

CRISPR-Cas -menetelmän kliiniset geeniterapeuttiset sovellukset

Alexi Hakkarainen
Luonnontieteiden kandidaatin tutkielma
Turun yliopisto
Biolääketieteen koulutusohjelma
Lääketieteellinen tiedekunta
Biolääketieteen laitos
18.09.2024

Tiivistelmä

CRISPR-Cas-teknologia on mullistanut geeniterapian tarjoamalla tarkan ja joustavan työkalun geneettisten sairauksien hoitoon. Menetelmä pohjautuu bakteerien adaptiiviseen immuunipuolustukseen, jossa Cas-proteiinit ja CRISPR-sekvenssit toimivat yhdessä tunnistuen ja tuhoten vieraita geneettisiä elementtejä. Tästä mekanismista kehitetty CRISPR-Cas-menetelmä on osoittautunut tehokkaaksi monissa geeniterapian sovelluksissa. Cas-nukleaasin ja siihen liitetyn sgRNA:n (single guide RNA) avulla menetelmä voi kohdistaa DNA:n katkaisun tarkasti haluttuun sekvenssiin, minkä jälkeen solun DNA-korjausmekanismien avulla on mahdollista poistaa tai lisätä geenejä. CRISPR-Cas-menetelmän avulla on myös mahdollista korvata virheellisesti toimiva geeni toisella geenillä.

CRISPR-Cas-geenimuokkauksella on saavutettu merkittäviä tuloksia erityisesti hemoglobiнопatioiden, kuten sirppisoluanemian ja beetatalassemian hoidossa. Näissä sairauksissa CRISPR-Cas-menetelmää hyödynnetään hematopoieettisiin kantasoluihin muokkaukseen niin, että ne alkavat tuottaa fetaalihemoglobiinia, mikä kompensoi viallisten geenien aiheuttamaa ongelmaa. Vuonna 2023 näihin sairauksiin hyväksyttiin ensimmäinen CRISPR-Cas-pohjainen lääkehoito (Casgevy) Iso-Britanniassa ja Yhdysvalloissa.

Vaikka CRISPR-Cas on osoittautunut tehokkaaksi tietyissä kliinisissä sovelluksissa, sen laajamittainen kliininen käyttö kohtaa vielä teknisiä haasteita. Yksi merkittävimmistä ongelmista on off-target-muutokset eli kohdesekvenssien ulkopuolella tapahtuvat muokkaukset, jotka voivat johtaa haitallisiin sivuvaikutuksiin, kuten syövän kehittymiseen. Lisäksi CRISPR-Cas-menetelmän tarkkuutta ja tehokkuutta haittaavat toimitusmenetelmien rajoitteet. Virusvektorit, kuten adeno-assosioituneet virukset (AAV), ovat yleisesti käytettyjä, mutta niiden kantokyky on rajallinen ja ne voivat aiheuttaa immuunivasteita. Synteettisten vektorien, kuten lipidinanopartikkelien, tutkimus tarjoaa lupaavia vaihtoehtoja, mutta niiden tehokkuus ei ole vielä riittävällä tasolla.

CRISPR-Cas-menetelmä tarjoaa merkittäviä mahdollisuuksia geeniterapian alalla ja kliiniset kokeet osoittavat sen potentiaalin geneettisten sairauksien hoidossa. Kuitenkin menetelmän terapeuttisen tehokkuuden optimoimiseksi on ratkaistava useita teknisiä haasteita, kuten kuljetusmenetelmien parantaminen, off-target-muutosten minimointi ja eri solutyypin muokkaamisen tehostaminen. Jatkuva tutkimus ja menetelmien kehittäminen ovat avainasemassa CRISPR-Cas-teknologian tulevassa menestyksessä kliinisessä käytössä.

Sisällysluettelo

Tiivistelmä	2
1. Johdanto.....	5
2. CRISPR-Cas9 -menetelmä.....	5
2.1 Geenimuokkauksen perinteiset menetelmät	5
2.2 Bakteerien adaptiivinen immuunipuolustus	6
2.3 CRISPR-Cas-menetelmän toiminta geenimuokkaustyökaluna.....	8
2.4 DNA:n korjausmekanismit geenimuokkauksessa	9
2.5 CRISPR-Cas-menetelmän johdannaiset.....	10
2.5.1 Eri Cas-endonukleaasien ominaisuudet	13
2.5.2 Cas-nukleaasien muokkaus.....	13
2.5.3 Emäsmuokkausmenetelmä	14
2.5.4 Prime-muokkausmenetelmä	14
3. CRISPR-Cas koneiston kuljetus soluun geeniterapiasovelluksissa	15
3.1 Virusvektorit.....	16
3.2 Synteettiset vektorit.....	17
3.3 Muut kuljetusmekanismit	18
3.4 <i>Ex vivo</i> ja <i>In vivo</i> -muokkaus	18
4. CRISPR-Cas kliinisissä geeniterapiatutkimuksissa	19
4.1 Hemoglobiinopatiat	20
4.1.1. Sirppisoluanemia	20
4.1.2. Beetatalassemia.....	20
4.2 Duchennen lihasdystrofia	21
5. Eettiset ongelmat.....	22
5.1 Somaattisten solujen geenimuokkaus.....	23

5.2 Ituradan solujen geenimuokkauksen eettiset ongelmat	23
5.3 Geenimuokkauksen valvonta ja säätely	24
6. Pohdinta	26
6.1 Terapeuttisen tehokkuuden saavuttaminen	26
6.2 CRISPR-Cas-geenimuokkauksen tekniset haasteet	27
6.2.1 Geenimuokkauksen tarkkuuden parantaminen	27
6.2.2 Geenimuokkauksen tehokkuuden kasvattaminen	28
6.2.3 Kuljetusmekanismin vaikutus geenimuokkauksen tehokkuuteen	29
6.3 Eettiset haasteet	29
Yhteenveto	30
Lähdeluettelo	31

1. Johdanto

Kun tutkijoiden ymmärrys ihmiskehon toiminnoista on ajan saatossa lisääntynyt, geeniterapia on muodostunut aina vain varteenotettavammaksi vaihtoehdoksi ennaltaehkäistä ja hoitaa tauteja. Alun perin ajatus geeniterapiasta nousi esiin 1960- ja 1970-luvulla, mutta sen käytössä kliinisessä lääketieteessä on edelleen paljon enemmän potentiaalia tämänhetkisten käyttökohteiden lisäksi. Geeniterapialla tarkoitetaan sairauksien hoitoa ja ehkäisemistä sairautta aiheuttavaa geeniä muokkaamalla, poistamalla tai siirtämällä terve geeni sen paikalle.

Pidempään käytössä olleet geeniterapiamenetelmät ovat kalliita, hitaita ja usein epätarkkoja, mikä on muodostanut ongelman niiden käyttämiseksi potilaiden hoidossa. Vuonna 2012 Jennifer Doudna ja Emmanuelle Charpentier esittelivät uuden geenimuokkausmenetelmän nimeltä CRISPR-Cas, joka on syrjäyttänyt monet vanhemmat menetelmät.

LuK-tutkielmassani keskityn esittelemään CRISPR-Cas-menetelmän toimintaa ja käyttöä osana ihmisen geeniterapiaa sekä somaattisissa että ituradan soluissa. Tämän lisäksi käsittelen aiheen eettisiä ongelmia ja haasteita.

2. CRISPR-Cas9 -menetelmä

2.1 Geenimuokkauksen perinteiset menetelmät

Geenimuokkaus on ollut vuosikymmeniä tutkijoiden mielenkiinnon kohteena. Ensimmäisenä tekniikkana käytettiin jo 1970-luvun loppupuolella homologista rekombinaatiota. Siinä muutoksen kohteena olevan sekvenssin kanssa osakseen komplementaarinen sekvenssi injektoidaan solun sisään, jossa DNA:n nukleiinihappojen pariutuessa on mahdollista saada aikaan muutos, kun injektoitu sekvenssi korvaa kohdesekvenssin solun tumassa. Tässä tekniikassa suureksi ongelmaksi muodostuu kuitenkin heikko tehokkuus, kun haluttuja muutoksia tapahtuu jopa vain yhdessä solussa miljoonasta. Lisäksi ei-toivottujen mutaatioiden mahdollisuus on homologista rekombinaatiota käyttämällä erittäin korkea. (Wigler et al., 1977)

Geenimuokkaus homologisella rekombinaatiolla on erittäin sattumanvaraista, joten tämä menetelmä ei juurikaan täyttänyt tutkijoiden vaatimuksia geeniterapia käytössä. Seuraava askel otettiin 1990-luvulla, kun sinkkisorminukleaasit (zinc finger nuclease, ZFN) esiteltiin. Tutkijat löysivät eukaryoottisista organismeista katkaisuelementtejä, jota pystyttiin muuttamaan geenimuokkaukseen soveltuvaksi. Toimintaperiaatteena ZFN:ssa on, että niiden proteiini-rakenne suunnitellaan kohdesekvenssin mukaan, jolloin nämä nukleaasit sitoutuvat täsmällisesti haluttuun kohtaan ja katkaisevat DNA juosteen. Näin pystyttiin ensimmäisen kerran tehokkaasti tekemään katkoksia haluttuun kohtaan DNA:ta. Geenimuokkaus muodostui tällä menetelmällä selvästi tehokkaammaksi, kun halutut muutokset onnistuivat joka kymmenennessä muokkauksessa. Haasteeksi ZFN:n käytössä muodostui kuitenkin se, että jokaiselle kohdesekvenssille on suunniteltava oma proteiini, mikä tekee käytöstä haastavaa ja työlästä. (Urnov et al., 2010)

Ensimmäinen huomattavasti helppokäyttöisempi geenimuokkaustyökalu esiteltiin vuonna 2010. Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) kehitettiin sinkkisorminukleaasien tapaan luonnossa normaalisti esiintyvistä proteiineista, jolla on kyky sitoutua täsmällisesti tiettyyn kohtaan DNA:ta (Boch et al., 2009). Tätä proteiinia muokattiin liittämällä siihen DNA:n katkaisemiseen pystyvät nukleaasialueet. Lopputuloksena saatiin DNA:han hyvällä tarkkuudella sitoutuva ja juosteen katkaisemiseen kykenevä proteiini. TALEN:n toiminta ja tehokkuus ovat verrattavissa ZFN:n tehokkuuteen, mutta selkeä etu on käytön helppoudessa. TALEN:n yksinkertaisempi rakenne helpottaa proteiinin suunnittelemista jokaiselle kohdesekvenssille, jolloin käyttö on kustannustehokkaampaa (Joung & Sander, 2013). Seuraava askel geenimuokkauksessa otettiin pari vuotta myöhemmin, kun uusi TALEN:ia ja ZFN:ia tehokkaampi CRISPR-Cas -menetelmä esiteltiin tiedeyhteisölle.

2.2 Bakteerien adaptiivinen immuunipuolustus

Vuonna 1987 japanilaisen tutkimusryhmän analysoidessa *Escherichia coli* -bakteerin genomia ilmeni toistuvia sekvenssejä sisältävä lokus, jonka tehtävää ei vielä tiedetty (Ishino et al., 1987). Myöhemmin rakenteeltaan samanlaisia lokuksia löytyi myös muista prokaryooteista ja nimitys CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) muodostui (Mojica et al., 1993). CRISPR-sekvenssien samankaltaisuudet olivat selkeitä. Ne koostuvat yleensä 28 – 37 nukleotidin mittaisista toistojaksoista (repeat) ja toistojaksojen välissä olevista, yleensä 32 – 38 nukleotidia pitkeistä, niin sanotuista vaihtuvista sekvensseistä (spacer). CRISPR-sekvenssien tarkoitus oli

tutkijoille vuosia mysteeri ja erilaisia hypoteeseja niiden toiminnasta, esimerkiksi DNA-korjausmekanismina, esitettiin (Makarova et al., 2002). Vuosia myöhemmin CRISPR-sekvenssien spacereiden huomattiin täsmäävän bakteriofagien ja plasmidien DNA:han, jolloin ajatus niiden osallistumisesta genomien suojelemiseen syntyi. Nykyään tiedetään, että CRISPR-lokus toimii useiden bakteerien ja arkkibakteerien hankittuna immuunipuolustuksena. (Mojica et al., 2005)

Samaan aikaan tunnistettiin useita geenejä, joiden koodaamien proteiinien todettiin olevan läheisesti yhteydessä CRISPR-sekvenssien toimintaan, josta muodostui nimitys *cas* (CRISPR associated)-geenit (Jansen et al., 2002). Myöhemmissä tutkimuksissa selvisi CRISPR-sekvenssien ja Cas-proteiinien yhteistoiminta bakteerien ja arkkibakteerien immuunipuolustuksessa (Makarova et al., 2006). CRISPR-sekvenssejä ja Cas-proteiineja alettiin kutsua yhdessä CRISPR-Cas-puolustusjärjestelmiksi.

