

SOLUBIOLOGI 1 • 2017

35. vuosikerta (2017)

Julkaisija: Suomen Solubiologit ry

<http://suomensolubiologit.fi>

(Finnish Society For Cell Biology, Finlands Cellbiologer rf)

 **suomen solubiologit**

ISSN 0358-8475

Yhdistyksen osoite:

Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Jyväskylän yliopisto
PL 35 YAC
40014 Jyväskylä

Yhdistyksen puheenjohtaja:

Elina Siljamäki
Puh. 050 576 9807
elisel@utu.fi

Solubiologi-lehden päätoimittaja:

Sebastian Landor
Puh. 040 841 4519
slandor@btk.fi

Mainostoimittaja:

Mervi Toriseva
Puh. 040 724 5371
mertor@utu.fi

Toimittajat:

Helsinki
Juha Matilainen
Puh. 041 433 7132
jmatilai@yahoo.co.uk

Jyväskylä

Sira Karvinen
Puh. 050 362 5120
sira.m.karvinen@jyu.fi

Tampere

Merja Helenius
Puh. 03-35518592
merja.helenius@uta.fi

Turku

Elina Siljamäki
Puh. 050 576 9807
elisel@utu.fi

Taitto:

Graafinen Palvelu Martti Lepistö
Pihtakuusentie 3
36600 Pälkäne
Puh. 050 5718385
martti.lepisto@sivulados.fi

Painopaikka:






Painosalama Oy
Tykistökatu 4 A
20520 Turku

Kannen kuva: Kirsi Rilla

Sisältö

| | |
|--|----|
| Pääkirjoitus (Sebastian Landor) | 3 |
| Solunulkoiset vesikkelit – uudet solujen väliset viestijät <i>Kirsi Rilla</i> (Toim. Sebastian Landor) | 4 |
| Kokogenomin CRISPR-seulonnat – Toiminnallisen genetiikan muurinmurtaja? <i>Konsta Kukkonen</i> (Toim. Merja Helenius) | 8 |
| microRNAs and cancer <i>Mauro Scaravilli</i> (Toim. Merja Helenius) | 16 |
| Euro-BioImaging – Suomen johtama uusi kuvantamispalveluiden verkosto <i>Pasi Kankaanpää</i> (Toim. Elina Siljamäki) | 20 |
| Ulkomaankirjeenvaihtaja <i>Sira Karvinen</i> (Toim. Elina Siljamäki) | 25 |

Mainostajat

| | |
|--|-----------|
|  | 15 |
| www.promega.com/cellhealth | |
|  | 23 |
| www.biotop.fi | |
|  | 24 |
| thermofisher.com/cellcounting | |
|  | III-kansi |
| fennokauppa.fi | |
|  | IV-kansi |
| Nuppulinna laboratoriopalvelu Oy | IV-kansi |
| nuppulinna@dlc.fi | |

PÄÄKIRJOITUS**22.11.2017**

Tämän vuoden Solubiologi-lehti ilmestyy vain kerran, ja tarjoammekin nyt Suomi 100 -hengessä monipuolisen erikoisnumeron pakattuna täyteen hyvinkin ajankohtaista asiaa.

Lehden aloittaa Kirsi Rilla, joka laajentaa tietoisuuttamme solunulkoisten vesikkelien muodossa. Artikkelissa Kirsi kuvailee näiden ekstrasellulaaristen vesikkeleiden toimintaa solujenvälisinä viestinviejinä, sekä niiden käyttöä biomarkkerina eri patologisissa tilanteissa. Konsta Kukkonen vuorostaan kuvailee meille kokogenomin CRISPR-seulonnat, joissa määrätyn fenotyypin aiheuttama genotyyppi voidaan määrittää. Seuraavaksi saamme tujauksen syöpätutkimusta, kun Mauro Scaravilli luo meille lujatekoisen yleisnäkemyksen mikroRNAsta syövässä.

Olemme tähän numeroon myös onnistuneet saamaan Euro-Bioimaging projektimanageri Pasi Kankaanpään artikkelin, jossa hän esittelee teille Euroopassa jo suureksi kasvaneen Euro-Bioimaging kuvantamisverkoston. Tätä jatkuvasti kehittyvää infrastuktuuria johdetaan Suomen Turusta käsin ja yhteistyötä tehdään jo

nyt myös maailmanlaajuisesti niin kutsutussa Global Bioimaging toimintahaarassa.



Kaiken tämän jännittävyyden lisäksi tässä numerossa alkaa myös uusiutuva osio nimeltään ulkomaankirjeenvaihtajan kuulumiset, jonka potkaisee käyntiin meidän oma Sira Karvinen. Jutussa Sira kertoo tohtorintutkinnon jälkeisestä seikkailustaan Atlantin tuolla puolen Minnesotan yliopistossa. Jatkossa pyrimme myös julkaisemaan tasaisin väliajoin mielenkiintoisia tarinoita solubiologien ulkomaanvaihto- tai työkokemuksista. Kehotamme siis täten ulkomailla vaihto-opiskeluaikaa tai työkaksoa suorittavia lukijoitamme rohkeasti ottamaan yhteyttä, mikäli jutun kirjoittaminen Solubiologi-lehteen kiinnostaa.

Mielenkiintoisia ja jännittäviä lukuhetkiä sekä mukavia joulunodotuksia toivottaa koko Solubiologi-tonttuporukka!

Tuntematon tutkija - Sebastian Landor

Solunulkoiset vesikkelit – uudet solujen väliset viestijät

Kirsi Rilla (FT, dosentti, akatemiutkija)

Itä-Suomen Yliopisto, Biolääketieteen yksikkö, PL 1627

70211 Kuopio

s-posti kirsi.rilla@uef.fi

puh. 040-3553218

Tiivistelmä

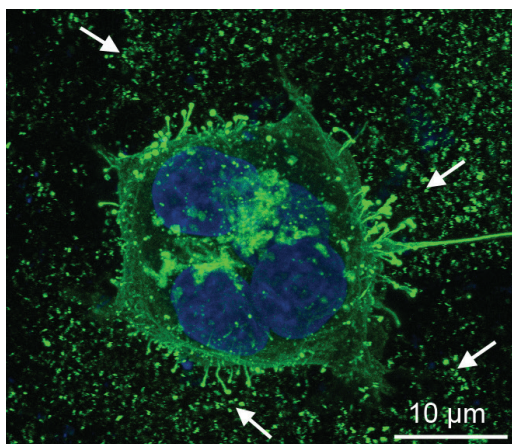
Solunulkoiset vesikkelit ovat tällä hetkellä yksi kiivaimmin tutkittuja kohteita solubiologian ja biolääketieteen alalla. Solunulkoiset vesikkelit ovat solujen ympäristöönsä erittämiä kalvorakkuloita, jotka kantavat isäntäsolusta peräisin olevia molekyylejä. Niitä erittyy useimmista elimistön soluista soluväliaineeseen ja kaikkiin elimistön nesteisiin, jossa ne toimivat viesteinä solujen välillä. Niiden mahdollinen hyödyntäminen biomarkkereina on erityisen kiinnostuksen kohteena.

