

Geenien muokkaus uusilla tekniikoilla

Kasvit, eläimet, mikrobit



Julkaisun on toimittanut biotekniikan neuvottelukunta (BTNK)

Kirjoittajat:

Marko Ahteensuu, Tampereen yliopisto

Mikaela Grönholm, Helsingin yliopisto

Vesa Joutsjoki, Luonnonvarakeskus

Jussi Jäntti, Teknologian tutkimuskeskus VTT

Katileena Lohtander-Buckbee, Suomen ympäristökeskus SYKE

Anneli Ritala-Nurmi, Teknologian tutkimuskeskus VTT

Marja Ruohonen-Lehto, Suomen ympäristökeskus SYKE

Helena Siipi, Turun yliopisto

Teemu Teeri, Helsingin yliopisto

Julkaisua saa kopioida ja levittää esimerkiksi opetus- ja muissa vastaavissa ei-kaupallisisissa tarkoituksissa. Tällöin on kuitenkin mainittava lähde. Suositeltava lähdemerkintä on ”Biotekniikan neuvottelukunta, Geenien muokkaus uusilla tekniikoilla, 2018, Helsinki.”

Julkaisu on saatavissa sähköisesti osoitteessa <http://www.btnk.fi> ja tilattavissa painettuna biotekniikan neuvottelukunnan sihteeriltä (info@btnk.fi).

Biotekniikan neuvottelukunta on valtioneuvoston asettama neuvoa-antava asiantuntijaelin bio- ja geenitekniikkaan liittyvissä kysymyksissä.

Kannen kuva: 3DConcepts/Shutterstock

Kuva sivulla 15: science photo/Shutterstock

BTNK:n julkaisu 8 (2018)

ISBN: 978-952-00-4014-7 (painettu)

ISBN: 978-952-00-4015-4 (PDF)

Taitto ja Painatus:

Unigrafia

Helsinki 2018

SISÄLLYS

Sisällys	3
1 Alkusanat	4
2 Tekniikat	5
2.1 Ohjelmoitavat nukleasit, Crispr/Cas9	5
2.2 Geeniajurit.....	8
3 Esimerkit	9
3.1 Kasvit	9
3.2 Malariahyttysen torjunta geeniajurin avulla	12
3.3 Mikrobin genomieditointi	13
3.4 CRISPR/Cas9-menetelmien käyttö Suomessa.....	13
4 Yhteenveto	16
4.1 Ympäristö	16
4.2 Maatalous	16
4.3 Etiikka.....	17
4.4 Lainsäädäntö.....	19
Kirjallisuus	22

1 ALKUSANAT

CRISPR/Cas9 teknologian soveltaminen genomieditointiin on saanut valtavasti huomiota ja sitä on pidetty mullistavana teknologiana, jonka vaikutukset ja mahdollisuudet ovat paljon laajemmat kuin perinteisten geenimuuntelumenetelmien. Tässä julkaisussa, joka on valmisteltu geeniteknikan lautakunnan pyynnöstä keväällä 2018 valmistuneen muistion pohjalta, selvitetään esimerkkien avulla CRISPR/Cas9 teknologian erilaisia sovelluksia erityisesti kasvinjalostuksessa ja malarian torjunnassa. Mikrobeihin kohdistuvaa genomieditointia sivutaan lyhyesti. CRISPR/Cas9-teknologia mahdollistaa myös populaatioissa itseään levittävien geenielementtien (ns. geeniajurien) rakentamisen. Julkaisussa tarkastellaan myös genomieditointisovellusten suhdetta geeniteknikkalainsäädäntöön. Erityisen ongelman muodosti pitkään se, että oli epäselvää miten EU:n lainsäädäntöä sovelletaan uusiin tekniikoihin, jotka mahdollistavat kohdennetun mutageneesin tavalla, jota ei voi erottaa luonnon mutaatioista. Tilannetta on selkeyttänyt EU-tuomioistuimen (EUT) heinäkuussa 2018 tekemä päätös, jossa se otti kantaa uusien mutageneesitekniikoiden juridiseen asemaan. Biotekniikan neuvottelukunta laatii terveystieteistä erillisen selvityksen.

Helsingissä 7.11.2018

Marko Ahteensuu, Tampereen yliopisto

Mikaela Grönholm, Helsingin yliopisto

Vesa Joutsjoki, Luonnonvarakeskus

Jussi Jäntti, Teknologian tutkimuskeskus VTT

Katilleena Lohtander-Buckbee, Suomen ympäristökeskus SYKE

Anneli Ritala-Nurmi, Teknologian tutkimuskeskus VTT

Marja Ruohonen-Lehto, Suomen ympäristökeskus SYKE

Helena Siipi, Turun yliopisto

Teemu Teeri, Helsingin yliopisto

2 TEKNIIKAT

2.1 Ohjelmoitavat nukleasit, Crispr/Cas9

CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9) on alun perin osa bakteerien ja arkeonien puolustusjärjestelmää viruksia vastaan (Hsu ym. 2014, Barrangou 2015). Menetelmä on nykyään laajassa käytössä sekä aiotumallisten että esitumallisten eliöiden genomien muokkaamisessa. CRISPR/Cas9-menetelmä perustuu tietyn emäsjärjestyksen omaavan DNA-ketjun tunnistamiseen ohjaavan RNA-molekyylin avulla ja siihen liitetyn Cas9-nukleasin kykyyn leikata kaksijuosteista DNA:ta. Käytännössä lähes mitä tahansa kohtaa eliön genomissa voidaan muokata suunnitelmalla sille sopiva ohjaava RNA liitettäväksi Cas9-nukleasiin.

CRISPR/Cas9 teknologia ei sinällään edusta aivan uutta teknologiaa. Sen erityispiirteenä on soveltamisen helppous ja nopeus, joka saattaa teknologian paljon laajemman tiedeyhteisön käyttöön. Teknologian taustalla (niin eläin- kuin kasvipuolella) on ollut tavoite saada aikaan kohdennettu geeninsiirto. Kasveilla yli 30 vuotta käytössä olleella perinteisellä geeninsiirtotekniikalla siirtogeneeni liittyy genomiin sattumanvaraiseen paikkaan, ns. insertiopaikkaan, ja vain osalla siirtogeenisistä linjoista on halutut ominaisuudet esimerkiksi siirretyn geenin toiminnan voimakkuuden ja pysyvyyden kannalta. Käytännössä hyvin toimivat linjat löydetään seulomalla suuri määrä kandidaattilinjoja. Kohdennetulla geeninsiirrolla vältetään insertiopaikkaan liittyvä sattumanvaraisuus.

Kohdennettu geeninsiirto saadaan aikaan, jos kohde (haluttu kohta genomissa) osataan katkaista endonukleasilla, joka katkaisee DNA:n molemmat juosteet. Jo 25 vuotta sitten osoitettiin menetelmän toimivan käyttämällä genomiin perinteisellä tavalla siirrettyä keinotekoisista kohdetta/DNA-aluetta, joka katkaistiin spesifisellä endonukleasilla (meganukleasi I-SceI, Puchta ym. 1993). Varsinainen haaste menetelmän yleiselle käytölle on ollut siinä, miten voitaisiin suunnitella katkaisijaentsyymi genomien ennalta suunniteltuun täysin spesifiseen kohteeseen.

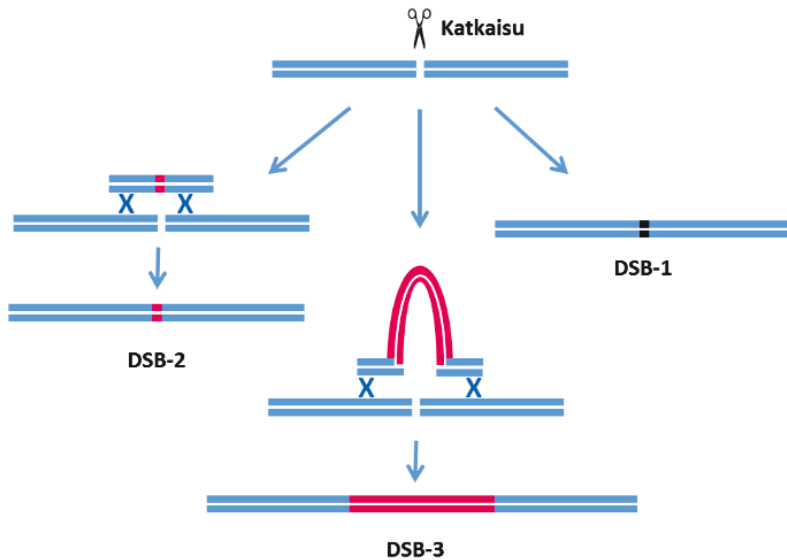
”Meganukleasit”, ”sinkkisorminukleasit” ja ”TALE nukleasit” ovat entsyymejä, joita voidaan proteiiniuokkauksen avulla räätälöidä katkaisemaan ennalta suunniteltu kohdesekvenssi. Näiden entsyymien muokkaaminen vaatii erikoisosaamista, jonka takia vain harvat tutkimusryhmät ovat pystyneet niitä hyödyntämään. Tässä esitetyt sovellustyypit on alun perin osoitettu toimiviksi juuri näiden ensimmäisen polven nukleasien avulla ja monet esimerkit on toteutettu jollakin näistä muokatuista proteiineista. CRISPR/Cas9 teknologian erityisyys on siinä, ettei proteiiniuokkausta tarvita lainkaan, vaan nukleasin spesifisyys saadaan aikaan RNA-molekyylillä, jonka valmistaminen tiettyyn kohteeseen

on yksinkertainen, nopea ja kustannuksiltaan halpa prosessi. Yhteisnimityksenä kaikille voidaan käyttää termiä ”ohjelmoitava nukleaasi” (programmable nuclease).

