

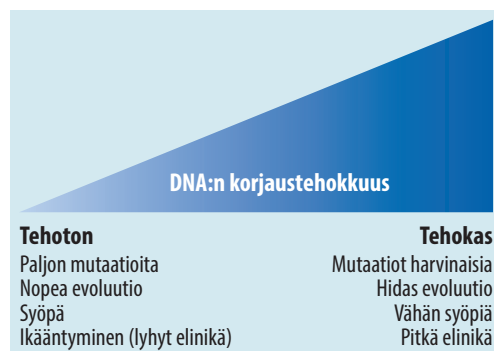
Saara Ollila ja Jaan-Olle Andressoo

DNA-korjauksen kahdet kasvot: genomin ylläpito ja geenien muokkaus

DNA:n korjausmekanismit ovat kehittyneet säilyttämään DNA-molekyylit riittävän virheettöminä solun ja eliön elinkyvyn säilyttämiseksi sukupolvelta toiselle. Periytyvät muutokset DNA:ssa voivat johtaa perinnöllisiin sairauksiin, mutta toisaalta ne sallivat perimän vaihtelun ja sitä kautta evoluution. Somaattisten kudosten solujen DNA:han kerääntyvät virheet liittyvät lääketieteen näkökulmasta ennen kaikkea syöpien kehitykseen sekä ikääntymiseen, ja DNA:n korjausmekanismien tutkimus onkin aiemmin liittynyt pääasiallisesti näihin ilmiöihin. Viime aikoina valtavasti kehittyneet geenien muokkausmenetelmät, kuten CRISPR-Cas, luovat uusia mahdollisuuksia hoitaa ihmisten sairauksia genomia muokkaamalla. Solunsisäiset DNA:n korjausmekanismit ovat keskeisiä ja luovat reunaehdot genomin muokkaukselle.

A itotumallisten eliöiden solujen DNA:han on kirjattu tieto siitä, miten solu rakennetaan ja miten sitä ylläpidetään. Solun kemialliset komponentit, esimerkiksi proteiinit, lipidit ja ribonukleiinihapot voidaan tarvittaessa rakentaa uudelleen DNA:n sisältämän informaation perusteella. Itse DNA:n perustehtävä on toisaalta pysyä vakaana solun vaihtuvassa ympäristössä, mutta toisaalta kuitenkin riittävän vaihtelevana, jotta yksilön ilmiönsu erillisuus ja muuntuvuus mahdollistavat jatkuvan evoluution.

Riittävän tehokkaat DNA-virheiden tunnistus- ja korjausmekanismit ovat mahdollistaneet monimutkaisten ja pitkäikäisten eliöiden kehittymisen. Pienistä sekvenssvaihteluista voidaan kiittää korjausmekanismien ajoittaisia epäonnistumisia, sillä vaikka virheiden seuraukset voivat olla kohtalokkaita, ne ovat välttämättömiä lajin evoluution kannalta. Evoluutiossa tärkeää onkin ollut nimenomaan riittävien mutta epätäydellisten mekanismien kehittyminen. Ilman mutaatioita bakteeri ei voisi kehittää vastustuskykyä mikrobilääkkeille, virus ei voisi muuntua immuunijärjestelmälle tunnistamattomaksi eivätkä suuremmat eliöt kuten ihmiset kehittää hyödyllisiä ominaisuuksia, esimerkiksi suurikokoisia aivoja (KUVA 1).



KUVA 1. DNA:n korjausteho mahdollistaa pitkän elinajan. DNA:n korjausmekanismien täytyy toimia riittävän hyvin mahdollistaakseen eliön elinkyvyn lisääntymisikäiseksi, mutta riittävän epätarkasti mahdollistaakseen evoluution. Tämä tasapaino vaihtelee huomattavasti lajien välillä.

Mistä DNA-vauriot johtuvat ja miten niitä korjataan?

DNA voi vaurioitua tai muuttua lukuisista eri syistä ja eri tavoilla, ja erilaisille muutoksille on omat korjaussysteeminsä. Esimerkiksi pienet DNA:n emästen kemialliset muutokset, kuten deaminaatiot, eivät aiheuta muutosta itse DNA-molekyylin rakenteeseen, mutta niiden korjautumatta jääminen voi aiheuttaa sekvens-

simuutoksia DNA:n kahdentumisen yhteydessä. Tällaisia pieniä muutoksia tapahtuu jokaisessa solussa tuhansia joka päivä esimerkiksi happiradikaalien reagoitessa DNA:n kanssa. Niiden korjauksesta vastaa emäksenkorjaus (base excision repair, BER) -mekanismi, joka tunnistaa ja vaihtaa vioittuneen emäksen. Nukleotidinpoistokorjaus (nucleotide excision repair, NER) puolestaan korjaa isompia DNA:n rakenteeseen vaikuttavia muutoksia, joita aiheuttavat esimerkiksi UV-säteily tai tietyt syöpäainekset kuten sisplatiini.

Vakavimpia DNA-vaurioita soluille ovat DNA:n kaksoisjuosteen katkokset, joiden korjaukseen on kehittynyt erilaisia korjausmekanismeja. Non-homologous end joining (NHEJ) -korjaus on aktiivinen suurimmassa osassa erilaistuneista, jakautumattomista soluista. NHEJ-proteiinit tunnistavat katkenneet kromosomin päät ja yhdistävät ne mahdollisimman nopeasti välittämättä deleetiosta, joka jää sekvenssiin korjauksen yhteydessä.

