

Aarni Mäkelä

BIODIVERSITEETIN SUOJELU SYNTEETTISEN BIOLOGIAN AVULLA

Kandidaatintyö
Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Tarkastaja: Ville Santala
Tammikuu 2024

TIIVISTELMÄ

Aarni Mäkelä: Biodiversiteetin suojelu synteettisen biologian avulla
Conservation of Biodiversity Through Synthetic Biology
Kandidaatintyö
Tampereen yliopisto
Bioteknologian ja biolääketieteen tekniikan TkK-tutkinto-ohjelma
Tammikuu 2024

Luonnon monimuotoisuus on vähentynyt maailmanlaajuisesti ihmisen toiminnan vaikutuksesta. Tämän takia yhä useampi eliölaji on uhanalainen ja sukupuuttojen määrä on kiihtynyt. Syitä luontokadolle ovat ilmastonmuutos, elinalueiden pirstaloituminen, vieraslajit sekä taudit. Ihmisten mukana vieraslajit ovat levinneet ekosysteemeihin, jossa ne vahingoittavat alueen kotoperäisiä lajeja. Ilmaston lämpeneminen on osaltaan vaikuttanut uhanalaisille eliöille vaarallisten tautien leviämiseen. Synteettisen biologian menetelmät voivat kuitenkin tarjota ratkaisuja näihin ongelmiin.

Synteettinen biologia on kasvava monitieteellinen ala, joka keskittyy suunnittelemaan ja rakentamaan uusia biologisia systeemejä tai muokkaamaan olemassa olevia eliöitä hyödyllisiin tarkoituksiin. Synteettisesti tuotetun DNA:n avulla eliöihin voidaan siirtää ominaisuuksia, jotka saattavat olla peräisin toisesta lajista. Tämän tutkielman tavoitteena on selvittää, kuinka synteettistä biologiaa voidaan hyödyntää luonnonsuojelussa, ja mitä eri menetelmiä voidaan hyödyntää biodiversiteetin suojelemisessa. Tutkielmassa esitellään menetelmien teoreettinen tausta, sekä vertaillaan niitä keskenään. Menetelmien sovelluksia luonnonsuojelussa käydään läpi kirjallisuudesta löydettyjen esimerkkien avulla.

Lupaavimpia synteettisen biologian menetelmiä luonnonsuojelussa ovat CRISPR-Cas9-geenimuokkaus (engl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR associated protein), geeniajurit sekä erilaiset kloonauksen tekniikat. CRISPR-Cas9-pohjaisten menetelmien avulla voidaan tarkasti liittää synteettisesti tuotettu DNA-jakso osaksi elion perimää tai poistaa siitä haluttuja kohtia kohdegeenin hiljentämiseksi. Geenijureissa hyödynnetään CRISPR-tekniikkaa siten, että tietty geneettinen elementti siirtyy tavanomaista yleisemmin sukupolvelta toiselle yleistyen siten populaatiossa nopeasti. Geenijurin avulla eliölle suotuisia ominaisuuksia voidaan lisätä ja haitallisia poistaa. Kloonauksen tekniikoista somaattinen tuman siirto on käytetyin. Tämän menetelmän avulla voidaan lisätä uhanalaisten eläinlajien geneettistä monimuotoisuutta.

Tutkimuksessa esitellään muun muassa kuinka uhanalaisille linnuille haitallisia, malariaa levittäviä hyttysiä voidaan torjua geenijurien avulla. Yksi esimerkki uhanalaisen eläimen somaattisesta tuman siirto -kloonauksesta on vaarantuneen mustajalkahillerin kloonauksen. Lisäksi esitellään, kuinka uhanalaisia kasveja kuten amerikkankastanjaa voidaan muokata agrobakteerien avulla.

Menetelmien laajaan käyttöönottoon liittyy useita bioeettisiä kysymyksiä ja haasteita. Esimerkiksi geenijurien käyttö laajemmassa mittakaavassa on herättänyt vastustusta. Synteettisen biologian menetelmät ovat vielä kehittymässä ja niiden vaikutuksia ekosysteemeihin ei vielä tarkasti tunneta. Uudet tekniikat tarjoavat kuitenkin kiinnostavan vaihtoehdon perinteisten luonnonsuojelukeinojen rinnalle, ja lisätutkimukselle on tarvetta ilmastonmuutoksen ja luontokadon kiihtyessä.

