

Perinnöllisen aksonirappeumasairauden molekyylitason mallintaminen kantasoluperäisten spinaalimotoneuronien avulla

Julius Järvilehto

Lääketieteen kandidaatti

Kantasolujen ja metabolian tutkimusohjelma

Helsinki 26.4.2020

Syventävien opintojen tutkielma

Ohjaaja: Henna Tynismaa

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

julius.jarvilehto@helsinki.fi

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

| | | | |
|---|----------------------------------|---|---|
| Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty | | Laitos – Institution – Department | |
| Lääketieteellinen tiedekunta | | Kantasolujen ja metabolian tutkimusohjelma | |
| Tekijä – Författare – Author | | | |
| Julius Järvilehto | | | |
| Työn nimi – Arbetets titel – Title | | | |
| Perinnöllisen aksonirappeumasairauden molekyyli­tas­on mallintaminen kantasoluperäisten spinaalimotoneuronien avulla | | | |
| Oppiaine – Läroämne – Subject | | | |
| Lääketiede, molekyylineurologia | | | |
| Työn laji – Arbetets art – Level | Aika – Datum – Month and year | Sivumäärä - Sidoantal Number of pages | - |
| Syventävä tutkielma | 26.4.2020 | 42 + 13 | |
| Tiivistelmä – Referat – Abstract | | | |
| <p>Charcot-Marie-Tooth (CMT) on yhteinen nimitys perinnöllisille ääreishermostoluja vaurioittaville neuropatioille. Kyseessä on yksi yleisimmistä neurologisista perinnöllisistä sairauksista esiintyvyyden ollessa noin 1:2500. Monimutkaisten tautimekanismien ja riittämättömien hoitomuotojen vuoksi kyseinen tauti on mielenkiintoinen tutkimuksen kohde. Tutkimusryhmämme on selvittänyt CMT-taudin geenitaustaa Suomessa.</p> <p>Sairauden kliiniseen kuvaan kuuluu vaihtelevin vaikeusastein motosensoriset häiriöt, jotka lievimmillään rajoittuvat distaalisten lihasten heikkouteen. Kuitenkin vakavimmissa tapauksissa sairaus voi viedä potilaan liikuntakyvyn. Tällä hetkellä mitään spesifisiä</p> | | | |

hoitoja ei ole tarjolla, mutta alati lisääntyvän molekyyli-tason tiedon myötä muutamia lääkekandidaatteja on otettu klinisiin kokeisiin.

Hermosolujen välikokoista filamenttia koodaava geeni *NEFL* (neurofilament light) on yksi CMT-tautigeeneistä (CMT1F/2E muoto). Tässä tutkimuksessa pyrin luomaan tautimallin *NEFL*-proteiinin puutokselle. Muokkasin indusoituja pluripotentteja kantasoluja CRISPR-Cas9 - teknologialla *NEFL*-geenin poistamiseksi. Sen jälkeen erilaistin muokatut kantasolut alemmiksi motoneuroneiksi. Mallin avulla pyrin selvittämään, miten muiden välikokoisten filamenttien ja sairauteen liitettyjen geenien ilmentyminen muuttuu *NEFL*-poistogeenisissä neuroneissa.

Sain erilaistettua kolme muokkaamaamme solulinjaa alemmiksi motoneuroneiksi. Täydellinen *NEFL*-proteiinin poisto oli tapahtunut kahdessa näistä linjoista. Käytin tutkimuksen analyttisessä osassa avuksi RNA- ja proteiinitason tutkimusmenetelmiä (qPCR, Western Blot, immunosytokemia). Tuloksista selvisi, että periferiinin määrä oli noussut western blotissa, kun *NEFL* puuttuu soluissa. Lisäksi *SLITRK2* ja *LYNX1* mRNA määrä oli qPCR-analyysin mukaan vähentynyt ja *GRM3* mRNA oli lisääntynyt muokatuissa soluissa. Näiden tulosten perusteella CMT2E-taudin patofysiologiaan liittyyneen muutoksia monissa erilaisissa solunsisäisissä kompensatorisissa mekanismeissa.

(202 sanaa)

Avainsanat – Nyckelord – Keywords

Charcot-Marie-Tooth, perinnöllinen neuropatia, kantasolu, liikehermosolu, CRISPR-Cas9

Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited

Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information

| | |
|---|----|
| 1 Johdanto | 1 |
| 2 Kirjallisuuskatsaus | 3 |
| 2.1 Hermoston kehitys | 3 |
| 2.2 Hermoston liikehermosolut | 3 |
| 2.3 Charcot-Marie-Tooth | 5 |
| 2.4 Kantasolumallit ja CRISPR-Cas9 | 10 |
| 3 Tutkimuksen tavoitteet | 12 |
| 4 Aineisto ja menetelmät | 13 |
| 4.1 Solujen kasvatus | 13 |
| 4.2 Geeninmuokkaus | 14 |
| 4.3 FACS (fluorescence-activated cell sorting) | 16 |
| 4.4 Liikehermosoluiksi erilaistaminen | 19 |
| 4.5 Immunosytokemia | 22 |
| 4.6 Western blot | 23 |
| 4.7 qPCR | 24 |
| 4.8 Tilastolliset menetelmät ja eettinen lupa | 24 |
| 5 Tulokset | 25 |
| 5.1 Elektroporaation ja FACS tulokset | 25 |
| 5.2 NEFL KO osoitus | 25 |
| 5.3 Motoneuroneiksi erilaistamisen onnistumisen varmistaminen | 29 |
| 5.4 NEFL KO:n seuraukset solussa | 32 |
| 6 Pohdinta | 38 |
| Lähdeluettelo | 43 |
| Liitteet | 51 |

1 Johdanto

Charcot-Marie-Tooth'n tauti (CMT) on eräs yleisimmistä perinnöllisistä neurologisista sairauksista ja yhteisnimitys ääreishermoston perinnöllisille polyneuropatioille. Sen hyvin vaihtelevan taudinkuvan vuoksi tauti on jaettu pienempiin alamuotoihin, jotka eroavat toisistaan mutatoituneen geenin, taudinkulun, oireiden, patofysiologian tai alkamisajankohdan perusteella. Vaihtelevan taudinkuvan ja suhteellisen yleisyyden vuoksi (1:2500) CMT on ollut suuren kiinnostuksen kohteena tutkimuksessa. Pahimmassa tapauksessa kyseessä voi olla liikuntakyvyn jo melko varhain vievä sairaus, johon mitään parantavaa lääkitystä ei vielä ole tarjolla. Sairauden tarkempi patofysiologian selvittäminen onkin tärkeää, jotta tulevaisuudessa voitaisiin mahdollisesti estää oireiden paheneminen tai löytää parantava hoito.

Yli 80 erilaista tautigeeniä on tunnistettu kyseisen sairauden taustalla. Näitä ovat pääpiirteissään joko aksonin myelinisaatioon haitallisesti vaikuttavat muutokset tai aksoniin itseensä liittyvät vauriomekanismit. Tyyppi I on yleisempi muoto sairaudesta, jossa demyelinaation vuoksi aksonin johtonopeus vähenee. Tämän tutkimuksen painopiste keskittyy sairauden tyyppiin II, jossa aksoni itsessään on vaurioitunut eli johtonopeus pysyy normaalina tai on vain vähän pienentynyt. Tyypillisesti aksonia vaurioittavissa sairauksissa synaptisen transmission postsynaptinen potentiaali on vähentynyt eli eksitatorinen toiminta on heikentynyt. Tutkimukseni kohteena olevan *NEFL*-geenin tuottaman proteiinin on esitetty olevan tärkeä aksonin tukirangan rakenteessa, koska se on eräs ainoastaan neuroneissa esiintyvistä välikokoisista filamenteista. Mahdollisina syinä hermojen toiminnan puutoksiin voivat olla esimerkiksi aksonaalisen kuljetuksen vaje tai mutanttifilamenttien aggregaation aiheuttamat pullistumat aksonin varrelle.

Tässä tutkimuksessa muokkasin ihmisen indusoituja pluripotentteja kantasoluja CRISPR-Cas9 tekniikan avulla siten, että ne eivät ilmennä *NEFL*-geeniä. Tutkimusidea perustuu ryhmämme aikaisempaan tutkimukseen (16), jossa tutkittiin resessiivisesti periytyvän *NEFL*-geenin mutaation vaikutusta potilaiden soluista erilaistettujen kantasolujen avulla. Kyseistä tautimuotoa on aikaisemmin tutkittu paljon hiirten solujen avulla. Koska ihmissolumalli on kuitenkin tarkempi ja taudin patofysiologian ollessa vielä epäselvä, on tärkeää rajata

pienetkin erot tarkastelun ulkopuolelle. Aiemmin on tutkittu myös ihmisen kantasoluja dominanttien CMT:tä aiheuttavien mutaatioiden saralla. Erona moniin muihin tutkimuksiin mallimme on isogeeninen, eli ainoa ero kontrollilinjan ja muokattujen spinaalisten motoneuroneiden välillä on *NEFL*-geenin ekspressio.

Käytimme tutkimusryhmämme optimoimaa erilaistamisprotokollaa ja eristettyäni solut 30 päivän kasvatuksen jälkeen aloitin tämän projektin analyttisen osan. Käyttämällä RNA- ja proteiinitason menetelmiä hyväkseni sain dataa kasvattamistani neuroneista ja vertasin kolmea luomaani knock-out (poistogeenistä) linjaa kontrollisolulinjaan.

Onnistuin tuottamaan ja todentamaan kaksi genomi-editoitua solulinjaa oikeiksi poistogeenisiksi linjoiksi *NEFL*-geenin suhteen. Lisäksi hermosolujen erilaistaminen onnistui huomattavan hyvällä tehokkuudella. Keskiarvo erilaistettujen solujen ISL1-positiivisuudessa, joka on spesifinen alempien motoneuroneiden markkeri, oli noin 85 %. Tarkasti kuvaamani erilaistamismenetelmä auttaa tulevaisuudessa kantasoluperäisten liikehermosolumallien luomisessa. Lisäksi tutkimukseni tuloksia voidaan hyödyntää jatkotutkimuksessa, joka on parhaillaan meneillään tutkimusryhmässämme.

Western blot analyysissä emme havainneet merkittäviä eroja NEFM-proteiinin määrässä kontrollin ja muokattujen linjojen välillä. Toisaalta periferiini-proteiinin määrä oli kasvanut muokatuissa linjoissa. Tutkimme lisäksi ryhmämme suorittaman RNA sekvensoinnin avulla löydettyjä uusia geenejä (julkaisematon tutkimustulos), joiden ekspressio on mahdollisesti muuttunut poistogeenisissä neuroneissa. Näissä oli tilastollisesti merkitseviä eroja *SLITRK2*, *LYNX* sekä *GRM3*- geenien tuottamien mRNA:n määrien suhteen kontrollilinjan ja genomieditoitujen linjojen välillä.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Hermoston kehitys

Aikaisin sikiönkehityksen aikana hedelmöittynyt munasolu jakaantuu, kunnes se muodostaa blastulaksi kutsutun rakkularakenteen koostuen yhdestä solukerroksesta (37). Noin 21 päivän kuluttua hedelmöityksestä tapahtuu gastrulaatio. Siinä syntyy kolme alkiolevyä, endodermi, meso- ja ektodermi. Ektodermi muodostaa edelleen neurulaation myötä kolme ektodermimassaa; hermostoputken, hermostopienen solut sekä ulomman ektodermin. Ulommasta ektodermistä syntyy epidermis ja hermostopienen solut muodostavat perifeeriset gangliot, melanosyytit sekä dorsaalisen haaran gangliot. Lopulta hermostoputki muodostaa keskushermoston, eli aivot ja selkäytimen. (62)

Pienet molekyylit ovat avainasemassa määrittelemässä alkion ventraali-dorsalisuunnan. Tässä prosessissa Sonic Hedgehog (SHH) ja retinoidihappo (RA) ovat todella tärkeitä. SHH erittyy selkäjänteestä (notochord) ja muodostaa lateraalisen inhibiition avulla konsentraatiogradientin hermostoputken lateraaliseen pohjalevyyn, josta erilaistuvat muun muassa liikehermosolut (38). Toisaalta hermostoputken dorsaalipuolen kattolevystä erittyy luun morfogeenistä proteiinia (BMP4) ja Wnt- perheeseen kuuluvia signaalintiproteiineja. Nämä kaksi yhdessä saavat aikaan dorsaalisen puolen solujen erilaistumista (38). Glykogeenisyntaasikinaasi-3 toimii Wnt antagonistina estäen hermostoputken dorsaalipuolen erilaistumista (61).

NOTCH-reseptori säätelee hermosolujen kehitystä lateraalisen inhibition avulla. NOTCH-reseptoriin sitoutuvaa Delta-1 ligandia ekspressoivat solut erilaistuvat hermosoluiksi, mutta viereisissä soluissa Delta-1 ligandi inhiboi neurogeneesiä (48). NOTCH -signaalintireitin estyessä hermosolujen erilaistuminen tehostuu. Gammasekretaasi inhibiittori estää NOTCH-ligandin kiinnittymisen NOTCH- reseptoriin ja lisää neurogeneesiä (49).

2.2 Hermoston liikehermosolut

Motoneuronit voidaan jakaa laveasti ylempiin ja alempiin motoneuroneihin. Jako on tärkeää tehdä, koska solut poikkeavat toisistaan melkoisesti paikan, neurovälittäjäaineen, ja esimerkiksi mahdollisten vaurioiden tuottamien oireiden mukaan. Ylemmät motoneuronit

sijaitsevat aivojen korteksilla siinä missä alemmat aivorungossa ja selkäytimessä. Glutamaatti on pääasiallinen ylempien motoneuroneiden neurovälittäjäaine. Toisaalta alemmat motoneuronit käyttävät edelleen asetyylikoliinia välittäjäaineena eksitoidessaan esimerkiksi lihaksia. Spastisiteetti ja esimerkiksi positiivinen Babinskin merkki liittyvät ylempien motoneuroneiden vaurioon. Halvaantumisen ja esimerkiksi lihasvoiman väheneminen sekä syvien jännerefleksien uupuminen liittyvät alempien motoneuroneiden vaurion merkkeihin. (38)

Motoneuronit sijaitsevat selkäytimessä ventraali- eli etuhaarassa. Ne ovat suoraan yhteydessä sensorisiin hermosoluihin, joka on tärkeää refleksien nopeuden kannalta. Lihaksiin menevät somaattiset motoneuronit voidaan jakaa alfa- ja gammamotoneuroneihin. Alfamotoneuronit ovat yhteydessä ylempiin motoneuroneihin interneuroneiden välityksellä. Alfamotoneuronit vastaavat lihaksen supistuksesta ja toisaalta gammamotoneuronit tuovat tärkeää informaatiota lihaksen asennosta ja kulloinkin vallitsevasta lihasjännityksestä. Lisäksi on olemassa hieman huonommin tunnetut betamotoneuronit, jotka hermottavat sekä intra- että ekstrapusaalisia lihassäikeitä. (38)

Kun motoneuronit erilaistuvat alkionkehityksessä primitiivisen ektodermin soluista, ne kohtaavat matkallaan erilaisia signalointimolekyylejä joiden avulla ne saavat tietylle paikalle ominaisia piirteitä. Tärkeitä signalointimolekyylejä neurulaation jälkeen tapahtuvassa aikaisessa neurogeneesissä ovat WNT, BMP sekä RA. Näiden signaalien lisäksi nimenomaan neuroneiden ventraali-dorsaali suunnan määräytymisessä tärkeä signalointimolekyylä on SHH, jota notokordi erittää (38).

Itse motoneuronit kehittyvät samasta progenitorista (MNP) josta myös kortikaaliset motoneuronit syntyvät. OLIG2 ja NEUROG2 ovat tärkeitä transkriptiotekijöitä saamaan solut suuntautumaan kohti spinaalisia motoneuroneita (38). Kaavoittuminen - nimisessä tapahtumassa motoneuronit kehittyessään saavat ominaisuuksia, jotka ovat tärkeitä niiden lopullisessa tehtävässä. Tämän vaiheen aikana esimerkiksi TGFBeta (transforming growth factor beta), RA (retinoid acid) ja FGF (fibroblast growth factor) ovat tärkeässä roolissa (28). Kehityksen loppupuolella tärkeitä kypsymisen kannalta ovat BDNF (brain-derived neurotrophic factor), GDNF (glial- derived neurotrophic factor) sekä CNTF (ciliary neurotrophic factor). BDNF ekspressoituu laajalti hippokampuksessa ja korteksilla, mutta

sillä on esitetty olevan tärkeä rooli neuroneiden selviytymisessä kehityksen aikana (50). GDNF on liitetty esimerkiksi nigrostriataalisen radan dopaminergisten neuroneiden kehitykseen ja sillä uskotaan olevan merkitys myös synaptogneesissä (51). CNTF on BDNF:n tapaan neuroneiden selviytymistä edistävä tekijä ja sen ekspression vaihtelulla on ajateltu olevan merkitystä neurodegeneratiivisissa sairauksissa (52, 53).

2.3 Charcot-Marie-Tooth

Charcot-Marie-Tooth (CMT) sairaus on yleisnimitys perinnöllisille neuropatioille (56,57), jonka vauriot ylettyvät sekä motorisiin että sensorisiin neuroneihin ääreishermostossa (2). Kyseisen taudin esiintyvyys on 1:2500 (56,57) ja se on geneettisesti erittäin heterogeeninen. Yli 80 erilaista geeniä on yhdistetty CMT-tautiin (35, 58) määrän edelleen kasvaessa, tehden taudista hyvin monimuotoisen. Yleisin kaikista Charcot-Marie-Toothin tautia aiheuttavista mutaatioista on ylivoimaisesti *PMP22*-geenin duplikaatio, joka aiheuttaa jopa 50% kaikista tapauksista (41). Näissä tapauksissa puhutaan CMT1A-tautimuodosta. CMT:stä tunnetaan kaksi syntymekanismiltaan eroavaa muotoa. Tyyppi I tarkoittaa taudin demyelinoivaa ja II tyyppi aksonaalista ilmiä (4), jotka voidaan erottaa toisistaan hermonjohtonopeutta mittaamalla (60). Lisäksi tyypit eroavat toisistaan patologisten mekanismien valossa (5, 57). On kuitenkin huomattavaa, että osa taudin ilmenemismuodoista ei ole selvästi jompaakumpaa tyyppiä vaan puhutaan sekailmiästä (1). Demyelinoivaan muotoon liitetyt geenit vastaavat esimerkiksi Schwannin solujen kehityksestä sekä myeliinin muodostuksesta (57), kun taas aksonaalisessa muodossa puutteita voi olla ainakin solun tukirangan koostumuksessa ja aksonaalisen kuljetuksen eheydessä (6). CMT tyypit I ja II ovat pääasiassa autosomaalisesti dominantisti periytyviä ja ne voivat olla myös de novo - mutaation aiheuttamia (7). Aiemmin on myös puhuttu CMT3 ja CMT4-luokista. Edelliseen liittyy hyvin vakava aikaisin alkava taudinkuva riippumatta periytymismekanismista siinä missä jälkimmäinen tyyppi periytyy autosomaalisesti resessiivisesti ja voi olla vakavuudeltaan vaihteleva (4). Nykyisessä luokittelussa CMT3 muotoa kutsutaan mieluummin DSS:ksi (Dejerine-Sottas syndrome) (4,8). Autosomaalisesti periytyvien tapauksien lisäksi sairaudesta tunnetaan myös X-kromosomaalisesti periytyvä muoto (9).