Teknologian ydin on genomien DNA:n molempien juosteiden katkaisu, DSB (double stranded break, Kuva 1). Monet luonnolliset prosessit, kuten ionisoiva radioaktiivinen (tausta)säteily, aiheuttavat DSB-vaurioita, jotka solun korjausjärjestelmä osaa korjata. Jos DNA juosteiden päät yksinkertaisesti liitetään takaisin yhteen, puhutaan ei-homologisesta liittämisestä, NHEJ (non-homologous end joining). Virheettömässä NHEJ prosessissa korjattu kohdesekvenssi on altis uudelle katkaisulle, mutta korjauksessa tapahtuu myös virheitä. Niinpä yksinkertaisin lopputulos ohjelmoitavan nukleaasin käytöstä on kohdesekvenssin mutaatio, useimmiten lyhyt deleetio tai pieni insertio. Käytännössä kohdegeenin toiminta lakkaa tai heikkenee - samoin tapahtuu suurimmassa osassa kohdegeenin luonnollisia mutaatioita. Tätä sovellusta kutsutaan tyyppin 1 sovellukseksi, DSB-1.

DSB on substraatti myös homologiselle rekombinaatiolle. Homologisessa rekombinaatiossa katkennut DNA-juoste korjataan mallin mukaan, esimerkiksi diploidin organismin ehjän vastinalleelin perusteella. Tällaisessa tapauksessa puhutaan geenikonversiosta, mutta DSB on myös meioosissa tapahtuvan tekijäinvaihduntaprosessin ensimmäinen vaihe. Jos siis ohjelmoitavan nukleaasin lisäksi soluun siirretään kaksijuosteinen DNA-molekyyli malliksi, saadaan aikaan kohdegeenin konversio mallin mukaiseksi. Tällä tavalla genomiin voidaan ohjata kohdennettu mutaatio, esimerkiksi muuttaa koodattavan proteiinin yksi aminohappo toiseksi ja näin saada ominaisuuksiltaan suunnitellulla tavalla muokattu proteiini. Muutos mallimolekyylyissä voi olla hyvin pieni, pienimmillään vain yksi nukleotidi. Kyseessä on tyyppin 2 sovellus, DSB-2.

Tyyppin 3 sovellukset, DSB-3, perustuvat niin ikään homologiseen rekombinaatioon. Mallisekvenssissä oleva ”muutos” on kuitenkin paljon suurempi ja käsittää kokonaisen toimivan geenikasetin, joka integroituu ohjelmoitavan nukleaasin katkaisemaan kohteeseen. Kyseessä on siis kohdennettu geeninsiirto, tekniikan alkuperäinen tavoite. DSB-2 ja DSB-3 perustuvat samanlaiseen prosessiin ja kohteeseen liitetyn geenijakson pituus voi vaihdella yhdestä tai muutamasta emäksestä (mutaatiosta) useisiin tuhansiin (kokonaiisiin geeneihin). Tyypillisesti DSB-2 tekniikassa muokataan kohdetta ja DSB-3 tekniikassa kohdetta käytetään laskeutumisalustana, mutta on mahdollista kehittää sovelluksia, jotka ovat näiden välillä tai niiden yhdistelmiä.



Kuva 1. Kromosomaalisen DNA:n kaksoisjuosteen katkaisu ohjelmoidulla nukleaaasilla voi johtaa deleetioon (DSB-1) tai jos malli-DNA siirretään samalla soluun, geenikonversioon mallin mukaan (DSB-2 ja DSB-3).

Kohdennetut pistemutaatiot eivät myöskään ole luonnolle uusia. DNA:n replikaatiossa toimiva DNA-polymeraasi tekee virheitä taajuudella 10^{-9} , toisin sanoen yksi emäs miljardista on muuttunut toiseksi. Näin ollen tarvitaan noin miljardi yksilöä, jotta minkä tahansa etukäteen valitun emäksen kohdalla olisi löydettävissä mutaatio. Miljardi ohran- tai vehnänjyvää voidaan Suomessa korjata alle 10 hehtaarin pellolta. Luonnollisen disruptiivisen geenimutaation frekvenssi on moninkertainen tähän verrattuna, koska se voi tapahtua monessa kohtaa geeniä.

Ohjelmoitavat nukleaaasit voivat katkaista myös suunnitellun kohdesekvenssin kaltaisia sekvenssejä muualla genomissa, ns. ”off-target” kohteita, joihin syntyy myös deleetioita tai insertioita. ”Off-target” tapahtumien hallinta on tärkeä osa genomieditoinnin menetelmäkehitystä ja niiden yleisyyteen voidaan vaikuttaa suunnittelemalla kohde/haluttu katkaisukohta huolella, olettaen että kohdeorganismien koko genomisekvenssi tunnetaan. Myös ohjelmoitavien nukleaaasien suunnittelulla ja valinnalla voidaan vaikuttaa ”off-target” frekvensseihin. ”Off-target” tapahtumat ovat suuri ongelma geeniterapiassa, mutta kasvinjalostukseen sovellettuna niitä ei pidetä kovin vaikeina hallita. ”Off-target” mutaatiot ovat luonteeltaan samanlaisia kuin sattumanvaraiset luonnonmutaatiot (yleensä disruptiivisia) ja niistä päästään takaisinristeyttämällä helposti eroon, aivan kuin perinteisessä jalostuksessa syntyvistä haitallisista ”off-mutaatioista”.

2.2 Geeniajurit

CRISPR/Cas9-menetelmää voidaan käyttää muun geenieditoinnin lisäksi geeniajurien (gene drive) valmistamiseen suvullisesti lisääntyville eliöille. CRISPR/Cas9-menetelmää käytettäessä eliön genomiin siirretään geeniajurin keskeiset osat. Ohjelmoitavaa nukleaaasia koodaavan geenin ympärille liitetään ohjelmoidun katkaisukohtaan oikean- ja vasemmanpuoleinen DNA-jakso rekombinaatiomalliksi. Kasettiin voidaan liittää myös geeniyhdistelmä, jonka toivotaan yleistyvän populaatiossa. Hedelmöityksessä tämä ajurin osat sisältävä juoste kopioi itsensä toiselta vanhemmalta perittyyn vastinalleeliin. Käytännössä tämä tapahtuu niin, että ohjaava RNA tunnistaa toiselta vanhemmalta perityn alleelin ja Cas9-nukleasi katkaisee sen. Tämän jälkeen solu korjaa katkaistun juosteen CRISPR/Cas9-kompleksin sisältämän DNA-mallin mukaan. Toisin sanoen, muutettu, ajurin sisältävä juoste korjaa aina muuttamattoman villityypin alleelin kaltaiseksi ja heterotsygoottisesta yksilöstä tulee homotsygoottinen ajurikasetin suhteen. Geeni päättyy jokaiseen jälkeläiseen ja kaikkiin näidenkin jälkeläisiin. Geenijureita (ns. itsekkäitä geneielementtejä) esiintyy myös luonnossa ja niitä on mahdollista tehdä myös ilman CRISPR/Cas9-tekniikkaa, mutta ei yhtä helposti (Burt 2003).

Geeniajuri lisää todennäköisyyttä sille, että tietty geenimuoto periytyy jälkeläisille (luonnossa periytymisen todennäköisyys on 50 %) ja pystyy siten leviämään myös valintapainetta vastaan. Geeniajuri esiintyy usean sukupolven päästä populaation lähes jokaisessa yksilössä. Ajurin toimintamekanismi perustuu joko halutun geenimuodon kopioitumiseen vastinkromosomissa tai villityypin geenimuodon omaavan sukusolun heikentyneeseen elinkelpoisuuteen (Champer ym. 2016). Geenijurien avulla voidaan joko nopeuttaa tietyn geneettisen ominaisuuden leviämistä populaatiossa ja/tai pienentää tai kokonaan hävittää kohdepopulaatioita tai peräti kokonaisia lajeja (ks. esim. Champer ym. 2016). Tähän voi riittää hyvin pieni määrä muokattuja yksilöitä. Menetelmän avulla on siten mahdollista vaikuttaa kokonaisuun ekosysteemeihin.

Geeniajurimenetelmää pidetään lupaavana tekniikkana esim. haitallisten tulokaslajien hävittämisessä ja väli-isäntien avulla leviävien sairauksien, erityisesti malarian, torjunnassa.

