

Aino Vesikansa

Geenisaksilla hermoston sairauksien jäljille

Geenisaksiksi kutsuttua CRISPR-menetelmää pidetään yhtenä tämän vuosikymmenen suurimmista tieteellisistä läpimurroista. CRISPR-menetelmän avulla voidaan muokata DNA-juostetta tarkasti ja yksinkertaisesti halutussa genomissa. Helppo muokattavuus ja käytettävyys yli lajirajojen tekevät menetelmästä ainutlaatuisen. CRISPR-menetelmä on mullistanut myös neurologisten sairauksien taustalla vaikuttavien geenien toiminnan tutkimisen. Uudet tautimallit ja ihmisen kantasoluviljelmien muokkaus nopeuttavat sekä hermoston toimintamekanismien tutkimusta että avaavat uusia mahdollisuuksia lääkekehitykselle. Tulevaisuudessa joitakin perinnöllisiä tauteja voidaan mahdollisesti hoitaa CRISPR-tekniikkaan perustuvilla geenihoidoilla. Menetelmällä pystytään muokkaamaan geenejä myös ihmisen sukusoluissa. Alan tämän hetken tärkeimpiä haasteita onkin pohtia laajamittaisesti geenimuokkauksen vaikutuksia ja sopia alalle eettisesti ja yhteiskunnallisesti kestävä pelisääntö.

Ihmisen genomikartan valmistuminen vuonna 2003 ja sitä seurannut uuden sukupolven sekvensointimenetelmien kehitys ovat merkittävästi lisänneet tietoa hermoston sairauksien taustalla vaikuttavista perinnöllisistä tekijöistä. Genominlaajuisten assosiaatiotutkimusten avulla on löydetty satoja esimerkiksi autismille tai skitsofrenialle altistavia geenimuunnoksia. Valtaosa hermoston sairauksista syntyy kuitenkin useiden geenien, ympäristötekijöiden ja sattuman yhteisvaikutuksen tuloksena. Nykyisin suurimpia haasteita onkin ymmärtää, miten nämä alttiusero yhdyttyä ulkoisten tekijöiden kanssa vaikuttavat tautiriskiä ja taudin patofysiologiaan.

Toiminnallisen genomitutkimuksen tarkoituksena on selvittää, miten ja missä ympäristössä geenit toimivat ja miten ne vaikuttavat ilmiäsuun. Viime vuosien suurimpia läpimurtoja toiminnallisen genomitutkimuksen saralla on täsmällisten geenimuokkausmenetelmien kehitys. Näistä merkittävimpänä pidetään CRISPR-menetelmää (clustered regularly-interspaced short palindromic repeats), jonka sovellukset ovat lisääntyneet räjähdysmäisesti sitten tekniikan kuvaamisen genomissa muuntelussa (1,2). CRISPR-menetelmä avaa uusia mahdollisuuksia

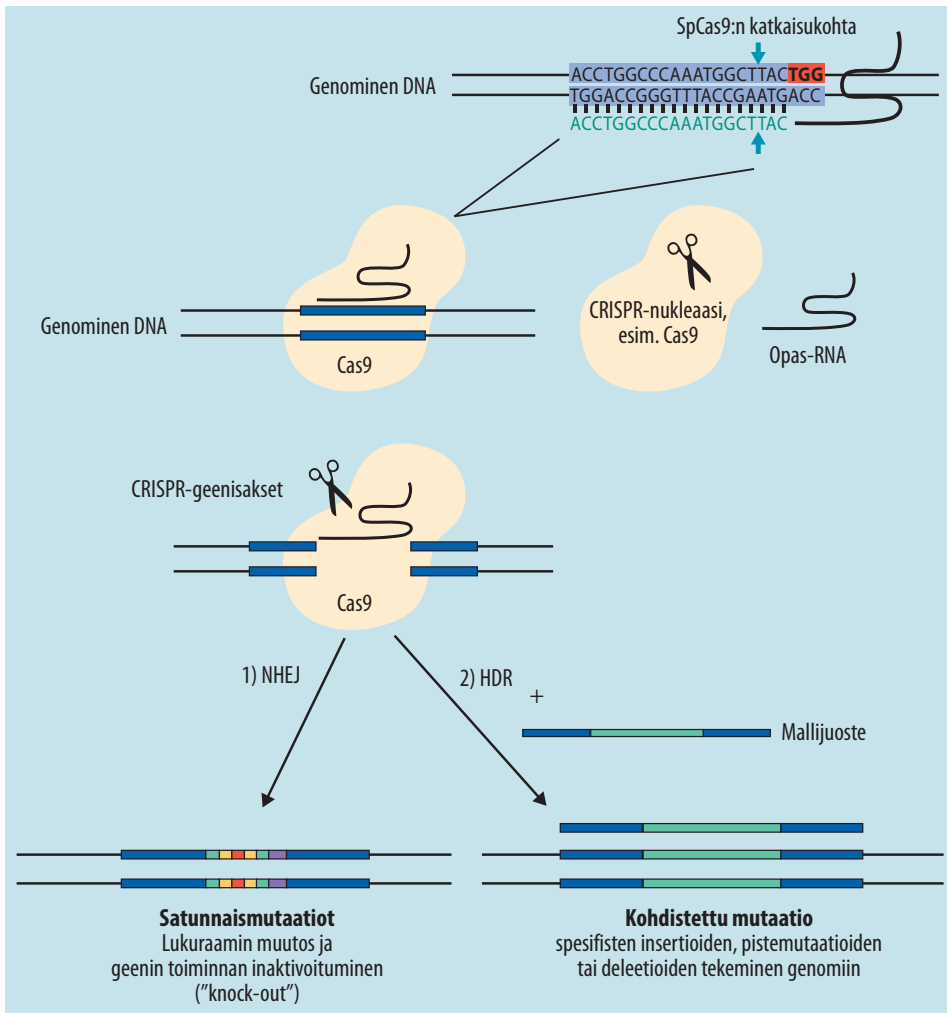
myös hermoston toiminnan ja sairauksien tutkimukseen ja perinnöllisten sairauksien täsmähoitojen kehittämiseen (3,4).

