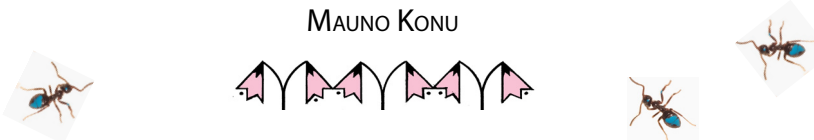


Vanamon rahoittamaa tutkimusta

Pihamauriaisien geenimuokkaus CRISPR-Cas9-tekniikalla



Suomessa yleinen pihamauriaisinen otettiin ensimmäistä kertaa kohteeksi CRISPR-Cas9-geenisaksilla tehtävään kokeeseen. Kokeen tuloksena onnistuttiin muuttamaan muurahaisen silmien väriä ja näin osoittamaan, että geenien muokkaus tällä lajilla on mahdollista.

Johdanto

Pihamauriaisinen (*Lasius niger*) on yleisin muurahaislaji Euroopan rakennetussa kaupunkiympäristössä, ja laji esiintyy laajasti koko Euraasian lauhkealla alueella (Haatanen ym. 2015). Lajin pesän tunnistaa helposti pienistä hiekkakeoista pihalaatoitusten saumoissa, asfaltin halkeamissa ja kivijalkojen juurilla. Laji saattaa myös tunkeutua ihmisasuntoihin ja löytää sieltä sokeria sisältävät ruoka-aineet, minkä vuoksi pihamauriaista kutsutaan myös sokeri-muurahaiseksi.

Pihamauriaisinen on helppohoitoinen. Se ei pure eikä käyttäydy aggressiivisesti, kuten esimerkiksi metsissä asuvat kekomuurahaiset. Tämän vuoksi laji on suosittu lemmikki muurahaiharrastajien parissa ja oiva laji tutkimuskäyttöön. Pesä on helppo pitää huoneenlämmössä ja ruokkia kotoa löytyvillä aineksilla. Talven tullessa pesän voi laittaa talvilevolle jääkaappiin. Yleisyytensä ja helppohoitoisuutensa vuoksi valitsimme pihamauriaisien tutkimuksemme kohteeksi.

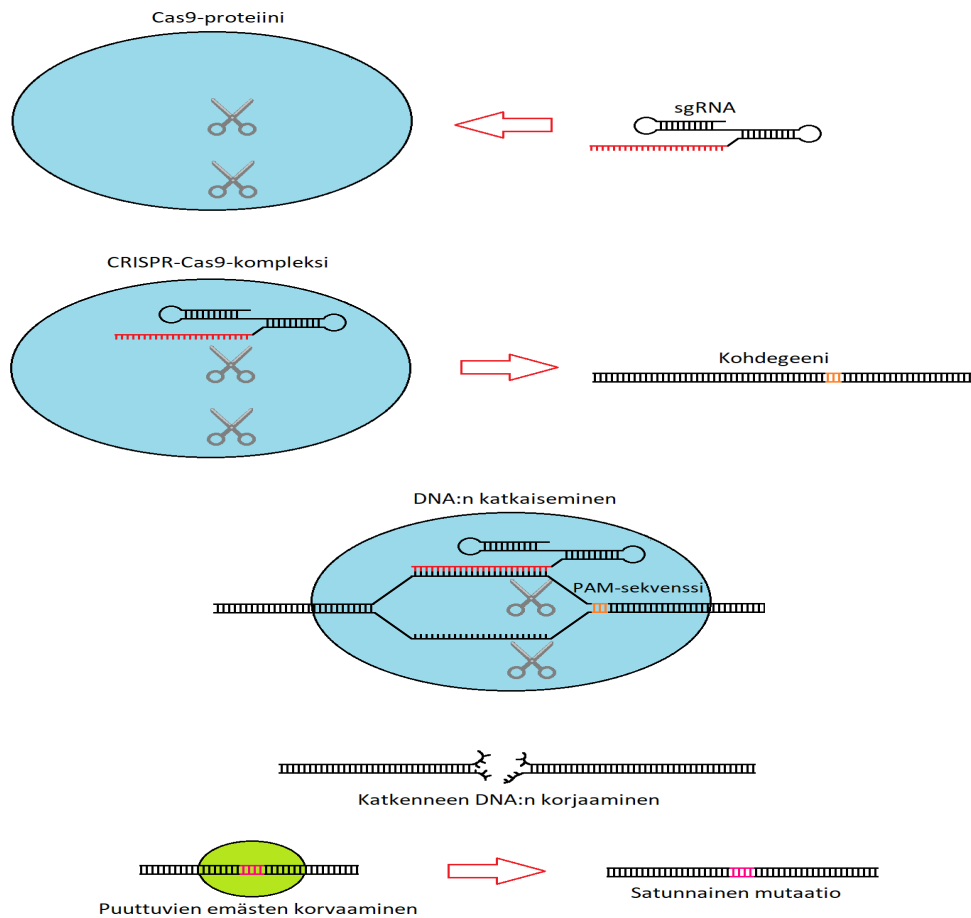
Tavoitteenamme oli kehittää toimiva menetelmä pihamauriaisien geenimuokkaukseen CRISPR-Cas9-menetelmällä ja näin saada aikaan näkyvä muutos muurahaisen ulkonäössä inaktiivomalla silmän väriin vaikuttava *cinnabar*-geeni. Tutkimuksemme pyrimme luomaan pohjaa tuleville tutkimuksille, joiden tarkoitus on selvittää muurahaisten geenien toimintaa niin yksilön kuin koko lajin tasolla. Tietojemme mukaan tutkimuksemme oli viides muurahaisilla