3 ESIMERKIT

3.1 Kasvit

Soijaöljyn laatujaostus genomieditoinnilla (DSB-1)

Kertatydyttymättömiä rasvahappoja pidetään ruokavaliossa monitydyttymättömiä ja tyydytettyjä rasvahappoja terveellisempinä ja niiden säilyvyys on parempi kuin monitydyttymättömien. Soijaöljyssä on kertatydyttymättömiä rasvahappoja 24 %, kun taas rapsiöljyssä ja oliiviöljyssä niitä on 61 % ja 75 %. Soijaöljyä voidaan muokata katalyyttisesti vedyttämällä (hydraamalla), jolloin kertatydyttymättömien rasvahappojen osuus nousee, mutta prosessissa syntyy myös trans-rasvahappoja, jotka ovat epäterveellisiä. Soijalla *FAD2* geeniperhe (*FATTYACID DESATURASE2*) vastaa monitydyttymättömien rasvahappojen biosynteesistä ja katalysoi kertatydyttymättömän öljyhapon hapettumista monitydyttymättömäksi linolihapoksi. Kaksi geeniperheen jäsentä, *FAD2-1A* ja *FAD2-1B* ilmenevät soijan siemenen täytyessä ja säätelevät öljyhapon määrää siemenissä.

Inaktivoiva mutaatio *FAD2-1A* ja *FAD2-1B* geeneissä yhtä aikaa johtaa haluttuun ominaisuuteen, kohonneeseen öljyhapon pitoisuuteen soijassa. Perinteinen jalostus on pystynyt hyödyntämään tällaisia mutaatioita, mutta mutaatioiden siirtäminen eri olosuhteisiin sopeutuneisiin soijan viljelylajeiksi (risteyttämällä ja takaisinristeyttämällä) on hidas prosessi. Haun ym. (2014) ohjelmoivat proteiiniuokkauksen avulla TALE nukleaasin tunnistamaan soijan *FAD2-1A* ja *FAD2-1B* geenien sekvenssin, testasivat eri versiot hiivassa ja soijan karvajuuriviljelmissä, ja siirsivät parhaiten toimivat ohjelmoidut nukleaasit soijaan perinteisen geeninsiirron avulla. Yhdeksästätoista soijalinjasta neljässä havaittiin suunniteltu mutaatio *FAD2-1A* ja *FAD2-1B* geeneissä lehdistä eristetyssä genomisessa DNA:ssa ja kolmessa linjassa mutaatiot periytyivät jälkeläisille (yhdessä molemmat, kahdessa vain toinen). Molempien mutaatioiden suhteen homotsygoottisissa linjoissa siementen rasvahappopitoisuus oli dramaattisesti muuttunut ja öljyhapon pitoisuus oli noussut 20 %:sta 80 %:iin ja samalla linolihapon pitoisuus oli laskenut 50 %:sta 4 %:iin. Jälkeläiset oli valittu niin, että TALE nukleaasia koodaava siirtogeneeni oli segregoitunut pois. *FAD2-1A* ja *FAD2-1B* geeneissä havaittiin olevan 63 ja 23 emäsparin deleetiot toisessa eksonissa, ohjelmoitujen katkaisukohtien vieressä.

Härmänkestävyys vehnässä (DSB-1)

Blumeria graminis sienen aiheuttama härmä on yleinen viljakasvien tauti. Ohralla tunnetaan kestävä resistenssigeeni härmää vastaan, disruptiivinen mutaatio lokuksessa *Mlo*. Resistenssigeeni on resessiivinen (ilmenee vain homotsygoottisena). Mutaatio on kuvattu ensimmäisen kerran 1940-luvulla ja identifioitu toistuvasti ohran mutageneesiohjelmissa. Vehnän härmän osalta *Mlo* resistenssiä ei ole löydetty. Vehnä on heksaploidi ja sen kaikissa kolmessa kromosmistossa on *Mlo* locus (*TaMLO-A1*, *TaMLO-B1* ja *TaMLO-D1*). Geenit ovat emäsjärjestykseltään 98-99 % identtisiä. Koska resistenssigeeni on resessiivinen, mutaatio tarvitaan kaikissa lokuksissa homotsygoottisena. Wang ym. (2014) käyttivät sekä TALEN että CRISPR/Cas9 teknologiaa ja kohdensivat samanaikaisesti mutaation kaikkiin lokuksiin. Mutaatiot olivat lyhyitä deleetioita, periytyivät jälkeläisille ja kolmoishomotsygootti oli kestävä härmää vastaan.

Vaikka vehnän *mlo*-resistenssiä ei ole identifioitu perinteisen valintajalostuksen aikana (tilastollisista systä), se on hiljattain saatu aikaan tunnistamalla yksittäiset luonnolliset *mlo*-mutaatiot TILLING-tekniikan avulla ja yhdistämällä ne risteyttämällä (Acevedo-Garcia ym. 2017). Lajike on kenttäkoevaiheessa (Ralph Panstruga, RWTH Aachen University, Germany, henkilökohtainen tiedonanto 13.3.2018).

Vahaperunan jalostus (DSB-1)

Kasvien tärkkelys on glukoosipolymeeri ja koostuu kahdenlaisista molekyyleistä, lineaarisesta (haarautumattomasta) amyloosista ja haarautuvasta amylopektiinistä. Pelkästä amylopektiinistä koostuvalla tärkkelyksellä on sovelluksia paperi- ja elintarviketeollisuudessa ja tällaisia ”vaha” (waxy) lajikkeita tunnetaan mm. maissista. Kyseessä on disruptiivinen mutaatio yhdenlaisessa tärkkelyssyntaasia (GBSS) koodaavassa geenissä.

Myös perunan kohdalla vahalinjoille olisi sovelluksia. Perunan luonnollisia vahalinjoja ei tunneta, mutta säteilyttämällä sellaisia on saatu aikaan (Hovenkamp-Hermelink ym. 1987) ja geeninsiirtotekniikoiden avulla on osoitettu, että hiljentämällä perunan *GBSS1* geeni antisense- tai RNAi-tekniikalla saadaan aikaan tavoiteltu vahaperuna (Kuipers ym. 1994, Andersson ym. 2003). Andersson ym. (2017) käyttivät kohdennettua DSB-1 mutageneesiä CRISPR/Cas9 avulla saman lopputuloksen kehittämiseen.

Torjunta-ainekestävä tupakka (DSB-2)

Tyyppin 2 sovelluksessa käytetään ohjelmoitavan nukleaaasin lisäksi mallisekvenssiä, jonka mukaan kohde korjataan geenikonversiolla ja saadaan aikaan kohdennettu (piste)mutaatio. Teknologian kannalta DSB-2 muistuttaa DSB-3 tekniikkaa, mutta lopputuloksen osalta DSB-1 sovelluksia siinä mielessä, että vastaava pistemutaatio syntyy helposti myös itsestään.

Townsend ym. (2009) on ensimmäisiä raportteja, missä ohjelmoitavia nukleaseja ylipäätään käytettiin kasveilla. Kohdegeeninä oli tupakan asetolaktaattisyntaasia koodaavat geenit *SuRA* ja *SuRB*. Näiden geenien tiettyjen mutanttimuotojen tiedetään johtavan imidazoloni- ja sulfonyyliureaherbisidi-kestävyyteen ja mallisekvenssejä käyttäen saatiin aikaan kohdennettuja mutaatioita näihin geeneihin, jotka johtivat herbisidiresistenssiin.

Kohdennettu geeninsiirto (DSB-3)

Tyyppin 3 sovellus on kohdennettu geeninsiirto. Edellä mainitun Townsend ym. (2009) työn ohella DSB-tekniikan ensimmäiset esimerkit kasveilla kuuluvat tähän ryhmään. Shukla ym. (2009) käyttivät ohjelmoitua sinkkisorminukleasia kohdentamaan herbisidiresistenssigeenin haluamaansa genomiseen lokukseen maississa. Shuklan ja kollegoiden kohdelokus oli maissin *IPK1* geeni, joka koodaa fytaatin biosynteesin viimeisessä vaiheessa tarvittavaa entsyymiä. Fytaatti on siemenen fosforivarasto, jota eläimet eivät pysty hyödyntämään ja siten fytaatin fosfori päätyy kuormittamaan ympäristöä. Työssä oli siis tarkoitus samanaikaisesti kehittää herbisidinkestävä maissi ja vähentää maissin jyvän fytaattipitoisuutta kohdennetulla (insertio)mutaganeesilla.

Kohdennetun geeninsiirron tavoite on saada siirtogeeni liittymään eri kerroilla samaan lokukseen, jolloin insertiokohdan vaikutuksista saatuja tuloksia voidaan soveltaa yleisemmin. Tavoitteena on löytää ”laskeutumisalustoja” siirtogeeneille, joissa geeni toimii stabiilisti halutulla tavalla sukupolvesta toiseen ja joiden kohdalla ei ilmene haitallisia sivuvaikutuksia. Kohde voi sinänsä olla toimiva geeni, kuten edellä olevassa fytaattitapauksessa. Käytännössä toimivia vakioituja insertiokohtia ei toistaiseksi ole kuvattu millään viljelykasvilajilla, vaikka asiaa on kirjallisuudessa pohdittu (esim. Cantos ym. 2014). Käyttäen keinotekoisia kohdetta ja CRISPR/Cas9 tekniologiaa Jiang ym. (2013) saivat aikaan kohdennetun geeninsiirron lituruohon, tupakan, durran ja riisin genomiin.