2.3.1 Oireet

Charcot-Marie-Tooth pitää sisällään laajan kirjon erilaisia oireita ja vaikeusasteita johtuen taudin patogeneesin erilaisista varianteista. Lievät tapaukset alkavat usein myöhemmällä iällä ja oireisiin ja löydöksiin kuuluvat tällöin esimerkiksi distaalinen lihasheikkous alkaen normaalisti ensimmäiseksi alaraajoista, sekä syvien jännerefleksien puuttuminen tai heikkous (10,11). Lihashheikkous esiintyy useimmiten alaraajoissa tibiaalisella (sääriluun puoleinen) puolella ja toisaalta käden alueella etenkin sisäiset lihakset rapistuvat keskihermon hermottaman thenarin (peukalonpuoleinen lihasaitio) puolelta (35). Myös sensorista ataksiaa esiintyy ja ensimmäisenä subkliinisenä merkinä voikin olla esimerkiksi proprioception heikkeneminen (3,11). Myös kuulon alenemaa ja liikkumiskyvyn menetystä on havaittu harvinaisempina oireina (13). Aikaisin alkavat muodot tunnistetaan yleensä ensimmäisten ikävuosien aikana ja merkit neuropatiasta liittyvät liikkumisen puutteisiin (6). Kaatuilu, kömpelyys ja tuntoaistin epäherkkyys ovat yleisiä merkkejä mahdollisesta aikaisin alkavasta taudinkuvasta (14). Lisäksi anatomisia poikkeavuuksia voi esiintyä, esimerkiksi jalkaholvin ylikaareutumisen ja jalan inversio sekä vasaravarpaat kuuluvat tavallisiin merkkeihin (14,15,16). Elinajanodotteesta on ristiriitaista tietoa. Tanskalaisessa aineistossa havaittiin jopa 36 % suurempi mortaliteetti CMT-potilailla verrattuna väestöön (47). Toisaalta ainakin CMT1-muodon suhteen elinajanodotteen on raportoitu olevan normaali (43).

2.3.2 NEFL-geeni

Mutaatiot geeneissä, jotka koodaavat ainoastaan neuroneissa esiintyviä välikokoisia filamenttejä kattavat osan sairauden muodoista (3, 63). *NEFL* - geenimutaatiot aiheuttavat noin kaksi prosenttia kaikista CMT-tapauksista tehden siitä melko harvinaisen taudin syyn (17, 41). *NEFL* - geenivirheet on liitetty joko demyelinoivaan CMT1F tai aksonaaliseen CMT2E-muotoon (20). *NEFL* on neuroneiden pääasiallinen välimuotoinen filamentti, jonka tehtäviin kuuluu muiden välimuotoisten filamenttien kanssa esimerkiksi aksonin halkaisijan kasvattaminen tällä tavoin nopeuttaen impulssin johtumista (18, 59). Neuronien välikokoisiin filamentteihin luetaan edellä mainitun lisäksi keskikokoinen neurofilamentti eli NEFM, raskas neurofilamentti eli NEFH, alfa-interneksiini, sekä useimmiten periferiini (64,65). Neuronien filamentit koostuvat globulaarisesta aminoterminaalista, alfahelikalisesta

sentraalisesta sauvasta sekä karboksiterminaalista (3). Välikokoiset filamentit muodostavat heteropolymeerejä aksoneissa sitoutuen toisiinsa (16,19). Nykyisen tiedon valossa kevyt neurofilamentti toimii ydinproteiinina polymeerissä tehden siitä olennaisen proteiinin aksolin neurofilamenttien eheyttä ajatellen (16). Aikaisemmin on ehdotettu, että mutaatio välikokoista filamenttia tuottavassa geenissä voisi estää heteropolymeereiksi järjestymisen (66). Ilmeisesti CMT2E/1F-muodot, jotka siis tarkoittavat NEFL-proteiinin viallisuudesta johtuvaa taudinkuvaa, eivät ole seurausta neurofilamenttien kerääntymisestä toisiensa lomaan. Myös potilailta otettujen hermobiopsioiden elektronimikroskooppitutkimukset puoltavat tätä (55). Paremminkin taudin molekyylipatologiseksi syyksi on ehdotettu neurofilamenttien vääränlaista järjestäytymistä aksolin varrelle, johtaen paikallisiin kertymiin ja muualla vallitseviin filamenttien puuttellisuuteen. Myös vääränlaisen NEFL-proteiinin kertyminen neuronin soomaan voi olla syynä vajavuuksiin neuronaalisessa kommunikaatiossa. Tähän havaintoon liittyen on ehdotettu, että syynä pakkautumiseen ei ole amyloidogeenisyys vaan vajuus proteiinien kuljetuksessa (5,36).

NEFL-geenin mutaatiot Charcot-Marie-Toothin sairaudessa voidaan jakaa perustavanlaatuisesti kahteen; heterotsygoottisiin dominantisti periytyviin yhden aminohapon muuttaviin missense-mutaatioihin ja homotsygoottisiin nonsense-mutaatioihin, jotka johtavat ennenaikaiseen lopetuskodoniin. Yleisempiä ovat heterotsygoottiset mutaatiot, jotka voivat johtaa kliinisesti erilaisiin taudinkuviin ja vakavuusasteisiin (22). Heterotsygoottinen mutaatio voi johtaa aikaisin alkavan muodon ohella myös ns. late-onset fenotyyppiin (23). Jälkimmäisessä, myöhään alkavan taudin tapauksessa taudin patofysiologiaksi on kuvailtu missense-mutaation aiheuttaman vääränlaisen NEFL-proteiinin aggregoitumista tukkien esimerkiksi mitokondrioiden aksonaalisen kuljetuksen, sekä aktiopotentialin etenemisen (24). Homotsygoottinen nonsense-mutaatio johtaa usein aikaisin ilmenevään taudinkuvaan (22), mutta tapaukset ovat selvästi harvinaisempi kuin heterotsygoottiset mutaatiot. Nonsense-mutaatioiden tautimekanismia on tutkittu vain vähän humaanimalleissa, mutta sen ajatellaan johtuvan normaalia lyhyemmän proteiinin epänormaalista kertymisestä neuronin soomaan ja siitä johtuvasta NEFL-proteiinin puutoksesta aksoneissa (12). Tutkimusryhmämme on kuitenkin hiljattain osoittanut, että nonsense-mutaation tapauksessa NEFL-proteiinia ei tuoteta neuroneissa lainkaan, johtaen

aikaisin alkavaan taudinkuvaan (16). Tutkimukseni tarkoitus on edelleen selvittää mekanismeja proteiinin puuttumisen ja taudinkuvan välillä.

2.3.3 Diagnostiikka

Erilaiset Charcot-Marie-Toothin tautivariantit oireilevat erilaisen patofysiologian ja kulloinkin mutatoituneen geenin mukaisesti eri tavoin. Diagnostiikka perustuu CMT2-potilailla klinisiin, geneettisiin sekä neurofysiologisiin tutkimuksiin. Aluksi on tärkeää selvittää, onko kyseessä sporadinen sairaus, vai onko potilas perinyt sairauden vanhemmiltaan. Tätä varten voidaan sukupuiden avulla selvittää taudin periytymistapaa. Koska dominantti tautimuoto on runsaasti resessiivistä yleisempi, kannattaa tarkastella sitä ensin. Sukupuun lisäksi voidaan tarkastella erilaisia merkkejä, jotka indikoivat geneettisestä neuropatiasta. Aikaisin alkava tautimuoto, hitaasti etenevä kliininen kuva sekä jalkaterän virheasennot (Charcot'n jalka) kuuluvat geneettiseen tautimuotoon, vaikkakaan näiden poissaolo ei sulje pois mahdollisuutta geneettisestä neuropatiasta (30).

Kliiniseen tutkimukseen kuuluu siis etenkin alaraajan distaalisten lihasten voiman määrittäminen, sekä esimerkiksi syvien jänne-refleksien toteaminen. Usein CMT-potilailla alaraajojen lihasvoima on vähentynyt ja patellarefleksi on heikentynyt tai olematon (31). Myös sensoriikkaa kannattaa tutkia, koska 20–40% potilaista on etenkin alaraajoihin painottuvaa nosiseptiivistä tai neuropaattista kipua ja etenkin värinä-tunnon alenema on hyvin yleistä (44).

Neurologi voi lisäksi ottaa geneettiset kokeet, joiden avulla laboratoriomenetelmin voidaan varmistaa uuden sukupolven sekvensoinnin avulla potilaan mahdollinen mutaatio. Monet CMT:n takana olevat mutaatiot voidaankin todentaa teettämällä verestä DNA koe. Tässäkään negatiivinen tulos ei sulje pois CMT:n mahdollisuutta (31). Mikäli elektrofysiologiassa todetaan demyelinaatio, voidaan määrittää *PMP22*- geenin kopioluku. Jos tämä jää negatiiviseksi, voidaan jatkaa geenipaneelilla, joka kattaa yleisimpiä muita mutaatioita. On arvioitu, että kaikista CMT-potilaista noin 20-64 prosentilla on mutaatio *PMP22*-geenissä (43). Jos saadaan rajattua tauti CMT2-luokkaan, voidaan tutkia *MFN2*, joka vastaa noin 20 prosenttia kaikista CMT2-tapauksista (11). Kyseisen mutaation yleisyys lienee Suomessa kuitenkin vähäisempää. CMT2-epäillyt varmennetaan Suomessa pääsääntöisesti geenipaneelin avulla. On kuitenkin havaittu, että taudin monimuotoisen syntymekanismin

vuoksi vain noin 25% potilaista joilla on kliininen diagnoosi, voidaan osoittaa myös geneettinen tausta (42).

Mikäli halutaan varmistaa, kummasta tautimuodosta on kyse (CMT1 vai CMT2) voidaan suorittaa hermon johtonopeusmittaus (NCV). Mittaus tulisi suorittaa yli 3 hermolle (30). Koska vain CMT1-muodossa aktiopotentialin nopeus on selvästi hidastunut, on kyseinen koe varsin pätevä selvittämään tautityypit toisistaan. Aksonin johtonopeutta 38 m/s on pidetty rajana demyelinoivan ja aksonaalisen tautimuodon erottamiseen (45,60).

Käyttökelpoisia kokeita oireiden syiden selvitykseen ovat myös usein neurografian kanssa tehtävä elektromyografia (EMG), joka mittaa elektristen signaalien vahvuutta lihaksissa, sekä harvemmin hermosyiden biopsia, joka on jo melko invasiivinen koe. Polyneuropatian tapauksessa EMG:ssä nähdään fibrillaatiota, yksikkökatoa ja MUP (motor unit potential) muutoksia (72). Koepalasta voidaan määrittää sairauden tyypilliset histopatologiset piirteet, kuten myelinisoituneiden hermosyiden väheneminen tai aksoneiden rappeutuminen (30, 31). Magneettikuvantaminen on havaittu hyödylliseksi sairauden etenemisen arvioinnissa mittaamalla esimerkiksi lihakseen kertyvän rasvan määrää (46).

2.3.4 Hoito

Charcot-Marie-Tooth on tällä hetkellä parantamaton sairaus, jonka hoito on vain kuntouttavaa. Mitään lääkkeellistä hoitoa ei ole olemassa, vaikkakin viime aikoina HDAC6 -inhibiittorit ovat osoittaneet lupaavia tuloksia kliinisissä kokeissa mitokondriaalista kuljetusta parantamalla (29,33). Sairauden patofysiologian ja geneettisen monimuotoisuuden paremman ymmärtämisen myötä uusien lääkkeiden kehittäminen nopeutuu. Kliinisissä kokeissa onkin tällä hetkellä muutamia eri mekanismein vaikuttavia lääkevaihtoehtoja (33).

Hoito keskittyy liikkumisen ylläpitämiseen erilaisten nilkkatukien, ortopedisten leikkausten ja fysioterapian keinoin (30). Liikunnan vaikutus on todettu suotuisaksi esimerkiksi jalan dorsifleksion voimakkuutta mitattaessa (34). Lisäksi erityisen tärkeää on välttää muita riskitekijöitä erilaisten neuropatioiden kehittymisen taustalla. Esimerkiksi neurotoksiinit, kuten tietyt lääkkeet ja alkoholi, on syytä jättää pois (30). Sairauden vaikutuksesta elinajanodotukseen on ristiriitaista tietoa (30, 43, 47). Hiirimalleissa on onnistuttu

vähentämään CMT1-taudinkuvalle tyypillisten Schwannin solujen rappeumaa geeniterapian avulla, mutta tehokkaksiin tämänkaltaisiin hoitomuotoihin on vielä pitkä matka (32).

2.4 Kantasolumallit ja CRISPR-Cas9

Kantasolumallit ovat olleet yli kymmenen vuoden ajan käytössä (67). Tällä tarkoitetaan tyypillisesti potilaiden somaattisten solujen takaisinohjausta pluripotentialle kantasoluasteelle, jonka jälkeen ne voidaan edelleen erilaistaa halutuksi solutyypiksi. Niiden avulla on voitu tutkia erilaisia perinnöllisiä sairauksia ja lääkkeiden vaikutuksia tehokkaammin ja eettisemmin kuin aiempien sikiön kantasolujen avulla. Nykyisin on voitu päästä lähemmäksi todellista tilannetta tutkimalla solumallien lisäksi myös 3D malleja, joissa pyritään jäljittelemään potilaan tilannetta organoidi-tasolla.

CRISPR-Cas9 mekanismi tuli tunnetuksi vuonna 2012, kun ensimmäinen genominen in vitro-muokkaus saatiin aikaiseksi (68). Kyseinen mekanismi on tehokas geenimuokkausmenetelmä, jossa endonukleasi (Cas9) pilkkoo DNA:ta tehden joko molempiin tai vain toiseen juosteeseen leikkauksen. Leikkauskohta määritetään liittämällä entsyymiin spesifinen lyhyt RNA pätkä, joka tunnistaa muokattavan alueen emäspariperiaatteen mukaisesti. CRISPR-Cas9 mekanismi on vähintään yhtä tehokas kuin aiemmin käytetyt geenimuokkausmenetelmät (ZFN, TALEN) ja lisäksi se on vähemmän sytotoksinen. On kuitenkin selvää, että aina muokkaus ei onnistu täysin tai se voi mennä hieman ohi halutusta kohdasta. Juuri spesifisyys onkin vielä ongelma menetelmässä, koska muokatessa voi syntyä ns. off-target leikkauksia (69).

Viime vuosien aikana indusoituja kantasolumalleja on käytetty esimerkiksi Alzheimerin taudin patofysiologian ymmärtämiseen (70). Mallien avulla on luotu myös pienimolekulaarisia lääkkeitä, jotka ovat edenneet jo ihmiskokeisiin. Menetelmän etuja ovat tehokkuus ja etenkin isogeenisen linjan muodostamalla saadaan teoriassa selville vain tutkittavan alueen mutaation vaikutus solujen fenotyyppiin (67). Monogeenisten tautimallien kultainen standardi onkin tällä hetkellä isogeenisen linjan luominen. Editoimalla genejä voidaan kantasolumallien kautta rakentaa tällainen tautimalli, koska onnistuessaan ainoa ero kontrollisolujen ja tutkittavan linjan välillä on tutkittava geeni. Suurimpana haasteena on ollut solumallin vertaaminen todellisiin potilaisiin. Kantasoluista tuotetut 3D-organoidit ovat

herättäneet kiinnostusta, koska niiden avulla voitaisiin tutkia luotettavammin todellista tilannetta. Onkin pyritty mukailemaan esimerkiksi hermo-lihasliitosta paremman mallin saavuttamiseksi.

Muita haasteita kantasolumalleissa ovat esimerkiksi viljelmän epäpuhtaus ja todellisen kultaisen standardin puuttuminen kasvatusprotokollissa (71). Vaikka erilaisilla tavoilla onkin saatu erilaistettua jopa 95 % kaikista soluista neuroneiksi, on usein maljoilla havaittavissa myös jakaantuvaa solukkoa, joka on virhelähde tutkittaessa esimerkiksi proteiineja maljalta. Lisäksi vertailukelpoisuus tutkimusten välillä voi olla vaikea todentaa, mikäli erilaistamisprotokollissa on ollut merkittävästi eroja.

