UPPSALA
UNIVERSITET

Hur kan CRISPR användas inom mänsklig genterapi

Ebyon Mohamud Hassan

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

Hur kan CRISPR användas inom mänsklig genterapi?

Ebyon Mohamud Hassan

Självständigt arbete i biologi 2016

Sammandrag

CRISPR (eng. clustered regularly interspaced short palindromic repeats) är namnet på en form av adaptivt immunförsvar som upptäcktes relativt nyligen hos prokaryota organismer. CRISPR-systemet är en del av det prokaryota DNA:t och består av korta repetitiva sekvenser varvade med intermediära segment. Dessa intermediära segment har kopierats från tidigare hot, ofta bestående av virusinfektioner. Genom de intermediära sekvenserna kan cellen känna igen viruset nästa gång det angriper cellen. Då uttrycks *cas* generna belägna en bit uppströms från CRISPR-matrisen och deras genprodukter eliminerar det hotande DNA:t via klyvning.

CRISPR-systemet och i synnerhet ett av *cas*-proteinerna, Cas9, har en relativt simpel uppbyggnad då det behövs få komponenter för att fullfölja funktionen. På artificiellt håll kan systemet modifieras ytterligare och programmeras om till att binda till och klyva godtyckligt i genomet. CRISPR/Cas9-baserad genteknik kan även appliceras inom genterapin för att underlätta medicinsk forskning men också för att undersöka potentialen inom mänsklig genterapi. I dagsläget sker forskning på CRISPR/Cas9-baserad genterapi som behnadling for en rad sjukdomar, bland annat cancer, HIV, och Duchennes muskeldystrofi. Utmaningarna är många då det fortfarande måste utvecklas ett säkert leveranssystem av CRISPR/Cas9 till eukaryota celler som inte har systemet naturligt samt avlägsnande av potentiella bieffekter.

Inledning

Begreppet CRISPR, kommer från engelskans **c**lustered **r**egularly **i**nterspaced **s**hort **p**alindromic **r**epeats. Det saknas i nuläget en svensk översättning men begreppet kan översättas med: grupperade korta repeterade palindromiska sekvenser utplacerade med jämna mellanrum. CRISPR är en form av adaptivt försvarssystem som har upptäckts hos prokaryota mikroorganismer (Barrangou *et al.* 2007). Kortfattat ger CRISPR och Cas (CRISPR associerade proteiner) bakterier ett effektivt och specifikt skydd mot främmande genetiska element som hotar cellen. En avgörande mekanism är systemets förmåga att memorera delar av en okänd DNA sekvens för att sedan känna igen och avlägsna den (Barrangou *et al.* 2007) (Garneau *et al.* 2010). Trots att upptäckten av CRISPR skedde relativt nyligen har systemet redan haft en betydande inverkan på modern genteknik då det har blivit lättare än någonsin för forskare att genomföra genmodifieringar (Doudna & Charpentier 2014). CRISPR-systemet har visat sig vara ett kraftfullt forskningsredskap och med hjälp av CRISPR har även utvecklingen av genterapeutiska metoder accelererat (Hsu *et al*. 2014). Redan idag undersöks möjligheterna kring hur CRISPR-baserad teknik kan användas inom forskningen på sjukdomar som cancer (Sánchez-Rivera & Jacks 2015), HIV (Ebina *et al.* 2013) och Duchennes muskeldystrofi (VandenDriessche & Chuah 2016).

Syftet med denna uppsats är att utreda till vilken grad CRISPR kan användas inom genterapi och vilka utmaningar som ännu kvarstår. Kan CRISPR-baserad genterapi i framtiden användas vid behandling av sjukdomar?

CRISPR, prokaryoternas immunförsvar

CRISPR-systemet har ett väldigt specifik upplägg i det bakteriella DNA:t. CRISPR-matrisen byggs upp av korta, repetitiva DNA-sekvenser som avbryts av korta intermediära sekvenser, så kallade ”spacers” med en längd runt 30 baspar (Bolotin *et al.* 2005). Det har påvisats att dessa intermediära segment är helt eller delvis homologa med DNA från bakteriofager (Bolotin *et al.* 2005). CRISPR fungerar som en försvarsmekanism mot främmande DNA som hotar att invadera det egna genomet, ofta i form av utmaningar från virus eller plasmider. Hos bakterier som överlever en virusinfektion kan CRISPR/Cas-systemet memorera en kort slumpmässig sekvens av DNA från det hotande elementet och lägga till den till CRISPR-matrisen som en ny mellanliggande sekvens. De hotande DNA-elementen har betäckningen protospacers, eftersom det är från dessa som den intermediära sekvensen kopieras. Nästa gång bakteriecellen blir utsatt för samma virus kommer det att kännas igen och med hjälp av Cas-proteinerna kommer den främmande arvsmassan klippas bort och avlägsnas. Virusattacken har därmed stoppats med framgång. Cas-proteinerna kommer att angripa det främmande DNA:t så länge den intermediära sekvensen fortfarande stämmer överens och det infekterande viruset inte har muterat just där. Det är den korta intermediära längan av DNA som är avgörande för CRISPR-systemets effektivitet och specificitet (Jinek *et al.* 2012).

CRISPR maskineriet

De mekanismer CRISPR-systemet använder sig av vid inkorporering av främmande mobila DNA segment sker i tre steg och kan beskrivas övergripande med generella termer: anpassning, uttryck, och ingripande (eng. adaptation, expression, and interference).