Toinen tärkeä sovellus on siirtogeenien ”pinoaminen”. Perinteisillä tekniikoilla aikaansaaduilla GMO-lajikkeilla joihin on siirretty useampi ominaisuus, nämä ovat eri lokuksissa ja periytyvät toisistaan riippumattomasti. Ensimmäisen siirtogeenin yhteyteen voidaan sisällyttää laskeutumisalusta seuraavaa geeniä varten (Ainley ym. 2013). Koska alusta on synteettinen, voidaan se optimoida hyvin.

3.2 Malariahyttöksen torjunta geeniajurin avulla

Malariaa levittävät *Anopheles gambiae* ja *A. stephensi* -lajien naarashyttöset (Champer ym. 2016). Malarian torjuntaan on suunniteltu erilaisia geeniajuripohjaisia ratkaisuja. Hammond ym. (2016) tuottivat CRISPR/Cas9-muunnetun, pelkästään koiraspuolisia jälkeläisiä tuottavan naaraslinjan. Tutkijat kehittivät geeniajurin, joka häiritsee naarashyttöksen fertiiliteetille tärkeän geenin (*AGAP007280*) toimintaa. Laboratoriokokeissa geeniajurin sisältävää alleelia löytyi 71,5 % hyttöspopulaatiosta neljän sukupolven jälkeen.

Gantz ym. (2015) on puolestaan tuottanut CRISPR/Cas9-menetelmän avulla hyttöslinjan, jonka kestävyttä malarialoiselle (*Plasmodium falciparum*) on parannettu. Geeniajurikonstruktiin on liitetty malarialoisen tiettyihin proteiineihin kohdistuvia vasta-aineita (m1C3 ja m2A19) ilmentävä antiparasiittinen efektorigeeni. Vasta-aineita tuottavien täysikasvuisten hyttösnaraiden sylkirauhasista ei tavattu malarialoisen sporozooiitteja (tartuttava vaihe). Vasta-ainegeeni periytyi CRISPR/Cas9-muunnettujen hyttösten jälkeläisille 99,5 % todennäköisyydellä (Gantz ym. 2015).

Geeniajurilliset sovellukset eivät ole vielä valmiita käytettäväksi. Useissa tutkimuksissa on havaittu, että populaation resistenssi geeniajurille voi kehittyä nopeasti eivätkä sovellukset ole aina vakaita. Geeniajurien käyttöä sairauksien torjunnassa rajoittavat niiden mahdollisten laajamittaisten ja peruuttamattomien ekologisten vaikutusten lisäksi itse tekniikan heikkoudet (resistenssin kehittyminen, konstruktioiden epävakaus) (Oye ym. 2014).

Muita menetelmiä, joiden avulla on mahdollista, joskin vaikeaa, saada keinotekoisesti aikaan geeniajureita, ovat mm. itseohjautuvat (homing) endonukleasigeenit (Burt 2003), mikäli näihin saadaan liitettyä tietyn DNA-jakson tunnistava elementti (mm. TALENeja ja sinkkisormia on käytetty tässä yhteydessä). CRISPR/Cas9-mekanismiin RNA-ohjaus on kuitenkin huomattavasti helpompi ja tehokkaampi tapa tuottaa geeniajureita (Hammond ym. 2016).

Vastaavia, hyttösvälitteisten sairauksien torjuntaan suunnattuja keinoja on toteutettu myös muiden menetelmien avulla. Esimerkiksi britannialaisyritys Oxitec kasvattaa ”perinteisiä” geenimuunneltuja *Aedes aegypti* hyttösiä Brasiliassa. Kun muunnetut koirashyttöset parittelevat luonnossa elävien villityypin naaraiden kanssa, tuloksena on nuorena kuolevia jälkeläisiä. Aiemmissa kenttäkokeissa menetelmän avulla on saatu hyttöskantaa pienennettyä jopa 90 %.

Tässä sovelluksessa geenimuunneltuja hyttösiä tulee kuitenkin vapauttaa luontoon valtavia määriä, kun taas geeniajurin kohdalla pieni määrä riittää koko populaation hävittämiseen/ muuttamiseen. Tulos voi lisäksi olla väliaikainen kun muualta tulleet yksilöt rakentavat populaation uudelleen.

3.3 Mikrobin genomieditointi

Mikrobien osalta genomimuokkauksessa on parhaiten tunnettujen malliorganismien kuten *Escherichia coli* bakteerilla ja *Saccharomyces cerevisiae* hiivalla ollut jo vuosikausia käytössä laaja kirjo teknologioita (esim. lambda red rekombinaasiproteiinit *E. coli*ssa ja erittäin tehokas homologisen rekombinaation hyväksikäyttö *S. cerevisiaessa*), joiden avulla niiden genomia on kyetty muokkaamaan kohdennetusti ja täsmällisesti. CRISPR/Cas9-teknologia on kuitenkin syrjäyttämässä näissä organismeissa aiemmin käytetyt menetelmät (Donohoue ym. 2018). Useimmissa tapauksissa tämä johtuu teknologian helppokäyttöisyydestä ja erityisesti siitä että sen avulla kyetään, niin haluttaessa, aikaisempia teknologioita huomattavasti tehokkaammin aikaansaamaan samanaikaisesti useita kohdennettuja genomimuokkauksia.

Edellä mainittujen organismien lisäksi CRISPR/Cas9-teknologian on osoitettu toimivan tehokkaasti hyvin erityyppisissä bakteereissa ja hiivoissa sekä filamenttisissa homeissa. Erotuksena aiemmin kehitetyille genomimuokkausmenetelmille, CRISPR/Cas9-teknologian osalta on jo olemassa esimerkkejä siitä, että genomimuokkausta voidaan tehdä siirtäen soluihin pelkästään Cas9 proteiinia ja ohjaavia RNA molekyylejä ja haluttaessa genomiin vietävää DNA:ta (esim. Liang ym. 2015). Tämän kaltainen lähestymistapa mahdollistaa lähitulevaisuudessa myös sellaisten mikrobien ja muiden organismien genomimuokkauksen, joille ei ole olemassa plasmideihin perustuvaa yhdistelmänukleinihappoteknologiaa.

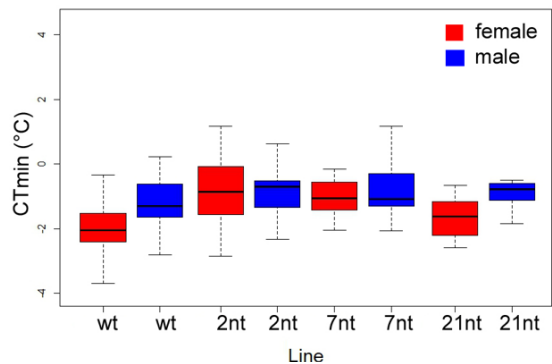
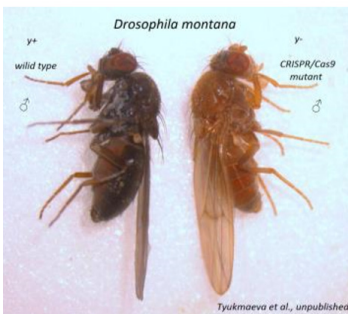
On oletettavaa, että sekä tutkijat että kaupalliset toimijat (huolimatta CRISPR/Cas9-teknologian epäselvästä patenttitilanteesta) käyttävät mielenkiinnon kohteena olevan organisminsa muokkaukseen ensisijaisesti CRISPR/Cas9-teknologiaa teknologian helppouden ja tehokkuuden takia.

3.4 CRISPR/Cas9-menetelmien käyttö Suomessa

Suomessa CRISPR/Cas9-sovelluksia on käytetty eukaryoottien tutkimuksessa suljetussa käytössä. Tutkimuksissa on käytetty ainakin lituruohoa (*Arabidopsis thaliana*), nisäkäsolulinjoja laboratorio- soluviljelmissä, lohta (*Salmo salar*), mahlakärpystä (*Drosophila* sp.), filamenttihomeetta *Trichoderma reesei* ja *Saccharomyces cerevisiae* hiivaa. Näissä on tehty muutoksia genomiin joko aiheuttamalla geenin toimintaa häiritseviä katkoksia tai vaihtamalla geeni isomman deleetion omaavaan geeniin tai vaihtamalla geeni toisen lajin vastaavaan alleeliin. Lisäksi osassa tutkimuksista käytettiin eri organismista peräisin olevaa merkkigeeniä. Kyseisissä tapauksissa leikkaava nukleaasi on viety soluihin joko RNA- tai proteiinimuodossa, joten se ei integroidu eliöiden genomiin tai eliötä on jatkoristeytetty niin, että menetelmästä jää genomiin ainoastaan haluttu mutaatio.

