

Bakteriers immunsystem

åbner døren til en ny æra for biologien

Bakteriers immunforsvar mod virus kaldet CRISPR-Cas viser vejen til en teknologi, der rummer et enormt potentiale indenfor bioteknologien. En teknologi, der præcist og effektivt kan ændre gener i organismer, og som allerede har vist resultater i jordbruget.

CRISPR-Cas er det sprøde akronym for bakteriers forsvar mod virus, et system som kan genkende virus-DNA og klippe det over. Systemet blev opdaget i 2012, og ikke længe efter blev det klart, at CRISPR-Cas er et effektivt værktøj til at klippe og ændre i DNA, ikke bare i bakterier, men også i dyr og planter. Nu står vi overfor en ny revolution i biologi og medicin kaldet genredigering eller præcisionsforædling. Det vil give os mulighed for at ændre en organismes kodende DNA (dvs. mutere det) uden at tilføre fremmed arvemateriale. Dette har store perspektiver indenfor grundforskning, for jordbrug og måske også indenfor medicin.

Når det bakterielle immunsystem er i operation, kan det fungere således: 1) en viruspartikel lander på bakterien og injicerer sit DNA med henblik på at tage kontrol over cellen; 2) ved hjælp af CRISPR-Cas opdager bakterien, at DNA-strengen ikke er af egen oprindelse, men kommer fra en virus; 3) ved hjælp af CRISPR-Cas klipper bakterien DNA-strengen over, og dermed er virus-DNA'et uskadeliggjort.

Et system med umådeligt potentiale.

I bakterier eksisterer der flere versioner af dette system, der varierer i kompleksitet. De fleste af disse systemer involverer flere forskellige Cas-proteiner, der alle klipper i DNA. Cas-proteinerne guides frem af et lille stykke RNA, der matcher det DNA, som skal klippes over. I praksis er det et forbløffende simpelt system til at genkende og klippe i DNA, som nu har vist sig at kunne overflyttes til

andre organismer og som spås en lovende fremtid som bioteknologisk redskab. Redskabet består af et protein (Cas9), der er i stand til at klippe dobbeltstrengt DNA over, samt en kort designet RNA-streng, der guider proteinet til det DNA, der ønskes ændret. De DNA-sekvenser, der koder for redskabet to elementer (dvs. protein og RNA-streng), kan med nuværende teknikker forholdsvis simpelt inkorporeres i en organismes arvmasse, hvorefter redskaberne bliver syntetiseret af organismen selv. Når redskaberne har udført deres opgave, er det tillige relativt simpelt at avle redskabssekvenserne ud af arvmassen igen. Resultatet vil være en organisme med de ønskede ændringer i arvmassen, men uden spor af det anvendte biologiske værktøj. I de tre år, der er gået siden opdagelsen, er der sket en eksplosiv vækst af forskning, der benytter sig af genredigering ved hjælp af CRISPR-Cas9. I forhold til andre metoder har CRISPR-Cas9-systemet en række fordele. Det er enkelt at designe det RNA, der skal guide Cas9 hen til det sted, hvor der skal klippes. Arbejdsprocessen er relativt simpel, hurtig og billig, hvilket gør det let at opskalere størrelsen af eksperimenter efter behov.

Genterapi

CRISPR-Cas9-teknologien spås en strålende fremtid både inden for grundforskning og bioteknologien. Man har demonstreret CRISPR-Cas9 systemets funktionsdygtighed i et væld af modelorganismer lige fra gåsemd (modelorganismen for højere planter) til salamandre, zebrafisk og mus. Man

