

CRISPR/Cas9-menetelmä ja sen sovellutukset hyönteistutkimuksessa

Ville Salo

Luk-tutkielma

Biologian tutkinto-ohjelma

Oulun yliopisto

Joulukuu 2020

SISÄLLYS

Käytetyt lyhenteet	3
1 JOHDANTO	5
1.1 Tutkimushistoria	6
1.2 Toiminta bakteereissa	6
1.3 Muut geenimuokkausmenetelmät.....	7
2 CRISPR/CAS9-GEENIMUOKKAUSMENETELMÄNÄ	7
2.1 Suunnittelu & tiedonhaku	8
2.2 Cas9-proteiini ja PAM.....	8
2.3 Guide RNA (gRNA)	9
2.4 Juosteiden korjaus	10
2.5 Konsentraatio	11
2.6 Konstrukti & toimitusmekanismit.....	11
2.7 Onnistumisen tarkkailu	12
3 MAHDOLLISET ONGELMAT	13
3.1 Spesifisyys & tehokkuus	13
3.2 PAM-rajoitteet.....	13
4 ONNISTUNEET HYÖNTEISTUTKIMUKSET	14
4.1 CRISPR <i>Drosophilalla</i>	14
4.2 Knockout <i>Apis Melliferalla</i>	15
5 MENETELMÄN TULEVAISUUS.....	16
5.1 Teknisten ongelmien ratkaisu	16
5.2 CRISPR/Cas9-geeniajo tulevaisuuden mahdollisuutena.....	17
5.3 Bioturvallisuus.....	19
6 YHTEENVETO	19
LÄHTEET	20

Käytetyt lyhenteet

Cas9	Crispr associated protein 9
Crispr	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
crRNA	Crispr-RNA
DSB	Double strand break
gRNA	Guide RNA
HDR	Homology directed repair
NHEJ	Non-homologous end joining
PAM	Protospacer adjacent motif
sgRNA	Single guide RNA
TALEN	transcription activator-like effectors nuclease
tractRNA	transaktivoituva crispr RNA
ZFN	sinkkisorminukleaasit

Tiivistelmä

Kandidaatin tutkielmassani perehdyn CRISPR/Cas9-menetelmään ja siihen miten sitä voidaan hyödyntää hyönteistutkimuksessa. Tutkielman keskeisimpinä tutkimuskysymyksinä on perehtyä yksityiskohtaisesti sen toimintaan geenimuokkausmenetelmänä ja kuvailla menetelmän toimintaa hyönteisissä onnistuneiden tutkimusten kautta. Tutkielman alussa perehdyn hieman CRISPR/Cas9:n taustoihin, kuten siihen mistä se on alun perin löydetty ja miten se eroaa muista geenimuokkausmenetelmistä. Sen jälkeen paneudun sen toimintaan geenimuokkausmenetelmänä. Ensiksi käyn läpi menetelmän toiminnan peruseriaatteen ja sen jälkeen erikseen tarkemmin menetelmän toiminnan kannalta tärkeiden komponenttien toimintaa. Tutkielmassa tuon esiin myös menetelmän toiminnan kannalta keskeisiä ongelmakohtia, jotka voivat johtaa ei-toivotunlaisiin tuloksiin geenimuokkaustyötä tehdessä. Ongelmakohtien jälkeen käsittelen onnistuneita hyönteistutkimuksia yleisesti. Käyn läpi mitkä asiat ovat kaikille tutkimuksille yhteisiä ja hieman siitä millaisin tutkimusmenetelmin tutkijoiden täytyy CRISPR/Cas9-menetelmää soveltaa geenimuokkaututkimuksissaan. Sen jälkeen tutkielmassani esittelen yksityiskohtaisesti kaksi eri tutkimuseliöllä tehtyä onnistunutta tutkimusta. Nämä tutkimukset todistavat sen, että CRISPR/Cas9-menetelmää voidaan käyttää onnistuneesti hyönteistutkimuksissa. Tämän jälkeen käyn läpi menetelmän tulevaisuuden näkymiä ja potentiaalisia menetelmän käyttökohteita. Tulevaisuudessa tutkimukset menetelmän tehostamiseksi jatkuvat ja myös tutkielmassani aikaisemmin esiin nostettuihin ongelmiin haetaan tulevaisuudessa ratkaisuja. Tutkielmassani nostan esiin yhtenä tulevaisuuden käyttökohteena CRISPR/Cas9-menetelmän hyödyntämisen yhdessä geeniajomenetelmän kanssa. Tällä menetelmällä voidaan tulevaisuudessa mahdollisesti auttaa hyönteislevitteisistä vektorisairauksista kärsiviä. Tällaisten menetelmien hyödyntäminen aiheuttaa myös huolta bioturvallisuuteen liittyen, koska geenimuokattujen hyönteisten vaikutuksista luonnon populaatioihin ei ole tutkimustuloksia. Myöskään niiden vaikutuksista kokonaisuun ekosysteemeihin ei ole vielä tarvittavaa tutkimustietoa. Menetelmän käytöstä on myös tulevaisuudessa sovittava yhteiset pelisäännöt, jotta kaikilta epämieluisilta skenaarioilta vältyttäisiin. Tutkielman lopuksi vedän lyhyesti yhteen tutkielmassani esiin nostettuja asioita ja tulevaisuuden näkymiä.

1 JOHDANTO

CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) ja Cas9 (Crispr associated protein 9) muodostavat yhden tämän hetken puhutuimmista menetelmistä biologian alalla. CRISPR-menetelmä löydettiin alun perin bakteereista, joissa se toimii osana adaptiivista immuunipuolustusmekanismia, jonka tehtävänä on suojella bakteereja viruksilta (Clement ym., 2020). CRISPR-menetelmiä on useampia, mutta tässä kandidaatintutkielmassa keskitytään kertomaan tyypin-II CRISPR:stä. Tämä CRISPR/Cas9:nä paremmin tunnettu menetelmä on menetelmistä kaikista parhaiten tunnettu ja eniten käytetty. Muut CRISPR- menetelmät eroavat siitä erilaisten systeemien ja nukleaasien takia. Tyypin I- ja III-CRISPR-menetelmissä crispr-RNA (crRNA) ei liity transaktivoituvaan (tracrRNA) crispr-RNA:han, toisin kuin II-tyypin menetelmässä. Myös niiden molempien DNA:n tunnistus- ja katkaisumekanismi perustuu isompiin proteiinikomplekseihin, kun II-tyypillä niistä vastaa Cas9-nukleaasi (Hsu, Lander & Zhang, 2014). CRISPR/Cas9-menetelmä on tarjonnut tehokkaan työkalun biologiseen tutkimukseen ja on mahdollistanut geneettisen tutkinnan myös lajeilla, joita on perinteisesti ollut vaikea manipuloida geneettisesti (Sander & Joung, 2014). Menetelmä on mahdollistanut geenifunktioiden tutkinnan lisäksi myös geenimuokkauksen. Sen lisäksi että CRISPR/Cas9-menetelmä on erittäin laajalti sovellettavissa ja yksinkertainen, se on myös tehokkaampi ja halvempi suhteessa muihin geeninmuokkausmenetelmiin (Taning ym., 2017).

CRISPR/Cas9:stä on tullut suosittu menetelmä hyönteistutkijoiden keskuudessa, joille siitä on tullut erittäin hyödyllinen tutkimusväline. Menetelmä on vielä kohtuullisen uusi ja tutkijat joutuvatkin usein kokeellisesti testaamaan ja optimoimaan menetelmää kohde-eliöilleen. Monien lajien kohdalla ollaan vielä alkutekijöissä ja tutkijat keskittyvät saamaan menetelmän toimimaan moitteettomasti. Monilla tutkimuseliöillä menetelmä onkin jo onnistuttu saamaan toimimaan. Esimerkiksi *Drosophilalla* (Gratz ym., 2013) ja *Apis Melliferalla* (Kohno ym., 2016). Menetelmän odotetaan mahdollistavan evolutiivisesti merkittävien geenien tehokkaamman tutkinnan ja sen toivotaan tuovan ratkaisun myös hyönteislevitteisten vektorisairauksien aiheuttamiin ongelmiin. (Taning ym., 2017).