Drosophila

CRISPR/Cas9-muunnettujen mahlakärpästen (*Drosophila montana* ja *D. flavomontana*) muutokset toteutettiin aiheuttamalla geenin toimintaa häiritseviä katkoksia. Geenin toiminnan häirinnässä Cas9-nukleaasi katkaisee ohjaavan RNA:n tunnistaman geenin kaksoisjuosteen. Solu korjaa katkoksen omalla korjausmekanismillaan (non homologous end-joining; NHEJ). Korjaamisen yhteydessä tapahtuu usein mutaatioita, joissa voi tapahtua yhden tai useamman nukleotidin lisäys tai poisto. Tämä voi lopettaa geenin toiminnan (knock-out) tai häiritä sitä. Koska tumman ruumiinvärin tiedetään vaikuttavan eliöiden lämmönsäätelyyn ja ko. mutaatiot on helppo havaita kärpästen ilmiössä, on tutkimusryhmämme muokannut mahlakärpästen ruumiinväriin vaikuttavia *yellow*- (kuva 1A) ja *ebony*-geenejä. Olemme myös tutkineet *yellow*-geeniin muodostuneiden eripituisten deleetioiden vaikutusta kärpästen kylmänkestävyyteen ja havainneet, että mutaatiolinjat (2 nt, 7 nt ja 21 nt deleetiot *yellow*-geenin ensimmäisessä eksonissa) ovat vähemmän kylmänkestäviä kuin kontrollilinjojen (ei mutaatioita) kärpäset nk. CT_{min} (critical thermal minimum) -kokeella mitattuna (Kuva 1B).



Kuva 1. A) CRISPR/Cas9-geenin editointimenetelmällä muokatut *D. montana* -kärpäset, joista vasemmanpuoleinen on normaalin ruumiinvärin ja oikeanpuoleinen muunnellun keltaisen värin omaava kärpänen. **B)** Eri mutanttityyppien (2, 7 ja 21 emäsparin deleetio *yellow*-geenin ensimmäisessä eksonissa) ja muokkaamattomien kärpästen (villityyppi = wt) erilainen käyttäytyminen kylmäkokeissa (nk. CT_{min}; critical thermal minimum -koe). Mutaatiolinjat kestävät kylmää huomattavasti enemmän kuin kontrollilinjat ($p < 0.001$) mutta eri mutaatiolinjojen välillä ei ole merkitseviä eroja ($p > 0.1$). Valokuva V. Tyukmaeva, kuva J. Mänttari.

Hiivat

CRISPR/Cas9 -tekniikkaa ja automaatiota hyödyntäen VTT:llä on muokattu *Saccharomyces cerevisiae* -hiivan kolmea eri genomista lokusta samanaikaisesti käyttäen luovuttaja-DNA:na synteettisiä promoottoreita, jotka mahdollistavat geenien ilmentämisen hyvin alhaisista asteittain erittäin korkeisiin tasoihin. Luovuttaja-DNA:n kanssa soluihin siirrettiin myös kohdistus-RNA-molekyylejä (gRNA) koodaavat geenit. Hiivasolut oli jo aiemmin muokattu siten että ne ilmensivät Cas9-geeniä. Tämä lähestymistapa mahdollisti sen, että yhdellä solujen muokkauksella saatiin aikaan suuri määrä erilaisia hiivasoluvariantteja, joissa kolmen keskeisen metaboliageenin ilmentymistasot poikkeavat normaaleista tasoista (Kuivanen ym. 2018). Tutkimalla aikaansaatuisten hiivasolujen kykyä tuottaa erilaisia molekyylejä on mahdollista ymmärtää metaboliareittien toimintaa ja niiden säätelyä. Tätä lähestymistapaa käyttäen voidaan myös nopeasti optimoida hiivasoluihin siirretyn entsyymaattisen kohdemolekyylin tuotantoreitin aktiivisuutta esimerkiksi niin että tuotantoreitin toiminta on optimaalista halutuissa tuotanto-olosuhteissa.

CRISPR/Cas9 -teknologiaa on käytetty myös apuna osoitettaessa uudentyyppisen geenisäätelyjärjestelmän toiminta hiivoissa, jotka omaavat teolliseen biotekniikkaan hyvin soveltuvia ominaisuuksia, mutta joita ei ole aiemmin kyetty muokkaamaan perinteisen geenitekniikan menetelmin (Rantasalo ym. 2018). Käyttäen CRISPR/Cas9 -teknologiaa versiona, jossa soluille annetaan gRNA-molekyylin kanssa koeputkessa sitoutettua/yhdistettyä Cas9-proteiinia (erotuksena yleisesti käytettyyn lähestymistapaan, jossa Cas9-proteiinia ilmentetään sitä koodaavasta geenistä), erittäin happamia kasvuolosuhteita kestäviin *Candida apicola* ja *Zygosaccharomyces lentus* -hiivoihin kyettiin siirtämään ennalta suunniteltuun genomiin kohtaan uudenlainen geenien ilmentämisen mahdollistava systeemi. Kyseinen esimerkki osoittaa CRISPR/Cas9 -teknologian käytettävyyden myös mikrobeissa, joita ei ole vielä aiemmin kyetty muokkaamaan täsmällisesti perinteisen geenitekniikan menetelmin. Tämä lähestymistapa mahdollistaa aiemmin vähän käytettyjen mikrobien testaamisen ja käyttöönoton bioteknologisissa sovelluksissa.



4 YHTEENVETO

4.1 Ympäristö

CRISPR/Cas9-sovellusten, myös geeniajurien, riskit arvioidaan käyttäen geenitekniikkalainsäädännön riskinarviointimenetelmiä. Geeniajurit voivat kuitenkin aiheuttaa lisähaasteita riskinarvioinnissa sillä niiden avulla tehdyt populaatiomuutokset voivat olla laajamittaisia ja pysyviä. Todennäköisimpinä riskeinä pidetään tahatonta geeniajurin valmistamista sekä suljetussa käytössä olevien ajurillisten eliöiden tahatonta ympäristöön vapautumista (Westra ym. 2016, Lunshof ja Birnbaum 2017). Mikäli geeniajurin avulla tehty muutos halutaan peruuttaa, se on tehtävä toisen geeniajurin avulla. Muokattua populaatiota ei kuitenkaan enää voida palauttaa alkuperäiseen tilaansa, jossa samasta alleelistä esiintyy useampaa muotoa. Joidenkin artikkelien (esim. de Jong 2017) mukaan olemassa oleva muuntogeenisten eliöiden riskinarviointi voi olla riittävä myös geeniajurillisten eliöiden ympäristövaikutusten arviointiin, mikäli lisäksi riskejä arvioidaan myös mallinnuksen avulla. Hollanti on ensimmäisiä maita, jossa geeniajurit on sisällytetty geenitekniikkalainsäädäntöön (Westra ym. 2016, Lunshof ja Birnbaum 2017). Lain mukaan kaikelle geeniajuria käyttävälle tutkimukselle on haettava lupa ja tutkimus tulee toteuttaa eristystason 4 tiloissa. Korkealle eristystasolle on mahdollista hakea poikkeusta mikäli riskinhallintatoimet ovat riittäviä.

4.2 Maatalous

Elintarviketuotannon tulevaisuutta muovaavat tulevaisuudessa monet globaalit muutokset, kuten kaupungistuminen, digitalisaatio ja ilmastonmuutos. Ilmastonmuutoksen aiheuttamat sään ääri-ilmiöt aiheuttavat haasteita alkutuotannolle ja vaikuttavat satomääriin. Globaalit markkinat ja lisääntynyt matkustelu lisäävät riskejä eläin- ja kasvitautien leviämiseksi uusille alueille. Nopeasti muuttuvassa ympäristössä joustava sopeutumiskyky uusiin olosuhteisiin on avainasemassa ruokajärjestelmän toimivuuden ja turvallisuuden varmistamisessa. Fossiilisesta taloudesta bio- ja kiertotalouteen siirtymisessä elintarvikkeiden alkutuotannolla on tärkeä rooli. Muuttuvassa ympäristössä ja globaalien väestönkasvun paineessa elintarviketuotannolta vaaditaan sekä kasvavaa tuottavuutta että toisaalta tuotannon kestävyydelle asetettujen, yhä kiristyvien tavoitteiden toteuttamista. Sadon määrän ja satovarmuuden parantamisen lisäksi uusia haasteita liittyy erityisesti veden ja ravinteiden

käytön optimointiin, tauti- ja tuholaiskestävyyteen sekä maatalouskemikaalien aiheuttaman ympäristökuorman hallintaan. Kokonaistavoitteena on edelleen terveellisen ja turvallisen ravinnon tuottaminen, tämä on myös kotimaisen maatalous- ja elintarviketuotannon kilpailukyvyyn säilyttämisen perusta nopeassa muutosvaiheessa olevassa toimintaympäristössä.