Virhelöydöksestä biomarkkeriksi

Perinteisesti on ajateltu että solujen välinen kommunikointi tapahtuu vain suoralla solu-solu kontaktilla tai solujen erittämien liukoisten tekijöiden, kuten hormonien ja kasvutekijöiden välityksellä. Solunulkoisten vesikkelien löytyminen on kuitenkin mullistanut tietämyksen kehomme solujen välisestä viestinnästä. Vesikkelien avulla jopa täysin eri puolella elimistöä sijaitsevat solut pystyvät kommunikoimaan toistensa kanssa (Raposo ja Stoorvogel 2013). Wolf tutkimusryhmineen löysi jo vuonna 1967 verihiutaleista hiukkasia joita kutsuttiin nimellä ”platelet dust” = verihiutalepöly (Wolf 1967). Aluksi niitä pidettiin kuitenkin virhelöydöksenä tai solujen tapana päästä eroon mm. kuona-aineista. Tällä hetkellä solunulkoiset vesikkelit ovat yksi nopeimmin etenevistä biolääketieteen tutkimuskohteista. PubMed -haku termillä ”extracellular vesicles” tuottaa yli 1500 tieteellistä julkaisua, joista 1400 on tehty viimeisen viiden vuoden aikana. Tällä hetkellä vesikkeleitä pidetään erittäin lupaavina biomarkkereina niiden helpon saatavuuden vuoksi elimistön nesteistä, mutta myös potentiaalisina hoidon kohteina ja lääkeaineiden kantajina.

Mitä solunulkoiset vesikkelit ovat?

Solunulkoiset vesikkelit eli ekstrasellulaarivesikkelit ovat pieniä solukalvon verhoamia rakkuloita, joita kehomme solut erittävät soluväliaineeseen ja elimistön nesteisiin. Vesikkeleitä esiintyy kaikissa elimistön nesteissä, kuten plasmassa, nivelnesteessä, virtsassa, aivo-selkäydinnesteessä, syljessä, hiessä, siemennesteessä, lapsivedessä ja äidinmaidossa (Camussi ym. 2010). Valtaosa normaaleista solutyypeistä erittää vesikkeleitä, mutta niiden määrä ja koostumus muuttuu monissa sairaustiloissa, kuten syövässä, tulehduksissa ja kudonsvaurioissa. Vesikkelien erityis lisääntyy tyypillisesti aktivoituneissa, stressaantuneissa ja kuolevissa soluissa. Ne voivat toimia myös edistäjinä kudonsvaurioiden paranemisessa. Erityisesti kantasolujen erittämien vesikkelien mahdollisuudet kudonsvaurioiden hoidossa ovat erittäin aktiivisen tutkimuksen kohteena (Riazifar ym. 2016).



Kuva 1. Konfokaalimikroskooppinen 3D-projektio ryhmästä ihmisen rintasyöpäsoluja (MCF-7), jotka erittävät GFP-HAS3-positiivisia vesikkeleitä ympäröivään matriksiin (nuolet).

Kantasolujen erittämien vesikkeliön on todettu edistävän mm sydän- (Lai ym. 2010) ja munuaisvaurioiden (Bruno ym. 2009) paranemista.

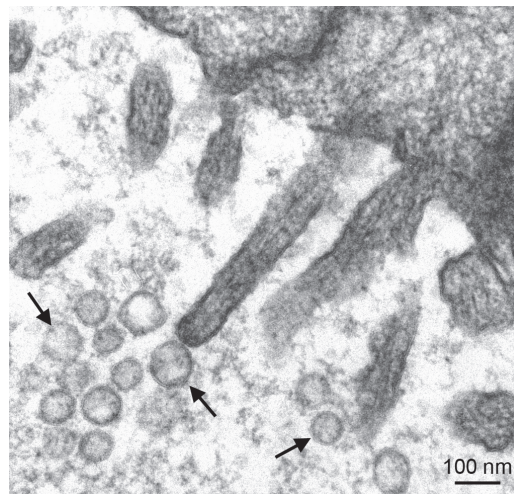
Nimistön ja tutkimusmenetelmien haasteet

Vesikkeleistä käytetään useita eri nimityksiä riippuen niiden oletetusta syntytavasta ja lähtösolusta. Syntyvän mukaan vesikkelit luokitellaan solujen endosomikoneistosta peräisin oleviin ja eksosytoosilla erittyviin eksosomeihin (halkaisija 30 nm - 120 nm), solukalvosta suoraan kuroutuviin mikrovesikkeleihin (50 nm - 2 µm) ja ohjelmoidusti kuolevista soluista peräisin oleviin apoptoosikappaleisiin (200 nm - 5 µm) (György ym. 2011). Lisäksi syöpäsoluista lähtöisin olevia suurikokoisia vesikkeleitä kutsutaan onkosomeiksi (Morello ym. 2013). Myös lukuisia muita nimityksiä löytyy kirjallisuudesta; alkuperäisen kudoksen tai solutyypin mukaan nimetään mm. prostasomit, sebosomit ja kardiosomit. Myös jo pitkään tunnetut matriksivesikkelit, jotka ovat keskeisessä roolissa ruston ja luun soluväliaineen muodostumisessa, (Anderson 1967), luetaan kuuluvaksi solunulkoisiin vesikkeleihin.

Erittäin aktiivisesta viimeaikaisesta tutkimustoiminnasta johtuen myös vesikkeliön tutkimukseen käytettävien menetelmien kirjo on laaja. Vesikkeliön luokittelu koon perusteella eksosomeihin ja mikrovesikkeleihin on osin harhaanjohtava, sillä täysin puhdasta populaatiota on tämän hetkisillä menetelmillä mahdotonta eristää. Lisäksi vesikkeliön pieni koko antaa omat haasteensa niiden eristykseen ja tunnistukseen. Esimerkiksi plasmanäytteestä eristetty populaatio sisältää vesikkeleitä lukuisista eri lähtösoluista. Alan kansainvälinen järjestö (ISEV, international society for extracellular vesicles) on julkaissut ohjeistuksen (Gould ja Raposo 2013), jonka mukaan on suositeltavaa käyttää yleistä termiä solunulkoiset vesikkelit (extracellular vesicles), koska se kattaa kaikki vesikkelityypit. Myös tutkimusmenetelmien suhteen on laadittu ohjeistus jossa määritellään minimivaatimukset näytteiden analysoinnille (Lötvall ym. 2014).

Miten vesikkelit säätelevät kohdesolujen toimintaa?

Vesikkelit sisältävät ja kuljettavat kaikkia solujen makromolekyylejä, eli lipidejä, proteiineja ja nukleiinihappoja (DNA ja RNA). Niiden on



Kuva 2. Transmissioelektronimikroskooppilla kuvattu MDCK-solu, jonka solukalvouloukkeista kuroutuu vesikkeleitä (nuolet).

todettu siirtävän kohdesoluihin jopa toiminnallista RNA:ta (Valadi ym. 2007). Syöpäsolujen erittämät vesikkelit kantavat onkogeeneja ja niiden tuotteita, joiden avulla ne voivat muokata kohdesolujen toimintaa (Al-Nedawi ym. 2008). Vesikkeliön uskotaan aiheuttavan epigeneettisiä muutoksia kohdesoluissaan (Camussi ym. 2011). Vesikkelit säätelevät kohdesolujen toimintaa mm. tulehdustilanteissa ja luovat otollisen ympäristön syövän metastoinnille (Hoshino ym. 2015). Ne vaikuttavat syöpäsolujen aineenvaihduntaan siirtämällä aminohappoja solusta toiseen ja säätelemällä kohdesolujensa glukosiiniainenvaihduntaa (Zhao ym. 2016). Jopa lääke-resistenssin on todettu välittyvän syöpäsolujen erittämien vesikkeliön kautta (Sousa ym. 2015). Alkuperäisen ajatuksen mukaan vesikkelit ovat myös solujen tapa päästä eroon jätteistä ja haitallisista molekyyleistä. Tällä voi olla merkitystä esimerkiksi kertymäsairauksissa ja moniin vanhenemiseen liittyvissä tiloissa kuten silmäpohjan rappeumassa (Wang ym. 2009) ja neurodegeneratiivisissa sairauksissa (Quek ja Hill 2016).

