



Kandidaatintutkielma

CRISPR-Cas-menetelmän hyödyntäminen
amyotrofisessa lateraaliskleroosissa nyt ja
tulevaisuudessa

Tino Laakkonen

Oulun yliopisto
Biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunta

2021

Sisällysluettelo

Käytetyt lyhenteet	3
1. Neuronit.....	5
1.1. Liikehermosolu.....	5
1.1.1. Ylempi liikehermosolu	6
1.1.2. Alempi liikehermosolu	6
2. ALS	7
2.1 Rappeutumisen tekijät	8
2.1.1. TDP-43	8
2.1.2. C9orf72.....	9
2.1.3. SOD1	10
3. CRISPR.....	12
3.1. CRISPR-Cas-menetelmän toiminta.....	13
3.1.1. CRISPR-Cas luokka 1	14
3.1.2. CRISPR-Cas luokka 2.....	17
4. CRISPR-Cas-systeemin hyödyntäminen ALS:n hoidossa.....	21
4.1. CRISPR-Cas9-menetelmän hyödyntäminen SOD1-geenimutaatiossa	22
4.2. CRISPR-Cas9-menetelmän hyödyntäminen C9orf72-geenimutaatiossa	23
5. ALS:n hoitaminen CRISPR-Cas9:n avulla tulevaisuudessa	24
6. Kiitokset	25
7. Kirjallisuusviitteet	25

Käytetyt lyhenteet

ALS	Amyotrofinen lateraaliskleroosi
SOD1	Superoksididismutaasi 1
C9orf72	9. kromosomin 72. avoin lukukehys
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
Cas9	CRISPR associated protein 9
TDP-43	TAR DNA-binding protein of 43 kDa
FTLD	Frontotemporal lobar degeneration
RBP	RNA-binding protein
DPR	Dipeptide repeat proteins
mRNA	Messenger-RNA
WT	Wild type
UPR	Unfolded protein response
ERAD	Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation
crRNA	CRISPR RNA
NHEJ	Non-homologous end joining
HR	Homologous recombination
RAMPs	Repeat-Associated Mysterious Proteins
RRM	RNA Recognition Motif
PAM	Protospacer-adjacent motif
SF2	Superfamily 2
HD	Histidine-Aspartate
ATP	Adenosine triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid

RNA	Ribonucleic acid
NUC	Nuclease (domain)
REC	Recognition (domain)
tracrRNA	trans-acting CRISPR RNA
Cpf1	CRISPR from <i>Prevotella</i> and <i>Francisella</i> 1
C2c2	CRISPR associated protein 13a
HEPN	Higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding
AAV9-SaCas9-sgRNA	Adeno-associate virus staphylococcus aureus cas9
ICV	Intracerebroventricular injection
iPSC	Induced pluripotent stem cell

1. Neuronit

Neuronit eli hermosolut ovat tärkeitä soluja ihmisille ja muillekin eliöille. Hermosolujen päätehtävänä on lähettää sähköimpulsseja, jotka toimivat viesteinä ja tietona muille soluille. Neuronit koostuvat soomasta, joka on neuronin runko-osa, jossa sijaitsee tuma ja muut soluelimet, tuojahaarakkeista eli dendriiteistä, jotka tuovat muiden neuronien viestejä, aksonista eli viejähaarakkeesta, joka välittää tietoa eteenpäin sekä viejähaarakkeen päätteestä, joka kiinnittyy toiseen neuroniin tai lihakseen. Neuronit toimivat viestinvälittäjinä muuttamalla aksonien solukalvolla olevaa aktiopotentiaalia eli sähköistä impulssia. Muutos tässä potentiaalissa johtaa viestin etenemiseen pitkin aksonin solukalvoa kohti synapsia. Lepotilassa tämä aktiopotentiaali on noin -60 mV ja se voi kohota korkeimmillaan jopa +50 mV:iin. Tätä muutosta kutsutaan solukalvon depolarisaatioksi ja se polarisoidaan nopeasti takaisin normaaliin lepotilaan. Muutos tapahtuu kalium- ja natriumionien avulla, joita pumpataan solukalvon sisälle ja ulos johtaen jännite-eroon ja potentiaalın kasvuun tai laskuun. Tämä nopea viesti kulkeutuu aina aksonin päähän ja sieltä se pystytään välittämään toisille neuroneille synapsien välityksellä (Lodish et al., 2000).

Synapsit toimivat siten, että viestin mukana tuleva potentiaalın muutos vaikuttaa kalsiumionien Ca^{2+} lukumäärälliseen kasvuun sytosolissa. Kalsiumionien suuri määrä johtaa vesikkelien muodostumiseen aksonin päässä olevasta solukalvosta. Nämä vesikkelit irtoavat aksonin päästä ja liikkuvat synapsiraon läpi vastaanottajasolun reseptoreihin. Tämä solu on yleisesti toinen neuronit tai lihas. Vesikkelin kiinnittyessä reseptoriin se voi aiheuttaa vastaanottajasoluun sähköistä häiriötä aiheuttaen aktiopotentiaalın ja näin viestin kulkeminen jatkuu kohti sen kohdetta (Lodish Harvey et al., 2000). Neuroneita on kuitenkin useita erilaisia ja amyotrofiseen lateraaliskleroosiin liittyy pääsääntöisesti liikehermosolut, joten niihin perehdytään enemmän tässä kirjallisuuskatsauksessa.

1.1. Liikehermosolu

Liikehermosolu on rakenteeltaan neuronin kaltainen, mutta siinä on aksonin ympärille kääriytynyt myeliinituppi, joka suojaa aksonia ja se toimii samalla myös eristeenä, jotta aksonia pitkin kulkeva viesti siirtyisi tehokkaasti sen päätepisteeseen (Heino & Vuento, 2015). Nämä myeliinitupet nopeuttavat viestin etenemistä siten, että potentiaalın muutokseen tarvittava ionien pumppaus tapahtuu tuppien väliin muodostuvissa kuroumissa. Näitä kuroumia kutsutaan Ranvierin kuroumiksi ja ne ovat ainoita paikkoja liikehermosolussa, jotka ovat kosketuksissa

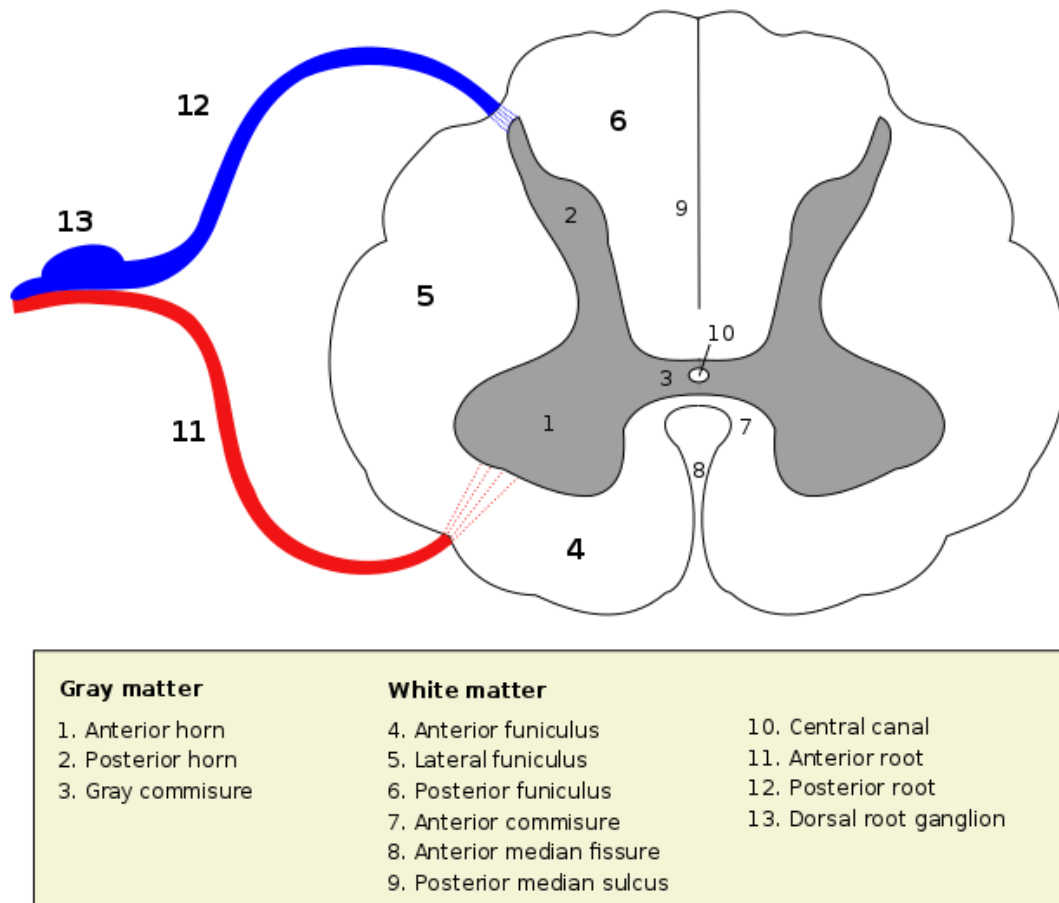
solukalvon ulkopuoliseen nesteeseen. Liikehermosolua etenevä viesti siis kulkee tupprien väliin muodostuvia kuroumia pitkin nopeuttaen viestin kulkemista lihaksiin ja rauhasiin (Kent Michael, 2000). Liikehermosoluja on kuitenkin useammassa paikassa ja ne voidaan jakaa kahteen eri osioon: ylempiin- ja alempiin liikehermosoluihin

1.1.1. Ylempi liikehermosolu

Ylemmät liikehermosolut löytyvät ihmisiltä aivoista ja niiden läheisyydestä. Ylemmät liikehermosolut lähettävät aivoista tulevaa viestiä pitkiä aksoneita pitkin aivorunkoon ja sieltä aina selkäyttimeen asti (Brown & Al-Chalabi, 2017). Ylemmät liikehermosolut ovat siis osa keskushermostoa, koska ne yhdistävät aivot ja selkäytimen hermosolujen avulla. Ylempiä liikehermosoluja suojaavat myeliinitupet nopeuttavat viestin siirtymistä alemmille liikehermosoluille (kuva 1).

