Gensaxen: ett redskap för att förändra livets kod

__Emmanuelle Charpentier__ och __Jennifer Doudna__ tilldelas 2020 års Nobelpris i kemi för upptäckten av ett av genteknikens skarpaste verktyg: gensaxen CRISPR/Cas9. Med hjälp av den kan forskare med hög precision förändra arvsmassan i djur, växter och mikroorganismer. Tekniken har revolutionerat de molekylära livsvetenskaperna, öppnar nya möjligheter till växtförädling, bidrar till innovativa cancerterapier och kan göra verklighet av drömmen om att bota ärftliga sjukdomar.

Till vetenskapens lockelser hör att den är oförutsägbar. Det går aldrig att i förväg veta vart en idé eller frågeställning kommer att leda. Ibland hamnar den vetgiriga i en återvändsgränd, ibland i en snårig labyrint som det tar åratal att reda ut. Då och då inser hon plötsligt att hon – som den första människan i världen – tittar ut över en vidsträckt horisont av oanade möjligheter.

Bild 1. Med hjälp av gensaxen kan forskare förändra arvsmassan i allt levande.

Till de oväntade upptäckter vars utsikter har fått mången att tappa andan hör gensaxen CRISPR-Cas9. När Emmanuelle Charpentier och Jennifer Doudna började utforska immunförsvaret hos en streptokockbakterie, var en tanke att de kanske skulle kunna utveckla en ny form av antibiotika. Istället upptäckte de ett molekylärt redskap som kan användas för att göra precisa snitt i en arvsmassa. Där snittet är lagt, går det sedan att på ett enkelt vis förändra livets kod.

Ett kraftfullt verktyg som påverkar alla

Endast åtta år efter deras upptäckt har gensaxen omdanat livsvetenskaperna. För biokemister och cellbiologer är det numera enkelt att undersöka hur olika gener i celler fungerar och vilken roll de spelar i ett sjukdomsförlopp. Inom växtförädlingen kan forskare med hög precision ge växter nya egenskaper, som att motstå torka i ett varmare klimat. Inom medicinen bidrar gensaxen till nya cancerterapier och de första studierna där man försöker bota ärftliga sjukdomar pågår.

Exemplen på hur gensaxen kan användas är närmast oändliga. De rymmer även oetiska tillämpningar. Som alla kraftfulla tekniker behöver gensaxen regleras, mer om det senare.

Att det var ett livsavgörande möte hade vare sig Emmanuelle Charpentier eller Jennifer Doudna en aning om när de första gången träffades 2011 på ett kafé i Puerto Rico. Vi börjar med att presentera Charpentier, som var den som föreslog ett samarbete.

Nobelpriset® är av Nobelstiftelsen registrerat varumärke.

Charpentier fascineras av sjukdomsframkallande bakterier

Driven, uppmärksam och noggrann, har vissa kallat henne. Andra menar att Emmanuelle Charpentier alltid letar efter det oväntade. Själv citerar hon Louis Pasteur: ”Slumpen ler bara mot det förberedda sinnet.” Lusten att få upptäcka nya saker och önskan om att få vara fri och oberoende, har styrt hennes väg. Inräknat doktorandstudierna vid Pasteurinstitutet i Paris, har hon bott i fem olika länder, sju olika städer och arbetat vid tio olika institutioner.

Så miljöerna och infallsvinklarna har skiftat, men det mesta av hennes forskning har haft en gemensam nämnare: sjukdomsframkallande bakterier. Varför blir de så aggressiva? Hur utvecklar de sin motståndskraft mot antibiotika? Och går det att hitta nya behandlingar som kan stoppa deras framfart?

När Emmanuelle Charpentier 2002 startade sin egen forskningsgrupp vid universitetet i Wien fokuserade hon på en av de bakterier som gör mänskligheten störst skada: *Streptococcus pyogenes*. Varje år infekterar den miljontals personer. Oftast orsakar den lättbehandlade infektioner som halsfluss och svinkoppor, men den kan även ge livshotande blodförgiftningar och bryta ner kroppens mjukdelar. Därför har den ett rykte om sig att vara en köttätare.