suoritettu CRISPR-Cas9-koe, ja ensimmäinen pihamauriaisella tai yleisesti Suomessa tavattavalla lajilla suoritettu koe (Chiu ym. 2020; Sieber ym. 2020; Triple ym. 2017; Yan ym. 2017).

Menetelmät

Työ toteutettiin hyödyntämällä CRISPR-Cas9-geenisaksia ja mikroinjektointia. CRISPR-Cas on bakteereissa esiintyvä immuunipuolustusmekanismi, joka pystyy havaitsemaan bakteerin sisään tunkeutuneen virusperäisen DNA:n ja katkaisemaan sen, jolloin viruksen lisääntymisen estyy ja bakteeri selviää elossa infektiosta (Ishino ym. 1987). Mekanismi koostuu kahdesta osasta: CRISPR on lyhyt virus-DNA:n osa, jonka bakteeri on tallentanut osaksi omaa genomiään vertailukappaleeksi. Bakteerin genomissa on useita vertailukappaleita eri viruksille järjestettynä tasaisin välein DNA:han, joista bakteeri alkaa tuottaa RNA-kopioita virustartunnan ilmetessä. Cas-proteiini taas toimii geenisaksien saksi-osana. Se ottaa CRISPR-RNA:n malliksi ja skannaa bakteerin sisällä olevaa DNA:ta. Jos DNA vastaa mallia, sen täytyy olla peräisin viruksesta, joten se katkaistaan (Kuva 1).

Tämä mekanismi on valjastettu tehokkaaksi ja tarkaksi geenimuokkausmenetelmäksi. CRISPR-RNA:ta voidaan valmistaa keinotekoisesti vastaamaan minkä tahansa lajin mitä tahansa geeniä, jolloin mikä tahansa osa geenistä voidaan katkaista (Jinek ym. 2012). Cas-proteiinina käytetään yleisimmin *Streptococcus pyogenes* -bakteerin Cas9-proteiinia (Taning ym. 2017).