Homologiaohjattu korjaus (homology directed repair, HDR) puolestaan on mekanismi, jolla rikkoutunut kromosomi korjataan käyttämällä sisarkromatidin sekvenssiä mallijuosteena, jolloin saavutetaan virheetön korjaus. HDR on aktiivinen ainoastaan jakautuvissa soluissa, esimerkiksi suku- ja kantasoluissa.

Kolmas tapa liittyy kaksoisjuosteiden katkokset on mikrohomologiavälitteinen yhdistäminen (microhomology-mediated end joining, MMEJ), jossa juosteet liitetään yhteen katkoskohdan ympärillä olevan 5–25 emäsparin pituisen homologisen selvessin kohdalta. DNA:n katkoskohtaa ympäröivät lyhyet homologiset sekvenssit pariutuvat siis yksijuosteisina toisiinsa, ja DNA:han jää deleetio, joka vastaa homologisten sekvenssien etäisyyttä toisistaan.

DNA:n tulee kopioitua tarkasti jokaisen solunjakautumisen yhteydessä. Ihmisen DNA:n kopiointi kestää noin kymmenen tuntia, ja sinä aikana kopioidaan diploidin genomien yli kuusi miljardia emäsparia, mikä vastaa reilua tuhatta keskimittaista romaania. DNA:ta kopioivat polymeerasientsyymit tekevät oikolukuominaisuutensa ansiosta virheitä vain joka kymmenennenmiljoonannen emäksen kohdalla. Näiden virheiden korjauksesta vastaa DNA:n

kahdentumisvirheiden korjaus (mismatch repair, MMR), joka tunnistaa ja korjaa vielä 99 % näistä virheistä. Tällöin tytärsoluun kopioitua DNA on lähes identtinen malli-DNA:n kanssa.

DNA-virheiden kertyminen somaattisiin soluihin: syöpä ja ikääntyminen

Sukupolvelta toiselle periytyvien DNA-muutosten lisäksi myös somaattisten solujen DNA muuttuu yksilön ikääntymisen yhteydessä: kromosomien päitä suojaavat toistojaksot, telomeerit, lyhenevät, ja mutaatiomäärä lisääntyy. Somaattisiin soluihin kertyvien mutaatioiden tunnetuin seuraus on syövän kehittyminen.

Periytyvät mutaatiot DNA:n korjausproteiineja koodaavissa geeneissä johtavat mutaatioiden kertymisen nopeutumiseen, ja tähän ilmiöön liittyvä suuri syöpäriski on vahvistanut syövän olevan pääosin geneettinen sairaus. BER-systeemin mutaatiot liittyvät esimerkiksi kolorektaalisyöpään, tiettyjen NER-mutaatioiden kantajien riski sairastua ihosyöpiin on yli 2 000-kertainen ja MMR-geenien mutaatiot altistavat muun muassa paksusuoli- ja kohdunlimakalvosyöville (1–4). Periytyvään rintasyöpään liittyvät BRCA1- ja BRCA2-geenit ovat osa HDR-koneistoa (5).

Syöpäalltiuden ja DNA:n korjausmekanismien välisen yhteyden selvittyä DNA:n korjausmekanismien tutkimus lisääntyi valtavasti. Se palkittiin vuonna 2015 kemian Nobelin palkinnolla.

Syöpäalltiuden lisäksi ihmisen ikääntymiseen liittyy monenlaisia oireita, joista osa voi johtua ikääntyvissä soluissa tapahtuvasta telomeerien lyhenemisestä (6). Toisaalta myös DNA-vaurioiden kertyminen soluihin voi olla syynä ikääntymiseen liittyville oireille, ja osalle NER-geenien mutaatioita kantavista potilaista kehittyikin ennen aikaista vanhenemista aiheuttava Cockayne oireyhtymä tai COFS-oireyhtymä (cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome), joihin liittyy dementiaa, koordinaatiovaikeuksia, kuulon ja näön heikentymistä sekä osteoporoosia. Erittäin harvinaisissa tapauksissa NER-mutaatiot johtavat sekä syöpä-

alittiuteen että ennenaikaiseen vanhenemiseen (2,3).

Genomin muokkaus: työkalupakki laajenee

Ihmisen genomin sekvensointi on paljastanut yli 75 000 geneettistä poikkeamaa, jotka liittyvät erilaisiin periytyviin sairauksiin (7). Yksi biolääketieteen pitkän aikavälin tavoitteista onkin pystyä parantamaan geneettisiä ja muita sairauksia genomin muokkauksen avulla. Geenimuunneltujen solu- ja eläinmallien luominen edesauttaa geneettisten sairauksien ymmärtämistä sekä mahdollistaa hoitojen prekliinisen testaamisen lyhyemmällä aikavälillä.

Siirtämällä malli-DNA:ta hiirten kantasoluihin onkin HDR:n avulla onnistuttu luomaan esimerkiksi poistogeenisiä hiiriä ja potilasmuutaatioiden hiirimalleja. Geenimuunneltujen hiirien käyttöön kehitetty menetelmä on ollut ratkaisevan tärkeä geenien toiminnan tutkimuksessa ja erilaisten tautimallien luomisessa. Onnistuneiden HDR-tapahtuminen todennäköisyys on kuitenkin pieni, ja tekniikka on työläs ja epävarma.

HDR-tapahtumien todennäköisyyttä ja kohdennetun DNA-muokkauksen eli genomin editoinnin onnistumista voidaan lisätä valtavasti, mikäli muokattavaan kohtaan luodaan DNA:n katkos. Yksi biolääketieteen suurimmista läpimurroista onkin ollut DNA:n kohdennettu katkaiseminen (8). Restriktioentsyymit, jotka tunnistavat ja katkaisevat DNA:ta tiettyjen sekvenssien kohdalta, kuvattiin 1970-luvulla. Meganukleaasit löydettiin 1990-luvulla; ne katkaisevat DNA:ta spesifisesti kohdesekvenssinsä kohdalta, mutta kohdesekvenssien harvinaisuus rajoittaa niiden käyttöä.