1.1.2. Alempi liikehermosolu

Alempi liikehermosolu on rakenteeltaan samanlainen muiden liikehermosolujen kanssa. Aksonia suojaavan kerroksen nimi on Schwannin solu, joka toimii samalla tavalla kuin myeliinituppi, nopeuttaen viestiä ja suojaen hermosolua (Heino & Vuento, 2015). Alempi liikehermosolu kuuluu periaatteessa keskushermostoon sekä ääreishermostoon, koska sen sooma sijaitsee keskushermoston puolella, mutta sen pitkät aksonit kuuluvat ääreishermostoon. Nämä alemmat liikehermosolut toimivat viestin viejinä keskushermostosta lihaksiin ja rauhasiin ympäri kehoa, joten ne ovat todella merkittäviä varsinkin ALS:in tutkimisessa (Davis-Dusenbery et al., 2014).



Kuva 1 Poikkileikkaus selkäytimestä. Numerossa 1 eli “etusarvessa” sijaitsevat suuret liikehermosolut, jotka rappeutuvat ALS-taudin aiheuttamina. Punainen “juuri” toimii hermosoluna, joka välittää viestiä eteenpäin ääreishermostoon selkäytimestä. Kuva: Polarlys, CC BY-SA 3.0 <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>, Wikimedia Commons.

2. ALS

ALS eli amyotrofinen lateraaliskleroosi on liikehermosolusairaus, jossa liikehermosolut rappeutuvat suhteellisen nopeasti, koska tauti johtaa kuolemaan yleensä n. 2-3 vuoden kuluttua taudin toteamisesta. ALS vaikuttaa lihaksiin, jotka surkastuvat liikehermosolujen rappeutumisen yhteydessä, koska liikehermosolut eivät voi kuljettaa viestiä lihaksiin. Rappeutuminen johtaa elintärkeiden lihasten rappeutumiseen, joka lopulta johtaa kuolemaan (Gordon, 2011). Ensimmäisiä raporteja ALS-taudista löytyi jo vuodelta 1824, jolloin Charles

Bell huomasi tautia muistuttavia oireita. Itse tauti sai nimensä vuonna 1874, kun Jean-Martin Charcot käytti nimitystä ensimmäisen kerran julkaisemassaan raportissa (Rowland, 2001). ALS:in yleisyys ei kuitenkaan ole kovin suurta Euroopassa (2–3 sairasta 100 000 ihmistä kohden), mutta se on kuitenkin yleisin liikehermosolu sairaus (Hardiman et al., 2017). Yleisimmät ALS-taudin aiheuttajat ovat tuntemattomia ja vain kymmenesosa taudeista on peräisin perheen jäseneltä, jolla on itsellään ALS tai suvussa on ollut ALS-tautia (Van Damme, Robberecht, & Van Den Bosch, 2017). Tautiin ei ole keksitty parantavaa lääkettä tai hoitoa, mutta on olemassa sitä hidastavia lääkkeitä, kuten riluzole, joka mukauttaa aivojen hermosoluissa tapahtuvaa glutaminergistä viestinvälitystä (Bensimon et al., 1994).

2.1 Rappeutumisen tekijät

Taudissa liikehermosolut siis rappeutuvat, jotta ne eivät voi kuljettaa viestejä eteenpäin. Mikroskooppisissa tutkimuksissa on huomattu, että hermosolujen myeliinitupet kuluvat pois selkäytimen etu- ja takapuolella. Tämä väheneminen on huomattavissa helposti myeliiniin jäämillä, kuten luxol fast bluella. Tämä kiinnittyy myeliinitupen lipoproteiinien emäksiin ja värjätessä myeliini ilmenee sinisenä. Muitakin keinoja on huomattu, kuten isojen tyhjien tilojen sijaitseminen neuronien lähellä, jolloin neuronit eivät välitä viestiä eteenpäin sekä vakuolisaatiota (Saber et al., 2015).

2.1.1. TDP-43

ALS:a on myös tutkittu molekuläärisellä tasolla. Tällä tasolla on huomattu muutamia keinoja, jotka saattavat aiheuttaa tautia. Näistä yleisin on TAR DNA-binding protein of 43 kDa eli TDP-43. Tätä proteiinia on huomattu yli 90 %:lla ALS:a sairastavista henkilöistä, mutta sitä koodavan geenin (TARDBP) mutaatio ei aiheuta kuin muutaman prosentin kaikista ALS-tapauksista. TDP-43-proteiini on mukana RNA:n säännöstelyn eri vaiheissa. Proteiinin toimintaa ja tasoja säädelään todella tarkasti, koska se on kriittinen solun toiminnalle. Tämä pääasiassa sen takia, koska proteiini aiheuttaa solujen kuolemaa, jos sitä on siellä liikaa tai sen sijainti on väärä. Liika TDP-43 aiheuttaa hermosolujen rappeutumista, kun taas väärä sijainti

ajaa solua kohti kuolemaa. Tätä proteiinia on huomattu myös muista ALS:a aiheuttavista tapauksista, kuten C9orf72 geenin mutaation aiheuttavasta ALS:sta (Weskamp et al., 2020).

2.1.2. C9orf72

C9orf72 eli kromosomi 9 avoimen lukukehyksen 72 mutaatio kuuluu periytyviin ALS-tauteihin. Se on yleisin geneettisesti periytyvä ALS:iin johtavan taudin syy. Tämä geeni aiheuttaa toistuvan GGGGCC jakson takia ALS:ia ja otsa- ja ohimolohkorappeumaa eli FTLD:tä. Näitä toistojaksoja on sairastavassa potilaassa huomattu olevan satoja, ellei tuhansia, kun normaalisti jaksoja on vain alle 11 (Balendra & Isaacs, 2018). Itse C9orf72 koodaa proteiinia, jonka rooli solussa ei ole vielä niin tarkasti selvillä. On kuitenkin tutkittu, että geeni olisi merkittävässä roolissa mm. autofagosytoosin ja lysosomien säätelyssä. Säätelyä varten C9orf72-proteiini muodostaa kompleksin DENN-domeenin omaavan SMCR8-proteiinin ja WDR41-proteiinin kanssa. Tämä kolmen proteiinin kompleksi on yhteydessä FIP200/ULK1/ATG13/ATG101 -kompleksin kanssa, jolloin C9orf72-kompleksi saattaa säädellä normaalia autofagosytoosia. Mekanismi, millä tämä tapahtuu, on kuitenkin epäselvä (Sullivan et al., 2016).

Tutkituin ja parhaiten arvioitu hypoteesi, joka johtaa ALS-tautiin, on toistojakson sisältävä myrkyllinen RNA. Tämä myrkyllinen RNA voi aiheuttaa myrkyllisyyttä kahdella eri tapaa: RNA:ta sitovien proteiinien eristämällä (RBPs) tai dipeptiditoistojakso proteiinien (DPR) kertymisellä. C9orf72 RNA:ta, joissa on GGGGCC tai CCCC GG toistojakso, löytyy kerääntymänä soluista ja varsinkin lähetti-RNA (mRNA) muodossa olevaa (GGGGCC) RNA:ta löytyy paljon keskushermoston solujen membraanin läheltä. Neuroneissa kerääntymät ovat runsaita, mutta muissa soluissa, kuten astrosyyteissä ja mikroglia soluissa, on huomattu pieniä RNA keskittymiä. Nämä keskittymät aiheuttavat myrkyllisyyttä siten, että ne eristäytyvät samalla vähentäen tärkeiden RBP:en määrää. Tärkeitä RBP-proteiineja, jotka sitoutuvat eristäytyviin RNA toistojaksoihin, on huomattu useita, mutta minkään ei ole todettu olevan niin sanotusti se yksi ja tärkein vaan kaikki ovat mahdollisia. Tutkittuja proteiineja, jotka sitoutuvat toisto RNA:n sense- tai antisense-jaksoihin ovat Pur-alfa, joka toimii transkriptiossa, nukleoliini, joka vaikuttaa ribosomaalisen RNA:n transkriptiossa ja ribosomien kokoamisessa ja Zfp106, joka toimii solussa niin kutsuttuna ”sinkki sormena” (McEachin et al., 2020)

Toinen tapa, jolla toistojakso voi aiheuttaa myrkyllisyyttä on DPR-proteiinien kertymisellä. Näitä proteiineja on viisi: poly-GA, poly-GP, poly-GR, poly-PR ja poly-PA. Näitä proteiineja saadaan, kun sense- ja antisense-RNA keskittymien RNA-jaksot muutetaan proteiineiksi translaation avulla. Translaatio ei kuitenkaan tapahdu normaalisti vaan se menee niin kutsutun RAN-translaation mukaan, jossa mukana ei ole ollenkaan AUG-kodonia. RAN-translaatio toimii hyvin ilman AUG-aloituskodonia, mutta se luottaa silloin toistopätkien muodostamiin sekundäärirakenteisiin. Translaation kuitenkin kumoo toistojaksojen väheneminen (Green, Linsalata, & Todd, 2016). Näiden DPR-proteiinien myrkyllisyyttä ja sen aiheuttamaa neuronien rappeutumista on tutkittu paljon ja jotkin tutkimukset osoittavat, että C9orf72-geenistä koodatut DPR-proteiinit aiheuttavat neuronien rappeutumista. On kuitenkin myös tutkittu, että nämä proteiinit eivät aiheuta itsessään rappeutumista, vaikka ovatkin myrkyllisiä neuroneille. DPR-proteiineja ei kuitenkaan pidä unohtaa ALS-taudin yhteydessä, koska ne liittyvät tautiin muutamalla tavalla. DPR-proteiinit liittyvät ennemminkin TDP-43:n aiheuttamaan ALS:iin. DPR-proteiinien reitti tapahtuu ennen TDP-43 reittiä, toki yhteyttä DPR ja TDP-43 välillä ei olla pystytty osoittamaan. Toinen rappeutumiseen johtava DPR-proteiinien mahdollinen tapa on niiden liukoisuus. Kahden proteiinin, poly-GR ja poly-PR, liukoisuus saattaa aiheuttaa solun sisäisen RNA-metabolian häiriintymistä ja näin ollen johtaa myöhemmin ALS:iin tai ainakin on neuroneille myrkyllistä. Se saattaa myös laukaista TDP-43 fosforylaatiota tai sen kokoontumista. Kolmantena vaihtoehtona on kaikkien yhdistelmä, jossa mukana on RNA-keskittymät, DPR-proteiinien myrkyllisyys, DNA/RNA hybridit ja C9orf72 haplovajaatoiminta. Näiden ja mahdollinen solun ominainen herkkyystekijä saattavat aiheuttaa tietyissä aivojen lohkoissa neuronien rappeutumista (Schludi et al., 2015).