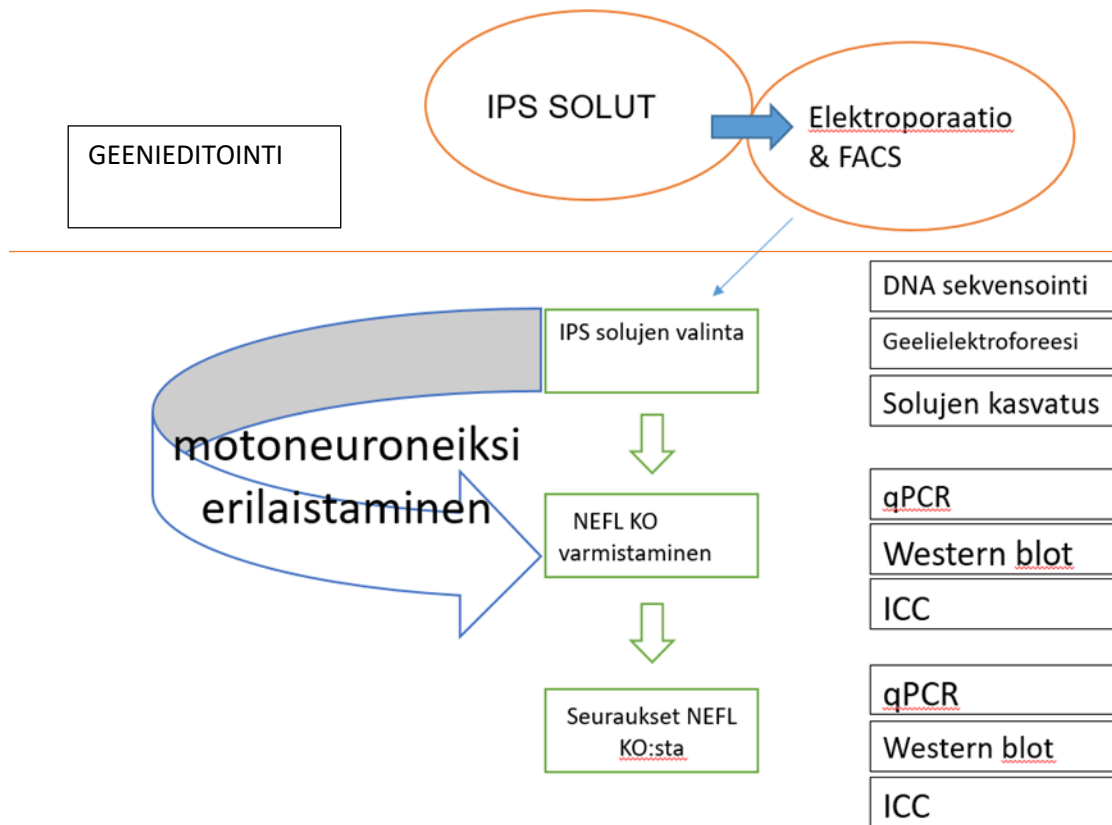
3 Tutkimuksen tavoitteet

Tässä tutkimuksessa keskityn neurofilamenttien puutteista johtuvaan aksoneita vaurioittavaan CMT2E-muotoon. Tavoitteenani on mallintaa NEFL-proteiinin puutosta kantasoluista erilaistetuissa liikehermosoluissa. Terveeltä luovuttajalta kerätyt fibroblastit on indusoitu ensin pluripotentiksi kantasoluksi (iPSC), jonka jälkeen käyttämällä CRISPR-Cas9-mekanismia pyrin tekemään *NEFL*-geenin alueelle poistogeenisen mutaation molempiin alleeleihin. Geenieditoinnin onnistuminen onkin eräs tutkimukseni päätavoitteista. Ryhmämme tutkimuksen mukaan nonsense-mutaatio NEFL-proteiinissa johtaa sen puutokseen (16). Tämän tiedon valossa ”knock-out”-mallin käyttö onkin perusteltua ja järkevää. Näistä klooneista tulen erilaistamaan liikehermosoluja mallintaakseni NEFL-proteiinin puutosta parhaalla mahdollisella tavalla. Toinen tämän tutkimuksen päätavoitteista onkin muokattujen IPS-solujen erilaistaminen alemmiksi liikehermosoluiksi. Tämän jälkeen tavoitteenani on verrata geenien ilmentymistä ja proteiinien tuotantoa ja esiintymistä kontrollin, sekä muokkaamieni kloonien välillä.

Tutkimukseni tavoitteena on luoda toimiva tautimalli käyttäen CRISPR-Cas9-mekanismia hyväkseni ja tunnistaa erilaisia poikkeavuuksia, joita NEFL knock-out (KO)-hermosolu saattaa ilmentää verrattuna kontrollisoluihin. Esimerkiksi erilaiset kompensatiomekanismit aksonin filamenttiverkoston muodostamisessa lienevät mahdollisia rakenteeltaan läheisesti NEFL:iä muistuttavien NEFM ja NEFH-proteiinien ekspressiota lisäämällä. Pysin myös selvittämään ryhmämme suorittaman RNA sekvensoinnin myötä kiinnostaviksi osoittautuneiden geenien mahdollisia eroavaisuuksia muokatuissa solulinjoissa.

Tämä tutkimus suoritetaan kahdessa vaiheessa. Loin vuonna 2018 genomieditoinnin avulla useita NEFL KO-klooneja, jotka on tarkistettu leikkausten osalta ja ne onnistuivat hyvin (16). Jatkoisin tästä vuonna 2019 pakastettujen kloonien avulla, koska halusin validoida useamman kloonin geenieditoinnin onnistumisen. Tästä jatkettiin neuronien erilaistamiseen ja edelleen tulosten saamisen jälkeen kirjoitusvaiheeseen. Tutkimus suoritettiin yhdessä lähiohjaaja Markus Sainion opastuksessa, joten tuloksien ja tutkimuksen vaiheen raportointi hoitui päivittäin.

4 Aineisto ja menetelmät



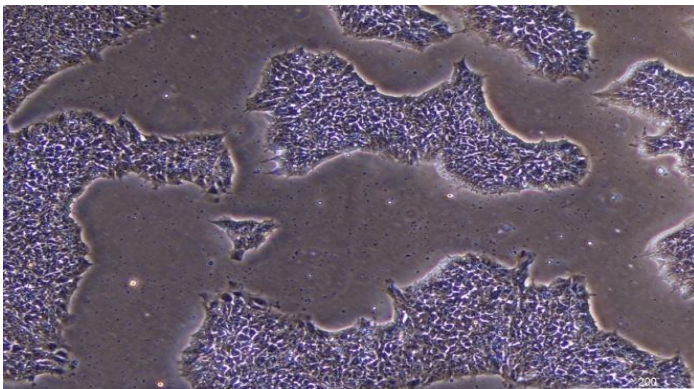
Kuva (1) Työvaiheet tutkimuksen aikana

4.1 Solujen kasvatus

Geenieditointi suoritettiin käyttämällä elektroporaatiossa kahta guidea, jotka leikkaavat geenin aloituskohdan pois. IPS-solujen valinnassa ajettiin genominen DNA agarosigeelille, josta nähtiin irti leikkautuneen palan koko. Kasvuun otettavien solulinjojen valinnassa auttoi myös alustavan sekvensoinnin tulokset. Lopullinen solujen valinta tapahtui solujen jo kasvaessa kasvunopeuden perusteella.

Kaikki IPS-soluviljelyssä tarvittavat liuokset steriloidtiin suodattamalla ne 0,22 µm filterin läpi. IPS-solut hankimme Biomedicum kantasolukeskuksesta ja heidän taholtaan on varmistettu solujen pluripotenttius. Soluviljelmässä käytin ”matrigel” maljoja 0,5%

matrigeeli (Corning)/DMEM/F12 + Glutamax (Life Technologies). Maljojen lämmitettiin aina kaksi tuntia huoneenlämmössä ennen solujen asettamista niille. Kasvatusliuoksena käytin 2 % Essential 8 Supplement-liuosta (Life Technologies), ja soluja sulatettaessa maljalle lisättiin 10 μ M Rho-kinaasin (ROCK) inhibiittoria (Selleckchem). Tämän tarkoituksena oli estää solustressin indusoimaa apoptoosia. Solut irrotettiin maljalta huuhtelemalla kaksi kertaa 0,5 mM EDTA-liuoksella (Life Technologies). Tämän jälkeen lisättiin vielä kerran EDTA-liuos maljalle ja laitettiin inkubaattoriin 3-4 minuutiksi. EDTA imettiin pois paineen avulla ja riippuen, mitä seuraavaksi tehtiin, solut joko irrotettiin mekaanisesti tai pakastusnesteen avulla. Ensimmäiseen pakastusnesteliuokseen (20 % FBS/DMEM) resuspensoitiin pakastukseen menevät solut, jonka jälkeen toinen liuos (20 % FBS, 20 % DMSO/DMEM) lisättiin hitaasti sekaan.



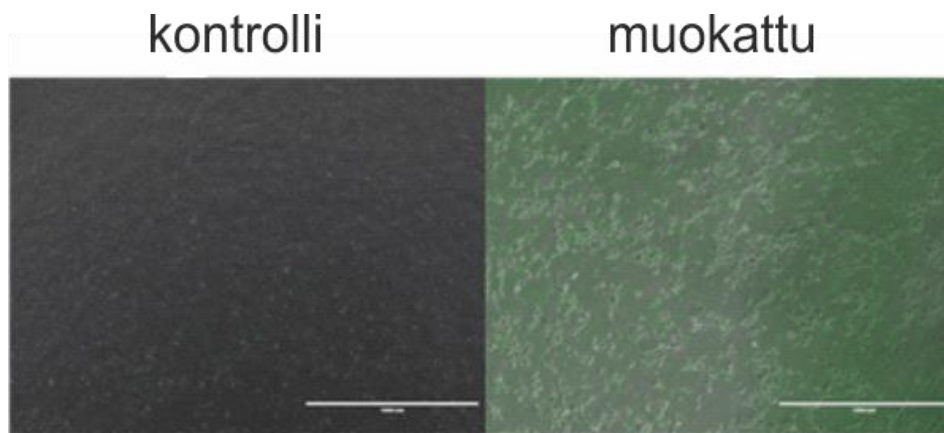
Kuva (2). 46.11 kontrolli IPS- linjan viljelmä

4.2 Geeninmuokkaus

Ensimmäisellä kerralla teimme elektroporaation siten, että soluja oli noin miljoona. Toisella kerralla soluja kasvatettiin siihen asti, että soluja oli noin 5 miljoonaa. Tämä vastaa noin 5 täyttä 3,5 cm maljaa. Elektroporaatio tehtiin kahdesti, sillä ensimmäisellä kerralla ei saatu tarpeeksi klooneja kasvuun. Elektroporaatiossa siirsimme plasimidin solun sisään tekemällä solukalvoon väliaikaisesti pienen reiän. Suunnittelimme CRISPR-CaS9 katkaisureaktion käyttämällä hyväksi Benchling-ohjelmaa, jolla voi suunnitella targetointi guideja. SgRNA:t (single gene RNA) on esitetty alhaalla taulukossa.

Maljat käsiteltiin 10 mikromolaarisella ROCK-inhibiittorilla 4 tuntia ennen toimenpidettä. Tämän jälkeen solut pestiin PBS:llä ja irrotettiin lisäämällä 1ml accutasea ja inkuboitiin 37 asteessa noin 5 minuuttia. Soluliuos kerättiin 15 ml:n Falcon putkeen, ja lisättiin kylmää FBS/PBS liuosta (5 %). Solumäärä varmistettiin Life Countess II – solulaskurilla. Tarvittava määrä soluja pipetoitiin Eppendorf-putkeen. Solut sentrifugoitiin ja resuspensoitiin 500 mikrolitraan Neon-R-puskuria (invitrogen). Liuokseen lisättiin 500 nanogrammaa tilattua sgRNA:ta (guidea), 3 mikrogrammaa Cas9-plasmidia ja 3 mikrogrammaa templaattia. Soluliuos upotettiin kolmeen millilitraan elektrolyyttipuskuria (invitrogen), ja elektroporaatio suoritettiin kahden 20 millisekunnin ja 1100 voltin suuruisella sähköiskulla. Sähköiskut saatiin aikaan Invitrogen Neon Transfection System- laitteella. Solut siirrettiin 3,5 cm matrigelimaljalle E8- kasvatusliuokseen, johon lisättiin jälleen ROCK- inhibiittoria [10uM]. Seuraavana päivänä noin 24 h elektroporaation jälkeen vaihdettiin tuore E8- kasvatusliuos. Solut kuvattiin fluoresenssimikroskoopilla, joka siis mittasi solujen GFP-signaalia, transfektion onnistumisen osoittamiseksi.

Vertailun vuoksi otettiin kuvat GFP-signaalista kontrollista, johon ei oltu elektroporoitu plasmidia, ja muokatuista soluista.



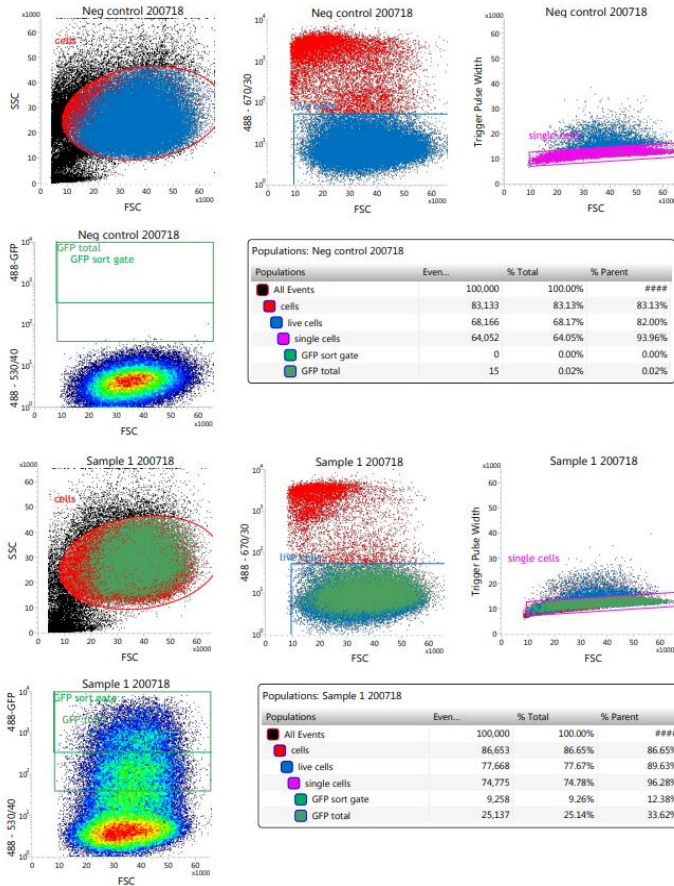
Kuva (3). GFP signaalin osoitus

Plasmidin siirtymisen soluun elektroporaatiossa voi varmistaa tutkimalla solun GFP signaalia, koska plasmidissa on myös GFP signaalin antava alue.

4.3 FACS (fluorescence-activated cell sorting)

FACS perustuu elektroporoitujen solujen GFP-positiivisuuteen. Erottelua varten soluja inkuboitiin 10 mikromolaarisessa ROCK inhibiittorissa tuoreessa E8 kasvatusliuoksessa 4 tuntia. Tämä siksi, että FACS tuottaa soluille suhteellisen paljon stressiä, joten halutaan varmistaa, etteivät ne kuole matkalla FACS laitteelta solumaljalle. Solut huuhdeltiin PBS-liuoksella ja irrotettiin akkutaasilla inkuboiden solukaapissa 37 asteessa noin viiden minuutin ajan. Tämän jälkeen liuos siirrettiin 15 millilitran Falcon-putkiin. Putkeen lisättiin myös 4 ml jääkylmää 10%FBS/PBS liuosta. Soluja sentrifugoitiin 190g:ssä noin kolme minuuttia. Pelletti liuotettiin FACS puskuriin (10%FBS/PBS, 1x HBSS (Life technologies), 1 mM EDTA, 25mM HEPES (Life technologies), 10 mikromolaarinen ROCK inhibiittori) lisäämällä jääkylmää liuosta 500 mikrolitraa- Liuos suodatettiin 40 mikrometrin filterillä ja siihen lisättiin FACS - laitteen vieressä puoli mikrolitraa propiumjodidia, joka merkitsee kuolleet solut sitoutumalla näiden DNA:han.

Biomedicum Flow Cytometry Unit – palvelun avulla pystyimme erottelemaan ne solut, josisa elektroporaatio oli onnistunut, kasvamaan yksittäin matrigeelipäällystetyille 96-kuoppalevyn kaivoille. Laitteen nimi on BD Influx Flow Cytometer. FACS- erottelun jälkeen solut sentrifugoitiin kevyesti 70g:ssä muutaman minuutin ajan ja inkuboitiin kaksi päivää ROCK-inhibiittori / E8 kasvatusliuoksessa. E8 + ROCK- kasvatusliuos vaihdettiin joka toinen päivä.



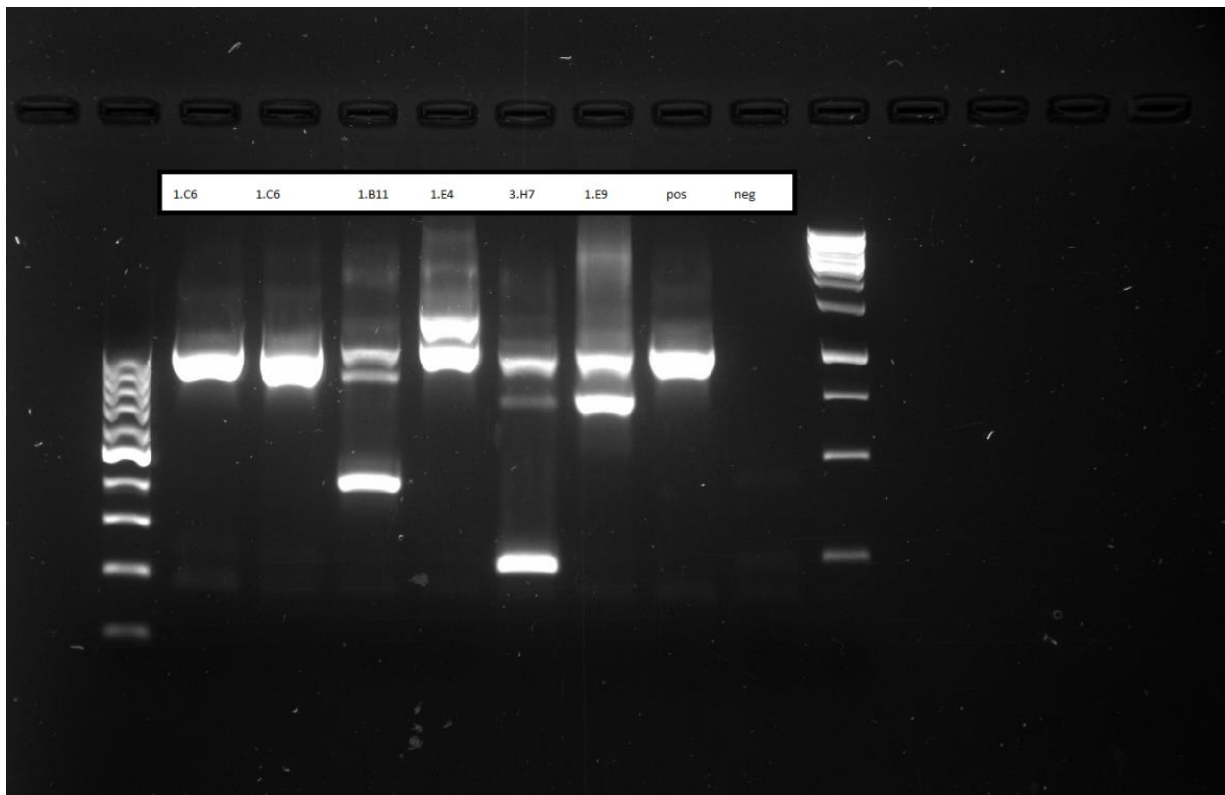
Kuva (4). FACS analyysi

Yllä toisesta Elektroporaatio-FACS kerralta saatua dataa FACS – palvelusta. Sen mukaan siis elävistä soluista (78 %) noin joka kolmas solu (25%) oli GFP positiivinen. Kuolleiden ja elävien solujen erottelu perustuu PI-merkkiaineeseen, joka fluoresoi kuolleita soluja sitoutumalla niiden DNA:han. Sytometrilaitteen toiminta perustuu eri signaalien (PI, GFP) ominaisiin aallonpitoisuuksiin, joilla laite valaisee ja jaottelee solut niistä tulevien signaalien mukaan. Valo siroaa eteen (etusironta) tai sivuille (sivusironta). Tämä antaa informaatiota solujen koosta ja rakenteesta, eli esimerkiksi siitä, ovatko solut yksittäisiä vai kasautuneet ryppäisiin.