CRISPR-geenimuokkauksen periaate ja sovellukset

Geenimuokkausmenetelmillä tarkoitetaan yleisesti tekniikoita, joilla muutetaan yksilön tai solun perimää lisäämällä, poistamalla tai muuttamalla DNA-jaksoja tai emäksiä tietyssä genomissa. Ensimmäiset geenimuokkausmenetelmät perustuivat meganukleaseihin, sinkkisormiproteiineihin ja TALEN-proteiineihin (5). Kuitenkin vasta CRISPR-menetelmän kehitys on mahdollistanut tehokkaan ja täsmällisen geenimuokkauksen laajassa mittakaavassa (6). CRISPR eroaa aiemmista menetelmistä DNA:han sitoutuvan osan suhteen. Proteiinin sijaan CRISPR-geenisaksien sitoutumista DNA:han ohjaa lyhyt RNA-jakso, mikä tekee menetelmästä aiempia geenimuokkausmenetelmiä huomattavasti helpomman ja edullisemmän käyttä.

CRISPR-menetelmä perustuu bakteerien immuunijärjestelmän luontaiseen kykyyn puolustautua viruksia vastaan. Bakteeriperä-

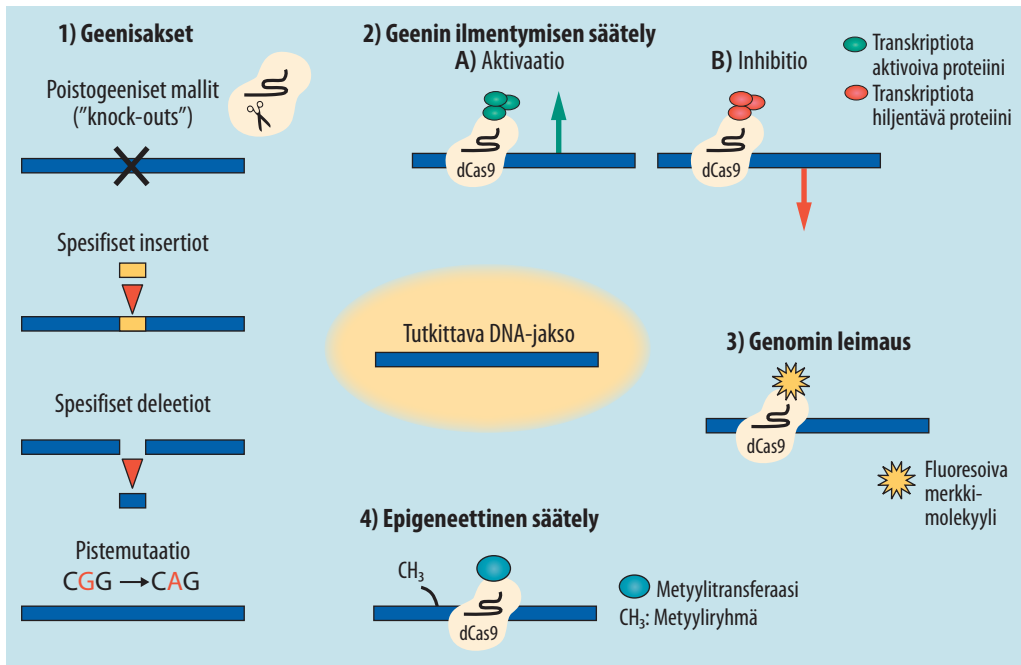




KUVA 1. CRISPR-geenisaksien periaate. Opas-RNA, joka voidaan syntetisoida laboratoriossa, ohjaa Watson-Crickin emäspariutumisen avulla CRISPR-nukleaasin (esimerkiksi Cas9) haluttuun genomien kohtaan. Opas-RNA voidaan suunnitella mihin tahansa kohtaan genomia sillä edellytyksellä, että 20:n nukleotidin tunnustussekvenssiä seuraa kolmen nukleotidin PAM-sekvenssi, joka on spCas9-nukleaasille 5'-NGG-3. Ihmisen genomissa PAM-sekvenssi esiintyy noin kahdeksan nukleotidin välein, joten käytännössä sopivan opas-RNA:n suunnittelu on usein helppoa. Cas9 katkaisee DNA-juosteen kolme nukleotidia ennen PAM-sekvenssiä. Solu korjaa DNA-säikeen käyttämällä joko NHEJ- (1) tai HDR-reittiä (2). NHEJ:ssä katkenneen DNA:n päät liitetään yhteen ilman mallijuostetta, jolloin DNA:n leikkauskohtaan jää tyypillisesti satunnaisia mutaatioita, mikä muuttaa lukuraamia, ja geenin normaali ilmentyminen estyy (poistogeeniset mallit). Vaihtoehtoisesti jakautuvissa soluissa voidaan hyödyntää HDR-reittiä, jossa solu korjaa katkaistun juosteen mallijuosteen mukaiseksi. Mallijuosteen avulla genomiin voidaan liittää haluttu uusi DNA-jakso, luoda pistemutaatioita tai saada aikaan kohdistettu deleetio. PAM = protospacer adjacent motif, NHEJ = non-homologous end-joining, HDR = homology-directed repair

siä CRISPR-systeemejä on löydetty useita, ja niistä parhaiten tunnettu on ensimmäisenä *Streptococcus pyogenes* -bakteerilta karakterisoitu tyyppi 2 CRISPR-Cas9 (7). Geenitekniikassa bakteerien luontaista CRISPR-systeemiä voidaan hyödyntää yksinkertaisesti ja tehokkaasti. Menetelmän keskeinen osa on yksittäi-

nen opas-RNA (single guide RNA, sgRNA), joka ohjaa Cas9:n sitoutumaan DNA-juosteseen halutussa genomien kohdassa (KUVA 1). DNA:han sitoutunut Cas9 katkaisee juosteen opas-RNA:n määräämässä paikassa, minkä jälkeen solu hyödyntää luonnollisia DNA:n korjausmekanismejaan juosteen korjaamiseen (8).



KUVA 2. CRISPR-menetelmän sovellukset. Opas-RNA:n kyky ohjata Cas9 haluttuun genomin kohtaan voidaan hyödyntää eri tavoin. DNA:n emäsjärjestyksen muokkaus perustuu Cas9-nukleaasin kykyyn katkaista kaksoisjuoste ("geenisakset") ja solun luonnollisiin korjausmekanismeihin (1). Cas9-proteiinista muokattu versio, josta puuttuu nukleasiomaisuus (nuclease-deactivated Cas9, dCas9) toimii puolestaan proteiini-moduulina, jonka avulla voidaan ohjata muita efektoreja genomiin (2–4). dCas9-proteiiniin voidaan liittää esimerkiksi transkriptiota sääteleviä proteiineja (2), fluoresoiva merkkimolekyyl (3) tai DNA:n epigeneettisiä ominaisuuksia säätelevä entsyymi (esimerkiksi metyyliitransferaasi) (4).