Ensimmäiset laajalti käytetyt, riittävän spesifistä sekvenssiä tunnistavat entsyymit olivat sinkkisorminukleaaseja (zing finger nucleases, ZFN) eli proteiineja, jotka tunnistavat tietyn DNA-sekvenssin ja katkaisevat sen. Kasvien patogeeneistä eristetyt transkription aktivaattorin kaltaiset vaikuttajat (transcription activator-like effectors, TALE) puolestaan sitoutuvat kohdesekvenssiinsä. Näihin liitetyn nukleaasin avulla tuotetaan TALEN-entsyymejä, jotka katkai-

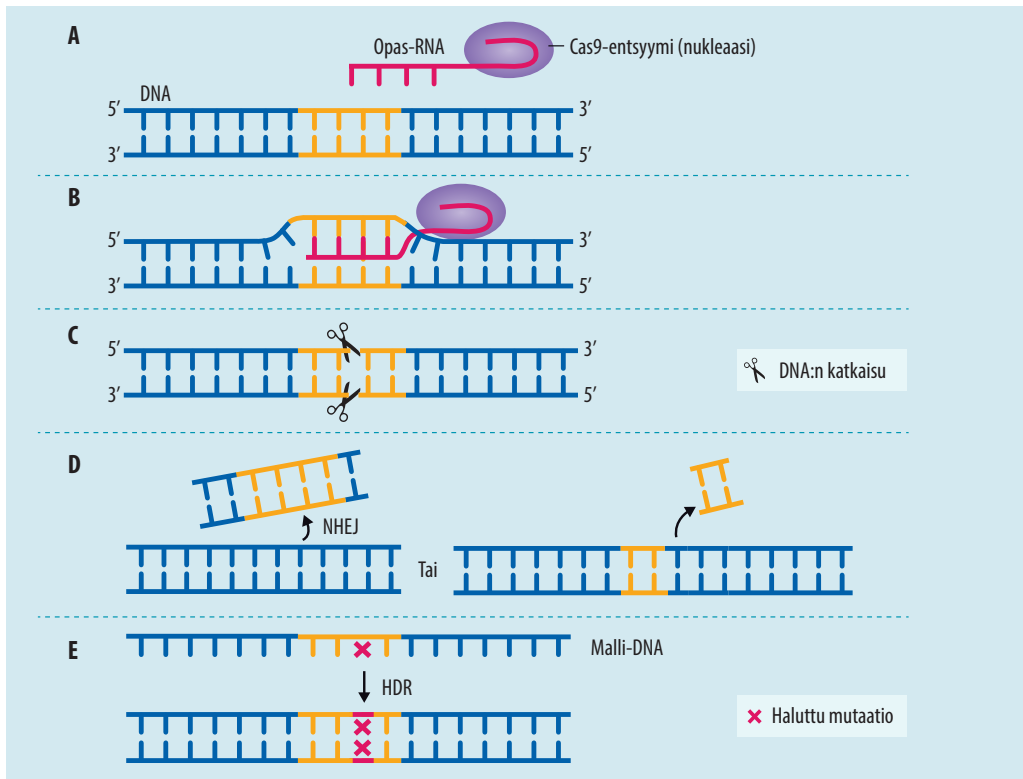
Ydinasiat

- ▶ DNA:n korjausmekanismit ylläpitävät geneettistä informaatiota ihmisen eliniän aikana ja sallivat sen siirron sukupolvesta toiseen.
- ▶ Geenien muokkaus voi mahdollistaa geneettisten sairauksien parantamisen tai oireiden lievittämisen.
- ▶ Geenien muokkaustekniikat kuten CRISPR-Cas käyttävät hyväksi solunsisäisiä DNA:n korjausmekanismeja.
- ▶ CRISPR-Cas-tekniikan ja vastaavien menetelmien käyttökelpoisuus lääketieteessä riippuu kyvystämme hyödyntää ja hallita solunsisäisiä DNA:n korjausmekanismeja.

sevat DNA:ta siitä kohdasta, joihin proteiiniin sekvenssispesifinen osa sitoutuu.

Vaikka sekä sinkkisormi- että TALEN-nukleaasit ovat työläitä ja kalliita tapoja katkaista DNA:ta halutuista kohdista, ne osoittivat, että DNA:n kohdennettu muokkaus on mahdollista. Tämä mahdollisti teoriassa sellaisten sairauksien parantamisen, joissa viallisen geenin tai sen osan poistaminen johtaisi solun toiminnan normalisoitumiseen (8). Esimerkiksi Duchennen lihasdystrofiassa haitallisen eksomin poistaminen sallisi dystrofiniigeenin osittaisen toiminnan ja taudin lieventymisen (9). Huntingtonin taudissa geenin patogeeninen alleeli palautuisi normaalimuotoon, jos ylipitkä polyglutamiinijono poistettaisiin (10).

Vuonna 2012 Jennifer Doudna ja Emmanuelle Charpentier osoittivat bakteerista eristetyt Cas9-nukleaasin leikkaavan DNA:ta opas-RNA:n ohjaamana DNA:n emäskomplementaarista kohdasta (11). CRISPR-Cas-systeemiä kutsuttu tekniikka perustuu bakteerien viruksia vastaan kehittämään puolustusjärjestelmään, jolla bakteeri tuhoaa viruksen sen perimää tunnistavien RNA-sekvenssien avulla. Tämä läpimurto teki genomieditoinnin huomattavasti aiempia sovelluksia helpommaksi ja monipuolisemmaksi.