Tämän kandidaatintutkielman tarkoituksena on perehtyä CRISPR-menetelmään ja sen alkuperään. Tarkemmassa käsittelyssä on sen sovellutukset geenimuokkausvälineenä ja erityisesti se, miten sitä voidaan soveltaa hyönteistutkimuksessa. Tutkimuksessa tarkastellaan ensin CRISPR:ä ja sen toimintaa luonnossa. Sen jälkeen käydään läpi sen toimintaa

geenimuokkausvälineenä sekä onnistuneita tutkimuksia hyönteisillä. Lopussa perehdytään menetelmän tulevaisuuden sovellutuksiin ja ratkaistaviin ongelmiin.

1.1 Tutkimushistoria

CRISPR löydettiin vuonna 1987 kun Ishino ym., (1987) tekivät tutkimusta isozyme alkaline phosphate-geenistä (*iap*) ja sattumalta havaitsivat 29 nukleotidin mittaisia toistuvia jaksoja geenin läheisyydessä. Tämä johti lukuisiin tutkimuksiin, joissa koitettiin selvittää näiden toistuvien jaksoiden perimmäistä luonnetta. Kesti kuitenkin vuoteen 2007 kun Barrangou ym., (2007) tutkimuksessa saatiin ensimmäistä kertaa kokeellisesti todistettua CRISPR:n rooli adaptiivisena nukleiinihappoja hyödyntävänä immuunipuolustusmekanismina. Menetelmää tutkittiin tämän jälkeen paljon ja tietoa saatiinkin kaikista CRISPR:n komponenteista. Lisääntyneen tiedon ja uteliaisuuden avulla vuonna 2012 Charpentierin & Doudnan tutkimusryhmä todisti, että Cas9-proteiini voi RNA:n ohjaamana halkaista halutun DNA-jakson tietystä kohtaa (Jinek, 2012). Tämä johti siihen, että CRISPR:n kyvyt geenimuokausmenetelmänä havaittiin ja löydöksen ansioista Charpentierin & Doudnan tutkimusryhmä palkittiin kemian Nobelin palkinnolla vuonna 2020.

1.2 Toiminta bakteereissa

CRISPR/Cas-entsyymit ovat tärkeitä adaptiivisen immuunipuolustusmekanismin komponentteja bakteereilla ja arkeilla. Ne muodostavat järjestelmän, jolla ne puolustautuvat virusperäisiltä tai plasmideista tulevilta nukleiinihapoilta. (Clement ym., 2020). CRISPR-lokus koostuu Cas-geenistä, johtosekvenssistä ja toistojaksoista. Toistojaksot sisältävät komplementaarisen pätkän vierasperäisistä lähteistä olevaa DNA:ta, ja niiden avulla bakteerien immuunipuolustus kykenee tunnistamaan infektoijan. Immuunipuolustusreaktio alkaa sillä, kun bakteeri tuottaa Cas-proteiinin, joka tunnistaa tunkeilevan vierasperäisen DNA:n. Tarkkaa tietoa tunnistusmekanismista ei vielä ole ja tutkimukset sen ratkaisemiseksi jatkuvat. Cas-proteiini pilkkoo tunkeilijasta pienen pätkän ja tämä pätkä tallennetaan CRISPR:n toistojaksoihin, jotta bakteeri muistaa tämän tunkeilijan tulevaisuudessa. Kun sitten tulevaisuudessa sama infektiota tapahtuu, indusoidaan näistä toistojaksoista tätä infektoijaa varten tallennettu pätkä ja siitä muodostuu crRNA, joka on komplementaarinen vierasperäisen DNA:n kanssa. CrRNA pariutuu infektoivan DNA:n kanssa, jotka PAM-sekvenssin (protospacer-adjacent motif) ohjaamana ohjautuvat tracrRNA:n luo. TracrRNA ohjaa Cas9:n

katkaisemaan DNA-juosteen PAM-sekvenssin vierestä, lopputuloksena vierasperäinen DNA pilkkotaan toimimattomaksi ja bakteerin infektoituminen estyy. (Sander & Joung, 2014).

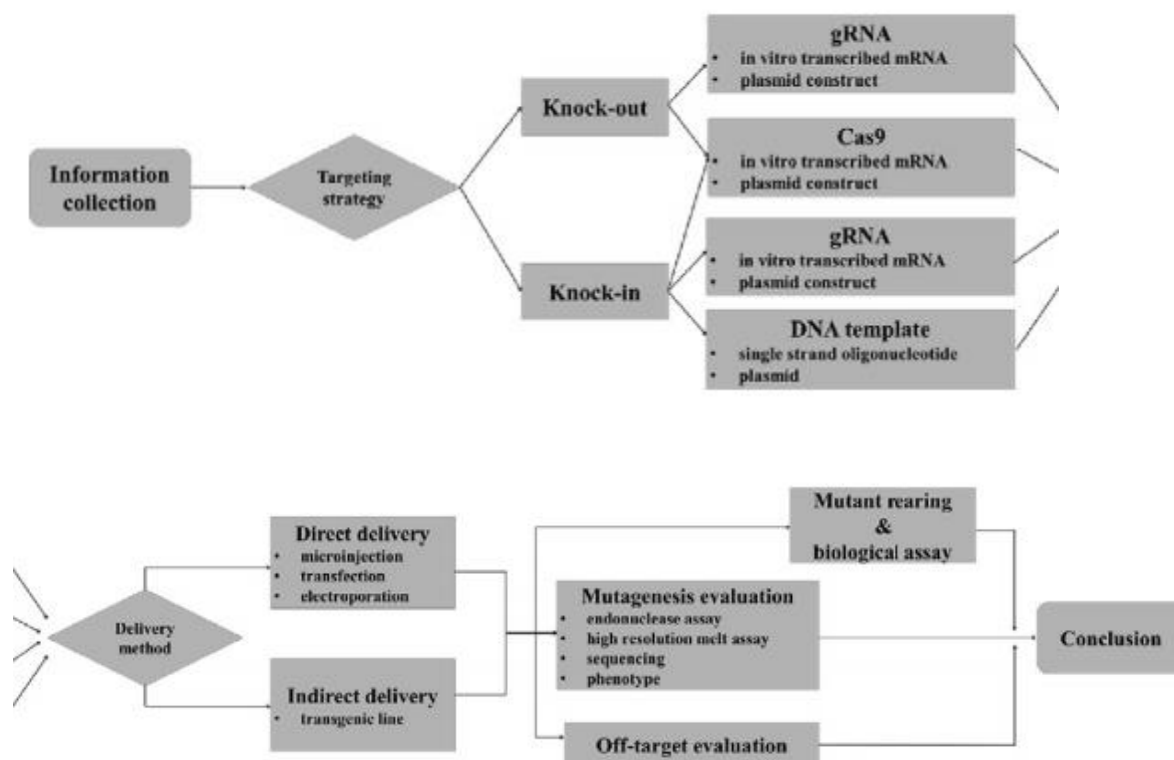
1.3 Muut geenimuokkausmenetelmät

CRISPR/Cas9 ei ole ainoa olemassa oleva geenimuokkausmenetelmä, vaan sitä ennen on ollut käytössä meganukleasit, sinkkisorminukleasi (ZFN) ja transcription activator-like effectors nuclease (TALEN) menetelmät. Ne kaikki ovat proteiinipohjaisia systeemejä, joilla on kustomoitavissa oleva kyky tarttua DNA:han (Sander & Joung, 2014). Kaikilla menetelmillä on puolensa, mutta niillä on myös heikkoutensa. Iso ongelma on se, että jokaista DNA kohtaa kohti tarvitaan uusi ZFN tai TALEN proteiini, verrattuna siihen että, yksi CRISPR:in Cas9-proteiini voi halkaista minkä tahansa RNA:n osoittaman sekvenssin. (Pattanayak ym., 2013.) Muutenkin CRISPR on geenimuokkausmenetelmistä halvin ja ylivertainen käytettävyydeltään (Hsu, Lander & Zhang, 2014).