Avainsanat: synteettinen biologia, luontokato, vieraslajit, CRISPR-Cas, geenijuri, yhdistelmä-DNA-tekniikat

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check –ohjelmalla.

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO.....	1
2. LUONTOKATO JA SYNTEETTINEN BIOLOGIA.....	3
2.1 Eliöille haitalliset patogeenit.....	3
2.2 Vieraslajit ja tuholaiset.....	4
2.3 Ihmisen vaikutus biodiversiteettiin.....	5
2.4 Synteettinen biologia.....	6
3. ERILAISET GEENITEKNIIKAN MENETELMÄT.....	8
3.1 CRISPR/Cas-geenimuokkaus.....	8
3.2 TALEN- ja sinkkisorminukleaasit.....	10
3.3 Geeniajurit.....	10
3.4 Kloonaus.....	12
3.5 Geenimuokkaus agrobakteerien avulla.....	12
4. MENETELMIEN SOVELLUKSIA LUONTOKADON TORJUMISESSA.....	14
4.1 CRISPR/Cas9-geenimuokkaus.....	14
4.1.1 Korallien lämmönkestävyyden lisääminen.....	14
4.1.2 Punkkien levittämien tautien torjunta.....	15
4.2 Geeniajurien käyttäminen luonnonsuojelussa.....	17
4.2.1 Haitallisten jyrsijöiden torjuminen.....	17
4.2.2 Malariaa levittävien hyttysten torjunta.....	18
4.3 Lajin pelastaminen kloonauksen avulla.....	19
4.4 Tautien torjuminen agrobakteeri-geenimuokkauksella.....	21
5. POHDINTA.....	23
5.1 Geenitekniikan menetelmien tehokkuus ja vaikutukset.....	23
5.2 Bioeettiset näkökulmat.....	27
5.3 Tulevaisuuden näkymät.....	29
6. YHTEENVETO.....	32
7. LÄHTEET.....	33

LYHENTEET JA MERKINNÄT

ACRRP	Tutkimusprojekti amerikankastanjan suojelemiseksi, eng. American Chestnut Research and Restoration Project
CRISPR	Geenimuokkaustekniikan osa, tasaisesti sijoittuneet ryppäytyneet lyhyet palindromiset toistojaksot, eng. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Cas	Nukleaasi-proteiini, joka kykenee pilkkomaan DNA:ta, eng. CRISPR associated protein
crRNA	CRISPR-RNA
gRNA	Opas-RNA CRISPR-systeemissä, eng. guide RNA
iSCNT	Lajien välinen somaattinen tuman siirto, kloonaustekniikka, eng. interspecific Somatic Cell Nuclear Transfer
mtDNA	mitokondrionaalinen DNA
OspA	Borrelioosia aiheuttavan bakteerin ulkopinnan proteiini A
SCNT	somaattinen tuman siirto -kloonaustekniikka, eng. Somatic Cell Nuclear Transfer
TALEN	Nukleasigeenieditointi-tekniikka, eng. Transcription activator-like effector nuclease
T-DNA	DNA-molekyyli, joka siirretään agrobakteerin avulla kasviin, eng. Transferred DNA
Ti-plasmidi	Agrobakteerien plasmidi, jonka geenit aikaansaavat kasvaimen muodostumisen, eng. Tissue inducing plasmid

1. JOHDANTO

Biodiversiteetti tarkoittaa biologista monimuotoisuutta ja sen vaihtelun suuruutta. Termi käsittää ekosysteemit, populaatiot, lajit sekä lopulta geeniperimän monimuotoisuuden. [1] Biodiversiteettiä voidaan mitata monella eri tavalla, joista kolme yleisintä ovat lajirikkaus, eri lajien populaatiokokojen tasaisuus sekä lajien välinen erilaisuus. Monimuotoisuudeksi voidaan siis laskea tietyn alueen suuri lajimäärä, eri lajien tasainen levittäytyminen alueelle sekä eri lajien toisiinsa nähden kaukaiset taksonomiset sukulaisuussuhteet. [2,3] Luontokatoa eli biodiversiteetin vähentymistä aiheuttavat esimerkiksi taudit, vieraslajit sekä muutokset ekosysteemeissä esimerkiksi lämpötilan nousun tai metsien hakkaamisen takia. Usein syiden taustalla on ihmisen toiminta, jonka takia luontokato on kiihtynyt maailmanlaajuisesti. WWF:n vuoden 2022 "Living Planet Report" -raportissa kerrotaan, että lajipopulaatiot ovat vähentyneet globaalisti keskimäärin 69 % vuoden 1970 jälkeen. Ihmisen maankäyttö ja elinalueiden pirstaloituminen on raportin perusteella tällä hetkellä suurin syy luontokadolle, minkä lisäksi etenevä ilmaston lämpeneminen tuo koko ajan kasvavan uhan luonnon monimuotoisuudelle. [4]