2.1.3. SOD1

Superoksididismutaasi 1 eli SOD1:n mutaatio on yksi geeniperäisistä ALS-tautia aiheuttavista mutaatiogeneista. Se on löydetty ensimmäisenä geeniperäisesti dominoivasti periytyvänä geeninä, joka aiheuttaa ALS:ia. SOD1 koodaama proteiini sijaitsee sytosolissa ja mitokondrion kalvojen välisessä tilassa homodimeerinä. SOD1-geenin tuottamia proteiineja on havaittu myös lysosomeissa sekä oksidatiivisen stressin myötä myös tumassa. Mutaatioita geenissä voi olla useita, koska erilaisia mutaatioita geenissä on havaittu jo yli 150. Mutaatioita löytyy monesta kohtaa, kuten alaniinin muutos valiiniin 4. kodonissa (A4V) tai leusiinin muutos valiiniin 38.

kodonissa (L38V) (De Araújo Brasil et al., 2019). Proteiinin muokkaus on hyvin monimutkainen ja sitä ei tunneta vielä kunnolla. Se tiedetään kuitenkin, että sen muokkaus tapahtuu sen lopullisissa sijainneissa. Siinä on kupari- ja sinkki-ionit ja alayksiköitä yhdistävä sulfididisidos Cys-57 ja Cys-146 välillä. SOD1 toimii normaalisti antioksidanttina, joka katalysoi superoksidianionin (O_2^-) disprotonaatiota muodostaen vetyperoksidia (H_2O_2) ja happea (O_2). Tämä on merkittävä myrkyllisen superoksidin poistaja soluista ja kehosta. Muutettu superoksidi muuttuu vetyperoksidiksi, joka voidaan muiden entsyymien, kuten katalaasin, avulla muuttaa toiseen, turvalliseen muotoon (Sea et al., 2015).

Mutaatiot tässä geenissä on todettu aiheuttavan ALS-tautia periytyvästi, mutta monissa tutkimuksissa on myös todettu, että se ei ole läsnä yksittäisissä ALS tapauksissa. Mutaatio SOD1 geenissä aiheuttaa yleensä proteiinin vääränlaista muokkausta translaation jälkeen. Näihin muokkauksiin kuuluu mm. proteiinin oksidaatio ja se ettei proteiinin tarvitsemat kupari ja sinkki liity toimivaan proteiiniin. Tämä viittaa myös siihen, että SOD1-proteiinit voivat saada myrkyllisen luonteen, vaikka kyseessä onkin ihan tavallinen villi tyyppi SOD1-proteiini, koska translaation jälkeisessä muokkauksessa voi tulla virheitä. Mitä enemmän väärin muokattuja proteiineja kertyy, sitä myrkyllisemmäksi ne käyvät (Da Cruz et al., 2017).

SOD1-geenin mutaatio voi aiheuttaa ALS:ia mutatoituneen proteiinin ja villi tyyppi (WT) muodostaman heterodimeerin avulla. Tämä heterodimeeri vaikuttaa SOD1 toimintaan siten, että se ei poista superoksidianioneita niin tehokkaasti solusta johtaen superoksidin kertymiseen ja näin ollen oksidatiivinen stressi lisääntyy. Oksidatiivinen stressi voi aiheuttaa lopulta neuronien surkastumista, kun neuronit kuolevat liiallisen oksidatiivisen stressin alla. Näiden heterodimeerien muodostumiselle on ehdotettu muutamia tapoja, kuten homodimeerien eroaminen ja uudelleen sitoutuminen heterodimeeriksi mutatoituneen monomeerin kanssa. Heterodimeerit voivat muodostua myös suoraan sekä oligomeerien kautta, mutta suoraan heterodimeereiksi valmistuminen ei ole vielä varmaa. De Araújo Brasil et al. (2019) huomasivat myös tutkimuksessaan, että mutaatiot SOD1-geenissä vähensivät myös oksidatiivista stressiä vähentävien proteiinien määrää tumassa. Tämä huomattiin, kun katalaasin aktiivisuus oli paljon suurempi ikääntyneissä soluissa, kun siellä oli WT SOD1. Heterodimeeri SOD1:n omaavissa soluissa katalaasin aktiivisuus oli matalampi ja näin ollen SOD1-heterodimeeri ei toimi kunnolla hajottaessaan superoksidia (De Araújo Brasil et al., 2019).

Heterodimeerinen reitti on vain yksi mahdollinen tapa, joka johtuu SOD1 mutaatiosta. Mutaatio ja väärin sitoutunut rakenne aiheuttavat myös monella muulla tavalla solujen apoptoosia ja proteiinin myrkyllisyyttä. Toinen mahdollinen tapa on mutaation aiheuttama stressi endoplasmakalvostossa. Kun kalvostoon kohdistuu muutos, joka aiheuttaa stressiä, se laukaisee kaksi erilaista keinoa lieventää sitä. Toinen näistä on väärin muokattujen proteiinien uudelleen muokkaus (UPR) ja toinen on väärin muokattujen proteiinien kuljettaminen kalvostolta ubikitiini proteasomi-systeemille, jossa proteiinit hajotetaan (ERAD). Näiden eri stressin ehkäisykeinojen jatkuva käynnissä oleminen aiheuttavat solun ja ALS:n tapauksessa neuroneita ajautumaan kohti sen apoptoosia. On tutkittu, että SOD1-mutaatio pitkittää tätä kalvoston stressi tilaa vaikuttamalla COPII-kompleksin alayksiköihin. COPII-kompleksi on merkittävässä roolissa proteiinien kuljetuksessa endoplasmakalvostolta Golgin laitteelle. SOD1 aiheuttama häiriö estää näin proteiinien kulkeutumisen kalvostolta pois, jolloin proteiinit kertyvät kalvostolle aiheuttaen aktiivista stressitilaa, joka pitkittyessään johtaa apoptoosiin (Bunton-Stasyshyn, Saccon, Fratta Pietro, & Fisher, 2015). ALS tautiin ei ole kuitenkaan keksitty vielä parantavia hoitoja, koska mekanismit ovat vielä hieman epäselviä, mutta yksi mahdollinen tapa parantaa tauti on uusi menetelmä nimeltään CRISPR.