Soluja kasvatettiin koskematta 72h, jonka jälkeen lisättiin alla mainittua mediaa 50 µl. Kun solut kasvoivat yksittäisinä 96-kuoppalevyllä, niille vaihdettiin media joka toinen päivä. Mediana käytettiin erityistä FACS-jälkeistä mediaa. Basaaliliuoksena käytettiin E8, lisäksi (10 µM Rho-kinaasin inhibiittoria, Pen/Strep- antibioottia [Gibco], ja Clone R [StemCell Technologies]). Tätä liuosta käytettiin vähintään kahden medianvaihdon ajan, jonka jälkeen

Clone R jätettiin pois. Kun solut kasvoivat tarpeeksi, siirrettiin ne pikkuhiljaa isommille maljoille, jotta solut kasvaisivat nopeammin. Tämän jälkeen soluja pyrittiin kasvattamaan, jotta saataisiin tarpeeksi eristettävää DNA:ta elektroporaatiossa tapahtuneiden leikkausten laadun selvittämiseen. Tässä vaiheessa kasvatusmediasta jätettiin pois myös ROCK-inhibiittori ja PS.

Eristin genomisen DNA:n Macherey Nagel NucleoSpin Tissue XS-kitillä, ja sen konsentraation määritin NanoDrop-laitteella. Kloonin genomien muokkaus tarkistettiin PCR:llä alukkeilla, jotka on suunniteltu katkaisukohtaan ulkopuolelle (Aluke Forward 1446, Aluke Reverse 1447). PCR-ohjelmana käytettiin MyTaq HS Red Mix- entsyymiin perustuvaa reaktiota (liite 1). Tämän jälkeen näytteitä laskettiin sopiva määrä lisättäväksi 1 % agarosigeeliin ja ajettiin 120V noin tunnin verran. Kun näytteet olivat ajautuneet, kuvasin geelin Bio-Rad ChemiDoc XRS+ -laitteella.



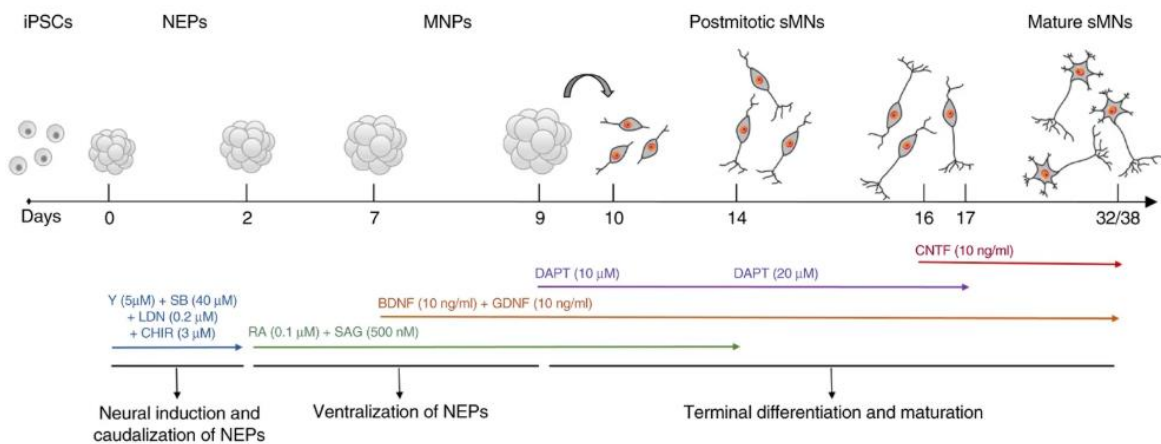
Kuva (5). Geenimuokkauksien varmistaminen geelijaon avulla

1.B11 ja 1.E9 ovat seurausta ensimmäisestä elektroporaatiosta ja 3.H7 toisesta elektroporaatiosta. Guidet 1246 ja 1443 leikkaavat genomista 600 bp palan. Jos leikkaus on tapahtunut, geelijaossa näkyy 480 bp pala (1. elektroporaatio, suoritettu 20.6.2018). Guidet 1245 ja 1444 leikkaavat

genomista 670 bp palan. Jos leikkaus on tapahtunut, geelissä näkyy 350 bp pala (2. elektroporaatio, suoritettu 19.7.2018).

Geeliltä eristetyistä DNA paloista tarkistettiin sekvenssi. Näytteille tehtiin BigDye PCR -ajo erillisen ohjeen mukaan (FIMM Ready to run –sekvensointi). Sekvensointialukkeina oli samat alukkeet, joita käytettiin PCR:ssa eli näyteestä vietiin kaksi eri putkea sekvensointiin sekä alukkeella 1446 että alukkeella 1447 (taulukko 2). Sekvensoinnin tuloksia tarkasteltiin Sequencher 5.2.4-ohjelmaa käyttäen.

4.4 Liikehermosoluiksi erilaistaminen



Kuva (6). Kuva lainattu (29). Aikajana motoneuroneiden erilaistumisesta.

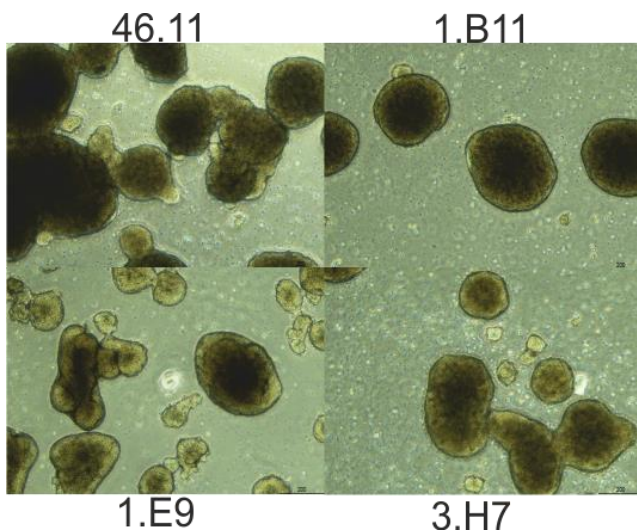
IPS-solujen valinta tapahtui luonnollisesti ennen erilaistamisen aloitusta. Valittiin yhteensä viisi linjaa kasvuun alustavien sekvensointitulosten ja geelielektroforeesin perusteella. Lopullinen valinta tapahtui vasta liikehermosoluiksi erilaistamisen aikana solujen kasvun perusteella. Hyvin kasvavat linjat viljelmässä olivat 1.B11, 1.E9 ja 3.H7, joten jatkettiin niiden kanssa erilaistamisprosessissa eteenpäin.

Liikehermosolujen erilaistamisen perusliuos (motor neuronal differentiation base, MNDB) oli alemmiksi liikehermosoluiksi erilaistamisen basaaliliuos, eli sitä käytettiin kaikissa

vaiheissa (1:1 DMEM/F12 + Glutamax/Neurobasal [Life Technologies] kasvatusliuos, 0,5x N2 [Life Technologies], 0,5x B27 [Life Technologies], 0,1 mM askorbiinihappo [Merck], 1x P-S).

2 miljoonaa IPS-solua maljattiin low-attachment-plateille E8-mediaan. MG1 – liuosta käytettiin NEP-asteelle erilaistamisessa. Media sisälsi MNDB, ROCK-I (5uM) TGFB(SB) (40 uM), GSK-3 (Chir) (3 uM), BMP (LDN) (0,2 uM) ja kasvatusliuos vaihdettiin heti seuraavana päivänä. Ensimmäinen vaihe käsittää erilaistamisen kaksi ensimmäistä päivää.

Toisessa vaiheessa ventralisoitiin neuroepiteliaaliset progenitorsolut, jotta ne kehittyisivät nimenomaan motoneuroneiksi, jotka sijaitsevat selkäytimen etusarvessa. Ne kehittyvät siis liikehermosolujen esiastesoluiksi, eli MNP:ksi. Käyttämällä oikeissa suhteissa retinoidihappoa ja SAG:tä, eli sonic hedgehog - polun inhibiittoria, syntyy noin viikon kuluttua protokollan aloituksesta OLIG2 -positiivisia MNP:ta. Tämän jälkeen siirryttiin käyttämään eri signalointimolekyylejä sisältävää liuosta, MG2:ta. MG2 sisältää retinoidihappoa (0,1uM) ja SHH inhibiittoria (0,5uM) (katso liitteet). Tätä kasvatusliuosta vaihdettiin kahden päivän välein aina seitsemänteen päivään asti. Median vaihto tapahtui sentrifugoinnin avulla (250rpm, 4 min) josta aina poistettiin supernatantti.



Kuva (7). hermosolujen esiasteita 4. päivänä erilaistamisen aloituksesta

MG2-liuosta käytettiin 7. päivään asti, jolloin NEP-soluille vaihdettiin MG3 – media. Sen tarkoituksena on saada lopullinen erilaistuminen mononeuronien esiasteiksi aikaan. Tässä mediassa on samat ainesosat kuin yllä olleessa MG2, mutta lisäksi lisättiin BDNF ja GDNF (10ng/ml).

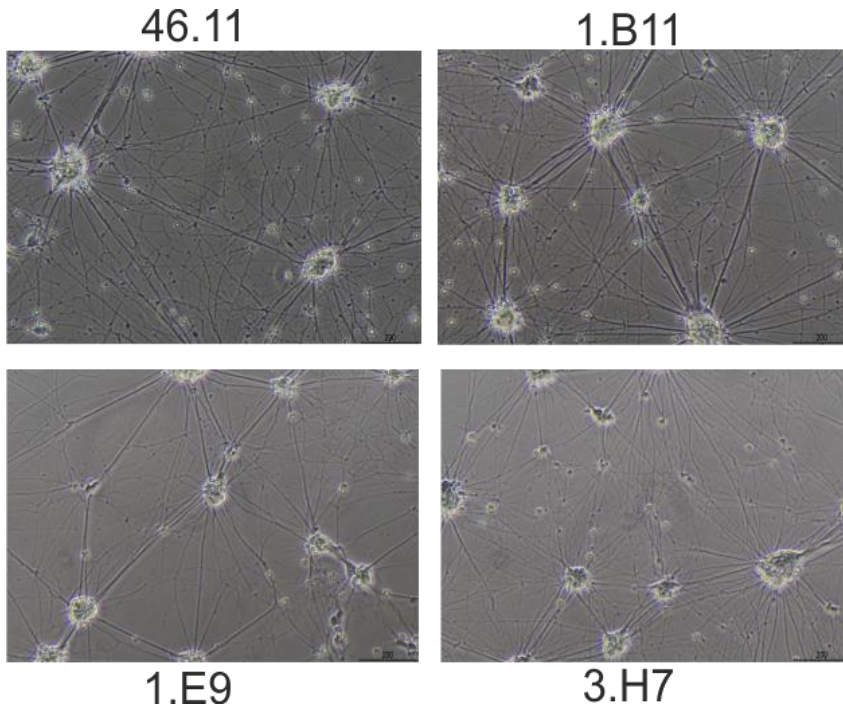
Yhdeksäntenä päivänä solumedian laatu vaihtui jälleen. Seuraavan median nimi oli MG4, ja se sisältää MG3-median kaikki komponentit ja lisäksi DAPT:in (gammasekretaasi-inhibiittori) (20uM).

Päivä 11 on kaikista kriittisin tämän protokollan onnistumiseksi. Silloin suuret MNP solurykelmät tulee hajottaa pienemmiksi. Tätä päivää edeltävästi piti valmistaa Poly-D-lysiini + laminiini päällystetyt levyt (1:20 PDL in PBS, 500 uL/12-well plate), joille hajotetut MNP:t sitten siirrettiin. Levyt suljettiin parafilmillä ja inkuboitiin huoneenlämmössä vuorokauden ympäri. Seuraavana päivänä levyt pestiin PBS:llä ja lisättiin laminiini (1:200) ja inkuboitiin tunnin verran inkubaattorissa. Solut siirrettiin 15 ml Falcon putkiin, jonka jälkeen ne fuugattiin 1000rpm 3 minuuttia ja poistettiin supernatantti. Pelletti resuspensoitiin neljään millilitraan PBS:sää ja fuugaus suoritettiin uudestaan. Tämän jälkeen lisättiin 1 ml Accumaxia ja resuspensoitiin pellettiä. Liuosta inkuboitiin 10 minuuttia 37 asteen vesihauteessa ja sen jälkeen 5-10 minuuttia huoneenlämmössä. Sitten pipetoitiin edestakaisin, jotta solurykelmät hajoaisivat- tässä on kuitenkin oltava tarpeeksi sensitiivinen, koska solut kuolevat helposti. Sitten lisättiin 5 ml PBS-liuosta, jotta accumax laimenee. Sentrifugoitiin 1000 rpm 5 minuutin ajan ja poistettiin supernatantti. Tämä sentrifugointivaihe toistettiin vielä uudelleen jonka jälkeen pelletti resuspensoitiin yhteen millilitraan MG4-liuosta. Solujen määrä ja viabiliteetti tarkistettiin lisäämällä 10 mikrolitraan solususpensiota 10 mikrolitraa TrypanBlue ja Countess II-solulaskurin avulla. Solut maljattiin tämän jälkeen ja ylimääräiset solut pakastettiin pakastusmedioita hyväksi käyttämällä.

Solujen viabiliteetti oli pääosin hyvää, noin 90 %, joten solujen määrä ei ollut ongelma. Soluja jäi pakastettavaksi asti. Proteiini/RNA levyille (12-well plate) maljattiin 500 000 solua per kaivo. Immunosytokemiaa varten tehtiin 24-well plate, jolle maljattiin 100 000 solua per kaivo.

Päivänä 12 vaihdettiin soluille puolet mediasta, edelleen käyttäen MG4 mediaa. Puolet mediasta vaihdettiin kahden päivän kuluttua MG5 mediaan, joka sisältää MNDB, DAPT(20uM), BDNF(10ng/ml), GDNF(10ng/ml). Päivänä 16 mediaksi vaihtui lopullinen MG6, jota vaihdettiin puolet kaivon tilavuudesta. Puolikas medianvaihto on parempi, koska solujen ei haluta kuivuvan missään vaiheessa. Loppuaikana puolet mediasta vaihdettiin aina

2-3 päivän välein. Se sisältää MNDB, BDNF, GDNF, CNTF (jokainen 10ng/ml). Kuvassa (12) esitän omien solujeni avulla erilaistamisprosessia ja havainnollistaakseni prosessia olen lainannut kaavamaista kuvaa motoneuroneiden erilaistamista käsittelevästä julkaisusta (kuva 6) (29).



Kuva (8) 17 päivän ikäiset postmitoottiset neuronit

4.5 Immunosytokemia

Immunosytokemiaa varten kasvatin neuroneita 24- kuoppalevyillä. Päivänä 30. neuroneiden kehityksessä otin kaikki solut pois kasvatuksesta mukaan lukien immunosytokemiaan menevät solut. Huuhtelin neuronit PBS:llä, jonka jälkeen solut fiksoitiin 4 % - PFA liuokseen 15 minuutiksi. Tämän jälkeen käytin 0.2 % Tritonia x100 PBS:ssä 15 minuuttia solujen permeabilisointiin. Blokkasin solut 5- % BSA:lla (base liuksena PBS-T) noin 2 tuntia huoneen lämmössä.

Valmistin tällä välin primaari vasta-aine liuokset. Primaarisen vasta-aineiden lisäämisen jälkeen soluja inkuboitiin yön yli neljässä asteessa valolta suojattuna. Seuraavana päivänä Primaari vasta-aine pestiin pois kolmen pesukerran avulla käyttäen PBS-T- liuosta huoneen

lämpötilassa. Sekundaari vasta-ainetta inkuboitiin noin tunnin verran huoneen lämmössä. Se pestiin pois samalla tavalla.

Sitten siirsin solut isommille suorakulmioiden muotoisille laselle siten, että jokaiselle isolle lasille tuli 2 kappaletta neuronilaseja. Käytin mounting mediumia 1-2 tuntia huoneen lämpötilassa. Lopulta suljin reunat kynsilakalla ja vein solut pimeään estääkseni valoreaktion. Kuvien analyysissä käytettiin ohjelmia FIJI image J, sekä ZEN ja Graphpad 8 ohjelmia. ISL-1+ - Analyysi suoritettiin manuaalisesti laskemalla vertaamalla punaisen signaalin päällekkäisyyttä siniseen signaaliin FIJI image J ohjelman avulla. Käytetyt vasta-aineet on esitetty taulukossa 1.

4.6 Western blot

Motoneuroniviljelmästä kerättyyn solupellettiin sekoitettiin 80 mikrolitraa RIPA-puskuria (Life technologies), ja proteiini-inhibiittoria, ja sitä inkuboitiin yhteensä 5 minuuttia jäällä. Tämän jälkeen vorteksoidin pellettä ja sentrifugoin tarpeeksi kauan (14 000 g, 10 minuuttia).

Pipetoin Criterion TGX- geelille (BioRad) 6 mikrogrammaa näytettä per kaivo. Geeliä ajettiin ensin kymmenen minuuttia 120V, jonka jälkeen noin 65 minuuttia 140V. Proteiinit siirrettiin geeliltä nitroselluloosakalvolle (Life Technologies) Bio-Rad Trans-Blot Turbo -laitteella valmistajan ohjeen mukaisesti. Siirrossa käytettiin Mixed MW -ohjelmaa 150 V maksimijännitteellä ja 10 minuutin siirtoajalla. Siirron jälkeen kalvoa huuhdeltiin TBST-liuoksessa (0,1 % Tween20/1x TBS) 10 minuuttia keinuttajalla huoneenlämmössä, jonka jälkeen kalvoa inkuboitiin tunnin ajan blokkauksiliuoksessa (5 % maitojauhe/TBST), joka pestiin pois TBST:llä, kunnes pesuliuos säilyi kirkkaana. Kalvoa inkuboitiin primaarisessa vasta-aineessa (taulukko 1) yön yli +4 celsiusasteessa. Primaarinen vasta-aine pestiin pois TBST:llä 3 kertaa 10 minuutin ajan huoneenlämmössä, jonka jälkeen inkuboitiin ravistelijassa tunnin verran sekundaarisessa vasta-aineessa. Lopuksi huuhdeltiin kolme kertaa 10 minuutin ajan. Kalvolle lisättiin kaksi millia WesternBright ECL- substraattia (Advansta), ja kalvo kuvattiin Bio-Rad ChemiDoc XRS+ -laitteella. Analyysissä käytettiin hyväksi Image Lab 3.0 Graphpad 8-ohjelmaa.