För att bättre förstå *S. pyogenes* började Charpentier grundligt utreda hur bakteriens olika gener regleras. Just detta beslut är det första steget mot upptäckten av gensaxen. Men innan vi vandrar vidare på den vägen, ska vi lära känna Jennifer Doudna bättre. För medan Charpentier synar *S. pyogenes* i sömmarna, får Doudna för första gången höra en förkortning som hon tycker låter som *crisper*.

Vetenskap – lika äventyrligt som en deckarhistoria

Redan under sin uppväxt på Hawaii kände Jennifer Doudna en stark kunskapstörst. En dag lade hennes far James Watsons bok *Den dubbla spiralen* på hennes säng. Den deckarliknande historien om hur James Watson och Francis Crick löste strukturen på DNA-molekylen liknade ingenting som hon hade läst i sina skolböcker. Hon fängslades av den vetenskapliga processen och insåg att vetenskap är mer än bara fakta.

När hon själv började lösa vetenskapliga mysterier riktade hon dock inte sin uppmärksamhet mot DNA, utan dess molekylära syskon: RNA. År 2006 – när vi träffar henne – leder hon en forskargrupp vid Berkeleyuniversitetet i Kalifornien och har två decenniers erfarenhet av att arbeta med RNA. Hon är känd som en framgångsrik forskare med näsa för banbrytande projekt, och de senaste åren har hon gett sig in i ett nytt glödhett område: *RNA-interferens*.

Länge hade forskare då trott att de kände till RNA:s grundläggande funktioner i cellen. Men så upptäckte de plötsligt att det finns mängder av små RNA-molekyler i celler, som bidrar till att reglera genernas aktivitet. Att Jennifer Doudna är engagerad i just RNA-interferens, är skälet till varför hon 2006 blir uppringd av en kollega, som arbetar vid en annan institution.

Bakterier bär på ett uråldrigt immunförsvar

Kollegan, som är mikrobiolog, berättar för Doudna om en färsk upptäckt: när forskare har jämfört koden i arvsmassan mellan vitt skilda bakterier, och även arkéer (ett slags mikroorganism), hittar man en egenartad sekvens som är förvånansvärt välbevarad. Samma kod upprepas om och om igen, men mellan dessa upprepningar finns helt unika sekvenser som skiljer sig åt (bild 2). Det är som om ett och samma ord skulle upprepas mellan varje unik mening i en bok.

Sekvensen kallas *clustered regularly interspaced short palindromic repeats,* vilket förkortas CRISPR. Det intressanta är att de unika delarna tycks matcha arvsmassan från olika virus. Därför tror man nu att detta är en del av ett uråldrigt immunförsvar, som skyddar bakterier och arkéer mot virus. Hypotesen är att om en bakterie har lyckats överleva en virusinfektion, lägger den in en bit av virusets genetiska kod i sin egen arvsmassa som ett minne av infektionen.

Ingen vet ännu hur allt detta fungerar, berättar kollegan, men man misstänker att mekanismen som bakterierna använder sig av när de oskadliggör virus liknar den Doudna studerar: RNA-interferens.

Doudna kartlägger ett komplext maskineri

Nyheten är både anmärkningsvärd och rafflande. Om det är sant att bakterier har ett uråldrigt immunförsvar, är det ingen småsak. Jennifer Doudnas sinne för molekylära märkligheter vaknar till liv och hon läser in sig på CRISPR-systemet.

Det visar sig att förutom CRISPR-sekvensen har forskare upptäckt speciella gener som de kallar *CRISPR-associerade gener,* vilket förkortades *cas.* Det som Doudna finner intressant är att dessa gener har stora likheter med gener för redan kända proteiner, som man vet är specialiserade på att linda upp och klippa av DNA. Så har Cas-proteinerna samma funktion? Klipper de sönder virusets DNA?