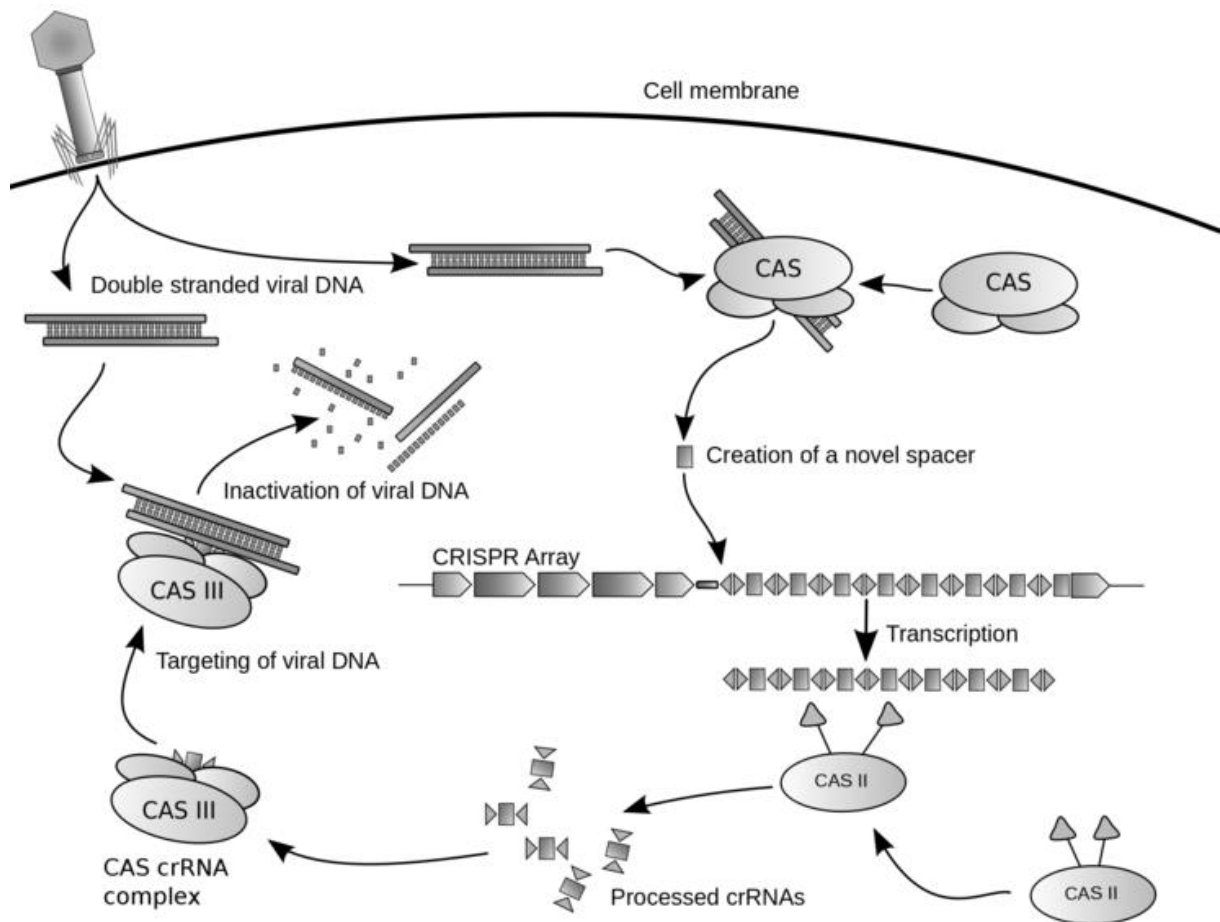
3. CRISPR

CRISPR eli Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats on uusi tieteellinen menetelmä, jota voidaan hyödyntää geenien muuntelussa ja on näin mahdollisesti hyödyllinen myös ALS-taudin hoidossa. CRISPR on peräisin bakteereiden ja arkkien immuunijärjestelmästä ja se huomattiin ensimmäisen kerran 1987 *E. coli*:n genomista. Kuitenkaan suurempia tutkimuksia ei aloitettu kuin vasta 2000-luvun puolella välissä. Vuonna 2007 CRISPR-Cas (CRISPR Associated) systeemin huomattiin torjuvan *Streptococcus thermophilus* bakteerissa lyyttisiä faageja. Tämän havainnon myötä syntyi idea, jossa näitä bakteereita voitaisiin hyödyntää erilaisia faageja vastaan. Nykyään tutkimuksia tehdään paljon enemmän ja niissä on huomattu mm. useita erilaisia Cas-proteiineja, joita voidaan hyödyntää bioteknologiassa sekä miten CRISPR menetelmää voitaisiin hyödyntää geneettisessä muokkauksessa (Doudna & Charpentier, 2014). Menetelmä on todella merkittävä, koska Emmanuel Charpentier ja Jennifer Doudna saivat tutkimuksistaan Nobelin kemianpalkinnon vuonna 2020.

3.1. CRISPR-Cas-menetelmän toiminta

CRISPR-menetelmä toimii kolmella eri vaiheella: sopeutuminen, CRISPR RNA (crRNA) biogeneesi ja estäminen. Menetelmä kokonaisuudessaan alkaa sopeutumisella, jossa vieraan nukleiinihapon tärkeät osat prosessoidaan ja kuljetetaan CRISPR-kokoelmaan, jotta se muistaisi kyseisen taudin perimässä olevat nukleiinihapot. Kun tieto nukleiinihapoista on viety talteen, se pystytään transkription avulla kopioimaan pitkäksi crRNA edeltäjäksi. Tämä edeltäjä täytyy prosessoida Cas-proteiinien avulla ennen kuin sitä voidaan käyttää kunnolla. Viimeisenä vaiheena on tautia aiheuttavien nukleiinihappojen estäminen. Tämä tapahtuu siten, että talteen otetut tietyt jaksot vieraasta nukleiinihaposta koodataan crRNA:ksi ja se ohjaa estämiseen tarkoitettua kompleksia vieraan nukleiinihapon luo. Kompleksi pilkkoo crRNA:han kopioidut jaksot pois vieraasta nukleiinihaposta tehden siitä turvallisen (Kuva 2). (Hille et al., 2018). Kompleksi tunnistaa tietyn jakson Watson-Crick-emäsparimenetelmällä tehden siitä erittäin tarkan. CRISPR:n mukana on erilaisia Cas-proteiineja, jotka hoitavat vieraan DNA:n pilkkomisen. Katkaistu vieras DNA sen jälkeen liitetään takaisin yhteen, joko ei-homologisella päitten yhdistämisellä (NHEJ) tai homologisen rekombinaation (HR) avulla (Dai et al., 2016).

Estäminen tässä kolmivaiheisessa prosessissa on tärkein ja monipuolisin. Estämisvaiheeseen kuuluu kahta erilaista luokkaa: yksi ja kaksi. Luokassa yksi estämiseen osallistuu kompleksi, johon kuuluu useita Cas-proteiineja. Toisessa luokassa taas vieraan DNA pilkkomisessa käytetään vain yhtä Cas-proteiinia. Näissä luokissa on vielä erilaisia tyyppisiä, miten pilkkominen tapahtuu. Ensimmäisessä luokassa on tyypit I, III ja IV ja toisessa luokassa tyypit II, V ja VI. Nämä tyypit tarkoittavat eri Cas-proteiinien tyyppiä ja nekin voidaan vielä jaotella omiin alatyyppeihinsä. Esimerkiksi CRISPR-Cas-systeemin tunnetuin proteiini Cas9 kuuluu toiseen luokkaan, joten se hajottaa vieraita DNA-jaksoja ilman muiden Cas proteiinien apua (Hille et al., 2018).



Kuva 2 CRISPR-Cas-menetelmä solussa. Solu mukautuu vieraaseen DNA:han prosessoimalla osia siitä Cas-kompleksin avulla. Tämä kopioitu tieto siirretään CRISPR-kokoelmaan, jossa on muidenkin vieraitten DNA-jaksojen tietoja. Nämä tiedot kopioidaan transkription avulla CRISPR RNA:ksi. Nämä crRNA pätkät kuljettavat Cas-kompleksin pilkkottavan vieraan DNA:n luokse, jossa kompleksi pilkkoo DNA-jakson, jotta se ei olisi enää vaarallinen solulle (Dai et al., 2016). Kuva: James atmos, CC BY-SA 3.0 <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>, Wikimedia Commons

3.1.1. CRISPR-Cas luokka 1

Ensimmäisen luokan CRISPR-Cas-systeemeihin kuuluvat tyypit I, III ja IV. Näistä yleisimmät ovat I ja III. Tyypin IV-systeemi on paljon harvinaisempi, koska se koostuu paljon alkeellisemmasta CRISPR-keskuksesta, sillä keskuksessa ei ole ollenkaan mukautumiseen tarvittavaa osaa. Ensimmäistä luokkaa löytyy myös paljon enemmän arkeista kuin bakteereista

ja nämä systeemit koostuvat aina useasta Cas-proteiinista. Yleisin muodostelma Cas-kompleksista koostuu Cas7, Cas5, Cas6 ja Cas8 tai Cas10 proteiineista. Näistä Cas7 ja Cas5 muodostavat kompleksille niin sanotun selkärangan, joka koostuu useasta Cas7-proteiinista ja yhdestä Cas5-proteiinista, joka on kiinnittyneenä selkärankaa pitkin menevään crRNA:n 5' päähän. Tätä selkärankaa kutsutaan nimityksellä RAMPs eli Repeat-Associated Mysterious Proteins. Se on todella merkittävä RNA:n tunnistamisessa, koska nämä proteiinit muodostavat proteiinin laskoksista RRM:n eli RNA Recognition Motif. Rakenne koostuu neljästä beetalevystä ja kahdesta alfakierteestä. Selkärankaan kuuluu vielä kaksi erillistä alayksikköä, jotka koostuvat Cas11-proteiineista, sekä yhdestä isommasta alayksiköstä. Iso alayksikkö koostuu tyypin I kohdalla Cas8-proteiinista ja tyypin III kohdalla Cas10-proteiinista. Tyypin I rakenteeseen kuuluu vielä Cas6-proteiini, joka on kiinnittyneenä kompleksin 3'päähän ja pääasiassa vaikuttaa crRNA-edeltäjän muokkauksessa ja lisää suojan selkärangan päähän. Tyypissä III Cas6-proteiinin korvaa Cas7 kaltaiset proteiinit kuten Csm5 ja Cmr1 ja Cmr6 riippuen systeemin tyypistä. Tyypin IV -kompleksi on rakenteeltaan vielä epäselvä, mutta sen selkäranka koostuu samankaltaisista proteiineista ja sen iso alayksikkö on Csf1-proteiini. (Koonin, Makarova, & Zhang, 2017; Liu & Doudna, 2020).

3.1.1.1. Tyypin I

Ensimmäisen luokan CRISPR-Cas-tyypin I -systeemi tarvitsee toimiakseen siis melko suuren kompleksin. Sen toimintaperiaate perustuu vieraan DNA:n tunnistamiseen ja sen pilkkomiseen. Vieraassa DNA:ssa on PAM-jakso (protospacer-adjacent motif), jota kompleksi lukee tunnistakseen vieraan DNA:n. Tätä kohtaa ei löydy CRISPR:n omasta DNA:sta, jotta se ei ala pilkkomaan omaa DNA:ta. Kun 2–5 emäsparin pituinen PAM-jakso on löydetty vieraasta genomista Cas8-proteiinin lysiini sormen, glutamiini kiilan ja glysiini silmukan avulla, DNA:ta aletaan purkamaan kaksoiskierteestä. Tämä metodi, jolla purkaminen aloitetaan, on yksi tyypillisimmistä tavoista. Tyypissä I on myös muitakin tapoja aloittaa tämä ja se vaihtelee eri alatyypien välillä. Kun DNA:ta on alettu purkamaan, crRNA sitoutuu siihen ja muodostaa R-silmukan. Muodostumisen jälkeen tämä silmukka kiinnittyy Cas7- ja Cas11-proteiinien avulla paikoilleen. Silmukka ajautuu näiden proteiinien luo, koska Cas8 ja Cas5 pinnalla on positiivinen varaus. Silmukan muodostuminen saattaa johtua siitä, että kompleksi haluaa väärän DNA-juosteen pois, jotta crRNA ei muodostaisi väärä sidoksia kumoten silmukan

lukittautumisen. Jotta vierasta DNA:ta voidaan alkaa pilkkomaan, tarvitaan vielä yksi Cas-proteiini: Cas3. Se pystyy sitoutumaan kompleksiin silmukan aiheuttamien konformaatiomuutosten takia. Cas3-proteiini leikkaa DNA:n R-silmukasta ja kiinnittyy yksijuosteiseen DNA:han purkaen ja hajottaen sitä. Tämä vaatii energiaa eli ATP:tä. Kuitenkin Cas3-mekanismi on vielä hieman epävarmaa ja muutamia ehdotuksia on esitetty. Näistä yksi mahdollinen on se, että Cas3 pysyy kompleksissa kiinni ja vetää vierasta DNA:ta itsensä läpi hajottaen sitä Superfamily 2 (SF2) ja Histidiini-Aspartaatti (HD) domeenien avulla. Tietenkin tyyppin I eri alatyypin välillä on eroja, mutta edellä mainittu hajotus tapa kuuluu tyyppille I-E (Liu & Doudna, 2020).