Forfatterne



Jeppe Thulin Østerberg er ph.d.-studerende, jethu@plen.ku.dk



Michael Palmgren er professor, dr. scient. palmgren@plen.ku.dk

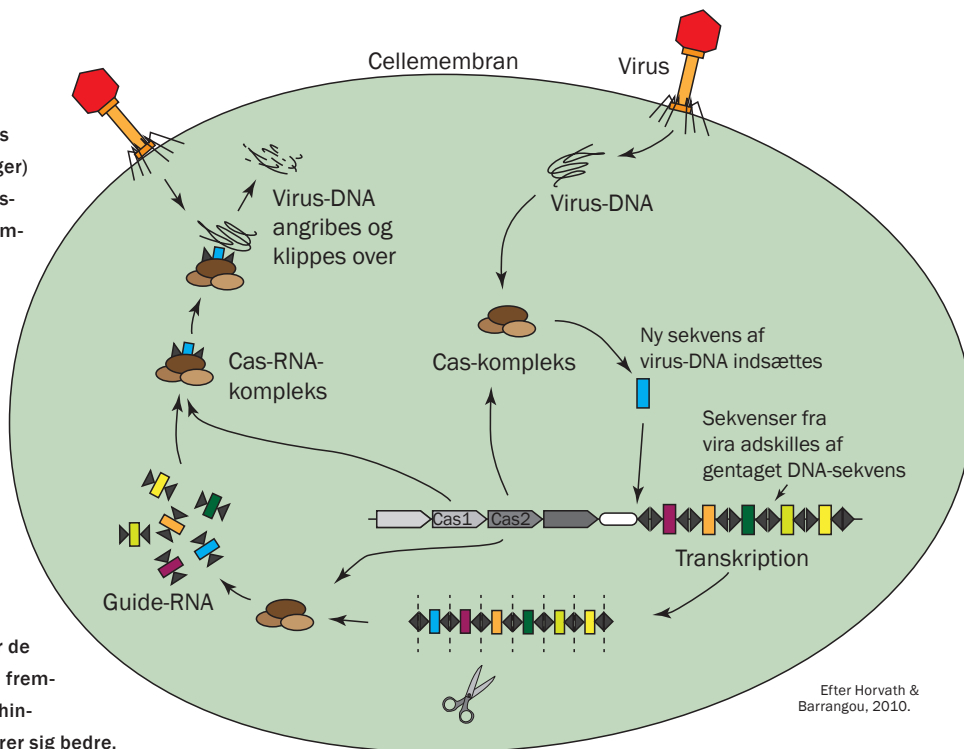
Begge ved Institut for Plante- og Miljøvidenskab Københavns Universitet

Bakteriers immunforsvar

Immunforsvaret i bakterier beskytter mod virus (som også kaldes bakteriofager – eller blot fager) og mod små cirkulære DNA-strenger kaldet plasmider. Når DNA fra en virus eller et plasmid kommer ind i en bakterie, udtrykkes generne fra denne fremmede DNA. Der bliver derved dannet proteiner, der hjælper sygdommen med at virke og formere sig. For at forhindre dette har bakterier et system, der gemmer små sekvenser fra det fremmede DNA og bruger det til at genkende sygdommen næste gang, den trænger sig på.

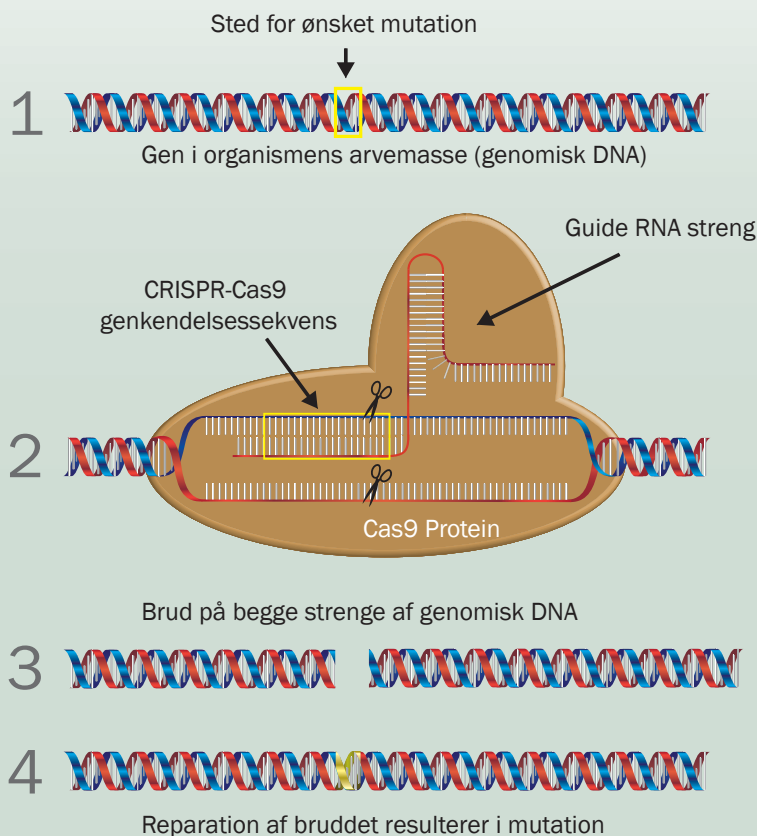
Systemet benytter sig af de fremmede sekvenser sammen med en række proteiner, der er i stand til at klippe i DNA. Når sekvenserne kombineres med disse proteiner, danner de et kompleks, der er i stand til at genkende den fremmede DNA og klippe den i stykker. Således forhindres sygdommen i at få fat, og bakterierne klarer sig bedre.