Non-homologous end-joining (NHEJ) on tehokkaampi mutta epätarkempi tapa korjata DNA-juoste. NHEJ liittyy katkenneen juosteen päät yhteen sattumanvaraisesti, jolloin DNA:han jää usein ylimääräisiä nukleotideja tai alkuperäisiä nukleotideja katoaa (insertiot ja deleetiot, "indelit"). NHEJ-mekanismiin perustuvaa korjausta hyödynnetään satunnaisten mutaatioiden luomiseen ja poistogeenisten mallien tuottamiseen.

Homology-directed repair -mekanismiin (HDR) perustuvaa korjausta käytetään puolestaan tarkkojen mutaatioiden ja insertioiden luomiseen perimään. Soluun viedään opas-RNA:n ja Cas9:n lisäksi mallijuoste, jonka mukaisesti solu korjaa katkaistun genomisen DNA-jakson. HDR:n hyödyntämistä on rajoittanut se, että mekanismi toimii vain jakautuvissa soluissa ja mutaatiotaajuus on usein harva. Uusien sovellusten ansiosta myös HDR-reittiin perustuvasta geenimuokkauksesta on kuitenkin tullut tehokkaampaa (9).

CRISPR-menetelmän sovellukset lisääntyvät huimaa vauhtia, ja alkuperäisen geenisaksoitumisen lisäksi menetelmästä on kehitetty useita kekseliäitä versiota geenien toiminnan tutkimukseen (10). Niiden avulla voidaan esimerkiksi säädellä geenien ilmentymistä ja epigenetiikkaa tai seurata kromatiinin dynamiikkaa leimaamalla haluttu geeni fluoresoivalla merkkiproteiinilla (KUVA 2). Yleisimmin käytetyn *Streptococcus pyogenes* -Cas9-nukleaasin (spCas9) rinnalle on kehitetty myös muihin CRISPR-nukleaseihin perustuvia menetelmiä, joiden avulla voidaan esimerkiksi parantaa kohdetarkkuutta, laajentaa kohdevalikoimaa tai pakata nukleasi AA-virukseen (9).

CRISPR-menetelmän etuihin kuuluu helpon kohdistettavuuden lisäksi mahdollisuus muokata useita geneja samanaikaisesti (2). Viemällä soluun useita opas-RNA:ita yhtä aikaa voidaan tutkia geenien vuorovaikutussuhteita ja yhteisvaikutuksia sairauksien etiologiassa. Tämä on erityisen tärkeää monitekijäisten sai-

rauksien mekanismeja tutkittaessa. Merkittävää on myös tekniikan toimiminen yli lajirajojen – CRISPR on toiminut toistaiseksi kaikissa testatuissa eliöissä sukkulamadoista kädellisiin.

Uudet tautimallit lisäävät ymmärrystä hermostosairauksien mekanismeista

Geenien toiminnan tutkiminen hermostossa on erityisen vaativaa hermosolujen pitkälle erilaistuneen luonteen vuoksi. Ihmisen ja muiden nisäkkäiden aivoissa on jopa satoja erilaisia hermosolutyyppejä, jotka eroavat toisistaan rakenteeltaan ja toiminnaltaan. Geenien toiminta hermosolussa voi olla hyvinkin erilaista esimerkiksi aivojen eri osissa. Tämä riippuu solun mikroympäristöstä ja yhteyksistä muihin soluihin. Ihmisen hermosolujen kudossympäristöstä riippuvia patologisia muutoksia päästään tutkimaan vasta kuolemanjälkeisistä näytteistä. Solu-, kudoss- ja eläinmallit ovatkin merkittäviä neurologisten sairauksien mekanismien selvittämisessä ja uusien lääkkeiden kehittämisessä. CRISPR on osoittautunut verrattomaksi työkaluksi uusien, enemmän ihmisen sairautta muistuttavien tautimallien luomiseen.

Täsmällisempiä eläinmalleja nopeammin.

Ihmisten hermostosairauksia tutkittaessa keskiössä ovat yleisesti hiirimallit, joiden alkion kantasolujen perimän muokkaaminen homologisen rekombinaation avulla osataan hyvin. Hiirimallien luominen homologisen rekombinaation avulla on kuitenkin varsin työlästä, ja uuden hiirimallin tekeminen vie vuodesta jopa kahteen.

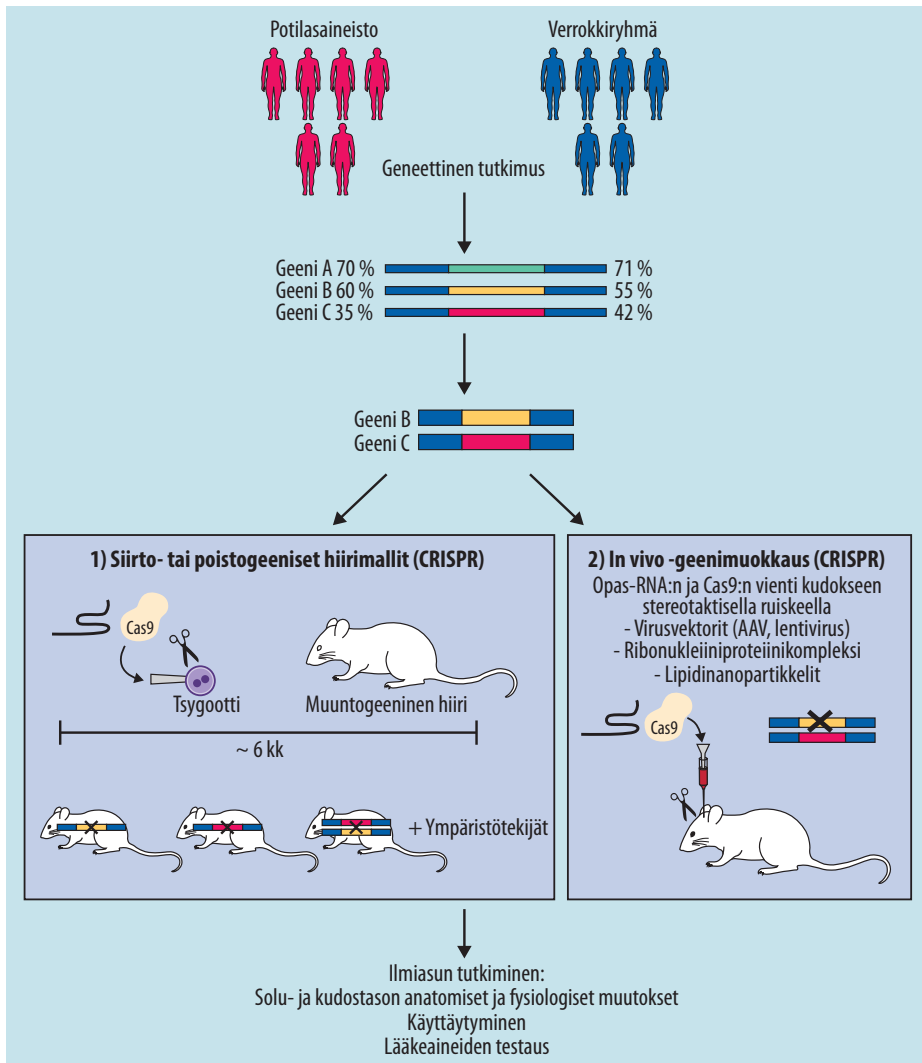
CRISPR-menetelmällä erityisesti poistogeenisten hiirimallien luominen on yksinkertaista ja edullista (11). Menetelmällä voidaan muokata suoraan hedelmöittyneen munasolun perimää kantasolujen sijaan ja luoda poistogeeninen hiirimalli jopa puolessa vuodessa (KUVA 3). Koska menetelmällä voidaan muokata samanaikaisesti useamman geenin toimintaa, hitaiden ja kalliiden siirtogeenisten hiirikantojen risteytyksien tarve vähenee huomattavasti (12). CRISPR-menetelmä ei ole kuitenkaan vielä täysin syrjäyttänyt tavanomaisia menetelmiä hiirimallien luomisessa. Kohdistettujen