3.1.1.2. Tyypin III

Tyyppin III -systeemejä on yhteensä kuusi kappaletta (III-A-III-F), joista tyypit III-A ja III-B ovat yleisimmät. Tyypin III CRISRP-kompleksit voivat myös hajottaa vierasta RNA:ta verrattuna tyyppiin I, joka kykenee vain DNA:n hajottamiseen. RNA:n hajottaminen alkaa vieraan RNA:n tunnistamisella, joka tapahtuu crRNA ja RNA-emäsparien löytämisellä. Kun crRNA on löytänyt vastaavat emäkset, Cas7 kaltaiset alayksiköt Csm3 (tyypeissä III-A/D/E/F) tai Cmr4 (tyypeissä III-B/C) lisäävät muodostuneeseen juosteeseen silmukoita joka kuudennen parin kohdalle kääntäen emäsparin ympäri. Nämä silmukat ovat vieraan RNA:n leikkaus kohtia, joista Csm3 ja Cmr4 leikkaavat itsenäisesti RNA:n palasiksi. Leikkaamisessa auttaa alayksiköiden katalyyttinen aktiivisuus. Tämä aktiivisuus johtuu Csm3 ja Cmr4-yksiköissä olevasta asparagiini osasta, joka leikkaa jokaisen käännetyn emäksen 3' päästä. Rakenteellista muutosta ei kuitenkaan voida vielä todistaa kunnolla, koska aktiivisen kohdan mutanti tai leikkaamaton yksijuosteinen DNA estävät tämän mekanismin (Liu & Doudna, 2020).

Tyyppi III voi leikata myös DNA:ta. Tämä mekanismi on vielä hieman epäselvä ja on ehdotettu, että tyyppin III -kompleksi leikkaisi yksijuosteista DNA:ta, kun RNA on sitoutunut kompleksiin. Leikkaamisen hoitaa Cas10-proteiini, jossa on HD-domeeni. Se leikkaa DNA:ta satunnaisista kohdista, eikä ole niin tarkka. Cas10:n aktivointia ja sen leikkaamisen aloittamista ei tiedetä kunnolla, mutta sitoutumattomat R-silmukat voivat olla mahdollinen leikkauspaikka tyyppin III -kompleksissa. Toinen mahdollinen tapa on transkription aikana, kun pitkät yksijuosteiset DNA jaksot ovat paljaana RNA-polymeraasin johdosta. DNA:ta voidaan leikata, mutta menetelmä on vielä epäselvä tyyppin III kohdalla (Liu & Doudna, 2020).

3.1.1.3. Tyypin IV

Tyypin IV CRISPR-Cas-kompleksit ovat paljon harvinaisempia kuin tyypin I ja III. Sitä löytyy useimmiten arkeista ja sen luullaan olevan niin sanotusti esi-isä varsinkin tyypille III sen alkukantaisuuden takia. Tämä sen takia, koska siinä on samankaltainen hajottaja Cas-proteiini (Csf2) kuin tyypissä III (Csm3 ja Cmr4). Lisäksi tyypin IV -kompleksista löytyy myös Cas10-proteiini HD-domeenilla, joka on samanlainen kuin tyypillä III. Alayksiköt eroavat myös tyypin IV kohdalla erilaisten Cas-proteiinien takia. Vaikka tyypin IV onkin samankaltainen kuin tyypin III, sen CRISPR-Cas-systeemi kohdistuu plasmideihin virusten sijaan. Tämä saattaa johtua siitä, että tyypin IV koodataan paljon varsinkin plasmideissa. Toinen mahdollinen syy on se, että vieraat plasmidit tai plasmidien kaltaiset asiat tuovat kilpailua tyypin IV CRISPR-Cas-systeemiä koodaavaa plasmidia kohtaan varsinkin solun sisäisten resurssien kohdalla. Miten tyypin IV pilkkominen toimii, on kuitenkin vielä epäselvää (Pinilla-Redondo et al., 2019).

3.1.2. CRISPR-Cas luokka 2

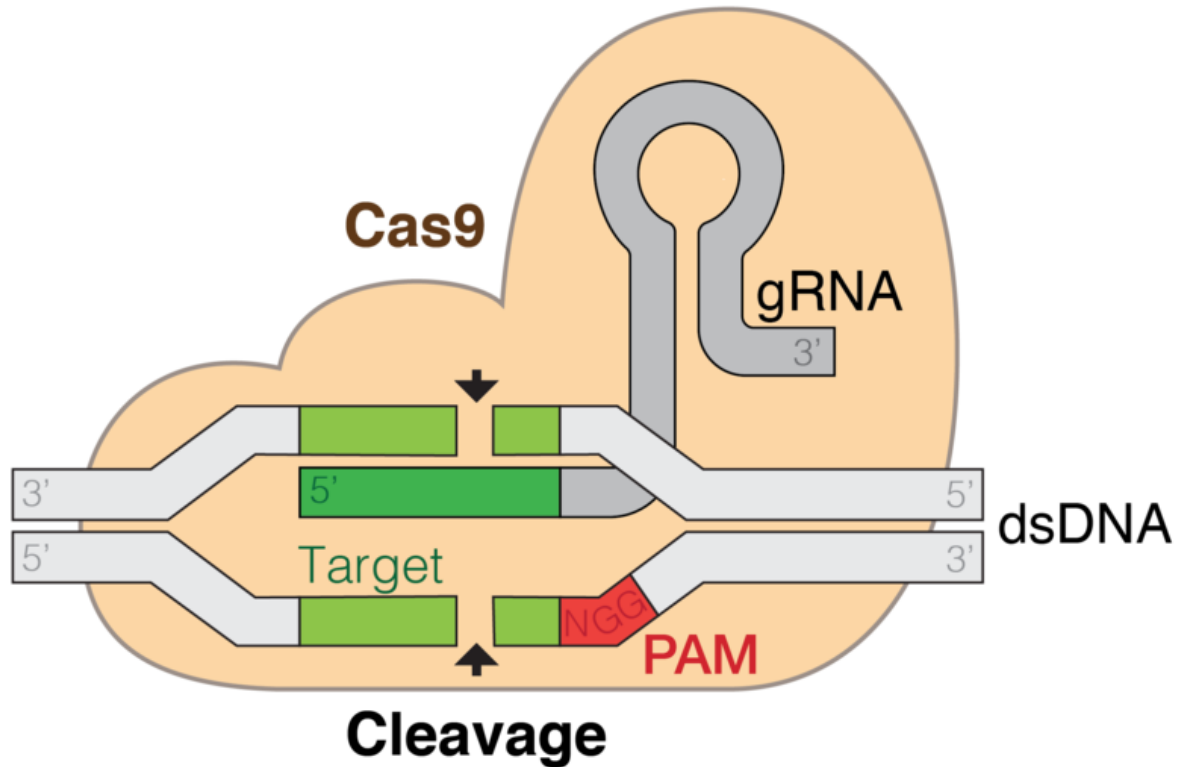
Luokka 1 ja luokka 2 eroavat paljolti. Kun luokassa 1 toimii usea Cas-proteiini yhdessä, luokassa 2 toimii vain yksi Cas-proteiini. Tämä yksittäin toimiva proteiini ei kuitenkaan ole pieni, sillä siinä on useita domeeneita. Kuten luokan 1 -systeemeillä myös luokan 2 -systeemeillä on erilaisia tyyppisiä (II, V ja VI). Nämä ovat harvinaisempia verrattuna luokan 1 -systeemeihin, mutta ovat tärkeitä varsinkin bioteknologian ja lääketieteen yhteydessä kompleksin yksinkertaisuuden takia. Luokan 2 CRISPR-Cas-systeemeitä löytyy pääasiassa bakteereista. Niitä ei olla löydetty ollenkaan arkeista tai hypertermofiileistä (Koonin et al., 2017; Shmakov et al., 2017).

3.1.2.1. Tyypin II

Tyypin II on tunnetuin ja tutkituin CRISPR-Cas-systeemi, koska siihen kuuluu Cas9-proteiini ja sen eri variantit. Tämä johtuu siitä, että se on rakenteeltaan paljon yksinkertaisempi verrattuna luokan 1 CRISPR-Cas-systeemeihin. Sen on myös huomattu olevan helposti

saatavilla geenitutkimuksia varten. Cas9-proteiini on yksi iso proteiini (950–1600 aminohappoa), johon kuuluu kaksi eri nukleasidomeenia: RuvC ja HNH. RuvC on endodeoksiribonukleaasi, jossa on Hollidayn-liitos ja kolme eri alatyyppeä. HNH on myös endonukleaasi, mutta siinä ei ole useaa alatyyppeä mukana. Nämä kaksi domeenia löytyvät Cas9-proteiinin nukleasi lohkoista (NUC) ja ne hoitavat CRISPR-Cas9-systeemissä vieraan DNA:n leikkaamisen. Proteiinista on löydetty myös alfakierre-lohko (REC), joka auttaa HNH-nukleasin kiinnittymisessä leikkauskohtaan muutamalla konformaatiotaan paljastaen vieraan DNA:n leikkauskohdan. Kuten aikaisemmatkin Cas-systeemit, Cas9 tarvitse myös crRNA:n tunnistaa kohde DNA:n. Tyypin II -geeni koodaa myös muutakin kuin pelkästään Cas9-proteiineja, koska se koodaa myös trans-acting CRISPR RNA:ta (tracrRNA). Cas9 tarvitsee tätä tracrRNA-jaksoa varsinkin sen edeltäjä crRNA:n muokkauksessa, jotta oikeanlainen crRNA saadaan tyypin II -proteiiniin mukaan (Shmakov et al., 2017).