ZFN:n heikkoutena on se, että se on erittäin riippuvainen aminohappoketjun rakenteesta, joka vaikeuttaa sen pariutumiskohtien ennustamista. Tämä vaikeuttaa sen yleistä soveltamista geenimuuntelussa. TALEN on toiminnaltaan erittäin hyvin ennustettavissa ja se tarttuu DNA:han äärimmäisen spesifisesti, mutta tuloksena syntyvien polypeptidien suuri koko tekee niiden modifioinnista haastavaa (Bassett & Liu, 2013).

2 CRISPR/CAS9-GEENIMUOKKAUSMENETELMÄNÄ

Yksinkertaistettuna geeninmuokkauksessa Cas9:n tunnistaa PAM:in ja sen seurauksena crRNA tunnistaa halutun DNA-kohdan ja pariutuu sen kanssa. Cas9-sgRNA kompleksin tarttuessa DNA:han se avautuu PAM-sekvenssin vierestä. CrRNA:n ja DNA:n kiinnittyminen aktivoi Cas9:n leikkaamaan DNA-juosteet poikki ja syntyy kaksoisäiekatkos (double strand break, DSB). Tämän jälkeen solun oma korjausmekanismi korjaa juosteet takaisin yhteen, jonka tuloksena on mutaation aiheuttama geenimuokkaus. Työn onnistumisen kannalta tärkeä vaihe on alun suunnitteluvaihe, jossa on syytä päättää mitä muokataan ja millaisin menetelmin. Tätä suunnitteluvaihetta on havainnollistettu myös kuvassa 1. (Taning ym., 2017).



Kuva 1: CRISPR/Cas9- tutkimuksen työvaiheet (Taning ym., 2017) Lupa kuvan käyttöön CC-BY-NC-ND ©ELSEVIER Ltd, Journal of Insect Physiology 2017.

2.1 Suunnittelu & tiedonhaku

Onnistuakseen geenimuokkaus vaatii selkeän suunnitelman sekä informaation hakua projektiin vaikuttavista tekijöistä. On tärkeää määrittää selkeä strategia siitä, miten menetelmää aikoo käyttää, oli sitten kyseessä geenin hiljentäminen tai muokkaus. Työssä käytettävästä lajista on selvitettävä sgRNA:ta (single guide RNA) varten geenisekvenssit. Tiedonhakuja helpottamaan voi käyttää erilaisia netistä löytyviä tietopankkeja, sgRNA-kirjastoja ja muita bioinformatiivisia apuohjelmia (Clement ym., 2020; Taning ym., 2017).

2.2 Cas9-proteiini ja PAM

Cas9-nukleaasi löytyi *Streptococcus pyogeneksestä*, josta se on saatu eristettyä ja siitä on tullut tärkeä osa CRISPR/Cas9-geenimuokkausmenetelmää. Sen tehtävänä on leikata DNA-juosteet tietyistä kohdasta. Cas9-proteiini koostuu kahdesta alayksiköstä, HNH-domeenista, joka

katkaistee komplementaarisen juosteen sekä RuvC-domeenista joka puolestaan katkaisee nonkomplementaarisen juosteen. (Jinek, 2012). Juosteiden leikkaus tapahtuu samasta kohtaa, jolloin syntyy DSB, jonka syntyminen on tärkeä geenimuokkauksen ensimmäinen vaihe. Cas9:n voi myös leikata juosteet useammasta kohtaa samanaikaisesti (Sander & Joung, 2014). Koska leikkauskohdat voidaan spesifisesti määrittää, on se johtanut siihen, että Cas9:stä on tullut monikäyttöinen geenimuuntelutyökalu (Jinek ym., 2014).

Cas9:n toiminta on riippuvaista PAM-tunnistuksesta, josta vastaa tunnistuskohta NGG (N, on mikä tahansa nukleotidi). PAM-sekvenssi sijaitsee halutun DNA:n 3' päässä, ja Cas9:n tarttuu sekvenssiin ja muodostaa emäsparit crRNA:n ja DNA:n välille. Tämän jälkeen Cas9:n domeenit HNH ja RuvC katkaisevat sekvenssit 3 nukleotidia ennen PAM-sekvenssiä. Koska katkaisureaktio on erittäin spesifinen, voidaan Cas9-nukleaasi aktiivisuutta soveltaa minkälaiseen tahansa sgRNA:n kanssa, kunhan halutulla DNA jaksolla on PAM-sekvenssi. (Sander & Joung, 2014). Myös muita PAM-alueita, kun NGG on löydetty. Jiang (2013) havaitsi että Cas9:n PAM-sekvenssinä voi toimia myös NAG-sekvenssi, mutta sen havaittiin olevan huomattavasti vähemmän efektiivinen. Myös lyhyempiä kahden nukleotidin mittaisia PAM:ejä ja pidempiä vähintään neljän nukleotidin mittaisia PAM:ejä on saatu luotua. Niiden toivotaan hyödyttävän geenimuuntelua tulevaisuudessa (Zhang ym., 2016).

2.3 Guide RNA (gRNA)

Guide RNA koostuu crispr-RNA:sta (crRNA) ja transaktivoituvasta crispr-RNA:sta (tracrRNA). CrRNA tunnistaa halutun DNA juosteen ja pariutuu sen kanssa yhteen. Samaan aikaan tracrRNA vuoro vaikuttaa Cas9:n kanssa ja ohjaa juosteiden katkaisua. (Gratz ym., 2013.) Yleisimmin nämä kaksi on kuitenkin yhdistetty sgRNA:ksi, koska niiden yhdistelmä on stabiilimpi ja tehokkaampi (Sander & Joung, 2014). SgRNA on yleensä 20 nukleotidin mittainen ja on komplementaarinen halutun sekvenssin kanssa, niitä voi olla reagenssissa yksi tai useampia samaan aikaan. Näin on mahdollista saada aikaan mutaatioita useimmissa geneissa samaan aikaan tai kahden sgRNA:n avulla voidaan ei-homologisten päiden yhdistämisen (non-homologous end joining, NHEJ) kautta poistaa isompia kokonaisuuksia genomista. (Sander & Joung, 2014; Hsu, Lander & Zhang, 2014).

O'Geen ym., (2015) mukaan sgRNA:n rakenne on menetelmän spesifisyyden kannalta tärkeintä ja sgRNA on syytä suunnitella mahdollisimman hyvin. Spesifisyys tarkoittaa siis sitä, että sgRNA on sellainen, että sillä on mahdollisimman vähän samanlaisia sitoutumiskohtia genomissa, jotta ei-halutuilta (off-target) mutaatioilta vältyttäisiin. Myös muokattuja sgRNA:ta

voidaan käyttää. Sander & Joung (2014) tutkimuksissaan kokeilivat 5' päästä lyhennettyjä 17 ja 18 nukleotidin mittaisia sgRNA:ta ja saivat lupaavia tuloksia niiden tehokkuudesta ja matalasta off-target aktiivisuudesta.