Syitä eliölajien vaarantumiseen ja sukupuuttoihin on useita. Osa uhanalaisista lajeista on vaarantuneita tietyn patogeenin aiheuttaman infektion takia, jotka voivat olla bakteeri, virus- tai sieniperäisiä. [1,5] Patogeenien lisäksi monet uhanalaiset lajit kärsivät haitallisista vieraslajeista, jotka valtaavat kotoperäisten lajien ekologisia lokeroita. Kansainvälisen luontopaneelin syyskuussa 2023 julkaisemassa raportissa kerrotaan vieraslajien olevan yksi merkittävimmistä uhista luonnon monimuotoisuudelle. [6] Ihmisten mukana levinneet jyrsijät, kuten rotat, ovat yksi esimerkki etenkin saari ekosysteemeille haitallisista lajeista. Vieraslajit sekä tuholaiset aiheuttavat haittaa myös monille uhanalaisille kasveille. [7]

Synteettinen biologia ja uudet molekyylibiologian menetelmät voivat tarjota ratkaisuja, joilla voidaan parantaa eliöiden vastustuskykyä sairauksia vastaan sekä auttaa vastaamaan vieraslajien ja ilmaston lämpenemisen aiheuttamiin ongelmiin. Menetelmät voivat kohdistua suoraan kyseessä olevaan uhanalaiseen lajiin tai toimia välillisesti esimerkiksi torjumalla vieraslajeja tai tauteja levittäviä eliöitä kuten hyönteisiä.

Tässä kandidaatintyössä esitellään kirjallisuudesta löydettyjen esimerkkien avulla erilaisia geenitekniikan menetelmiä, joita voidaan käyttää hyväksi luontokadon torjumisessa. Tavoitteena on selvittää, kuinka synteettistä biologiaa voidaan hyödyntää luonnonsuojelussa. Erityisesti keskitytään uhanalaisille lajeille haitallisiin eliöihin, kuten taudinaiheuttajiin ja vieraslajeihin. Tutkimuskysymyksinä ovat: Millaisia uhkia biodiversiteetille on, ja miten ne vaikuttavat uhanalaisiin lajeihin? Mitä erilaisia synteettisen biologian menetelmiä voidaan hyödyntää

biodiversiteetin suojelussa? Millaisia vaikutuksia eri menetelmillä on, ja miten ne eroavat toisistaan? Mikä on geenitekniikan menetelmien rooli luonnonsuojelussa tulevaisuudessa?

Aluksi selvitetään, millaisia erilaisia uhkia biodiversiteetille on. Kappaleessa 2 esitellään erilaisia synteettisen biologian menetelmiä ja niiden toiminnan perustaa. Erityisesti keskitytään menetelmiin, joita on tutkittu luonnonsuojelutarkoituksiin. Kappaleessa 3 käsitellään menetelmien sovelluksia erilaisten uhanalaisten lajien suojelemiseksi. Lopuksi pohditaan geenitekniikan menetelmien vaikutuksia laajemmin ja niiden tulevaisuutta osana luonnonsuojelua. Erityisen huomion kohteena ovat menetelmiin liittyvät bioeettiset kysymykset ja haasteet, joita menetelmien laajempaan käyttöönottoon liittyy.

2. LUONTOKATO JA SYNTEETTINEN BIOLOGIA

Kehittyvän teknologian myötä on mahdollista muokata eliöiden geeniperimää yhä tarkemmin ja tehokkaammin. Tässä luvussa esitellään synteettisen biologian tieteenala ja käydään läpi sen suhdetta luontokatoon. Lisäksi esitellään esimerkkien kautta erilaisia tekijöitä, jotka aiheuttavat luontokatoa eri ekosysteemeissä.

2.1 Eliöille haitalliset patogeenit

Osa uhanalaisista lajeista on vaarassa kuolla sukupuuttoon niitä vaivaavien tautien takia. Taudinaiheuttajat eli patogeenit voivat olla muun muassa bakteereja, viruksia, sieniä tai alkueliöitä.