Tyypissä II on muutamia eri alatyyppejä, jotka kaikki ovat toiminnaltaan samankaltaisia. Ainoa ero näiden välillä on Cas9-proteiinin pituus, joka johtuu REC-lohkojen eri pituudesta. CRISPR-Cas9-systeemin toiminta alkaa vieraan DNA:n oikean kohdan löytymisellä, jossa auttavat Cas9-proteiinissa oleva crRNA-tracrRNA yhdistelmä. Tämä tunnistaa oikean kohdan vieraasta DNA:sta. Ennen leikkaamista Cas9 tunnistaa ja sitoutuu leikattavan vieraan kohde-DNA:n 3'-pästä PAM-kohtaan, joka koostuu guaniini rikkaasta alueesta. Tämä kohta aktivoi proteiinissa muutoksen sitoutuneen ja leikkaavan konformaation välillä. PAM estää samalla sitä, että se ei leikkaa bakteerissa olevaa CRISPR-kokoelmaa. Kun Cas9-proteiinin crRNA on sitoutunut kunnolla leikattavaan DNA-jaksoon, sen HNH ja RuvC-domeenit aktivoituvat ja leikkaavat kyseisen pätkän vieraasta DNA:sta. Molemmat leikkaavat domeenit toimivat leikkauksen aikana leikaten molemmat vieraan DNA:n juosteet katkaisten koko kaksoisjuosteisen DNA:n. Cas9:ää voidaan hyödyntää myös muuttamalla tracrRNA:n sgRNA:lla (single-guide RNA). Tämä ohjaa ja auttaa Cas9-systeemiä löytämään vieraan DNA:n ja kiinnittymään siihen (Kuva 3) (Hsu, Lander, & Zhang, 2014).



Kuva 3 CRISPR-Cas9-systeemin toiminta. Cas9-proteiinissa oleva gRNA (sgRNA) ohjaa proteiinin oikeaan kohtaan. sgRNA koostuu harmaasta tracrRNA-jaksosta, joka sitoutuu Cas9-proteiiniin vakauttaen sitä. Tumman vihreä jakso sgRNA:ssa on crRNA, joka tunnistaa ja sitoutuu aukaistuun vieraaseen DNA:han punaisen PAM-kohdan vieressä. Leikkaaminen tapahtuu HNH ja RuvC-domeeneissa yhtäaikaaisesti, jotta DNA saadaan leikattua kerralla. Solun oma DNA:n korjausmekanismi korjaa leikatun DNA-jakson homologisen rekombinaation avulla. Korjaamisessa voidaan liittää haluttu DNA-jakso leikattuun DNA:han korjaamisen yhteydessä (Doudna & Charpentier, 2014). Kuva: marius walter, CC BY-SA 4.0 <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0>, Wikimedia Commons

3.1.2.2. Tyypin V

Tyypin V CRISPR-Cas-systeemi koostuu Cpf1-proteiinista (CRISPR from *Prevotella* and *Francisella* 1). Cpf1-proteiini on kokoluokaltaan suurin piirtein samankokoinen verrattuna tyypin II Cas9-proteiinin kanssa (1300 aminohappoa). Vaikka Cpf1 on suhteellisen suuri proteiini, siinä on silti vain yksi nukleasidomeeni, joka leikkaa DNA:n. Tyypin II ja tyypin V CRISPR-systeemeissä on myös muita eroja, joista merkittävin on systeemin valmistaminen.

Tyyppi V ei tarvitse proteiinin muokkauksessa tracrRNA pätkää, joten pelkkä crRNA riittää, jotta proteiinista saadaan toimiva. Toinen merkittävä eroavuus on leikkaus tapa. Cpf1 jättää leikattuun DNA-jaksoon tarrautumispinnat, jotka ovat noin 4–5 nukleotidin mittaiset. Nämä pinnat muodostuvat DNA:n 5' päihin. Kolmas merkittävä eroavaisuus on PAM-kohta. Cpf1 tunnistaa leikattavan DNA:n PAM kohdasta kuin Cas9, mutta tunnistus kohta koostuu tyymiini rikkaasta alueesta eikä guaniini rikkaasta alueesta. Yksi tärkeä ero on myös leikattava kohde. Cpf1 kohdistaa leikkauksen plasmideihin, kun taas Cas9 leikkaa vierasta DNA:ta (Zetsche et al., 2015).

Cpf1 leikkaa vieraan plasmidin siis vain yhdellä nukleasidomeenilla, joka on RuvC kaltainen endodeoksisiribonukleaasi. Miten tämä nukleaasi pilkkoo DNA:ta, on vielä hieman epäselvää. Pilkkominen alkaa Cpf1:ssä olevan crRNA:n kiinnittymisellä DNA:sta löytyvään PAM-kohtaan. Tämän jälkeen kaksijuosteinen DNA muutetaan yksijuosteiseksi, jotta crRNA voi tunnistaa oikean kohdan ja pariutua siihen. Tämän jälkeen RuvC kaltainen domeeni aktivoituu ja leikkaa kohde DNA:n molemmat juosteet yksitellen, koska RuvC pystyy kiinnittymään vain yhteen DNA-juosteeseen kerrallaan. Leikkaus tapa on kuitenkin vielä hieman epäselvä. Yksi mahdollinen tapa on, että Cpf1 muodostaa homodimeerin RuvC kaltaisen domeenin alayksiköiden kanssa leikatun yhden juosteen vieraasta DNA:sta. Zetsche *et al.* (2015) huomasivat omassa tutkimuksessaan, että tämän nukleasin toimimattomaksi tekeminen kumoaisi molempien juosteiden leikkaamisen. Kolmas mahdollinen tapa on se, että Cpf1-proteiinissa on vielä olemassa tunnistamaton leikkaava domeeni, joka leikkaisi DNA:ta RuvC kaltaisen domeenin kanssa. Cpf1:n tekemää leikkausta edeltävä rakenne on tutkimusten mukaan sellainen, että se leikkaa ensin DNA-juosteen, joka ei ole vastin kappale crRNA:lle. Eli ensimmäinen leikkaus ei kohdistuisikaan mallijuosteeseen vaan koodaavaan juosteeseen (Safari et al., 2019; Zetsche et al., 2015).

3.1.2.3. *Tyyppi VI*

Luokan 2 CRISPR-Cas-systeemeihin kuuluu vielä yksi tyyppi ja se on tyyppi VI. Tyyppi VI koostuu Cas13-proteiinista, joka tunnetaan myös nimellä C2c2. Tyypin VI -systeemit kohdistavat leikkaamisen yksijuosteiseen RNA:han toisin kuin aikaisemmat tyypit, jotka leikkaavat DNA:ta. C2c2 nukleasidomeenit eivät muistuta aikaisempien tyyppien DNA:n leikkaus domeenia vaan siinä on kaksi Higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding

(HEPN) domeenia, jotka hoitavat vieraan RNA:n pilkkomisen. HEPN-domeeneita löytyy myös tyypeistä III-A/B, mutta näistä löytyy vain yksi domeeni kahden sijasta. Tyypin VI rakenne on yksinkertainen ja siihen kuuluu Cas-proteiini (C2c2 ja sen alatyypit) sekä crRNA.

Tyypin VI RNA pilkkominen on hyvin samankaltainen kuin aikaisemmilla systeemeillä. CRISPR-Cas-systeemi tunnistaa vieraan RNA:n, joka aktivoi HEPN-domeenit, jotka pilkkovat vieraan RNA:n paloiksi. C2c2 CRISPR-systeemi pilkkoo vain yksijuosteista RNA:ta urasiili rikkailta alueilta. Leikkaaminen tapahtuu HEPN-domeeneista löytyvillä arginiini ja histidiini alueilla. Erikoista kuitenkin on se, että tyypin VI -proteiinin HEPN-domeenit tekevät yhteistyötä pilkkomisessa. On kuitenkin huomattu, että tyypin VI CRISPR-Cas-systeemiä voidaan käyttää myös muuhunkin kuin vain RNA:n pilkkomiseen. Kun HEPN-domeenin katalyyttinen alue vaihdettiin alaniiniin, C2c2:sta tuli pelkästään RNA:han sitoutuva proteiini, joka ei leikkaa sitä palasiksi. Tätä voidaan hyödyntää mm. erialisissa kuvantamismenetelmissä (Abudayyeh et al., 2016).

4. CRISPR-Cas-systeemin hyödyntäminen ALS:n hoidossa

CRISPR-Cas-systeemin on huomattu olevan hyödyllinen työkalu uusissa geenimuuntelu tutkimuksissa ja bioteknologisissa keksinnöissä. Systeemillä on myös mahdollisuutensa lääketieteessä ja mahdollisesti ALS-taudin hoitamisessa. Taudin hoitamista on tutkittu paljon varsinkin CRISPR-Cas9-systeemillä ja sen on todistettu olevan lupaava uusi hoitomenetelmä. Suvussa periytyvät ALS-tapaukset on paljon helpompi korjata tällä tavalla, koska silloin mutaatiot tiedetään. Yksittäisissä tapauksissa hoitaminen on kuitenkin hieman hankalampaa. Hoitojen tutkimuksia on tehty varsinkin SOD1 ja C9orf72-geenien kanssa, koska ne aiheuttavat suurimman osan periytyvistä ALS-tapauksista. Monet tutkimukset ovat havainneet hiirillä suoritetuissa kokeissa suuria elinajan pidennyksiä muuttamalla tai poistamalla näitä mutatoituneita geenejä.