Hon sätter sin forskargrupp i arbete, och inom loppet av några år har de lyckats avslöja funktionen hos flera olika Cas-proteiner. Parallellt med detta studerar en handfull forskargrupper vid andra universitet det nyupptäckta CRISPR/Cas-systemet. Dessa kartläggningar visar att bakteriers immunförsvar kan se väldigt olika ut. Det CRISPR/Cas-system som Doudna har studerat tillhör klass 1. Det är ett komplext maskineri som kräver många olika Cas-proteiner för att oskadliggöra ett virus. Skillnaden är stor mot klass 2-systemen, som är betydligt enklare. Och ett sådant system har Emmanuelle Charpentier just snubblat över i en annan del av världen. Åter till henne.

En ny okänd pusselbit i CRISPR-systemet

När vi lämnade Emmanuelle Charpentier bodde hon i Wien. Men 2009 fick hon en tjänst med fina förutsättningar för forskning vid Umeå universitet. Vissa varnade henne från att flytta till en så avlägsen del av världen. Men hon finner att den mörka och långa vintern skänker arbetsro.

Och arbetsro behöver hon. Hon intresserar sig också för små genreglerande RNA-molekyler och har i ett samarbete med forskare i Berlin kartlagt alla de små RNA som finns i *S. pyogenes.* Resultatet har gett henne en del att tänka på. För en av de små RNA-molekyler som förkommer i stor mängd i bakterien är en hittills okänd variant, och den genetiska koden för detta RNA ligger väldigt nära den märkliga CRISPR-sekvensen i bakteriens arvsmassa.

Närheten mellan de två får Charpentier att misstänka att de har med varandra att göra. En noggrann analys av de genetiska koderna avslöjar också att en del av den lilla okända RNA-molekylen matchar den del av CRISPR som återkommande upprepas. Det är som att hitta två pusselbitar som passar varandra perfekt (bild 2).

Charpentier hade aldrig jobbat med CRISPR, men hennes forskargrupp påbörjar ett mikrobiologiskt detektivarbete för att kartlägga CRISPR-systemet i *S. pyogenes.* Sedan tidigare visste man att detta system, som alltså tillhör klass 2, bara kräver ett enda Cas-protein, Cas9, för att klippa av virus-DNA. Charpentier visar att den okända RNA-molekylen, som får namnet *trans-activating crispr RNA (tracrRNA)*, också fyller en helt avgörande funktion. Den behövs för att det långa RNA som skapas från CRISPR-sekvensen i arvsmassan ska mogna och anta sin aktiva form (bild 2).

Streptokockens naturliga immunsystem mot virus: CRISPR/Cas9

När virus infekterar en bakterie, skickar de in sitt skadliga DNA i bakterien. Överlever bakterien infektionen, infogar den en del av virusets DNA i sin arvsmassa. Det blir som ett minne av viruset. Detta DNA används sedan för att skydda bakterien mot nya infektioner.