mutaatioiden, kuten tarkkojen insertioiden tai deleetioiden, aikaansaaminen CRISPR-menetelmällä ei ole yhtä yksinkertaista kuin poistogeenisten mallien luominen.

Hiirimallien käyttö aivosairauksien tutkimuksessa ei ole ongelmatonta. Etuaivokuori, joka käsittelee korkeampia aivotoimintoja ja jonka toiminnan häiriöt ovat monien psykiatristen sairauksien (esimerkiksi skitsofrenia, kaksisuuntainen mielialahäiriö, ADHD) taustalla, on hiirellä huonosti kehittynyt. Toisaalta hiiren lyhyt elinikä vaikeuttaa iän myötä kehittyvien hermoston rappeumasairauksien tutkimusta. CRISPR-menetelmää voidaan käyttää tautimallien luomiseen pitkäikäisissä nisäkäslajeissa, joissa tavanomaisia kantasolujen muokkaamiseen perustuvia tekniikoita ei voida hyödyntää. Esimerkiksi neurodegeneratiivisten sairauksien tutkimukseen on kehitetty useita apina- ja sikamalleja (13,14). Apinamalleja on hyödynnetty myös neuropsykiatristen sairauksien kuten autismin tutkimuksessa (15).

Uusien eläinmallien, erityisesti kädellisten eläinten osalta, kehittäminen herättää runsaasti eettistä keskustelua ja jakaa mielipiteitä. Länsimaissa kädellisten eläinten käyttö tutkimuksessa on vähäistä kriittisen ilmapiirin vuoksi. Kädellisten jalostaminen on huomattavan hidasta, ja siksi riittävän tutkimusaineiston tuottaminen on vaativaa. Toisaalta uudet eläinmallit voisivat ratkaisevasti edesauttaa uusien lääkkeiden kehittämistä neurologisiin sairauksiin, sillä yli 80 % hiirimalleissa toimiviksi ja turvallisiksi todetuista lääkkeistä osoittautuu tehottomiksi ihmiskäytössä (16). Keskushermostoon vaikuttavien lääkeaineiden kliinisten kokeiden epäonnistuminen on huomattavasti yleisempää kuin muiden lääkeaineiden (17). Onkin pohdittava tarkoin, missä tilanteessa esimerkiksi kädellisten käyttö tutkimuksessa on välttämätöntä ja perusteltua.

Nisäkästautimallien lisäksi CRISPR-menetelmä on nopeuttanut hermoston perusmekanismien tutkimusta monissa muissakin mallieliöissä, kuten seeprakaloissa. Seeprakalojen perimä ja hermoston rakenne on kuvattu hyvin, ja CRISPR-menetelmän avulla voidaan seuloa samanaikaisesti jopa kymmenien geenien vaikutusta ilmiasuun (18).



KUVA 3. Monitekijäisten neurologisten sairauksien tutkiminen CRISPR-menetelmän avulla hiirimallissa. Kun geneettisissä tutkimuksissa on löydetty tiettyjen geenivarianttien (tässä B, C) ja esimerkiksi sporadisen Alzheimerin taudin yhteys, voidaan CRISPR-menetelmää käyttää muokkaamaan kandidaattigeenejä hiirimallissa. Opas-RNA ja Cas9 voidaan viedä mikroruiskeella suoraan hedelmöittyneeseen munasoluun, mikä nopeuttaa hiirimallien luomista merkittävästi (1). Tekniikalla voidaan muokata useita kandidaattigeenejä samanaikaisesti, mikä helpottaa monitekijäisten sairauksien taustalta löydettyjen geenien synergisten vaikutusten tutkimista. Siirtogeenisissä hiirimalleissa voidaan tutkia myös erilaisten geenien sekä ympäristötekijöiden, kuten ruokavalion tai stressin, yhteisvaikutuksia Alzheimerin taudin synnyssä. Vaihtoehtoisesti CRISPR-menetelmää voidaan käyttää kandidaattigeenien toiminnan tutkimiseen in vivo esimerkiksi muistin toiminnalle tärkeässä hippokampuksessa (2). Tällöin opas-RNA ja Cas9 viedään stereotaktisella ruiskeella halutulle aivoalueelle, mikä mahdollistaa myös geenien toiminnan ajallisten vaikutusten tutkimisen siirtogeenisiä hiirimalleja paremmin.