Vesikkeliön hyödyntäminen biomarkkereina

Solunulkoiset vesikkelit sisältävät luonnollisesti samoja molekyylejä kuin alkuperäinen solu, ja toimivat siksi edustavina näytteinä solujen molekyylikoostumuksesta. Myös mahdolliset muutokset patologisissa tilanteissa heijastuvat vesikkeliön määrään ja sisältöön. Toinen etu

on näytteiden oton vaivattomuus. Nestemäisten koepalojen (liquid biopsies) näytteenotto onnistuu ilman invasiivista kiinteän koepalan ottamista. Keskeisin sovellus nestemäisten koepalojen käytölle ovat syöpäsairaudet, niiden diagnosointi ja seuranta. Erityisen lupaavia ovat vesikkelien kuljettamat RNA-molekyylit, kuten miRNA:t, jotka normaalisti hajoavat nopeasti verenkierrassa tai muissa nesteissä. Kuitenkin pakattuina vesikkelien sisään ne voivat säilyä vahingoittumattomina pitkiäkin aikoja, ja toimia spesifisinä biomarkkereina monissa eri sairaustiloissa, erityisesti varhaisessa diagnostiikassa. Lisäksi nestemäiset biopsiat antavat kokonaiskuvan sairauden tilasta, toisin kuin kudossiopsiat joissa esim. syöpä voi jäädä toteamatta jos näyte ei ole riittävä. Esimerkiksi prostata-syövän diagnosoinnissa on saatu jo lupaavia kliinisiä tuloksia tutkimalla virtsanäytteiden vesikkelien sisältämiä RNA-molekyylejä (McKiernan ym. 2016). Syöpäsairauksien lisäksi muita lupaavia sovelluksia ovat mm. diabetes, neurodegeneratiiviset sairaudet, tulehdusreaktiot, maksasairaudet, nivelsairaudet, ateroskleroosi ja kehityshäiriöt.

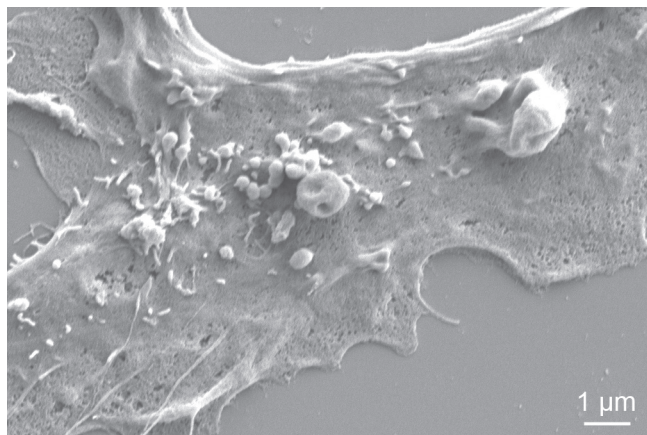
Hyaluronaanipeitteisten vesikkeleiden tarina

On hyvin tyypillistä, että yksittäiset tutkijat tai tutkimusryhmät ovat sattuman kautta havainneet solunulkoisten vesikkelien olemassaolon, josta aktiivinen tutkimustyö on saanut alkunsa. Näin myös oma tutkimusryhmäni päätyi vesikkelitutkimuksen pariin. Hyaluronaani (HA, Hyaluronic acid) on soluväliaineen yleis-

sin polysakkaridi joka tukee sekä solujen normaalia että pahanlaatuista kasvua monin eri tavoin. Ryhmämme tutkimuksissa havaittiin, että hyaluronaania tuottavien entsyymien aktiivisuus indusoi erittäin pitkien apikaalisten filopodioiden muodostumisen (Kultti ym. 2006). Yllättäen havaittiin myös, että hyaluronaanin synteesi on yhteydessä lisääntyneeseen solunulkoisten vesikkeleiden muodostumiseen. Tarkemmat selvitykset paljastivat, että nämä vesikkelit, joita ympäröi hyaluronaanipeite, kuroutuvat hyaluronaanisynteessin aktivoimien solu-ulokkeiden kärjistä (Rilla ym. 2013). Tämä löydös voi selittää monia niitä mekanismeja joiden kautta hyaluronaani edistää solujen aktiivatiota mm. syövän ja tulehduksen aikana (Rilla ym. 2014). Löydös kertoo myös että proteiinien, lipidien ja nukleiinihappojen lisäksi myös hiilihydraateilla ja niiden muodostamalla glykokalyksilla on tärkeä merkitys vesikkelien lastina. Lisäksi glykokalyksin molekyylit voivat mm. säädellä vesikkelien vuorovaikutusta kohdesolujen ja soluväliaineen kanssa solukalvon reseptorien tai muiden soluväliaineen molekyylien välityksellä.

Tulevaisuuden haasteet

Solunulkoisia vesikkeleitä pidetään mullistavana löytönä solubiologian alalla. Kyseessä on tavallaan täysin uusi soluorganelli. Kuitenkin räjähdysmäinen tutkimusaktiivisuuden ja julkaisujen määrän kasvu herättää kysymyksiä ja on syytä suhtautua varovaisen kriittisesti menetelmien ja tulosten luotettavuuteen. Epäilemättä on selvää, että solut tuottavat solukalvon peittämiä rakkuloita ympäristöönsä. Onko vesikkelien fysiologinen merkitys todella niin merkityksellinen kuin tällä hetkellä uskotaan, jää vielä selvitettäväksi. Kriitistä huolimatta kyseessä on kiehtova biologinen ilmiö, joka muuttaa merkittävästi käsitystämme solujen toiminnasta. Kyseessä on myös lupaava tutkimusalue joka voi johtaa merkittäviin tuloksiin biolääketieteen alalla. Odotamme mielenkiinnolla menetelmien kehittymistä ja uusia löydöksiä vesikkelien ja solujen välisessä viestinnässä. Odotamme myös solunulkoisten vesikkelien pääsemistä mukaan solubiologian oppikirjoihin.



Kuva 3. Scanning-elektronimikroskooppilla kuvattu rotan mesoteelisolu, jonka pinnalla näkyy erikokoisia kuroutuvia vesikkeleitä.