Anpassning

Det första steget, anpassning, innebär att cellen erhåller en ny intermediär sekvens, härledd från angripande DNA. Denna mellanliggande sekvens kommer att fungera som minne av en tidigare infektion. Det är ännu inte helt klarlagt hur denna immunisering går till. Hittills pekar data på att det är proteinerna Cas1 och Cas2 som interagerar med det främmande DNA-elementet och antingen kopierar eller klipper ut den korta sekvens som är den blivande intermediära sekvensen (Horvath & Barrangou 2010). Generna *cas1* och *cas2* är de enda som är konserverade och finns närvarande i alla kända CRISPR-system (Nuñez *et al.* 2014). Det har dessutom visats att deras genprodukter, proteinerna Cas1 och Cas2 är viktiga vid erhållandet av intermediära sekvenser (Yosef *et al.* 2012). Vid anpassning bildar Cas1 och Cas2 tillsammans ett proteinkomplex. Det är okänt exakt hur det går till, men proteinkomplexet bildar den nya intermediära sekvensen, antagligen via klyvning av DNA, och leder den sedan till CRISPR-lokuset där den inkorporeras (Nuñez *et al.* 2014). Cas1-Cas2 komplexet hittar den blivande intermediära sekvensen bland restprodukter från DNA-replikation eller reparation av det virus som håller på att infektera (Levy *et al.* 2015).

Uttryck

Under den följande fasen transkriberas hela CRISPR-matrisen och skrivs om till RNA. Transkriptet inkluderar både de repetitiva och intermediära segmenten och kallas för prekursor crRNA (pre-crRNA). En annan typ av icke-kodande små RNA, tracrRNA (eng. trans-activating crRNA), rekryteras för att bearbeta pre-crRNA:t genom basparning. Det som bildas är ett duplex bestående av pre-crRNA och tracrRNA. Duplexet klyvs av enzymet RNase III och slutprodukten är färdiga korta crRNA som består av endast ett unikt intermediärt segment och ett repetitivt segment (Deltcheva *et al.* 2011) .

Ingripande
Det slutgiltiga steget är ingripande av CRISPR-systemet och följaktligen avvärjande av protospacern, det vill säga det angripande DNA:t. Exakt hur det går till varierar beroende på vilket CRISPR-system som behandlas. Den generella processen är att relevanta Cas-proteiner bildar komplex med det färdiga crRNA som är komplementärt med protospacern. crRNA:t basparar och binder till protospacern vilket medför att Cas-proteinerna rekryteras till platsen och kan ingripa. Ingripandet består av nukleasaktivitet av något slag, alltså DNA-klyvning som leder till degradering av protospacern (Staals *et al.* 2016). Det krävs ytterligare ett element för att komplexet ska binda till protospacern; en så kallad PAM-sekvens (eng. protospacer-adjacent motif). PAM är en fem till tre baspar lång konserverad DNA-sekvens med följande utseende ”NGGNG”. PAM-sekvensen är belägen ett kort stycke nedströms från protospacern (Gasiunas *et al.* 2012). Det är tack vare PAM-sekvensen som CRISPR-maskineriet kan skilja den egna intermediära sekvensen från protospacern som ska degraderas, och den är avgörande för ett fungerande försvar.

Beskrivningen ovan täcker i generella drag hur CRISPR fungerar. Emellertid finns det variationer vilket leder till att det finns en systematik och ett antal klassificeringar av CRISPR-system.

Klassifikation av CRISPR
Det finns två klasser av CRISPR-system, som vidare kan delas in i sex typer och 16 undertyper. Klass 1 CRISPR består av typerna I, II, och III medan typ IV och V CRISPR ingår i klass 2. Klass 1 inkluderar alla de CRISPR-system där crRNA bildar komplex med flera olika proteiner vid ingripande fasen. Komplexet som består av crRNA och flera olika protein kallas för crRNA-effektor komplex och innehåller flera subenheter. I klass 2 system är det istället ett enda protein som är ansvarigt för ingripandet och således täcker alla funktioner som proteinerna ingående i effektorkomplexet har. Därefter delas CRISPR-lokusen upp i typer beroende på gener som är unika eller karaktäristiska för ett visst CRISPR-lokus. Till exempel är *cas3* signaturgenen för typ 1 CRISPR. Signaturgenen för typ II CRISPR är *cas9* medan *cas11* är signaturgenen för typ III CRISPR. Den följande indelningen av typer till undertyper baseras på definierbara genetiska arrangemang som är speciella för varje undertyp. undertyperna skrivs ut med bokstäver, exempelvis typ II-B som är den vanligaste versionen av typ II CRISPR-system. Överlag är det typ I CRISPR som är vanligast bland arkéer (~64% av alla CRISPR-lokus) och bakterier (~60% av alla CRISPR-lokus). (Makarova *et al.* 2015)

Den genetiska saxen
Det är specifikt CRISPR av typ II som har varit intressant när det gäller genmodifieringar. Karaktäristiskt för CRISPR-system av denna typ är genen *cas9* och den tillhörande genprodukten Cas9. Det CRISPR/Cas9-system som upptäcktes hos *Streptococcus pyogenes* och *Streptococcus thermophilus* är det som sedan har renats fram och modifierats till dagens genetiska verktyg (Jinek *et al.* 2012).

Cas9 är ett speciellt protein eftersom det ensamt står för en stor del av CRISPR funktionen (Jinek *et al.* 2012). I typ II CRISPR/Cas-system är Cas9 det enda protein som behövs för att bilda komplex med crRNA. Mekanismen i typ II CRISPR-system är relativt enkel. Den kräver endast ett fåtal komponenter: tracrRNA och RNase III som under närvaro av Cas9 bearbetar pre-crRNA till moget crRNA. Det mogna crRNA:t bildar sedan komplex med Cas9 och

protospacern som slutligen klyvs och bryts ned (Gasiunas *et al.* 2012). Den enkla mekanismen beror på Cas9 som är ett multifunktionellt jätteprotein (Makarova *et al.* 2006). Den viktigaste funktionen hos Cas9 återfinns under ingripandet där proteinet kan inducera dubbelsträngsbrott på protospacern. Det är möjligt då proteinet har två klyvande domäner med varsitt aktiva säte som inducerar brott på varsin DNA sträng (Gasiunas *et al.* 2012).