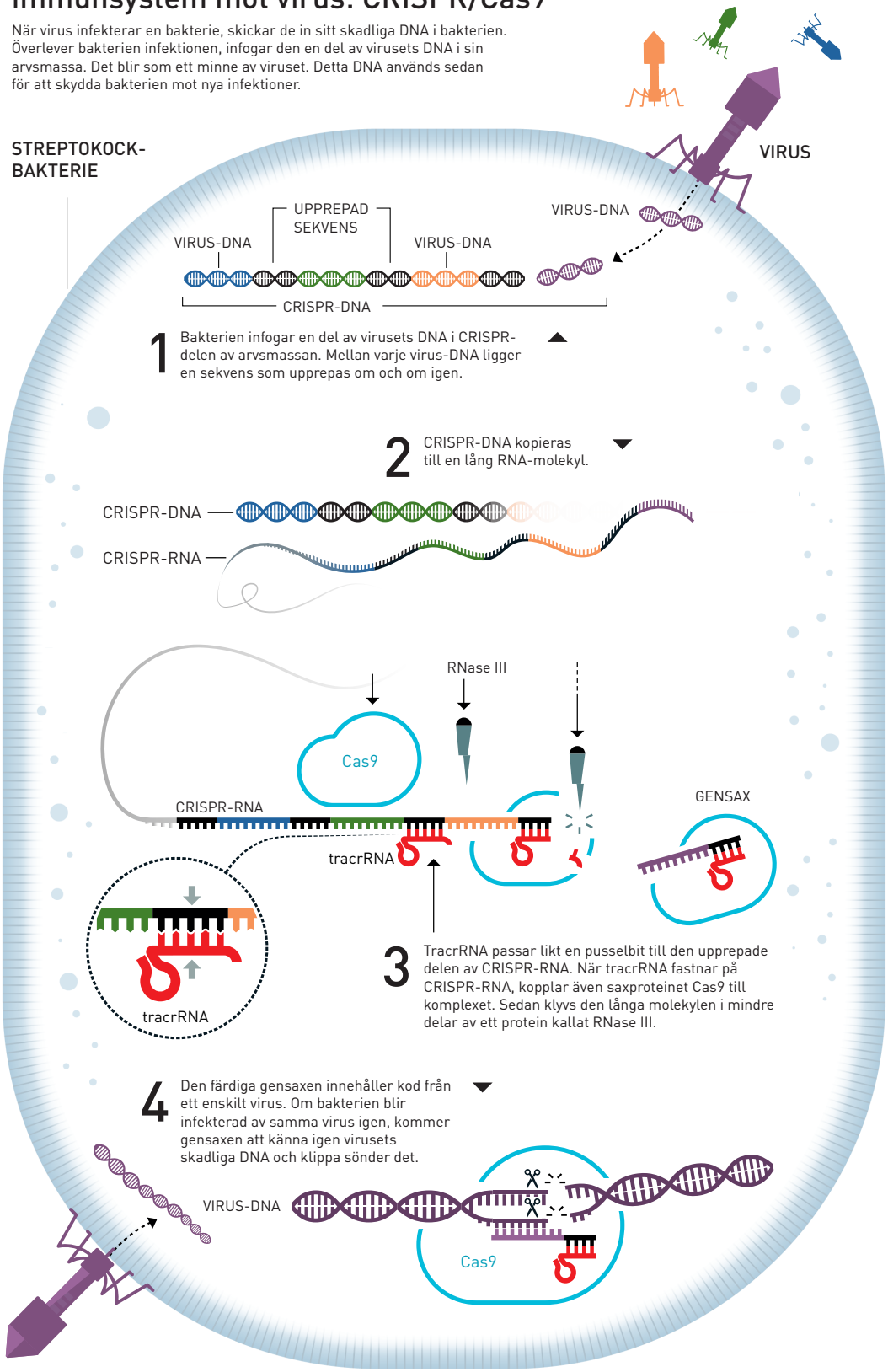

Bild 2

Efter ett intensivt och målmedvetet experimenterande publicerar Emmanuelle Charpentier upptäckten av tracrRNA i mars 2011. Hon inser att hon är något riktigt spännande på spåren. Själv har hon lång erfarenhet av mikrobiologi, och i det fortsatta utforskandet av CRISPR-Cas9-systemet vill hon samarbeta med en biokemist. Jennifer Doudna är ett självklart val. Så när Charpentier samma vår bjuds till en konferens i Puerto Rico för att berätta om sitt fynd, är hennes mål att träffa den skickliga Berkeleyforskaren.

Ett livsavgörande möte på ett kafé i Puerto Rico

Av en slump möts de på ett kafé under konferensens andra dag. En kollega till Doudna presenterar de två för varandra och nästa dag föreslår Charpentier att de ska utforska de gamla delarna av huvudstaden tillsammans. Medan de strosar på de kullerstensbelagda gatorna, börjar de prata om sin forskning. Charpentier undrar om Doudna är intresserad av ett samarbete. Vill hon vara med och studera hur Cas9 fungerar i *S. pyogenes* enkla klass 2-system?