Eri bakteerien CRISPR-Cas-puolustusjärjestelmät tutkittaessa huomattiin eroja niiden toiminnassa. Puolustusjärjestelmät jaetaan kahteen luokkaan toiminnallisten erojen mukaan. Suurin osa, noin 90 %, bakteereista ja arkeista käyttää luokan I CRISPR-Cas-järjestelmiä, joissa esiintyy pääasiassa 4–7 Cas-efektoriproteiinia. Nämä Cas-proteiinit yhdessä vastaavat kompleksin toiminnasta. Luokan II CRISPR-Cas-puolustusjärjestelmissä, jota käyttävät loput 10 % bakteereista ja arkeista, efektoriproteiineja on vain yksi, jolloin kompleksin toiminta on huomattavasti yksinkertaisempi. (Shmakov et al., 2017)

Bakteerien ja arkkien CRISPR-Cas-immuunipuolustuksen toiminta jaetaan kolmeen eri vaiheeseen, muokkausvaihe (adaptation), CRISPR-RNA:n (crRNA) prosessointi, ja estämisvaihe (interference). Ensimmäisessä eli muokkausvaiheessa bakteeriin tunkeutuneen bakteriofagin perimästä siirretään tunnistekappale bakteerin CRISPR-sekvenssiin spaceriksi. Tunnistekappaleen valinta bakteriofagin perimästä tapahtuu niin kutsuttujen PAM-sekvenssien (protospacer adjacent motif) ohjaamana. PAM-sekvenssin tehtävä bakteerien immuunipuolustuksessa on suojata bakteeri omaa genomia Cas-nukleaasien aktiivisuudelta. Tunnistekappaleen siirtämisestä vastaa kaikissa CRISPR-Cas-tyypeissä Cas1 ja Cas2-proteiinit. (Makarova et al., 2006)

Immuunipuolustuksen toisessa vaiheessa tapahtuu CRISPR-sekvenssin transkriptio crRNA:ksi. Kaikissa CRISPR-Cas-järjestelmissä CRISPR-sekvenssi transkriptoidaan ensin prekursori-crRNA:ksi (pre-crRNA), joka Cas-proteiinien ja ribonukleaasien toimesta pilkotaan ja prosessoidaan valmiiksi crRNA:ksi. Valmis crRNA ilmentää yhtä spacer-sekvenssiä, jota käytetään tunnistamaan bakteriofagin perimä tulevassa infektiossa. CRISPR-Cas-tyypin mukaan eri Cas-nukleaasit osallistuvat crRNA:n prosessointiin. Tyypin II efektoriproteiini Cas9 on tutkituin ja parhaiten

tunnettu kaikista Cas-nukleaaseista. Cas9-proteiini vastaa yhdessä RNase III:n ja tracrRNA:n (trans-activating RNA) kanssa pre-crRNA:n prosessoinnista. tracrRNA:n emäsjärjestys on komplementaarinen CRISPR-sekvenssin toistojaksoille, jolloin crRNA:n prosessoinnin ensimmäisessä vaiheessa tracrRNA kiinnittyy pre-crRNA:han emäsparisitoutumisella. Cas9-nukleaasi stabiloi tracrRNA:pre-crRNA-kompleksin ja pre-crRNA:n prosessointi jatkuu RNase III:n toimesta. Prosessoinnin lopputuloksena on yksittäisiä tracrRNA:crRNA-Cas9-komplekseja, joissa jokaisessa ilmennetään yhtä CRISPR-sekvenssin spacereista lähtöisin olevaa tunnistuskappaletta. (Marraffini & Sontheimer, 2010)

Kolmannessa niin sanotussa estämävaiheessa Cas9-proteiini toimii endonukleaasina. tracrRNA:crRNA-kompleksin kiinnittyessä Cas-proteiiniin siinä tapahtuu konformaatiomuutoksia ja sen endonukleaasitoiminta aktivoituu. tracrRNA:crRNA-Cas9-kompleksi seuloo tulevissa infektioiden virusten perimää. Kun crRNA:n spaceria vastaava sekvenssi löytyy viruksen perimästä, crRNA sitoutuu siihen komplementaarisella sitoutumisella, jolloin Cas9-nukleaasin katalyyttiset RuvC ja HNH nukleaasialueet katkaisevat viruksen DNA/RNA-juosteen. Viruksen perimän katkaiseminen estää sen toiminnan, jolloin infektiota estyy. (Marraffini & Sontheimer, 2010)

2.3 CRISPR-Cas-menetelmän toiminta geenimuokkaustyökaluna

Erityisesti tyypin II CRISPR-Cas-puolustusjärjestelmän yksinkertaisuus kiinnosti tutkijoita ja vuonna 2012 Jennifer Doudna ja Emmanuelle Charpentier esittelivät uuden geenimuokkaustyökalun nimeltä CRISPR-Cas9. Tutkijat eristivät *Streptococcus pyogenes* -bakteerista Cas9-proteiinin (SpCas9) ja totesivat, että mukailemalla bakteereissa normaalisti toimivien kaksois-RNA-sekvenssien rakennetta Cas9:n nukleaasitoimintaa pystytään ohjaamaan. (Jinek et al., 2012)

Yksinkertaistaakseen Cas9:ää ohjaavaa RNA-koneistoa tutkijat kehittivät yhden kimeerisen RNA-juosteen (single guide RNA, sgRNA), joka sisältää bakteereissa ilmenevät tracrRNA- ja crRNA-juosteet. Rakenteeltaan sgRNA jäljittelee tracrRNA:crRNA-kompleksia, jolloin kiinnittyminen Cas9:ään säilyy ennallaan. Tämän sgRNA:n ohjaamana Cas9:n endonukleaasiaktiivisuus pystytään kohdentamaan haluttuun kohtaan DNA:ta (Jinek et al., 2012). Aiempiin geenimuokausmenetelmiin verrattuna CRISPR-Cas9:n suuri etu on käytön helppous. Pelkästään sgRNA:n emäsjärjestystä muokkaamalla DNA:n katkaisu voidaan kohdentaa lähes mihin tahansa haluttuun kohtaan genomia.

Rajoitteena CRISPR-Cas9:n nukleaasitoiminnan kohdentamisessa toimii PAM-sekvenssi. PAM-sekvenssit ovat 2–5 nukleotidin mittaisia lyhyitä pätkiä DNA:ssa, jotka ovat erilaisia CRISPR-Cas-systeemin tyypistä ja alkuperäisestä bakteerista riippuen. Cas9-proteiinilla PAM-sekvenssi on muotoa NGG, jolloin kohde-DNA:sta täytyy katkaisukohtaan vierestä löytyä yksi mikä tahansa nukleotidi (N) ja sen jälkeen kaksi guaniinia (G). Yleensä PAM-sekvenssin sijainti on katkaisukohtaan 3–4 nukleotidia lukusuuntaan. Cas9:n nukleaasitoiminnan aktivoituminen ei tapahdu ilman PAM-sekvenssin tunnistamista, mikä rajoittaa mahdollisten kohdesekvenssien määrää. (Jinek et al., 2012)

Yksi suurimmista CRISPR-Cas-menetelmän haasteista geenimuokkauksessa on mahdollisten kohdegeenien ulkopuolella eli off-target-alueilla tapahtuvat muokkaukset. Vaikka teoriassa CRISPR-Cas-koneiston ohjaaminen kohdegeenin muokkaukseen onnistuu komplementaarisen sgRNA:n suunnittelulla, muokkaus ei välttämättä tapahdu ainoastaan kohdegeenissä tästä huolimatta. Ohjattaessa CRISPR-Cas-koneiston muokkausalueelle sgRNA sietää jonkun verran yhteensopimattomuutta ja saattaa tällöin ohjata muokkausalueen off-target-alueelle, jossa tapahtuu virheellinen DNA:n katkaisu (Fu et al., 2013). Näillä off-target-mutaatioilla saattaa olla ennalta-arvaamattomia vaikutuksia, kun alueen geenien toiminta mahdollisesti häiriintyy. Off-target-mutaatiot saattavat johtaa esimerkiksi karsinogeenisiin vaikutuksiin ja siten kasvattaa potilaan syöpäriskiä. Off-target-vaikutusten minimoimiseksi on kehitetty useita tapoja, joista yksi tärkeimmistä on kohdegeenin suunnittelu ja sgRNA:n optimoiminen. Tutkijat ovat lisäksi yrittäneet kehittää vaihtoehtoisia cas-nukleaaseja, joilla off-target-aktiivisuus olisi pienempi (kappale 2.4).

2.4 DNA:n korjausmekanismit geenimuokkauksessa

Usein genomia muokatessa halutaan deleetioiden sijaan viedä uusia geenejä genomiin tai esimerkiksi korjata virheellisiä geenejä korvaamalla ne korjatulla geenisekvenssillä. Tällöin käytetään hyväksi solujen omia mekanismeja kaksoisjuosteen katkaisukohtien korjaamiseksi. DNA:n kaksoisjuosteen katkokkien korjausta varten elimistössämme toimii kaksi eri DNA-korjausmekanismia: homology-directed repair (HDR) (Sung & Klein, 2006) ja non-homologous end joining (NHEJ) (Lieber, 2008). Näistä HDR on täsmällinen korjausmekanismi, joka tarvitsee toimiakseen homologisen DNA-juosteen. Tästä syystä HDR-mekanismi esiintyy jakautuvissa soluissa, yleisesti solusyklin G2 ja S-vaiheissa, jolloin homologinen DNA-juoste eli niin sanottu templaatti on saatavilla. Geenimuokkauksessa soluihin voidaan viedä CRISPR-Cas-komponenttien lisäksi DNA-templaatti,

jolloin HDR-korjausmekanismeissa DNA korjataan templaatin mallin mukaiseksi. Näin saadaan lisättyä geeni osaksi solun genomia tai esimerkiksi muokattua virheellisesti toimiva geeni jälleen toimivaksi. (Lin et al., 2014)

NHEJ-mekanismi on solun kannalta tehokkaampi, mutta epätarkempi tapa korjata DNA-katkos. Siinä DNA-juosteiden päät liitetään yhteen sattumanvaraisesti, minkä seurauksena DNA-juosteeseen jää usein ylimääräisiä nukleotideja tai jotkin nukleotidit katoavat. Näitä muutoksia kutsutaan insertioiksi ja deleetioiksi, ja yhdessä näistä käytetään nimitystä indel-mutaatiot. Geenimuokkauksen kannalta NHEJ-mekanismiin esiintyminen on usein huono asia, sillä yksittäisten nukleotidien muutokset muuttavat geenin lukukehysten. Indel-mutaatioiden muodostumista ja geenimuokkauksen lopputulosta on mahdoton ennustaa, jolloin muokkauksen seuraukset ovat arvaamattomia. NHEJ-mekanismia hyödynnetäänkin yleensä prekliinisissä tutkimuksissa satunnaisten mutaatioiden muodostamisessa ja poistogeenisten tautimallien luomisessa. (Pickar-Oliver & Gersbach, 2019)

DNA-katkoksen korjaus HDR-mekanismiin kautta johtaa täsmällisiin muokkauksiin ja siten palvelee genomimuokkausta paremmin kuin NHEJ-mekanismi. Ongelmaksi muodostuu se, että nämä molemmat DNA-korjausmekanismit toimivat soluissa rinnakkain ja on hankalaa vaikuttaa, kumman mekanismin kautta DNA-katkos korjataan. HDR:NHEJ-suhde on siten ratkaisevassa roolissa genomimuokkauksen onnistumisen kannalta. Tehokkaasti jakautuvissa soluissa tämä suhde on yleensä suurempi kuin heikosti jakaantuvissa soluissa. Tutkijat ovat yrittäneet löytää tapoja kasvattaa suhdetta erilaisin menetelmin, kuten käyttämällä inhibiittoreita NHEJ-mekanismiin estämiseen (Maruyama et al., 2015). HDR:NHEJ-suhteen kasvattamiseksi ei kuitenkaan ole löytynyt hyvin toimivaa tapaa. Tutkimus on viime vuosina keskittynyt uusien cas-nukleaasien ja muokausmenetelmien kehittämiseen, jotta riippuvuus DNA:n korjausmekanismeista ei olisi niin suurta.