Geenien paikallisen toiminnan tutkiminen in vivo -geenimuokkauksella. Siirtogeenisissä eläimille muokattu tai poistettu geeni on useimmiten jokaisessa eliön solussa, jolloin geenin paikallisten ja ajallisten vaikutusten tutkiminen on haastavaa. Toisaalta kehi-

tyksenaikaiset kompensoitumekanismit voivat osaltaan vaikuttaa ilmiasuun. CRISPR-menetelmä mahdollistaa hermoston solujen perimän muokkaamisen myös in vivo halutulla aivoalueella ja jopa tietyssä solutyypissä (KUVA 3).

In vivo -geenimuokkauksen avulla voidaan

tutkia geenin toimintaa määrätyn ajanjakson aikana, ja se soveltuikin hyvin esimerkiksi iän myötä kehittyvien hermostosairauksien tutkimiseen. In vivo -geenimuokkausta voidaan hyödyntää myös tutkittaessa hermosolujen epigeneettistä dynamiikkaa, jonka häiriöiden on havaittu vaikuttavan useiden neurologisten sairauksien taustalla (19). Paikallisen geenimuokkauksen avulla on pystytty vahvistamaan esimerkiksi *MECP2*-geenin merkitys kontekstuaalisen muistin toiminnassa hiiren hippokampuksessa (20). In vivo -geenimuokkauksella on osoitettu myös tunnettujen kasvunrajoitegeenien (*PTCH1*, *Trp53*, *PTEN*, *NF1*) merkitys hiiren pikkuaivojen medulloblastooman ja etuaivojen glioblastooman kehitymisessä (21).

Vaikka in vivo -geenimuokkaus on nopeaa ja monin tavoin tarkoituksenmukaista, se ei ole vielä rutiinimaisessa tutkimuskäytössä menetelmään liittyvien haasteiden vuoksi. Viimeaikaiset löydöt vauhdittavat eittämättä CRISPR-menetelmän käyttöä in vivo ja rakentavat pohjaa myös menetelmän mahdolliselle kliiniselle käytölle. Äskettäin julkaistiin uusi NHEJ-korjausmekanismiin perustuva HITI-menetelmä (homology-independent targeted integration), jolla kyetään luomaan kohdistettuja geenimutaatioita myös postmitoottisten hermosolujen perimään in vivo (22). Uusien geeninsiirtomenetelmien ja Cas9-nukleasin säädeltävien versioiden kehittäminen helpottavat osaltaan paikallisen ja ajallisen tarkkuuden saavuttamista (4,23).

Muokatut kantasolut – ihmisperäiset solu- ja kudospallit. Kantasolutekniikoiden kehittyminen on mahdollistanut tutkimuksen ihmisiltä eristetyissä soluissa ja osaltaan vauhdittanut hermostosairauksien mekanismien selvitystä. Yhdistettynä genominmuokkausmenetelmiin kantasolut ja niistä kasvatetut hermoston solut ja kudospallit (organoidit) tarjoavat oivallisen tavan tutkia geenien toimintaa ihmisen soluissa in vitro (24). Kantasoluista kasvatetuissa hermosoluviljelmissä voidaan myös seuloa nopeasti ja tehokkaasti mahdollisia lääkkeitä (25). Kantasoluilla ja kudospallilla

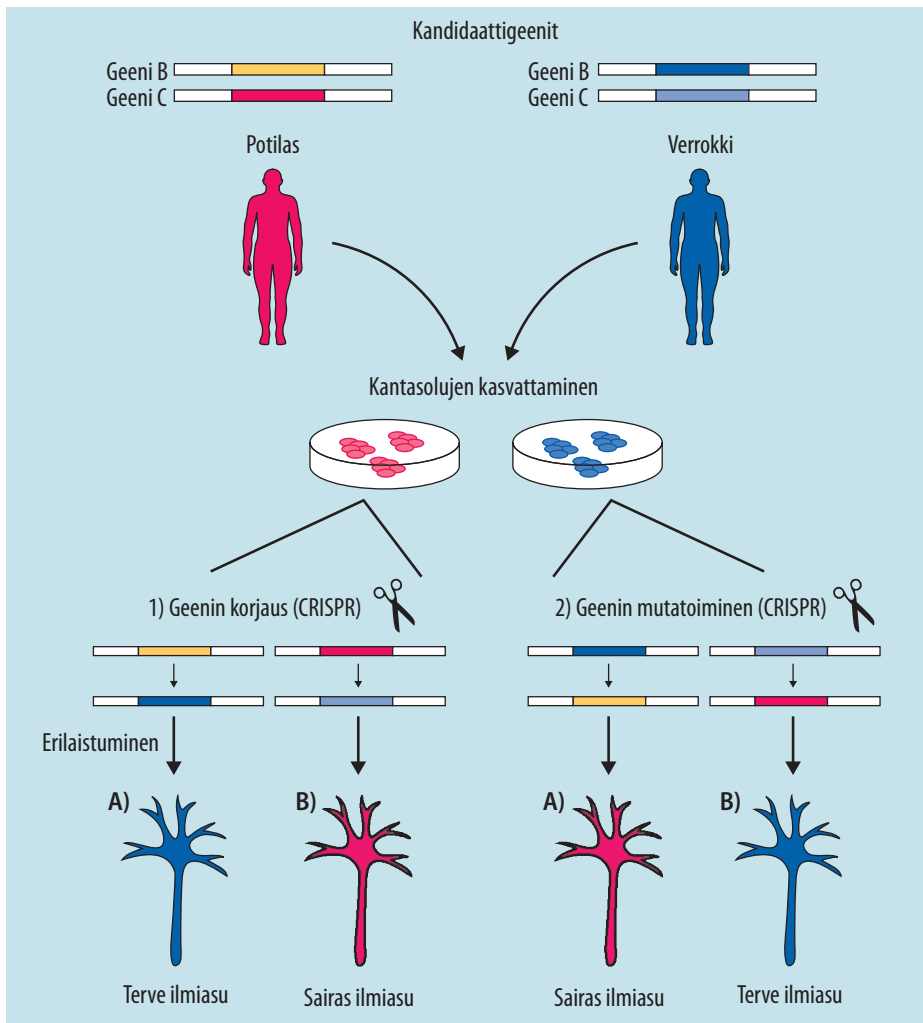
onkin merkittävä rooli pyrkimyksissä vähentää eläinkokeiden määrää.