2.4 Juosteiden korjaus

CRISPR/Cas:in katkaistua juosteet, aktivoituu solun oma korjauskoneisto ja liittää juosteet takaisin yhteen. Siinä missä bakteereissa kaikki muutokset tapahtuvat homologisen rekombinaation (homology-directed repairin, HDR) kautta, eukaryooteilla korjaus voi tapahtua HDR:n tai NHEJ:n avulla. (Allen ym., 2018). Juosteessa voi olla useampia korjauskohtia, jos juosteet on katkaistu useammasta kohtaa. Lisäksi HDR:ää ja NHEJ:ää voi esiintyä samoissa juosteissa. (Sander & Joung, 2014). Allen ym., (2018) mukaan vielä ei kuitenkaan ole tarkkaa ymmärrystä siitä mitkä asiat vaikuttavat siihen kummalle reitille lopulla ajaudutaan. Tiedetään kuitenkin, että se riippuu tekijöistä kuten missä vaiheessa solusykliä solu on ja siitä, miten korjausentsyymejä on saatavilla. Tutkimuksissa kuitenkin huomattiin, että luonnollisesti NHEJ-reitti on yleisempi ja aiheutunut mutaatio on yleensä insertio tai deleetio. Kohdealueen kanssa homologisen templaatin avulla voidaan saada korjaus HDR-reitille. Tehokkuuden kohdalla NHEJ on kuitenkin menetelmistä edellä, ja sen onkin huomattu aiheuttavan mutaatioita HDR:ää tehokkaammin. Tutkimuksia tehdäänkin HDR:n tehostamisen suhteen koska se olisi keino parantaa menetelmän spesifisyyttä (Taning ym., 2017).

HDR on reiteistä tarkempi, sen avulla voidaan tehdä tarkkoja geneettisiä muutoksia ja se on paremmin kontrolloitavissa (Taning ym., 2017). HDR:n avulla voidaan tehdä pistemutaatioita ja rekombinaation avulla liittää haluttuja geenisekvenssejä osaksi kohteen sekvenssiä. Geenisekvenssin liittämiseen tarvitaan luovuttajatemplaatti, jonka on oltava homologinen kohdesekvenssin kanssa (Sander & Joung, 2014). Tällä tavoin voidaan geenisekvenssi liittää osaksi halutun geenin eksonialuetta. Näin sekvenssin avulla voidaan häiritä geenin toimintaa, ja saada se toimimattomaksi, tätä menetelmää kutsutaan knockout-menetelmäksi. Vastaavasti tavoitetulle alueelle voidaan lisätä jotain, jolloin menetelmä on knock-in menetelmä (Taning ym., 2017).

NHEJ-reitin kautta syntyy erimittaisia indel-mutaatioita insertioiden tai deleetioiden kautta (Allen ym., 2018). NHEJ voi liittää leikatut päät yhteen, jolloin syntyy pieniä deleetioita tai insertioita. Se voi myös mahdollisesti liittää kaksi eri leikkauskohtaa yhteen. Tällöin niiden välissä ollut juoste voi deletoitua tai kääntyä, mikä johtaa isompiin kromosomaalisiin muutoksiin (Bassett & Liu, 2013). Indelien aiheuttaminen on hyödyllistä, kun halutaan muuttaa

isompia kokonaisuuksia tai häiritä koodaamattomia säätelymekanismeja (Song, 2016). Näin voidaan esimerkiksi vaikuttaa translaation lukukehykseen ja sitä kautta valmistuvan proteiinin rakenteeseen ja sen toimivuuteen. On myös mahdollista luoda uusi stop-kodoni, joka lopettaa geenin koodaamisen tai vastaavasti muokata koodaamattomia alueita ja sitä kautta häiritä transkriptiofaktorien kiinnittymistä (Billon, 2017; Clement ym., 2020). NHEJ-reittiä pidetään kuitenkin virhealttiina sen takia, että aiheutuvien indelien koko ja tyyppi on arvaamaton, eikä se ole kontrolloitavissa kuten HDR. Lisäksi se häviää HDR korjaukselle tarkkuudessa (Taning ym., 2017).

2.5 Konsentraatio

Erittäin tärkeä asia menetelmän toiminnan kannalta on Cas9-gRNA:n konsentraatio, sillä liian korkean konsentraation on havaittu olevan myrkyllistä ja aiheuttavan steriiliyttä. Konsentraation ollessa korkea myös off-target mutaatioita aiheutuu enemmän kuin matalammilla konsentraatioilla, mikä johtaa siihen, että menetelmän spesifisyys laskee ja vaikuttaa myös selviytyneiden tutkimuseliöiden määrään. Mutta toisaalta on havaittu, että konsentraation lasku vähentää myös haluttujen on-target mutaatioiden määrää. Onkin siis kyseessä eräänlainen vaihtokauppa tilanne menetelmän tehokkuuden ja spesifisyyden välillä (Pattanayak ym., 2013). Taning ym., (2017) mukaan onkin ensiarvoisen tärkeää löytää optimaalinen konsentraatio, sillä sen on havaittu olevan tärkeää haluttujen tuloksien saamiseksi. Konsentraation lisäksi myös Cas9-sgRNA-ekspression kestolla arvioidaan olevan vaikutusta muokkauksen spesifisyyteen, mutta tutkimukset sen varmistamiseksi jatkuvat yhä (Mali ym., 2013).

2.6 Konstrukti & toimitusmekanismit

Cas9:n ja sgRNA:n konstruktit on luotava kohde-eliöön toimitusta varten, mikä on mahdollista tehdä plasmidia tai RNA-injektiota avuksi käyttäen. Cas9:n ja sgRNA:n koodaavat alueet voivat olla yhdessä plasmidissa tai erillisissä plasmideissa. Myös geenien promoottorit ja terminaattorit on koodattu plasmideihin. Cas9-mRNA:n ja sgRNA:n ollessa erillisissä plasmideissa ovat tulokset olleet Taning ym., (2017) *Drosophilalla* tekemän tutkimuksen mukaan heikkoja, mutta niiden ollessa yhdessä ja samassa plasmidissa on saatu parempia tuloksia. Bassett & Liu (2013) tutkimuksen mukaan RNA-injektiolla on mahdollista injektoida Cas9-proteiinina sgRNA:n kanssa suoraan alkioon, ja tällä tavalla on saatu parempia tuloksia verrattuna siihen, että on käytetty plasmidia siirtovälineenä. Tämän he arvelevat johtuvan siitä, että Cas9-proteiinin ja sgRNA:n pitoisuudet ovat tällä tavalla korkeimmat. Cas9-mRNA:n siirrossa aikaa menee myös proteiinin translaatioon, mikä näkyy pienempänä ituradan solujen

mutaatiofrekvenssinä. Mutta jos siirto tehdään proteiinina, voi Cas9-sgRNA-kompleksi muodostua heti, eikä alkion ituradassa kerkeä tapahtua erikoistumista ja mutaatiofrekvenssi on sitä kautta suurempi (Taning ym., 2017; Bassett & Liu, 2013). Näin ollen toimitustavan valinnalla on selvä vaikutus menetelmän tehokkuuteen (Bassett & Liu., 2013). Hyönteisissä reagenssit yleensä injektoidaan tuoreisiin muniin/alkioon injektorin avulla, näin ne saadaan niin somaattisiin kuin ituradankin soluihin. Myös transfektiota voidaan käyttää, jos tutkimuksessa on kyseessä vain yksittäisten solujen kanssa tehtävä tutkimus (Taning ym., 2017).