2.5 CRISPR-Cas-menetelmän johdannaiset

Streptococcus pyogenes -bakteerista eristetyn SpCas9:n lisäksi on eristetty muita Cas9-proteiineja monesta muusta bakteerista. Näitä ovat esimerkiksi *Staphylococcus aureus* -bakteerista eristetty SaCas9, *Streptococcus thermophilus* -bakteerista eristetyt St1Cas9 ja St3Cas9, ja *Neisseria meningitidis* -bakteerista eristetty NmCas9. Jokainen Cas9-proteiini tunnistaa sille tyypillisen PAM sekvenssin, mikä mahdollistaa nukleaasitoiminnan kohdentamisen useampaan kohtaan genomia. Lisäksi PAM-sekvenssit vaikuttavat cas-nukleaasien spesifisyyteen. Esimerkiksi St1Cas9 ja St3Cas9

proteiineissa erittäin rajoittavien PAM-sekvenssien (NNAGAAW ja NGGNG) johdosta off-target-muutosten esiintyminen on pienempää kuin käytettäessä SpCas9-nukleaseja (Müller et al., 2016). Myös Cas9-proteiinien rakenteessa on eroja. SaCas9-proteiinin etuna on sen pieni koko (1053 aminohappoa) verrattuna yleisesti käytettyyn SpCas9-proteiiniin (1368 aminohappoa), mikä muodostuu merkittäväksi tekijäksi, kun mietitään CRISPR-Cas9-koneiston pakkaamista kuljetusvektoriin. (Ran et al., 2015)

DNA-katkosten tarkkuutta ja tehokkuutta lisätäkseen tutkijat ovat etsineet muita Cas-proteiineja ja pyrkineet muokkaamaan jo tunnettuja endonukleaaseja käyttötarkoituksiin sopivammiksi (Taulukko 1).

Taulukko 1. Erilaisia cas-nukleaaseja

Nukleaasin nimi	Alkuperä	PAM-sekvenssi (5' → 3')	Koko (aminohappoa)	Ominaisuudet
SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i>	NGG	1 368	<ul style="list-style-type: none"> Tutkituin Yleisimmin käytetty
SaCas9	<i>Streptococcus aureus</i>	NNGRRT	1 053	<ul style="list-style-type: none"> Kooltaan pienempi kuin SpCas9 Mahdollisesti sopivampi vektorivälitteiseen kuljetukseen
St1Cas9 St3Cas9	<i>Streptococcus thermophilus</i>	NNAGAAW NGGNG	1 122 1 409	<ul style="list-style-type: none"> PAM-sekvenssi rajoittavampi Spesifisyys on ollut SpCas-nukleaaseja parempi
Cas12a	<i>Acidaminococcus</i>	TTTV	1 308–1 310	<ul style="list-style-type: none"> Porrastunut DNA:n katkaisu jättäen ketjuihin 4-5nt lisäkkeet Hyödyllinen HDR-korjausmekanismin toimintaa vaativissa muokkauksissa
nCas9	Johdettu useista Cas9-nukleaaseista			<ul style="list-style-type: none"> Toinen katalyyttinen osa hiljennetty, jolloin vain yksi ketju DNA:sta katkaistaan
dCas9	Johdettu useista Cas9-nukleaaseista			<ul style="list-style-type: none"> Katalyyttiset osat hiljennetty Sitoutuu genomiin ilman DNA:n katkaisua CRISPRi ja CRISPRa käyttö geeniaktiivisuuden säätelyyn
ABE	nCas, dCas			<ul style="list-style-type: none"> Cas-nukleaasiin liitetty adensiinideaminaasi Kykenee pistemutaatioihin ilman DNA:n katkaisua A-T → G-C muutokset
CBE	nCas, dCas			<ul style="list-style-type: none"> Cas-nukleaasiin liitetty sytidiinideaminaasi Kykenee pistemutaatioihin ilman DNA:n katkaisua C-G → T-A muutokset
Prime-editor	nCas			<ul style="list-style-type: none"> nCas9 yhdistettynä käänteiskopioijaentsyymiin Geenimuokkaus ilman DNA:n täydellistä katkaisua

2.5.1 Eri Cas-endonukleaasien ominaisuudet

Erityisesti PAM-sekvenssien tuomat rajoitteet ovat saaneet tutkijat etsimään vaihtoehtoisia Cas-proteiineja. Esimerkiksi Cas12-proteiini on toiminnaltaan melko samanlainen kuin Cas9, mutta sen PAM-sekvenssit ovat adeniini/tyymiini-rikkaita, kun taas Cas9 -proteiineissa ne ovat guaniini-rikkaita. Tällöin Cas12-proteiini saattaa olla soveltuvampi, jos kohdegeenin alue koostuu suurelta osin adeniinista ja tymiinista. Cas12-nukleaasien erikoisuutena on lisäksi porrastettu DNA-ketjun katkaisu. Tämän seurauksena DNA-katkoskohtaan jää ketjuihin 4–5 nukleotidin lisäkkeet (overhangs), joilla on todettu mahdollisesti olevan HDR-korjausmekanismia aktivoivaa vaikutusta (Zetsche et al., 2015). DNA:han muutokset kohdistavien nukleaasien lisäksi on löydetty nukleaaseja, kuten Cas13, jotka kohdistavat vaikutukset RNA:han. Vaikutusten kohdistaminen RNA:han tekee muutoksista hetkellisiä, jotka palautuvat CRISPR-Cas-koneiston poistuttua solusta. (Abudayyeh et al., 2016)

2.5.2 Cas-nukleaasien muokkaus

Useista Cas-proteiineista on muokattu erilaisia versioita, joilla jotkin ominaisuudet ovat parempia ja käyttötarkoitukseen soveltuvampia kuin alkuperäisillä. Esimerkiksi StCas9 ja NmCas9-proteiineista on muokattu versiot, joissa niiden katalyyttiset osat on hiljennetty. Tällöin Cas9-proteiini, jolla ei ole entsymaattista aktiivisuutta (deadCas9, dCas9), pystyy edelleen RNA:n ohjaamana sitoutumaan haluttuun kohtaan DNA:ta, mutta ei katkaise kohdejuostetta. dCas9-proteiineja voidaan käyttää niin sanottuna CRISPRi-menetelmänä (CRISPR-interference) geenien hiljentämiseen, sillä kohteeseen sitoutuessaan proteiini estää transkription (Qi et al., 2013). dCas9-proteiinia hyödynnetään myös geenien aktivoimisessa CRISPRa-menetelmällä. CRISPRa-menetelmässä dCas9-proteiini yhdistetään transkriptioaktivaattoriin, jolloin kohdegeeniin sitoutuessaan kompleksi käynnistää kyseisen geenin transkription (Bikard et al., 2013). dCas9-proteiineja on myös merkitty fluoresenssiproteiineilla, jolloin pystytään tutkimaan proteiinin sitoutumista haluttuihin DNA-sekvensseihin. (Chen et al., 2013)

Lisäksi Cas9-proteiineista on muokattu versioita, joissa toinen katalyyttinen osa on hiljennetty ja toinen toimii normaalisti (nickase, nCas9), jolloin Cas9 katkaisee vain toisen DNA:n kaksoisjuosteista. Kahta nCas9:ää käyttämällä katkokset voidaan erikseen tehdä molempiin juosteisiin niin, että katkaisukohtaan jää niin sanotut ulokkeet (overhangs). Näin on mahdollista kasvattaa geenimuokkauksen tarkkuutta. (Ran, Hsu, Lin, et al., 2013)

2.5.3 Emäsmuokkausmenetelmä

Uusimpia CRISPR-Cas-menetelmän johdannaisia ovat niin sanotut base-editorit eli emäsmuokkausmenetelmät. Näiden erona perinteisiin CRISPR-Cas-menetelmiin on kyky pistemutaatioiden tekemiseen ilman DNA:n katkaisemista. Emäsmuokkausmenetelmissä hyödynnetään nukleasiaktiivisuudelta hiljennettyä Cas-proteiinia (nCAs9 tai dCas9), johon on liitetty deaminaasientsyymi. Tähän mennessä on kehitetty kaksi eri emäsmuokkausmenetelmää: sytosiini-emäsmuokkaus (cytosine base editor, CBE) ja adeniini-emäsmuokkaus (adenine base editor, ABE). CBE:n avulla genomien sytosiini (C) – guaniini (G) emäsparit voidaan muuttaa tyymiini (T) – adeniini (A) emäspariksi (Komor et al., 2016). ABE:n avulla emäsparien muutos onnistuu A – T emäsparista G – C emäspariksi (Gaudelli et al., 2017). Emäsmuokkausmenetelmien avulla pystytään aiheuttamaan tai korjaamaan pistemutaatioita, mikä luo paljon mahdollisuuksia sairauksien hoitoon tulevaisuudessa.

2.5.4 Prime-muokkausmenetelmä

Toinen uusi CRISPR-Cas-menetelmästä johdettu geenimuokkaustyökalu on nimeltään prime editing eli prime-muokkausmenetelmä. Toisin kuin perinteisessä Cas-nukleaaseilla tehdyssä geenimuokkauksessa, prime-muokkauksessa geenimuokkaus pystytään tekemään ilman DNA-kaksoisketjun katkaisua. Prime-editorit ovat proteiinikomplekseja, jotka koostuvat nCas9:sta ja siihen liitetystä käänteiskopioijaentsyymistä. Proteiinikompleksin toimintaa ohjaa kohdesekvenssin mukaan syntetisoitu pegRNA (prime editing guide RNA), joka tunnistaa kohteen ja tarjoaa mallisekvenssin haluttua geenimuokkausta varten. (Anzalone et al., 2019)

Prime-editorien etuna on myös niiden vähäisempi vaatimus PAM-sekvenssin läheisyydestä kohdesekvenssin alueella, mikä rajoittaa geenimuokkauksen tekemistä vähemmän kuin perinteisillä cas-nukleaaseilla. Geenimuokkauksen toteutus ilman DNA-kaksoisjuosteen täydellistä katkaisua poistaa primemuokkauksesta perinteiseen CRISPR-Cas-muokkaukseen liittyvät DNA-korjausmekanismeista johtuvat ongelmat. Tästä syystä prime-editoinnissa esimerkiksi indelmutaatioiden ja muiden ei-toivottujen muutosten riski on huomattavasti pienempi. Prime-editoinnin merkittävistä eduista huolimatta sen tehokkuus saattaa olla vaihtelevaa, minkä vuoksi menetelmä vaatii vielä kehittämistä. (Anzalone et al., 2019)

3. CRISPR-Cas koneiston kuljetus soluun geeniterapiasovelluksissa

Turvallinen ja tehokas tapa kuljettaa CRISPR-Cas-koneisto kohdekudokseen ja soluihin on avainasemassa menetelmän kliinisessä käytössä. Kuljetustapoja ja -menetelmiä on useita ja niillä on jokaisella hyvät ja huonot puolensa. Monet näistä saattavat vahingoittaa soluja, aiheuttaa liiallista immuunivastetta tai olla muuten toksisia. Lisäksi kuljetustapa saattaa vaikuttaa off-target-muutosten ilmenemiseen. Näistä syistä kuljetustapa tulee valita tapauskohtaisesti siten, että saavutetaan mahdollisimman suuri terapeuttinen tehokkuus mahdollisimman pienillä haittavaikutuksilla.