Navnet CRISPR-Cas har sit ophav i måden, hvorpå de fremmede DNA-sekvenser lagres i bakteriernes immunhukommelse. De fremmede sekvenser befinder sig i en region af bakteriernes arvemasse adskilt af en regelmæssigt gentaget DNA-sekvens. Denne



struktur er ophav til betegnelsen CRISPR, som er en forkortelse af *Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats*, og det forklarer også betegnelsen for Cas-proteinerne, der simpelthen står for CRISPR associated.

Genredigering med CRISPR-Cas9



Princippet i at bruge CRISPR-Cas9-systemet til genredigering:

- 1) En RNA-guidesekvens designes, så den matcher DNA-koden i arvemassen det sted, man ønsker at ændre;
- 2) RNA-guidesekvensen indføres i organismen sammen med Cas9-proteinet, der kan klippe i DNA. Cas9-proteinet ledes af RNA-guidesekvensen frem til det matchende sted i arvemassen;
- 3) Efter at være blevet ledt på rette plads klipper Cas9-proteinet organismens dobbeltstrengede DNA over;.
- 4) Organismens eget system til at vedligeholde arvemassen reparerer det dobbeltstrengede brud, men systemet har en relativt høj fejlrate, så der kan opstå fejl (ændringer = mutationer) i det reparerede DNA.



har desuden vist, at CRISPR-Cas9 systemet fungerer i humane celler. I humane celler åbner dette op for et væld af muligheder, fx at skabe store biblioteker af celler med forskellige mutationer for så at undersøge virkningen af nye lægemiddelkandidater. En anden mulighed er at bruge systemet til genterapi. Det er i teorien muligt at reparere anlæg for nogle arvelige sygdomme ved at redigere i arvemassen. Ved hjælp af CRISPR-genredigering er det således lykkedes forskere at kurere mus for stær ved at rette en af de arvelige mutationer, der forårsager sygdommen. Det er dog tvivlsomt, om genterapi er noget, vi vil se i mennesker i den nære fremtid. Da det tidligere i år blev rapporteret, at et forskerhold havde brugt CRISPR-Cas9 til at redigere i arvemassen i humane embryoer, blev der fra mange forskeres side råbt vagt i gevær, og diskussionen om de etiske retningslinjer for human genterapi er stadig langt fra løst.

Erfaringer med CRISPR-Cas9 i jordbruget

Interessant nok er situationen næsten omvendt i planter. I arbejdet med forædling af kulturplanter har man siden midten af det tyvende århundrede benyttet sig af tilfældigt genererede mutationer. Traditionelt foregår det ved at benytte radioaktiv stråling eller kemiske mutagener til at skabe en stor mængde tilfældige mutationer i planter. Derefter udvælger man interessante mutationer

og bruger muterede planter med disse træk i den videre avl. Mutationsforædling af kulturplanter er altså accepteret praksis i dag. Til gengæld er der en stærk modvilje mod genmodificerede planter – dvs. planter der har fået tilføjet gener fra andre organismer for at give dem ønskede kvaliteter.

Gener der er flyttet (*transporteret*) mellem organismer på tværs af artsbarrierer kaldes *transgener*. Når CRISPR-Cas9 anvendes til at skabe en mutation i en plante, vil den første generation af planter efter forsøget godt nok være "transgene", da CRISPR-Cas9-værktøjet (som indbefatter transgener) stadig findes i dem, men efter et antal tilbagekrydsninger med den oprindelige plante, vil dette værktøj være forsvundet, og tilbage vil være planter, der er identiske med udgangspunktet på nær den ønskede mutation. De resulterende planter er således ikke transgene. Spørgsmålet er så, om brug af CRISPR-Cas9-systemet skal betragtes som genmodificering og de resulterende planter som GMO'er, eller om systemet frit kan bruges som et supplerende værktøj i almindelig planteforædling. Dette juridiske spørgsmål er ikke endeligt løst i EU, men i Sverige har den regulerende myndighed for nylig slået fast, at planter forædlet ved brug af CRISPR-Cas9, og som ikke længere bærer på transgent arvemateriale, ikke skal kategoriseres som GMO.