En viktig upptäckt kom 2012 då forskare upptäckte att systemet kunde förenklas ytterligare till ett två-komponentssystem (Doudna & Charpentier 2014). tracrRNA-crRNA komplexet ersätts med sgRNA (eng. single guide RNA) som behåller två väsentliga funktioner: en kort dubbelsträngad sekvens som binder till Cas9-proteinet och en 20 baspar lång ände som motsvarar mål DNA:t. I och med att sgRNA kan skapas på artificiellt håll innebär det att Cas9 är ett programmerbart protein. Förutsätt att det finns passande sgRNA kan dubbelsträngsbrott placeras var som helst i genomet. Därmed har gentekniken fått ett nytt effektivt verktyg (Jinek *et al.* 2012).

Genteknikens användning/tillämpningar av CRISPR/Cas9

Genteknik är ett brett forskningsfält och innefattar alla tillfällen där DNA manipuleras. Upptäckten av Cas9 har således fått ett stort genombrott då proteinet låter forskare göra precisa modifieringar av gener på ett lätt och effektivt sätt. Cas9-baserad genteknik har använts inom forskning riktad mot: genreglering, epigenetik, genetisk screening, gendrivare, GMO och genterapi.

Artificiell genreglering

Genom inaktivering av de två klyvningsdomänerna hos Cas9 kan proteinet byggas om till en transkriptionsfaktor kapabel till att dämpa genuttryck (Terns & Terns 2014). Det modifierade proteinet, dCas9 (eng. dead Cas9) har förlorat sin nukleasaktivitet men kan fortfarande binda till DNA så länge sgRNA som passar uttrycks tillsammans med proteinet (Qi *et al.* 2013). Genom att designa sgRNA som är komplementärt med en gensekvens kommer det inaktiva Cas9-proteinet att bilda komplex med sgRNA:t och binda till DNA-målet. Om detta DNA-mål motsvarar en position i genen som är relevant för transkriptionsapparaten, exempelvis avgörande delar av promotorsekvensen eller RNA polymerasets bindningssäte, kommer det att negativt påverka transkriptionen av den genen. Beroende på var exakt Cas9-sgRNA komplexet binder i gensekvensen kan olika delar av transkriptionen dämpas, till exempel initiering av transkriptionen eller elongering av transkriptet. Den här metoden har fått namnet CRISPRi (eng. CRISPR interference) då CRISPR-systemet har anpassats till att ingripa och tysta genuttryck (Qi *et al.* 2013).

Det är inte bara typ II CRISPR som har modifierats i genreglerande syfte. I typ I CRISPR-system bildar Cas-proteinerna och crRNA tillsammans ett komplex som kallas för Cascade. Cascade-komplexet har till syfte att genomsöka cellen i jakt efter främmande DNA (Rath *et al.* 2015). När komplexet detekterar detta DNA rekryteras ytterligare ett protein, Cas3, till komplexet för att mål-DNA:t ska degraderas. Likt dCas9 kan Cascade-komplexet vid frånvaro av Cas3 programmeras om till ett verktyg för att tysta genuttryck med crRNA-komponenten som guide. I synnerhet är Cascade-komplexets bindning till mål-DNA:t specifik och i princip permanent (Rath *et al.* 2015).

Aktiv genetik
Ett annat fält CRISPR/Cas9-baserad teknik kan appliceras på är forskningen kring gendrivare. Konceptet gendrivare baseras på så kallade självviska genelement. Självviska genelement syftar på gener som ökar i frekvens inom en population över flera generationer trots att genen ifråga inte ökar fitnessen hos bäraren eller har något evolutionärt övertag. Gendrivare kan till och med spridas inom en population även om den påverkar fitnessen negativt. Mendelsk genetik fastslår att vid sexuell reproduktion har båda allelerna 50% möjlighet att föras vidare till avkomman. Gendrivare undgår genetiska konventioner då möjligheten att de ärvs vidare är avsevärt större jämfört med den andra allelen vid sexuell reproduktion (Champer *et al.* 2016).

Med CRISPR/Cas9-baserad genteknik det bli möjligt att skapa konstgjorda gendrivare i labb, något som forskare länge eftersträvat. Artificiella gendrivare skulle göra det möjligt att aktivt påverka organismers genetik och har potentialen att appliceras inom viktiga områden såsom global hälsa, miljöfrågor, och jordbruk (Esvelt *et al.* 2014). Med effektiva gendrivare skulle det bli möjligt att utrota insektsburna infektionssjukdomar, det främsta exemplet malaria. Det skulle dessutom bli möjligt att återinföra känslighet i insekter, parasiter, eller bakteriepopulationer som blivit resistenta mot antibiotika eller olika typer av bekämpningsmedel (Esvelt *et al.* 2014).

CRISPR/Cas9 baserad genterapi
Genterapi syftar på manipulation av arvsmassan med målet att förebygga eller behandla genetiska sjukdomar. Tidigare har genterapi mest behandlat modifieringar i form av gentillsättning, det vill säga införandet av en hel funktionell gen som ska komplettera den felaktiga versionen. Genterapin har till viss del fått en ny form med upptäckten av ett så specifikt och mångfacetterat verktyg som Cas9. Utvecklingen på området genterapi har därmed fortskridit i en rasande fart. CRISPR/Cas9-medierad genterapi har en lång rad tillämpningar, exempelvis möjligheten att göra genomtäckande studier och systematiskt analysera genetiska funktioner (Doudna & Charpentier 2014).

Generellt kan CRISPR/Cas9-ingripande på en DNA sträng få två olika utfall. När Cas9 klyver DNA-strängen skapar den så kallade trubbiga ändar. Det innebär att maskineriet som ska reparera skadan på DNA:t inte kan använda den ena strängen som mall. Detta leder ofta till en icke-homolog sammanfogning av ändarna, NHEJ (eng. non-homologous end joining) (Mali *et al.* 2013). NHEJ är ofta felbenägen och leder till mutationer i form av insättningar eller raderingar av baspar. Den här typen av mutationer kallas för frameshift-mutationer då de leder till att den genetiska läsramen förskjuts och fel protein byggs ihop vid translation av sekvensen.