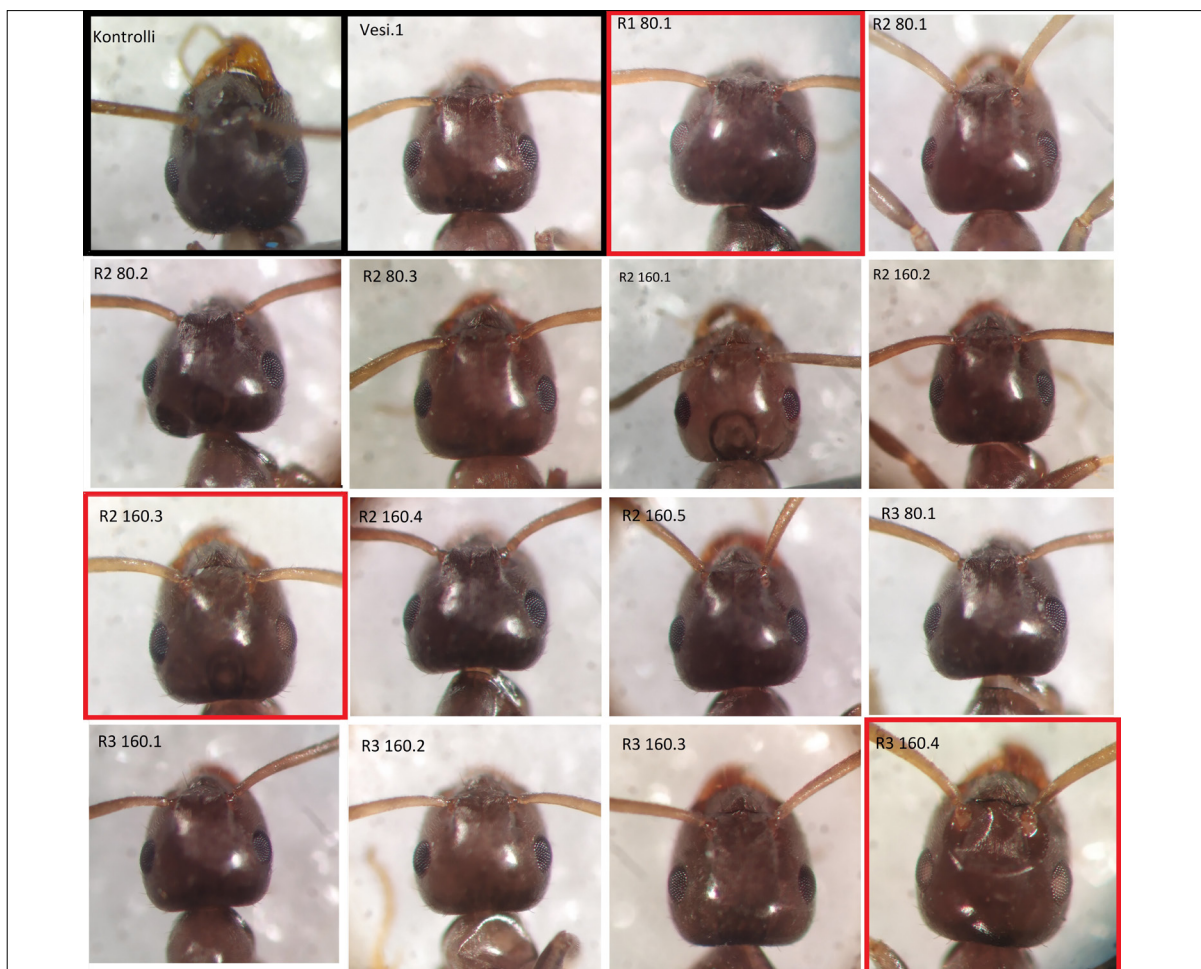


Kuva 1. CRISPR-Cas9:n käyttö geenimuokkauksessa. Keinotekoisesti syntetisoitu sgRNA, joka sisältää kohdegeeniä vastaavan sekvenssin, sitoutuu Cas9-proteiiniin mallijuosteeksi. CRISPR-Cas9-kompleksi tunnistaa kohdejuosteen ja sitoutuu siihen. DNA-juoste katkaistaan, jolloin solun omat korjausmekanismit pyrkivät liittämään katkenneet päät yhteen. Korjauksen aikana syntyy virheitä, jolloin geenin toiminta estyy.

Geeniä muokatessa DNA katkaistaan, jolloin se lähtee purkautumaan. Solun omat korjausmekanismit yrittävät korjata juosteen ja liittää päät yhteen mutta usein korjauksen yhteydessä tapahtuu virheitä, jolloin juosteesta joko puuttuu emäksiä tai siihen liitetään vääriä emäksiä, jolloin geenin toiminta lakkaa. Näin haluttu geeni saadaan hiljennettyä. Jos genomiin halutaan lisätä uusia genejä, pitää geenisaksien yhteydessä viedä soluun myös mallijuoste, joka vastaa molemmista päistään kohdelajin DNA:ta, ja jonka keskellä on haluttu uusi geeni. Näin katkennut DNA korjataan mallijuosteen mukaisesti ja uusi geeni liittyy osaksi solun genomia.