Lähteet

- Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, et al: Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 10: 619-624, 2008.
- Anderson HC: Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification. *J Cell Biol* 35: 81-101, 1967.
- Bruno S, Grange C, Deregibus MC, Calogero RA, Saviozzi S, Collino F, et al: Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol* 20: 1053-1067, 2009.
- Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantalupi V, Biancone L: Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int* 78: 838-848, 2010.
- Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Grange C, Fonsato V, Tetta C: Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *Am J Cancer Res* 1: 98-110, 2011.
- Gould SJ, Raposo G: As we wait: Coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2: 10.3402/jev.v2i0.20389, 2013.
- György B, Szabo TG, Pasztoi M, Pal Z, Misjak P, Aradi B, et al: Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 68: 2667-2688, 2011.
- Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, et al: Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527: 329-335, 2015.
- Kultti A, Rilla K, Tiihonen R, Spicer AP, Tammi RH, Tammi MI: Hyaluronan synthesis induces microvillus-like cell surface protrusions. *J Biol Chem* 281: 15821-15828, 2006.
- Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NS, Choo A, Chen TS, et al: Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 4: 214-222, 2010.
- Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzas EI, Di Vizio D, Gardiner C, et al: Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the international society for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 3: 26913, 2014.
- McKiernan J, Donovan MJ, O'Neill V, Bentink S, Noerholm M, Belzer S, et al: A novel urine exosome gene expression assay to predict high-grade prostate cancer at initial biopsy. *JAMA Oncol* 2: 882-889, 2016.
- Morello M, Minciacchi VR, de Candia P, Yang J, Posadas E, Kim H, et al: Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA. *Cell Cycle* 12: 3526-3536, 2013.
- Quek C, Hill AF: The role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016.
- Raposo G, Stoorvogel W: Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200: 373-383, 2013.
- Riazifar M, Pone EJ, Lötvall J, Zhao W: Stem cell extracellular vesicles: Extended messages of regeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2016.
- Rilla K, Pasonen-Seppänen S, Deen AJ, Koistinen VV, Wojciechowski S, Oikari S, et al: Hyaluronan production enhances shedding of plasma membrane-derived microvesicles. *Exp Cell Res* 319: 2006-2018, 2013.
- Rilla K, Siiskonen H, Tammi M, Tammi R: Hyaluronan-coated extracellular vesicles-a novel link between hyaluronan and cancer. *Adv Cancer Res* 123: 121-148, 2014.
- Sousa D, Lima RT, Vasconcelos MH: Intercellular transfer of cancer drug resistance traits by extracellular vesicles. *Trends Mol Med* 21: 595-608, 2015.
- Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lötvall JO: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9: 654-659, 2007.
- Wang AL, Lukas TJ, Yuan M, Du N, Tso MO, Neufeld AH: Autophagy and exosomes in the aged retinal pigment epithelium: Possible relevance to drusen formation and age-related macular degeneration. *PLoS One* 4: e4160, 2009.
- Wolf P: The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 13: 269-288, 1967.
- Zhao H, Yang L, Baddour J, Achreja A, Bernard V, Moss T, et al: Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism. *Elife* 5: 10.7554/eLife.10250, 2016.

Kokogenomin CRISPR-seulonnat – Toiminnallisen genetiikan muurinmurtaja?

Konsta Kukkonen (FM),

Tampereen Yliopisto, Lääke- ja biotieteiden tiedekunta,

Molecular Biology of Prostate Cancer Group

sähköposti: konsta.kukkonen@uta.fi

Tiivistelmä

CRISPR-Cas9 menetelmä on viime vuosina osoittautunut tehokkaaksi työkaluksi toiminnallisissa tutkimuksissa. Tarkkaan valikoitujen kohteiden muokkauksen lisäksi sitä voidaan hyödyntää myös genomilaajuisissa seulonnoissa, joissa etsitään tunnetun fenotyypin aiheuttavaa geeniä tai geenejä hiljentämällä solumaljalla kaikkia geenejä samanaikaisesti eri soluissa. RNA-interferenssistä poiketen CRISPR-Cas9:n perustuvalla teknologialla voidaan saavuttaa täydellinen ja peruuttamaton geenin hiljeneminen. Lisäksi Cas9:n entsyymien muokattavuus mahdollistaa myös geenien aktivaation, tämänkin genomien laajuisena.

Johdanto

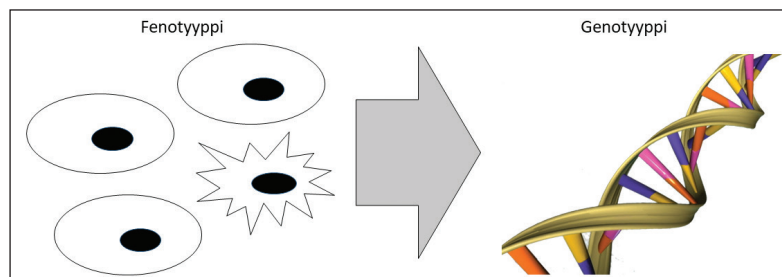
Tässä artikkelissa esittelen CRISPR-Cas9 menetelmän käyttöä genomilaajuisen fenotyypistä genotyyppiin etenevien populaatiopohjaisten seulontojen (Kuva 1) työkaluna. En yritä

tarjota kattavaa kuvaa kaikesta, mitä menetelmällä on saavutettu, vaan pyrin antamaan muutamien esimerkkien avulla yleiskuvan siitä, mihin menetelmää on käytetty ja mitä sen käytössä on otettava huomioon. Kattavampi lista kokogenomin CRISPR-seulonnoista löytyy esimerkiksi julkaisusta Joung ym. 2017.

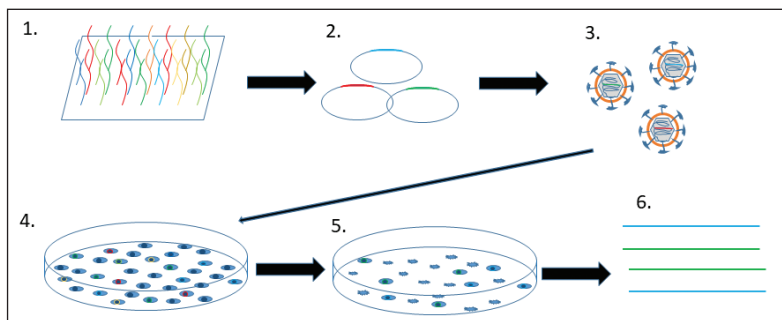
Yleistä CRISPR Cas9-menetelmästä

CRISPR (Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats) -teknologia on ollut genomineditoimiskäytössä vasta noin viiden vuoden ajan, mutta jo tässä ajassa se on mullistanut molekyylibiologian tutkimuskentän. CRISPR on peräisin bakteerien ja arkkien viruksia vastaan suunnatusta immuunipuolustuksesta, jonka avulla edellisestä infektiosta selvinneet bakteerit pystyvät tunnistamaan ja tuhoamaan uudelleen bakteerin infektoimiseen pyrkivän viruksen geneettisen materiaalin (Deveau ym. 2010, Doudna ja Charpentier 2014). CRISPR-Cas9 systeemi, joka on erityisesti saavuttanut molekyylibiologien suosion, kuuluu CRISPR

tyyppiin kaksi (Makarova ym. 2011). Sen komponentteja ovat ainostaan Cas9 entsyymi, jossa on HNH- ja RuvC-tyyppiset endonukleaasiaktiivisuudet, entsyymiin sitoutuva tracrRNA (trans-activating crRNA) sekä crRNA (CRISPR-RNA), joka pariutuu sekä tracrRNA:n, että bakteeriin tunkeutuvan viruksen DNA:n kanssa (Jinek ym. 2012, Doudna ja Charpentier



Kuva 1. Eteenpäin vievän genetiikan konsepti (englanniksi forward genetics): solun poikkeavan fenotyypin avulla pyritään selvittämään, mikä solun genotyyppissä saa kyseisen muutoksen aikaan. Samaa strategiaa on hyödynnetty aikaisemmin satunnaismutageneesiin ja RNA-interferenssiin perustuvissa seulonnoissa (Shalem ym. 2015). CRISPR-Cas9:n perustuvissa seulonnoissa on edellisiin verrattuna useita suotuisia ominaisuuksia (Shalem ym. 2015). (DNA:n kaksoiskierre, Wikipedia, CC-lisenssi)



Kuva 2. Sekapopulaatiossa tapahtuvan CRISPR-seulonnan käytännön työvaiheet. Kirjaston sekvenssit syntetisoidaan DNA-sirun pinnalle (1.), kloonataan esimerkiksi lentiviruksen transfer-vektoriin (2.) ja pakataan viruspartikkeleihin (3.). Solut transduoidaan ja niihin kohdistetaan seulontapaine (4.). Seulonnan jälkeen (5.) solut kerätään ja niiden sgRNA-kompositio analysoidaan sekvensoimalla (6.). Työvaiheet on kuvattu tarkemmin tekstissä.