Ihmisen erittäin monikykyiset kantasolut jaetaan alkulähteensä perusteella kahteen tyyppiin: alkion kantasoluihin (embryonic stem cells, hES-solut) ja indusoituihin pluripotentteihin kantasoluihin (induced pluripotent stem cells, IPS-solut). Indusoidut pluripotentit kantasolut ovat aikuiselta ihmiseltä (esimerkiksi ihon fibroblasteista) eristettyjä ja kasvatettuja somaattisia soluja, jotka voidaan soluviljelmässä ohjata kehittymään lähes minkä tahansa tyyppin soluiksi. Kantasoluista kasvatetut hermosolut tai hermoston tukisolut säilyttävät siis luovuttajan perinnöllisen materiaalin ja mahdollistavat geenien toiminnan tutkimisen ihmisen erilaisissa perinnöllisissä taustoissa (26).

CRISPR-menetelmän avulla voidaan muokata joko suoraan kantasolujen tai niistä erilaisuneiden hermoston solujen perimää. Muokkaamalla kandidaattigeenejä potilaalta eristetyistä kantasoluista voidaan tutkia kyseisten geenien vaikutuksia solujen patofysiologiseen ilmiösuun (KUVA 4). Vaihtoehtoisesti terveeltä verrokilta eristettyihin kantasoluihin voidaan luoda haluttu mutaatio ja seurata, johtaako tämä taudille tyypilliseen solutason ilmiösuun. Tämä on erityisen hyödyllistä tutkittaessa kehityksellisiä hermostosairauksia tai hermoston rappeumasairauksia, joiden patofysiologiset muutokset alkavat eläinmalleista saadun tiedon perusteella jo ennen oireiden alkua. Esimerkiksi varhaiseen Alzheimerin tautiin linkittyvien *APP*- ja *PSEN1*-geenien muokkaaminen CRISPR-menetelmällä kantasoluissa johti kantasoluista kasvatetuissa hermosoluissa samankaltaisiin muutoksiin, joita on kuvattu Alzheimerin taudin yhteydessä (27).

Ihmisen CRISPR-geenimuokkaus – mahdollisuuksia ja uhkakuvia

CRISPR-menetelmä on ollut suuri läpimurto lääketieteellisen perustutkimuksen monella osa-alueella. Tekniikka on kuitenkin herättänyt paljon kiinnostusta ja odotuksia myös

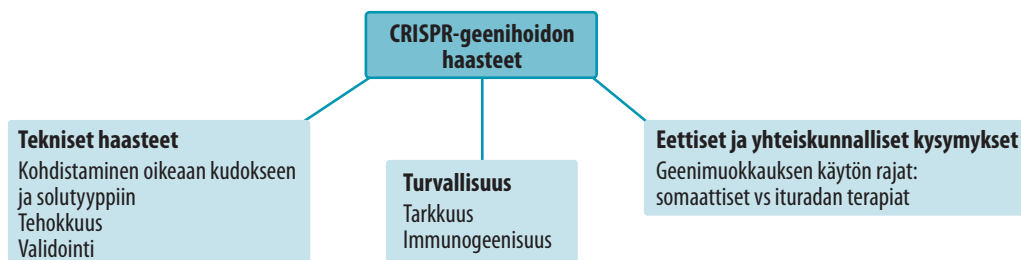


KUVA 4. Muokatut kantasolut mahdollistavat sairauksien tutkimisen *in vitro* ihmisten perinnöllisen taustan vaihdella. Monikykyisiä kantasoluja voidaan kasvattaa somaattisista soluista (esimerkiksi ihon fibroblastit) ja erilaistaa viljelmässä hermoston soluiksi. CRISPR-geenimuokkausta voidaan hyödyntää kandidaattigeenien (B, C) tutkimuksessa eri tavoin. Kandidaattigeeni voidaan korjata CRISPR-menetelmällä potilaalta kasvatetuissa soluissa (1). Jos geeninkorjaus palauttaa terveen solun ilmiasun, kuten (geeni B), voidaan geenin ja taudin yhteys varmistaa (1 A). Vaihtoehtoisesti kandidaattigeeneihin voidaan tehdä mutaatiota terveistä yksilöistä kasvatetuissa soluissa (2). Koska geenin B muokkaaminen johtaa sairaan solun ilmiasuun, sairauden ja geenin välinen yhteys vahvistuu (2 A). Koska geenin C muokkaamalla ei pystytä vaikuttamaan tutkittavaan ilmiasuun (1 B, 2 B), geenin C yhteyttä tautiin ei voitu tässä mallissa osoittaa.

kliinisen lääketieteen puolella. Voitaisiko CRISPR-menetelmää tulevaisuudessa käyttää sairauksien hoidossa tai jopa pysyvästi parantamaan perinnöllisiä hermosairauksia? CRISPR-menetelmää kokeiltiin ihmisen geenihoidossa ensi kertaa viime vuonna. Kiinalaiset tutkijat siirsivät keuhkosyöpäpotilaalle CRISPR-menetelmällä *ex vivo* muokattuja immuunipuolustukseen osallistuvia T-soluja, ja tavoitteena

oli kasvainkudoksen tuhoaminen (28). Menetelmää on testattu myös ihmisalkioiden perimän muokkaamiseen, ja vaikka näitä muunto-geenejä alkioita ei ollut tarkoitukseen siirtää kohtuun asti, kokeilut aiheuttivat suurta kohua sekä tutkijapiireissä että mediassa (29,30).

CRISPR-menetelmään perustuvia somaattisten solujen geenihoidoja on jo kehitteillä, ja moni yritys on julkistanut menetelmään liit-



KUVA 5. CRISPR-menetelmään perustuvien geenihoidojen haasteet.

tyviä hankkeita (31). Hermostosairauksista kiinnostuksen kohteena ovat erityisesti perinnölliset verkkokalvon rappeumataudit, kuten verkkokalvon pigmenttisurkastuma (retinitis pigmentosa) ja tyyppin 10 Leberin synnyntäminen amauroosi (LCA10). Myös kuurosokeutumista aiheuttavalle Usherin oireyhtymälle, jonka alatyypin USH3 kuuluu suomalaisen tautiperintöön, on kehitteillä CRISPR-menetelmään perustuvia geenihoidohankkeita. Silmään kohdistuvat hoidot ovat houkutteleva kohde helpon tavoitettavuuden, anatomian ja immuunipuolustuksen eristäytyneisyyden takia. Silmätautien lisäksi CRISPR-menetelmään pohjautuvien geenihoidojen julkistettuja kohteita ovat Duchennen lihasdystrofia ja perinnöllinen amyloidinen polyneuropatia. Kaikki geenihoidohankkeet ovat kuitenkin hyvin varhaisessa vaiheessa, eikä niiden kliinistä merkittävyyttä voida vielä arvioida.