En annan möjlighet är att det Cas9-inducerade brottet repareras genom homolog rekombination (HDR, eng. homology directed repair) (Cong *et al.* 2013). HDR innebär att en sekvens som är homolog, det vill säga stämmer överens med det kluvna segmentet, rekryteras för att användas som mall. Till skillnad från NHEJ har HDR hög noggrannhet. Genom att leverera en DNA-sekvens tillsammans med Cas9 och sgRNA kan HDR använda den som mall och leda till att en ny DNA-sekvens intar platsen där klyvningen inträffade.

Leveranssystem
En fråga som länge varit viktig inom genterapin är utvecklingen av leveranssystem som gör det möjligt att tillföra de gentekniska verktygen till rätt celltyp och vävnad. Genterapi som fält

utvecklas i takt med att gentekniken förfinats vilket gör det viktigt att fungerande leveranssystem finns att tillgå för genomförandet av *in vivo* experiment (Nelson & Gersbach 2016). De vanligaste leveranssystemen idag är virusvektorer. Virus har via evolution utvecklat sätt att undvika de hinder som finns naturligt i cellen med syfte att stoppa inträde av främmande material. Det är främst tre virustyper som har använts inom gentekniken (Nelson & Gersbach 2016).

Adenoassocierade virus
Adenoassocierade virus (AAV) är bland de mest använda leveransvektorerna idag och ett populärt verktyg att nyttja inom kliniska prövningar och *in vivo* experiment (Nelson & Gersbach 2016). AAV har flera fördelar. Det är säkert, då viruset i första hand inte integrerar in i värdkromosomen, och har i regel höga nivåer av genuttryck. Vidare kan AAV-vektorer modifieras så att de begränsas till enskilda vävnader, till exempel levern, hjärnan, ögat, och hjärt- och skelettmuskulatur (Nelson & Gersbach 2016). Nackdelen med AAV är att genomet är relativt litet. Det består av cirka 5 tusen baspar. Det är inte tillräckligt för att packa in både Cas9 och sgRNA samt transkriptionsfaktorer och genmallar som är nödvändiga för att uppnå de önskade genmodifieringarna. Det är möjligt att fullfölja leveransen ändå genom användandet av ytterligare en vektor, men det är kopplat med lägre effektivitet (Trapani *et al.* 2014).

Lentivirus
En annan populär virusvektor grundar sig på lentivirus. Lentivirus har modifierats för att undkomma begränsningar såsom oförmåga att nå celler som inte genomgår celldelning och risken att orsaka ett immunsvar (Persons 2010). De modifierade vektorerna har en storlek på ungefär 10 tusen baspar och kan infektera både delande och icke-delande celler. En intressant aspekt är att lentiviruset endast uttrycks tillfälligt vilket är en fördel då målet med leveransen ofta är att inducera en engångshändelse såsom en permanent genmodifiering. I det fallet är fortsatt uttryck av de gener som packats in i vektorn onödigt. Lentivirusvektorer används främst i T-lymfocyter och humana stamceller (Nelson & Gersbach 2016).

Adenovirus
Vektorer baserade på adenovirus är i särklass störst då de har en kapacitet uppemot 36 tusen baspar, vilket också är den största fördelen. Det stora genomet gör det möjligt att leverera CRISPR/Cas9-system som inkluderar många olika sgRNA. Adenovirus används främst som ett *ex vivo* verktyg då risken är hög att den inducerar ett immunsvar i levande celler. I det fall där adenovirus använts *in vivo* för att leverera Cas9 har det lett till utvecklandet av antikroppar riktade mot Cas9. Denna respons är inte enbart negativ utan skulle kunna utnyttjas inom cancerrelaterad genterapi där ett immunsvar mot cancersjuka celler skulle vara önskvärt (Nelson & Gersbach 2016).

Främjande av cancerforskning
Ett område som möjligen kan få ett lyft via CRISPR/Cas9-medierad genteknik är forskningen kring cancerbiologi (Barrangou & Doudna 2016). Vid cancerforskning är genetiska analyser väldigt angelägna då sjukdomen har en rad genetiska aspekter. Speciellt intressanta är så kallade tumörsuppressorgener och tumörframkallande onkogener. Hittills baseras mycket av metodiken på att alstra mutationer som antingen ökar eller slår ut funktionen hos de här typerna av gener. Cancerforskningen har till stor del varit fokuserad på embryonala stamceller och genmodifierade musmodeller (GEMMs, från engelskans genetically engineered mouse

models). I stamcellerna har man inducerat mutationer på specifika positioner med hjälp av homolog rekombination och det har varit möjligt för forskare att generera en mängd olika GEMMs (Sánchez-Rivera & Jacks 2015). Problemen har dock varit att homolog rekombination har låg specificitet. Arbetet som krävs för att modifiera stamceller samt uppfödandet av möss med den önskade genotypen är också väldigt tidskrävande.

Inom cancerforskning kan CRISPR/Cas9-systemet tillämpas för att förbättra den redan befintliga metodiken. Med CRISPR/Cas9-medierad genmodifiering blir det lättare utveckla nya GEMM:s på ett sätt som är både snabbare och mer effektivt än tidigare. (Wang *et al.* 2013). Följden blir att forskare lättare kan studera tumörutveckling i detalj. Dessutom går det att skapa ett större bibliotek av cellinjer från embryonala stamceller med olika kombinationer av cancerframkallande mutationer i onkogener och tumörsuppressorer. I och med att den gentekniska metoden förenklas kan det alstras och studeras nya, mer komplexa GEMM:s med distinkta genotyper som ett första steg i ledet mot individualiserad cancerterapi.