KUVA 2. CRISPR-Cas9 ja DNA:n kaksoisjuosteen katkoksen korjaus. **A.** Cas9-opas-RNA (gRNA) -kompleksi tunnistaa gRNA:lle komplementaarisen sekvenssin. **B.** Opas-RNA pariutuu kohdesekvenssin kanssa. **C.** Cas9-nukleaasi katkaisee DNA:n molemmat juosteet. **D.** NHEJ-korjaus liittää DNA-juosteiden päät yhteen, jolloin tuloksena on yleensä deleetio, jonka koko vaihtelee. Kuvassa kaksi erilaista deleetiomahdollisuutta. **E.** Homology directed repair (HDR) korjaa katkoksen käyttämällä homologista sekvenssiä mallina, jolloin DNA säilyy virheettömänä ja siihen voidaan lisätä haluttuja muutoksia. Keltainen osa kuvaa opas-RNA:n kohdesekvenssiä.

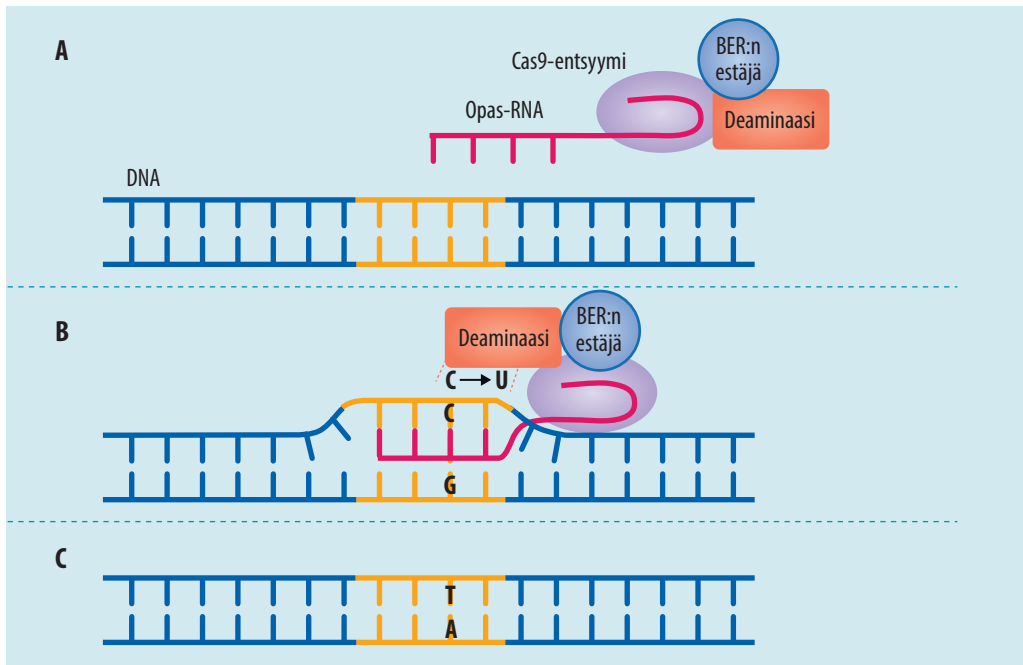
NHEJ = ei-homologisten päiden yhdistäminen, non-homologous end joining

CRISPR-Cas-tekniikassa tarvitaan vain yksi DNA:ta leikkaava entsyymi (esimerkiksi Cas9), ja leikkauskohta voidaan osoittaa helposti ja edullisesti syntetisoitavan RNA-molekyylin avulla. CRISPR-Cas-tekniikan moniin mahdollisuuksiin kuuluvat esimerkiksi DNA-sekvenssin deleetoinen, tietyn mutaation korjaus oikeaksi tai halutun mutaatiosekvenssin luominen sekä halutun uuden sekvenssin kuten fluoresoivan merkkiaineen tai muun merkkiaineen vienti haluttuun genomin kohtaan. Tämä aiempia huomattavasti halvempi, tehokkaampi ja monipuolisempi uusi DNA:n editointisysteemi vaikuttaa seuraavien vuosien ja vuosikymmenien aikana biotekniikan ja biolääketieteen kehitykseen valtavasti (12).

Genomin muokkaus nojaa DNA:n korjausmekanismeihin

Miten DNA:n korjaussysteemit sitten liittyvät genomin muokkaukseen? Genomin editointiin liittyy kolme vaihetta: katkaisukohtan tunnistus, DNA-juosteen katkaisu ja katkaistun kohdan korjaus. Tunnistuksesta ja katkaisusta vastaavat molekyylit on mahdollista viedä editoitaviin soluihin, mutta korjausreaktiossa tarvitaan solun omia DNA:n korjausmekanismeja. Kussakin solussa aktiivisena olevat korjaussysteemit asettavat siis reunaehdot sille, miten genomin editointia voidaan hyödyntää niin perustutkimuksessa kuin bioteknisissä ja biolääketieteellisissä sovelluksissakin (13).

Esimerkiksi geenien poistoissa voidaan hyö-



KUVA 3. Emäsmuokkaus (base editing). A. Cas9-opas-RNA-kompleksi tunnistaa opas-RNA:lle komplementaarisen sekvenssin. Cas9 on modifioitu niin, että siinä ei ole nukleasiaktiivisuutta, ja se on fuusioitu deaminaasientsyymien sekä emäksenkorjauksen (BER) estäjäentsyymien kanssa. B. Opas-RNA pariutuu kohdesekvenssin kanssa ja deaminaasi poistaa sytosiinista aminoryhmän, jolloin se muuttuu urasiiliksi. Normaalisti BER tunnistaisi urasiilin ja korjaisi sen sytosiiniksi. BER:n estäjä estää tämän. C. DNA:n kopioitumisen jälkeen tuloksena on emäsparimuutos C-G → T-A.