Uuteen genomipohjaiseen tietotaitoon perustuva tutkimus- ja kehitystyö tarjoaa mahdollisuuksia edistää ja luoda uusia toimintaedellytyksiä niin maa- kuin metsätaloudessakin. Tulevaisuudessa keskeisten viljelykasvilajikkeiden satoisuutta ja ekologista sietokykyä on parannettava, erityisesti taudin- ja tuholaiskestävyys sekä mahdollisesti tulvan ja kuivuuden sietokyky ovat keskeisissä rooleissa ruokaturvan varmistamiseksi. CRISPR/Cas9 menetelmä sovelluksineen avaa uusia käytäntöjä viljelykasvien tuottavuuden parantamiseksi, mikä tehostaa viljelymaan käyttöä ja vähentää siten uusien luonnonympäristöjen raivaamista maatalouskäyttöön kestävä kehityksen periaatteiden mukaisesti. Menetelmiä tulee kuitenkin soveltaa hallitusti, lähtökohtana elintarviketuotannon eri tuotantosuuntien elinvoimaisuus, luonnonvarojen kestävä käyttö sekä tuotteiden turvallisuus ja korkea laatu.

4.3 Etiikka

Monet CRISPR/Cas9-menetelmää koskevat eettiset kysymykset liittyvät niiden riskiarviointiin, -hallintaan ja -viestintään. Riskiarviointiin liittyvät normatiiviset ennakkooletukset ja -sitoumukset ovat usein jääneet vähälle huomiolle. Esimerkiksi se, mikä ylipäänsä katsotaan riskiksi (siis mahdolliseksi ei-toivotuksi seuraukseksi), ei ole pelkästään tieteellinen kysymys. Samoin riskiarvioinnin menetelmiin ja laajuuteen liittyy valintoja: arvioidaanko menetelmää ensisijaisesti ekologisesta, terveydellisestä vai muusta näkökulmasta, ja miten nämä arviot yhdistetään (vrt. malariahyttysten torjunta geeniajurin avulla)?

Erityisesti geeniajurit tuovat mukanaan sellaisia riskejä, joita ei perinteiseen muuntogeenitekniikkaan sisälly. Sen osoittaminen, että jonkin tekniikan käyttöönotolla saattaa olla jokin ei-toivottu seuraus, ei kuitenkaan sinällään ole kovin vahva argumentti tuota tekniikkaa vastaan. Perinteisesti on ajateltu, että lisäksi on myös punnittava mahdollisten ei-toivottujen seurausten todennäköisyyttä ja sitä, kuinka suuresta haitasta on kyse. Tällainen kaksikulotteinen riskikäsitys on humanistis-yhteiskuntatieteellisessä tutkimuksessa kyseenalaistettu riittämättömänä.

Nykyinen geenitekniikkalaki (377/1995) edellyttää muuntogeenisten organismien mahdollisten riskien kartoittamista. Eettisestä näkökulmasta keskeistä eivät kuitenkaan ole yksinomaan riskit vaan myös se, mikä on mahdollisen haitan suhde saavutettaviin hyötyihin. Tällöin keskeiseksi eettiseksi kysymykseksi nousee, millaiset hyödyt oikeuttavat riskien ottamisen (vrt. torjunta-ainekestävä tupakka). Eettisesti merkityksellistä on myös,

keneen mahdolliset riskit ja hyödyt kohdistuvat. Lähtökohtaisesti tilanne, jossa riskit koituvat heikossa asemassa oleville (esimerkiksi kehittyvien maiden köyhille pienviljelijöille) ja hyödyt niille, joiden asema on jo valmiiksi vahva (esimerkiksi länsimaiden ylemmälle keskiluokalle), on eettisesti ongelmallinen.

Mahdollisten riskien ja hyötyjen vuoksi on tärkeää, että CRISPR/Cas9-menetelmästä käydään avointa keskustelua ja että sen käyttöä säädelään ja valvotaan. Se, että CRISPR/Cas9:n oikeudellinen asema on pitkään ollut epäselvä, on eettisesti ongelmallista. Juridinen epävarmuus hidastaa tutkimusta ja tuotekehitystä ja siten CRISPR/Cas9-sovellusten hyötyjen saavuttamista. Tilanne myös asetti eri teknologioiden hyödyntäjät keskenään eriarvoiseen asemaan, kun CRISPR/Cas9-säätelyn tulevaisuuden näkymät olivat epävarmat.

Näkemyksemme mukaan kysymys siitä, onko CRISPR/Cas9-menetelmän käyttö yleisesti ottaen eettisesti hyväksyttävää, ei ole kovinkaan mielekäs eettisestä näkökulmasta. Hyviä eettisiä perusteita CRISPR/Cas9-menetelmän yleiselle kiellolle on vaikea löytää, kun esimerkiksi muuntogeenitekniikoita koskevassa keskustelussa on jo osoitettu, etteivät jumalan leikkimiseen ja luonnollisuuteen vetoavat argumentit yksinään riitä perusteeksi. Samaan aikaan on selvää, että CRISPR/Cas9-menetelmää olisi mahdollista hyödyntää eettisesti tuomittavalla tavalla esimerkiksi biologiseen sodankäyntiin. Yhtä ilmeistä on, että CRISPR/Cas9:lla voidaan saada aikaan paljon hyvää. CRISPR/Cas9-menetelmän etiikka onkin järkevää nähdä ennen kaikkea tapauskohtaisena harkintana ja keskusteluna. Eettisen harkinnan tapauskohtaisuus ei tarkoita toimimista perusteettomasti tai sattumanvaraisesti.

Yleisellä tasolla tarvitaan eettistä keskustelua siitä, milloin ja millä ehdoin CRISPR/Cas9:n käyttö on hyväksyttävää. Edellä esitellyistä sovelluksista voidaan kysyä, mitä arvoja ne palvelevat. Edistääkö tarkasteltava sovellus tasa-arvoa tai globaalia oikeudenmukaisuutta vai pitääkö se yllä eriarvoisuutta? Millaista käsitystä hyvästä ympäristöstä se palvelee? Mikä on teknologisen sovelluksen vaikutus ihmisten itsemääräämisoikeuteen?

Itsemääräämisoikeuteen liittyy kysymys merkintävelvoitteesta. EU:ssa muuntogeenisistä ainesosista pitää olla merkintä elintarvikkeiden pakkausselosteissa, mutta lääkkeiden muuntogeenisyydestä ei tarvitse kuluttajille kertoa. Merkintävelvoite ei tarkoita, että muuntogeenisyyteen liittyy erityisiä riskejä. Sen sijaan merkintävelvoite palvelee kuluttajien oikeutta heitä kiinnostavan tiedon saantiin. Tiedonsaantinäkökulmasta voidaankin mielekkäästi kysyä, tulisiko merkintävelvoitetta toteuttaa myös niiden Crispr/Cas9 -sovellusten kohdalla, joissa tuotteeseen ei jää vierasta DNA:ta, riippumatta niiden lainsäädännöllisestä statuksesta. Toisaalta CRISPR/Cas9:n käyttöä ei voida aina tuotteesta jäljittää, ainakaan perinteisten jäljitysmenetelmien avulla. Onko järkevää asettaa merkintävelvoitetta, jos sen noudattamista ei käytännössä voida tuotteita testaamalla valvoa?

4.4 Lainsäädäntö

EU-tuomioistuin (EUT) teki 25.7.2018 Ranskan Conseil d'État'n (ylin hallintotuomioistuin) jättämän, 17.10.2016 kirjatun ennakkoratkaisupyynnön johdosta päätöksen, jossa se otti kantaa uusien mutageneesitekniikoiden juridiseen asemaan. Päätöksen perusteella direktiivin 2001/18/EY 2 artiklan 2 kohtaa on tulkittava siten, että mutageneesitekniikoilla valmistetut organismit ovat direktiivissä tarkoitettuja geneettisesti muunnettuja organismeja (GMO). Päätöksen mukaan direktiivin 2001/18/EY 3 artiklan 1 kohtaa, luettuna yhdessä direktiivin liitteessä I B olevan 1 kohdan kanssa ja sen johdanto-osan 17 perustelukappaleen valossa, on tulkittava siten, että direktiivin soveltamisalan ulkopuolelle jäävät vain organismit, jotka on valmistettu mutageneesitekniikoilla, joita on käytetty vanhastaan erilaisissa sovelluksissa ja joiden turvallisuudesta on pitkäaikaista kokemusta. Täten uusilla mutageneesitekniikoilla tuotetut organismit kuuluvat tarkoituksellista levittämistä ympäristöön koskevan geenitekniikkadirektiivin 2001/18/EY soveltamisalaan.

Geenitekniikka (yhdistelmä nukleiinihappoteknologia) yhdistää eri eliömuotojen geneejiä tavalla mikä on luonnossa kokonaan uutta. Samalla kun nähtiin geenitekniikan potentiaali tutkimuksissa ja sovelluksissa, tiedeyhteisön aloitteesta riskejä haluttiin tarkastella ja oppia hallitsemaan ennen geenitekniikan laajamittaista soveltamista. Tämän seurauksena EU:ssa geeniteknisesti muunnettuja organismeja (GMO) säännellään erityislainsäädännöllä. Suomessa geenitekniikkalaki astui voimaan vuonna 1995. Lain tavoitteena on edistää geenitekniikan turvallista käyttöä ja kehittymistä ennaltavaraantumisen periaatteen mukaisesti sekä eettisesti hyväksyttävällä tavalla, sekä suojella ihmisen ja eläinten terveyttä ja ympäristöä, kun muuntogeenisiä organismeja käytetään suljetussa tilassa tai tarkoituksellisesti levitetään ympäristöön (377/1995; 1 §).