Förutom att skapa nya GEMM:s kan CRISPR/Cas9 användas för att vidare studera de musmodeller som finns idag. Genom Cas9 kan nya mutationer introduceras i existerande GEMM:s för att undersöka huruvida mutationer samarbetar med varandra och eventuellt farliga interaktioner kan utvärderas. CRISPR/Cas9 möjliggör också genetiska modifieringar i somatiska celler. År 2013 gjordes ett försök där forskare utnyttjade CRISPR/Cas9 för att inducera mutationer i genen *trp53*, en välkänd tumörsuppressorgen, under en rad olika förhållanden (Malina *et al.* 2013). Det visade sig vara möjligt att med Cas9 ändra i alleler och selektera för just den mutation man skapat. Detta gick att göra i cellinjer från både möss och människor. Försöket kunde dessutom göras *ex vivo* på levande möss. *Ex vivo* innebär att cellerna tas ut från levande vävnad, modifieras, och sedan återförs till kroppen. I detta fall injicerades lymfatiska celler med sgRNA-Cas9. Med CRISPR/Cas9 blir det genomförbart att direkt modifiera arvsmassan hos vuxna möss och förändra sekvensen i cancerrelevanta gener (Xue *et al.* 2014).

HIV-forskning

Ett annat fält som har tittat närmare på CRISPR/Cas9-medierad genteknik är forskningen på HIV (Guan *et al.* 2016). Idag finns det behandling som håller HIV-infektionen i schack genom att hindra virusets från att replikera men ännu finns det inte ett fullständigt botemedel inom räckhåll. Dagens behandling innebär att viruset fortfarande kan stanna kvar i kroppen genom att stänga av transkriptionsverksamheten och ligga vilande i värdens DNA. Att hitta ett sätt att bekämpa den inaktiva formen av viruset är en av nyckelfrågorna för att i framtiden kunna eliminera viruset från infekterade individer (Ebina *et al.* 2013). En möjlig utväg är att guida Cas9 i riktning mot virusgenomet genom att skapa ett passande sgRNA och på så sätt inducera mutationer. HIV-genomet är linjärt och innehåller en så kallad LTR (eng. long terminal repeats) som finns i båda ändar av genomet. LTR-regionen är essentiell för virusets genuttryck då den fungerar som promotor och transkriptionsfaktor. Genom att designa sgRNA som matchar denna region är det möjligt att tysta viruset. Eftersom LTR finns på båda ändar av virusgenomet och regionerna är kopior av varandra kan Cas9 dessutom användas för att avlägsna viruset från värdcellens kromosom (Ebina *et al.* 2013).

Vidare forskning har gjorts på HIV *in vitro* för att utveckla mer precisa metoder som kan avlägsna hela HIV-genomet från den infekterade cellen med CRISPR/Cas9-baserad teknik (Kaminski *et al.* 2016). Framgångsrika försök har gjorts där Cas9 och sgRNA modifierades

till att känna igen de två olika LTR-segmenten i ändarna av HIV-genomet. Cas9-sgRNA konstruktionen injicerades in i en speciell variant av immunförsvarets T-hjälparceller som är speciellt mottagliga för latenta HIV-infektioner. T-hjälparcellerna var hämtade från en mänsklig cellinje, vilket ger studien ökad relevans. En rad intressanta fynd gjordes. Till att börja med visar resultaten att det med hjälp av Cas9-sgRNA går att effektivt avlägsna flera kopior av det integrerade virusgenomen från olika platser i värdcellens kromosomer (Kaminski *et al.* 2016). Vidare kunde studien påvisa att det avlägsnade virala DNA:t bryts ner vilket hindrar det från att infektera cellen ånyo på en annan plats i arvsmassan. Med fortsatt uttryck av Cas9-sgRNA minskade risken för ny infektion av HIV och cellen blev oförmögen att underhålla viral replikation. Skyddet mot viruset ökade dessutom i samband med mängden Cas9 som uttrycktes.

I samband med försöket undersöktes de potentiella negativa effekterna av Cas9-aktiviteten. Allt som allt kunde ingen signifikant eller kvarstående negativ påföljd upptäckas gällande genuttrycket av gener positionerade nära klyvningssajten. Inte heller kunde forskarna upptäcka att Cas9 inducerat mutationer på oönskade positioner i värdgenomet som bieffekt (Kaminski *et al.* 2016). En avslutande upptäckt som gjordes var att friska T-hjälparceller kunde skyddas från att infekteras genom leverans av Cas9-sgRNA via lentivirusvektorer. Detta *ex vivo* experiment ledde till inaktivering av virusreplikation och inhiberade infektionen av HIV i humana celler (Kaminski *et al.* 2016).

CRISPR/Cas9 systemets förebyggande förmåga mot HIV har undersökts ytterligare. Ett CRISPR/Cas9-system, inklusive sgRNA, som är optimerat för mänskliga celler kan användas för att angripa viruset under olika steg av virusets livscykel och i olika delar av virus-DNA:t (Liao *et al.* 2015). Försöket designas med mål att undersöka flera variabler och utförs både i en human cellinje av T-celler och humana pluripotenta stamceller. Cas9 kan attackera viruset i två steg. Det kan agera direkt på virusets arvsmassa när det först går in i värdcellen och fortfarande befinner sig utanför cellkärnan, eller efter att viruset har integrerat in i värdcellens DNA. I båda fallen räcker det med Cas9-aktivitet för att störa infektionen. Cas9 kan leda till en permanent inhibering när det agerar mot det integrerade virusets genuttryck. Oavsett när i virusets livscykel som Cas9 angriper ökar effektiviteten om det levereras till cellen tillsammans med flera olika sgRNA. Det ökar antalet möjliga måltavlor och leder till att mutationer introduceras flerfaldigt i viruset (Liao *et al.* 2015). Dessutom tyder data på att insättande av ett konstant uttryckt CRISPR/Cas9-system kan ge ett långsiktigt skydd mot HIV-1 i T-lymfocyter (Liao *et al.* 2015).