4.7 qPCR

RNA eristettiin 30 päivän ikäisistä neuroneista Macherey-Nagel RNA eristyskitin avulla. Tämän jälkeen tuotin jokaisesta näytteestä 20 mikrolitraa cDNA:ta Maxima kitin avulla. Primereina käytin seuraaville geneille suunniteltuja alukkeita: GAPDH, NEFL ja SLITRK2, ISL1, GRM3 ja LYNX1 (taulukko 2). Ajoin qPCR ohjelman (liite 2), käyttäen apuna Bio-Rad ChemiDoc XRS+ -laitetta, Syber Greenin ohjeen mukaan. Tuloksia käsittelin Excelin ja GraphPad 8-ohjelman avulla.

4.8 Tilastolliset menetelmät ja eettinen lupa

Tuloksia analysoidessa käytettiin hyväksi GraphPad 8-ohjelmaa. Tilastollisesti merkitsevän tuloksen rajana pidettiin $p < 0,05$. Solulinjojen välisiä eroja tutkittiin käyttäen Studentin T-testiä. Eettinen lupa saatiin tutkimukseen Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin kuntayhtymän (HUS) eettisen toimikunnan puolesta.

5 Tulokset

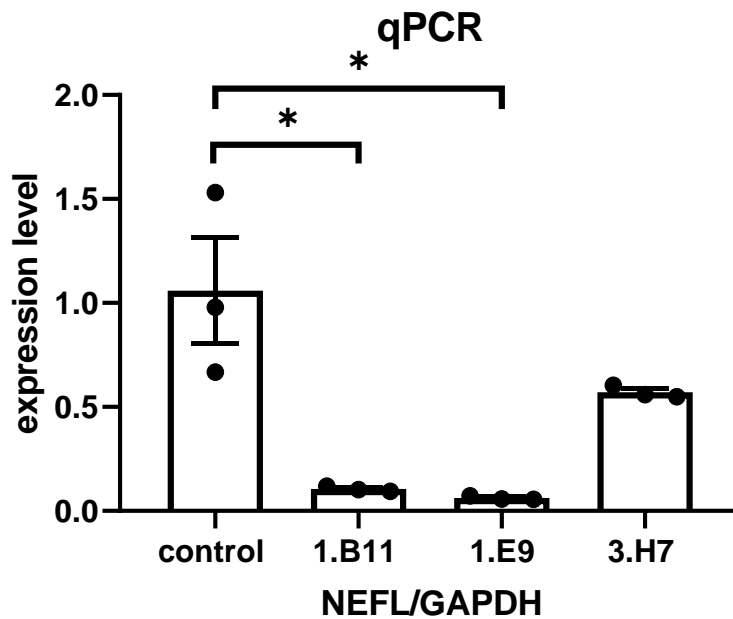
5.1 Elektroporaation ja FACS tulokset

Ensimmäisestä elektroporaatiosta ja seuraavana päivänä tehdystä FACS:sta saatiin 5 kpl kloonija kasvuun, joista kuitenkin vain kaksi saatiin kasvamaan kolonioiksi asti. Nämä olivat kloonit 1.B11 ja 1.E9, joita käytin tässä tutkimuksessa erilaistukseen asti. Toisella kerralla pyrin minimoimaan solujen inkubaattorin ulkopuolella vietetyn ajan ja lisäksi soluja oli määrällisesti enemmän. Tuloksena oli 23 kasvamaan lähtenyt kloonit, joista 19 saatiin kasvatettua kolonioiksi asti. Tutkimuksessani käytetty linja 3.H7 on peräisin näistä kloonista. Suuri osa muista toisella kerralla saaduista kloonista on varmistettu geenieditoinnin kannalta onnistuneiksi ryhmämme muiden tutkijoiden puolesta.

5.2 NEFL KO osoitus

5.2.1 NEFL qPCR

Aivan ensimmäiseksi tuli selvittää, ovatko käsiteltävät linjat tutkittavan geenin suhteen muokattu onnistuneesti. Koska NEFL ilmentyy vain neuroneissa, ei IPS-soluista mRNA tai proteiinitason varmennusta voi tehdä. DNA-tason selvitys oli kuitenkin jo tehty ryhmämme sisällä ja osaltaan sekvensoinnin tulosten perusteella valittiinkin juuri tutkimuksessa käytetyt linjat, koska niiden perusteella geenieditointi näytti onnistuneen. Aloitin tämän varmentamisen ajamalla qPCR ajon, josta kävikin ilmi kahden linjan (1.E9 ja 1.B11) onnistunut muokaus (Kuva 9). Toisaalta yhdessä linjassa (3.H7) NEFL mRNA:n määrä näyttäisi puolittuneen, eli molempien alleelien muokaus ei näytä onnistuneen. *NEFL*-geenin tuottamaa mRNA:ta verrattiin solujen ylläpitogeneeni *GAPDH*:n tuottaman mRNA:n määrään.

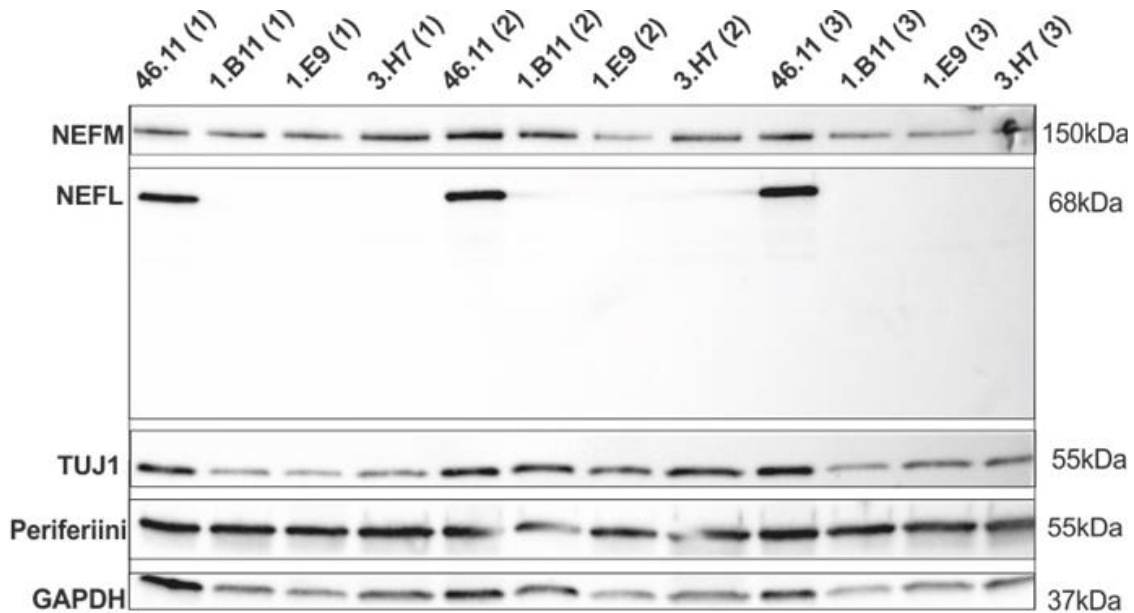


Kuva (9). NEFL qPCR

Geenimuokkaus NEFL-geenin suhteen on onnistunut kahdessa linjassa (1.B11, 1.E9). Lisäksi mRNA:n määrä linjassa 3.H7 näyttää puolittuneen, joten voidaan arvella toisen alleelin muokkauksen onnistuneen toisen tuottaessa vielä mRNA:ta. Tulos on analysoitu käyttäen Studentin T-testiä verraten kontrollisolulinjaan.

5.2.2 Western Blot

Seuraavaksi tuli selvittää proteiinitason muutokset muokatuissa soluissa. Ainakin linjojen 1.E9 ja 1.B11 muokkaus NEFL suhteen on onnistunut western blotin mukaan. NEFL-vastaaine ei havainnut ylivalotuksessa näissäkään linjoissa ollenkaan signaalia. Kaivovaluman vuoksi on vaikeaa analysoida kahta vasemmanpuolista nelikkoa, mutta viimeisessä neljän kaivon setissä 3.H7 kohdalle ilmestyi hyvin himmeä viiva NEFL kohdalle ylivalotuksessa.



Kuva (10). Western blot

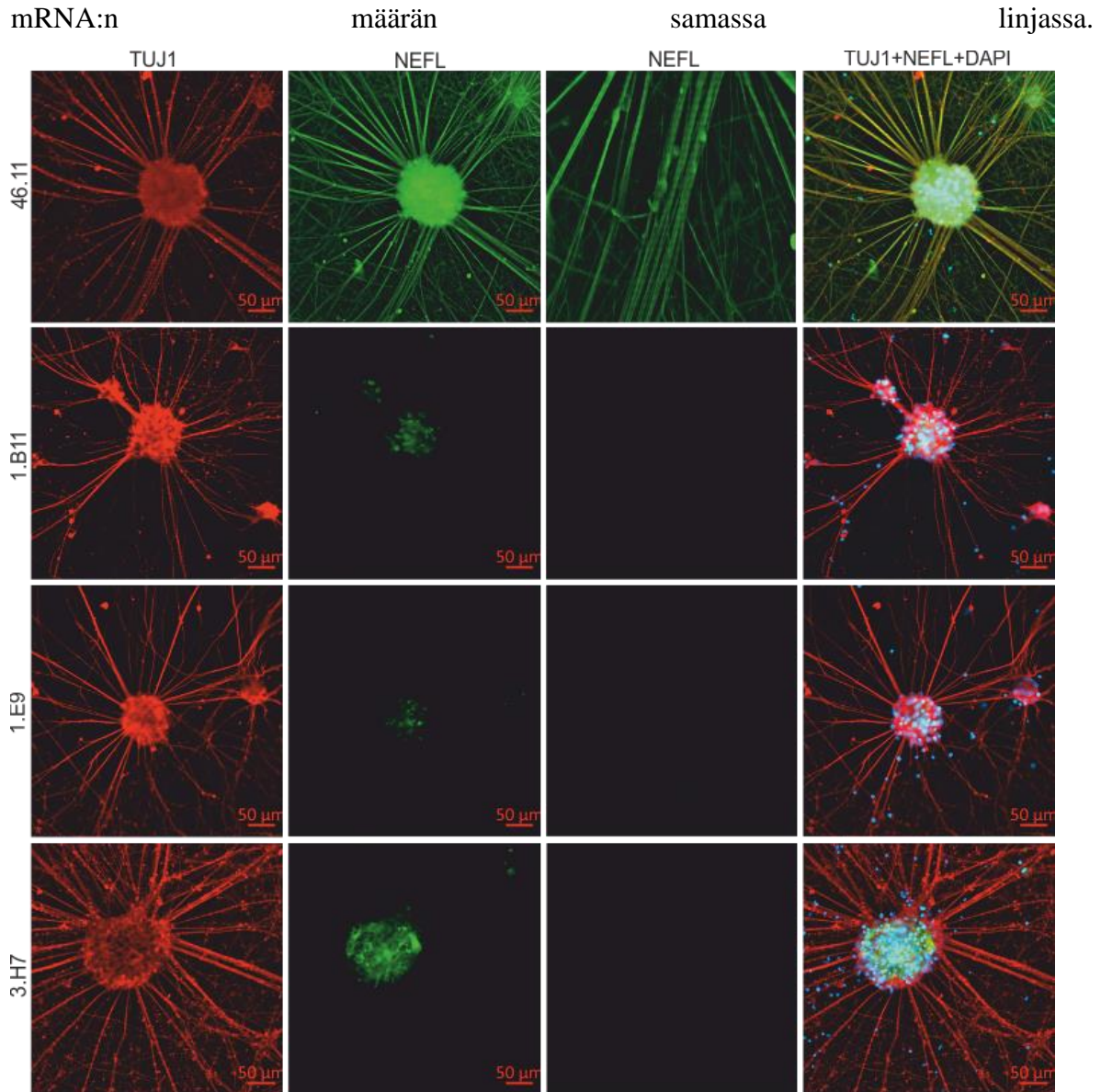
NEFL-proteiinia ei havaita muokatuissa linjoissa. Kaivovalumaa on havaittavissa kaivoissa 1.B11 (2) ja 3.H7 (2) ja se voidaan nähdä myös esimerkiksi periferiini vasta-aineella kuvattaessa.

5.2.3 NEFL immunosytokemia

Halusin vielä varmistaa, ettei tutkituissa linjoissa ilmenny proteiinia etenkin aksoneissa, missä NEFL yleensä sijaitsee. Värjäys onnistui hyvin ja sen perusteella kahdessa kolmesta (1.B11, 1.E9) muokatusta linjasta on täydellinen NEFL-proteiinin puutos, mikä havaitaan vihreän signaalin vähäisyydellä. Lisäksi on huomattavaa, että kohdistettaessa aksoneihin, joissa kyseinen proteiini pääasiassa sijaitsee, ei näy ollenkaan signaalia muokatuissa linjoissa. NEFL ei siis ekspressoitu, koska geenimuokkaus on onnistunut ja proteiinia ei tuoteta.

Kyseinen värjäys lienee oleellisin tutkimukseni kannalta. Siinä vihreä väri vastaa NEFL-proteiinia. Sitä pitäisi olla kontrollissa, mutta ei geenimuokatuissa neuroneissamme. Toisaalta punainen väri värjää TUBB3:n, eli tubuliinin neuronaaalisen alayksikön. Sitä pitäisi olla vakiomäärä kaikissa neuroneissa, koska NEFL poistaminen ei pitäisi vaikuttaa neuronaaalisen tubuliinin määrään. Värjäyksistä todetaan, että TUJ1-signaali näkyy kaikissa kuvissa varsin tasaisesti ja selvästi kaikkialla. NEFL sen sijaan ekspressoituu vahvasti

kontrollisolulinjassa. Linjoissa 1.B11 ja 1.E9, joissa muokkaus on todennäköisesti onnistunut, on NEFL-proteiinin tuottaman signaalin määrä olematon. Toisaalta linjassa 3.H7 signaalia tulee hieman, mutta vähemmän mitä olisi voinut olettaa ottaen huomioon NEFL mRNA:n



Kuva (11). NEFL, TUJ1, DAPI immunosytokemia

Vihreä väri osoittaa NEFL:n, punainen Tubuliinin ja sininen DAPI:n. Tärkeimpänä havaintona on NEFL-signaalin puuttuminen muokatuista solulinjoista, etenkin kolmannessa paneelissa esitetyissä aksoneissa.

5.2.4 Yhteenveto

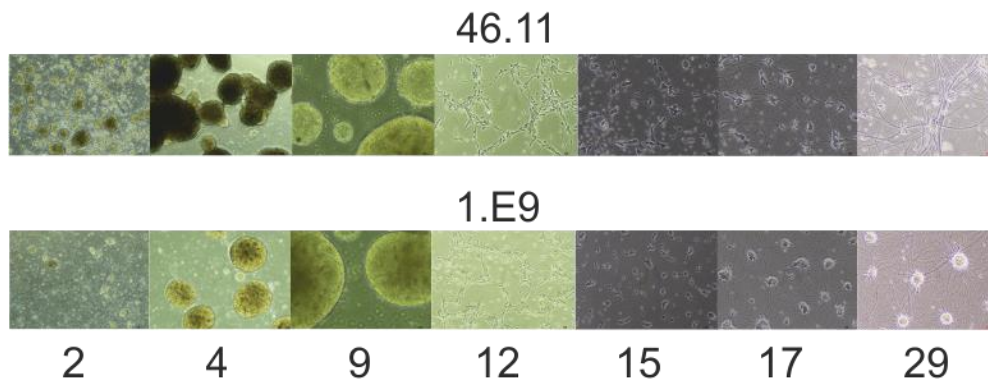
Todistin kolmella tavalla kohdegeenimme ekspresion puuttumisen tai vähenemisen muokatuissa solulinjoissa. Voidaankin hyvällä varmuudella sanoa, että vaikka pieni määrä mRNA:ta tuotetaan myös solulinjoissa 1.B11 ja 1.E9, ei kuitenkaan NEFL-proteiini ekspresoidu siellä missä sitä tarvittaisiin aksonien eheyden kannalta.

5.3 Motoneuroneiksi erilaistamisen onnistumisen varmistaminen

Toinen tämän tutkimuksen ydintavoite oli erilaistaa alempia hermosoluja hyvällä tehokkuudella onnistuneesti. Tätä varten käytimme tunnettuja spinaalisten motoneuronien markkereita hyväksemme validoidaksemme työvaiheen onnistumista.

5.3.1 Solujen ulkonäkö soluviljelmässä

Otin liikehermosolujen kehitykseen liittyvien tärkeiden päivämäärien kohdilla kuvia mikroskoopilla eri solulinjoista. Vertasin yhtä muokattua linjaa kontrollisolulinjaan poissulkeakseni mahdollisia eroja linjojen välillä. Näitä ei esiintynyt, vaan solut kehittyivät hyvin samankaltaisina.



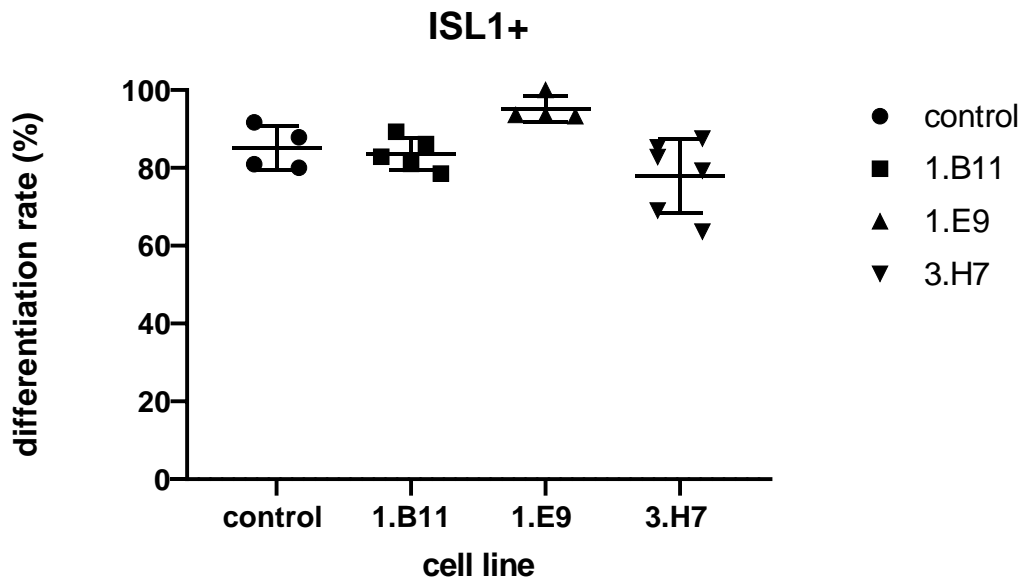
Kuva (12). Spinaalisten motoneuronien kehitys soluviljelmässä

Kuvia on otettu eri aikoina erilaistamisprosessin aikana. Esimerkinomaisesti esitetty kontrollin ja yhden muokatun solulinjan (1.E9) erilaistaminen.

