

## Et skridt nærmere genomredigering: CRISPR-Cas9 og HS



Udvikling af CRISPR-Cas9-teknikker kan nu bruges til at redigere HS-genet i hjernen på levende mus.

Skrevet af Leora Fox den 24. oktober 2017

Redigeret af Dr Jeff Carroll; Oversat af Cecilie Wennemoes Willert

Oprindeligt offentliggjort 26. juli 2017

---

*CRISPR-Cas9 er en eksperimentiel genomredigeringsmetode, der anvendes til at foretage præcise ændringer i DNA. For første gang har forskere brugt denne fremgangsmåde til at angribe sygdomsmutationen i Huntingtons Sygdom i hjerneceller hos mus. Andre forskere arbejder på at raffinere CRISPR-Cas9 til at være mere effektiv, specifik og sikker. Metoden er langt fra klar til brug i HS-patienter, men dens anvendelse i mus er et spændende skridt fremad.*

### Genomredigering med CRISPR-Cas9

DNA er den grundlæggende kode, der styrer væksten og funktionen af levende celler. Vores evne til at manipulere denne kode, hvilket tidligere var noget, man kun læste om i science fiction bøger, er begyndt at få betydning for forskningen i arvelige sygdomme som Huntingtons Sygdom. Design og anvendelse af værktøjer til ændring af DNA er kendt som *genomredigering*, og blandt disse værktøjer har CRISPR-Cas9 for nyligt fået opmærksomhed. Siden metoden blev opdaget, har forskere undersøgt muligheden for, om CRISPR-Cas9 kunne bruges til at ændre den genetiske mutation, som forårsager HS.

Denne eksperimentelle teknik er endnu ikke klar til forsøg i mennesker, men den har hurtigt flyttet sig fra reagensglas til levende celler og videre til organismer. Nyligt arbejde fra flere forskningsgrupper har vist, at CRISPR-Cas9 kan bruges til at redigere HS-genet i hjernen hos levende mus. Hvad der er endnu mere spændende er, at en forskningsgruppe har vist, at det forbedrede adfærden i HS-mus, når CRISPR-Cas9 blev leveret til musenes hjerner. Denne genomredigeringsteknologi fortsætter med at blive mere sofistikeret, og flere HS-forskningsgrupper forsøger at tilpasse den til udfordringerne ved HS-behandling. Lad os tale om hvordan CRISPR-Cas9 virker, dens anvendelse, og om hvorfor sikkerheden er et problem på nuværende tidspunkt.



Genomredigerings-teknikker resulterer i en permanent ændring i DNA-koden

### HS-genet: redigering af historien

HS er forårsaget af en uønsket tilføjelse til den genetiske kode. Milliarder af biologiske byggesten, nukleotiderne C, G, A og T, findes i den fulde DNA-kode. Disse nukleotider læses og fortolkes i små stykker - sektioner kaldet *exons*. Man kan se et nukleotid som et bogstav, tre nukleotider som et ord, et exon som en sætning, genet som et afsnit, og det komplette genom som en vejledning der beskriver alle dele nødvendige for at celler kan vokse og fungere.

Lad os zoome ind på et afsnit i historien - nemlig på genet, der forårsager HS. Hos mennesker, der udvikler HS, indeholder den første sætning en fejl: en række af bogstaverne C-A-G der bliver ved... og ved og ved og ved og ved og ved og ved... mange flere gange end nødvendigt. Hvad hvis vi kunne redigere fejlen i CAG-gentagelsen og slette alle disse "ved-og-ved" gentagelser fra den foregående sætning? Dette er hovedfokus for genomredigering i HS-forskning, og CRISPR-Cas9 er én blandt flere tilgange.

## CRISPR-Cas9: At lave klippet

Der er intet i cellen, der kan redigere gener som et tekstbehandlingsprogram kan redigere tekster. For at rette gener på mikroskopisk skala, én celle ad gangen, skal den defekte kode lokaliseres og fysisk klippes – og det er netop hvad CRISPR-Cas9 gør. At gennemføre et sådant klip kræver to komponenter: (1) en **guide-RNA** og (2) et skæringsenzym kaldet **Cas9**. Her er en simpel analogi: forestil dig, at du vil klippe et stykke bånd over, men din ven holder saksen. Du holder båndet med to helt tætte hænder for at vise din ven præcis hvor klippet skal laves. Dét er sådan CRISPR-Cas9 fungerer på mikroskopisk skala: guide-RNAet finder og præsenterer det rigtige sted på DNAet, og Cas9 fungerer som en saks, der laver selve klippet.

I laboratoriet kan forskere designe specifikke guide-RNAer, som viser Cas9, hvor der skal klippes - to gange på hver sin side af den ekstra lange sekvens med C-A-G gentagelser i HS-genet. Derefter kan de nye ender limes sammen, hvorved den skadelige del fjernes permanent. Det er sådan forskere bruger CRISPR-Cas9 til at *redigere* genetiske sekvenser.

