara en av många. Som nämnts i början av arbetet så kan CRISPR/Cas9 även användas för att redigera i arvsmassan och detta verkar kunna göras brett då tekniken verkar fungera för alla organismer.

Genutslagning på modellorganismer

CRISPR/Cas9 används inte kliniskt än, då det krävs mer forskning och experiment på ryggradsdjur kräver dessutom speciell tillåtelse. *Drosophila melanogaster* är en modellorganism för djurceller då den har snabb generationstid och är representativ då den uppvisar många cellulära proceser som förekommer hos högre eukaryoter.

I en studie av Yu *et al.* (2013) undersökte forskarna effektiviteten för att slå ut gener, så kallade gen knock-outs med CRISPR/Cas9. Vid dubbelsträngade avbrott behöver cellen system för lagning, då avbrott i generna är farligt för alla organismer. När Cas9 klipper finns det olika system som lagar de avbrott som uppstår, dels icke-homolog sammanfogning "non homologous end-joining" (NHEJ) och dels homolog rekombination som är den vanligaste typen av "Homology directed repair" (HDR). NHEJ-systemets funktionalitet bygger på att det vid avbrottet introduceras oförutsägbara deletioner, alternativa nukleotider eller tillförsel av ytterligare baser. Samlingsnamnet för deletionerna och insertionerna kallas för "indelmutationer". Genen tas inte bort men ramen för transkriptionen av genen blir förskjuten och genen kan därför inte uttryckas. I HDR-systemet inkorporeras nya sekvenser, det går alltså att lägga in nya bitar i genomet. Vid genomredigering av organ för till exempel xenotransplantationer är HDR den metoden som man behöver använda. I celler hos högre eukaryoter är det NHEJ som oftast används i cellerna då den kan genomföras i alla delar av cellfaserna till skillnad från HDR som kräver att cellen är i S-fasen. HDR kräver att genetiskt material från en donator finns tillgängligt (Maruyama *et al.* 2015). Det går inte att förutsäga ifall cellen kommer att använda sig av HDR eller NHEJ för att laga avbrottet (Geuting *et al.* 2013). För att åstadkomma gen-knockouts som genomredigering behövs inte HDR utan det räcker med NHEJ som dessutom har visat sig användas naturligt av cellen hos högre eukaryoter (Maruyama *et al.* 2015).

I studien av Yu *et al.* (2013) använde sig forskarna av CRISPR/Cas9 för att slå ut olika gener. De experimenterade bland annat med att slå ut locus *ms(3)k81* som vid mutationer ger infertilitet hos *Drosophila* hanar. Vid det locuset finns en restriktionspunkt för restriktionsenzymet RsaI. De syntetiserade ett tracr+crRNA (sgRNA) i syfte att leda Cas9 till att klippa i den restriktionspunkten. Detta för att de senare skulle kunna genomföra en PCR och få fram DNA-fragment som inte kunde klippas av RsaI. Av 17 hanar som deltog i experimentet hade hela 100 % av dem blivit sterila, vilket är en hög siffra. Den höga siffran var förvånande eftersom en viss proportion av indelmutationer brukar vara för små för att ge knock-outs, då ramen för transkription inte förskjuts

tillräckligt, eller så tas inte cas9 upp av alla testsubjekt. *Drosophila* är dessutom en diploid organism med två homologa kromosomer och eftersom alla 17 hanar blivit sterila betyder det att bägge homologa kromosomer för detta locus blivit klippta av Cas9 hos alla testexemplar. Det gjordes en PCR amplifiering av dessa hanar och en restriktionsklyvning för att se om steriliteten berodde på indelmutationer. Hos de hanar som blivit behandlade kunde RsaI inte klyva där restriktionspunkten borde finnas men hos kontrollgruppen fungerade det. Av detta kunde de dra slutsatsen att Cas9 hade orsakat en mutation i *ms(3)k81* locuset. *Ms(3)k81* locuset ligger i eukromatinet hos *Drosophila*. Eukromatinet är den del av kromatinet som är transkriptionellt tillgängligt medan heterokromatinet ofta benämns som inaktivt. Hur skulle det fungera att redigera gener som återfinns i heterokromatinet?