↑ Meldug er en svamp, der angriber bl.a. hvede med store tab for landbruget verden over. Med CRISPR-Cas9-teknikken kan forskere fremavle planter, der er modstandsdygtige over for meldug.

Foto: Lise Nistrup Jørgensen

Ny GMO-teknik



Den franske forsker Emmanuelle Charpentier (nu på Umeå Universitet) opdagede sammen med amerikaneren Jennifer Doudna *CRISPR-Cas9* systemet i 2012. Emmanuelle Charpentier er på *Time Magazines* liste over verdens 100 mest indflydelsesrige personer i 2015.

Foto: Wikimedia Commons

Når en mutation opstår, skyldes det oftest en fejl i det reparationsmaskineri, der findes i celler til at beskytte deres arvemasse. En oplagt metode til at generere mutationer er derfor at slå DNA-strengen i stykker, så cellen tvinges til at reparere det. I alt liv er arvemassen gemt i dobbeltstrengt DNA, og når man forsøger at slå denne dobbeltstreng i stykker, kan det derfor ske, at en enkelt streng slås i stykker et sted eller, at begge strenge slås i stykker eller klippes over. Disse dobbeltstrengsbrud har adskillige fordele: I enkeltstrengsbrud reparerer den ødelagte DNA-streng ved, at de manglende basepar kopieres fra den intakte del af dobbeltstrengen. I tilfælde, hvor begge strenge er brudt, kan dette ikke lade sig gøre, og en af to reparationsmekanismer sætter ind.

Den første mekanisme forsøger at sætte de to brudte stykker sammen igen. Denne mekanisme har en høj rate af fejl og er derfor særdeles interessant, hvis man ønsker at mutere DNA'et. Den anden mekanisme benytter sig af DNA, der ligner enderne af den DNA-streng, der blev brudt. Dette nye stykke DNA bliver brugt som skabelon for at reparere strengen, og er som oftest den anden tilsvarende DNA på den til-

svarende kromosomkopi. Det kan dog også være andet DNA, og man kan eksperimentelt tilføje DNA med en del, der ligner de brudte ender. I dette stykke DNA kan man frit ændre på den kode, der ligger imellem de ende-lignende stykker. Det giver mulighed for meget præcist at redigere DNA-sekvensen omkring brudstedet og kaldes genredigering. Forskere har derfor længe været interesseret i metoder, hvormed man kunne klippe DNA-dobbeltstrengene over præcist på de steder, hvor man ønsker at redigere.

Fokus har i mange år været på at designe sammensatte proteiner bestående af en nuklease, en type protein, der er i stand til at kløve DNA-strengene, og proteiner, der binder DNA ved specifikke DNA-koder. Designet af sådanne proteiner har dog vist sig at være særdeles omstændeligt, da kodningen af de dele af proteinerne, der genkender DNA, kræver sammensætningen af mange mindre stykker syntetiseret DNA. Selvom der er sket store fremskridt på dette område de seneste år, er disse fusionsproteiner nu ved at blive overhalet indenom af *CRISPR-Cas9*-systemet, der dukkede op i 2013 fra en til dels uventet retning, den mikrobiologiske forskning i bakteriers adaptive immunforsvar.

Det første eksempel på en kulturplante, der er blevet ændret med *CRISPR-Cas9*, er brødhvede. Allerede i september 2014 viste kinesiske forskere således, at de ved hjælp af denne teknik vil kunne fremavle planter, der er modstandsdygtige mod den skadelige svamp meldug, der angriber hvede og bygger med store negative følger for udbyttet. For-

skerne havde kunnet slukke for alle seks kopier af et gen og dets varianter i hvede, der koder for et protein, der sidder på overfladen af hvedes celler, og som meldugsporerne skal genkende, inden de kan spire. Det bemærkelsesværdige er, at hvedeplanternes modstandsdygtighed ikke skyldtes, at de havde fået tilført nyt DNA – i princippet kunne disse mutationer lige så godt være opstået i naturen.



Forædling af kulturplanter som ris har betydet, at der over tid er akkumuleret tilfældige mutationer, der påvirker risens egenskaber negativt. *CRISPR-Cas9* vil være et oplagt værktøj til at reparere disse mutationer.