5.3.2 ISL1-positiivisuuden selvittäminen

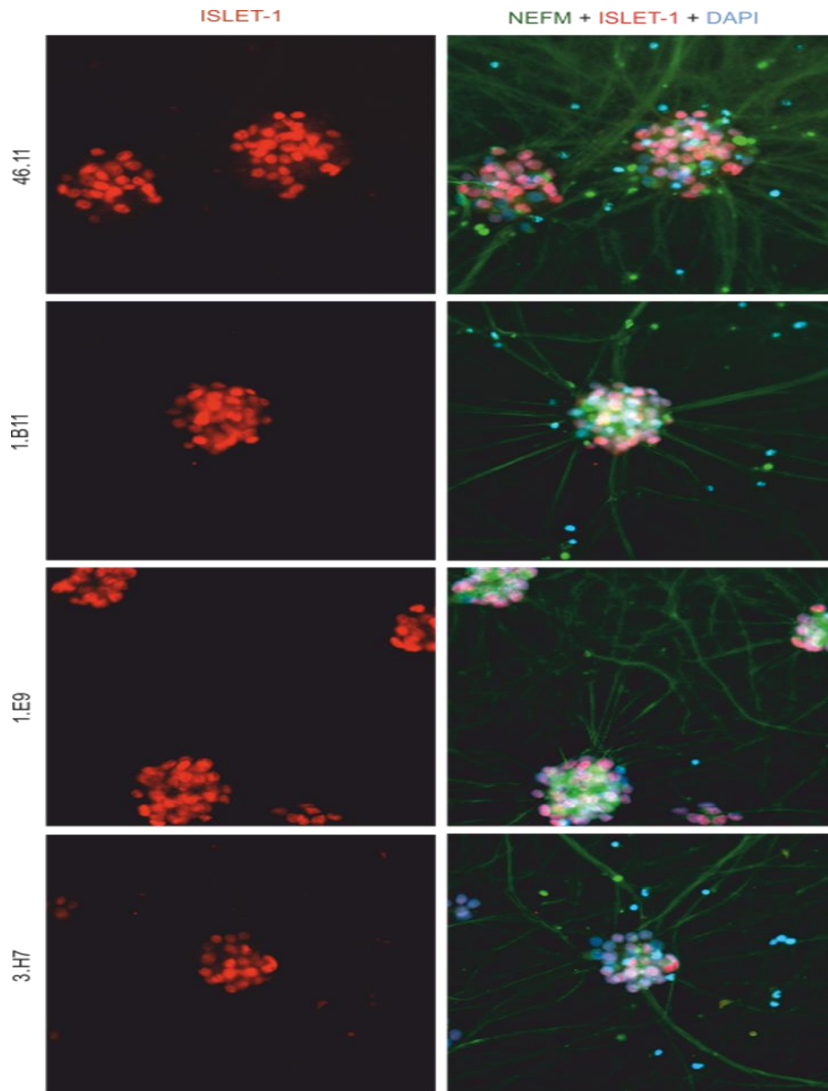
Halusin selvittää, kuinka suuri määrä tietyn solulinjan soluista on erilaistunut halutuiksi alemmiksi motoneuroneiksi. Käytin hyväkseni tunnettua spinaalisten motoneuronien merkkiainetta (Islet1). Kyseinen proteiini toimii transkriptiofaktorina ja ekspressoituu jo melko kypsissä spinaalisissa motoneuroneissa.

Laskin manuaalisesti solujen ISL1-positiivisuutta verrattuna solujen GAPDH-positiivisuuteen. Tulokset olivat huomattavan hyviä, sillä parhaan solulinjan erilaistumistehokkuus oli jopa 95% (1.E9). Myös muiden solulinjojen ISL1-positiivisuus oli erinomainen. Ryhmässämme erilaistamisprosentti on ollut noin 80 % luokkaa aikaisemmin.



Kuva (13). ISL1+ määrittäminen manuaalisesti laskemalla (FIJI imageJ -ohjelma)

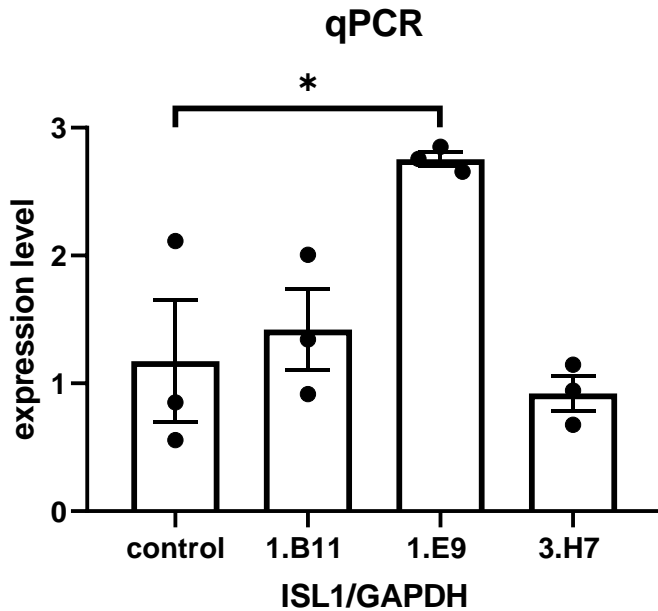
Kaikkien solulinjojen erilaistamisen keskiarvoksi sain noin 85 %. Suurin onnistumisprosentti oli solulinjassa 1.E9 (noin 95% , n=4). Huonoin erilaistamisprosentti oli solulinjassa 3.H7 (noin 78%, n=6).



Kuva (14). ISL1-NEFM värjäys

NEFL puutos ei näytä vaikuttavan NEFM määrään ja tämä havainto on yhtäläinen western blotin tulokseen. NEFM värjäytyy kaikkialla tasaisesti, kuten kuuluukin. Punainen väri osoittaa ISLET1-proteiinin, vihreällä ilmenee NEFM ja sinisellä jälleen tumaproteiini DAPI. ISLET1 sijaitsee liikehermosolun tumassa. NEFM sen sijaan ekspressoituu aksoneissa.

Varmistin vielä qPCR:n avulla ISL1-positiivisuustason jokaisessa solulinjassa. Vertasin tulosta jälleen solujen ylläpitogeneeni GAPDH:hon. Kaikkien linjojen ekspressio on hyvä, mutta yhdessä linjassa (1.E9) erilaistaminen näyttää onnistuneen muita linjoja paremmin.



Kuva (15). ISL1/GAPDH qPCR.

1.E9-linjan erilaistumisprosessi näyttää olleen tehokkain. Kaikki solulinjat ovat kuitenkin erilaistuneet hyvin. Tulos on analysoitu käyttäen Studentin T-testiä.

5.3.3 Yhteenveto

Käytin kolmea eri keinoa varmistaakseni, onko toinen ydintavoitteeni saavutettu. Voidaan todeta, että solut näyttävät motoneuroneilta soluviljelyn loppupuolella ja valtaosa niistä ekspressoii alemmille motoneuroneille spesifiä markkeria sekä immunosytokemian- että qPCR:n perusteella. Näiden tietojen perusteella olen onnistunut erilaistamaan alempia motoneuroneita.

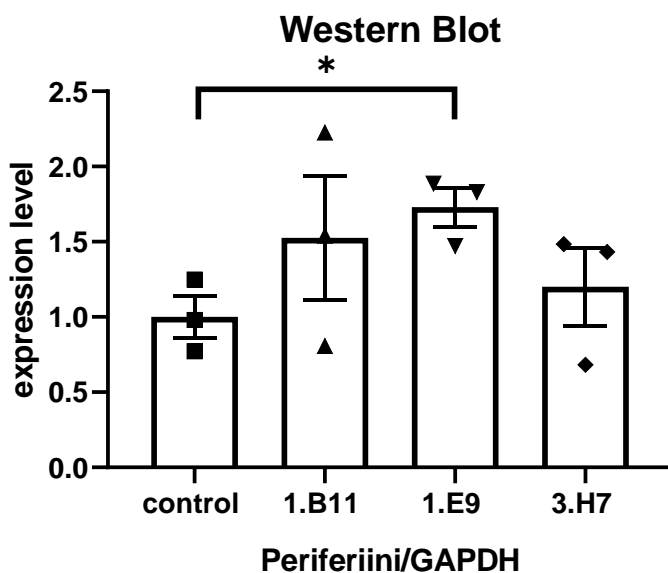
5.4 NEFL KO:n seuraukset solussa

Tämän tutkimuksen lisätavoitteisiin kuului muokattujen solujen tutkiminen muiden kiinnostavien geenien ja proteiinien osalta. Näitäkin kysymyksiä lähestyessä käytin hyväksi western blottia, qPCR sekä immunosytokemiaa.

5.4.1 Western blot

Tutkin NEFL ohella myös NEFM, Periferiinin, TUBB3 ja GAPDH:n proteiinien määriä eri solulinjoissa. Western blotissa on havaittavissa kaivovalumaa (kuva 10), jonka huomaa selvimmin NEFL- värjäyksestä kaivojen 1.B11 (2) ja 3.H7 (2) kohdalla. Tämän huomaa myös periferiinvärjäyksessä samoilla paikoilla. Tämän vuoksi näitä kaivoja ei voi käyttää etenkin NEFL-tuloksia analysoidessa. NEFL-ylivalotuskuvasta huomaa kuitenkin, että mitään *NEFL*-geenin tuotetta ei ole ajautunut pidemmälle geelillä. Myöskään NEFM -proteiinin osoituksen viimeistä kaivoa ei voi analysoida päivämäärän tullessa signaalin tielle.

Verrattaessa eri linjojen proteiinien määriä solujen housekeeping – geeni *GAPDH*:n tuottamien proteiinien määriin, voitiin arvioida mahdollisia eroja linjojen välillä. Muita kiinnostavia proteiineja ovat mahdollisesti NEFL-proteiinin puutoksen myötä ekspressiotaan muuttavat muut välikokoiset filamentit. Keskikokoisen neurofilamentin (NEFM) määrä vaikuttaa melko vakiolta kaikissa linjoissa ja tämä onkin ollut viimeisimpien tutkimustulosten konsensus. *TUBB3*-geenin tuottama proteiini on lähes *GAPDH*:n veroinen housekeeping geeni spinaalisissa motoneuroneissa, joten sen ekspressio tulee olla tasainen kaikissa linjoissa. Periferiinin määrä näyttää olevan noussut kaikissa muokatuissa solulinjoissa verrattaessa kontrolliin. Etenkin ”parhaassa” (1.E9, jossa NEFL mRNA määrä pienin) knock-out-linjassa periferiinin määrä eroaa tilastollisesti merkitsevästi kontrollilinjasta.



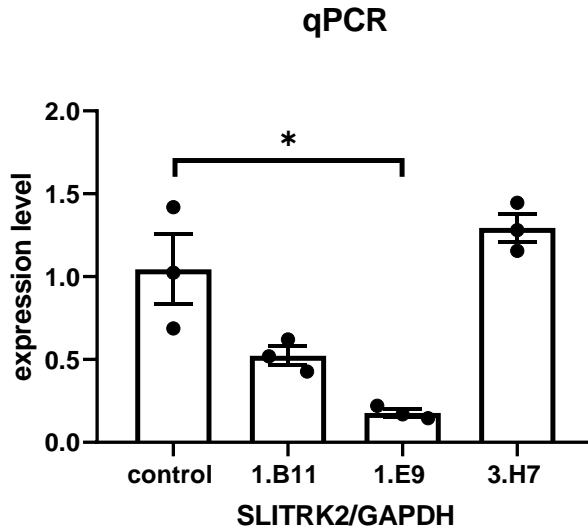
Kuva (16). Periferiinin määrä suhteessa GAPDH:n määrään Western blot analyysissä

Muokatuissa linjoissa periferiinin määrä on suurempi verrattuna kontrollisolulinjaan, ja linjassa 1.E9 tulos on tilastollisesti merkitsevä. Tulos on analysoitu Studentin T-testiä käyttäen kontrollilinjaan verraten.

5.4.2 qPCR

Halusin selvittää tutkimuksen kannalta tärkeiden geenien tuottaman mRNA:n määrää muokattujen solulinjojen ja kontrollin välillä. Ryhmämme suorittaman RNA sekvensoinnin perusteella kontrollin ja yhden varman knock-out linjan välillä oli eroja *SLITRK2*, *GRM3* ja *LYNX1* - geenien ekspression välillä. RNA sekvensoinnin tuloksissa *SLITRK2* mRNA määrä oli laskenut ja *LYNX1* sekä *GRM3* mRNA määrä oli noussut. Yritin saada selville, toistuisivatko nämä tulokset kasvattamissani alemmissa liikehermosoluissa.

SLITRK2-geenin tuottaman mRNA:n määrä erosi kontrollin ja muokattujen solulinjojen välillä tilastollisesti merkitsevästi. Tilastollisesti merkitsevä mRNA määrän väheneminen on havaittavissa 1.E9-solulinjan kohdalla ja se näyttää vähentyneen myös linjassa 1.B11, mutta tulos ei ole tilastollisesti merkitsevä. Toisaalta 3.H7- linjan mRNA:n määrä ei ollut laskenut. Tämä johtunee muokkauksen epätäydellisyydestä 3.H7-linjassa. Tulos vastaa ryhmämme aikaisempaa käsitystä *NEFL*-geenin sammuttamisen vaikutuksesta *SLITRK2*-geenin ilmentämiseen neuroneissa. Tulos tulisi kuitenkin tulevaisuudessa toistaa suuremmalla määrällä näytteitä.



Kuva (17). SLITRK2/GAPDH qPCR

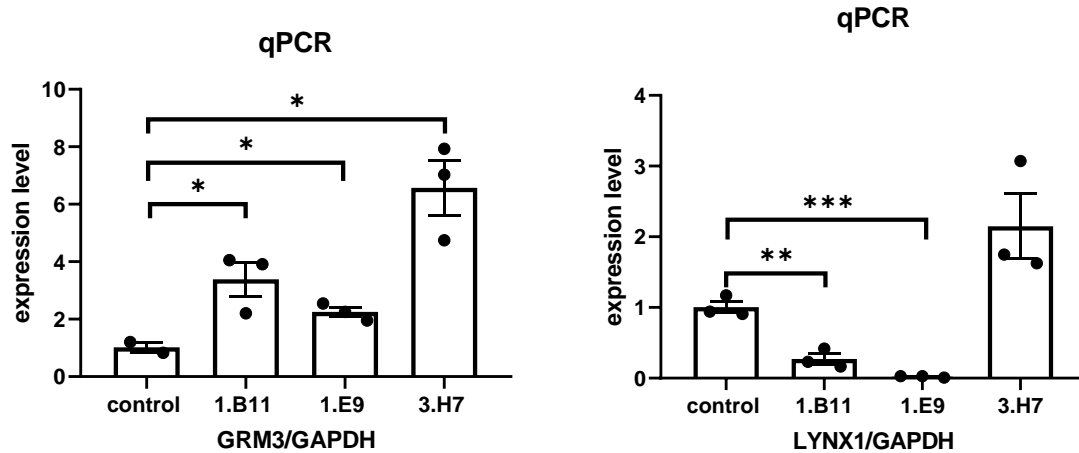
Tilastollisesti merkitsevä ero esiintyy kontrollin ja 1.E9-linjan välillä. Myös 1.B11-linjan SLITRK2 mRNA määrä on vähentynyt, mutta tulos ei ole tilastollisesti merkitsevä. 3.H7-linjassa samaa havaintoa ei todeta. Tulos vastaa ryhmämme suorittaman RNA sekvensoinnin tulosta. Tulos on analysoitu Studentin T-testiä käyttäen verraten kontrollilinjan.

GRM3 ja LYNXI olivat näyttäneet kiinnostavilta geneiltä samassa RNA-sekvensoinnissa, jossa oli vertailtu kontrollineuroneita yhteen *NEFL* knock-out solulinjaan. Geenien ekspressio oli noussut RNA sekvensoinnin perusteella *NEFL*-poistogeenisessä solulinjassa.

GRM3:n kohdalla tulokset näyttävät melko johdonmukaisilta muokatuissa solulinjoissa. Kyseisen geenin tuottama mRNA oli lisääntynyt kaikissa muokatuissa solulinjoissa. Tilastollisesti merkitsevä ero esiintyi jokaisessa muokatussa solulinjassa. Tulos vastaa ryhmämme aikaisempaa tulosta kyseisen geenin suhteen. Koska kuitenkin suurin kyseisen geenin ekspressio oli puolittain geenimuokatussa solulinjassa, ei lopullisia johtopäätöksiä voida vetää ja jatkotutkimuksia tarvitaan.

Toisaalta *LYNXI* - geenin tuottaman mRNA määrissä havaitsin tilastollisesti merkitsevän eron onnistuneesti muokatuissa solulinjoissa, eli linjoissa 1.B11 ja 1.E9. Samankaltaista havaintoa ei tule esiin kolmannessa muokatussa solulinjassa (3.H7). Tulokset olivat kuitenkin onnistuneesti muokatuissa solulinjoissa päinvastainen ryhmämme RNA

sekvensoinnin tuloksiin kyseisen geenin osalta. Koska onnistuneesti muokatuissa solulinjoissa tulokset ovat hyvin vahvasti tilastollisesti merkitsevät, on kyseistä geeniä kuitenkin kiinnostavaa tutkia tulevaisuudessa.