4.1. CRISPR-Cas9-menetelmän hyödyntäminen SOD1-geenimutaatiossa

Cas9-proteiinin käyttäminen SOD1-mutaation hoitamiseen on mahdollista ja sitä on tutkittu paljon. Yhdessä tutkimuksessa (Duan et al., 2020) tutkijat huomasivat, kuinka SOD1-mutaation poistaminen keskushermostosta pidensi hiiren elinajanodotetta jopa 50 %. He käyttivät tutkimuksessaan AAV9-SaCas9-sgRNA eli adeno-associated virus 9 – *Staphylococcus aureus* Cas9 – single guided RNA -systeemiä hajottamaan SOD1-geenin G93A-mutaatiota. Tutkimuksessaan he huomasivat, että Cas9:n aktiivisuus oli korkeimmillaan kahden sgRNA:n kohdalla (sg1 ja sg2). Cas9-systeemi oli injektoitu hiireen intraserebroventrikulaarisesti (ICV) eli virus laitetaan suoraan aivo-selkäydinnesteeseen. Virus etenee kehon sisällä neuroneihin ja Cas9-systeemi alkaa pilkkomaan SOD1-mutaatiota PAM-tunnistus kohdan yläpuolelta noin 3–4 nukleotidin päästä. Pilkkomisessa on kuitenkin huomattu ja mietitty erilaisia haasteita kuten neuronien laajalle levittäytyneisyyttä ja Cas9-systeemin väärässä paikassa tapahtuvaa pilkkomista. Duan et al. (2020) kuitenkin huomasivat tutkimuksessaan, että väärässä paikassa tapahtuvaa pilkkomista, joka vahingoittaisi kohdetta, ei kuitenkaan tapahdu. Tutkimuksessa huomattiin samalla myös se, että Cas9 ei kunnolla tuhonnut mutaatiota, koska myöhemmin SOD1-mutaation saaneet hiiret kuolivat nopeaan ALS-taudin kehittymiseen. Tämä saattaa johtua kroonisesti aktivoituvasta keskushermoston tukikudoksesta, tähtisolusta, joka erittää myrkyllisiä tekijöitä, joka johtaa mm. glutamaatin eksitotoksisuuteen neuronissa. Tämä eksitotoksisuus johtaa lopulta neuronien kuolemaan. Ylipäätään tukikudoksen aktivoituminen saattaa johtua kuljettavasta vektorista, joka ei välttämättä ole läpäissyt kunnolla neuroneita, jotta Cas9-proteiini olisi päässyt kunnolla muuttamaan SOD1-mutaatiota. Kuljetuksessa pitäisi siis miettiä ja tutkia muita vaihtoehtoja, jotka läpäisisivät paremmin kohteen neuroneita (Duan et al., 2020).

Gaj et al. (2017) huomasivat tutkimuksessaan samanlaisia ongelmia kuin Duan et al. (2020). Heidän tutkimuksensa todisti samaa, mitä Duan et al. (2020) todisti myös myöhemmin: CRISPR-Cas9-systeemin tekemä mutaatio SOD1-geenissä pidentää elinajanodotetta hiirissä, mutta systeemiä kuljettavan vektorin täytyy olla parempi ja läpäisevämpi. On kuitenkin myös todistettu, että Cas9 pystyy tuhoamaan useita kopioita väärää geeniä saman aikaisesti. Kaiken kaikkiaan Cas9:n tekemä pilkkominen SOD1-mutaation kohdalla on mahdollinen uusi hoitotapa ALS-sairauteen, mutta monien tutkimusten myötä on huomattu, että vektorin pitää olla kunnolla läpäisevä, jotta SOD1-mutaatio saadaan kunnolla poistettua. Vektorin heikkouden kannalta tutkimuksia pitää jatkaa, ennen kuin hoito voidaan

viedä kliiniselle tasolle. Tutkimus kuitenkin avaa ovia myös muille ALS-tautia aiheuttavien mutaatioiden, kuten C9orf72-mutaation, hoidolle (Gaj et al., 2017).

4.2. CRISPR-Cas9-menetelmän hyödyntäminen C9orf72-geenimutaatiossa

C9orf72 on merkittävä ALS-tautia aiheuttava geeni ja sen hoitamista on tutkittu erilaisilla toimenpiteillä. Yksi suurimpia tutkimus tapoja on ALS-potilaasta eristetyllä indusoidulla pluripotentilla kantasolulla (iPSC) tehdyt tutkimukset. Näistä kantasoluista on johdettu liikehermosoluja, jotta tutkimus kohdistuisi hermosoluissa tapahtuvaan rappeutumiseen. Tämä iPSC-soluilla tapahtuva tutkimus on aiheuttanut hieman ongelmia, koska solut eivät ole normaalissa ympäristössään, johon vaikuttavat muutkin biologiset tavat, mitä ihmisessä tapahtuu. Tutkimuksen laatuun myös vaikuttaa paljolti ihmisten yksilöllisyys. Kuitenkin monet c9orf72-mutaatioon kohdistuneet tutkimukset, jotka on tehty iPSC-soluilla, ovat antaneet paljon hyviä näkökulmia ja potentiaalia. Ababneh et al. 2020 ovat huomanneet tutkimuksessaan, että CRISPR-Cas9-systeemillä on saatu poistettua ja muutettua ALS:ia aiheuttavia GGGGCC tai CCCCCG toistojaksoja. He tutkivat paljolti tämän vahingoittavan toistojakson muuttamista normaaliksi jaksoksi, joka ei aiheuta ALS-tautia. Tämä sen takia, koska c9orf72:n koodaamat pätkät ovat normaalisti ihmiselle tarpeellisia, joten toistojaksoa ei voida kokonaan poistaa. Jotta oikea leikattava kohta löydettiin, CRISPR-Cas9-systeemiin laitettiin oma sgrRNA, joka pystyi tunnistamaan mutatoituneen geenin oikeasta kohtaa. Ababneh et al. (2020) käyttivät tutkimuksessaan homologista rekombinaatiota (HR) saadakseen normaalin toistojakson mutatoituneen tilalle. Tutkimukset osoittautuivat parantaviksi, sillä normaalisti c9orf72 mutatoituneissa soluissa kaspasi-3-hajotus on suurta. Kun mutaatio korjataan, kaspasi-3:n hajoamistaso palautuu normaalille tasolle. Tämä kertoo siitä, että neuronit eivät kestä korjauksen jälkeen niin kovaa stressiä endoplasmisella kalvostolla, joka saattaa johtaa apoptoosiin (Ababneh et al., 2020).

Eräässä toisessa tutkimuksessa oli myös hyödynnetty iPSC soluja, mutta CRISPR-Cas9-systeemiä ei ollut kohdennettu suoraan toistojaksoja koodaavaan geenin kohtaan. Krishnan et al. 2020 tutkivat toistojaksoja koodaavan geenin promoottorin poistamista, jolloin geeni ei pystisi valmistamaan proteiineja, joissa on ALS-tautia aiheuttavia GGGGCC toistojaksoja. He huomasivat samassa tutkimuksessa, että minimaalisen promoottorin poistaminen estäisi myös neuronien rappeutumiseen johtavaa reittiä.

Promoottorin poistaminen geenistä kokonaan pystyisi auttamaan ALS-potilaita, mutta silloin geeni ei pystyisi koodaamaan tarpeellisia normaaleja c9orf72-geenistä löytyviä proteiineja, kuten Ababneh et al., 2020 suorittamassa tutkimuksessa, jossa mutatoitunut toistojakso korvataan normaalilla. C9orf72 promoottorin poistaminen solusta ei kuitenkaan aiheuta hermosolujen rappeutumista, vaikka se ei toimisikaan normaalisti (Krishnan et al., 2020).

5. ALS:n hoitaminen CRISPR-Cas9:n avulla tulevaisuudessa

Erilaiset tutkimukset ovat antaneet erilaisia potentiaalisia hoitotapoja ALS:n hoitamiseen. Kuitenkaan hoitoa ei voida vielä aloittaa kliinisellä tasolla, koska ALS:n eteneminen ja CRISPR-systeemien toiminta ihmisessä on vielä hieman avointa. Duan et al. 2020 ja Gaj et al. 2017 mainitsivat muutamia ongelmakohtia kliiniselle tasolle siirryttäessä. Nämäkin kohdat kertovat hieman vielä epävarmuudesta ja siitä, että toimiiko CRISPR-Cas9-systeemit niin kuin niiden pitäisi. Tulokset ovat kuitenkin olleet positiivisia varsinkin iPSC-soluilla tehdyissä tutkimuksissa kuin myös hiirillä tehdyissä kokeissa. Tutkimuksia kuitenkin pitää vielä jatkaa paljon, jotta löydettäisiin ratkaisu, joka toimisi varmasti aiheuttamatta suuria ongelmia ja epävarmuutta (Duan et al., 2020; Gaj et al., 2017).

Epävarmuutta CRISPR-Cas9-menetelmässä aiheuttaa myös menetelmästä aiheutuvat eettiset ja moraaliset kysymykset liittyen juuri sen tehokkuuteen ja mihin sitä loppujen lopuksi käytetään. Suurimmat huolet kuitenkin tutkijoiden kesellä on systeemin luotettava toiminnallisuus. Menetelmää pyritään kehittämään koko ajan parempaan suuntaan, jotta se toimisi paremmin ja sitä varten on myös perustettu järjestö ARRIGE (Association for Responsible Research and Innovation in Genome Editing), joka pitää huolen siitä, että geenimuunteluun liittyvät tutkimukset tehdään huolella ja moninkertaisesti. Järjestö auttaa myös tutkijoita heidän tutkimuksissaan kohtaamiin erilaisiin eettisiin kysymyksiin, kuten kuinka pitkälle geenimuuntelua voidaan käyttää ei-terapeuttisessa tarkoituksessa (Brokowski & Adli, 2019).

Kaiken kaikkiaan CRISPR-Cas9-menetelmä on kuitenkin hyvin potentiaalinen hoitotapa tulevaisuudessa varsinkin geneettisille sairauksille kuten amyotrofiselle lateraali skleroosille. Tutkimuksia on kuitenkin jatkettava vielä pitkästi ja löydettävä varmoja tapoja hoitaa ja injektoida CRISPR-Cas9-systeemi kehoon. Eettiset ongelmat rajoittavat varmasti

potilaiden hoitamista, mutta tulevaisuudessa CRISPR-menetelmä saattaa olla jo arkipäivää geneettisten sairauksien hoitamisessa.