CRISPR/Cas9 editering av gener i heterokromatin

Centromeren och pericentromeren är regioner som framför allt förekommer i heterokromatinform (Feng *et al.* 2016). I välkända organismer där det mesta av genomet eller för den delen, hela genomet är kartlagt går det att välja ut gener som är lokaliserade till just de områdena för målsättning med CRISPR/Cas9 systemet. För att testa CRISPR/Cas9 systemets effektivitet för genomeditering hos gener i heterokromatinet valdes 12 gener som finns i heterokromatinet hos *Zea Mays* (majs). De målsatte gener som såväl blir regulatoriskt transkriberade som gener som håller sig inaktiva (Feng *et al.* 2016). De syntetiserade sgRNA för delar på var och en av de 12 generna. De förberedde plasmider som sedan injicerades in i majsprotoplaster. Sedan genomfördes en PCR med följande sekvensering av generna för att upptäcka om det skett någon mutation. I fem av 12 generna upptäcktes indelmutationer med varierande effektivitet. I de andra sju generna var det ytterligare sex som inte fått någon mutation och en där det inte kunde avgöras (se tabell 1).

Tabell 1. **CRISPR/Cas9 medierade mutationer på 12 gener hos majs.** Tabellen visar 12 olika gener placerade på kromosom två & fem inom centromeren & pericentromeren hos majs som blivit målsatt med CRISPR/Cas9. Hos fem av generna har indelmutationer påvisats genom PCR (Feng *et al.* 2016)

Site name	Gene ID	Chromosome	Relative expression level	Mutation detected by PCR-RE
Hsg 1	GRMZM2G091313	2	5.64	No
Hsg 2	GRMZM2G083935	2	15.99	No
Hsg 3	GRMZM2G332562	5	9.26	Yes
Hsg 4	GRMZM2G080129	5	26.24	Yes
Hsg 5	GRMZM2G170577	5	4.23	No
Hsg 12	GRMZM2G438243	2	59.93	Yes
Hsg 6	GRMZM2G170586	2	0	Yes
Hsg 7	GRMZM2G099580	2	0	Yes
Hsg 8	GRMZM2G000411	5	0	No
Hsg 9	GRMZM2G429781	5	0	No
Hsg 10	GRMZM2G135228	5	0	Undetermined
Hsg 11	GRMZM2G342426	5	0	No

Trots att mindre än hälften av de målsatta generna uppvisade indelmutationer i studien av Feng *et al.* (2016) drog de slutsatsen att CRISPR/Cas9 är ett framgångsrikt verktyg för att inducera gen knock-outs även på gener inom heterokromatinet. Detta arbete bygger till viss

del på tidigare kunskap om studier av samma sak fast hos celler från *Drosophila*. I den tidigare forskningen hade man testat att målsätta tre gener inom heterokromatinet, varav en satt på Y-kromosomen och två på autosomala kromosomer (Yu *et al.* 2013). Genen på Y-kromosomen som målsattes var *kl-3* vilket är en fertilitetsfaktor hos *Drosophila*. Hos hanarna i försöket blev hela 100 % av försöksdjuren sterila vilket skulle betyda att *kl-3* locuset blev muterat hos alla hanar. Detta skedde troligen på grund av att CRISPR/Cas9 systemet införde mutationer. Genom PCR analys fann man mycket riktigt att *kl-3* locuset hade blivit muterat. Hos de andra målsatta generna inom heterokromatinet visades det också att indelmutationer uppstått, hos den ena hade det skett till 100 % precis som i *kl-3* genen men i den andra endast till 18 % (Yu *et al.* 2013).