Än en gång kittlas Jennifer Doudnas känsla för nydanande projekt och via digitala möten drar de båda forskarna tillsammans med sina medarbetare upp planerna för projektet. Deras misstanke är att CRISPR-RNA behövs för att identifiera ett virus-DNA, och att Cas9 är själva saxen som klipper av DNA-molekylen. Men när en de testar detta i ett provrörsförsök händer ingenting. DNA-molekylen förblir intakt. Varför? Är det något fel på experimentförhållandena? Eller fyller Cas9 en helt annan funktion?

Efter mycket brainstormning och en hel del misslyckade experiment, tillsätter forskarna till slut också tracrRNA till försöket. Innan trodde de att tracrRNA endast behövdes när CRISPR-RNA klövs till sin aktiva form (bild 2), men när Cas9 nu får tillgång till tracrRNA händer det alla väntat på: DNA-molekylen klyvs i två delar.

Ofta har evolutionens lösningar överraskat forskare, men detta var något utöver det vanliga. Det vapen som streptokocker har utvecklat som skydd mot virus är enkelt och effektivt, för att inte säga genialt. Här skulle historien om gensaxen ha kunnat sluta. Charpentier och Doudna hade avslöjat en grundläggande mekanism hos en bakterie som orsakar människor mängder av lidande. Den upptäckten var stor nog, men mot sinnen som är förberedda ler slumpen.

Ett epokgörande experiment

Forskarna bestämmer sig för att försöka förenkla gensaxen. Med hjälp av den kunskap de har skaffat sig om hur gensaxen fungerar, funderar de ut hur de kan koppla ihop tracrRNA och CRISPR-RNA till en enda molekyl, som de kallar guide-RNA. Med denna förenklade variant av gensaxen genomför de sedan ett epokgörande experiment: de undersöker om de kan styra gensaxen så att den klipper av DNA på ett av forskarna förutbestämt ställe.

Vid det här laget förstår de att de är nära ett stort genombrott. De tar en gen som redan finns i en frys på Doudnas laboratorium och väljer ut fem olika ställen där genen ska klippas av. Sedan förändrar de CRISPR-delen av saxen så att koden matchar koden där snitten ska läggas (bild 3). Resultatet är överväldigande. DNA-molekylerna går av på exakt rätt ställen.

Gensaxen CRISPR/Cas9

När forskare ska förändra en arvsmassa med hjälp av gensaxen bygger de på konstgjord väg ett guide-RNA, som matchar DNA-koden där klippet ska göras. Saxproteinet Cas9 kopplar till guide-RNA, som styr saxen till den plats i arvsmassan där klippet ska göras.