BER = base excision repair

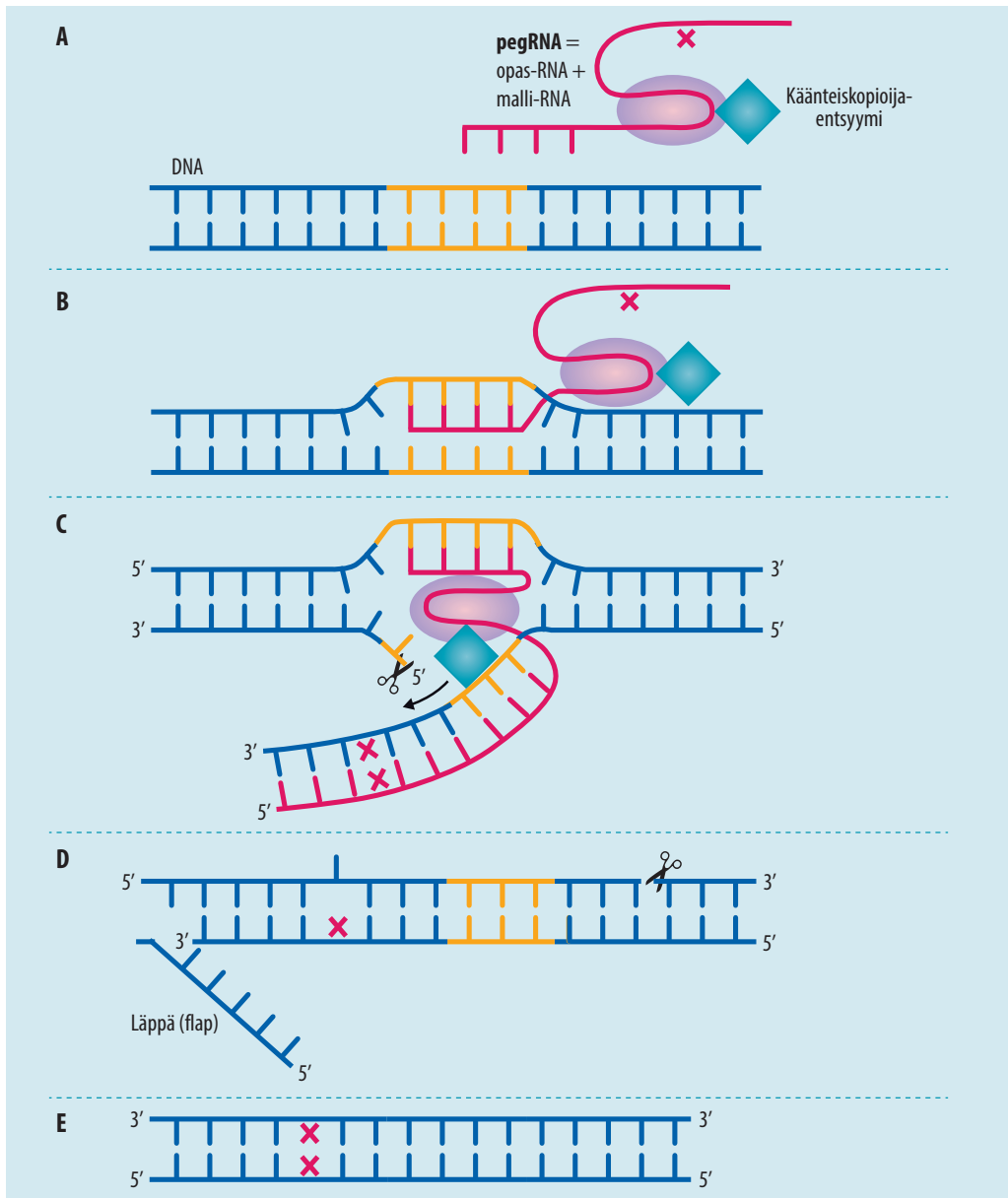
dyntää NHEJ-mekanismia, joka vastaa DNA:n katkoksen korjauksesta jakautumattomissa soluissa, ja tuottaa DNA:han erilaisia deleetioita (KUVAT 2 A–D). MMEJ:n avulla voidaan lisätä sekvenssiä suhteellisen tarkasti tiettyyn genomikohtaan hyödyntämällä mikrohomologiaa, mutta tuloksena on myös pieniä deleetioita. HDR:n mallijuosteena jakautuvissa soluissa on sisarkromatidi, mutta genomieditoinnissa soluun viedään mallijuosteeksi muokattavalle sekvenssille homologinen DNA-molekyyli, jossa on haluttu sekvenssimuutos (KUVAT 2 A–C ja E).

Sairauksia aiheuttavien mutaatioiden tarkka korjaaminen vaatii virheetöntä korjausta eli HDR:ää, joka rajoittaa sen käytön jakautuviin soluihin. Uusiutumattomiin kudoksiin, esimerkiksi aivoihin tai sydämeen, ei tämän vuoksi pystytä tekemään HDR:ään perustuvaa editointia.