2.7 Onnistumisen tarkkailu

Kun konstrukti on onnistuneesti toimitettu, on tärkeää luonnehtia ja määritellä millaisia muutoksia on saatu aikaan. Sen lisäksi että tutkitaan, onko halutulle (on-target) geenialueelle saatu aiheutettua mutaatiota, on tärkeää tutkia, onko tahattomasti saatu aikaan mutaatioita myös muilla (off-target) geenialueilla. Yleisimmin käytetty metodi onnistumisen tarkkailuun on sekvensointi (Sanger tai Next-Generation Sequencing (NGS)), jolla saadaan tarkasti määritettyä sekvenssin nukleotidijärjestys. Sekvensoinnin tulosta voidaan verrata alkuperäiseen sekvenssitietoon alueesta, jolloin nähdään, onko muutoksia tapahtunut (Clement ym., 2020). PCR:ää käytetään yleensä avuksi sgRNA:n kohdealueen monistamiseen, jota sitten sekvensoidaan (Kohno ym., 2016).

Toinen mahdollinen onnistumisen tarkkailun väylä on kohdennettu mutaatioanalyysi. Siinä PCR:ään laitetaan editoitua ja alkuperäistä DNA:ta, jotka sitten reaktiossa denaturoituvat ja liittyvät yhteen sattumanvaraisesti niin, että yhteen juosteeseen tulee sekä editoitua että alkuperäistä DNA:ta. Tämän jälkeen niiden yhteensopimattomuutta voidaan tarkkailla entsyymien kuten Surveyor tai T7E1 avulla. Metodi tarjoaa nopean ja kustannustehokkaan ratkaisun muutosten tarkkailuun, mutta se häviää sekvensoinnille tarkkuudessa eikä sillä havaita pistemutaatioita. Menetelmällä myös voidaan saada vääriä positiivisia tuloksia, jos kontrolleja ei suoriteta (Clement ym., 2020). Mahdollista on myös tarkkailla muutoksia geeni- ja proteiini-ekspressoissa monin biokemiallisin menetelmin (Vouillot, 2015).

3 MAHDOLLISET ONGELMAT

3.1 Spesifisyys & tehokkuus

Keskeinen ongelma tällä hetkellä menetelmän kannalta on se, että spesifisyys ja tehokkuus eivät ole korreloi keskenään. Kun spesifisyyttä koitetaan nostaa, kärsii tehokkuus ja sama toistuu toisinpäin (Pattanayak ym., 2013). Spesifisyyttä laskee eniten se, kun halutun mutaation lisäksi syntyy myös mutaatioita, joita ei ole tarkoitettu syntyvän. Ei haluttujen mutaatioiden syntyminen on vaikeasti ratkaistavissa oleva ongelma. Koska on huomattu, että sgRNA voi liittyä myös alueeseen, joka ei ole sen kanssa täysin homologinen. Cong, (2013) tutkimusten mukaan sgRNA:n liittymiseen DNA-juosteeseen riittää, PAM-sekvenssin kiinnittymiskohdasta laskien on 12 nukleotidin homologisuus juosteen kanssa. Mutta lopuissa sgRNA:n kahdeksassa nukleotidissa voi esiintyä eroavaisuuksia. Tämä lisää mahdollisuutta ei haluttujen mutaatioiden syntyyn. Off-target mutaatiot voivat myös vaikuttaa kohde-eliön selviytymisasteeseen kokeen aikana, sillä lukuisissa kokeissa selviytymisaste on melko matala (Zhang ym., 2016). Mutaatiot ovat kaikki onnistuessaankin epäsäännöllisiä ja onnistunut mutaatio ilmenee eri yksilöissä eri lailla (Kohno ym., 2016).

Tehokkuutta arvellaan heikentävän myös sen, että DSB-aktiivisuus riippuu nukleotidijärjestyksestä. Myös tutkimukset kromatiinin rakenteen vaikutuksista ovat käynnissä. Tehokkuutta ei myöskään voida arvioida tällä hetkellä mitenkään etukäteen vaan kaikki täytyy kokeellisesti testata (Zhang ym., 2016). Taning ym., (2017) mukaan myös injektointi on tehoton tapa siirtää Cas9-sgRNA kohde-eliöön. He havaitsivat tutkimuksissaan *Drosophilalla*, että injektointi epäonnistuu monissa tapauksissa tuottamaan mutaatioita ituradalla. He myös korostavat, että eri tutkimuksien välinen vertailu on vaikeaa koska kaikilla tutkimusryhmillä on eri kohdealueet ja ne käyttävät erilaisia sgrRNA:ita.

3.2 PAM-rajoitteet

CRISPR/Cas9:n DSB-aktiivisuus tarvitsee toimiakseen PAM-sekvenssin, joiden monipuolisuuden vähyys on ongelma. Tunnistusmenetelmäksi kolmen nukleotidin (NGG) PAM-sekvenssi on aika huono koska samanlaisia kolmen nukleotidin mittaisia alueita kuin NGG on lajin genomien koosta riippuen satoja, ehkä jopa tuhansia (Sander & Joung, 2014). Vaikka uudenalaisten PAM-sekvenssien saralla onkin otettu edistysaskelia ja myös paranneltuja PAM-sekvenssejä on saatu käyttöön, on niiden vähyys tällä hetkellä menetelmän käytettävyyttä rajoittava tekijä. Uusien erilaisten PAM-sekvenssien myötä voidaan kohdentaa

geenimuokkausta uusille sekvenssialueille ja mahdollisesti parantaa spesifisyyttä (Zhang ym., 2016).

4 ONNISTUNEET HYÖNTEISTUTKIMUKSET

Yhteisiä piirteitä kaikille onnistuneille geenimuokkauskokeille hyönteisissä on se, että kaikki tutkimukset kohdistuvat geenialueille, joilla ei ole vaikutusta lajin normaaliin kehitykseen (Kohno ym., 2016). Muuten tutkimukset ja niiden menetelmät eroavat toisistaan, koska menetelmä on vielä niin uusi tutkimuskäytössä. Kaikkien tutkimusryhmien on täytynyt lähteä kokeellisesti tutkimaan CRISPR/Cas9:n toimivuutta tutkimuskohteena olevan eliön geenien muokkaukseen, osittain myös siitä syystä, että tutkimuksia on tehty vähän ja pohjatietoa löytyy rajallisesti. Kun menetelmää saadaan tehostettua ja käytettävyyttä parannettua, voidaan siirtyä tutkimaan evolutiivisesti merkittävien geenien toimintaa (Zhang ym., 2016).

4.1 CRISPR *Drosophilalla*

Gratz ym., (2013) tutkimuksen tavoitteena oli todistaa, että CRISPR/Cas9:ää voidaan käyttää geenimuokkaukseen *Drosophilalla* ja että ne voivat sen jälkeen tuottaa samat geenimuokkaukset omaavia jälkeläisiä. Kohdegeeninä tutkimuksessa oli X-kromosomissa sijaitseva *yellow*-geeni. Tutkimuksessa konstruktina käytettiin Cas9:ää ja sgRNA:ta koodaavia plasmideja ja tarkempaan tavoitteena oli *yellow*-geenin ensimmäinen eksoni. Kun injektioista oli kulunut 24 h eristettiin DNA:ta alkioista ja monistettiin halutun alueen DNA:ta PCR:llä. Tämän jälkeen tutkittiin onnistumista kohdennetun mutaatioanalyysin (Surveyor mutation detection assay) avulla ja huomattiin muokkauksen onnistuneen koska mutaatio oli syntynyt haluttuun kohtaan sgRNA:n ohjaamana. Tämän jälkeen toistettiin vastaava koe *rosy*-geenillä ja saatiin menetelmä toimimaan onnistuneesti myös sillä.