CRISPR-Cas-menetelmässä koneiston kuljetukseen voidaan käyttää kolmea eri strategiaa. Ensimmäisessä tavassa Cas9-proteiinia ja sgRNA:ta koodaavat DNA-pätkät pakataan plasmidiin eli vektoriin. Tämä plasmidiin pohjautuva kuljetusmekanismi on yksinkertainen ja perinteinen tapa siirtää geenimuokkaukseen tarvittava koneisto solun sisään. Solun sisällä restriktioentsyymit pilkkovat plasmidin ja vapauttavat Cas9-proteiinia ja sgRNA:ta koodaavat DNA-sekvenssit. Plasmidiin-pohjautuvassa kuljetusmekanismissa haasteeksi muodostuu plasmidin kuljettaminen tumaan. Lisäksi plasmidin Cas9-proteiinia koodaava DNA-sekvenssi täytyy transkriptoida Cas9 mRNA:ksi, minkä vuoksi tässä tavassa geenimuokkauksen tapahtuminen vaatii enemmän aikaa. Lisäksi on mahdollista, että plasmidiin-pohjautuvassa kuljetusmekanismissa esiintyy enemmän off-target-muutoksia kuin muissa kuljetusstrategioissa. (Ran, Hsu, Wright, et al., 2013)

Toinen kuljetusstrategia pohjautuu sekoitukseen Cas9:n mRNA:ta ja sgRNA:ta. Tässä tavassa etuna on se, että Cas9-sekvenssi on jo mRNA-muodossa, jolloin tumassa tapahtuvaa transkriptiota ei vaadita. Cas9-mRNA transloidaan sytoplasmassa Cas9-proteiiniksi, joka sgRNA:n kanssa muodostaa Cas9-sgRNA-kompleksin, mikä on valmis muokkaamaan kohdegeenin. Ongelmaksi muodostuu se, että Cas9-proteiinin ilmentäminen on tilapäistä, mikä rajoittaa geenimuokkauksen tapahtumista. Lisäksi mRNA:n stabiilius hankaloittaa tämän kuljetusstrategian käyttöä. Plasmidiin-pohjautuvaan kuljetusstrategiaan verrattuna off-target-vaikutuksia on todettu olevan vähemmän, kun koneisto kuljetetaan soluun RNA-muodossa. (Niu et al., 2014)

Kolmannessa kuljetusstrategiassa CRISPR-Cas-koneisto viedään soluun sekoituksena Cas9-proteiinia ja sgRNA:ta. Puhdistettu Cas9-proteiini on positiivisesti varautunut ja muodostaa sgRNA:n kanssa tehokkaasti Cas9/sgRNA-ribonukleoproteiini-kompleksin (RNP). Valmiin RNP-kompleksin kuljettamisessa soluun on useita hyötyjä. Koneisto on heti soluun päästessään valmis toimimaan, jonka takia se on nopea ja sillä on korkea geenimuokkaustehokkuus. Lisäksi tämä strategia ei vaadi transkriptioon tai translaatioon vaadittavien kodonien optimointia ja promoottorialueen valintaa.

Tässä kuljetusstrategiassa on myös todettu olevan vähemmän off-target-muutoksia, toksisuutta ja immuunireaktiota kuin aiemmin mainituissa strategioissa. (Zuris et al., 2015)

Kuljetusstrategian lisäksi on valittava tapa, jolla CRISPR-Cas-koneisto kuljetetaan soluun. Erilaisia kuljetustapoja on useita, mutta usein käytetään vektoreita eli partikkeleita, kuten plasmideja tai viruksia, jotka kuljettavat muokkauskoneiston solun sisään. Geenimuokkauksen kannalta hyvän vektorin piirteitä ovat tehokkuus, spesifisyys ja turvallisuus. Vektorin tehokkuus määrittää kuinka useaan kohdesoluun CRISPR-Cas-koneisto saadaan kuljetettua. Mikäli tehokkuus jää matalaksi, geenimuokkauksen tehokkuus jää myös alhaiseksi ja terapeuttista tehokkuutta ei välttämättä saavuteta. Vektorin spesifisyys mahdollistaa CRISPR-Cas-koneiston kuljetuksen juuri haluttuihin soluihin. On olemassa esimerkiksi useita kudosspesifisiä vektoreita, joita käyttämällä saadaan kohdistettua vaikutukset kohdesoluihin. Vektorin korkea spesifisyys rajaa siten geenimuokkauksen tapahtumisen kohdesoluihin, mikä vähentää ei-toivottujen muutosten ilmenemistä muissa kehon soluissa. Vektorin tulee olla myös turvallinen käyttää. Se ei saa aiheuttaa haitallista immuunivastetta kehossa.

3.1 Virusvektorit

Virusvektoreita on kehitetty useita erilaisia, mutta kliinisissä kokeissa yleensä käytetyt virusvektorit on johdettu adeno- tai retroviruksista. Näiden virusten perimästä on poistettu virusten lisääntymiselle välttämättömät ja sairauksia aiheuttavat geenit, jolloin niitä on turvallista käyttää vektoreina.

Geenimuokkauksessa eniten käytetty virusvektori on adeno associated virus (AAV) (Gaj et al., 2016). Hyötyinä AAV:n käytössä on, että ne ovat huomattavasti vähemmän immunogeenisiä kuin muut virukset, ja pystyvät infektoimaan sekä jakautuvia, että ei-jakautuvia soluja. Ongelmaksi AAV-vektorien käytössä muodostuu niiden rajallinen kantokyky. *Streptococcus pyogenes* Cas9 ja sgRNA plasmidiin pakattuna ovat kooltaan noin 4 200 emästä. AAV-vektorin kantokyvyn ollessa noin 4 500 emästä, SpCas9 ja sgRNA saadaan juuri ja juuri mahdutettua sen sisään. Kantokykyongelmaan on yritetty löytää ratkaisuja lyhentämällä SpCas9:ää ja käyttämällä muista bakteereista peräisin olevia nukleaaseja, kuten *Staphylococcus aureuksen* Cas9:ää, joka on kooltaan SpCas9:ää pienempi. Näillä vaihtoehdoilla on kuitenkin huomattu olevan usein negatiivisia vaikutuksia Cas9:n aktiivisuuteen ja geenimuokkauksen tehokkuuteen. Lisäksi on yritetty käyttää kaksois-AAV-systeemiä, joissa toiseen vektoriin pakataan SpCas9 ja toiseen sgRNA. Tällöin ongelmia kuitenkin aiheuttaa se, että

molempien vektoreiden täytyy infektoida sama solu, jotta geenimuokkaus voi tapahtua. (Yang et al., 2016)

AAV-vektoreiden lisäksi lentivirusten käyttöä on hyödynnetty geenimuokkauksikonkoneiston kuljetukseen. Lentivirusten suurimpana etuna on niiden korkea infektiotehokkuus, joka ulottuu myös ei-jakaantuviin soluihin. Tästä on suurta hyötyä, kun muokkauksen kohteena on kudokset, kuten aivot tai lihas, jossa terapeuttisen tehokkuuden saavuttamiseksi geenimuokkauksen täytyy onnistua mahdollisimman monessa solussa (Zufferey et al., 1998). Lentivirusten käytöstä geenimuokkauksikonkoneiston kuljetuksessa on saatu hyviä tutkimustuloksia prekliinisissä kokeissa. (Aiuti et al., 2013)

3.2 Synteettiset vektorit

Virusvektorien rajoittunut kantokyky ja immuunivaste on johtanut synteettisten kuljetusvektoreiden kehittämiseen. Näiden ei-viraalisten vektoreiden etuna on erityisesti, että niihin pystytään sisällyttämään aktiivinen RNP-kompleksi, jolloin Cas-proteiinia ilmennetään kohdesolussa vain tilapäisesti. Virusvektoreihin verrattuna synteettisten vektorien etuna on vähäisemmän immuunivasteen lisäksi niiden helppo muokattavuus, jolloin vektoriin pystytään kiinnittämään immuunipuolustuksen tunnistamiselta suojaavia komponentteja, kuten polyetyleeniglykolimolekyylejä.

Lipidinanopartikkelit ovat yksi nukleiinihappojen kuljetukseen yleisimmin käytetyistä synteettisistä vektoreista. Muutama lipidinanopartikkeli on edennyt kliinisiin kokeisiin käytettäväksi RNA-interferenssiterapiassa (Coelho et al., 2013) ja soveltuvuutta CRISPR-Cas-geenimuokkaukseen on tutkittu. Prekliinisissä kokeissa lipidinanopartikkeleja käyttämällä on pystytty onnistuneesti kuljettamaan sekä RNP-komplekseja, että Cas9 mRNA ja sgRNA sekoituksia kohdesoluihin. (Zuris et al., 2015)

Toinen mahdollinen synteettinen vektori CRISPR-Cas-geenimuokkaukseen on polymeereistä johdettu partikkeli, kuten polyetylenimiini. Polyetylenimiiniin pystyy kuljettamaan nukleiinihappoja solun sisään ja vapauttamaan ne sytosoliin. Polyetylenimiiniä käyttämällä onnistuneesti kuljettettu sgRNA:ta ja Cas9:ää koodaavia plasmideita esimerkiksi kasvainsoluihin hiirikokeissa. (Kang et al., 2017)

Lipidinanopartikkelien ja polymeeripartikkelien lisäksi epäorgaanisten materiaalien käyttöä CRISPR-Cas-geenimuokkauksen vektoreina on tutkittu. Kultananopartikkelien käyttö Cas9-proteiinin ja sgRNA:n kuljetukseen on useissa solumalleissa osoittanut hyvää kuljetustehokkuutta. (Mout et al., 2017)

3.3 Muut kuljetusmekanismit

Perinteisiä fyysisiä CRISPR-Cas-koneiston kuljetusmenetelmiä ovat elektroporaatio ja mikroinjektio. Elektroporaatiossa solukalvojen läpäisevyyttä lisätään tilapäisesti johtamalla solujen läpi sähkövirta (Mali et al., 2013). Tällöin solukalvoihin syntyy pieniä reikiä, joiden kautta esimerkiksi nukleiinihapot, jotka eivät normaalisti kykene läpäisemään solukalvoa, pääsevät solun sisään. Mikroinjektio tarkoitetaan yksinkertaista menetelmää, jossa mikropipetin avulla kuljetetaan proteiineja tai DNA:ta solun sisään. (Niu et al., 2014)

Elektroporaatiossa ja mikroinjektiossa etuna on, että niitä pystytään käyttämään mihin tahansa solutyyppeihin ja niissä pystytään hyödyntämään kaikkia kolmea kuljetusstrategiaa. Elektroporaatiossa transfektiotehokkuus on korkea, mutta ongelmaksi muodostuu, että menetelmässä ei voida kohdentaa transfektiota vain tiettyyn solutyyppeihin, koska kaikkien sähkövirralle altistuneiden solujen solukalvon läpäisevyys lisääntyy. Lisäksi elektroporaatio aiheuttaa soluille niin merkittävää vauriota, että solukuolleisuus on muita menetelmiä suurempaa. Mikroinjektioilla pystytään kontrolloidusti kuljettamaan CRISPR-Cas-koneisto haluttuihin soluihin, mutta menetelmä ei sovellu tapauksiin, joissa täytyy transfektoida useita soluja. Mikroinjektioita käytetään lähinnä tsygoottien transfektioon koe-eläinmalleja tehdessä. Mikroinjektio voi olla varteenotettavin vaihtoehto myös ihmisen ituradan solujen muokkaukseen (Liu et al., 2017). Lisäksi mikroinjektioita on käytetty kliinisissä kokeissa Leberin synnyntäistä amauroosia (Leber Congenital Amaurosis) sairastavien potilaiden silmän solujen muokkaukseen (Pierce et al., 2024).