Tarkan genomieditoinnin riippuvuutta solussa toimivasta HDR:sta on pyritty kiertämään erilaisilla tavoilla aktivoida HDR-mekanismia

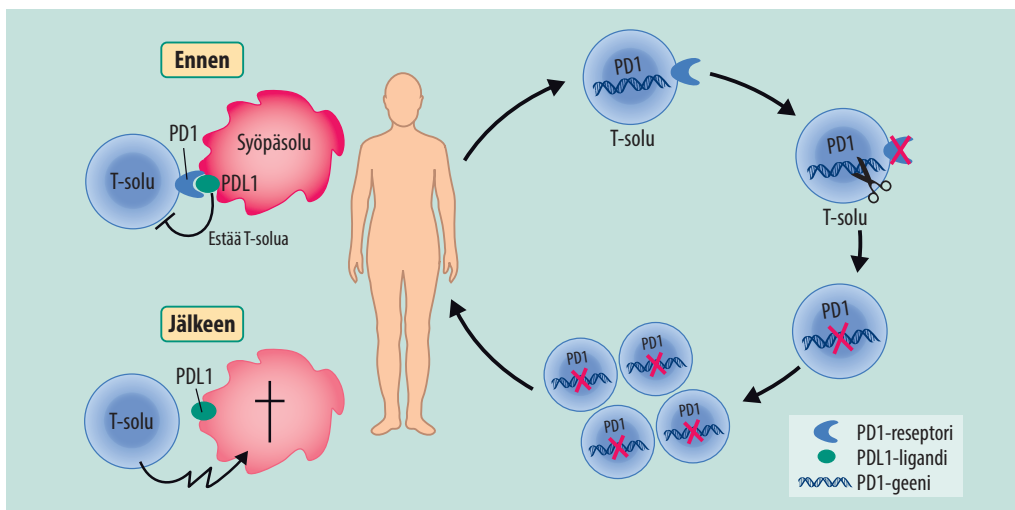
(12–15). CRISPR-Cas-systeemiä on kehitetty myös muokkaamaan DNA-emäksiä ilman kaksoiskierron katkaisua, jolloin voidaan välttää riippuvuus HDR:stä. Emäksen muokkauksella (base editing) voidaan korjata tiettyjä mutaatioita poistamalla Cas9-entsyymistä nukleasiaktiivisuus ja lisäämällä siihen deaminaasientsyymi (KUVA 3).

Deaminaasin avulla sytosiinista voidaan muodostaa urasiili, joka käyttäytyy DNA:ssa tyymiinin tavoin. Vastaavasti adeniinin deaminaatiosta muodostuu inosiini, joka käyttäytyy guaniinin tavoin. Normaalisti BER-systeemi tunnistaa ja korjaa spontaanin sytosiinin deaminaation kautta syntyneet muuntuneet emäkset, mutta emäksen editoinnissa Cas9-entsyymiin on liitetty BER:n toimintaa estävä entsyymi. Rajoituksena emäseditoinnissa on se, että sillä voidaan tuottaa ainoastaan C→T ja A→G-modifikaatioita. Tekniikkaa rajoittaa myös se, että deaminaatioreaktion rajoittaminen vain halut-



KUVA 4. Alukemuokkaus (prime editing). **A.** Alukemuokkaus-opas-RNA:ssa (pegRNA) on sekä opas-RNA että halutun muutoksen sisältävä malli-DNA. pegRNA-Cas9-kompleksi tunnistaa opas-RNA:lle komplementaarisen sekvenssin. Cas9 on modifioitu niin, että se katkaisee vain yhden DNA-juosteen (nickase), ja se on fuusioitu käänteiskopioijaentsyymien kanssa. **B.** pegRNA:n opas-RNA-sekvenssi pariutuu kohdesekvenssin kanssa. **C.** Cas9 leikkaa yhden DNA-juosteen, ja käänteiskopioijaentsyymi jatkaa leikattua juostetta käyttämällä apunaan alukemuokkausosaa pegRNA:ssa, johon sisältyy alukesekvenssi sekä mallisekvenssi,

joka sisältää halutun DNA-muutoksen. **D.** Kaksi versiota DNA:n toisessa juosteessa muokatusta kohdasta: haluttu mutaatio ja alkuperäinen sekvenssi, joista kumpi tahansa voi jäädä pariutumatta toisen juosteen kanssa (lappä, flap). Solun endo- ja eksonukleasit poistavat läpän, ja kun alkuperäinen sekvenssi poistetaan, DNA:n toisessa juosteessa on mutaatio ja toisessa ei. Editoimattomaan juosteeseen induoidaan katkos (nick) Cas9-nikaasin (nickase) avulla. **E.** Kahdentumismisvirheiden korjaus (MMR) korjaa heterodupleksin alkuperäisen juosteen editoidun mukaiseksi. MMR = mismatch repair



KUVA 5. Esimerkki geenimuokkauksen mahdollisuuksista syövän immuunihoidossa: PD1-reseptorin poisto T-soluista. Syöpäpotilaalta eristetään T-soluja, joista poistetaan PD1-reseptori esimerkiksi CRISPR-Cas9-menetelmällä. PD1-poistogeenisiä T-soluja kasvatetaan ex vivo, ja ne siirretään takaisin potilaaseen, jolloin syöpäsolujen ilmentämä PD1-ligandi (PDL1) ei voi sitoutua reseptoriin ja estää T-solun toimintaa syöpäsolun tappajana.

tuun emäkseen on hankalaa (14).