CRISPR/Cas9 tekniken och mänskliga celler

CRISPR/Cas9 har visat sig fungera på prokaryoter, växtceller och insektceller, i både eukromatin och heterokromatin men hur har det hittills fungerat på mänskliga celler? I en sentida studie har man börjat med att modifiera cas9-proteinet genom att optimera kodonen för proteinet så att cas9 fått en nukleär lokalisering signal varpå man klonat in detta i ett mammaliskt system (Mali *et al.* 2013). En nukleär lokalisering signal behövs då det är reglerat vad som får transporteras in och ut ur cellkärnan. Man valde sedan att börja målsätta modifierade gener som inte finns nativt i cellens genom. En stabil cellinje etablerades av leverceller som kodar för grönt fluorescerande proteiner (GFP) men som inte kan uttryckas då de infört en bit av människans AAVS1 locus inom den kodande regionen för GFP. Tanken var att man genom att använda HDR från en lämplig donator med reparerande material skulle kunna göra proteinet fluorescerande igen. De tillverkade sgRNA som skulle målsätta AAVS1 locuset och 20 timmar efter transfektion kunde de uppmäta att 3-8 % av de transfekterade celler fluorescerade genom ”flow-activated cell sorting” (FACS). Med de positiva resultaten gick de vidare och testade systemet på nativa gener, utan integrerade sekvenser i genomet.

De använde sig av två sgRNA för AAVS1 locuset på PPP1R12C genen på kromosom 19. Denna gen är lämplig att målsätta då den uttrycks i de flesta vävnader (Mali *et al.* 2013). Det är taktiskt att experimentera på gener som uttrycks i många olika vävnader eftersom att trots att vi har samma DNA i alla celler differentieras cellerna och transkriptionen skiljer sig, vilket man skulle kunna tänka eventuellt kan göra skillnad i teknikens effektivitet. De transfekterade tre olika slags celler, en levercell, en inducerad pluripotent cell och en human kronisk myelogen leukemicell, med sgRNA och Cas9 och analyserade resultatet med next-generation sequencing (NGS). Hos alla tre cellerna såg man att sgRNA och Cas9 transfektionen resulterat i indelmutationer med varierande effektivitet mellan 2-25 %. Med hjälp av sekvenseringen kunde de också se att mutationerna skett kring de målsatta områdena vilket stärker faktumet att CRISPR/Cas9 är specifikt. Att mutationerna skett på rätt plats visar också att ospecifik basparning inte är så vanligt, vilket skulle kunna vara ett stort bekymmer vid genterapi.

Genetiskt modifierade grisar

Sist kommer det att undersökas om CRISPR/Cas9 systemet är effektivt för xenotransplantationer. Vilket definieras som organtransplantation från icke-mänskliga djur in till människor. För detta krävs modifiering av organen så att de inte stöts bort av människokroppen. Då det är stor brist på organ idag skulle detta kunna vara en revolutionerande applikation inom medicin.

Grisar en bra modeller för att undersöka människans olika sjukdomar. Olika gentekniker har testats på grisar och sedan använts. Dessvärre har tidigare tekniker visat sig vara ganska ineffektiva

i det avseendet (Hammer *et al.* 1985). Att kunna genmodifiera grisar är en förutsättning för att xenotransplantationer mellan gris och människa ska kunna fungera då kroppen annars skulle stöta bort organet. Uppsatsen har tidigare behandlat hur man framgångsrikt genmodifierat andra organismer, *S. aureus*, *E. coli*, *D. melanogaster* och *Z. mays*. Även om informationen från dessa studier tyder på att CRISPR/Cas9 är effektivt för genmodifiering i dessa och troligen i alla organismer så behövs det bevis på effektiviteten hos tekniken hos grisar och andra djur som lämpar sig för xenotransplantationer.