Rohkaistuneena siitä, että CRISPR/Cas9:n toimii *Drosophilalla* siirryttiin tutkimaan, että saataisiinko menetelmä valjastettua tuottamaan deletio määritettyyn kohtaan. Tavoitteena oli tällä kertaa poistaa koko *yellow*-geenin 4,6 kiloemäksen kokoinen lokus. Tätä varten suunniteltiin 2 sgRNA:ta. Molemmat suunniteltiin vastaamaan geeninpäässä olevia alueita, toinen 3'-päähän ja toinen 5'-päähän. Menetelmä toistettiin samalla lailla, kuin edellinenkin koe, mutta onnistumisen tarkkailuun käytettiin tällä kertaa sekvensointia. Sekvensointia varten halutun alueen monistamiseen suunniteltiin alukkeet ja DNA:ta monistettiin PCR:n avulla. Tutkimuksen tuloksena huomattiin että 4,6 kb lokus oli onnistuneesti poistettu ja tarkemmassa

tarkastelussa molemmissa päissä oli NHEJ:lle tyypilliset indel-mutaatiot. Tämä oli yksi ensimmäisistä tutkimuksista, joissa CRISPR/Cas9:n avulla poistettiin onnistuneesti isompia genomisia alueita kohde eliöltä.

Onnistuttuaan edellisissä kokeissa päätettiin vielä kokeilla siirtää *attP*-geeni HDR:n avulla *yellow*-geenin kohdalle. Siihen tarvittiin templaati, joka sisälsi *attP*-geenin ja oli reunoilta homologinen poistettavan *yellow*-geenin kanssa. Tutkimus toistettiin muuten samalla tavalla, mutta Cas9:n ja sgRNA:n lisäksi injektointiin myös templaatti. Samoja alukkeita kuin edellisessä kokeessa käyttäen monistettiin haluttua *yellow*-geenin aluetta. Jälleen kerran tutkimus onnistui ja sekvenssikohtainen tarkastelu osoitti, että 5 tapauksessa 8:sta oli kyse *attP*-geenin siirtymisestä kohde alueelle. Kahdessa tapauksessa korjaus oli tapahtunut NHEJ:n kautta ja ne sisälsivät deleetioita mutta *attP*-geeni puuttui. Yhdessä tapauksessa onnistuminen oli ollut osittainen, sillä deleetio löytyi kuten piti mutta sekvenssi sisälsi vain puolet *attP*-geenin sekvenssistä.

Kokeiden jälkeen tehtiin risteytyskokeita, jotta voitiin testata tehtyjen mutaatioiden periytyvyyttä. Kaikissa kokeissa muunneltua *Drosophila*-kantaan risteytettiin muuntelemattoman villityypin yksilöiden kanssa. Näiden jälkeläisten DNA:ta sitten eristettiin ja sekvensoimalla tutkittiin, olivatko muutokset jälkeläisissä todella CRISPR/Cas9:n muuntelun syytä. Sekvensoinnissa löytyi osalta jälkeläisistä samanlailla muunnellut geenialueet kuin muunnelluilta vanhemmiltaankin. Mainitsemisen arvoista tutkimuksessa on se, että kaikki mutaatiotyypit onnistuivat vain yksittäisissä yksilöissä ja tehokkuus oli matala kaikilla menetelmillä. Paras tulos tuli ensimmäisellä NHEJ:n pohjaisella menetelmällä, joka tuotti onnistumisen vain 5,9 % tapauksissa.

4.2 Knockout *Apis Mellifera*

Kohno ym., (2016) tutkimusryhmän tavoitteena oli hiljentää tarhamehiläisen (*Apis mellifera*) *major royal jelly* proteiinia koodaava (*mrjpl*) geeni. Oletuksena tutkimuksessa oli, että tämä pääasiassa aikuisissa mehiläisissä ekspressoitava geeni olisi poistettavissa niin ettei mehiläisten normaali kehitys kärsisi. NCBI:n RefSeq-tietokantaa tutkimuksessa apuna käyttäen suunniteltiin (N₂₀NGG) sgRNA, jonka kanssa ei ollut yhtään samanlaista kohtaa koko *Apis mellifera* genomissa. Tavoitteena oli saada aikaan mutaatio (insertio tai deleetio) ja saada aikaan muutos geenin toisessa eksonissa. SgRNA:t, Cas9-mRNA:t, ja oligonukleotiditemplaattit tilattiin netistä ja niistä tarvittavat laimennokset valmistettiin itse. Toimitusmekanismina tutkimuksessa käytettiin mikroinjektointia ja aineet injektointiin

maksimissaan 3 tuntia vanhoihin hedelmöitettyihin muniin, saaden aikaan geenimuunneltuja kuningattaria. Maksimoidakseen reagenssin pääsyn ituradan soluihin, pyrittiin aineet injektoidaan munien dorsaaliseen puolelle. Sen jälkeen näitä geenimuunneltuja kuningattaria munitettiin ja niiden hedelmöityttämistä munista saatiin geenimuunneltuja kuhnureita. Näiden kuhnurien genotyyppjä analysoimalla saatiin varmistettua kuningattarien geenimuokkauksen onnistuminen. Genotyyppien analysointiin tutkimuksessa käytettiin PCR:ää jolla monistettiin kuhnureista *mrjpl* geenialuetta, jotka sitten sekvensoitiin. Tuloksia verrattiin alkuperäiseen RefSeq:stä saatuun sekvenssiin.

57 injektoidusta munasta kuoriutui 23 toukkaa, joista selviytyi lopulta 14. Yhdeksän toukkaa kuoli mahdollisesti geenimanipulaation vaikutuksesta tai ruoan puutteen takia. Lopulta vain kuusi kuningattaria syntyi, joista kaksi kykeni munimaan, kaksi näistä kuningattarista kuoli, kun työläiset tappoivat ne ja kaksi kuoli muista syistä ennen munimista. Toinen munivista kuningattarista muni 67 munaa, mutta tuloksista selvisi, ettei geenimuuntelu ollut sen kohdalla onnistunut. Toinen kuningattarista muni 161 munaa ja tuloksien mukaan kahdessakymmenessä niistä geenimuokkaus oli onnistunut (12,4 % tehokkuudella) ja mutaatio löytyi halutulta geenialueelta. Muunnellut kuhnurit selvisivät aikuisikään ja näin saatiin varmistettua se, että *mrjpl*-geeni voidaan poistaa ja ettei se vaikuta *Apis mellifera* normaaliin kehitykseen.

5 MENETELMÄN TULEVAISUUS

5.1 Teknisten ongelmien ratkaisu

Sander & Joung (2014) mukaan isoimpana haasteena tulevaisuudessa on menetelmän spesifisyyden parantaminen. Strategioiden ja menetelmien saaminen sellaisiksi, että off-target mutaatioita ei tapahdu, eikä menetelmän tehokkuus heikkene, on merkittävä haaste alalla. Tutkimuksia on jo tehty modifioitujen sgRNA:en kanssa ja rohkaisevia tuloksia niiden spesifisyyttä parantavista ominaisuuksista on saatu. Mahdollisina tulevaisuuden tutkimuskohteina esiin on tullut myös Cas9:n modifioiminen tai modifioitujen nukleotidien käyttäminen sgRNA:n valmistuksessa. Myös korjausmenetelmissä siirtyminen suosimaan HDR-korjausta NHEJ-korjauksen sijaan parantaisi menetelmän ennustettavuutta ja sitä myötä spesifisyyttä (Taning ym., 2017).

Uusien paranneltujen PAM-alueiden kehittäminen tai löytäminen tekisi menetelmästä vielä entistä laajemmin sovellettavamman (Hsu, Langer & Zhang, 2014). Zhang ym., (2016) ovat

myös tutkineet modifioituja PAM-alueita. He tutkivat 2 nukleotidin mittaisien PAM-alueiden käyttöä kahtiajakoisin tuloksin sillä menetelmää kyllä pystyttiin laajemmin käyttämään, mutta samanlaisten PAM-alueiden määrä genomissa kasvoi aivan liian suureksi. He pitävät yhtenä todennäköisesti toimivana ratkaisuna ongelmaan sitä, että PAM:n kanssa vuorovaikutuksessa olevia aminohappoja räätälöitäisiin myös tunnistusmekanismiksi, joka tekisi tunnistuskohdasta spesifimmän.