Genominlaajuisten sgRNA-kirjastojen kokoonpano

CRISPR-kirjastojen, kuten aiemmin shRNA-kirjastojen vektorina on käytetty retrovirsuksia (usein erityisesti lentivirus-ta) niiden monien tar-koitukseen soveltuvien ominaisuuksien vuoksi: transduktion tehokkuus on lähellä 100 %:a ja tiitteri, eli vektorin kopioluku solua

2014). Systeemin käytännöllisyyttä on edelleen lisätty liittämällä RNA-komponentit yhteen niin kutsutuksi sgRNAksi (single guide RNA), jolloin koko systeemi voidaan koodata ainoastaan kahdella geenillä (Jinek ym. 2012), jotka voivat olla yhdessä vektorissa. CRISPR-Cas9:n systeemin suosion takana on sen joustavuus ja nopeus: genomiin voi tehdä muutoksia lähes mihin tahansa kohtaan muuttamalla 20 nukleotidin pituista (tai lyhyempää) tunnistusosaa sgRNasta. Näennäisesti ainoat kriteerit tunnistettavalle kohdalle ovat kolmen nukleotidin PAM (Protospacer Adjacent Motive) sekvenssi (NGG yleisimmän *S. Pyogenes* lajin entsyymien tapauksessa) suoraan sgRNA:n tunnistuskohdan alavirrassa, jota entsyymi tarvitsee sitoutumiseen (Anders ym. 2014), sekä kohdesekvenssin uniikkisuus genomissa.

CRISPR ei vaadi syvällistä ymmärrystä proteiinin rakenteen muuttamisen vaikutuksesta sen sitoutumisspesifisyyteen edeltävien FokI-sinkkisormijärjestelmän ja TALENien (Trans Activator Like Effector Nuclease) tavoin (Doudna ja Charpentier 2014). Lisäksi CRISPRillä tehty muutos kohdistuu RNA-interferenssistä poiketen suoraan DNA-tasolle, jolloin se vaimentaa proteiinia koodaavan geenin toiminnan täysin, kohdistuessaan molempiin alleeleihin ja geenin lukukehys muuttuu korjauksen yhteydessä (Shalem ym. 2015). Toisaalta Cas9 entsyymiä voidaan muokata liittämällä siihen aktivaattori tai inhibiittoria (Gilbert ym. 2014), mikä kasvattaa edelleen sen käyttömahdollisuuksia. Näin ollen CRISPR soveltuu täydellisesti genomin laajuisten seulontojen tekemiseen.

kohden, saadaan tarkasti määritettyä (Shalem ym. 2015). Tavallisesti tämä arvo (Multiplicity of infection, MOI) on koko genomin seulonnoissa: MOI <1 (tyypillisesti välillä 0,05-0,3), jotta soluihin päätyisi korkeintaan yksi sgRNA (Shalem ym. 2014, Ma ym. 2015, Shalem ym. 2015). Retroviruksella toimitetun sgRNA:n sekvenssi integroituu solun genomiin, jolloin se toimii myös ID:nä sekvenssoinnissa (Shalem ym. 2015). Jo ensimmäisen sukupolven kirjastot olivat genomin laajuisia, sillä ne oli suunniteltu 7031–18080 ihmisen (Shalem ym. 2014, Wang ym. 2014) tai 19150 hiiren (Koike-Yusa ym. 2014) geeniä vastaan. Lisäksi jokaista geeniä kohden on 2-10 sgRNA:ta, mikä parantaa tulosten luotettavuutta (Koike-Yusa ym. 2014, Shalem ym. 2014, Wang ym. 2014, Shalem ym. 2015). Osaa kirjastoista on käytetty stabiilisti Cas9 ilmentävien solulinjojen kanssa (Koike-Yusa ym. 2014, Wang ym. 2014), osassa taas Cas9 on sgRNA:n kanssa samassa vektorissa (Shalem ym. 2014). Toisaalta myös väliaikainen Cas9 transfektio kirjaston transduktion jälkeen on havaittu toimivaksi ja sen arvioidaan vähentävän off-target vaikutuksia, tosin herkkyyden kustannuksella (Ma ym. 2015). Viime vuosina uusia kirjastoja on julkaistu kiihtyvään tahtiin, ja niillä on pyritty pääasiassa parantamaan spesifisyyttä ja aktiivisuutta kohdesekvenssissä (mm. Ma ym. 2015, Wang ym. 2015, Doench ym. 2016, Tzelepis ym. 2016, Hart ym. 2017). Kirjastojen valmistamista käsittelemme viimeisessä luvussa ja sen yleiset työvaiheet on kuvattu lyhyesti kuvassa 2.

Negatiiviset CRISPR-seulonnat auttavat tunnistamaan välttämättömiä geenejä

Genominlaajuisia CRISPR-kirjastoja on käytetty niin negatiiviseen kuin positiiviseenkin seulontaan (Shalem ym. 2015). Esimerkkejä negatiivisesta seulonnasta ovat normaalien ja syöpäsolujen välttämättömien geenien löytämiseen tähtäävät seulonnat (Hart ym. 2015, Tzelepis ym. 2016). Välttämättömiä geenejä voidaan tunnistaa sillä perusteella, että niitä kohdentavat sgRNA:t vähenevät tai katoavat (sgRNA:n aktiivisuudesta riippuen) solupopulaatiosta seulonnan aikana, kaikissa olosuhteissa (Hart ym. 2015). Välttämättömiä geenejä tunnistettiin jo ensimmäisissä kokogenomin CRISPR-seulonnoissa (Wang ym. 2014, Shalem ym. 2014), mutta toisen sukupolven kirjastot ovat edelleen pystyneet parantamaan seulontojen herkkyyttä ja uusia solulinjakohtaisia välttämättömiä geenejä on tunnistettu edelleen lisää (Hart ym. 2015, Tzelepis ym. 2016, Hart ym. 2017). CRISPR on ollut shRNA seulontoihin verrattuna ylivoimainen välttämättömien geenien tunnistuksessa (Evers ym. 2016, Munoz ym. 2016). Ainoastaan ribosomaaliset geenit shRNA seulonta on tunnistanut paremmin (Hart ym. 2015). Välttämättömien geenien listaa voidaan hyödyntää muun muassa perinnöllisten sairauksien tutkimuksessa ja genominlaajuisen kirjastojen laadun arvioimisessa, sillä näitä geenejä kohdentavien sgRNA:iden tulisi aina hävitä populaatiosta (Hart ym. 2015). Lisäksi vertaamalla syöpäsolulinjoissa välttämättömiä geenejä normaaleissa soluissa välttämättömiin on mahdollista tunnistaa uusia, jostakin muutoksesta johtuvia synteettisesti letaaleja geenejä, jotka voivat olla kohteina uusille, aiempaa vähemmän sivuvaikutuksia aiheuttaville täsmälääkkeille (Hart ym. 2015, Munoz ym. 2016, Tzelepis ym. 2016).