Som med en hver anden ny spændende teknologi har forskere leget med CRISPR-Cas9 systemet for at finde nye måder at bruge værktøjet på. Forskere indså tidligt, at de ganske let kunne bruge CRISPR-Cas9 til at lave enkeltskæringer i et bestemt gen. Reparationsprocessen som cellerne bruger til at reparere disse skæringer fører let til fejl, som ofte medfører at små stykker af den genetiske information mistes.

Som analogi kan du forestille dig at skrive en besked til en ven ved middagsbordet, hvor der stod: "Ræk venligst smørret". Hvis du ved et uheld sprang et par bogstaver over – lad os sige "æk" – men beholdt strukturen af beskeden, ville din ven modtage beskeden: "rve nligstsm ørretxx". Når genetiske beskeder bliver uforståelige på grund af sletning af nogen af bogstaverne, har cellerne et maskineri, der genkender fejlen og dernæst undlader at læse indholdet. Dette giver forskerne muligheden for at bruge CRISPR-Cas9 til effektivt at *slette* et gen (fordi det ikke længere bliver læst), snarere end at *redigere* sekvensen på en specific måde.

## CRISPR-Cas9 i en HS-musehjerne

Et par forskningsgrupper har netop opdaget, at det er muligt at ændre HS-genet i hjernen hos

levende mus. Senest fandt en gruppe, ledet af Xiao-Jiang Li på Emory University i USA, at man ved at lave små skæringer i HS-genet kunne opnå gavnlige effekter i HS-mus. Til disse eksperimenter brugte de CRISPR-Cas9 til at *slette* bogstaver som beskrevet ovenfor, snarere end til at *redigere* HS-genet og fjerne den forlængede C-A-G-sekvens.

For at bruge CRISPR-Cas9 i en HS-musemodel skal guide-RNAet og Cas9-”saksen” først transporteres via en specialdesignet virus, som skal sprøjtes ind i hjernen. Li’s gruppe anvendte denne teknik til at ramme striatum, et område i hjernen som styrer humør og bevægelse og som bliver beskadiget ved HS. Et par uger senere havde CRISPR-Cas9-komponenterne spredt sig til mange celler, inaktiveret det dysfunktionelle HS-gen, og mindsket neuronernes tegn på stress.

Efter tre måneder var der færre skadelige klumper af huntingtinprotein opbygget i hjernecellerne, og HS-musene klarede sig lidt bedre i bevægelsestests. Det mest spændende aspekt ved dette forsøg var, at ældre mus, som allerede havde udviklet symptomer, fik det bedre. Selv 9 måneder gamle mus (svarende til midaldrene mus) viste forbedringer efter at have modtaget indsprøjtningen, hvilket tyder på, at deres hjerner delvist kunne komme sig, selvom de i halvdelen af deres levetid havde været skadede.

## Fortsættelse med forsigtighed

De fleste mennesker med HS har én kopi af det mutante gen og en anden kopi, der er helt rask. Der er en vis bekymring omkring brugen af CRISPR-Cas9 som terapi, for selvom den kan fjerne den beskadigede del fra HS-genet, kan den også permanent fjerne en del af den raske kopi. Li’s gruppe lavede også nogle forsøg, hvor de indirekte prøvede at besvare dette spørgsmål ved at bruge mus, der havde *to* defekte kopier af HS-genet, og fjerne begge med CRISPR-Cas9. Der var ingen umiddelbar fare for musene, som dog også kun blev overvåget i et par uger.

Det er vigtigt at tage i betragtning hvad det betyder for sikkerheden, når man påvirker den normale kopi HS-genet. Især i betragtningen af, at der lige nu er et igangværende kliniske forsøg med et potentielt huntingtinsænkende ASO - lægemiddel . Lægemidlet sænker mængderne af både den mutante og den raske udgave af HS-genet. Nogle forsøg med mus har antydnet, at dette er ufarligt at gøre sent i livet, men dette er svært at vide sig sikker på, fordi musenes levetid er langt kortere end menneskers. Virksomhederne som udfører ASO studiet – Roche og Ionis – er velvidende omkring risici og overvåger omhyggeligt forsøgspersonerne for tegn på problemer, der kunne være forårsaget af sænkningen af HS-genet.



Det mest spændende aspekt ved dette forsøg var, at ældre mus, som allerede havde udviklet symptomer, fik det bedre.



Der er andre vigtige forskelle mellem ASO-lægemidler og tilgangen med CRISPR-Cas9. Det nuværende ASO-studie i mennesker er en *huntingtinsænkende*, eller *genhæmmende* behandlingsform, som virker ved at inaktivere begge kopier af HS-genet i korte perioder. Hvis behandlingen stoppes, vil genet derfor genoprette funktionen. Omvendt skaber *gen-redigering* ved hjælp af CRISPR-Cas9 en permanent ændring i DNAet, og skal derfor anvendes med

endnu større forsigtighed. Der er tegn på, at HS-genet, beskadiget eller ej, har vigtige funktioner i cellen, og vi ønsker ikke at risikere permanente bivirkninger. Den gode nyhed er, at HS-forskere forsøger at takle udfordringen ved at skåne den raske kopi af genet, også kendt som allel-specifik tilgang.