Foto: Colourbox

I november 2015, lige før deadline af denne artikel, kom et større gennembrud i bekæmpelsen af plantesygdomme. Tre grupper fra hhv. Kina, USA og Saudi-Arabien kunne vise, at de havde overført *CRISPR-Cas9*-systemet til planter, således at de nu er beskyttet mod udvalgte virus, der angriber planter. Virus i mange former angriber planter og forårsager enorme skader i jordbruget hvert år. De udviklede planter kunne genkende virus, når det kom ind i deres celler, og klippede derefter effektivt deres DNA over ved hjælp af *CRISPR-Cas9*-systemet.

CRISPR-Cas9 i fremtidens jordbrug?

Københavns Universitet valgte for nylig at støtte et tværvidenskabeligt projekt kaldet *Plants for a changing world*, hvor forskere på tværs af faggrænser skulle diskutere og analysere, om *CRISPR-Cas9* og andre teknikker kan anvendes til at hjælpe med at sikre et bæredygtigt jordbrug, der kommer klimaændringerne i forkøbet, og som

er etisk og samfundsmæssigt forsvarligt. Der bliver flere munde at mætte i fremtiden, og der bliver derfor brug for mere mad. Den skal kunne dyrkes uden at belaste naturen mere end, vi allerede gør, så vi skal bruge mindre plads, gøde mindre og sprøjte mindre. Denne vision kaldes også *bæredygtig intensivering*, og selvom den kan lyde umulig, er dens realisering vigtig for at kunne redde vores planet fra overudnyttelse af de store, men i sidste ende begrænsede, ressourcer, den stiller til rådighed. Udover planteforskere deltager jurister, fødevarøkonomer, samfundsforskere, etikere og filosoffer i projektet.

Det første resultat af denne analyse blev publiceret i december 2014 og vakte interesse verden over. Det blev således foreslået, at CRISPR-Cas9 og andre præcisionsforædlingsteknikker kunne bruges til at rette på fortidens fejl. Dvs. rette på utilsigtede mutationer, der er opstået på et eller andet tidspunkt i løbet af tusinde års forædling og som kan have svækket kulturplanterne og gjort dem mindre modstandsdygtige mod plantesygdomme, skadedyr, tørke, kulde, varme og næringsmangel. Det var således ikke et forslag om at give planterne nye egenskaber, men at give dem deres gamle egenskaber tilbage. Denne bestræbelse på at føre utilsigtede mutationer tilbage til deres oprindelige form er blevet kaldt "tilbage-til-naturen-forædling".

Forædling på naturens egen måde

I løbet af 2015 er der kommet en række artikler, der bekræfter hypotesen om, at der i forædlingens tidsrum er akkumuleret mutationer i vores kulturplanter, som har ændret deres egenskaber på utilsigtet vis. Specielt har kinesiske forskere kunnet dokumentere dette i ris. Her har forskellige tilfældigt opståede enkeltmutationer påvirket kulturrisens evne til at optage kvælstofholdig gødning effektivt, til at modstå kulde og til at klare ekstrem varme. Det vil være oplagt at reparere skader, hvor de er opstået, ikke bare i de rissorter, der dyrkes nu, men i andre kulturplanter, hvor de måtte være opstået. CRISPR-Cas9 vil være et oplagt værktøj til dette formål.

Et andet resultat af projektgruppens arbejde, der blev publiceret i maj 2015, er, at sådanne styrkede planter skal danne basis for fremtidens økologiske jordbrug. Økologien har vist vejen frem mod et bæredygtigt jordbrug, men økologisk jordbrug lider under manglende produktivitet sammenlignet med det konventionelle jordbrug. Således er det beregnet, at hvis al konventionel jordbrug skal overgå til at blive økologisk, kræver det 40% mere landbrugsareal end det, der anvendes nu. Dette er utænkeligt, hvis vi skal bevare vor jordklode i sin nuværende tilstand. Med CRISPR-Cas9 er der håb om, at vi kan udvikle planter, der er styrket på naturens egen måde, så de ikke behøver så meget input, men giver mere output. ■

Forslag til videre læsning
Doudna1, J.A. & Charpentier, E.: The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* vol. 346, Is. 6213.

The Crispr Quandary. *New York Times*, 15. nov. 2015

Engineering Virus-Resistant Plants. *The Scientist*, 11. nov. 2015:

A Proposal to Modify Plants Gives G.M.O. Debate New Life. *New York Times*, 29. Maj 2015.

Dansk forsker: Økologer burde elske ny GMO-teknik
<http://videnskab.dk/teknologi/dansk-forsker-okologer-burde-elske-ny-gmo-teknik>

Om DNA-reparation
Når kroppen reparerer DNA. *Aktuel Naturvidenskab* nr. 6/2015.