Myös menetelmän optimointia eri solutyypeille, kudoksille ja organismeille tarvitaan (Sander & Joung, 2014). Zhang ym., (2016) mukaan tällä hetkellä keskitytäänkin liikaa kehittämään CRISPR:stä eräänlaista supermenetelmää kaikkiin organismeihin sopivaksi. Heidän mielestään ei ole realistista, että CRISPR voisi toimia kaikissa organismeissa samalla lailla vaan täytyisi keskittyä optimoimaan CRISPR:n toimintaa kullekin organismille sopivaksi.

Koko ajan kehittyvät tutkimusmenetelmät kuitenkin tukevat ongelmien kanssa painivia tutkijoita, jotka hyötyvät tekniikoiden paranemisesta ja muun tutkijayhteisön työn tuloksista. Netistä löytyvien tietopankkien ja sgRNA-kirjastojen apu on tutkimuksessa jo merkittävää, mutta nekin kehittyvät datan määrän kasvaessa (Clement ym., 2020). Myös koneoppimista ja algoritmeja on valjastettu hyötykäyttöön esimerkiksi parhaan mahdollisen sgRNA:n valinnassa, ja näiden merkityksen oletetaan vain kasvavan tulevaisuudessa (Bassett & Liu, 2013).

5.2 CRISPR/Cas9-geeniajo tulevaisuuden mahdollisuutena

CRISPR/Cas9:n pohjautuva geeniajo (gene drive) on mahdollinen tulevaisuuden keino torjua hyönteisien kautta leviäviä parasiittien aiheuttamia sairauksia. Näihin vektorisairauksiin menehtyy vuosittain 700 000 ihmistä ja ne ovatkin suuri ongelma erityisesti kehittyvissä maissa. Näistä vektorisairauksista tunnetuin on malaria, joka leviää ihmiseen *Plasmodium* alkueläimen infektoiman *Anopheles*-suvun hyttysten pistosta. Malariaan ei ainakaan vielä ole kyetty valmistamaan rokotetta, mikä on johtanut etsimään vaihtoehtoisia reittejä ongelman ratkaisuun. Geeniajon idea on peräisin luonnosta, kun tutkimuksissa on löydetty ”itsekkäitä geneettisiä elementtejä”, jotka edesauttavat omaa leviämistään seuraavaan sukupolveen seksuaalisesti lisääntyvien organismien luonnonpopulaatioissa suuremmalla todennäköisyydellä kuin 50 %. Tämä tapahtuu niin että tämä geneettinen elementti kopioi itsestään homologisen rakenteen myös vastinkromosomiin ja näin ollen elementin siirtyminen seuraavaan sukupolveen varmistuu (Nateghi Rostami, 2020).

CRISPR:n avulla pystytään toistamaan tämä, kun HDR:n avulla voidaan siirtää templaatti osaksi haluttua geenialuetta. Tämän jälkeen tämä geenialue mutatoidaan myös toiseen alleeliin, jolloin haluttu geeniyhdistelmä siirtyy myös seuraavaan sukupolveen. CRISPR muokkauksen avulla pyritään estämään *Plasmodiumin* aiheuttama infektointi hyttysissä tai pyritään vaikuttamaan hyttysten lisääntymiseen niin että niiden määrä vähenee (Hammond, 2015). Geeniajostrategiat voidaan jakaa populaatiota rajaaviin ja populaatiota muokkaaviin. Populaatiota rajaavassa strategiassa populaatioon tuodaan geenimuokattuja koiraita, jotka on muokattu niin että ne tuottavat koirasjälkeläisiä suuremmalla frekvenssillä kuin normaalisti. Tämä johtaa ajan mittaan siihen, että populaation koko pienenee ja naaraiden määrä vähenee. Tämä on merkittävää, koska kuten myös muilla hyttyslajeilla vain naaraat pistävät ihmistä ja siten levittävät vektorisairauksia. Toisessa strategiassa pyritään muokkaamaan populaatioita niin, että pyritään geenimuokkauksen avulla estämään *Plasmodium* infektiot hyttysissä. Tämä toteutetaan blokkamalla infektointi koiraisissa geenimuokkauksen avulla, jolloin antiparasiitti efektorigeenit siirtyvät geeniajon avulla populaatiossa. Ajan mittaan niiden geeniyhdistelmä yleistyy populaatiossa ja siirtyy myös naaraille, joka laskee parasiitin siirtoon kykenevien naaraiden määrää populaatiossa (Nateghi Rostami, 2020).

Hammond (2015) tutkimuksessaan testasi geeniajon toimivuutta *Anopheles gambiae*:lla. Tutkimuksessa tavoitteena oli hiljentää naaraiden fertiliteettiä yhteydessä olevia eri lokuksissa sijaitsevia alleleja. Tavoitteena oli, että hiljennettyjen alleelien suhteen resessiiviset homotsygootit olisivat steriilejä yksilöitä. Tämän asian selvittämiseksi suunniteltiin *hdrGFP*-konstruktit ja tavoitteena oli HDR:n avulla siirtää templaatti osaksi geenien koodaavaa aluetta, ja varmistaa että yksilöt olisivat homotsygootteja kyseisten alleelien suhteen. Templaattiin lisättiin myös fluoresoivan proteiinin transkriptio yksikkö, jotta pystyttäisiin tarkastelemaan siirron onnistumista. Kokeessa kaikkiin geeneihin siirto onnistui ja mutaatiot havaittiin halutulla alueella. Tulos tarkistettiin myös PCR:n ja sekvenssoinnin avulla koska haluttiin varmuus, että kyseessä oli HDR:n aiheuttama mutaatio. Kokeen jälkeisissä risteytyskokeissa havaittiin, että *hdrGFP* homotsygootit olivat steriilejä, kun taas heterotsygootit eivät. Tulokset olivat lupaavia, koska ne laskivat fertiliteettiä ja antoivat osviittaa geeniajon soveltuvuudesta vektorisairauksiin liittyvien ongelmien ratkaisijaksi. Huolestuttavana pointtina kuitenkin huomattiin, että *hdrGFP* suhteen heterotsygooteista vain 9,3 % selvisi hengissä. Näiden tietojen pohjalta laskettiin, että tehty muokkaus ei leviäisi populaatioon vaan se katoaisi siitä. Tutkimus kuitenkin todisti geeniajon toimivuuden.

Tulevaisuudessa geeniajotekniikan toimivuutta kehitetään yhdessä CRISPR/Cas9-menetelmän rinnalla. CRISPR/Cas9-menetelmän teknisten ongelmien ratkaisu auttaisi myös geeniajon hyödyntämistä ongelmien ratkaisijana. Ongelmaksi muodostuu myös se, että vektorisairauksia levittäviä hyttysiä ei tunneta vielä tarpeeksi hyvin. Niitä on tutkittu hyvin vähän, vaikka niiden aiheuttamat sairaudet ovatkin hyvin kaikkien tiedossa. Tietoa lajeista ja niiden ekologisista rooleista on rajallisesti. Todella harvasta hyttyslajista löytyy tietoa tietokannoista ja vain pari lajeista on sekvensoitu. Näiden asioiden tutkimista ja ratkaisua tarvitaan, jotta geeniajo voisi olla todellinen ratkaisu (Nateghi Rostami, 2020).