Ohjelmoitavien nukleaasien mahdollistama kohdennettu geeninsiirto (DSB-3) ja sen geeniajurisovellus kuuluivat selvästi nykyisen geenitekniikkalain piiriin. Sen sijaan nyky-lainsäädännön perusteella oli vaikeaa päätellä, kuuluivatko pistemutaatioita aiheuttavat editointimenetelmät DSB-1 ja DSB-2 geenitekniikkalainsäädännön soveltamisalaan vai eivät. Nämä tekniikat voivat johtaa niin rajallisiin muutoksiin genomissa, että niitä on mahdollista löytää myös luonnosta. Jos editoinnin työkalut (ohjelmoitu nukleaasi ja mallisekvenssi) ovat toimineet ohimenevästi tai ne on saatu risteyttämällä segregoitumaan pois loppukäyttöön tarkoitetusta genomieditoidusta linjasta, ei ole mitään keinoa erottaa keinollista, eli näiden tekniikoiden avulla aikaansaatuja, mutaatiota luonnollisesta.

Ennen heinäkuuta 2018 EU:ssa tehtiin joitakin maakohtaisia päätöksiä koskien geenieditointimenetelmien sääntelyä. Ruotsi luopui pelkkiä mutaatioita aiheuttavien menetelmien sääntelystä 2015. Päätöksen mukaan CRISPR/Cas9 menetelmällä aiheutetut mutaatiot ovat verrannollisia perinteisillä menetelmillä tehtyihin mutaatioihin silloin kun solun

ei jää vierasta DNA:ta. Vastaava päätös yritettiin tehdä myös Saksassa (ohjaavaa RNA:ta ei pidetty geneettisen materiaalin uutena yhdistelmänä) mutta yritys kaatui kansalais- ja viljelijä järjestöjen vastustuksen takia.

Aiemmin Ruotsi ja Iso-Britannia päättivät, ettei nk. ODM-tekniikalla tuotettu rapsi kuulu geenitekniikkasääntelyn soveltamisalaan. ODM (oligonucleotide directed mutagenesis) on DSB-2 tekniikkaa muistuttava menetelmä, jossa ei kuitenkaan käytetä ohjelmoitavaa nukleaasia. Suomessa päätöksiä tehtiin tapauskohtaisesti. Geenitekniikan lautakunnan enemmistön kantana oli, etteivät CRISPR/Cas9 tekniikoilla aiheutetut pistemutaatiot kuulu geenitekniikkalainsäädännön piiriin silloin kun soluun ei jää vierasta DNA:ta. Toiminnanharjoittajille ilmoitettiin kuitenkin, että tulkinta voi muuttua, mikäli EU-tuomioistuimen päätös sitä edellyttää.

Yhdysvalloissa geenimuunneltujen viljelylajikkeiden sääntelystä vastaava viranomainen USDA (United States Department of Agriculture) ei katso DSB-1 sovellusten kuuluvan sääntelyn piiriin. Edellä mainittu *FAD2-1A/FAD2-1B* editoitu soija on tulossa markkinoille ilman USDA:n sääntelyä. Myös CRISPR/Cas9 editoitujen kuivan- ja suolankestävän soijan, öljypitoisen kitupellavan (*Camelina sativa*) ja vahamaissin (waxy corn) kohdalla USDA on ilmoittanut, ettei se aio niitä säännellä (Walz 2018).

Vahaperunan erilaiset versiot muodostavat lainsäädännön näkökulmasta mielenkiintoisen ryhmän. Ne eivät eroa tosistaan biokemiallisesti, kaikissa *GBSS1* geenin toiminta on estetty, mutta käyttäen erilaisia tekniikoita. BASF sovelsi tavanomaista muuntogeenitekniikkaa (antisense) ja oli viemässä ”Amflora” vahaperunaa Euroopan markkinoille. Vaikka kaupallistamisen lupa lopulta saatiin, BASF vetäytyi hankkeesta poliittisen vastustuksen takia. CRISPR/Cas9 vahaperunan kohdalla epävarmuus lainsäädännössä on ollut este etenemiselle kaupalliseen suuntaan. Markkinoilla on kuitenkin yksi vahaperunalajike, hollantilaisen Averis Seeds yrityksen jalostama ”Eliane”. Lajike on säteilytyksellä aikaansaatu mutaatiojalostuksen tuote, jota geenitekniikan lainsäädäntö ei koske.

Perinteisen kasvinjalostuksen kohdalla laki ei edellytä riskinarviointia lainkaan. Suomi liittyi UPOV-järjestykseen 1993 (The International Union for the Protection of New Varieties of Plants, UPOV), jonka säännösten mukaan lajikkeelle voidaan hakea kasvinjalostajan oikeuksia, jos lajiketta voidaan pitää itsenäisenä. Tämä selvitetään DUS-testillä (Distinctness, Uniformity and Stability), joka edellyttää uuden lajikkeen olevan muista lajikkeista erotettava, yhtenäinen ja pysyvä. Lisäksi uuden lajikkeen tulee täyttää VCU vaatimus (Value for Cultivation or Use). On huomattava, että mitkään näistä uuden lajikkeen ominaisuuksista eivät liity turvallisuuden koskien terveyttä tai ympäristöä. Elintarvikelainsäädäntö toki määrää enimmäispitoisuuksia tietyille haitallisille aineille (mm. glykoalkaloideille perunassa) ja kasvinjalostaja tarkkailee haitta-aineita siitä lähtökohdasta, että uudet lajikkeet soveltuvat markkinoille ja tulevat hyväksytyiksi kasvilajikeluetteloon.

Zetterberg ja Björnberg (2017) kritisoivat EU:n lainsäädäntöä ja toteavat siinä puutteita lain soveltamisalueen epävarmuuden, diskriminaation (samanlaisia perinteisiä lajikkeita ei säännellä), suhteellisuuden (vaatimukset versus riskit) ja mukautuvuuden (uusiin tekniikoihin) suhteen. Muuntogeenitekniikkaan perustuva määritelmä liittyy yhteen sovelluksia, joiden lopputuloksilla (jalostetuilla lajikkeilla) on vähän tai ei lainkaan yhteisiä ominaisuuksia ilmiössä (Tagliabue 2015). Siirtyminen menetelmän laukaisemasta riskinarvioinnista lopputuloksen arviointiin olisi tervetullut täsmennys lainsäädäntöön ja riskinarviointi saataisiin kohdennettua jalostuksen kaikkiin muotoihin yhtäläisellä periaatteella.

KIRJALLISUUS

- Acevedo-Garcia, J., Spencer, D., Thieron, H., Reinstädler, A., Hammond-Kosack, K., Phillips, A. L., & Panstruga, R. (2017). mlo-based powdery mildew resistance in hexaploid bread wheat generated by a non-transgenic TILLING approach. *Plant biotechnology journal*, 15: 367-378.
- Ainley, W. M., Sastry-Dent, L., Welter, M. E., Murray, M. G., Zeitler, B., Amora, R., ... & Simpson, M. A. (2013). Trait stacking via targeted genome editing. *Plant biotechnology journal*, 11: 1126-1134.
- Andersson, M., Trifonova, A., Andersson, A. B., Johansson, M., Bülow, L., & Hofvander, P. (2003). A novel selection system for potato transformation using a mutated AHAS gene. *Plant cell reports*, 22: 261-267.
- Andersson, M., Turesson, H., Nicolia, A., Fält, A. S., Samuelsson, M., & Hofvander, P. (2017). Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant cell reports*, 36: 117-128.
- Barrangou, R. (2015). Diversity of CRISPR-Cas immune systems and molecular machines. *Genome Biology*, 16: 247.
- Burt, A. (2003). Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270: 921-928.
- Cantos, C., Francisco, P., Trijatmiko, K. R., Slamet-Loedin, I., & Chadha-Mohanty, P. K. (2014). Identification of “safe harbor” loci in indica rice genome by harnessing the property of zinc-finger nucleases to induce DNA damage and repair. *Frontiers in plant science*, 5: 302
- Champer, J., Buchman, A. & Akbari, O.S. (2016). Cheating evolution: engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations. *Nature Review Genetics*, 17: 146-159.
- de Jong, T.J. (2017). Gene drives do not always increase in frequency: from genetic models to risk assessment. *J. Consum Prot. Food Saf.* 12: 299-307.
- Donohoue, P.D., Barrangou, R., & May, A.P. (2018). Advances in Industrial Biotechnology Using CRISPR-Cas Systems. *Trends in Biotechnology*, 36:134-146
- Gantz, V. M., Jasinskiene, N., Tatarenkova, O., Fazekas, A., Macias, V. M., Bier, E., & James, A. A. (2015). Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification

of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112: E6736-E6743.