Kiinnostavia koeasetelmia

Välttämättömien geenien tunnistus on tärkeää niin perus- kuin soveltavankin tutkimuksenkin kannalta (Hart ym. 2015, Tzelepis ym. 2016). Kuitenkin CRISPR-seulonnan koko potentiaali tulee paremmin esiin positiivisissa seulonnoissa, joissa geenin hiljentäminen johtaa valintatuun. Erityisen mielenkiintoisia koeasetelmia ovat ne, joissa pyritään tunnistamaan geenejä, jotka vaikuttavat kliinisesti merkityksellisiin ilmiöihin, kuten virusinfektioon, tai syöpäsolujen lääkeaineresistenssin ja metastaasien kehittymiseen. Näistä ensimmäisenä esimerkkinä

vuonna 2015 julkaistussa tutkimuksessa tunnistettiin Länsi-Niilin viruksen aiheuttamaan hermosolujen apoptoosiin johtavia geenejä (Ma ym. 2015). Ensin 293FT solut transdukoitiin genomin laajuisella CRISPR-kirjastolla, rikastettiin GFP markkerin perusteella virtausytometrialla ja niihin transfektoitiin transientisti Cas9 entsyymi (Ma ym. 2015). Sitten solut altistettiin Länsi-Niilin virukselle (West Nile virus, WNV) ja sgRNA:t sekvensoitiin kuuden päivän altistuksen jälkeen (Ma ym. 2015). Mitä selkeämpi resistenssi geenin hiljentymisellä saadaan, sitä enemmän sgRNA:ta luetaan sekvensoitaessa. Kuitenkin osa resistenssigeeneistä hidastaa myös kasvua, mikä johtaa heikompaan sgRNA signaaliin sekvensoinnissa (Ma ym. 2015). Kuolleista soluista johtuva tausta oli sekvensoinnissa niin suuri, että resistenssigeenejä oli vaikea havaita (Ma ym. 2015). Ongelman kiertääkseen tutkijat tekivät parhailla kandidaateilla toisen seulonnan käyttäen pienempää alikirjastoa, jolloin tausta oli vaimeampi (Ma ym. 2015).

Tänä vuonna julkaistussa tutkimuksessa puolestaan CRISPR-seulontaa hyödynnettiin immunoterapiaresistenssiin liittyvien geenien etsimiseen melanoomasoluissa (Patel ym. 2017). Elegantissa kahden solutyyppin koeasetelmassa melanoomasolut ja T-solut muokattiin ensin niin, että melanoomaan siirrettiin anti-geeni ja T-soluihin sitä vastaava reseptori (Patel ym. 2017). Seuraavaksi melanoomasolut infektoitiin ensin genominlaajuisella CRISPR-kirjastolla ja altistettiin T-soluille (Patel ym. 2017). Infektoiduista soluista niissä, jotka selvisivät lymfositien hyökkäyksestä, oli hiljentynyt sellaisia geenejä, joiden toiminta on välttämättömiä CD8+ immuunivasteen synnyssä (Patel ym. 2017). Tutkimuksessa löydettiin lukuisia tunnettuja, mutta myös uusia ilmiöön vaikuttavia geenejä (Patel ym. 2017).

CRISPR-seulontaa voidaan hyödyntää myös *in vivo* tutkimuksessa. Chen ym. 2015 käyttivät genominlaajuisia sgRNA kirjastoa keuhkosyöpäsolujen metastaasiin johtavien geenien tunnistamisessa (Chen ym. 2015). Ensin kirjasto transdukoitiin GFP:tä ja Cas9:ä ilmentäviin hiiren keuhkosyöpäsoluihin (Chen ym. 2015). Lyhyen *in vitro* kasvatuksen jälkeen solut injektioitiin immuunipuutoksisten hiirten takajalkoihin ihon alle (Chen ym. 2015). Solupopulaatioiden sgRNA kompositiota sekvensoitiin ennen transplantaatiota, sekä kaksi ja kuusi viikkoa transplantaation jälkeen primäärikasvaimesta,

sekä metastaaseista (Chen ym. 2015). Näin voitiin tunnistaa metastaasiin vaikuttavia geenejä ja tutkia, miten kilpailutilanne vaikuttaa sgRNA kompositioon kasvaimen kehityksen aikana (Chen ym. 2015).

dCas9 – seulontapotentiaalın laajentaminen

Perinteiseen CRISPR:iin perustuva seulon- tastrategia soveltuu parhaiten proteiineja koo- daavien geenien toiminnan poistamiseen tähtääviin koeasetelmiin. Kuitenkin myös erilaisilla RNA geeneillä (miRNA, lncRNA ym.) tiedetään olevan suuri vaikutus solujen fenotyyppeihin. RNA:iden funktioon ei voida vaikuttaa tekemällä lukukehyyksen muuttavia mutaatioita, mutta sen sijaan niiden ilmentyminen voidaan hiljentää katalyyttisesti toimimattomaksi muokattamalla dCas9:llä, johon on liitetty KRAB-repressoridomeeni (Gilbert ym. 2014). Tällä strategialla on pystytty löytämään lukuisia uusia funktionaalisia lncRNA:ita useista eri solulinjoista ja toteamaan niiden vaikutus solujen kasvuun (Liu ym. 2017).

Edellisten esimerkkien lisäksi CRISPR on mahdollistanut myös toiminnan lisäämiseen tähtäävän seulonnan, jota ei RNA-interferenssillä sen mekanismista johtuen ole pystytty aiemmin tekemään, ja joka on plasmidikirjastoilla (Yang ym. 2011) tehtynä sekä kallista että kattavuudeltaan vaillinaista (Shalem ym. 2015). Geenin aktivaatio on hiljentämistä selvästi vaikeampi toteuttaa, sillä se vaatii koko transkriptiokoneiston ohjaamista kohdealueelle. Laajoissa seulonnoissa on myös välttämätöntä, että geeni saadaan aktivoitua jo yhden aktivaattorikompleksin sitoutuessa lähelle geenin transkription aloituskohtaa, sillä genomilaajuisen kirjaston valmistaminen olisi muussa tapauksessa valtavan työlästä ja kallista (Gilbert ym. 2014). Aktivoiva CRISPR perustuu dCas9:n ja/ tai sgRNA:n muokkaamiseen niin, että dCas9:n on fuusioitu joko synteettinen VP64-aktivaattoridomeeni, sen sitoutumispaikkoja tai sgRNAsa on sitoutumisaptameerejä eksogeenisille aktivaattoriproteiineille, jolloin jo yhden sgRNA:n avulla saadaan aikaan biologinen vaste (Gilbert ym. 2014, Konermann ym. 2015). Täyttä geenin hiljentymistä tavoittelevista seulonnoista poiketen aktivaatioseulonnoissa kohteina ovat niin hiljaiset kuin ilmentyvätkin geenit (Gilbert ym. 2014). dCas9:n perustuvien menetelmien on arvioitu aiheuttavan leikkaavaan Cas9:n verrattuna vähemmän kohdealueen ulkopuolisia vaiku-

tuksia, sillä kompleksin aiheuttama aktivaatio tai inhibitio tapahtuu vain sen sitoutuessa transkription aloituskohtaan (Gilbert ym. 2014, Konermann ym. 2015).