I en studie har man använt sig av CRISPR/Cas9 för att göra en knock-out på tre olika gener, två stycken endogena från grisenomet och en transgen (GFP) (Whitworth *et al.* 2014). De använde sig av oocyter och zygoter framställda *in vitro*. Man hade olika tekniker för införandet av CRISPR/Cas9. För oocyterna införde de sgRNA och Cas9 genom somatisk cellkärne överföring (SCNT) vilket går ut på att använda sig av ett ägg utan cellkärna som transfekteras av en genetiskt modifierad cellkärna från somatiska celler. För att införa materialet i zygoterna använde de sig av RNA injektion. De modifierade zygoterna introducerades sedan in och utvecklades till växande embryon. Introduktionen av CRISPR/Cas9 till somatiska celler gav varierande resultat. Att få cellen att använda sig av HDR visade sig ineffektivt, en knock-out via NHEJ fungerade bättre. Detta var dock inte helt tillförlitligt då vissa sgRNA guider fungerade bättre än andra för vissa gener. Det behöver utforskas mer noggrant i detta fall vilka av sgRNAs som ger resultat. I experimenten med oocyterna och SCNT behövde en del grisar avlivas då dem blev sjuka. Man vet inte om det berodde på just den tekniken som användes eller om det är CRISPR/Cas9 som är toxiskt.

Zygottransformationen gav bättre resultat. Två stycken sgRNA infördes per gen. Detta ökar sannolikheten att en större bit av genen ska rubbas än om man valt att inducera en indelmutation och hoppats på att mutationerna ska resultera i ett icke-fungerande protein och på så sätt få en specifik deletation av genen. För introduktionen av zygoterna i växande embryon använde sig forskarna av en mindre mängd CRISPR/Cas9 då det annars kan bli toxiskt, mindre mängd orsakar mindre stress för embryot. Forskarna menar att det är mer effektivt att använda sig av den senare experimentmetoden. I dagsläget finns det inte särskilt mycket forskning kring ämnet och fler experiment behöver genomföras för att få en tydligare bild om huruvida det är effektivt eller inte.

Diskussion

I det här arbetet sammanställde jag hur CRISPR/Cas9 systemet kan användas inom antimikrobbehandling, genomeditering och xenotransplantationer. Det är ett nytt redskap men det finns redan trots detta väldigt mycket forskning på effektiviteten hos CRISPR/Cas9.

I experimentet där Kim *et al.* (2016) bevisade att det gick att göra antibiotikaresistenta bakterier känsliga för antibiotika igen, förefaller detta vara en bra teknik för att få bukt med invasiva bakterier. Det har än så länge bara gjorts laboriestudier och man behöver därför göras tester också på patienter som är infekterade med multiresistenta bakterier. Innan man har testat *in vivo* kan man inte veta hur interaktionen mellan bakteriecellen, CRISPR/Cas9 och de mänskliga cellerna påverkar effektiviteten. Det kan alltid finnas oförutsedda faktorer och mekanismer som skulle kunna göra behandlingen mindre effektiv eller ha negativa hälsoeffekter. Sedan har vi problematiken med antibiotikabehandling som vid upprepad användning kan ge störningar av vår bakterieflora i matsmältningssystemet vilket kan leda till inflammationer och en störd matsmältning (Mondot *et al.* 2013). Man har lyckats återinföra antibiotikakänsligheten hos multiresistenta bakterier som man sedan behandlar med antibiotika. Detta leder till att de patogena bakterierna dör. Dock elimineras samtidigt många bakterier som ingår i vår normalflora. När en stor mängd bakterier försvinner vid antibiotikabehandling öppnas fler nischer upp för andra bakterier, eller samma som innan för den delen, som då kan kolonisera magtarmkanalen. På så sätt kan en ny bakterieflora uppkomma vilket kan vara på gott eller ont. Det blir en chanstagnation som