- Hammond, A., Galizi, R., Kyrou, K., Simoni, A., Siniscalchi, C., Katsanos, D., Gribble, M., Baker, D., Marois, E., Russell, S. & Burt, A. (2016). A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nature Biotechnology*: 34, 78-83.
- Haun, W., Coffman, A., Clasen, B. M., Demorest, Z. L., Lowy, A., Ray, E & Mathis, L. (2014). Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant biotechnology journal*, 12: 934-940.
- Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., Jacobsen, E., Ponstein, A. S., Visser, R. G. F., Vos-Scheperkeuter, G. H., Bijmolt, E. W., ... & Feenstra, W. J. (1987). Isolation of an amylose-free starch mutant of the potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 75: 217-221.
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, 157: 1262-1278.
- Jiang W., Zhou H., Bi H., Fromm M., Yang B. & Weeks D.P. (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research*, 41:e188.
- Kuipers, A. G., Soppe, W. J., Jacobsen, E., & Visser, R. G. (1994). Field evaluation of transgenic potato plants expressing an antisense granule-bound starch synthase gene: increase of the antisense effect during tuber growth. *Plant molecular biology*, 26: 1759-1773.
- Kuivanen, J., Holmström, S., Lehtinen, B., Penttilä, M., & Jäntti, J. (2018). A High-throughput workflow for CRISPR/Cas9 mediated combinatorial promoter replacements and phenotype characterization in yeast. *Biotechnology Journal*, 13(9) 1700593.
- Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Zou, Y., Quintanilla, R., Sridharan, M., Carte, J., Chen, W., Roark, N., Ranganathan, S., Ravinder, N., & Chesnut, J.D. (2015). Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *Journal of Biotechnology*, 208:44-53.
- Oye, K.A., Esvelt, K., Appleton, E., Catteruccia, F., Church, G., Kuiken, T., Lightfoot, S.B., McNamara, J., Smidler, A., & Collins, J.P. (2014). Biotechnology. Regulating gene drives. *Science*, 8;345:626-628.
- Puchta, H., Dujon, B., & Hohn, B. (1993). Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic acids research*, 21: 5034-5040.

- Rantasalo, A., Landowski, C.P., Kuivanen, J., Korppoo, A., Reuter, L., Koivistoinen, O., Valkonen, M., Penttilä, M., Jäntti, J., & Mojzita, D. (2018). A universal gene expression system for fungi. *Nucleic Acid Research*, 46(18):e111.
- Shukla, V. K., Doyon, Y., Miller, J. C., DeKelver, R. C., Moehle, E. A., Worden, S. E., ... & Choi, V. M. (2009). Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, 459: 437-441.
- Tagliabue, G. (2015). The meaningless pseudo-category of “GMOs”. *EMBO reports*, e201541385.
- Townsend, J. A., Wright, D. A., Winfrey, R. J., Fu, F., Maeder, M. L., Joung, J. K., & Voytas, D. F. (2009). High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature*, 459: 442-445.
- Waltz, E. (2018). With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time. *Nature Biotechnology*, 36: 6-7.
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., & Qiu, J. L. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology*, 32: 947-951.
- Westra, J., van der Vlugt, CJB., Roesink, C. H., Hogervorst, PAM., & Glandorf, DCM. (2016). Gene drives. Policy report. RIVM Report 2016-0023.
- Zetterberg, C., & Björnberg, K. E. (2017). Time for a new EU regulatory framework for GM crops? *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 30: 325-347.

the *Journal of Applied Behavior Analysis* (1974), and the *Journal of Experimental Psychology* (1975).

There are a number of reasons why the *Journal of Applied Behavior Analysis* is the most widely cited journal in the field of behavior analysis.

First, the journal is published by the American Psychological Association, which is the largest and most prestigious organization in the field of psychology.

Second, the journal is published quarterly, which allows for a high volume of research to be published.

Third, the journal is published in English, which is the most widely spoken language in the world.

Fourth, the journal is published in a format that is easy to read and understand, which makes it accessible to a wide range of researchers and practitioners.

Fifth, the journal is published in a format that is easy to search and access, which makes it convenient for researchers to find the articles they need.

Sixth, the journal is published in a format that is easy to cite, which makes it convenient for researchers to cite the articles they use.

Seventh, the journal is published in a format that is easy to share, which makes it convenient for researchers to share their findings with others.

Eighth, the journal is published in a format that is easy to archive, which makes it convenient for researchers to archive their work.

Ninth, the journal is published in a format that is easy to preserve, which makes it convenient for researchers to preserve their work.

Tenth, the journal is published in a format that is easy to disseminate, which makes it convenient for researchers to disseminate their findings.

Eleventh, the journal is published in a format that is easy to distribute, which makes it convenient for researchers to distribute their work.

Twelfth, the journal is published in a format that is easy to access, which makes it convenient for researchers to access their work.

Thirteenth, the journal is published in a format that is easy to search, which makes it convenient for researchers to search for their work.

Fourteenth, the journal is published in a format that is easy to cite, which makes it convenient for researchers to cite their work.

Fifteenth, the journal is published in a format that is easy to share, which makes it convenient for researchers to share their work.

Sixteenth, the journal is published in a format that is easy to archive, which makes it convenient for researchers to archive their work.

Seventeenth, the journal is published in a format that is easy to preserve, which makes it convenient for researchers to preserve their work.

Eighteenth, the journal is published in a format that is easy to disseminate, which makes it convenient for researchers to disseminate their work.

Nineteenth, the journal is published in a format that is easy to distribute, which makes it convenient for researchers to distribute their work.

Twentieth, the journal is published in a format that is easy to access, which makes it convenient for researchers to access their work.

Twenty-first, the journal is published in a format that is easy to search, which makes it convenient for researchers to search for their work.

Twenty-second, the journal is published in a format that is easy to cite, which makes it convenient for researchers to cite their work.

Twenty-third, the journal is published in a format that is easy to share, which makes it convenient for researchers to share their work.

Twenty-fourth, the journal is published in a format that is easy to archive, which makes it convenient for researchers to archive their work.

Twenty-fifth, the journal is published in a format that is easy to preserve, which makes it convenient for researchers to preserve their work.

Twenty-sixth, the journal is published in a format that is easy to disseminate, which makes it convenient for researchers to disseminate their work.

Twenty-seventh, the journal is published in a format that is easy to distribute, which makes it convenient for researchers to distribute their work.

Twenty-eighth, the journal is published in a format that is easy to access, which makes it convenient for researchers to access their work.

Twenty-ninth, the journal is published in a format that is easy to search, which makes it convenient for researchers to search for their work.

Thirtieth, the journal is published in a format that is easy to cite, which makes it convenient for researchers to cite their work.

Thirty-first, the journal is published in a format that is easy to share, which makes it convenient for researchers to share their work.

Thirty-second, the journal is published in a format that is easy to archive, which makes it convenient for researchers to archive their work.

Thirty-third, the journal is published in a format that is easy to preserve, which makes it convenient for researchers to preserve their work.

Thirty-fourth, the journal is published in a format that is easy to disseminate, which makes it convenient for researchers to disseminate their work.

Thirty-fifth, the journal is published in a format that is easy to distribute, which makes it convenient for researchers to distribute their work.

Thirty-sixth, the journal is published in a format that is easy to access, which makes it convenient for researchers to access their work.

Thirty-seventh, the journal is published in a format that is easy to search, which makes it convenient for researchers to search for their work.

Thirty-eighth, the journal is published in a format that is easy to cite, which makes it convenient for researchers to cite their work.

Thirty-ninth, the journal is published in a format that is easy to share, which makes it convenient for researchers to share their work.

Fortieth, the journal is published in a format that is easy to archive, which makes it convenient for researchers to archive their work.

Forty-first, the journal is published in a format that is easy to preserve, which makes it convenient for researchers to preserve their work.

Forty-second, the journal is published in a format that is easy to disseminate, which makes it convenient for researchers to disseminate their work.

Forty-third, the journal is published in a format that is easy to distribute, which makes it convenient for researchers to distribute their work.

Forty-fourth, the journal is published in a format that is easy to access, which makes it convenient for researchers to access their work.

Forty-fifth, the journal is published in a format that is easy to search, which makes it convenient for researchers to search for their work.

Forty-sixth, the journal is published in a format that is easy to cite, which makes it convenient for researchers to cite their work.

Forty-seventh, the journal is published in a format that is easy to share, which makes it convenient for researchers to share their work.

Forty-eighth, the journal is published in a format that is easy to archive, which makes it convenient for researchers to archive their work.

Forty-ninth, the journal is published in a format that is easy to preserve, which makes it convenient for researchers to preserve their work.

Fiftieth, the journal is published in a format that is easy to disseminate, which makes it convenient for researchers to disseminate their work.

Fifty-first, the journal is published in a format that is easy to distribute, which makes it convenient for researchers to distribute their work.

Fifty-second, the journal is published in a format that is easy to access, which makes it convenient for researchers to access their work.

Fifty-third, the journal is published in a format that is easy to search, which makes it convenient for researchers to search for their work.

Fifty-fourth, the journal is published in a format that is easy to cite, which makes it convenient for researchers to cite their work.

Fifty-fifth, the journal is published in a format that is easy to share, which makes it convenient for researchers to share their work.