Genominlaajuisten CRISPR-seulontojen suunnittelu

CRISPR-seulonta on oikein käytettynä erittäin tehokas työkalu, jolla voidaan tunnistaa biologiseen tapahtumaan osallistuvia geenejä ilman tarkkaa ennakkotietoa. Genomin laajuiset menetelmät eivät kuitenkaan ole automaattinen tapa löytää haluttu tieto nopeasti. Ennen kirjaston valmistusta koeasetelma on suunniteltava huolellisesti. Seulonnan tyyppi on valittava ensimmäiseksi tutkimuskysymyksen mukaan: onko kyseessä negatiivinen (esim. välttämättömät geenit) vai positiivinen selektio (esim. lääkeresistenssi)? Positiivisessa selektiossa tuloksena on usein hyvin pieni joukko geenejä, jotka rikastuvat populaatiossa seulonnan aikana (Shalem ym. 2015). Negatiivisessa selektiossa sgRNA:ista jää jäljelle huomattavasti suurempi osuus, mikä asettaa tiukemman vaatimuksen herkkyydelle (Shalem ym. 2015).

Lisäksi on mietittävä, onko ilmiöön liittyvä fenotyyppi seulottavissa? Solukuoleman tai kasvunopeuden lisäksi esimerkiksi vasta-aineilla tunnistettavien pintaproteiinien ilmentymistä voidaan käyttää, jolloin solut voidaan erotella virtausytometrian avulla (Shalem ym. 2015, Joung ym. 2017). Seulottavan fenotyypin tulee olla tunnistettavissa riittävällä herkkyydellä ja spesifisyydellä, jotta oikeat positiiviset erottuvat taustakohinasta. Epäselvästä fenotyypistä tai heikosta selektiosta johtuva voimakas kohina johtaa epävarmoin tuloksiin, joiden tulkin- ta ja validoiminen voi osoittautua haasteelliseksi.

Tulosten resoluutiota parantaa etenkin seulonnan kattavuus: Jokainen kirjastossa oleva sgRNA-sekvenssi tulisi olla edustettuna mahdollisimman monessa, usein useammassa sadassa solussa (>500 solua / sgRNA) (Chen ym. 2015, Joung ym. 2017). Kun otetaan huomioon kirjastojen laajuus, rinnakkaiset kokeet ja kontrollit sekä se, että transduktioon käytetään alhaista MOI:ta (kaikki solut eivät transdusoidu), tarvittu solumäärä kasvaa helposti suuruusluokkaan 10^8 (Joung ym. 2017). Täten myös käytettävän solumateriaalin saatavuus kannattaa ottaa huomioon jo hyvissä ajoin menetelmän käyttöä suunniteltaessa (Joung

ym. 2017). Jos solumäärä on rajoittava tekijä, on mahdollista käyttää genomien laajuisen kirjaston sijasta pienempää alikirjastoa (Joung ym. 2017).

Genominlaajuisen CRISPR-kirjaston valmistus ja käyttö

Kirjaston valmistus (Kuva 2) voi alkaa sgRNA:iden suunnittelusta, joskin valmiita, eri julkaisuissa käytettyjä kirjastoja on saatavilla toimijoilta, kuten Addgene (<https://www.addgene.org/>), jolloin sgRNA sekvenssien suunnitteluun ei tarvitse puuttua. Myös kaksi ensimmäistä työvaihetta (sgRNA synteesi ja kloonauksen vektoriin) jäävät pois kuvassa 2 kuvatussa kirjastonvalmistuksen työnkulusta, jos kirjasto tilataan valmiina. Mikäli kirjasto kuitenkin halutaan valmistaa alusta alkaen itse, se aloitetaan syntetisoimalla sgRNA-sekvenssit DNA-sirun pinnalle (Kuva 2, 1), jonka jälkeen ne pestään, kerätään, eristetään geeliltä ja kloonataan retrovirusvektoriin (Kuva 2, 2) (Joung ym. 2017). Vektorit monistetaan bakteerisoluihin ennen virustuotantoa, ja kirjaston edustavuus tarkistetaan pesäkkeiden lukumäärää arvioimalla (Joung ym. 2017). Virukset tuotetaan transfektioimalla kirjasto viruksen kuoriproteiineja koodaavien plasmidien kanssa 293T soluihin (Kuva 2, 3), jonka jälkeen määritetään viruksen tiitteri koetta varten (Joung ym. 2017). Lisäksi kirjaston kokoonpano olisi hyvä varmistaa esimerkiksi sekvensoimalla ennen käyttöä sen varmistamiseksi, että sgRNA sekvenssit ovat oikeita, kaikki sekvenssit ovat kattavasti mukana, eikä suuria vinoumia niiden suhteellisissa määrissä esiinny (Koike-Yusa ym. 2014, Ma ym. 2015, Joung ym. 2017). Esimerkiksi sgRNA:n sekvenssillä voi olla vaikutusta sen pakkautumiseen lentivirukseen, mistä voi seurata vaihtelua sgRNA:iden suhteellisissa osuuksissa (Koike-Yusa ym. 2014).

Seulontavaiheessa edustavuuden kannalta riittävä määrä soluja transdusoidaan viruskirjastolla (Kuva 2, 4). Transduoituneet solut rikastetaan esimerkiksi markkeriproteiinin avulla (Ma ym. 2015) tai antibioottiselektiolla (Koike-Yusa ym. 2014). Seuraavaksi soluihin kohdistetaan seulontapaine (Kuva 2, 5). Olosuhteiden kontrollista on huolehdittava tarkasti niin, että soluihin ei vaikuta tutkittavan ilmiön sijasta jokin muu selektiopaine, esimerkiksi stressi kasvatusmediumin puutteiden tai liian alhaisen pH:n takia (Hart ym. 2015). Kont-

rolleina kokeissa voidaan käyttää joko varhaista aikapistettä (negatiivinen seulonta) tai solumaljaa, johon ei kohdistu seulontapainetta (positiivinen seulonta) (Joung ym. 2017). Seulontaperiodi vaihtelee koeasetelman mukaisesti: vahvan seulontapaineen kanssa jo muutama tunti voi riittää (Patel ym. 2017), kun taas kasvunopeuteen perustuva seulonta on huomattavasti hitaampaa, jopa useita viikkoja (Chen ym. 2015). Toisaalta aikapisteitä voidaan kerätä useita, jos halutaan tutkia populaation dynamiikkaa ajan suhteen (Chen ym. 2015). Tällöin hiljennettävien geenien funktioiden lisäksi havaintoihin voi kuitenkin vaikuttaa myös sgRNA:iden aktiivisuus suhteessa toisiinsa (Shalem ym. 2015). Muutaman aikapisteen kerääminen voi olla välttämätöntä myös, jos käytetyn valintapaineen selektiotehokkuudesta ei ole tietoa tai jos se vaihtelee solulinjasta tai muista olosuhteista riippuen.

Seuraavaksi solut kerätään, DNA eristetään ja sgRNA:t sekvensoidaan kohdennetun syväsekvensoinnin avulla (Kuva 2, 6). Populaatiossa rikastuvat (positiivinen selektio) tai siitä poistuvat (negatiivinen selektio) sgRNA:t vastaavat niitä geenejä, jotka ovat mahdollisesti olennaisia tutkitun ilmiön kannalta.

Tulosten analyysissä on huomioitava mahdolliset väärät positiiviset osumat. Varsinkin polyploideissa solulinjoissa, väärin positiivisten mahdollisuus negatiivisessa seulonnassa on korkea, kun genomia leikataan liian monesta kohtaa samanaikaisesti (Munoz ym. 2016). Lisäksi kohdealueen ulkopuoliset vaikutukset vaikuttavat väärin positiivisten esiintymiseen (Shalem ym. 2015). Näihin pystytään jo ennen seulontaa vaikuttamaan sgRNA-sekvenssien huolellisella suunnittelulla ja käyttämällä useita eri sekvenssejä jokaista geeniä kohden, jolloin yksittäisten sgRNA:iden painoarvo tuloksissa ei nouse liian suureksi (Shalem ym. 2015, Joung ym. 2017).