följd av behandlingen då det inte går att förutsäga hur florans sammansättning kan förändras. Att behandla infektioner är nödvändigt och utan några andra effektiva och pålitliga alternativ har antibiotikan varit det man lutat sig emot men idag finns det fler alternativ med de framgångar vi har inom biotekniken. Nu har CRISPR/Cas9-tekniken visat att det går att ta död på specifika bakterier i en heterogen kultur (Bikard *et al.* 2014) vilket således betyder att man kan bli av med patogena bakterier utan att goda bakterier behöver stryka med. Man behöver inte heller bli av med en lika stor mängd bakterier och det är inte en lika stor nisch som kan upptas av andra bakterier. Det är en effektiv metod men den resulterar inte i 100 % avdödning och alltså kommer det att finnas vissa individer kvar. Detta ger således en risk för återväxt av de patogena bakterierna. För att göra den risken så liten som möjligt är det viktigt att utforska vilken den optimala mängden är som krävs av CRISPR/Cas9 samt att utforska vilket leveranssätt som är det mest effektiva möjliga.

Studierna som uppsatsen behandlat tyder på att CRISPR/Cas9-metoden kan bli mycket användbar för framtida antimikrob-behandlingar men visar också att det krävs fler studier. Även om studierna visat att metoden är mycket effektiv är det inte orimligt att bakterierna kan komma att mutera sina gener så att de inte blir mottagliga för CRISPR/Cas9. Det blir troligen mycket utmanande att syntetisera crRNA för specifika gener som klarar användning i stor skala då risken att bakterierna muteras blir väsentligt större. Detta kan göra det kostsamt och svårt i praktiken att använda systemet men trots detta, är CRISPR/Cas9 antagligen det bästa alternativet idag.

Att kunna redigera gener och inaktivera gener på utvalda ställen i genomet krävs för att vi ska kunna använda oss av organ från icke-mänskliga djur. Det har visat sig fungera bra att skapa knock-outs via NHEJ men det har visat sig svårare att framgångsrikt inkorporera nytt genetiskt material, vilket endast kan göras via HDR. Det hela är till viss del opålitligt eftersom att man i dagsläget fortfarande inte kan avgöra vilken av mekanismerna som aktiveras vid injektion av cas9 och sgRNA. Jag tror absolut att det finns potential att använda CRISPR/Cas9 för xenotransplantationer men att det är en lång väg tills att det används kliniskt. Rent tekniskt tror jag dock att det kommer att fungera då mutationsproblematiken inte finns hos djurceller på samma sätt som hos bakterier. Det är dock den etiska aspekten på xenotransplantationer som får metoden att kännas tveksam då man kommer att systematiskt föda upp och utnyttja de djur som används för ändamålet.

Det finns ytterligare en aspekt hos användningen av CRISPR/Cas9 som här endast har nämnts i förbigående, nämligen ospecifika basparningar. Då det finns väldigt många PAM i ett genom och för att få specificitet skall avståndssekvensen matcha nukleotiderna vid PAM. Med en avståndssekvens på 20 nukleotider får man en ganska säker matchning då det inte är så hög sannolikhet att just de sekvenserna finns på ett annat ställe vid en annan PAM i den ordningen. Men cas9 kan klyva även då basparningen inte är 100 % mellan crRNA och målet. Det kan leda till oanade skador på cellerna om en individ blir injicerad med crRNA och cas9 eftersom det tillåter viss ospecifik basparning.

Sammanfattningsvis kan man säga att CRISPR/Cas9-systemet ter sig mycket effektivt och att det troligen är ett av de bästa alternativen vi har idag mot patogena bakterier och för genomredigering. Det är sannolikt att vi kommer att se större användning av systemet inom en ganska snar framtid.

Tack

Tack till min handledare Stefan Bertilsson som har bidragit med konstruktiv kritik och vägledning. Jag vill dessutom tacka min vän Anna Broberg som hjälpt mig att skapa figurer.