Lokakuussa 2019 julkaistiin uusi CRISPR-Cas-systeemin käytettävyyttä mahdollisesti lisäävä läpimurto, alukkeisiin perustuva muokkaus (prime editing) (KUVA 4). Tässä alukemuokkaustekniikassa Cas9-proteiini on muokattu tekemään kaksoisjuosteen sijaan vain yhden DNA-juosteen katkoksen. Tämän lisäksi Cas9:ään liitettiin viruksen käänteiskopioijaentsyymi, joka voi syntetisoida DNA:ta käyttämällä RNA:ta mallina (15). Halutun mutaation sisältävä malli tuotiin soluun erillisen DNA:n sijaan RNA:na, joka oli fuusioitu opas-RNA-molekyylin, jolloin DNA:han saatiin luotua haluttuja muutoksia ilman HDR:n apua. Tutkimuksessa hyödynnettiin sen sijaan toista DNA:n korjausmekanismia, MMR:ää, joka korjaa DNA:n kahdentumisessa syntyviä virheitä tunnistamalla rakenteilla olevassa DNA-juosteessa olevan katkoksen. Lisäämällä editoimattomaan DNA-juosteeseen katkos saatiin MMR korjaamaan editoimaton juoste editoidun kaltaiseksi, mikä lisäsi editoinnin luotettavuutta merkittävästi. Käyttämällä hyväksi CRISPR-Cas-periaatetta luotiin näin systeemi, jolla DNA:ta editoitiin tarkasti käyttämällä MMR-korjausta, ilman pullonkaulaksi muotoutunutta HDR:ää (15).

Geenimuokkaus lääketieteessä: mahdollisuuksia, rajoitteita ja eettisiä näkökohtia

Genomieditointitekniikoiden kehitys avaa lukemattomia mahdollisuuksia parantaa tai lieventää erilaisia sairauksia. Tarvittavat työkalut lääketieteelliseen genomieditointiin ovat jo olemassa, esimerkiksi virusvektorit, joilla voidaan viedä malli-DNA, Cas-entsyymi ja opas-RNA soluihin. Vaikka geenimuuntelulla ei voitaisikaan hoitaa koko kehon tai kudoksen soluja, joissakin tapauksissa DNA:n korjaaminen vain osaan soluista voisi olla riittävää. Useita kliinisiä kokeita, joissa käytetään CRISPR-Cas9-tekniikkaa ja muita genomieditointitekniikoita, onkin jo käynnissä (16).

Erityisesti syövän immuunihoidoissa on käynnissä useita genomieditointia hyödyntäviä kokeita. Syöpäsolut välttelevät immuunijärjestelmää ilmentämällä PDL1-ligandia, joka estää tappaja-T-solujen aktiivisuutta sitoutumalla niiden pinnalla olevaan PD1-reseptoriin (KUVA 5). Genomieditointia hyödyntävässä immuunihoidossa syöpäpotilaasta eristetyistä T-soluista poistetaan editoinnin avulla PD1-reseptori ex vivo. Kun PD1-poistogeeniset T-solut siirretään takaisin potilaaseen, tavoitteena

TAULUKKO. Yhteenveto DNA:n korjaussysteemien käytöstä genomieditointisovelluksissa.

DNA:n korjaus-systeemi	Genomin editointitekniikka	Entsyymi	Editointi	Rajoitukset
Ei-homologisten päiden yhdistäminen (NHEJ)	CRISPR-Cas Sinkkisorminukleaasi TALEN	Cas-nukleaasi Fok1	Deleetiot	Deleetioiden kokoa vaikeaa rajoittaa, off-target-editointi
Homologiaohjattu korjaus (HDR)	CRISPR-Cas Sinkkisorminukleaasi TALEN	Cas-nukleaasi Fok1	Tarkat sekvenssi-muutokset	Heikko HDR-teho somaattisissa soluissa
Mikrohomologia-välitteinen yhdistäminen (MMEJ)	CRISPR-Cas Sinkkisorminukleaasi TALEN	Cas-nukleaasi Fok1	Mikrohomologisten alueiden väliset insertiot ja deleetiot	Deleetiot kohdesekvenssissä, tarkka korjaus mahdollista vain rajallisesti (homologisten sekvenssien sijainnin mukaan)
Emäksenkorjaus (BER)	Emäsmuokkaus (base editing)	Inaktiivinen Cas9, deaminaasi ja BER:n estäjä	Emästen muutokset (CàT, AàG)	Vain rajalliset emäsmuutokset mahdollisia, off-target-editointi, in vivo -tehokkuus tuntematon
Kahdentumisvirheiden korjaus (MMR)	Alukemuokkaus (prime editing)	Muokattu Cas9 (nikaasi, nickase), käänteiskopioija-entsyymi	Tarkat sekvenssi-muutokset, tehokkaampi menetelmä	Uusi teknologia, in vivo -tehokkuus tuntematon, off-target-editointia tutkittu rajallisesti

BER = base excision repair, HDR = homology directed repair, MMEJ = microhomology mediated end joining; MMR = mismatch repair, NHEJ = non-homologous end joining, TALEN = transkription aktivaattorin kaltainen vaikuttajanukleaasi

on, että syöpäsolut eivät pysty estämään niitä vaan T-solut tappavat syöpäsoluja tehokkaasti (KUVA 5).

HIV-infektion hoidossa genomieditoinnilla puolestaan pyritään poistamaan auttaja-T-soluista CCR5-geeni, jonka ilmentyminen mahdollistaa HI-viruksen tehokkaan siirtymisen näihin soluihin. Ensimmäisissä kokeissa CCR5-poistogeenisten T-solujen siirto potilaisiin on osoittautunut turvalliseksi, ja tehokkuutta mittaavat kokeet ovat käynnissä (16).