Yhden geenin aiheuttamien neurologisten sairauksien geenihoidoa on testattu solu- ja eläinmalleissa. Esimerkiksi Huntingtonin tautiin johtava CAG-emästoistojakson pidentymä *huntingtin*-geenissä on onnistuneesti korjattu CRISPR-menetelmällä viljellyissä soluissa (32). Korjaamalla CRISPR-menetelmällä rotamallissa verkkokalvon pigmenttisurkastumaan johtava *MERTK*-geeni pystyttiin puolestaan osin palauttamaan näkökyky (22).

Ennen CRISPR-menetelmään perustuvien geenihoidojen mahdollista tuloa laajamittaisesti sairauksien hoitoon on ratkaistava monta tekniikan tehokkuuteen ja turvallisuuteen liittyvää kysymystä (KUVA 5) (33). Geenikorjaus on toistaiseksi varsin tehotonta jopa jakautuvissa soluissa kuten maksasoluissa ja saattaa saman-

aikaisesti aiheuttaa ei-toivottuja muutoksia kohdegeeniin (34). Vielä ei myöskään tiedetä tarkasti, kuinka usein CRISPR katkaisee DNA:ta väärästä kohdasta perimää (off-target effects). Yleisimmin käytetyn CRISPR-nukleaaasin, Cas9:n, vieminen elimistöön (in vivo -hoidot) on proteiinin suuren koon vuoksi vaikeaa yleisesti geenihoidoissa käytetyillä vektoreilla, kuten AA-viruksilla. Toisaalta ihmiselle vieraan proteiinin vieminen elimistöön saattaa myös aiheuttaa voimakkaan puolustusreaktion. Hermoston sairaudet ovat erityisen vaativia geenihoidon kohteita. Valtaosa sairauksista on monitekijäisiä ja usein luonteeltaan kehittyviä. Suuri haaste on, miten geenihoido saataisiin kohdistetuksi oikeaan kudokseen ja solutyypin oikeaan aikaan.

CRISPR-menetelmään perustuvien lääketieteellisten sovellusten markkinoille tuloa ovat osaltaan hidastaneet tekniikkaan liittyvät patenttiristiriidat. Yhdysvalloissa CRISPR-menetelmän geenimuokkauksessa ovat patentoineet Kalifornian yliopiston Jennifer Doudna yhdessä menetelmän toisen kehittäjän, Emmanuelle Charpentierin kanssa. Menetelmän nisäkäsovellusten ja siten ihmiskäyttöön liittyvät patentit kuuluvat Yhdysvalloissa kuitenkin Broad-instituutin Feng Zhangille. Samalla kun patenttikäsittely Yhdysvalloissa jatkuu, Euroopan patenttivirasto on suosittanut laajan patentin myöntämistä CRISPR-menetelmän käytöstä Kalifornian yliopistolle. Ristiriitainen tilanne on aiheuttanut hämmennystä menetelmää lääketieteellisessä tarkoituksessa hyödyntävien yritysten piirissä, ja on edelleen varsin epäselvää, kuka lopulta tulee käärimään voitot CRISPR-menetelmään perustuvista kaupallisista sovelluksista.

Ydinasiat

- ▶ CRISPR-menetelmän avulla voidaan tehdä tarkkoja muutoksia DNA-juosteeseen halutussa genomissa kohdassa.
- ▶ Menetelmä on helppo ja edullinen käyttää ja toimii lähes kaikissa eliöissä.
- ▶ CRISPR-menetelmä on oiva työkalu neurologisten sairauksien taustalla vaikuttavien geenien toiminnan tutkimiseen ja lääkekehitykseen.
- ▶ Menetelmää voidaan käyttää myös ihmisen perimän muokkaamiseen ja tulevaisuudessa mahdollisesti joidenkin perinnöllisten sairauksien geenihoidoihinkin.

Ituradan muokkaus jakaa mielipiteet. Ensimmäiset tulokset terveiden ihmisalkioiden perimän muokkaamisesta julkaistiin äskettäin (29). Vaikka tulokset olivat parempia kuin aiemmat epänormaaleilla alkioiden kehityksestä saadut, myös näissä kokeissa vain osa alkion soluista sisälsi muokatun geenin eli ongelmana oli geneettinen mosaikismi.

Alkion perimän peukaloointi on suuri eettinen ja yhteiskunnallinen kysymys, joka jakaa asiantuntijoidenkin mielipiteet (35). Valtaosassa länsimaista ihmisen perimän muokkaaminen on kielletty. Esimerkiksi Ruotsissa, Britanniassa ja Yhdysvalloissa on kuitenkin myönnetty lupa alkioiden perimän muokkaamiseen tutkimuskäytössä. Yhdysvalloissa tehtiin äskettäin merkittävä periaatteellinen päätös ihmisalkioiden perimän muokkaamisesta kliinisessä tarkoituksessa (36). Kansainvälisistä asiantuntijoista koostuva paneeli hyväksyi alkion perimän muokkauksen tilanteessa, jossa muita vaihtoehtoja terveen biologisen lapsen saamiseen ei ole. Käytännössä tämä tarkoittaisi hyvin harvinaista tilannetta, jossa molemmat vanhemmat kantavat samaa dominoivasti periytyvää sairautta ja jossa tervettä alkioita ei voida valita alkiodiagnostiikan keinoin.

AINO VESIKANSA, FT
Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto ja
Helsinki Institute of Life Science, Helsingin yliopisto

Lopuksi

CRISPR-menetelmän kehitys on edennyt viime vuodet aallonharjalla, ja uusia sovelluksia julkaistaan jatkuvasti. Aiempiin geenimuokausmenetelmiin verrattuna CRISPR on ainutlaatuisen helppo, nopea ja edullinen käyttää. Menetelmästä onkin tullut pysyvä osa molekyylibiologian työkalupakkia, ja sen odotetaan nopeuttavan merkittävästi myös hermoston ja sen sairauksien tutkimusta. Yhdessä uusien mallisysteemien ja tehokkaiden sekvensointimenetelmien kanssa CRISPR mahdollistaa geenien toiminnan tutkimisen monimutkaisissa hermoverkostoissa aivan uudella tarkkuudella. Geenitiedon lisääntymisen ja tautimekanismien ymmärryksen myötä pystytään tulevaisuudessa toivottavasti hoitamaan neurologisia sairauksia syihin niiden kohdistuvilla täsmälääkkeillä pelkän oireiden helpottamisen sijaan.