5.3 Bioturvallisuus

Tällä hetkellä CRISPR/Cas9:llä käsiteltyjä hyönteisiä täytyy lain mukaan säilyttää tarkasti rajatuissa laboratorio-olosuhteissa monissa maissa (Kohno ym., 2016). Tulevaisuudessa toiveena kuitenkin on saada täysimääräinen hyöty irti jo saaduista tieteellisistä läpimurroista. Geeniajon tapaiset keinot vaativat toimiakseen sen, että geenimuokattuja hyönteisiä päästetään luontoon. Tämä on toki aiheellisestikin aiheuttanut huolta ja huolestuneita mielipiteitä onkin ilmaistu asioiden tiimoilta (Taning ym., 2017). Monista lajeista ja niiden ekologisista suhteista ei ole vielä tarpeeksi tietoa, jotta hyönteisiä voitaisiin vapauttaa laboratorio-olosuhteista. Ei voida ennustaa voiko geenimuokattu laji siirtää muutokset myös toiselle lajille tai minkälaisia seuraamuksia koko populaatio voi mahdollisesti kohdata (Nateghi Rostami, 2020). Samalla kun näihin asioihin haetaan ratkaisuja, on syytä hakea ratkaisuja myös teknisiin kysymyksiin. Myöskin geenimuokkauksen vaikutuksista ekosysteemitasolla on vielä rajallisesti näyttöä. Sillä on mahdollista, että muutokset vaikuttavat myös muihin lajeihin, jos ei suoraan niin välillisesti. On myös ekologista näyttöä siitä, että jos jokin ekolokero vapautuu niin jokin muu laji ottaa sen paikan. Tämä voisi johtaa siihen, että jouduttaisiinkin painimaan saman ongelman kanssa uudelleen. Moniin kysymyksiin täytyy vielä löytää ratkaisu ja on syytä myös sopia yhteiset pelisäännöt tulevaisuuden sovellutuksien varalle, jotta kaikenlaisilta ei halutuilta tilanteilta vältytään (Taning ym., 2017).

6 YHTEENVETO

CRISPR/Cas9-menetelmän yksinkertaisuus, tehokkuus ja laaja soveltuvuus voi muuttaa biologista tutkimusta. Se on tuonut tutkijoille aivan uudenlaisen työkalun, jolla voidaan tutkia tai tehdä muutoksia mille vain eliölle. Kun tulevaisuudessa menetelmän teknisiä ongelmia

saadaan paranneltua, onkin tutkimuskysymyksien laadinnassa vain mielikuvitus rajana (Sander & Joung, 2014). Koska siitä on tullut erittäin suosittu menetelmä maailman laajuisesti ja useat tutkimusryhmät painivat samojen ongelmien kanssa, on menetelmän kehittyminen tulevaisuudessa varmaa. Menetelmää kokeillaan jatkuvasti saada toimimaan uusilla lajeilla ja lajeilla, joilla se jo toimii, voidaan keskittyä optimoimaan ratkaisuja (Taning ym., 2017). Menetelmällä voidaan myös tulevaisuudessa ratkoa globaalistikin tärkeitä ongelmia, kuten löytää ratkaisuja, joilla auttaa hyönteislevitteisistä vektorisairauksista kärsiviä (Nateghi Rostami, 2020). Myös muuten hyönteistutkimuksen avulla voidaan tulevaisuudessa saada merkittävää tietoa evolutiivisesti tärkeistä asioista. Kuten tutkia hyönteisten evolutiivista historiaa, lajiutumista ja geenien välisiä yhteyksiä. Vaikka menetelmän täydellisen soveltamisen tiellä onkin vielä esteitä, voidaan sanoa, että CRISPR/Cas9-menetelmä on tullut jäädäkseen.

LÄHTEET

- Allen, F. (2018). Predicting the mutations generated by repair of Cas9-induced double-strand breaks. *Nature Biotechnology*, 37(1), 64-72. doi:10.1038/nbt.4317
- Barrangou, R. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (American Association for the Advancement of Science)*, 315(5819), 1709-1712. doi:10.1126/science.1138140
- Bassett, A. R., & Liu, J. (2014). CRISPR/Cas9 and genome editing in drosophila. *Journal of Genetics and Genomics*, 41(1), 7-19. doi:https://doi-org.pc124152.oulu.fi:9443/10.1016/j.jgg.2013.12.004
- Billon, P. (2017). CRISPR-mediated base editing enables efficient disruption of eukaryotic genes through induction of STOP codons. *Molecular Cell*, 67(6), 1068-1079.e4. doi:10.1016/j.molcel.2017.08.008
- Clement, K., Hsu, J. Y., Canver, M. C., Joung, J. K., & Pinello, L. (2020). Technologies and computational analysis strategies for CRISPR applications. *Molecular Cell*, 79(1), 11-29. doi:https://doi-org.pc124152.oulu.fi:9443/10.1016/j.molcel.2020.06.012
- Cong, L. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/cas systems. *Science (American Association for the Advancement of Science)*, 339(6121), 819-823. doi:10.1126/science.1231143
- Gratz, S. J., Cummings, A. M., Nguyen, J. N., Hamm, D. C., Donohue, L. K., Harrison, M. M., . . . O'connor-Giles, K. M. (2013). Genome engineering of drosophila with the CRISPR

- RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics*, 194(4), 1029-1035.
doi:10.1534/genetics.113.152710
- Hammond, A. (2015). A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nature Biotechnology*, 34(1), 78-83.
doi:10.1038/nbt.3439
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278. doi:https://doi-org.pc124152.oulu.fi:9443/10.1016/j.cell.2014.05.010
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakamura, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429-5433. doi:10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987
- Jiang, W. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-cas systems. *Nature Biotechnology*, 31(3), 233-239. doi:10.1038/nbt.2508
- Jinek, M. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (American Association for the Advancement of Science)*, 337(6096), 816-821. doi:10.1126/science.1225829
- Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., Ma, E., . . . Doudna, J. A. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 343(6176) doi:10.1126/science.1247997
- Kohno, H., Suenami, S., Takeuchi, H., Sasaki, T., & Kubo, T. (2016). Production of knockout mutants by CRISPR/Cas9 in the European honeybee, *Apis mellifera* L. *Zoological Science*, 33(5), 505-512. doi:10.2108/zs160043
- Mali, P., Aach, J., Stranges, P. B., Esvelt, K. M., Moosburner, M., Kosuri, S., . . . Church, G. M. (2013). CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature Biotechnology*, 31(9), 833-838.
doi:10.1038/nbt.2675
- Nateghi Rostami, M. (2020). CRISPR/Cas9 gene drive technology to control transmission of vector-borne parasitic infections. *Parasite Immunology*, 42(9), e12762.
doi:10.1111/pim.12762
- O'Geen, H., Yu, A. S., & Segal, D. J. (2015). How specific is CRISPR/Cas9 really? *Current Opinion in Chemical Biology*, 29, 72-78. doi:https://doi-org.pc124152.oulu.fi:9443/10.1016/j.cbpa.2015.10.001

- Pattanayak, V., Lin, S., Guilinger, J. P., Ma, E., Doudna, J. A., & Liu, D. R. (2013). High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nature Biotechnology*, 31(9), 839-843. doi:10.1038/nbt.2673
- Sander, J. D., & Joung, J. K. (2014). CRISPR-cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, 32(4), 347-355. doi:10.1038/nbt.2842
- Song, J. (2016). RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. *Nature Communications*, 7(1), 10548. doi:10.1038/ncomms10548
- Taning, C. N. T., Van Eynde, B., Yu, N., Ma, S., & Smagghe, G. (2017). CRISPR/Cas9 in insects: Applications, best practices and biosafety concerns. *Journal of Insect Physiology*, 98, 245-257. doi:https://doi-org.pc124152.oulu.fi:9443/10.1016/j.jinsphys.2017.01.007
- Vouillot, L. (2015). Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3 (Bethesda, Md.)*, 5(3), 407-415. doi:10.1534/g3.114.015834
- Zhang, J., Adikaram, P., Pandey, M., Genis, A., & Simonds, W. F. (2016). Optimization of genome editing through CRISPR-Cas9 engineering. *Null*, 7(3), 166-174. doi:10.1080/21655979.2016.1189039