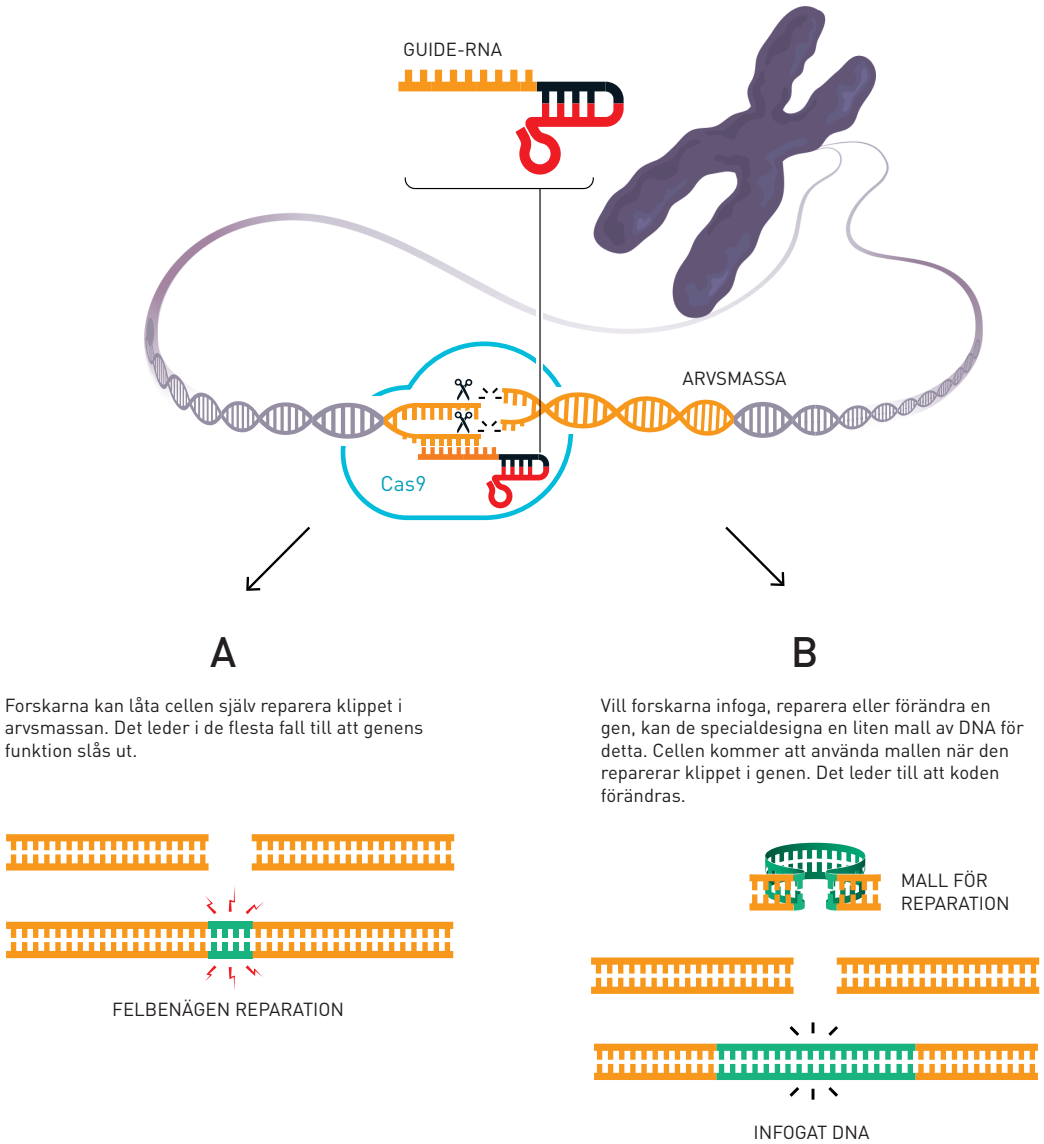

Bild 3

Gensaxen förändrar livsvetenskaperna

Strax efter att Emmanuelle Charpentier och Jennifer Doudna publicerar upptäckten av gensaxen CRISPR/Cas9 år 2012, visar flera forskargrupper att gensaxen går att använda för att modifiera arvsmassan i celler från både möss och människor. Detta leder till en explosionsartad utveckling. Förut var det tidsödande och ibland omöjligt att genförändra en cell, växt eller organism. Med gensaxens hjälp kan forskare i princip göra ett snitt i vilken arvsmassa de vill. Sedan är det lätt att utnyttja cellens naturliga system för DNA-reparation, så att de skriver om livets kod (bild 3).

Eftersom gensaxen är så lätt att använda, har den fått stor spridning inom grundforskningen. Den används för att förändra DNA i celler och försöksdjur, i syfte att förstå hur olika gener fungerar och samspelar till exempel under ett sjukdomsförlopp.