Monista mahdollisuuksista huolimatta genomieditointi ei ole helppoa eikä ongelmatonta. Yksi merkittävä haaste on editoinnin kohdistuminen ei-toivottuun sekvenssiin. CRISPR-Cas-systeemissä opas-RNA ohjaa nukleaasin leikkaamaan tietystä sekvenssikohdasta, mutta nukleaasi voi katkaista DNA:ta myös muualta, mikä saattaa johtaa haitallisiin muutoksiin (väärä kohdennus, off-target). Toisaalta myös oikeassa leikkauskohdassa korjausreaktio saattaa toimia väärin ja johtaa suurien kromosomi-alueiden deleetioihin. Myös emäsmuokkauksessa on vaativaa rajata editointi vain haluttuun emäkseen (14). Luotettava väärin muutosten

välttämisen on avainasemassa turvallisessa geenimuokkaukseen perustuvassa geenihoidossa.

Genomin muokkaustekniikoiden kehittymiseen ja lääketieteellisiin sovelluksiin liittyy luonnollisesti myös valtavia eettisiä haasteita. Vuonna 2018 kiinalainen tutkija He Jiankui paljasti käyttäneensä CRISPR-Cas-menetelmää muokatakseen koeputkihedelmitettyjen munasolujen perimää suojellakseen syntyviä vauvoja HIV-infektiolta poistamalla vauvojen genomista toimivan CCR5-geenin. Tämä Kiinan lain vastainen tapaus herätti laajaa järkytystä maailmanlaajuisesti.

On selvää, että suku- ja sukusolujen muokkaamista ei tule tehdä ainakaan tässä vaiheessa, kun ei voida olla varmoja geenieditoinnin mahdollisista haittavaikutuksista. Genomin muokkaustekniikoiden kehittyessä käydäänkin kiivasta pohdintaa niiden käytön eettisistä pelisäännöistä (12). Jos (kun) genomieditointitekniikat mahdollistavat esimerkiksi periytyvää sairautta sairastavien jälkeläisten perimän korjaamisen turvallisesti, kuka määrittää, millaisia korjauksia genomiin on eettistä tehdä?

Lopuksi

DNA:n korjausmekanismit takaavat DNA:n riittävän vakauden soluissa. Tutkijat ovat valjastaneet samat mekanismit käyttöönsä pyrkimyksissään muokata genomia tarkasti ja virheettömästi (**TAULUKKO**). Jää nähtäväksi, voidaanko CRISPR-Cas-tekniikalla muokata ihmisen genomia lääketieteellisessä tarkoituksessa turvallisesti ja tehokkaasti, mutta viimeaikaisten läpimurtojen valossa tämä näyttää todennäköiseltä.

SAARA OLLILA, FT, akatemiutkija

Translationaalisen syöpälääketieteen tutkimusohjelma, lääketieteellinen tiedekunta, Helsingin yliopisto

JAAAN-OLLE ANDRESSOO, FT, dosentti

Translationaalinen neurobiologia, lääketieteellinen tiedekunta, Helsingin yliopisto
Helsinki Institute of Life Sciences

Joka tapauksessa kykymme käyttää solun luontaisia DNA:n korjausmekanismeja hyväksemme määrittää sen, kuinka hyvin pystymme editoimaan genomia haluamallamme tavalla. DNA:n korjausmekanismit ovat siis jälleen kerran biolääketieteen, eivät pelkästään syövän ja ikääntymisen, vaan myös DNA:n muokkauksen tutkimuksen kohteena. ■

VASTUUTOIMITTAJA

Seppo Meri

SIDONNAISUUDET

Saara Ollila: Ei sidonnaisuuksia

Jaana-Olle Andressoo: Ei sidonnaisuuksia

KIRJALLISUUTTA

- Wallace SS, Murphy DL, Sweasy JB. Base excision repair and cancer. *Cancer Lett* 2012;327:73–89.
- Andressoo J-O, Hoeijmakers JHJ, de Waard H. Nucleotide excision repair and its connection with cancer and ageing. *Adv Exp Med Biol* 2005;570:45–83.
- Marteijn JA, Lans H, Vermeulen W, ym. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:465–81.
- Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, ym. Milestones of Lynch syndrome: 1895–2015. *Nat Rev Cancer* 2015;15:181–94.
- Zhao W, Wiese C, Kwon Y, ym. The BRCA tumor suppressor network in chromosome damage repair by homologous recombination. *Annu Rev Biochem* 2010;88:221–45.
- Razgonova MP, Zakharenko AM, Golkhvast KS, ym. Telomerase and telomeres in aging theory and chronographic aging theory (review). *Mol Med Rep* 2020;22:1679–94.
- Landrum MJ, Lee JM, Benson M, ym. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res* 2016;44:862–8.
- Fernández A, Josa S, Montoliu L. A history of genome editing in mammals. *Mamm Genome* 2017;28:237–46.
- Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, ym. Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports* 2015;4:143–54.
- Malankhanova TB, Malakhova AA, Medvedev SP, ym. Modern genome editing technologies in Huntington's disease research. *J Huntingtons Dis* 2017;6:19–31.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, ym. A Programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012;337:816–21.
- Uddin F, Rudin CM, Sen T. CRISPR gene therapy: applications, limitations, and implications for the future. *Front Oncol* 2020;10:264.
- Broeders M, Herrero-Hernandez P, Ernst M, ym. Sharpening the molecular scissors: advances in gene-editing technology. *iScience* 2020;23:100789.
- Rees HA, Liu DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat Rev Genet* 2018;19:770–88.
- Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, ym. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 2019;576:149–57.
- Ernst MPT, Broeders M, Herrero-Hernandez P, ym. Ready for repair? Gene editing enters the clinic for the treatment of human disease. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2020;18:532–57.