Genterapi och Duchennes muskeldystrofi

Duchennes muskeldystrofi (DMD) är en högintressant sjukdom från ett genterapeutiskt perspektiv eftersom det är en monogen sjukdom. Det innebär att den orsakas av skador på en enda gen. Skadorna innefattar mutationer som orsakar sjukdomen genom raderingar av ett eller flera exon, det vill säga kodande regioner av genen. Raderingen leder till en ny läsram och att fel proteinkedja byggs vid translation. Produkten av genen är proteinet dystrofin. Dystrofin är ett stort strukturprotein som är essentiellt för cellmembranet i muskelceller. Symptomen från DMD innefattar förlorad rörlighet och fortskridande muskelsvaghet då musklerna i kroppen degenererar. Duchennes muskeldystrofi leder till förkortad livslängd och för tidig död, ofta i samband med hjärtproblem eller att andningsapparaten fallerar. Sjukdomen är recessiv och X-bunden, därav är det nästan bara pojkar som drabbas (Long *et al.* 2014) (Nelson *et al.* 2016).

En annan anledning till att DMD är ett angeläget mål för genterapi är att det i nuläget inte finns något botemedel mot sjukdomen. Den enda behandling som är tillgänglig är i form av kortison som endast har en lindrande effekt. Trots att den genetiska bakgrunden länge varit väl karaktäriserad har rätt teknik saknats. Med CRISPR/Cas9 har dock nya dörrar öppnats. Försök har gjorts för att undersöka huruvida genetiska modifieringar kan förebygga sjukdomen. Long *et al* (2014) designade en studie där CRISPR/Cas9-baserad genteknik användes för att modifiera möss med mutationen. Studien genomfördes på zygoter som injicerades med Cas9, sgRNA, och en kort gensekvens med funktion att fungera som rättningsmall. Resultatet visade att även om korrigering ej skedde i alla muterade celler räckte det med att minst 17% av cellerna hade förlorat mutationen och korrigerats för symptom inte skulle utvecklas (Long *et al.* 2014). Därmed kunde denna studie visa att *in vivo* användning av CRISPR/Cas9-medierad genteknik har förmågan att korrigera mutationen som orsakar DMD och förhindra att sjukdomen uppstår.

Ytterligare *in vivo* experiment har genomförts med CRISPR/Cas9-baserad genteknik och fler metoder har utforskats. Ett alternativ är att avlägsna specifika exoner för att återställa läsramen. Metoden resulterar i ett funktionellt om något förkortat protein (Nelson *et al.* 2016). I det här fallet användes redan fullvuxna möss som injicerades med CRISPR/Cas9-system i somatiska celler. Systemet kunde levereras framgångsrikt till den relevanta vävnaden med hjälp av adenoassocierade virus (AAV), vilket är lovande för framtida forskning. Det har visats att CRISPR/Cas9 kan levereras med AAV vektorer både lokalt till en enskild muskel och till ett organsystem, exempelvis hjärtat (Tabebordbar *et al.* 2016)

Diskussion

En sak står säker, med upptäckten av CRISPR/Cas9 och systemets oändliga potential ser framtiden för genteknik onekligen ljus ut. Man kan säga att genetiken har inlett en ny era och vissa forskare menar att Cas9 kan jämföras med den inverkan uppfinnandet av PCR-maskinen hade på 90-talet. Den största orsaken till CRISPR/Cas9-systemets genomslag är hur lätthanterligt och kostnadseffektivt det är som verktyg. Det finns andra metoder vars effektivitet avseende genmodifieringar inte skiljer sig avsevärt från Cas9. Problemet med metoder som dessa, till exempel ZFN och TALEN:s, är det faktum att det krävs mycket förberedande arbete med proteinerna som ska utföra genmodifieringarna (Gaj *et al.* 2013).

Framtida utmaningar

För CRISPR/Cas9-baserad genterapi och sjukdomsforskning ser framtiden det lovande ut. Studierna som gjorts på teknologin fokuserar hittills mycket på den potential som Cas9 har som genetiskt verktyg. De publikationer som finns är till stor grad konceptbevis, alltså ämnade att bevisa vad som är möjligt att göra med Cas9. Emellertid kvarstår många viktiga hinder att överkomma innan forskningen appliceras på kliniska situationer. En av de främsta utmaningarna är att hitta ett effektivt leveranssystem som gör det möjligt att introducera CRISPR/Cas9 till cellen i fråga på ett effektivt sätt utan att störa cellens funktion (Nelson & Gersbach 2016). Tidigare har jag beskrivit de leveranssystem som är populära idag och som använts till stor framgång i *in vivo* försök. Ändå är effektiviteten mycket lägre än önskat. För att leveransen ska vara tillräcklig injiceras försöksdjuren ofta med doser som är långt över det

som skulle vara rimligt eller tillåtet i en klinisk studie på människor. Om man går in i mer detalj har dessutom alla de redovisade leveranssystemen sina nackdelar.

Lentivirus har den stora nackdelen att de kan integrera var som helst i värdens DNA. Därmed är risken stor att vektorn slår ut funktionen hos en essentiell gen. De är dessutom dyrt att producera lentivirusvektorer i tillräckligt stor mängd (Persons 2010). AAV-vektorer kan specificeras till enskilda vävnader och är relativt ofarliga, men leveranskapaciteten är till större delen otillräcklig. Ett annat hinder för klinisk applicering av AAV är det faktum att en signifikant andel av jordens befolkning har antikroppar ämnade att neutralisera adenoassocierade virus (Nelson & Gersbach 2016). Inte förrän problematiken gällande effektiv leverans av CRISPR/Cas9-system har lösts kan man överväga om CRISPR/Cas9 baserade genmodifieringar kan användas i terapeutiskt syfte.