Yksi esimerkki sieniperäisestä taudista, jolla on vakavia seurauksia uhanalaisille eläimille, on *Batrachochytrium dendrobatidis* -sienen aiheuttama infektio. Chytridiomycosis-nimellä tunnettu tauti vaikuttaa yli 500 sammakkoeläinlajiin maailmassa ja sen oletetaan aiheuttaneen 90 lajin sukupuuton. Tauti vaikuttaa eläinten ihon uloimpaan kerrokseen, jonne leviävät itiöt vaikuttavat sammakkoeläinten hengittämiseen, kosteutukseen sekä lämpötila- ja suolatasapainon säätelyyn. Jossain populaatioissa Chytridiomycosis voi aiheuttaa jopa 100 % kuolleisuuden. Tauti on levinnyt nopeasti globaalisti ihmisen kauppareittien mukana. Yksi esimerkki Chytridiomycosiksen vaivaamasta lajista on Australiassa elävä Corroboreenkonna, joita on luonnossa arvioitu olevan vain alle 50 yksilöä. [8–10]

Sieniperäiset taudit uhkaavat myös kasveja. Yksi esimerkki uhanalaiseen kasviin vaikuttavasta taudista on amerikankastanjaan (*Castanea dentata*) kohdistuva homesieni. Vierasperäinen sienipatogeeni *Cryphonectria parasitica* levisi Aasiasta Pohjois-Amerikkaan 1800-luvun lopussa, ja siitä lähtien se on tuhonnut noin 90 % mantereen amerikankastanjapopulaatiosta. Aasialaiset kastanjalajit kuten japaninkastanja sekä kiinankastanja ovat kehittyneet yhdessä *C. parasitican* kanssa ja kehittäneet vaihtelevan resistanssin tautia vastaan. Nopeasti kasvava ja pitkäikäinen amerikankastanja on Pohjois-Amerikassa tärkeä avainlaji metsäekosysteemeissä, sillä se tarjoaa ravintoa ja suojaa monille muille eliöille. [11]

Toinen sienitaudista kärsivä uhanalainen puulaji on amerikanjalava (*Ulmus americana* L.). *Ophiostoma novo-ulmi* -sienen aiheuttama hollanninjalavatauti (engl. Dutch-elm disease, DED) tavattiin ensin Euroopassa 1900-luvun alussa, ja tauti levisi Pohjois-Amerikkaan 1930-luvulla. Kaarnakuoriaisten mukana leviävä tauti on aiheuttanut kummallakin mantereella kaksi tuhoisaa epidemiaa, jonka seurauksena aiemmin erityisesti kaupunkipuuna tunnettu amerikanjalava on vähentynyt huomattavasti. [12]

Osa ihmisille vaarallisista patogeeneistä aiheuttaa haittaa myös uhanalaisille eläimille. Mustajalkahilleri (*Mustela nigripes*) on yksi Pohjois-Amerikan uhanalaisimmasta nisäkkäistä. Lajin oletettiin kuolleen sukupuuttoon jo 1970-luvulla, mutta pieni populaatio niitä löydettiin kuitenkin vuonna 1981. Tällä hetkellä noin 250–350 mustajalkahilleriä elää vankeudessa ja noin 300 yksilöä on palautettu luontoon. Kaikki nykyisin elossa olevat yksilöt ovat kuitenkin seitsemän aiemmin luonnosta pelastetun yksilön jälkeläisiä, joten lajin sisällä geneettinen kuormitus on suuri. Yksi suurimmista syistä mustajalkahillerin uhanalaisuudelle on rutto, joka tarttuu tehokkaasti niiden ensisijaiseen saaliseläimeen preeriakoiraan. Kyseessä on sama bakteeri, joka voi aiheuttaa ruttotautia ihmisissäkin, ja joka on alun perin kulkeutunut Pohjois-Amerikkaan Euroopasta. [5]