3.4 *Ex vivo* ja *In vivo*-muokkaus

CRISPR-Cas-geenimuokkaus voidaan tehdä *ex vivo* tai *in vivo*. *Ex vivo*-terapiassa potilaan soluja eristetään ja muokataan kehon ulkopuolella, jonka jälkeen ne siirretään takaisin potilaaseen. *In vivo*-terapiassa CRISPR-Cas-koneisto viedään potilaan kehoon systeemisellä tai paikallisella injektioilla,

jonka jälkeen koneisto siirtyy vektorien avulla kohdekudoksiin ja -soluihin *Ex vivo*-terapia mahdollistaa muuttujien kontrolloinnin paremmin kuin *in vivo*-terapia, mutta *ex vivo*-terapia ei sovellu kaikkien solujen muokkaamiseen samoin kuin *in vivo*-terapia. (Glass et al., 2018)

Ex vivo-terapiaa voidaan tällä hetkellä pitää turvallisempaa kuin *in vivo*-terapiaa ja monet tämän hetken CRISPR-Cas-geenimuokkauksen kliinisistä kokeista hyödyntävät tätä menetelmää. *Ex vivo*-terapiassa lääkeannosta pystytään kontrolloimaan paremmin ja geenimuokkauksen onnistuminen voidaan sekvensoinnilla varmistaa ennen muokattujen solujen siirtoa eli transplantaatiota. Lisäksi mahdollisia off-target-muutoksia voidaan sekvensoinnilla seurata ja nämä solut erotella transplantaatioon etenevästä solupopulaatiosta. *Ex vivo*-terapian kannalta on oleellista, että kohdesolut voidaan eristää potilaasta helposti ja aiheuttamatta suurta haittaa. Esimerkiksi hematopoeettiset solut soveltuvat *ex vivo*-terapiaan erittäin hyvin, kun niitä voidaan eristää potilaan verestä. Vastakohtana voidaan pitää esimerkiksi aivosoluja, joiden eristäminen potilaasta ei onnistu ilman merkittävän haitan aiheuttamista. Lisäksi *ex vivo*-terapiassa käytettyjen solujen tulee kyetä selviämään kehon ulkopuolella ja säilyä potentteina geenimuokkauksen jälkeenkin. Monille kehonsoluista esimerkiksi solu-solu-signaalit ovat toiminnan kannalta välttämättömiä, jolloin on mahdollista, että nämä solut *ex vivo*-terapiassa ajautuvat apoptoosiin tai menettävät toimintakykynsä. Onnistuneen eristämisen ja geenimuokkauksen jälkeen *ex vivo*-terapiassa on tärkeää saada muokatut solut jakaantumaan ennen transplantaatiota, jotta terapeuttinen tehokkuus olisi mahdollisimman suuri. (Li et al., 2020)

4. CRISPR-Cas kliinisissä geeniterapiatutkimuksissa

Tässä tutkielmassa käsittelen hemoglobiinopatioista sirppisoluanemian sekä beetatalassemian, sillä näistä toiseen on hyväksytty geeniterapia hoidoksi (sirppisoluanemia) ja toisessa on kliiniset kokeet käynnissä (beetatalassemia). Lisäksi käsittelen Duchennen lihasdystrofiaa (DMD), koska tauti ilmenee perinnöllisesti ja on yksi tällä hetkellä tutkinnan kohteina olevista sairauksista, missä harkitaan ituradan geeniterapiaa.

4.1 Hemoglobiнопатiat

4.1.1. Sirppisoluanemia

Sirppisoluanemia on geneettinen sairaus, jonka hoitamisessa on mahdollista hyödyntää CRISPR-Cas9 menetelmää. Maailmanlaajuisesti sirppisoluanemiaa sairastaa noin 6 miljoonaa ihmistä. Taudin patologiassa tunnuspiirteenä on pistemutaatio hemoglobiinin β -alaysikön geenissä (*HBB*), mikä aiheuttaa 6. aminohapon, glutamiinin, korvaamisen valiinilla β -hemoglobiiniproteiinin rakenteessa. Tämä muutos aiheuttaa punasolujen epämuodostumisen sirppimäiseksi rakenteeksi. Sirppisoluanemiassa tyypillistä on punasolujen kiihtynyt hajoaminen eli hemolyysi ja siitä johtuva hemolyyttinen anemia. Epämuodostuneet punasolut aiheuttavat yhtenä sirppisoluanemian vakavimmista oireista vaso-okklusiivisia kriisejä, mikä pahimmillaan voi johtaa elinvaurioihin. Sirppisoluanemiaan yhdistetään vahvasti myös lyhyempi elinajanodote (Rees et al., 2010). Kantasoluhoido ja luuydinsiirre ovat ainoat sirppisoluanemian parannuskeinot, mutta molempiin sisältyy huomattavia riskejä. Yhden geenin mutaatiosta seuraava sirppisoluanemia on hyvä esimerkki sairaudesta, johon CRISPR-Cas9-geenimuokkaus voisi toimia tehokkaana hoitomuotona.

Vuoden 2023 lopulla CRISPR-Cas-geenimuokkaukseen perustuva lääkehoito (Casgevy) hyväksyttiin sirppisoluanemian hoitoon Iso-Britanniassa ja Yhdysvalloissa. Casgevyn toiminta perustuu hematopoeettisten kantasolujen muokkaamiseen *ex vivo* siten, että ne alkavat ilmentää fetaalihemoglobiinia. Fetaalihemoglobiini (Hb-F) kattaa suurimman osan vastasyntyneen kokonaishemoglobiinista (60-85%), mutta jo ensimmäisen puolen vuoden aikana sen osuus laskee 2 – 3 prosenttiin. Korkeiden Hb-F tasojen takia sirppisoluanemiaa sairastavat vastasyntyneet ovat yleensä oireettomia ja sairauden muodot alkavat ilmetä vasta myöhemmällä iällä. Casgevy-hoidon myötä hematopoeettiset kantasolut voivat erilaistua punasoluiksi, jotka Hb-F:ia ilmentämällä pystyvät toimimaan normaaliin tapaan. Casgevyn on todettu vähentävän SCD-potilaiden vaso-okklusiivisia kriisejä merkittävästi. (Frangoul et al., 2021)

4.1.2. Beetatalassemia

Beetatalassemia on sirppisoluanemian tapaan *HBB* geenin mutaatiosta johtuva perinnöllinen sairaus, joka diagnosoidaan noin 60 000 potilaalla vuosittain. Mutaatio johtaa β -globiinin vähentymiseen tai puutteeseen. Seurauksena on α ja β -globiinien epätasapaino, mikä johtaa tehottomaan erytropoieesiin ja lisääntyneeseen hemolyysiin. Sirppisoluanemian tapaan sairautta pystytään hoitamaan verensiirroilla, mutta ainoana parantavana hoitona toimivat kantasoluhoido ja luuydinsiirre (Galanello

& Origa, 2010). Uusille hoitomuodoille on suuri tarve myös beetatalassemian hoidossa, sillä nykyisissä hoitomuodoissa haastavaa on sopivan luovuttajan löytäminen ja riskinä on aina kehon hylkimisreaktio.

Kliinisissä tutkimuksissa Casgevy on todettu vähentävän myös beetatalassemian oireita. Casgevy hyväksyttiin Iso-Britanniassa marraskuussa 2023 myös verensiirroista riippuvaisen beetatalassemian (Transfusion-Dependent Beta Thalassemia, TDT) hoitoon. Casgevy hyväksyttiin Yhdysvalloissa TDT:n hoitoon tammikuussa 2024. Kliinisten kokeiden perusteella Casgevy-hoidon aikaansaama Hb-F:n ilmentäminen poisti potilaiden tarpeen verensiirroille. (Frangoul et al., 2021)

4.2 Duchennen lihasdystrofia

Duchennen lihasdystrofia (DMD) on periytyvä lihassairaus, joka aiheuttaa lihaskudoksen hajoamista ja johtaa yleensä kuolemaan 20–30 vuoden iässä. X-kromosomaalisen resessiivisen periytymisen takia sairautta esiintyy pääasiassa pojilla ja tytöt toimivat oireettomina kantajina, mutta harvoissa tapauksissa oireita esiintyy myös kantajana toimivilla tytöillä. Esiintyvyys Duchennen lihasdystrofiassa on maailmanlaajuisesti noin yksi tapaus 3500–5000 syntynyttä poikalasta kohden. Sairauden aiheuttaa mutaatio DMD-geenissä, joka koodaa normaaleille lihastoiminnoille välttämätöntä dystrofiiniproteiinia. Duchennen lihasdystrofiaa hoidetaan pääasiassa kortikosteroideilla, mutta varsinaista parannuskeinoa sairauteen ei ole (Duan et al., 2021). Sairauden luonteen, korkean esiintyvyyden ja hoitojen puutteen takia geenimuokkauksen käyttäminen Duchennen lihasdystrofian hoidossa on ollut tutkijoiden mielenkiinnon kohteena .

Toistaiseksi yksikään CRISPR –menetelmää hyödyntävä hoito ei ole edennyt klinisiin tutkimuksiin, mutta monet prekliiniset tutkimukset ovat osoittaneet geenimuokkauksen potentiaalin Duchennen lihasdystrofian hoidossa. Ongelmaksi DMD-geenin korjaamisessa muodostuu HDR korjausmekanismin huono tehokkuus kehittyneissä poikkijuovaisissa lihassoluissa ja sydänlihassoluissa, jolloin geenin korjaaminen terveellä geenillä ei onnistu. Tästä syystä tutkijat ovat ottaneet erilaisia lähestymistapoja kehittääkseen geenimuokkaushoitoja Duchennen lihasdystrofiaan. Tutkijat ovat esimerkiksi muokanneet sairauteen yhteydessä olevien geenien ilmentymistä CRISPRa ja CRISPRi-menetelmiä käyttämällä. Yksi tutkimuksen kohteena oleva geeni on *UTRN*, joka koodaa dystrofiinin kaltaista utrofiiniproteiinia. Useiden prekliinisten tutkimusten tuloksena on huomattu, että utrofiinin tasoja nostettaessa osa Duchennen lihasdystrofian oireista on poistunut (Liao et al., 2017). Toisena lähestymistapana on käytetty emäsmuokkausta, jolla voidaan korjata DMD geenissä

esiintyviä pistemutaatioita, joita esiintyy noin 27 %:ssa tapauksista. Tutkijat ovat näin pystyneet vähentämään Duchenen lihasdystrofian oireita hiirimalleilla. Näissä prekliinisissä hiiritutkimuksissa geenimuokkaus on tehty *in vivo* adenovirusvektoreita käyttämällä (Ryu et al., 2018).

Edellä kuvatut hiirimalleilla tehdyt prekliiniset tutkimukset ovat antaneet lupaavia tuloksia, mutta CRISPR-Cas menetelmän käyttämiseksi Duchenen lihasdystrofian hoidossa on vielä pitkä matka. Monissa prekliinisissä tutkimuksissa vaikutukset ovat jääneet marginaalisiksi tai vaikutus sairauden fenotyyppiin on ollut pieni. DMD:n hoidossa *ex vivo*-geenimuokkaus ei ole vaihtoehto, koska muutosten tulee tapahtua kattavasti ympäri kehon lihassoluja, mikä aiheuttaa yhden suuren ongelman geenimuokkaushoidon tehokkuuteen. Adenovirusvektoreilla muutokset on mahdollista kohdentaa hyvällä tehokkuudella lihaskudokseen, mutta koko kehon lihaksiston kattavien muutosten tekeminen nykyisillä menetelmillä ei ole mahdollista.

5. Eettiset ongelmat

Sekä somaattisten solujen, että ituradan solujen geenimuokkaukseen liittyy suuri joukko eettisiä ongelmia. Monet näistä pohjautuvat muokkausmenetelmissä ilmeneviin ongelmiin, kuten mahdollisiin off-target-muutoksiin. Ituradan geenimuokkauksessa suurimpana ongelmana pidetään muutosten periytymistä tuleviin sukupolviin. Vuonna 2015 järjestetyssä kansainvälisessä huippukokouksessa (International Summit on Human Gene Editing) joukko alan huippututkijoita kokoontui keskustelemaan geenimuokkauksen silloisesta tilanteesta ja käytännöistä. Kokouksessa komitea linjasi, että ituradan geenimuokkausta ei voida toistaiseksi pitää eettisesti hyväksyttävänä lukuisten riskien takia. (Olson, 2016)

Tietoon perustuva suostumus on perinteinen eettinen prosessi lääketieteen tutkimuksessa ja sairauksien hoidossa. Sillä henkilö vahvistaa halukkuutensa osallistua tutkimukseen tai lääkehoitoon sen jälkeen, kun hänelle on annettu riittävät tiedot osallistumispäätökseen vaikuttavista asioista, kuten tarkoituksesta, riskeistä ja mahdollisista hyödyistä. Tietoon perustuvan suostumuksen toteutuminen geenimuokkaushoidoissa ei kuitenkaan ole täysin mutkatonta.