En annan utmaning är att utreda till vilken grad Cas9 leder till bieffekter som till exempel genmodifieringar på oönskade positioner i genomet. Ett Cas9-protein som inducerar klyvning och därmed mutationer på fel plats kan potentiellt vara mycket farlig. För att användning av CRISPR/Cas9 inom mänsklig genterapi ska vara genomförbart måste systemet vara fulländat. De studier jag tittat på har än så länge inte hittat bevis på att Cas9 skulle ha allvarliga bieffekter i det här avseendet. Dock är det viktigt att poängtera att dessa antaganden baseras på undersökning av positioner i genomen som förmodas vara mål för ett missriktat Cas9. Det är alltså baserat på bioinformatiska förutsägelser. För att bekräfta att Cas9-aktivitet inte ger några bieffekter krävs det *in vivo* verifiering samt sekvensering och analys av hela genomet.

Det finns dessutom en återkommande problematik som har tagits upp i flera studier. Ett av de stora målen med CRISPR/Cas9-baserad genterapi är att genomföra permanenta genkorrigeringar i somatiska celler. För att uppnå det krävs det att dubbelsträngsbrottet som Cas9-proteinet har inducerat repareras med homolog rekombination. Dock har det observerats att homolog rekombination rent naturligt förekommer med lägre frekvens än icke-homolog sammanfogning. Dessutom är homolog rekombination väldigt ineffektiv i celler som redan har genomgått celldelning (Long *et al.* 2014).

Etiska frågeställningar

Det är inte bara tekniken som utmanar tillämpandet av CRISPR/Cas9-baserad genterapi. Eftersom genterapi är ämnat att användas på människor som en form av behandling medföljer en rad etiska frågeställningar som inte kan åsidosättas. Till att börja med måste tekniken vara i fulländad innan den kan övervägas som ett seriöst alternativ inom sjukvården. I dagsläget är det tillåtet att genomföra genmodifieringar på mänskliga celler så länge cellerna i fråga är somatiska celler. När det gäller celler från arvslinjen, det vill säga könsceller eller andra celler som står för den tidiga utvecklingen, är det i nuläget förbjudet att modifiera dessa.

Tidigare under 2016 publicerades en artikel av en kinesisk forskargrupp som genomfört en CRISPR/Cas9-baserad studie på humana embryon (Kang *et al.* 2016). Embryona som användes i studien var inte livsdugliga och hade donerats till forskningen. Alltjämt fick artikeln mycket kritik och det var i samband med dess publicering som diskussionen om förbud mot användandet av just humana embryon hettade till. Jag förutspår att diskussionerna kring etiska aspekter bara kommer att öka med tiden. I dagsläget är tekniken inte där, men det är inte omöjligt att CRISPR/Cas9-baserad genteknik i framtiden kan användas för att permanent modifiera mänskliga celler.

Utmaningarna är många när det avser CRISPR/Cas9-systemets framtida utveckling, men det är viktigt att notera att forskare är väl medvetna om vad som kvarstår att undersöka innan tekniken är fulländad. Med tanke på den utveckling av CRISPR-teknik som har skett hittills tyder mycket på att dessa hinder kommer att övervinnas.

Tack

Tack till Josefin Pettersson, Linnéa Hamberg och Mariam Khammari för värdefull återkoppling. Stort tack också till min handledare Anna Larsson.

Referenser

Barrangou R, Doudna JA. 2016. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. Nature Biotechnology 34: 933–941.

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. 2007. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. Science 315: 1709–1712.

Bolotin A, Ouinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. Microbiology-Sgm 151: 2551–2561.

Champer J, Buchman A, Akbari OS. 2016. Cheating evolution: engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations. Nature Reviews Genetics 17: 146–159.

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.

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.

Doudna JA, Charpentier E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science 346: 1258096.

Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y. 2013. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. Scientific Reports 3: 2510.

Esvelt KM, Smidler AL, Catteruccia F, Church GM. 2014. Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. eLife 3: e03401.

Gaj T, Gersbach CA, Barbas III CF. 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends in Biotechnology 31: 397–405.

Garneau JE, Dupuis M-È, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. Nature 468: 67–71.

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–E2586.

Guan L, Han Y, Zhu S, Lin J. 2016. Application of CRISPR-Cas system in gene therapy: Pre-clinical progress in animal model. DNA Repair 46: 1–8.

Horvath P, Barrangou R. 2010. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. Science 327: 167–170.

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.

Kaminski R, Chen Y, Fischer T, Tedaldi E, Napoli A, Zhang Y, Karn J, Hu W, Khalili K. 2016. Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. Scientific Reports 6: 22555.

Kang X, He W, Huang Y, Yu Q, Chen Y, Gao X, Sun X, Fan Y. 2016. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 33: 581–588.

Levy A, Goren MG, Yosef I, Auster O, Manor M, Amitai G, Edgar R, Qimron U, Sorek R. 2015. CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA. Nature 520: 505–510.

Liao H-K, Gu Y, Diaz A, Marlett J, Takahashi Y, Li M, Suzuki K, Xu R, Hishida T, Chang C-J, Esteban CR, Young J, Belmonte JCI. 2015. Use of the CRISPR/Cas9 system as