CRISPR-menetelmän nopea kehitys haastaa sekä tiedeyhteisön että yhteiskunnan pohtimaan geenimuokkauksen käytön rajoja. CRISPR-menetelmä on tehnyt ihmisen perimän muokkaamisen mahdolliseksi tavalla, jota ei aiemmin osattu kuvitellakaan. Ensimmäisten CRISPR-menetelmään perustuvien somaattisten geenihoidojen kliiniset kokeet on tarkoitus aloittaa kuluvan vuoden aikana. CRISPR-menetelmään perustuvia somaattisten solujen terapioita kehitetään varmasti lisää lähitulevaisuudessa, eivätkä näihin liittyvät eettiset kysymykset ja viranomaisvaatimukset eroa merkittävästi nykyään käytössä olevista geenihoidoista. Toisaalta CRISPR:n myötä myös ihmisen sukusolujen ja siten jälkeläisille siirtyvien perinnöllisten ominaisuuksien muokkaus on käytännössä mahdollista. Ituradan hoitoihin liittyy teknisten vaatimusten lisäksi perustavanlaatuisia eettisiä kysymyksiä, joihin tiedeyhteisön ja yhteiskunnan on nopeasti luotava selkeä kanta. Onkin korkea aika käydä laajaa keskustelua geenimuokkauksen vaikutuksista ja siitä, mihin menetelmää ollaan tulevaisuudessa valmiita käyttämään. ■

SIDONNAISUUDET
Ei sidonnaisuuksia

KIRJALLISUUTTA

1. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, ym. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012;337:816–21.
2. Cong L, Ran FA, Cox D, ym. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013;339:819–23.
3. Lee HB, Sundberg BN, Sigafos AN, Clark KJ. Genome engineering with TALE and CRISPR systems in neuroscience. *Front Genet* 2016;7:47.
4. Heidenreich M, Zhang F. Applications of CRISPR-Cas systems in neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 2016;17:36–44.
5. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd, ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 2013;31:397–405.
6. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014; 157:1262–78.
7. Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods* 2013;10:957–63.
8. Ran FA, Hsu PD, Wright J, ym. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 2013;8:2281–308.
9. Komor AC, Badran AH, Liu DR. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell* 2017; 169:559.
10. Barrangou R, Doudna JA. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nat Biotechnol* 2016;34:933–41.
11. Cohen J. Mice made easy. *Science* 2016; 354:538–42.
12. Wang H, Yang H, Shivalila CS, ym. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 2013;153:910–8.
13. Tomioka I, Ishibashi H, Minakawa EN, ym. Transgenic monkey model of the polyglutamine diseases recapitulating progressive neurological symptoms. *eNeuro*. 2017;4. DOI: 10.1523/ENEURO.0250-16.2017.
14. Wang X, Cao C, Huang J, ym. One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 2016; 6:20620.
15. Liu Z, Li X, Zhang JT, ym. Autism-like behaviours and germline transmission in transgenic monkeys overexpressing MeCP2. *Nature* 2016;530:98–102.
16. Perrin S. Preclinical research: make mouse studies work. *Nature* 2014;507:423–5.
17. Kesselheim AS, Hwang TJ, Franklin JM. Two decades of new drug development for central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2015;14:815–6.
18. Li M, Zhao L, Page-McCaw PS, Chen W. Zebrafish genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Trends Genet* 2016;32:815–27.
19. Landgrave-Gomez J, Mercado-Gomez O, Guevara-Guzman R. Epigenetic mechanisms in neurological and neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci* 2015;9:58.
20. Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, ym. In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol* 2015;33:102–6.
21. Zuckermann M, Hovestadt V, Knobbe-Thomsen CB, ym. Somatic CRISPR/Cas9-mediated tumour suppressor disruption enables versatile brain tumour modelling. *Nat Commun* 2015;6:7391.
22. Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, ym. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature* 2016;540:144–9.
23. Staahl BT, Benekareddy M, Coulon-Bainier C, ym. Efficient genome editing in the mouse brain by local delivery of engineered Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Biotechnol* 2017;35:431–4.
24. Nie J, Hashino E. Organoid technologies meet genome engineering. *EMBO Rep* 2017;18:367–76.
25. Avior Y, Sagi I, Benvenisty N. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016;17:170–82.
26. Sternecker JL, Reinhardt P, Scholer HR. Investigating human disease using stem cell models. *Nat Rev Genet* 2014;15:625–39.
27. Paquet D, Kwart D, Chen A, ym. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature* 2016;533:125–9.
28. Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature* 2016;539:479.
29. Tang L, Zeng Y, Du H, ym. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Mol Genet Genomics* 2017;292:525–33.
30. Liang P, Xu Y, Zhang X, ym. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell* 2015; 6:363–72.
31. Sheridan C. CRISPR therapeutics push into human testing. *Nat Biotechnol* 2017; 35:3–5.
32. Shin JW, Kim KH, Chao MJ, ym. Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. *Hum Mol Genet* 2016;25:4566–76.
33. Cox DB, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med* 2015;21:121–31.
34. Yin H, Xue W, Chen S, ym. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol* 2014;32:551–3.
35. Bosley KS, Botchan M, Bredenoord AL, ym. CRISPR germline engineering – the community speaks. *Nat Biotechnol* 2015; 33:478–86.
36. Human genome editing: science, ethics, and governance. The National Academies of Sciences Engineering Medicine 14.2.2017. www8.nationalacademies.org/onpinews/newsitem.aspx?RecordID=24623&_ga=2.103921600.1511061303.1493105405-1090100874.1493105321#.WP77G450Yio.link.

SUMMARY

Unravelling the etiology of central nervous system disease using CRISPR gene-editing

The CRISPR-“gene-scissors”-method is considered one of the major scientific breakthroughs of this decade. The CRISPR-method provides an accurate and efficient means to generate sequence-specific changes in the genome. It is currently the simplest, most versatile and precise method of genetic manipulation. The method has revolutionized functional genomics and the landscape of research in neurological disease mechanisms. New model systems, including animal models and stem cell derived in vitro models, have accelerated the pace of basic research and opened new avenues for drug development. CRISPR-based techniques hold potential for gene therapy applications for some hereditary neurological disorders. The CRISPR-method can also be used to modify genes in human germ line, which raises many ethical and environmental questions. Broad societal and professional discussion is thus needed to agree on general guidelines for the use of CRISPR-based gene modification methods.