Tässä kappaleessa käsitelen somaattisen ja ituradan solujen geenimuokkaukseen liittyviä eettisiä ongelmia sairauksien hoidon kannalta.

5.1 Somaattisten solujen geenimuokkaus

Geenimuokkauksen potentiaalista huolimatta riskit vaikeuttavat sen terapeuttista käyttöä. Ei-toivottujen muutosten lisäksi geenimuokkaukseen saattaa liittyä monia muita sivuvaikutuksia, jotka ilmenevät vasta vuosia geenimuokkaushoidon jälkeen. Off-target-muutokset voivat pitkän ajan kuluessa johtaa esimerkiksi syöpään, kun normaalisti toimivien geenien ilmentyminen häiriintyy. Tällaisten muutosten varalta on eettisesti välttämätöntä, että potilasta seurataan pitkään geenimuokkaushoidon jälkeen. Pitkät seurannat kuitenkin aiheuttavat lisäkuluja, jolloin geenimuokkauksen käyttö saattaa muodostua taloudellisesti vielä ongelmallisemmaksi.

Vuosia myöhemmin ilmenevien off-target-vaikutusten esiintyessä niitä voi olla huomattavan vaikeaa hoitaa. Perinteisissä lääkehoidoissa esiintyvät sivuvaikutukset yleensä poistuvat, kun lääkehoito lopetetaan. Geenimuokkauksessa vaikutuksia voidaan pitää pysyvinä, jolloin aiheutetun vahingon korjaaminen on erittäin hankalaa. Äärimmäisessä tapauksessa sivuvaikutusten hoitaminen saattaa vaatia geenimuokkauksen käyttöä alkuperäisten muutosten korjaamiseksi.

5.2 Ituradan solujen geenimuokkauksen eettiset ongelmat

Ituradan geenimuokkauksen suurin vastustus nousee muokkausmenetelmien ongelmista ja muutoksien periytyvyydestä. Somaattisten solujen geenimuokkauksessa ei-toivottujen muutoksien haittavaikutukset rajoittuvat hoidettuun yksilöön, mutta iturataa muokattaessa ne siirtyvät myös tulevien sukupolvien taakaksi. Tällä hetkellä muokkausmenetelmiä pidetään liian epätarkkoina, mutta niiden kehittämiseksi tehdään jatkuvasti paljon töitä. Uusien tarkempien menetelmien ilmaantuessa saatamme tulevaisuudessa olla tilanteessa, jossa ituradan muokkaamisen riskejä voidaan pitää kohtuullisina verrattuna niiden tuomiin hyötyihin.

Ituradan geenimuokkauksessa ongelmallista on tietoon perustuvan suostumuksen täyttyminen tulevien sukupolvien osalta. Nykyisissä lääkehoidoissa vanhemmat tekevät usein päätökset lastensa puolesta, mutta tätä on kuitenkin vaikea rinnastaa siihen, että ituradan muokkauksen seurauksena vaikutukset voivat ulottua useampaan tulevaan sukupolveen. Ituradan muokkausta kannattavissa lausunnoissa viitataan usein siihen, että tulevat sukupolvet eivät tälläkään hetkellä pysty vaikuttamaan saamaansa geeniperimään. Luonnon saneleman sattuman kautta periytyvää sairautta tai

haitallista mutaatiota voi kuitenkin pitää hyväksyttävämpänä kuin ituradan geenimuokkauksella aiheutettua vastaavaa vaikutusta.

Eettiseksi ongelmaksi joissakin tapauksissa muodostuu myös ituradan geenimuokkauksesta pidättäytyminen. Kun tulevaisuudessa ituradan muokkauksen riskejä voidaan pitää hieman kohtuullisempina ja perinnöllisten sairauksien hoitaminen olisi täten mahdollista, onko eettisesti oikein pidättäytyä antamasta geenimuokkaushoitoa? Tilanteessa, jossa geenivirhe johtaa elämää suuresti haittaavaan sairauteen tai jopa kuolemaan, lääkehoidosta päättävät tahot saattavat joutua vaikean eettisen päätöksen eteen punnitessaan hoidetaanko yksilöä ja samalla riskeerataan geneettisen taakan aiheuttaminen tuleville sukupolville.

Ituradan geenimuokkauksen potentiaali on huomattava, mutta on mietittävä missä tilanteissa sen hyödyntäminen on eettisesti oikein. Vaikeaa haittaa tai kuolemaan johtavia sairauksia voidaan pitää ituradan geenimuokkauksen ensimmäisinä kohteina, mutta rajanveto on vaikeaa. Lasketaanko hoidettaviin geenimutaatioihin esimerkiksi periytyvät syöpäriskiä aiheuttavat geenimutaatiot, kuten BRCA-geenien mutaatiot? Tällaiset riskiä nostavat mutaatiot eivät kuitenkaan suoraan aiheuta syöpää tai muuta tautia, minkä vuoksi voi olla kyseenalaista lähteä muokkaamaan ituradan genomia. Toisaalta, jos suvussa ilmenee esimerkiksi paljon perinnöllistä rintasyöpää, olisiko tällöin eettisesti oikein vähentää tulevien sukupolvien riskiä muokkauksella? Lisäksi on mietittävä mitkä genomien vaihteluista johtuvat ilmenemät ovat ominaisuuksia ja mitkä luokitellaan sairauksiksi. Esimerkiksi Downin syndroomaa sairastavien lasten vanhemmat usein painottavat Down syndrooman olevan ominaisuus ja esimerkki monimuotoisuudesta, eikä hoidettava sairaus.

5.3 Geenimuokkauksen valvonta ja säätely

Kun geenimuokkausmenetelmät alkoivat yleistyä ja ensimmäiset geenimuokkaukseen perustuvat geenimuokkaushoidot alkoivat lähestyä kliinisiä kokeita, tutkijoiden keskuudessa heräsi suuri huoli geenimuokkauksen valvonnasta ja säätelystä. Tällä hetkellä geenimuokkauksen valvonta ja säätely vaihtelee suuresti eri maanosissa ja valtioissa. Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto (FDA) ja Euroopan lääkevirasto (EMA) ovat päivittäneet ohjeitaan ja menettelytapoja vastaamaan paremmin nykyistä geenimuokkauksen käyttöä ja mahdollisia tulevaisuuden hoitoja. EMA:n lisäksi jokaisessa Euroopan valtiossa vaikuttaa valtion oma säätelyviranomainen, kuten Suomessa Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus FIMEA. FDA:n, EMA:n ja esimerkiksi Kanadan valvontaviranomaisen PDD:n (Pharmaceutical Drug Directorate) valvonta ja säätely on

geenimuokkauksen kohdalla melko yhtenäistä, vaikkakin pieniä eroja löytyy. Suuremmaksi ongelmaksi muodostuu valvonnan ja säätelyn yhdenmukaisuus monien muiden valtioiden kanssa. Monien Aasian maiden säätelyelinten toiminta poikkeaa suuresti länsimaisten vastaavien toiminnasta. Esimerkiksi Kiinassa valtiollinen valvontaviranomainen NMPA (National Medical Products Administration) on lähiaikoina uudistanut ohjeistusta ja toimintatapoja, mutta valvonta ja säätely on edelleen puutteellista erityisesti yksityisten yritysten toiminnan osalta.

Puutteellisesta valvonnasta ja säätelystä, ja sen seurauksista saatiin esimerkki vuonna 2018, kun kiinalainen He Jiankui ja hänen tutkimusryhmänsä julkaisivat tuloksia kliinisestä kokeesta, jossa muokattiin ituradan soluja. He ja hänen tutkimusryhmänsä tavoitteena oli muokata alkioiden genomia siten, että niiden valkosolut olisivat resistenttejä HIV:ta vastaan. Tarkemmin sanottuna tavoitteena oli muokata CRISPR-Cas9-menetelmää hyödyntämällä valkosolujen CCR5-pintareseptoria siten, että virukset eivät voisi kiinnittyä niihin. Tutkimuksessa muokattiin yhteensä seitsemän parin alkioita hedelmöityshoitojen aikana. Näistä hedelmöityshoidoista seurasi yksi onnistunut raskaus. Tämän raskauden seurauksena marraskuussa 2018 syntyi kaksoset, joista julkisuudessa on käytetty nimiä Lulu ja Nana. Tutkimusryhmän julkaisemien tulosten mukaan nämä kaksoset ovat HIV:lle immuuneja. (Greely, 2019)

Ituradan muokkaamisen lisäksi Hen tutkimuksesta löytyy myös muita eettisiä ongelmia. Hen mukaan tutkimuksen tavoitteena oli suojata lapsia tulevaisuuden HIV-infektioilta ja julkisuudessa tämän tutkimustavoitteen eettisyyttä on kyseenalaistettu suuresti. On olemassa monia tehokkaita ja riittäviä keinoja suojautua HIV-infektioilta, jonka vuoksi puutteellinen lääketieteellisen hoidon tarve ei tässä tutkimuksessa täyty.

Vuonna 2019 He Jiankui ja kaksi hänen kollegaansa joutuivat oikeuteen tekemänsä tutkimuksen takia. He tuomittiin laittomasta lääketieteen harjoittamisesta kolmeksi vuodeksi vankilaan ja maksamaan kolme miljoonaa kiinan yuania (noin \$429 000) sakkoja. Hänen kollegoistansa toinen sai kahden vuoden ja toinen 18 kuukauden vankilatuomion. Kuten He, nämä kaksi tutkijaa tuomittiin myös maksamaan sakkoja, toinen miljoona yuania ja toinen 500 000 yuania. (Normile, 2019)

Positiivisena voi pitää sitä, että Hen tutkimus tuomittiin Kiinan oikeusjärjestelmässä. Tapaus toimii varoittavana esimerkkinä ja toivottavasti estää vastaavien tapausten ilmenemistä tulevaisuudessa. Tuomioita voi kuitenkin pitää varsin kevyinä, kun otetaan huomioon rikkeen vakavuus. Joka tapauksessa tapaus herätti alan asiantuntijat ituradan muokkauksen seurannassa ja säätelyssä vallitsevaan ongelmaan. Vaikka ihmisen ituradan muokkaus on maailmanlaajuisesti todettu epäeettiseksi ja kielletyksi, ei voida olettaa, että kaikkialla pysyttäisiin näiden moraalisten rajojen

sisällä geenimuokkausta harjoitettaessa. Tarve kansainvälisesti toimivalle kattojärjestölle, joka hoitaa geenimuokkauksen seurannan ja säätelyn, on suuri. Tällä järjestöllä tulee olla tarvittavat toimivaltuudet ja mahdollisuus yhdessä kansallisten valvontaviranomaisten kanssa asettaa sanktioita ihmisen geenimuokkauksessa esiintyvistä rikkeistä.

6. Pohdinta

CRISPR-Cas-menetelmän kliinisessä käytössä on suurta potentiaalia ja vuoden 2023 lopulla ensimmäisen CRISPR-Cas-menetelmään perustuvan hoidon hyväksyminen kliiniseen käyttöön lisää luottamusta vastaavien hoitojen yleistymiseen tulevaisuudessa. Menetelmän laajempaa terapeuttista käyttöä kuitenkin varjostaa vielä useita ongelmia.

6.1 Terapeuttisen tehokkuuden saavuttaminen

Terapeuttisen tehokkuuden saavuttaminen CRISPR-Cas-geenimuokkauksessa on yksi isoimmista ongelmista. Yksinkertaistetusti terapeuttisen tehokkuuden saavuttamisella tarkoitetaan sitä, että geenimuokkaus pystytään onnistuneesti tekemään niin suuressa määrässä soluja, että sairauden eteneminen pysähtyy, oireet vähenevät tai potilas paranee. Onnistuneiden geenimuokkausten määrä terapeuttisen tehokkuuden saavuttamiseksi vaihtelee suuresti eri sairauksien ja muokkauskohteiden välillä. Tästä syystä on selvää, että CRISPR-Cas-geenimuokkaus toimii paremmin joidenkin sairauksien hoitamiseksi kuin toisten. Kuten kappaleessa 4 ilmenee, CRISPR-Cas-menetelmä soveltuu hyvin esimerkiksi sirppisoluanemian (kappale 4.1.1.) ja beetatalassemian (kappale 4.1.2.) hoitoon.