Referenslista

- Abbott A. 2016. A CRISPR vision: Emmanuelle Charpentier spent years moving labs and relishing solitude. Then the co-discovery of CRISPR-Cas9 explosively changed her life. *Nature* **532**: 432.
- Andersson DI. 2003. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **6**:452-456.
- Barrangou R, Coute-Monvoisin A, Stahl B, Chavichvily I, Damange F, Romero D, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P. 2013. Genomic impact of CRISPR immunization against bacteriophages. *Biochemical society transactions***41**:1383-1391.
- Bikard D, Euler C, Jiang W, Nussenzweig PM, Goldberg GW, Duportet X, Fischetti VA, Marraffini LA. 2014. Development of sequence-specific antimicrobials based on programmable CRISPR-Cas nucleases. *Nature biotechnology* **32**: 1146–1150.
- Blair J, Webber M, Baylay A, Ogbolu D, Piddock L. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology* **13**: 42-51.
- Feng C, Yuan J, Wang R, Liu Y, Birchler J, Han, F. 2016. Efficient Targeted Genome Modification in Maize Using CRISPR/Cas9 System. *Journal of genetics and genomics***43**: 37-43.
- Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. 2012. Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: E2579
- Geuting V, Reul C, Löbrich M. 2013. ATM Release at Resected Double-Strand Breaks Provides Heterochromatin Reconstitution to Facilitate Homologous Recombination. *PLoS Genetics* **9**: e1003667.
- Gomaa A., Klumpe H, Luo M, Selle K., Barrangou R, Beisel C. 2014. Programmable Removal of Bacterial Strains by Use of Genome-Targeting CRISPR-Cas Systems. *American society for microbiology* **5**: e00928-13-e00928-13.
- Hammer RE, Ebert KM, Wall RJ, Bolt DJ, Pursel VG, Rexroad CE, Palmiter RD, Brinster RL. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature***315**: 680-683.
- Kim JS, Cho DH, Park M, Chung WJ, Shin D, Ko KS, Kweon DH. 2016. CRISPR/Cas9-Mediated Re-Sensitization of Antibiotic-Resistant Escherichia coli Harboring Extended-Spectrum β -Lactamases. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **26**:394–401.
- Lander ES. 2016. The Heroes of CRISPR. *Cell* **164**:18-28
- 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.
- Maruyama T, Dougan S, Truttmann M, Bilate A, Ingram J, Ploegh H. 2015. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nature biotechnology* **33**: 538-U260.
- Mondot S, de Wouters T, Doré J, Lepage P. 2013. The Human Gut Microbiome and Its Dysfunctions. *Digestive Diseases* **31**:278–285.
- Whitworth K, Lee K, Benne J, Beaton B, Spate L, Murphy S, Samuel M, Mao J, O'Gorman C, Walters E, Murphy C, Driver J, Mileham A, McLaren D, Wells K, Prather R. 2014. Use of the CRISPR/Cas9 System to Produce Genetically Engineered Pigs from In Vitro-Derived Oocytes and Embryos. *Biology of reproduction* **91**: 78.
- Yu Z, Ren M, Wang Z, Zhang B, Rong YS, Jiao R, Gao G. 2013. Highly efficient genome modifications mediated by CRISPR/Cas9 in Drosophila. *Genetics***195**: 289-291.

Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. 2008. Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. *FEMS Microbiology Reviews* **32**:361–385.

Genetisk modifikation med CRISPR/Cas9: etisk bilaga

Linn Syding

Självständigt arbete i biologi 2016

CRISPR/Cas9 - Ett användbart verktyg inom biotekniken

CRISPR/Cas9 och modifiering av genom

CRISPR/Cas9 är ett system som är lånat från bakteriers immunologi och som skyddar dem mot angripande virus. Detta sker genom att ett kort fragment på cirka 20 nukleotider av angriparens genetiska material sparas och lagras i bakterien. Nästa gång en liknande inkräktare visar sig kan det fragmentet tillsammans med ett endonukleas (cas9) baspara till matchande nukleotider. Vid denna basparning kan proteinet inducera ett dubbelsträngat avbrott i genen hos angriparen vilket leder till degradering av viruset (Barrangou *et al.* 2013). Den tekniken går att använda inom biotekniken och kan målsätta valfri gen hos vilken organism som helst, människor inkluderat. På så sätt är det möjligt att blockera genuttryck och inkorporera nytt material hos målorgansimen (Mali *et al.* 2013). Att kunna modifiera genom, är en förutsättning för organtransplantation mellan icke-mänskliga djur och människor (xenotransplantationer), detta skulle kunna göras med CRISPR/Cas9.