Kuva (18). qPCR tulokset GRM3/GAPDH & LYNX1/GAPDH

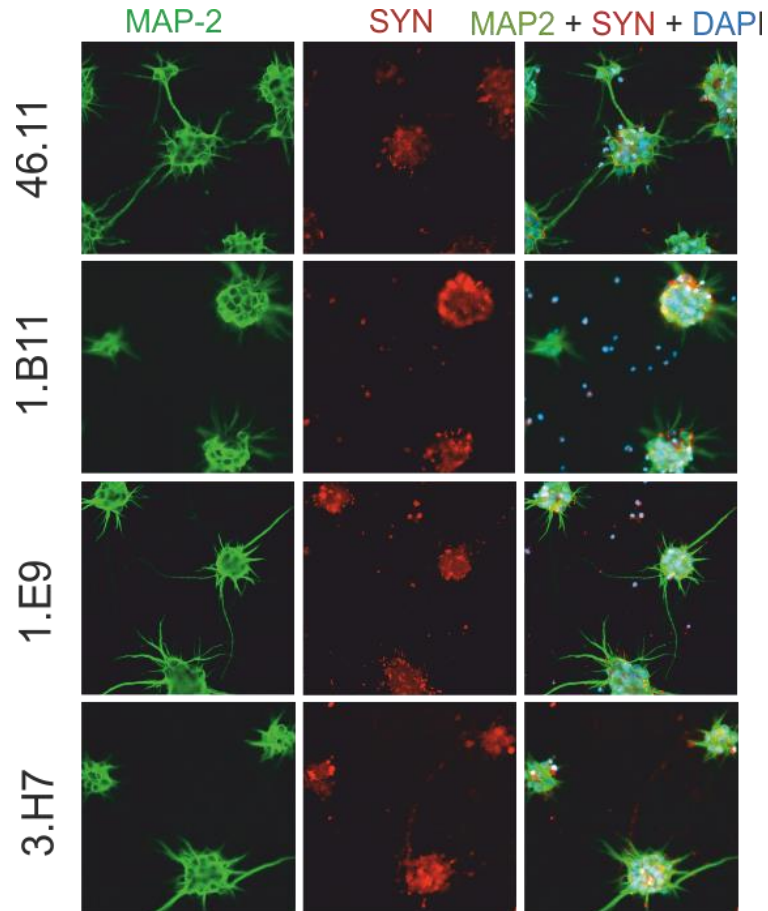
GMR3 mRNA:n määrä näyttää olevan NEFL-geenistä riippuvainen. Toisaalta LYNX1 mRNA:n määrä näyttää vähenevän kahdessa muokatussa solulinjassa, etenkin 1.E9-linjassa, jossa tulos tilastollisesti merkitsevä. GRM3-geenin tuottama mRNA oli noussut myös ryhmämme suorittamassa RNA sekvensoinnissa, joten saamani tulos vastaa tätä. Toisaalta LYNX1 mRNA:n määrä oli noussut samassa RNA sekvensoinnissa, mutta omassa tuloksessani se on laskenut onnistuneissa linjoissa herättäen kysymyksiä kyseisen geenin suhteen. Tulos on analysoitu käyttäen Studentin T-testiä kontrollilinjaan verraten.

5.4.3 Immunosytokemia

Tämän värjäyksen tarkoitus oli selvittää eri linjojen mahdollisia solumorfologisia eroja muokkauksen jäljiltä. Lisäksi halusimme selvittää synapsiin avulla hermosolujen toiminnallista aktiivisuutta.

Hermosolujen rakenne oli samanlainen, vaikka NEFL puuttui. MAP2 ekspressoituu kaikkialla tasaisesti, eli NEFL puutos ei ole vaikuttanut neuroneiden normaaliin morfologiaan tämän proteiinin suhteen. Toisaalta synapsiinia näkyy reilusti solujen sooma-

osissa, mikä kertoo siitä, että neuroneissa tapahtuu synapsien remodelaatiota, eli solut ovat aktiivisia.



Kuva (19). MAP2, SYN immunosytokemiaa

Nähdään solumorfologialtaan samanlaiset neuronit kontrollisoluinjassa sekä muokatuissa linjoissa. MAP-2 näkyy vihreällä, SYN punaisella ja DAPI jälleen sinisenä.

6 Pohdinta

Tämän tutkimuksen kaksi päätavoitetta oli mallintaa CMT2E-potilaan solutason tilannetta kantasolumallilla sekä tutkia muiden tautiin mahdollisesti liittyvien geenien tuottamien mRNA:n ja proteiinien määriä. Ensimmäiseen tavoitteeseen päästiin muokkaamalla indusoiduista pluripotentista kantasoluista *NEFL*-geenin suhteen mutantteja siten, että ne eivät tuottaisi kyseistä proteiinia. Sen jälkeen ne erilaistettiin alemmiksi motoneuroneiksi optimoimallamme protokollalla, jotta saavutettaisiin mahdollisimman hyvä erilaistamisprosentti ja toisaalta tutkimuksen toinen päätavoite. Kolmas tutkimuksen tavoite selvitettiin RNA- ja proteiinitason tutkimusmenetelmiä käyttäen, kun tutkittiin eri geenien ilmentymisiä muokatuissa solulinjoissa.

Tutkimustulokset viittaavat siihen, että kaksi kolmesta muokkaamastamme solulinjasta on onnistunut halutulla tavalla. Tämä selviää parhaiten qPCR:n avulla, jonka myös western blot varmistaa. Näissä linjoissa (1.E9 & 1.B11) *NEFL* RNA:n määrä on hyvin vähäinen ja proteiinia ei ole lähes ollenkaan. Immunosytokemia näytti *ISL1*-positiivisuuden lisäksi, että keskikokoisen filamentin (*NEFM*) määrä tai sijainti ei ollut muuttunut. *MAP2* ja synaptofysiinivärjäykset osoittivat, että *NEFL*-puutos ei vaikuttanut neuronien morfologiaan tai synapsien muokkausaktiivisuuteen. Lisäksi vastasin kysymykseen, onko *NEFL* proteiinia jäljellä muokatuissa solulinjoissa ja jos on, niin missä siellä. Samalla toinen proteiini, *TUBB3* kertoi, onko *NEFL*-proteiinin puutos vaikuttanut neuroneiden aksoneihin jollain muulla tavalla. Reilusti ylivalottamalla saadaan signaalia oikeastaan mistä vaan ja *NEFL*-geeninkin suhteen pystymme näkemään himmeästi värjäytyvät solukeskukset. Kuitenkaan *NEFL*-proteiinia ei ole neuriteissa, joissa sitä kuuluisi olla, joten tämä varmistaa *NEFL*-geenin suhteen knock-outtien onnistumisen.

Pystyin selvittämään solujen erilaistamistehokkuutta laskemalla manuaalisesti solujen *ISL1/2* positiivisuutta verraten *GAPDH*-positiivisiin soluihin. Erilaistaminen onnistui erittäin hyvin, etenkin ottaen huomioon jakautuvien solujen pienen määrän neuroniviljelmissä. Aiemmissa tutkimuksissa onkin havaittu, että *NEFL*-geenin sammuttaminen ei muuta motoneuroneiksi erilaistamisen tehokkuutta ja tulokseni tukee tätä havaintoa (16).

Saimme selvitettyä näiden solulinjojen erilaista ekspressioprofiilia sekä RNA- että proteiinitasolla neuroneiden välikokoisia filamentteja koodavien geenien (*NEFL*, *NEFM*, *Periferiini*) ja muutaman neuroneissa esiintyvien niiden toimintaa tukevien geenien suhteen (*SLITRK2*, *GRM3*, *LYNX1*). Näitä tuloksia oli varmistamassa immunosytokemia, jonka perusteella tulokset varmentuivat. Ryhmämme aikaisemmissa tutkimuksissa huomiota herättänyt periferiini näytti western blotin mukaan nousevan onnistuneesti muokatuissa linjoissa. Tilastollisesti merkitsevä muutos esiintyi linjassa 1.E9, jonka *NEFL* mRNA määrä oli muokatuista linjoista alhaisin. Muutaman näytteen otos ei tietenkään riitä toteamaan tästä tuloksesta mitään, mutta jatkoa ajatellen tämä havainto voi olla kiinnostavaa yrittää varmentaa.

Ryhmässämme tunnistettujen uusien mahdollisesti *NEFL*-puutukseen liittyvien geenien *SLITRK2*, *GRM3* ja *LYNX1* tuottamien mRNA määriä analysoitiin. Näitä on kiinnostavaa tutkia, sillä niissä on havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja mRNA sekvensoinnin avulla verratessa yhtä *NEFL*-poistogeenistä solulinjaa kontrollisolulinjaan. On kuitenkin pidettävä mielessä, että koska kyseessä on yksi solulinja, voivat erot johtua nimenomaan sille kloonille tuotetusta mutaatiosta, eikä siis välttämättä juuri *NEFL*-geenin hiljentämisestä.

SLITRK2 on yhdistetty synaptogeneesiin ja sen on ajateltu lisäävän kiihdyttävien synapsien syntyä (39). Sen tuottaman mRNA määrässä olikin tilastollisesti merkitsevä ero molempien varmasti onnistuneesti *NEFL*-geenin suhteen muokatun linjan ja kontrollin välillä. Tulos vastaa hyvin RNA sekvensoinnin tulosta. Kolmas tutkimamme linja, 3.H7 eroaa huomattavasti kahdesta onnistuneesti muokatuista linjoista, eikä siinä havaita mRNA:n vähenemistä. Analysoimme kyseisen linjan olevan *NEFL*-geenin suhteen puoliksi hiljennetty, eli toinen alleeli tuottaa jonkin verran *NEFL*-mRNA:ta. Selvästi eroava *SLITRK2* määrä voi selittyä resessiivisten tautien tyyppiin perustuen avulla. Kantajat eivät ilmennä tautia, eli vasta täydellinen proteiinin puutos johtaa tautiin. Tämän geenin riippuvuutta *NEFL*-geeniin ei näiden tulosten puolesta voida ainakaan poissulkea, joten lisätutkimukset ovat tarpeellisia.

GRM3-geeni on liitetty glutamaattivälitteiseen neurotransmissioon ja synaptiseen plastisiteettiin (73). Se vaikutti ekspressoituvan enemmän muokatuissa solulinjoissa ja sama havainto todettiin ryhmämme suorittamassa RNA sekvensoinnissa. Jokaisessa

geenimuokatussa solulinjassa havaittiin tilastollisesti merkitsevä tulos. Koska epätäydellisesti muokatussa solulinjassa (3.H7) *GMR3* mRNA määrä oli suurin, on epäselvää liittyvätkö ekspression muutokset juuri *NEFL*-geeniin vai voiko tulos selittyä solulinjaspesifisillä ominaisuuksilla. Lisätutkimukset tämän geenin osalta lienevätkin siis tarpeen.

LYNX1 mRNA:n määrä oli vähentynyt linjoissa 1.B11 ja 1.E9, joista jälkimmäisessä tulos oli tilastollisesti merkitsevä. Se ei kuitenkaan ollut vähentynyt linjassa 3.H7. Koska RNA sekvensoinnin tuloksissa tämän geenin ekspressio oli kuitenkin kasvanut, on epäselvää mistä tilastollisesti merkitsevä ero johtuu ja onko muutos vain solulinjaspesifinen tietynlaisen geenimuokkauksen vuoksi. *LYNX1* on liitetty erilaisiin nikotiinireseptorien alatyyppeihin ja sen tuottama proteiini moduloi näiden reseptorien funktionaalisia ominaisuuksia esimerkiksi estäen liiallisen eksitaation ja täten neurodegeneration (40). Tämänkin geenin tutkiminen tulevaisuudessa vaikuttaa järkevältä näiden tulosten valossa.

Tässä tutkimuksessa ei tutkittu *NEFH* tai Alfa-interneksiiniä, jotka ovat myös aksolin tukirangan proteiineja ja teoriassa voisivat muuttua *NEFL*-proteiinin määrän pudotessa mitättömiin määriin aksoneissa. Lisäksi tutkimuksessa käytettiin vain kolmea solulinjaa ja kolmea teknistä replikaattia esimerkiksi qPCR:ssä. *GRM3*-geenin kohdalla jouduttiin tyytymään kahteen kontrollireplikaattiin kolmen sijaan yhden epäonnistuttua. Tutkimuksessa havaitut asiat tuleekin toistaa isommalla määrällä neuroneita, jotta saadaan varmuus havaintojen luotettavuudesta. Lisäksi olisi hyvä käyttää FACS-pohjaista menetelmää myös neuronikasvatuksen yhteydessä, jolloin pystyisimme minimoimaan häiritsevien tekijöiden (kuten jakautuvat solut) aiheuttavan virhelähteen tuloksien analyysissä. Lisäksi kun on selvitetty kantasolun geenimuokkauksen onnistuminen, tulisi varmistaa kantasolujen puhtaus embryonal-body menetelmällä. Kyseisessä menetelmässä värjätessä soluja immunosytokemialla kaikkia alkiokerroksia tulisi ekspressoitua. Lisäksi karyotyypaus on suositeltavaa tehdä muokatuille kantasoluille, koska on havaittu, että pitkissä viljelmissä geenimanipulaation aiheuttamat kromosomimuutokset ovat mahdollisia.

Solun vaste epätäydelliseen editointiin on herättänyt laajasti kiinnostusta viime aikoina. On alettu puhumaan niin sanotusta geneettisestä kompensatiosta, jossa solu alkaa ekspressoimaan geneettisesti sammutetun geenin kaltaisia muita geenejä ja jopa itse editoitua

geeniä itseään. Tämä kompensatio tapahtuu mRNA tasolla ja ilmeisesti proteiinin puuttuminen ei itsessään saa aikaan kyseistä vastetta, vaan on ehdotettu DNA leesion tai mutantti mRNA:n aiheuttamaa vastetta. Eräässä tutkimuksessa syytä geneettiselle kompensatiolle yritettiin selvittää ja huomattiin, että pelkkä DNA leesio ei riitä aiheuttamaan solussa vastetta johtuen geneettiseen kompensatioon. Samassa tutkimuksessa saatiinkin selville, että mutantti mRNA:n hajotus on oleellinen asia solun geneettisen kompensatian kannalta (74). Toisessa tutkimuksessa yritettiin selvittää mRNA:n hajotuksen taustalla olevan koneiston aiheuttamaa vaikutusta solun geneettisestä kompensatiosta vastaavissa geeneissä. Etenkin mRNA:n hajotukseen liittyvien *Upf3a*-geenin ja COMPASS-kompleksiin liittyvien geenien tuottamat proteiinit ovat tärkeitä toimijoita solun geneettisessä kompensaatiossa (75). Ilmiö on tärkeä myös kliinisesti, sillä etenkin resessiivisissä sairauksissa geneettinen kompensatio voi selittää joidenkin sairauksien epätäydellistä penetraansia. Lisäksi ilmiön tutkiminen voi edelleen auttaa tunnistamaan genejä tämän ilmiön taustalla ja jopa johtaa joidenkin terapiamuotojen kehittämiseen (76).

Muokkaamissani soluissa tämänkaltainen ilmiö oli havaittavissa. Onnistuneestikin geenieditoidut linjat (1.B11 ja 1.E9) ekspressoivat vähän *NEFL*-geeniä mRNA tasolla. Proteiiniksi asti niitä ei kuitenkaan tuotettu kummassakaan linjassa. On kuitenkin huomattavaa, että solujen toiminta oli muuttunut myös muiden geenien tasolla, kuten yllä on todettu, joten olisikin kiinnostavaa verrata näitä kahta onnistuneesti geneettisesti editoitua solulinjaa toisiinsa. Erittäin kiinnostavan lisän tähän aiheeseen tuo kolmas geenieditoitu linja (3.H7). Joidenkin tutkittujen geenien osalta sen mRNA:n ekspressio eroaa huomattavasti kahdesta onnistuneesti muokatusta linjasta.

Tämä tutkimus lisää tietämystä Charcot-Marie-Tooth taudin molekyyliopatologiassa. Lisäksi tutkimus edistää muita tästä aiheesta kiinnostuneita tutkijoita kuvaamalla tarkasti solujen editointi ja erilaistamisprosessit. Erilaisten tautia käsittelevien tutkimusten perusteella ryhmässämme on aloitettu tutkimaan Amlexanox- nimisen lääkkeen mahdollista vaikutusta *NEFL*-proteiinin puutteeseen solutasolla. Kyseisen jo markkinoilla aitojen hoitoon tarkoitetun lääkkeen vaikutusmekanismina pidetään stopkodonien ohittamista geeniluennassa. Tämänkaltainen vaikutusmekanismi geenin luentaan voisi auttaa tässä sairaudessa, koska se voisi lisätä *NEFL*-proteiinin määrää neuroneissa. Koska

tautimekanismi CMT:ssä ei ole selvä, yritetään esimerkiksi edellä mainitulla tavalla lisätä puuttuvaa neurofilamenttia, joka voisi teoriassa estää tai lievittää sairautta. Mitä tarkemmin saadaan selvitettyä potilaan oireisiin johtavat syyt solutasolla, sen todennäköisemmin tähänkin pahimmillaan liikuntakyvyn vievään tautiin löydetään tulevaisuudessa ratkaisu.

Lähdeluettelo

- (1) Barreto LC, Oliveira FS, Nunes PS, de Franca Costa, I. M., Garcez CA, Goes GM, et al. Epidemiologic Study of Charcot-Marie-Tooth Disease: A Systematic Review. *Neuroepidemiology* 2016;46(3):157-165.
- (2) Murakami T, Garcia CA, Reiter LT, Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth disease and related inherited neuropathies. *Medicine (Baltimore)* 1996 Sep;75(5):233-250.
- (3) Horga A, Laura M, Jaunmuktane Z, Jerath NU, Gonzalez MA, Polke JM, et al. Genetic and clinical characteristics of NEFL-related Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2017 Jul;88(7):575-585.
- (4) Ramchandren S. Charcot-Marie-Tooth Disease and Other Genetic Polyneuropathies. *Continuum (Minneapolis)* 2017 Oct;23(5, Peripheral Nerve and Motor Neuron Disorders):1360-1377.
- (5) Saporta MA, Dang V, Volfson D, Zou B, Xie XS, Adebola A, et al. Axonal Charcot-Marie-Tooth disease patient-derived motor neurons demonstrate disease-specific phenotypes including abnormal electrophysiological properties. *Exp Neurol* 2015 Jan;263:190-199.
- (6) Yum SW, Zhang J, Mo K, Li J, Scherer SS. A novel recessive Nefl mutation causes a severe, early-onset axonal neuropathy. *Ann Neurol* 2009 Dec;66(6):759-770.
- (7) Saporta MA. Charcot-Marie-Tooth disease and other inherited neuropathies. *Continuum (Minneapolis)* 2014 Oct;20(5 Peripheral Nervous System Disorders):1208-1225.
- (8) Shy ME, Patzko A. Axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Curr Opin Neurol* 2011 Oct;24(5):475-483.
- (8) Bassam BA. Charcot-Marie-Tooth disease variants-classification, clinical, and genetic features and rational diagnostic evaluation. *J Clin Neuromuscul Dis* 2014 Mar;15(3):117-128.
- (9) Wang Y, Yin F. A Review of X-linked Charcot-Marie-Tooth Disease. *J Child Neurol* 2016 May;31(6):761-772.