Mahdollisimman korkean terapeuttisen tehokkuuden saavuttamiseksi on äärimmäisen tärkeää ymmärtää niin kohdegeeniä ja sen biologista vaikutusta, kuin myös kohdesairautta. Kohdegeenin tutkimuksella pystytään arvioimaan ja ennakoimaan vaikutuksia, joita tämän geenin muokkauksella saataisiin aikaan. On myös tärkeää ymmärtää mihin sairauteen geenimuokkausta pyritään kohdentamaan. Geneettiset sairaudet ovat geenimuokkaukselle luonnollisia kohdesairauksia, mutta niistäkin on tärkeää ymmärtää, onko kyseessä yksittäisen geenin mutaatio vai useamman geenin yhdessä aiheuttama sairaus.

Terapeuttisen tehokkuuden saavuttamiseksi muokattujen solujen täytyy syrjäyttää tautia aiheuttavat vialliset solut. Esimerkiksi syövässä on haastavaa saada korjatut solut tekemään näin, jos kasvuetu säilyy muuttumattomilla syöpäsoluilla. Terapeuttiseen tehokkuuteen vaadittu muokattujen solujen määrä vaihtelee tautikohtaisesti, mutta lähtökohtaisesti valtaosa sairautta-aiheuttavista soluista täytyisi saada muokattua. Tämä korostuu erityisesti sairauksissa, joissa kohdesolut eivät jakaannu aktiivisesti. Jos taas muokatut solut jakautuvat tehokkaasti, huomattavasti pienempikin määrä muokattuja soluja voi riittää sairauden parantamiseksi. Syöpäsairauksien hoidossa ongelmaksi muodostuu myös syöpäsolujen sopeutumiskyky ja mutaatioiden runsaus. Tämän vuoksi geenimuokkaus syöpäsairauksien hoidossa täytyisi saada onnistumaan lähes kaikissa syöpäsoluissa.

6.2 CRISPR-Cas-geenimuokkauksen tekniset haasteet

Geenimuokkauksen kliinistä käyttöä varjostaa suuri joukko teknisiä haasteita. Näitä haasteita CRISPR-Cas-menetelmässä ovat erityisesti tarkkuus, tehokkuus ja kuljetusmekanismien puutteellisuus. Riittävän terapeuttisen tehokkuuden saavuttamiseksi kaikissa näissä on parantamista.

6.2.1 Geenimuokkauksen tarkkuuden parantaminen

Geenimuokkauksen tarkkuus määritellään kyvyllä muokata genomia kohdelokuksessa. Mutaatiot kohdelokuksen ulkopuolella, eli niin kutsutut off-targetit, ovat pitkällä tähtäimellä vahingollisia, sillä ne voivat johtaa genomien toksisuuteen, genomien epävakauteen, geenien toiminnan häiriöihin, epigeneettisiin muutoksiin ja karsinogeneesiin. Mahdollisten off-target-muutosten tunnistamiseksi on kehitetty algoritmeja ja erilaisia tietokantoja, jotka auttavat tutkijoita minimoimaan off-target-vaikutuksia.

CRISPR-Cas-menetelmän tarkkuuden lisääminen on yksi suurimmista prioriteeteista menetelmän kehittämisessä. Menetelmän tarkkuuteen vaikuttaa suuresti sgRNA:n rakenne, koska kohdesekvenssiä tunnistessaan sgRNA:n sietää pienen määrän epätarkkuutta. Tällöin sitoutuminen voi tapahtua off-target-alueella, vaikka sekvenssi ei olisi täysin komplementaarinen sgRNA:n sekvenssin kanssa. Tästä syystä sgRNA:n tarkka suunnittelu ja testaaminen eri algoritmeilla ja tietokannoilla mahdollisten off-target-vaikutusten varalta vähentää off-target-muutosten todennäköisyyttä geenimuokkausta tehdessä, ja tällöin parantaa menetelmän tarkkuutta. Lisäksi sgRNA:n sekvenssin pituudella on huomattu olevan vaikutusta off-target-vaikutusten ilmenemiseen. sgRNA:n lyhentäminen 5'-päästä kahdella tai kolmella nukleotidilla on muutamien tutkimusten

perusteella vähentänyt mutaatioita off-target-alueilla, koska lyhennetty sgRNA:n sekvenssi sietää vähemmän epätarkkuutta. Kuitenkin merkittävin tapa off-target-muutosten vähentämiseksi on valita uniikki kohdesekvenssi, joka ei ole homologinen genomien muille sekvensseille. Tällöin voidaan välttää tai ainakin vähentää sgRNA:n sitoutumista ei-halutuille alueille.

Geenimuokkauksen tarkkuutta voidaan lisätä käyttämällä eri Cas-nukleaaseja. Esimerkiksi kahta nCas-nukleaasia käyttämällä on havaittu olevan vähemmän off-target-muutoksia kuin DNA-kaksoisketjun katkaisemalla Cas-nukleaaseilla. Cas-nukleaasien kehittäminen ja tutkiminen voisi tuoda tulevaisuudessa lisää tarkkuutta geenimuokkaukseen.

Lisäksi off-target-muutosten esiintymiseen vaikuttaa Cas-sgRNA-kompleksin konsentraatio solussa. Liian korkeassa konsentraatiossa off-target-vaikutukset yleistyvät, kun taas liian pienessä konsentraatiossa muutokset kohdesekvenssissä vähenevät. Tästä syystä optimaalisen konsentraation löytäminen on tärkeää.

6.2.2 Geenimuokkauksen tehokkuuden kasvattaminen

DNA:n korjausmekanismien vallitsevuus vaihtelee suuresti eri solutyypin välillä. Useimmissa soluissa NHEJ on aktiivisempi kuin HDR. HDR toimii aktiivisena korjausmekanismina erityisesti solusyklin S ja G2-vaiheissa, minkä vuoksi sitä esiintyy vain aktiivisesti jakautuvissa soluissa. Erot DNA:n korjausmekanismien aktiivisuudessa muodostavat haasteita geeninkorjausta tai geeninlisäämistä vaativien sairauksien hoidolle. Geenimuokkauksessa NHEJ-korjausmekanismia hyödyntämällä on mahdollista poistaa sairautta aiheuttava geeni tai aiheuttaa häiriöitä sen toimintaan, mutta geeninkorjaus ja geeninlisääminen vaativat HDR-korjausmekanismin aktiivisuutta. HDR-aktiivisuutta on yritetty lisätä esimerkiksi NHEJ-korjausmekanismia inhiboimalla, mutta vaikutukset ovat jääneet vähäisiksi. HDR-korjausmekanismin aktiivisuutta lisäämällä CRISPR-Cas-geenimuokkauksella olisi mahdollista hoitaa lukuisia perinnöllisiä sairauksia, mutta tällä hetkellä menetelmän käyttö rajoittuu vain sairauksiin, joissa solut jakautuvat aktiivisesti, kuten hemoglobinopatioissa.

Vaihtoehtoisesti ratkaisuna voi olla DNA:n korjausmekanismeista itsenäisten geenimuokkausmenetelmien, kuten emäsmuokkauksen ja PRIME-muokkauksen käyttö. Näissä menetelmissä etuna on geenimuokkauksen onnistuminen ilman DNA-kaksoisketjun katkaisua ja DNA:n korjausmekanismeja. Erityisesti PRIME-muokkaus on herättänyt tutkijoissa mielenkiintoa korvaamaan perinteisen CRISPR-Cas-muokkausmenetelmän.

6.2.3 Kuljetusmekanismin vaikutus geenimuokkauksen tehokkuuteen

Tehokkaan ja turvallisen kuljetusmekanismin löytäminen CRISPR-Cas-geenimuokkaukselle on merkittävä haaste menetelmän laajemmalle kliiniselle käytölle. Erityisesti *in vivo*-geenimuokkauksen kannalta nykyisistä kuljetusmekanismeista löytyy paljon ongelmia. Synteettiset vektorit ovat monien tutkimusten perusteella turvallisia ja kykenevät kantamaan Cas-sgRNA-komponentit soluun, mutta niiden tehokkuudessa on parannettavaa. Virusvektoreilla puolestaan on korkea tehokkuus ja riittävä spesifisyys, mutta immunogeenisyys aiheuttaa ongelmia. *In vivo*-geenimuokkauksella on mahdollista hoitaa sairauksia, joihin *ex vivo*-muokkaus ei sovellu. Ennen *in vivo*-geenimuokkauksen laajempaa kliinistä käyttöä tarvitaan kuitenkin lisää tutkimusta kuljetusmekanismeista ja uusia parempia kuljetusvektoreita.

6.3 Eettiset haasteet

Riskeistä huolimatta geenimuokkaus on erittäin potentiaalinen terapiamuoto niitä vakavia sairauksia vastaan, joihin tällä hetkellä ei löydy muuta tehokasta hoitomuotoa. Menetelmiä kehitetään jatkuvasti ja toivottavasti tulevaisuudessa nyky menetelmien ongelmista, kuten spesifisyydestä tai tehokkuudesta, johtuvat riskit ovat vähäisemmät. Ensimmäinen CRISPR-Cas-menetelmää hyödyntävä geenimuokkaushoito (Casgevy) on hyväksytty käyttöön Iso-Britanniassa ja Yhdysvalloissa, ja tulevan vuosikymmenen aikana sitä seuraa varsin todennäköisesti muutama muu vastaava hoito. On mahdollista, että käytön yleistyessä törmätään uusiin ongelmiin, mutta menetelmiä kehittämällä nämäkin vastoinkäymiset pystytään melko varmasti tulevaisuudessa ylittämään. Ituradan muokkauksessa riskit ja eettiset ongelmat ovat moninkertaiset somaattisten solujen muokkaukseen verrattuna. Mutaatioiden siirtyminen sukupolvelta toiselle sisältää suuret riskit ja muodostaa valtavan eettisen ongelman, minkä vuoksi ituradan muokkauksen tulee olla kiellettyä ainakin siihen asti, kunnes menetelmät kehittyvät huomattavasti turvallisimmiksi.

Geenimuokkauksen seurannassa ja säätelyssä on suuria eroja valtioiden välillä. Länsimaisissa valtioissa valvonta on samansuuntaista, mutta lisää työtä on tehtävä, jotta yhteiset pelisäännöt ovat selkeät. Lisäksi maailmassa on useita valtioita, joiden lainsäädäntö ei ota lainkaan kantaa geenimuokkauksen harjoittamiseen. Monissa valtioissa tutkijoita rajoittaa ainoastaan moraalinen vastuu. Ei voida olettaa, että kaikki tutkijat maailmassa seuraavat sovittuja sääntöjä ja pitävät huolta tutkimustensa eettisyydestä, kuten Hen tapaus osoitti.

Näihin ongelmiin on alan asiantuntijoiden keskuudessa herätty ja on toivottavaa, että tulevaisuudessa erityisesti ituradan genomimuokkauksen seuranta ja säätely on kansainvälisesti yhdenmukaista. Erityisesti ituradan muokkaukseen liittyvät rikkeet on tuomittava laajasti ja tuomioiden tulee olla suuruudeltaan tuntuvia, jotta vastaavilta rikkeiltä vältytään. Tarve geenimuokkausta valvovalle kattojärjestölle on suuri ja sitä pidetään ainoana tapana taata geenimuokkauksen eettisyys tulevaisuudessa.

Yhteenveto

Geenimuokkaus on yksi nykymaailman isoimmista askelista lääkehoitojen saralla. Tämän hoitomuodon potentiaali on valtava vaikkakin se sisältää myös paljon haasteita ja eettisiä ongelmia. CRISPR-Cas-menetelmään perustuvan Casgevy:n hyväksyminen kliiniseen käyttöön Iso-Britanniassa ja Yhdysvalloissa osoittaa kuinka nopeasti tämän hoitomuodon potentiaali on havaittu. Geenimuokkaus sisältää verrattain monia erilaisia tapoja toteuttaa ja niiden teho, spesifisyys, hyödyt ja haitat vaihtelevat sekä tapojen että kohdesairauksien välillä. Jatkotutkimus ja -kehitys geenimuokkauksen osalta tulee mahdollistamaan entistä parempien menetelmien kehittämisen ja parantaa jo olemassa olevia geenimuokkausmenetelmiä.