## Forbedring af genomredigeringsmetoder

To grupper har fornyligt forbedret CRISPR-Cas9-teknikken ved at bruge den til kun at klippe og inaktivere den beskadigede genkopi. Et team ledet af Jong-Min Lee på Massachusetts General Hospital lavede en allel-specifik sletning ved hjælp af klogt designede guide-RNA'er. Disse guides genkendte bittesmå forskelle i DNA-bogstaverne tæt på HS-mutationen og dirigerede to Cas9-skæringer hertil. Deres tilgang var ny, fordi genomredigering kunne "individualiseres" afhængigt af et individs DNA.

En anden gruppe, under ledelse af Beverly Davidson på Children's Hospital of Philadelphia, brugte en lignende tilgang til specifikt at ramme det mutante gen og lave mindre klip med Cas9. Dette stoppede produktionen af flere skadelige huntingtinproteiner. Ligesom Li's gruppe, kunne de også inaktivere HS-genet i hjernen hos en levende mus. Hvorvidt begge opdaterede CRISPR-teknikker vil kunne forbedre adfærden hos HS-mus vides endnu ikke, men begge nyskabelser er et skridt nærmere fremtidige genterapier.

## Udfordringer ved genomredigering

Vi er glade for at genomredigering benyttes til bedre at forstå HS. Brugen af CRISPR i levende mus og udviklingen af allel-specifikke fremgangsmåder repræsenterer tydelige fremskridt, men der er flere forhindringer at overvinde, før CRISPR-Cas9 kan udvikles til en HS-behandling. Her er de største udfordringer, som forskerne står overfor, samt vores nuværende viden:

1. **Præcision:** sørge for, at Cas9 kun klipper i det gen, det er designet til at klippe i, og ikke laver tilfældig skade andetsteds. Forskere ser ud til at være godt på vej til at sikre, at CRISPR er meget specifik.
2. **Allel-specificitet:** sikre, at kun den mutante kopi af HS-genet, og ikke den raske, fjernes. Forskningen beskrevet her er et spændende skridt fremad.
3. **Levering:** få CRISPR-Cas9-maskineriet transporteret ind i mange neuroner i hjernen og fjerne HS-genet fra dem. Nu ved vi, at det kan lade sig gøre i mus, men det er stadigvæk en stor udfordring for en hver terapi som bruges til behandling af den menneskelige hjerne.
4. **Kortsigtet sikkerhed:** sikre, at sletningen af en del af HS-genet ikke direkte medfører neurologiske problemer eller endda dødsfald. Hidtil synes dette ikke at være tilfældet.
5. **Langsigtet sikkerhed:** sikre, at redigering af HS-genet er sikkert over en lang periode. Dette er et vanskeligt spørgsmål at udforske i mus. Vi kan finde svar gennem eksperimenter i primater eller fra mindre permanente teknikker i kliniske forsøg.

De huntingtin-sænkende ASO-forsøg er stadig i de tidlige sikkerhedsfaser, men tilgangen har virket lovende indtil videre. Genomredigering kan introducere varige ændringer i det, der står skrevet i DNA-koden, med store konsekvenser til følge. Sikker brug af CRISPR-Cas9 bliver eksponentielt mere udfordrende, jo tættere den kommer på klinikken. Ikke desto mindre viser den næste generation af denne teknologi store muligheder, og mange kloge hoveder flytter teknologien fremad på nye, innovative måder.

---

*Jeff Carroll, forfatter på denne artikel, har et længerevarende, ikke-finansielt, forskningssamarbejde med Ionis Pharmaceuticals hvis ASO forsøg diskuteres i denne artikel. Ed Wild, HDBuzz med-redaktør, er medvirkende læge i Ionis/Roche ASO forsøget, som står nævnt i artiklen. Hverken Dr. Wild eller ansatte hos Ionis eller Roche har været med til at skrive eller redigere denne artikel. For mere information om vores offentliggørelsespraksis kig under FAQ...*

---

## Ordliste

**Genomredigering** brugen af zink finger nukleaser eller CRISPR til at lave ændringer i DNAet. "Genom" er et ord, som bruges om alt det DNA vi hver især har

**CRISPR** et system, der kan bruges til at lave præcise ændringer i DNA

**Terapi** behandlinger

**Genom** betegnelse for alle de gener, som indeholder det komplette sæt instruktioner til at skabe en person eller anden organisme

**Allel** én af de to kopier af et gen

**Exons** den lille fraktion af vores DNA, som direkte bruges til at instruere celler i hvordan de skal lave proteiner

**RNA** det molekyle, der ligner DNA, som fungerer som 'budbringer'-molekyle i cellerne, når de laver arbejdskopier af generne til proteinproduktionen

---

© HDBuzz 2011-2018. Indholdet på HDBuzz kan frit deles under en Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0 Unported License.

HDBuzz er ikke en kilde til lægefaglige råd. For mere information besøg [hdbuzz.net](http://hdbuzz.net)

Dannet 30. januar 2018 — Downloaded fra <https://da.hdbuzz.net/244>