Gensaxen har också blivit till ett standardverktyg inom växtförädlingen. De metoder som forskare tidigare nyttjade för att modifiera växters genom, krävde ofta att de förde in gener för antibiotikaresistens i växten. När växterna sedan planterades ut, fanns en risk att antibiotikaresistensen spred sig till mikroorganismer i omgivningen. Tack vare gensaxen slipper forskare dessa äldre metoder. Numera kan de göra väldigt precisa förändringar av arvsmassan. De har bland annat oskadliggjort de gener som gör att ris suger upp giftiga tungmetaller från jorden, vilket har gett nyttigare rissorter som innehåller lägre halter av kadmium och arsenik. Forskare har också utvecklat grödor som klarar torka bättre i ett varmare klimat, och motstår insekter och andra skadedjur som annars måste bekämpas med pesticider.

Hopp om att kunna bota ärftliga sjukdomar

Inom medicinen bidrar gensaxen till nya immunoterapier mot cancer och dessutom håller man på att uppnå en önskedröm: att kunna bota ärftliga sjukdomar. I kliniska studier undersöker forskare redan om de kan åtgärda genskador som orsakar blodsjukdomarna sicklecellanemi och beta-thalassemi samt ärftliga ögonsjukdomar.

De utvecklar även metoder för att kunna laga gener i större organ, som musklerna och hjärnan. I djurförsök har de visat att specialutformade virus kan leverera gensaxen till önskade celler och man har behandlat förödande ärftliga åkommor som muskeldystrofi, spinal muskelatrofi och Huntingtons sjukdom. Tekniken behöver dock vässas ytterligare innan den kan prövas på människor.

Kraften i gensaxen behöver regleras

Vid sidan av allt gott kan gensaxen också missbrukas. Den kan till exempel användas för att skapa genetiskt modifierade embryon. Sedan många år tillbaka finns det dock lagar och regler som styr hur gentekniken får tillämpas, och det är till exempel förbjudet att förändra den mänskliga arvsmassan på ett vis som gör att förändringen går i arv. Experiment som involverar människor och djur måste också alltid granskas och godkännas av etiska kommittéer, innan de får genomföras.

En sak är säker: gensaxen berör oss alla. Den kommer att ställa oss inför nya etiska frågor, och kan bidra till att lösa många av de utmaningar som mänskligheten står inför. Genom sin upptäckt har Emmanuelle Charpentier och Jennifer Doudna tagit livsvetenskaperna in i en ny era. De har fått oss att titta ut över en vidsträckt horisont av oanade möjligheter och någonstans på vägen – när vi utforskar dessa nya marker – kommer vi garanterat att göra nya oväntade fynd.

LÄS MER

Mer information om årets priser, bland annat en vetenskaplig bakgrundsartikel på engelska, finns på Kungl. Vetenskapsakademiens webbplats, *www.kva.se*, och på *www.nobelprize.org*. Där kan man också titta på presskonferenser, Nobelföreläsningar och annat videomaterial. Mer information om utställningar och aktiviteter kring Nobelprisen och Ekonomipriset finns på *www.nobelprizemuseum.se*.

Kungl. Vetenskapsakademien har beslutat utdela Nobelpriset i kemi 2020 till

EMMANUELLE CHARPENTIER

Född 1968 (51 år) i Juvisy-sur-Orge, Frankrike. Fil.dr 1995 vid Institut Pasteur, Paris, Frankrike. Director för Max Planck Unit for the Science of Pathogens, Berlin, Tyskland.

JENNIFER A. DOUDNA

Född 1964 (56 år) i Washington, D.C, USA. Fil.dr 1989 vid Harvard Medical School, Boston, USA. Professor vid University of California, Berkeley, USA och Investigator, Howard Hughes Medical Institute.

”för utveckling av en metod för genomeditering”

Vetenskapsredaktörer: Claes Gustafsson, Gunnar von Heijne, Pernilla Wittung Stafshede, Nobelkommittén för kemi
Text: Ann Fernholm
Illustrationer: ©Johan Jarnestad/Kungl. Vetenskapsakademien
Redaktör: Sara Gustafsson
©Kungl. Vetenskapsakademien