Plasmodium-suvun alkueläin aiheuttaa malariatautia. Vertaimevät hyttysset toimivat väli-isäntinä alkueläimille ja levittävät sitä. Malarialoinen kulkeutuu isäntäelion maksaan ja siitä edelleen veren punasoluihin, josta se leviää eteenpäin hyttysten mukana. [13] Malariasta on haittaa myös uhanalaisille lajeille, sillä useat saariekosysteemien vaarantuneet lintupopulaatiot kärsivät siitä. Historiallisella ajalla yli 90 saariekosysteemin lintulajia on kuollut sukupuuttoon ja erityisen vakavaa endeemisten lintulajien häviäminen on ollut Havaijin saarilla[1]. Lintuihin vaikuttavaa malariaa levittävät *Culex quinquefasciatus* -lajin hyttysset ovat vieraslajeja Havaijilla, sillä ne kulkeutuivat saarille vasta ihmisten mukana 1800-luvulla. Hyttysten leviämistä on yritetty ehkäistä esimerkiksi hävittämällä niiden toukkia, mikä on kuitenkin osoittautunut vaikeaksi suuressa mittakaavassa. Ilmastonmuutoksen edetessä malariaa levittävät hyttysset levittäytyvät yhä laajemmalle, mikä saattaa lisätä lintusukupuuuttojen määrää tulevaisuudessa. [14]

Punkit levittävät useita eläimille ja ihmisille haitallisia tauteja kuten borreliosia eli Lymen tautia ja puutiaisaivokuumetta. Punkit leviävät esimerkiksi peurojen mukana, ja taudit leviävät uusiin punkkisukupolviin väli-isäntien kuten hiirien kautta. Sairastuneet hiiret infektoivat uusia punkkisukupolvia ja toisaalta taudit leviävät sairastuneista punkeista hiiriin tai ihmisiin. Ekologiset muutokset kuten metsien ja petojen määrän väheneminen on johtanut peurojen ja hiirten määrän kasvuun, mikä on edelleen lisännyt punkkien ja niiden levittämien tautien määrää. Punkkien levittämät taudit ovat esimerkki ekosysteemimuutoksesta, josta on haittaa myös ihmisille. [15]

2.2 Vieraslajit ja tuholaiset

Monet edellä mainituista taudeista ovat levinneet kotoperäisten lajien joukkoon vieraslajien mukana. Vieraslajit ovat ihmistoiminnan mukana, tarkoituksella tai vahingossa, uusille alueille levinneitä lajeja. Vieraslajit voivat levitä uusille alueille esimerkiksi kauppakuljetuksien mukana. Joskus vieraslajit vakiintuvat ja menestyvät uudella alueella siten, että niistä aiheutuu negatiivisia vaikutuksia alueen biodiversiteetille, ekosysteemeihin ja lajeihin. Tällöin niistä kutsutaan haitallisiksi vieraslajeiksi. Haitallisista vieraslajeista voi olla haittaa myös ihmisille, sillä ne voivat vaikuttaa negatiivisesti esimerkiksi ruuantuotantoon tai vallata kasvullaan esimerkiksi rantoja ja vesistöjä. [6]

Kansainvälinen luontopaneeli IPBES (engl. Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services) julkaisi vuoden 2023 syyskuussa raportin, joka koski vieraslajien globaaleja vaikutuksia. Raportin mukaan ihmisen toiminnan seurauksena yli 37 000 vieraslajia on levinnyt maailman eri osiin. Näistä lajeista yli 3500 on nimetty haitallisiksi vieraslajeiksi. Vieraslajeista voi olla peruuttamatonta haittaa luonnolle, sillä ne voivat johtaa paikallisiin ja globaaleihin sukupuuttoihin. IPBES:n raportin perusteella vieraslajit ovat olleet merkittävä tekijä 60 %:ssa raportoituja eläin- ja kasvisukupuuttoja, ja ainakin 218 eri vieraslajia on vaikuttanut yli 1200 populaation sukupuuttoon. Haitallisista vieraslajeista aiheutuu myös globaalisti merkittävää taloudellista haittaa; vuonna 2019 niiden aiheuttamien vuosittaisten kustannuksien arvioitiin olevan 423 miljardia dollaria. [6]