Koetta varten tilattiin kolme erilaista CRISPR-RNA-konstruktia (R1/R2/R3), jotka sekoitettiin Cas9-proteiinin kanssa. Konstruktit

kohdistuvat eri kohtiin pihamauriaisien *cinnabar*-geeniä, jolloin voitiin varmistaa, että ainakin yksi konstrukti saisi aikaan näkyvän muutoksen muurahaisen ulkonäössä. Konstrukteja myös laimennettiin kahteen eri pitoisuuteen (80 ng/μl ja 160 ng/μl), jolloin saatiin yhteensä kuusi erilaista CRISPR-Cas9-käsittelyä. Pihamauriaisien munia kerättiin laboratoriossa siirtämällä kuningatarmuurahainen pienelle petrimaljalle, jonka päälle se laski munia. Munat kerättiin tunnin välein ja niihin injektoidiin CRISPR-Cas9-seosta hyvin ohuella lasineulalla. Munien on oltava injektoinnin aikana mahdollisimman tuoreita, koska muninnan jälkeen muna koostuu yhdestä solusta, joka alkaa pian jakautua. Kun geenimuokkaus saadaan tehtyä ensimmäiseen soluun, muutokset periytyvät kaikkiin jakautuviin



Kuva 2. Aikuisten yksilöiden silmien vertailu. Mustissa ruuduissa on villityypin kontrolliyksilö ja vedellä injektoitu kontrolliyksilö, loput 14 ovat CRISPR-käsiteltyjä koeyksilöitä. Punaisella ruudulla merkityt yksilöt ovat mutanteja, joiden silmät poikkeavat villityypistä.

soluihin. Jos solut ovat ehtineet jakautua ennen injektointia, CRISPR-Cas9-konstruktio ei leviä taasisesti joka soluun, jolloin osa aikuisen yksilön soluista sisältää muokatun geenin ja osa sisältää alkuperäisen geenin.

Munat saivat kehittyä aikuisiksi työläismuurahaisten hoidettavana, minkä jälkeen ne valokuvattiin silmien värin toteamiseksi ja tutkittava geenialue sekvensoitiin mutaatioiden varmistamiseksi.

Tulokset

Koetta varten saatiin kerättyä yhteensä 1624 munaa. Näistä 1228 injektointiin CRISPR-Cas9-konstruktilla, 195 injektointiin vedellä ja 201 jätettiin kokonaan injektointimatta. Vedellä injektointi kontrollikäsitteily tehtiin, jotta voi-

tiin todeta että vain CRISPR-Cas9 aiheuttaa mutaatioita. Injektoimattomalla kontrollilla voitiin todeta itse injektointitapahtuman aiheuttama vahinko munien selviytymiskyvylle.

Kaikkiaan 16 yksilöä kasvoi aikuiseksi ennen kokeen päättymistä. Näistä 15 oli CRISPR-Cas9-käsiteltyjä ja yksi vesi-injektiokontrolliryhmästä. Kolmella CRISPR-Cas9-käsitellyistä yksilöistä oli villityypistä poikkeava silmien väri, mikä osoitti kokeen onnistuneen (Kuva 2). Aikuisten yksilöiden vähäinen määrä suhteessa kerättyjen munien määrään pääteltiin johtuneen liian viileästä kasvatuslämpötilasta. Munien annettiin kehittyä 23 asteen lämpötilassa, koska korkeammassa lämpötilassa kasvatuspesien kuivumisen, ja näin ollen muurahaisen kuoleman, riski oli liian suuri. Viileämpi lämpötila saattoi kuitenkin johtaa munien ja

toukkien kehityksen pysähtymiseen, mikä olisi todennäköisesti voitu estää nostamalla lämpötila 27–30 asteeseen. Kasvatukseen käytettyjen lämpökaappien varausaika ehti kuitenkin loppua, ennen kuin lämpötilan vaikutus kehitysnopeuteen ehdittiin selvittää ja koe täytyi saattaa päätökseen.