Genetisk modifikation hos människor

CRISPR/Cas9 har visat sig kunna effektivt modifiera gener hos mänskliga celler. Detta medför en hel del etiska frågeställningar. Det är i dagsläget möjligt att upptäcka allvarliga genetiska sjukdomar redan på fosterstadiet och med den här tekniken skulle det kunna gå att redigera de sjukdomsframkallande generna. Skulle det vara etiskt acceptabelt att låta en individ födas med sjukdomar som skulle kunnat ha gått att bota? Om man gör genetisk modifiering av foster lagligt vart går gränsen för vilka slags sjukdomar som man väljer att bota?

Jag tror att metoden skulle kunna göra mycket gott i det avseendet att människor inte behöver födas med sjukdomar som skulle kunna föra med sig mycket lidande. Däremot är det mycket viktigt att instifta en tydlig laglig gräns för vilka genetiska sjukdomar som får redigeras. Vid en vagare lagstiftning skulle det kunna vara möjligt att rubba på gränserna för vilka åkommor som hanteras. Det skulle även vara möjligt att själv designa en individ efter eget tycke. Det tycker jag inte är moraliskt försvarbart på grund av att detta förutsätter att alla ska ha tillgång till tekniken för att få samma chans i samhället, vilket inte känns realistiskt. Genom att själv designa sitt barn tar man också på sig rätten att bestämma över någon annans kropp och det är problematiskt att sätta gränser för vilka redigeringar som ska tillåtas och vilka som är överflödiga.

CRISPR/Cas9 och xenotransplantationer

I dagens läge råder det stor brist på organ och väntelistan för att motta ett är väldigt lång. Att producera organ från icke-mänskliga djur som passar människor skulle kunna lösa det problemet. Det har visat sig möjligt att genetiskt modifiera grisar med CRISPR/Cas9 (Whitworth *et al.* 2014). I en framtid där det är praxis att föda upp grisar för att sedan använda deras organ till transplantationer kommer man in på djurhållningsetiken. Grisar är kännande djur som i så fall skulle födas upp för att systematiskt utnyttjas. Där blir frågan om konsekvensen, att rädda en

människas liv, rättfärdigar behandlingen av djuret. Ifall det skulle komma att bli en framtida användning blir det mycket viktigt att sätta en lagstiftning så att djuret får en bra behandling under tiden. Personligen är jag emot användandet av djur och tycker inte att xenotransplantationer känns som ett bra alternativ, detta endast på grund av respekt för djuren, tekniken i sig har potential.

Forskningsetik

I uppsatsen jag har skrivit om ämnet har jag endast använt mig av vetenskapliga artiklar som blivit granskade av andra forskare inom fältet. Jag gjort mitt bästa för att behandla ämnet rättvist och ge en bred bild av det nuvarande forskningsläget och hur det kan tillämpas i framtiden.

Referenser

- Barrangou R, Coute-Monvoisin A, Stahl B, Chavichvily I, Damange F, Romero D, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P. 2013. Genomic impact of CRISPR immunization against bacteriophages. *Biochemical society transactions* **41**:1383- 1391.
- 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.
- Whitworth K, Lee K, Benne J, Beaton B, Spate L, Murphy S, Samuel M, Mao J, O'Gorman C, Walters E, Murphy C, Driver J, Mileham A, McLaren D, Wells K, Prather R. 2014. Use of the CRISPR/Cas9 System to Produce Genetically Engineered Pigs from In Vitro-Derived Oocytes and Embryos. *Biology of reproduction* **91**: 78.