Sen lisäksi, että jokaista geeniä kohden olisi hyvä olla useita sgRNA:ita, laajoissa seulonnoissa löydetyt osumat tulee aina validoida yksitellen ja mieluiten käyttäen eri sgRNA-sekvenssiä kuin, mitä on käytetty seulonnassa. Näin voidaan varmistua, että seulonnassa löydetyt geenin hiljentäminen tai aktivoiminen todella johtaa seulonnassa etsittävään fenotyyppiin (Joung ym. 2017). Lisäksi kohdesekvenssissä olevia lyhyitä deleetioita voidaan analysoida kohdennetulla sekvensoinnilla (Joung ym. 2017). CRISPRi:n ja CRISPRa:n yhteydessä

voidaan käyttää qPCR:ta sekä western blot -menetelmää vasta-aineiden saatavuudesta riippuen (Joung ym. 2017).

Myös väärin negatiivisten olemassaolo on mahdollista. Esimerkiksi geenin hiljentyminen riippuu siitä, millainen aktiivisuus sgRNA:lla on ja muuttuuko geenin lukukehys mutaation seurauksena (Shalem ym. 2015). Tätäkin ongelmaa korjataan suunnittelemalla useita sgRNA:ita jokaista geeniä kohden, vaikka se ei aina ole mahdollista esimerkiksi, jos geenillä on lyhyt koodaava alue (Shalem ym. 2015). Genominlaajuisen seulonnan ei siis voida olettaa olevan täysin kattava.

Kattavampia listauksia kokogenomin CRISPR-seulonnan koeasetelman suunnittelussa ja toteutuksessa huomioon otettavista seikoista on listattu aiemmassa kirjallisuudessa (mm. Shalem ym. 2015, Joung ym. 2017).

Yhteenveto

Genominlaajuiset CRISPR-seulonnat ovat tehokas työkalu sellaisten ilmiöiden tutkimiseen, joissa selkeästi tunnistettavan fenotyypin aiheuttavaa genotyyppiä ei tunneta täydellisesti. Kuten erilaisista esittelemistäni koeasetelmista käy ilmi, se soveltuu hyvin erityyppisiin tutkimusongelmiin. Mikäli seuloitava fenotyyppi vain on tunnistettavissa riittävällä herkkyydellä, menetelmän avulla saadaan valtavasti uutta tietoa, joka mahdollistaa tarkemman mekaanisen tutkimuksen. Menetelmä on kuitenkin suhteellisen kompleksinen ja monivaiheinen ja vaatii paljon osaamista, resursseja ja infrastruktuuria, joten se ei välttämättä sovellu minkä tahansa tutkimusryhmän tai -laitoksen välineeksi.

Lähteet

Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek, M: Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 513, 569-573, 2014.

Berli RR, Segal DJ, Dreier B, Barbas CF: Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 14628-14633, 1998.

Deveau H, Garneau JE, Moineau S: CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annu Rev Microbiol* 64, 475-493, 2010.

Doench JG, Fusi N, Sullender M, Hegde M, Vaimberg EW, Donovan KF, Smith I, Tothova Z, Wilen C, Orchard R, Virgin HW, Listgarten J, Root DE: Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol* 34, 184-191, 2016.

Doudna JA, Charpentier E: The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096, 2014.

Evers B, Jastrzebski K, Heijmans JP, Grenrum W, Beijersbergen RL, Bernards R: CRISPR knockout screening outperforms shRNA and CRISPRi in identifying essential genes. *Nat Biotechnol* 34.6, 631-635, 2016.

Hart T, Tong A, Chan K, van Leeuwen J, Seetharaman A, Aregger M, Chandrashekar M, Hustedt N, Seth S, Noonan A, Habsid A, Sizova O, Nedyalkova L, Climie R, Lawson K, Sartori MA, Alibai S, Tieu D, Masud S, Mero P, Weiss A, Brown KR, Ušaj M, Billmann M, Rahman M, Costanzo M, Myers CL, Andrews B, Boone C, Durocher D, Moffat J: Evaluation and Design of Genome-wide CRISPR/Cas9 Knockout Screens. *bioRxiv* 117341, 2017.

Hart T, Chandrashekar M, Aregger M, Steinhart Z, Brown KR, MacLeod G, Mis M, Zimmermann M, Fradet-Turcotte A, Sun S, Mero P, Dirks P, Sidhu S, Roth FP, Rissland OS, Durocher D, Angers S, Moffat J: High-resolution CRISPR screens reveal fitness genes and genotype-specific cancer liabilities. *Cell* 163, 1515-1526, 2015.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E: A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-821, 2012.

Joung J, Konermann S, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Platt RJ, Brigham MD, Sanjana NE, Zhang F: Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. *Nat Protoc* 12, 828-863, 2017.

Koike-Yusa H, Li Y, Tan EP, Velasco-Herrera MDC, Yusa K: Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat Biotechnol* 32, 267-273, 2014.

Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mo-

- jica FJM, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV: Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 9, 467-477, 2011.
- Munoz DM, Cassiani PJ, Li L, Billy E, Korn JM, Jones MD, Golji J, Ruddy DA, Yu K, McAllister G, DeWeck A, Abramowski D, Wan J, Shirley MD, Neshat SY, Rakiec D, de Beaumont R, Weber O, Kauffmann A, McDonald III ER, Keen N, Hofmann F, Sellers WR, Schmelzle T, Stegmeier F, Schlabach MR: CRISPR screens provide a comprehensive assessment of cancer vulnerabilities but generate false-positive hits for highly amplified genomic regions. *Cancer Discov* 6, 900-913, 2016.
- Sanjana NE, Shalem O, Zhang F: Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods* 11, 783-784, 2014.
- Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F: Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 343, 84-87, 2014.
- Ophir S, Sanjana NE, Zhang F: High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat Rev Genet* 16, 299-311, 2015.
- Tzelepis K, Koike-Yusa H, De Braekeleer E, Li Y, Metzakopian E, Dovey OM, Mupo A, Grinkevich V, Li M, Mazan M, Gozdecka M, Ohnishi S, Cooper J, Patel M, McKerrell T, Chen B, Domingues AF, Gallipoli P, Teichmann S, Ponsting H, McDermott U, Saez-Rodriguez J, Huntly PJP, Iorio F, Pina C, Vassiliou GS, Yusa K: A CRISPR dropout screen identifies genetic vulnerabilities and therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Cell Rep* 17, 1193-1205, 2016.
- Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES: Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* 343, 80-84, 2014.
- Wang T, Birsoy K, Hughes NW, Krupczak KM, Post Y, Wei JJ, Lander ES, Sabatini DM: Identification and characterization of essential genes in the human genome. *Science* 350, 1096-1101, 2015.
- Yang X, Boehm JS, Yang X, Salehi-Ashtiani K, Hao T, Shen Y, Lubonja R, Thomas SR, Alkan O, Bhimdi T, Green TM, Johannessen CM, Silver SJ, Nguyen C, Murray RR, Hieronymus H, Balcha D, Fan C, Lin C, Ghamsari L, Vidal M, Hahn WC, Hill DE, Root DE: A public genome-scale lentiviral expression library of human ORFs. *Nat methods* 8, 659-661, 2011.