Tulokset tarkistettiin vielä sekvensoimalla tutkittavat geenialueet. Aikuisten työläisten lisäksi sekvensoitiin myös toukkia, jotka eivät ehtineet kasvaa aikuisiksi kokeen aikana. Yhteensä 20 CRISPR-Cas9-käsiteltyä yksilöä saatiin sekvensoitua (11 työläistä ja 9 toukkaa). Näistä seitsemällä (3 työläistä ja 4 toukkaa) havaittiin mutaatio CRISPR-Cas9-konstruktin kohdealueella, mikä jälleen kerran osoitti kokeen onnistuneen. Lisäksi 32 kontrolliyksilöä (1 työläinen ja 19 toukkaa vesi-injektoidusta kontrollista ja 1 työläinen ja 11 toukkaa injektoimattomasta kontrollista) sekvensoitiin. Yhdelläkään näistä yksilöistä ei havaittu mutaatioita. Aineistoa testattiin tilastollisesti Fisherin testillä, jonka mukaan CRISPR-käsiteltyjen ja käsittelemättömien yksilöiden indel-mutaatioiden määrä oli erilainen ja ero oli tilastollisesti merkitsevä. (Indel-mutaatioita esiintyy ainoastaan CRISPR käsitellyillä yksilöillä.

Tilastollisia testauksia Fisherin testillä suoritettiin myös eri käsittelyjen vertailemiseksi. CRISPR-Cas9-konstruktin injektoinnin ei todettu lisäävän munien kuolleisuutta verrattuna vesi-injektointiin. Sen sijaan vahvempi CRISPR-Cas9-pitoisuus lisäsi munien kuolleisuutta verrattuna laimeampaan pitoisuuteen. Lisäksi itse injektiotapahtuma (vesi-injektio verrattuna injektoimattomaan) lisäsi munien kuolleisuutta.

Tutkimuksesta kirjoitettiin artikkeli, joka on hyväksytty julkaistavaksi *Insect Molecular Biology* -sarjassa (<https://doi.org/10.1111/imb.12809>).

Kirjallisuus

Chiu YK ym. 2020 Mutagenesis mediated

by CRISPR/Cas9 in the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Insectes Sociaux*, 67(2), 317–326. Saatavissa: <https://doi.org/10.1007/S00040-020-00755-8>

Haatanen M K, Ooik T van & Sorvari J 2015 Effects of overwintering temperature on the survival of the black garden ant (*Lasius niger*). *J Therm Biol* 49–50, 112–118. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2015.02.012>

Ishino Y ym. 1987 Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bact*, 169(12), 5429–5433. Saatavissa: <https://doi.org/10.1128/JB.169.12.5429-5433.1987>

Jinek M ym. 2012 A programmable dualRNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821. 51 Saatavissa: https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1225829/SUPPL_FILE/PAP.PDF

Sieber K ym. 2020 Embryo injections for CRISPR-mediated mutagenesis in the ant *Harpegnathos saltator*. *JoVE J Vis Exp* 61930. Saatavissa: <https://doi.org/10.3791/61930>

Taning C N T ym. 2017 CRISPR/Cas9 in insects: Applications, best practices and biosafety concerns. *J Ins Phys* 245–257. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2017.01.007>

Trible W ym. (2017). orco Mutagenesis Causes Loss of Antennal Lobe Glomeruli and Impaired Social Behavior in Ants. *Cell* 170 727–735. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.001>

Yan H ym. 2017 An engineered orco mutation produces aberrant social behavior and defective neural development in ants. *Cell* 736–747. Saatavissa: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867417307705>

FM Mauno Konu työskentee väitöskirjatutkijana Oulun yliopistossa. Väitöskirjatyössään hän tutkii muurahaisissa esiintyviä RNA-virusia bioinformatiikan keinoin. Työssä kartoitetaan muurahaislajien viruksia sekä vertaillaan, kuinka virusten monimuotoisuus riippuu muurahaislajien elintavoista ja ympäristöstä.