an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. Nature Communications 6: 6413.
Long C, McAnally JR, Shelton JM, Mireault AA, Bassel-Duby R, Olson EN. 2014. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9–mediated editing of germline DNA. Science 345: 1184–1188.
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 1: 7.
Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, van der Oost J, Backofen R, Koonin EV. 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. Nature Reviews Microbiology 13: 722–736.
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.
Malina A, Mills JR, Cencic R, Yan Y, Fraser J, Schippers LM, Paquet M, Dostie J, Pelletier J. 2013. Repurposing CRISPR/Cas9 for in situ functional assays. Genes & Development 27: 2602–2614.
Nelson CE, Gersbach CA. 2016. Engineering Delivery Vehicles for Genome Editing. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering 7: 637–662.
Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, Thakore PI, Moreb EA, Rivera RMC, Madhavan S, Pan X, Ran FA, Yan WX, Asokan A, Zhang F, Duan D, Gersbach CA. 2016. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Science 351: 403–407.
Nuñez JK, Kranzusch PJ, Noeske J, Wright AV, Davies CW, Doudna JA. 2014. Cas1–Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity. Nature Structural & Molecular Biology 21: 528–534.
Persons DA. 2010. Lentiviral Vector Gene Therapy: Effective and Safe? Molecular Therapy 18: 861–862.
Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. Cell 152: 1173–1183.
Rath D, Amlinger L, Hoekzema M, Devulapally PR, Lundgren M. 2015. Efficient programmable gene silencing by Cascade. Nucleic Acids Research 43: 237–246.
Sánchez-Rivera FJ, Jacks T. 2015. Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. Nature Reviews Cancer 15: 387–395.
Staals RHJ, Jackson SA, Biswas A, Brouns SJJ, Brown CM, Fineran PC. 2016. Interference-driven spacer acquisition is dominant over naive and primed adaptation in a native CRISPR–Cas system. Nature Communications 7: 12853.
Tabebordbar M, Zhu K, Cheng JKW, Chew WL, Widrick JJ, Yan WX, Maesner C, Wu EY, Xiao R, Ran FA, Cong L, Zhang F, Vandenberghe LH, Church GM, Wagers AJ. 2016. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. Science 351: 407–411.
Terns RM, Terns MP. 2014. CRISPR-based technologies: prokaryotic defense weapons repurposed. Trends in Genetics 30: 111–118.
Trapani I, Colella P, Sommella A, Iodice C, Cesi G, Simone S de, Marrocco E, Rossi S, Giunti M, Palfi A, Farrar GJ, Polishchuk R, Auricchio A. 2014. Effective delivery of large genes to the retina by dual AAV vectors. EMBO Molecular Medicine 6: 194–211.

VandenDriessche T, Chuah MK. 2016. CRISPR/Cas9 Flexes Its Muscles: In Vivo Somatic Gene Editing for Muscular Dystrophy. Molecular Therapy 24: 414–416.
Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. 2013. One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. Cell 153: 910–918.
Xue W, Chen S, Yin H, Tammela T, Papagiannakopoulos T, Joshi NS, Cai W, Yang G, Bronson R, Crowley DG, Zhang F, Anderson DG, Sharp PA, Jacks T. 2014. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. Nature 514: 380–384.
Yosef I, Goren MG, Qimron U. 2012. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in Escherichia coli. Nucleic Acids Research 40: 5569–5576.

[Hur kan CRISPR användas inom mänsklig genterapi?]: etisk bilaga

Ebyon Mohamud Hassan

Självständigt arbete i biologi 2016

Introduktion

CRISPR (eng. clustered regularly interspaced short palindromic repeats) är namnet på ett biologiskt system som upptäcktes nyligen hos prokaryota organismer (Barrangou *et al.* 2007). Funktionen hos CRISPR kan liknas vid det immunförsvar som finns hos människor då det ger värdcellen möjligheten att avvärja angrepp från angripande virus. Mekanismen baseras på att CRISPR-systemet och associerade proteiner kan känna igen främmande DNA och degradera det. År 2012 kom forskare fram till att ett av de här proteinerna, Cas9, med enkla modifieringar kan programmeras om till att klyva vilken DNA sekvens som helst (Jinek *et al.* 2012).

Med denna upptäckt fick det gentekniska forskningsfältet tillgång till ett kraftfullt verktyg. Cas9 baserad genteknik har potentialen att appliceras på ett flertal områden, däribland genterapi. Det har dock väckt ett antal etiska frågor. Bör det vara tillåtet att använda Cas9 för att introducera permanenta modifieringar hos människor?

Ett väldigt starkt argument för tillåtandet av mänsklig genteknik är möjligheten att kunna behandla sjukdomar som tidigare varit omöjliga att råda bot på och som skapat stort mänskligt lidande. Sjukdomar som möjligen skulle kunna behandlas inkluderar Duchennes muskeldystrofi, HIV, och eventuellt cancer.

Det finns dock de som är skeptiska till användandet av genteknik på människor. I nuläget är det ledande motargumentet bristen på kunskap gällande både konsekvenserna och verktyget i sig. För att Cas9-medierad genterapi ska vara relevant måste tekniken vara så perfekt som möjligt. Till exempel behövs ett sätt att effektivt leverera proteinet till relevanta celler och eliminering av risken för bieffekter av proteinets aktivitet. I dagsläget är detta fortfarande något som forskare jobbar på.

Ett ytterligare motargument är det så kallade sluttande planet. Vissa menar att risken är stor att tekniken som tagits fram för att behandla sjukdomar i framtiden kan användas för att modifiera gener endast i kosmetiska syften. Var ska gränsen dras när föräldrar får möjligheten att påverka arvsmassan hos sina barn?

Avslutning

Tekniken är långt ifrån färdigutvecklad men jag tycker att det är viktigt att samtal kring de etiska aspekterna påbörjas redan nu så att samhället i stort är förberett när det en dag blir möjligt att genomföra permanenta genmodifieringar på människor. Personligen ser jag positivt på mänsklig genterapi då det kan minska lidandet hos det mänskliga samfundet, vilket är ett mycket övertygande argument. Att hjälpa andra borde vara ett fokus när det kommer till forskning som denna. I nuläget sållar jag mig däremot till skeptikerna då vi vet alldeles för lite och risken för dubbla användningsområden kan inte underskattas. Med den kunskap som finns idag är genterapi på människor inte relevant. Det finns en framtida potential för mänsklig genteknik, men för att den potentialen ska uppfyllas finns det ett stort behov för uppsättande av strikta regelverk och konsensus inom forskarsamfundet.

Referenser

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. 2007. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. Science 315: 1709–1712.

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.