- (10) Hoyle JC, Isfort MC, Roggenbuck J, Arnold WD. The genetics of Charcot-Marie-Tooth disease: current trends and future implications for diagnosis and management. *Appl Clin Genet* 2015 Oct 19;8:235-243.
- (11) Karakis I, Gregas M, Darras BT, Kang PB, Jones HR. Clinical correlates of Charcot-Marie-Tooth disease in patients with pes cavus deformities. *Muscle Nerve* 2013 Apr;47(4):488-492.
- (12) Mersiyanova IV, Perepelov AV, Polyakov AV, Sitnikov VF, Dadali EL, Oparin RB, et al. A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene. *Am J Hum Genet* 2000 Jul;67(1):37-46.
- (13) Lerat J, Magdelaine C, Beauvais-Dzugan H, Espil C, Ghorab K, Latour P, et al. A novel pathogenic variant of NEFL responsible for deafness associated with peripheral neuropathy discovered through next-generation sequencing and review of the literature. *J Peripher Nerv Syst* 2019 Mar;24(1):139-144.
- (14) Jani-Acsadi A, Ounpuu S, Pierz K, Acsadi G. Pediatric Charcot-Marie-Tooth disease. *Pediatr Clin North Am* 2015 Jun;62(3):767-786.
- (15) Fu J, Yuan Y. A novel homozygous nonsense mutation in NEFL causes autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscul Disord* 2018 Jan;28(1):44-47.
- (16) Sainio MT, Ylikallio E, Mäenpää L, Lahtela J, Mattila P, Auranen M, et al. Absence of NEFL in patient-specific neurons in early-onset Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Neurol Genet* 2018 Jun;4(3):e244.
- (17) Jordanova A, De Jonghe P, Boerkoel CF, Takashima H, De Vriendt E, Ceuterick C, et al. Mutations in the neurofilament light chain gene (NEFL) cause early onset severe Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain* 2003 Mar;126(Pt 3):590-597.
- (18) Sakaguchi T, Okada M, Kitamura T, Kawasaki K. Reduced diameter and conduction velocity of myelinated fibers in the sciatic nerve of a neurofilament-deficient mutant quail. *Neurosci Lett* 1993 Apr 16;153(1):65-68.

- (19) Ching GY, Liem RK. Assembly of type IV neuronal intermediate filaments in nonneuronal cells in the absence of preexisting cytoplasmic intermediate filaments. *J Cell Biol* 1993 Sep;122(6):1323-1335.
- (20) Pisciotta C, Bai Y, Brennan KM, Wu X, Grider T, Feely S, et al. Reduced neurofilament expression in cutaneous nerve fibers of patients with CMT2E. *Neurology* 2015 Jul 21;85(3):228-234.
- (21) Berciano J, Garcia A, Gallardo E, Peeters K, Pelayo-Negro AL, Alvarez-Paradelo S, et al. Intermediate Charcot-Marie-Tooth disease: an electrophysiological reappraisal and systematic review. *J Neurol* 2017 Aug;264(8):1655-1677.
- (22) Tazir M, Bellatache M, Nouioua S, Vallat JM. Autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease: from genes to phenotypes. *J Peripher Nerv Syst* 2013 Jun;18(2):113-129.
- (23) Doppler K, Kunstmann E, Kruger S, Sommer C. Painful Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2E/1F due to a novel NEFL mutation. *Muscle Nerve* 2017 May;55(5):752-755.
- (24) Abe A, Numakura C, Saito K, Koide H, Oka N, Honma A, et al. Neurofilament light chain polypeptide gene mutations in Charcot-Marie-Tooth disease: nonsense mutation probably causes a recessive phenotype. *J Hum Genet* 2009 Feb;54(2):94-97.
- (25) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006 Aug 25;126(4):663-676.
- (26) Bharathan SP, Manian KV, Aalam SM, Palani D, Deshpande PA, Pratheesh MD, et al. Systematic evaluation of markers used for the identification of human induced pluripotent stem cells. *Biol Open* 2017 Jan 15;6(1):100-108.
- (27) Otonkoski T. Pluripotency and Disease Modeling .
- (28) Maury Y, Come J, Piskorowski RA, Salah-Mohellibi N, Chevaleyre V, Peschanski M, et al. Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nat Biotechnol* 2015 Jan;33(1):89-96.

- (29) Guo W, Naujock M, Fumagalli L, Vandoorne T, Baatsen P, Boon R, et al. HDAC6 inhibition reverses axonal transport defects in motor neurons derived from FUS-ALS patients. *Nat Commun* 2017 Oct 11;8(1):861-y.
- (30) Pöyhönen R. Identification of disease causing mutations in early-onset neuropathies by exome sequencing. 2013 Jan 1,.
- (31) Muscular dystrophy association - Charcot-Marie-Tooth disease. Available at: <https://www.mda.org/disease/charcot-marie-tooth/diagnosis>.
- (32) Sahenk Z, Ozes B. Gene therapy to promote regeneration in Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain Res* 2020 Jan 15;1727:146533.
- (33) Benoy V, Vanden Berghe P, Jarpe M, Van Damme P, Robberecht W, Van Den Bosch L. Development of Improved HDAC6 Inhibitors as Pharmacological Therapy for Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease. *Neurotherapeutics* 2017 Apr;14(2):417-428.
- (34) Burns J, Sman AD, Cornett KMD, Wojciechowski E, Walker T, Menezes MP, et al. Safety and efficacy of progressive resistance exercise for Charcot-Marie-Tooth disease in children: a randomised, double-blind, sham-controlled trial. *Lancet Child Adolesc Health* 2017 Oct;1(2):106-113.
- (35) Fontes M. Charcot Marie Tooth Disease. A Single Disorder? *Int J Mol Sci* 2018 Nov 29;19(12):10.3390/ijms19123807.
- (36) Gentil BJ, Cooper L. Molecular basis of axonal dysfunction and traffic impairments in CMT. *Brain Res Bull* 2012 Aug 1;88(5):444-453.
- (37) Stifani N. Motor neurons and the generation of spinal motor neuron diversity. *Front Cell Neurosci* 2014 Oct 9;8:293.
- (37) Patten I, Placzek M. The role of Sonic hedgehog in neural tube patterning. *Cell Mol Life Sci* 2000 Nov;57(12):1695-1708.
- (39) Kang H, Han KA, Won SY, Kim HM, Lee YH, Ko J, et al. Slitrk Missense Mutations Associated with Neuropsychiatric Disorders Distinctively Impair Slitrk Trafficking and Synapse Formation. *Front Mol Neurosci* 2016 Oct 20;9:104.

- (40) George AA, Bloy A, Miwa JM, Lindstrom JM, Lukas RJ, Whiteaker P. Isoform-specific mechanisms of $\alpha 3\beta 4^*$ -nicotinic acetylcholine receptor modulation by the prototoxin lynx1. *FASEB J* 2017 Apr;31(4):1398-1420.
- (42) Bird TD. Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al, editors. *GeneReviews*((R)) Seattle (WA): University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved; 1993.
- (41) Pareyson D, Marchesi C. Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. *Lancet Neurol* 2009 Jul;8(7):654-667.
- (43) van Paassen BW, van der Kooi, A. J., van Spaendonck-Zwarts KY, Verhamme C, Baas F, de Visser M. PMP22 related neuropathies: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies. *Orphanet J Rare Dis* 2014 Mar 19;9:38-38.
- (44) Gemignani F, Melli G, Alfieri S, Inglese C, Marbini A. Sensory manifestations in Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst* 2004 Mar;9(1):7-14.
- (45) Szigeti K, Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth disease. *Eur J Hum Genet* 2009 Jun;17(6):703-710.
- (46) Morrow JM, Sinclair CD, Fischmann A, Machado PM, Reilly MM, Yousry TA, et al. MRI biomarker assessment of neuromuscular disease progression: a prospective observational cohort study. *Lancet Neurol* 2016 Jan;15(1):65-77.
- (47) Vaeth S, Vaeth M, Andersen H, Christensen R, Jensen UB. Charcot-Marie-Tooth disease in Denmark: a nationwide register-based study of mortality, prevalence and incidence. *BMJ Open* 2017 Nov 3;7(11):e018048-018048.
- (48) Hammerle B, Tejedor FJ. A novel function of DELTA-NOTCH signalling mediates the transition from proliferation to neurogenesis in neural progenitor cells. *PLoS One* 2007 Nov 14;2(11):e1169.
- (49) Olsauskas-Kuprys R, Zlobin A, Osipo C. Gamma secretase inhibitors of Notch signaling. *Onco Targets Ther* 2013 Jul 23;6:943-955.

- (50) Numakawa T, Odaka H, Adachi N. Actions of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Glucocorticoid Stress in Neurogenesis. *Int J Mol Sci* 2017 Nov 2;18(11):10.3390/ijms18112312.
- (51) Popova NK, Ilchibaeva TV, Naumenko VS. Neurotrophic Factors (BDNF and GDNF) and the Serotonergic System of the Brain. *Biochemistry (Mosc)* 2017 Mar;82(3):308-317.
- (52) Ip NY, Yancopoulos GD. The neurotrophins and CNTF: two families of collaborative neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* 1996;19:491-515.
- (53) Sieving PA, Caruso RC, Tao W, Coleman HR, Thompson DJ, Fullmer KR, et al. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Mar 7;103(10):3896-3901.
- (54) Pareyson D, Saveri P, Pisciotta C. New developments in Charcot-Marie-Tooth neuropathy and related diseases. *Curr Opin Neurol* 2017 Oct;30(5):471-480.
- (55) Stone EJ, Uchida A, Brown A. Charcot-Marie-Tooth disease Type 2E/1F mutant neurofilament proteins assemble into neurofilaments. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2019 Jul;76(7-8):423-439.
- (56) Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet* 1974;6(2):98-118.
- (57) Saporta MA, Shy ME. Inherited peripheral neuropathies. *Neurol Clin* 2013 May;31(2):597-619.
- (58) Timmerman V, Strickland AV, Zuchner S. Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) Disease within the Frame of the Human Genome Project Success. *Genes (Basel)* 2014 Jan 22;5(1):13-32.
- (59) Lancaster E, Li J, Hanania T, Liem R, Scheideler MA, Scherer SS. Myelinated axons fail to develop properly in a genetically authentic mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 2E. *Exp Neurol* 2018 Oct;308:13-25.

- (60) Harding AE, Thomas PK. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* 1980 Jun;103(2):259-280.
- (61) Hur EM, Zhou FQ. GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci* 2010 Aug;11(8):539-551.
- (63) Didonna A, Opal P. The role of neurofilament aggregation in neurodegeneration: lessons from rare inherited neurological disorders. *Mol Neurodegener* 2019 May 16;14(1):19-4.
- (63) Gary Schoenwolf, Steven Bleyl, Philip Brauer, Philippa Francis-West. *Larsen's Human embryology*. 5th ed.; 2014.
- (64) Yuan A, Rao MV, Sasaki T, Chen Y, Kumar A, Veeranna, et al. Alpha-internexin is structurally and functionally associated with the neurofilament triplet proteins in the mature CNS. *J Neurosci* 2006 Sep 27;26(39):10006-10019.
- (65) Yuan A, Sasaki T, Kumar A, Peterhoff CM, Rao MV, Liem RK, et al. Peripherin is a subunit of peripheral nerve neurofilaments: implications for differential vulnerability of CNS and peripheral nervous system axons. *J Neurosci* 2012 Jun 20;32(25):8501-8508.
- (66) Leung CL, Nagan N, Graham TH, Liem RK. A novel duplication/insertion mutation of NEFL in a patient with Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Med Genet A* 2006 May 1;140(9):1021-1025.
- (67) Rowe RG, Daley GQ. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Genet* 2019 Jul;20(7):377-388.
- (68) Hale CR, Majumdar S, Elmore J, Pfister N, Compton M, Olson S, et al. Essential features and rational design of CRISPR RNAs that function with the Cas RAMP module complex to cleave RNAs. *Mol Cell* 2012 Feb 10;45(3):292-302.
- (69) Doetschman T, Georgieva T. Gene Editing With CRISPR/Cas9 RNA-Directed Nuclease. *Circ Res* 2017 Mar 3;120(5):876-894.
- (70) Poon A, Zhang Y, Chandrasekaran A, Phanthong P, Schmid B, Nielsen TT, et al. Modeling neurodegenerative diseases with patient-derived induced pluripotent cells: Possibilities and challenges. *N Biotechnol* 2017 Oct 25;39(Pt B):190-198.

- (71) Juneja M, Burns J, Saporta MA, Timmerman V. Challenges in modelling the Charcot-Marie-Tooth neuropathies for therapy development. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2019 Jan;90(1):58-67.
- (72) 1. Juhani Partanen. ENMG-tutkimuksen kliininen käyttö. *Lääkärilehti* 2014; 35/2014(vsk 69): . <https://www.laakarilehti.fi/tieteessa/katsausartikkeli/enmg-tutkimuksen-kliininen-kaytto/> (accessed).
- (73) (1) Harrison PJ, Lyon L, Sartorius LJ, Burnet PW, Lane TA. The group II metabotropic glutamate receptor 3 (mGluR3, mGlu3, GRM3): expression, function and involvement in schizophrenia. *J Psychopharmacol* 2008 May;22(3):308-322.
- (74) El-Brolosy MA, Kontarakis Z, Rossi A, Kuenne C, Günther S, Fukuda N, et al. Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature* 2019 Apr;568(7751):193-197.
- (75) Ma Z, Zhu P, Shi H, Guo L, Zhang Q, Chen Y, et al. PTC-bearing mRNA elicits a genetic compensation response via Upf3a and COMPASS components. *Nature* 2019 Apr;568(7751):259-263.
- (76) Buglo E, Sarmiento E, Martuscelli NB, Sant DW, Danzi MC, Abrams AJ, et al. Genetic compensation in a stable *slc25a46* mutant zebrafish: A case for using F0 CRISPR mutagenesis to study phenotypes caused by inherited disease. *PLoS One* 2020 Mar 24;15(3):e0230566.

Liitteet

Lyhenteet

iPSC = induced pluripotent stem cells

CRISP-CAS9 = clustered palindromic regularly interspaced short palindromic repeats CAS9 on nukleaasi entsyymi

CMT = Charcot-Marie-Tooth

CMT1F/2E = NEFL – geenituotteen virheellisyydestä / vähäisyydestä johtuva CMT:n alayksikkö

DSS = Dejerine-Sottas-Syndrome

knock-out = CRISP-CAS9 menetelmällä hiljennetty geeni

qPCR = quantitative PCR

ICC = immunocytochemistry

SHH = Sonic Hedgehog

TGFBeta = Transforming growth factor Beta

RA = retinoid acid

BMP4 = Bone morphogenic protein

BDNF = Brain derived neurotrophic factor

GDNF = glial derived neurotrophic factor

CNTF = ciliary neurotrophic factor

MNP = motoneuron progenitor

DSS = Dejerine–Sottas Syndrome

NEFL = neurofilament light

NEFM = neurofilament medium

NEFM = neurofilament heavy

NCV = nerve conduction velocity

EMG = electromyography

HDAC6 = histone deacetylase 6

MUP = motor unit potential

Upf3a = Gene related to regulating mRNA nonsense mediated decay

COMPASS complex = Oleellinen H3K4me3 metylaasi eukaryoottisolussa

Taulukko 1

| ICC | Antibody | Dil. |
|---------|--|--------|
| 1. | Rb-a-NEFM, Proteintech | 1:800 |
| | M-a-ISL1/2, DSHB | 1:50 |
| 2. | Chi-a-MAP2, Millipore | 1:1000 |
| | M-a-SYN, SIGMA | 1:500 |
| 3. | Rb-a-NEFL, THERMO | 1:1000 |
| | M-a-TUJ1, Biolegend | 1:1000 |
| Western | | |
| 1. | Rb-a-NEFL (thermo) c-term | 1:1000 |
| 2. | Rb-a-peripheriini (Merck) (AB1530) | 1:1000 |
| 3. | Rb-a.NEFM (proteintech) | 1:1000 |
| 4. | Rb-a-GAPDH (Cell Signaling) (14c10) | 1:1000 |
| 5. | M-a-TUJ1 (BioSite) | 1:1000 |

Taulukko 2

| Primer | käyttö | emäsjärjestys |
|-------------------------------|-------------------------|--|
| 1446 NEFL For | CRISP R KO screen | CCTTCCCTTTTGCGCAGAAT |
| 1447 NEFL Rev | CRISP R KO screen | CGGCTCTTGAACCATTCCTC |
| 1246 | sgRNA | GTGGAAAGGACGAAACACCgCGGCTGATGGAAGCGCGC AAGTTTTAGAGCTAGAAATAG |
| 1443 | 5'UTR | GTGGAAAGGACGAAACACCg accctatttatacggcg GTTTTAGAGCTAGAAATAG |
| 1245 | sgRNA | GTGGAAAGGACGAAACACCgCTTCCGGGCGCTGTACGAG CGTTTTAGAGCTAGAAATAG |
| 1444 | 5'UTR | GTGGAAAGGACGAAACACCg tgcgatcgatcacggcacgc GTTTTAGAGCTAGAAATAG |
| 429GapdhF | qPCR | cgctctctgctcctcctggt |
| 430GapdhR | qPCR | cctggtgctctgagcgtg |
| 1089NEFLf or | qPCR | CAAGACCCTGGAAATCGAAG |
| 1090NEFLr ev | qPCR | TGAAACTGAGTCGGGTCTCC |
| 1731SLITR K2 Exon 3/4 F | qPCR | TGATGTCGATTGCGATTTCT |
| 1732SLITR K2 Exon 4/5 R | qPCR | GGTACCTACAGGCAAACCTGA |

| | | |
|------------------------------------|---------------|--|
| 1095Isl1for | qPCR | GTTACCAGCCACCTTGGAAA |
| 1096Isl1rev | qPCR | GGACTGGCTACCATGCTGTT |
| 1725GRM3 Exon 2 For | qPCR | GATGGATCCTATGCCATTCAA |
| 1726GRM3 Exon 3 Rev | qPCR | CGGTCCTGGCAAAGTAATCA |
| 1729Lynx1 Exon 2 F | qPCR | GCTGTTGACCTCCCCACTC |
| 1730Lynx1 Exon 3-4 R | qPCR | TGTAGTAGGTGCGCGTGGT |
| Plasmidi elektropora atiossa | CRISP R KO | CAG-Cas9-T2A-EGFP-ires-pur8 addgene plasmid #78311 |

Liite 1

PCR (My Taq HS Red Mix protokolla)

- (1) ensimmäinen denaturaatio 95 °C , 1 min n 1 sykli
- (2) denaturaatio 95 °C, 15 sec, 30 sykliä
- (3) irtoaminen 66 °C 15 sec. 30 sykliä
- (4) ekstensio 72 °C , 10 sec, 30 sykliä

Liite 2

qPCR protokolla

- (1) ensimmäinen denaturaatio 95 °C, 7 min, 1 sykli
- (2) denaturaatio 95 °C, 10 sec, 40 sykliä
- (3) irtoaminen 60 °C, 30 sec, 40 sykliä
- (4) ekstensio 65 °C – 95 °C, 5 sekunnin välein 0,5 °C:n nousu