Vaikkakin geenimuokkauksen potentiaali on valtava, sen haasteet ovat lähestulkoon yhtä suuria. Geenimuokkausmenetelmissä on jokaisessa parantamisen varaa, mutta on selvää, että haasteet ovat enemmän valvonnan ja eettisten ongelmien puolella. Eettisten ongelmien haasteet tulevat vahvasti esille myös ituradan muokkauksessa, jonka valvonta pitäisi olla ehdottoman yhdenmukaista koko maailmassa.

Geenimuokkauksen suuren potentiaalın vastapainona onkin valvonnan puutteellisuus ja eettiset ongelmat. Tämän vuoksi menetelmien kehittämisen lisäksi pitäisi tutkimusmaailman panostaa valtavasti yhdenmukaiseen lainsäädäntöön ja valvoviin järjestöihin.

Lähdeluettelo

- Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I. M., Cox, D. B. T., Shmakov, S., Makarova, K. S., Semenova, E., Minakhin, L., Severinov, K., Regev, A., Lander, E. S., Koonin, E. V., & Zhang, F. (2016). C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, *353*(6299), aaf5573. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5573>
- Aiuti, A., Biasco, L., Scaramuzza, S., Ferrua, F., Cicalese, M. P., Baricordi, C., Dionisio, F., Calabria, A., Giannelli, S., Castiello, M. C., Bosticardo, M., Evangelio, C., Assanelli, A., Casiraghi, M., Di Nunzio, S., Callegaro, L., Benati, C., Rizzardi, P., Pellin, D., ... Naldini, L. (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science (New York, N.Y.)*, *341*(6148), 1233151. <https://doi.org/10.1126/science.1233151>
- Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., Chen, P. J., Wilson, C., Newby, G. A., Raguram, A., & Liu, D. R. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, *576*(7785), 149–157. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
- Bikard, D., Jiang, W., Samai, P., Hochschild, A., Zhang, F., & Marraffini, L. A. (2013). Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Research*, *41*(15), 7429–7437. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt520>
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., & Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science (New York, N.Y.)*, *326*(5959), 1509–1512. <https://doi.org/10.1126/science.1178811>
- Chen, B., Gilbert, L. A., Cimini, B. A., Schnitzbauer, J., Zhang, W., Li, G.-W., Park, J., Blackburn, E. H., Weissman, J. S., Qi, L. S., & Huang, B. (2013). Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*, *155*(7), 1479–1491. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.001>

- Coelho, T., Adams, D., Silva, A., Lozeron, P., Hawkins, P. N., Mant, T., Perez, J., Chiesa, J., Warrington, S., Tranter, E., Munisamy, M., Falzone, R., Harrop, J., Cehelsky, J., Bettencourt, B. R., Geissler, M., Butler, J. S., Sehgal, A., Meyers, R. E., ... Suhr, O. B. (2013). Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *The New England Journal of Medicine*, 369(9), 819–829. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1208760>
- Duan, D., Goemans, N., Takeda, S., Mercuri, E., & Aartsma-Rus, A. (2021). Duchenne muscular dystrophy. In *Nature Reviews Disease Primers*, 7(13). <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00248-3>
- Frangoul, H., Altshuler, D., Cappellini, M. D., Chen, Y.-S., Domm, J., Eustace, B. K., Foell, J., de la Fuente, J., Grupp, S., Handgretinger, R., Ho, T. W., Kattamis, A., Kernytsky, A., Lekstrom-Himes, J., Li, A. M., Locatelli, F., Mapara, M. Y., de Montalembert, M., Rondelli, D., ... Corbacioglu, S. (2021). CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *New England Journal of Medicine*, 384(3), 252–260. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2031054>
- Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 31(9), 822–826. <https://doi.org/10.1038/nbt.2623>
- Gaj, T., Epstein, B. E., & Schaffer, D. V. (2016). Genome Engineering Using Adeno-associated Virus: Basic and Clinical Research Applications. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 24(3), 458–464. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.151>
- Galanello, R., & Origa, R. (2010). Beta-thalassemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 5(11). <http://www.ojrd.com/content/5/1/11>
- Gaudelli, N. M., Komor, A. C., Rees, H. A., Packer, M. S., Badran, A. H., Bryson, D. I., & Liu, D. R. (2017). Programmable base editing of A T to G C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 551(7681), 464–471. <https://doi.org/10.1038/nature24644>
- Glass, Z., Lee, M., Li, Y., & Xu, Q. (2018). Engineering the Delivery System for CRISPR-Based Genome Editing. *Trends in Biotechnology* 36(2), 173–185. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.11.006>
- Greely, H. T. (2019). CRISPR'd babies: Human germline genome editing in the “He Jiankui affair.” *Journal of Law and the Biosciences*, 6(1), 111–183. <https://doi.org/10.1093/jlb/lasz010>

- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, *169*(12), 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Jansen, R., van Embden, Jan. D. A., Gaastra, Wim., & Schouls, Leo. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* *43*(6), 1565–1575. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, *337*(6096): 816–821. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1225829>
- Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). TALENs: A widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *14*(1), 49–55. <https://doi.org/10.1038/nrm3486>
- Kang, Y. K., Kwon, K., Ryu, J. S., Lee, H. N., Park, C., & Chung, H. J. (2017). Nonviral Genome Editing Based on a Polymer-Derivatized CRISPR Nanocomplex for Targeting Bacterial Pathogens and Antibiotic Resistance. *Bioconjugate Chemistry*, *28*(4), 957–967. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00676>
- Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A., & Liu, D. R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, *533*, 420–424. <https://doi.org/10.1038/nature17946>
- Li, Y., Glass, Z., Huang, M., Chen, Z.-Y., & Xu, Q. (2020). Ex vivo cell-based CRISPR/Cas9 genome editing for therapeutic applications. *Biomaterials*, *234*, 119711. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119711>
- Liao, H.-K., Hatanaka, F., Araoka, T., Reddy, P., Wu, M.-Z., Sui, Y., Yamauchi, T., Sakurai, M., O’Keefe, D. D., Núñez-Delicado, E., Guillen, P., Campistol, J. M., Wu, C.-J., Lu, L.-F., Esteban, C. R., & Izpisua Belmonte, J. C. (2017). In Vivo Target Gene Activation via CRISPR/Cas9-Mediated Trans-epigenetic Modulation. *Cell*, *171*(7), 1495-1507.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.025>
- Lieber, M. R. (2008). The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700039200>

- Lin, S., Staahl, B. T., Alla, R. K., & Doudna, J. A. (2014). Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *ELife*, 3, e04766. <https://doi.org/10.7554/eLife.04766>
- Liu, C., Zhang, L., Liu, H., & Cheng, K. (2017). Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 266, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.012>
- Makarova, K. S., Aravind, L., Grishin, N. V., Rogozin, I. B., & Koonin, E. V. (2002). A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Research*, 30(2), 482–496. <https://doi.org/10.1093/nar/30.2.482>
- Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: Computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*, 1, 1–26. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-1-7>
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., & Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
- Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2010). CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews. Genetics*, 11(3), 181–190. <https://doi.org/10.1038/nrg2749>
- Maruyama, T., Dougan, S. K., Truttmann, M. C., Bilate, A. M., Ingram, J. R., & Ploegh, H. L. (2015). Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nature Biotechnology*, 33(5), 538–542. <https://doi.org/10.1038/nbt.3190>
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Mojica, F. J. M., Juez, G., & Rodríguez-Valera, F. (1993). Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular Microbiology*, 9(3), 613–621. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x>

- Mout, R., Ray, M., Yesilbag Tonga, G., Lee, Y.-W., Tay, T., Sasaki, K., & Rotello, V. M. (2017). Direct Cytosolic Delivery of CRISPR/Cas9-Ribonucleoprotein for Efficient Gene Editing. *ACS Nano*, *11*(3), 2452–2458. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b07600>
- Müller, M., Lee, C. M., Gasiunas, G., Davis, T. H., Cradick, T. J., Siksnys, V., Bao, G., Cathomen, T., & Mussolino, C. (2016). Streptococcus thermophilus CRISPR-Cas9 systems enable specific editing of the human genome. *Molecular Therapy*, *24*(3), 636–644. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.218>
- Niu, Y., Shen, B., Cui, Y., Chen, Y., Wang, J., Wang, L., Kang, Y., Zhao, X., Si, W., Li, W., Xiang, A. P., Zhou, J., Guo, X., Bi, Y., Si, C., Hu, B., Dong, G., Wang, H., Zhou, Z., ... Sha, J. (2014). Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, *156*(4), 836–843. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.027>
- Normile, D. (30 joulukuuta 2019). Chinese scientist who produced genetically altered babies sentenced to 3 years in jail. *Scienceinsider*. <https://www.science.org/content/article/chinese-scientist-who-produced-genetically-altered-babies-sentenced-3-years-jail>. Viitattu: 27.8.2024. doi: 10.1126/science.aba7347
- Olson, S. (Ed.). (2016). *International Summit on Human Gene Editing*. National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/21913>
- Pickar-Oliver, A., & Gersbach, C. A. (2019). The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *20*(8), 490–507. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0131-5>
- Pierce, E. A., Aleman, T. S., Jayasundera, K. T., Ashimatey, B. S., Kim, K., Rashid, A., Jaskolka, M. C., Myers, R. L., Lam, B. L., Bailey, S. T., Comander, J. I., Lauer, A. K., Maguire, A. M., & Pennesi, M. E. (2024). Gene Editing for CEP290-Associated Retinal Degeneration. *The New England Journal of Medicine*, *390*(21), 1972–1984. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2309915>
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., & Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, *152*(5), 1173–1183. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>
- Ran, F. A., Cong, L., Yan, W. X., Scott, D. A., Gootenberg, J. S., Kriz, A. J., Zetsche, B., Shalem, O., Wu, X., Makarova, K. S., Koonin, E. V., Sharp, P. A., & Zhang, F. (2015). In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. *Nature*, *520*(7546), 186–191. <https://doi.org/10.1038/nature14299>

- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C.-Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., Scott, D. A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., & Zhang, F. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, *154*(6), 1380–1389. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, *8*(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Rees, D. C., Williams, T. N., & Gladwin, M. T. (2010). Sickle-cell disease. *The Lancet*, *376*, 2018–2031. <https://doi.org/10.1016/S0140>
- Ryu, S.-M., Koo, T., Kim, K., Lim, K., Baek, G., Kim, S.-T., Kim, H. S., Kim, D.-E., Lee, H., Chung, E., & Kim, J.-S. (2018). Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Nature Biotechnology*, *36*(6), 536–539. <https://doi.org/10.1038/nbt.4148>
- Shmakov, S., Smargon, A., Scott, D., Cox, D., Pyzocha, N., Yan, W., Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Severinov, K., Zhang, F., & Koonin, E. V. (2017). Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, *15*(3), 169–182. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.184>
- Sung, P., & Klein, H. (2006). Mechanism of homologous recombination: Mediators and helicases take on regulatory functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *7*(10), 739–750. <https://doi.org/10.1038/nrm2008>
- Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S., & Gregory, P. D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*, *11*(9), 636–646. <https://doi.org/10.1038/nrg2842>
- Wigler, M., Silverstein, S., Lee, L. S., Pellicer, A., Cheng, Y. c., & Axel, R. (1977). Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell*, *11*(1), 223–232. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90333-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90333-6)
- Yang, Y., Wang, L., Bell, P., McMenamin, D., He, Z., White, J., Yu, H., Xu, C., Morizono, H., Musunuru, K., Batshaw, M. L., & Wilson, J. M. (2016). A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. *Nature Biotechnology*, *34*(3), 334–338. <https://doi.org/10.1038/nbt.3469>

- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., Volz, S. E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E. V., & Zhang, F. (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, *163*(3), 759–771. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., & Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *Journal of Virology*, *72*(12), 9873–9880. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.12.9873-9880.1998>
- Zuris, J. A., Thompson, D. B., Shu, Y., Guilinger, J. P., Bessen, J. L., Hu, J. H., Maeder, M. L., Joung, J. K., Chen, Z.-Y., & Liu, D. R. (2015). Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nature Biotechnology*, *33*(1), 73–80. <https://doi.org/10.1038/nbt.3081>