6. Kiitokset

Haluaisin osoittaa erityiset kiitokset ALS-tutkimuksen tuki ry:lle tutkielmani rahoittamisesta.

7. Kirjallisuusviitteet

- Ababneh, N. A., Scaber, J., Flynn, R., Douglas, A., Barbagallo, P., Candalija, A., . . . Talbot, K. (2020). *Correction of amyotrophic lateral sclerosis related phenotypes in induced pluripotent stem cell-derived motor neurons carrying a hexanucleotide expansion mutation in C9orf72 by CRISPR/Cas9 genome editing using homology-directed repair*. Oxford University Press. doi:10.1093/hmg/ddaa106/5851820
- Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I. M., Cox, D. B. T., . . . Zhang, F. (2016). *C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector*. *Science*, 353(6299), aaf5573. doi:10.1126/science.aaf5573
- Balendra, R., & Isaacs, A. M. (2018). *C9orf72-mediated ALS and FTD: Multiple pathways to disease*. Springer Science and Business Media LLC. doi:10.1038/s41582-018-0047-2
- Bensimon, G., Lacomblez, L., Meininger, V., & ALS/Riluzole Study Group. (1994). *A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis*. *The New England Journal of Medicine*, 330(9), 587-591. doi:10.1714/1056.11590

- Brokowski, C., & Adli, M. (2019). *CRISPR ethics: Moral considerations for applications of a powerful tool*. *Journal of Molecular Biology*, 431(1), 88-101. doi:10.1016/j.jmb.2018.05.044
- Brown, R. H., & Al-Chalabi, A. (2017). *Amyotrophic lateral sclerosis*. *The New England Journal of Medicine*, 377(2), 162-172. doi:10.1056/NEJMra1603471
- Bunton-Stasyshyn, R. K. A., Saccon, R. A., Fratta Pietro, & Fisher, E. M. C. (2015). *SOD1 function and its implications for amyotrophic lateral sclerosis pathology: New and renascent themes*. *The Neuroscientist*, 21(5) 519-529. doi: 10.1177/1073858414561795
- Da Cruz, S., Bui, A., Saberi, S., Lee, S. K., Stauffer, J., McAlonis-Downes, M., . . . Ravits, J. (2017). *Misfolded SOD1 is not a primary component of sporadic ALS*. *Acta Neuropathologica*, 134(1), 97-111. doi:10.1007/s00401-017-1688-8
- Dai, W., Zhu, L., Yan, Z., Xu, Y., Wang, Q., & Lu, X. (2016). CRISPR-Cas9 for in vivo gene therapy: Promise and hurdles. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 5(8), e349. doi:10.1038/mtna.2016.58
- Davis-Dusenbery, B. N., Williams, L. A., Klim, J. R., & Eggan, K. (2014). *How to make spinal motor neurons*. *Development*, 141(3), 491-501. doi:10.1242/dev.097410
- De Araújo Brasil, A., Dias Castela De Carvalho, Mariana, Gerhardt, E., Dias Queiroz, D., Dias Pereira, M., Outeiro, F., . . . Eleutherio, A. (2019). *Characterization of the activity, aggregation, and toxicity of heterodimers of WT and ALS-associated mutant Sod1*. New York: National academy of sciences. <https://www.pnas.org/content/suppl/2019/11/27/1902483116.DCSupplemental>

- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). *The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*. *Science*, 346(6213), 1077. doi:10.1126/science.1258096
- Duan, W., Guo, M., Yi, L., Liu, Y., Li, Z., Ma, Y., . . . Li, C. (2020). *The deletion of mutant SOD1 via CRISPR/Cas9/sgRNA prolongs survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model*. *Gene Therapy*, 27(3-4), 157-169. doi:10.1038/s41434-019-0116-1
- Gaj, T., Ojala, D. S., Ekman, F. K., Byrne, L. C., Limsirichai, P., & Schaffer, D. V. (2017). *In vivo genome editing improves motor function and extends survival in a mouse model of ALS*. *Science Advances*, 3(12), eaar3952. doi:10.1126/sciadv.aar3952
- Gordon, P. H. (2011). *Amyotrophic lateral sclerosis: Pathophysiology, diagnosis and management*. *CNS Drugs*, 25(1), 1-15. doi:10.2165/11586000-000000000-00000
- Green, K. M., Linsalata, A. E., & Todd, P. K. (2016). *RAN translation—what makes it run?* *Brain Research*, 1647, 30-42. doi:10.1016/j.brainres.2016.04.003
- Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Brayne, C., Beghi, E., van den Berg, Leonard H, Chio, A., . . . Rooney, J. (2017). *The changing picture of amyotrophic lateral sclerosis: Lessons from european registers*. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 88(7), 557-563. doi:10.1136/jnnp-2016-314495
- Heino, Jyrki, & Vuento, Matti. (2015). *Biokemian ja solubiologian perusteet* (3rd - 4th ed.). Helsinki: Sanoma Pro Oy.
- Hille, F., Richter, H., Wong, S. P., Bratovič, M., Ressel, S., & Charpentier, E. (2018). *The biology of CRISPR-cas: Backward and forward*. *Cell*, 172(6), 1239-1259. doi:10.1016/j.cell.2017.11.032

- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). *Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering*. *Cell*, 157(6), 1262-1278. doi:10.1016/j.cell.2014.05.010
- Kent Michael. (2000). *Advanced biology*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Koonin, E. V., Makarova, K. S., & Zhang, F. (2017). *Diversity, classification and evolution of CRISPR-cas systems*. *Current Opinion in Microbiology*, 37, 67-78. doi:10.1016/j.mib.2017.05.008
- Krishnan, G., Zhang, Y., Gu, Y., Kankel, M. W., Fen-Biao, Y., Gao, & Almeida, S. (2020). *CRISPR deletion of the C9ORF72 promoter in ALS/FTD patient motor neurons abolishes production of dipeptide repeat proteins and rescues neurodegeneration*, *Acta Neuropathologica* 140:81-84. <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02154-6>
- Liu, T. Y., & Doudna, J. A. (2020). *Chemistry of class 1 CRISPR-cas effectors: Binding, editing, and regulation*. *The Journal of Biological Chemistry*, 295(42), 14473-14487. doi:10.1074/jbc.REV120.007034
- Lodish Harvey, Berk Arnold, Zipursky S Lawrence, Matsudaira Paul, Baltimore David, & Darnell James. (2000). *Molecular cell biology* (4th ed.). New York: W. H. Freeman.
- McEachin, Z. T., Parameswaran, J., Raj, N., Bassell, G. J., & Jiang, J. (2020). *RNA-mediated toxicity in C9orf72 ALS and FTD*. *Neurobiology of Disease*, 145, 105055. doi:10.1016/j.nbd.2020.105055
- Philip Van Damme, Wim Robberecht, & Ludo Van Den Bosch. (2017). *Modelling amyotrophic lateral sclerosis: Progress and possibilities*. *Disease Models and Mechanisms*, 10(5), 537. Retrieved from <https://search.proquest.com/docview/1952238298>

- Pinilla-Redondo, R., Mayo-Muñoz, D., Russel, J., Garrett, R. A., Randau, L., Sørensen, S. J., & Shah, S. A. (2019). *Type IV CRISPR–Cas systems are highly diverse and involved in competition between plasmids*. Oxford University Press. doi:10.1093/nar/gkz1197
- Rowland, L. P. (2001). *How amyotrophic lateral sclerosis got its name: The clinical-pathologic genius of jean-martin charcot*. *Archives of Neurology*, 58(3), 512-515. doi:10.1001/archneur.58.3.512
- Saberi, S., MD, Stauffer, J. E., BA, Schulte, D. J., BS, & Ravits, J., MD. (2015). *Neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis and its variants*. *Neurologic Clinics*, 33(4), 855-876. doi:10.1016/j.ncl.2015.07.012
- Safari, F., Zare, K., Negahdaripour, M., Barekati-Mowahed, M., & Ghasemi, Y. (2019). *CRISPR Cpf1 proteins: Structure, function and implications for genome editing*. *Cell & Bioscience*, 9(1), 36. doi:10.1186/s13578-019-0298-7
- Schludi, M. H., May, S., Grässer, F. A., Rentzsch, K., Kremmer, E., Küpper, C., . . . Edbauer, D. (2015). *Distribution of dipeptide repeat proteins in cellular models and C9orf72 mutation cases suggests link to transcriptional silencing*. *Acta Neuropathologica*, 130(4), 537-555. doi:10.1007/s00401-015-1450-z
- Sea, K., Sohn, S. H., Durazo, A., Sheng, Y., Shaw, B. F., Cao, X., . . . Valentine, J. S. (2015). *Insights into the role of the unusual disulfide bond in copper-zinc superoxide dismutase*. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(4), 2405-2418. doi:10.1074/jbc.M114.588798
- Shmakov, S., Smargon, A., Scott, D., Cox, D., Pyzocha, N., Yan, W., . . . Koonin, E. V. (2017). *Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems*, Springer Science and Business Media LLC. doi:10.1038/nrmicro.2016.184

- Sullivan, P. M., Zhou, X., Robins, A. M., Paushter, D. H., Kim, D., Smolka, M. B., & Hu, F. (2016). *The ALS/FTLD associated protein C9orf72 associates with SMCR8 and WDR41 to regulate the autophagy-lysosome pathway*. *Acta Neuropathologica Communications*, 4(1), 51. doi:10.1186/s40478-016-0324-5
- Weskamp, K., Tank, E. M., Miguez, R., McBride, J. P., Gómez, N. B., White, M., . . . Barmada, S. J. (2020). *Shortened TDP43 isoforms upregulated by neuronal hyperactivity drive TDP43 pathology in ALS*, American Society for Clinical Investigation. doi:10.1172/jci130988
- Zetsche, B., Gootenberg, J., Abudayyeh, O., Slaymaker, I., Makarova, K., Essletzbichler, P., . . . Zhang, F. (2015). *Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-cas system*. *Cell*, 163(3), 759-771. doi:10.1016/j.cell.2015.09.038