Vieraslajit aiheuttavat merkittävää uhkaa usein pienille eristäytyneille populaatioille. Tällaisia ovat esimerkiksi kaukana mantereesta sijaitsevat saaret, joille on kehittynyt niille ainutlaatuinen lajisto. Saaret ovat maapallon tärkeitä monimuotoisuuskeskuksia, sillä vaikka ne muodostavat vain noin 5 % maapallon maapinta-alasta, 20 % maailman lajeista elää niillä. Monet saarten lajeista ovat vaarantuneita, ja 37 % kriittisesti uhanalaisista lajeista elää saarilla. Erityisesti vierasperäiset jyrsivät ovat aiheuttaneet negatiivisia vaikutuksia saariekosysteemeille. Ekosysteemeille haitallisia jysijälajeja ovat esimerkiksi kotihiiri sekä rotat. Jyrsijät ovat aiheuttaneet haittaa erityisesti uhanalaisille lintulajeille ja erityisesti merilinnuille. Merilintulajien sukupuutot ovat aiheuttaneet myös epäsuoria vaikutuksia, sillä merilinnut edesauttavat ravinteiden leviämistä mereltä maalle, mistä useat kasvilajit hyötyvät. Jyrsijöiden hävittämien onkin osoittautunut tehokkaaksi suojelukeinoksi. Yleinen keino vierasperäisten jysijöiden hävittämiseksi saarilta on ollut jysijämyrkköjen käyttäminen. Yleisesti käytössä ovat olleet antikoagulantit, joita on levitetty saarille ilmaitse. Antikoagulanttien käyttämiseen liittyy kuitenkin riski siitä, että kohdelajit tulevat niille vastustuskykyisiksi tai, että ne vaikuttavat lajeihin, joihin se ei ole tarkoituksenmukaista. Jysijämyrkköjen käyttämiseen liittyy myös huoli mahdollisista terveysvaikutuksista ihmisiin. [7,16]

2.3 Ihmisen vaikutus biodiversiteettiin

Kuten edellä mainituista esimerkeistä käy ilmi, ihmisen toiminta vaikuttaa laajasta luontokatoon. Monet vieraslajit ja taudit leviävät uusille alueille ihmisten mukana. Ihmisen toiminnan seurauksena ilmastomuutos on kiihtynyt ja eliöiden elinalueet ovat muuttuneet.

Esimerkiksi osa ihmisen teollisuudessa tarvitsevista yhdisteistä on eläinperäisiä. Tämä aiheuttaa eläinkauppaa ja erilaisia ongelmia siihen liittyen. Esimerkiksi lääketeollisuus on käyttänyt hyväkseen eläinperäisiä yhdisteitä, mikä on voinut aiheuttaa ekologisia ongelmia ja johtaa eliölajien vaarantumiseen. Yksi esimerkki tästä on lääketeollisuuden tarvitsema testausmenetelmä, jolla voidaan havaita endotoksiineja. Tavanomainen keino menetelmän valmistukseen on käyttää hyväksi vaarantuneiden molukkirapujen verta, mikä johtaa arviolta 130 000 molukkiravun kuolemaan vuosittain lääketeollisuuden takia, vaikka toimiva synteettinen vaihtoehto endotoksiinien havaitsemiseen on kehitetty. [17]

Yksi esimerkki ilmastonmuutoksen aiheuttamasta suorasta uhasta biodiversiteetille on korallien vaaleneminen. Koralliriutat ovat merenalaisia biodiversiteettikeskuksia, jotka tarjoavat elinympäristön valtavalle määrälle merieliöitä. Meriveden lämmitessä korallien kanssa symbioosissa elävät levät poistuvat, mikä johtaa korallien vaalenemiseen ja lopulta niiden kuolemaan. Esimerkiksi vuosien 2016 ja 2017 lämpimien kesien aikana noin 50 % Ison valliriutan koralleista koki massakuoleman. [18] Koralliriuttojen kunnossapito, suojelualueet, luontoon palauttaminen sekä kasvihuonepäästöjen vähentäminen ovat kriittisiä korallien selviämiseksi. Jos ilmaston lämpenemistä ei saada estettyä tarpeeksi nopeasti yhä laajempi osuus maapallon koralliriutoista on vaarassa hävitä. Meriveden lämpenemisen lisäksi ilmastonmuutos aiheuttaa koralleilla negatiivisia ilmiöitä kuten meriveden suolapitoisuuden laskua, ravinteiden ja saasteiden määrän lisääntymistä, tautien yleistymistä sekä myrskyjen ja syklonien aiheuttamien tuhojen lisääntymistä. [19]

2.4 Synteettinen biologia

Synteettinen biologia on kasvava monitieteellinen ala, joka keskittyy suunnittelemaan ja rakentamaan uusia biologisia systeemejä tai muokkaamaan olemassa olevia eliöitä hyödyllisiin tarkoituksiin. Ala yhdistää insinööritieteet biologiaan, ja sen tarkoituksena on kehittää biologisia systeemejä, joita ei löydy sellaisenaan luonnosta. [20] Synteettisen biologian avulla voidaan vastata erilaisiin ongelmiin esimerkiksi muokkaamalla jo olemassa olevia biologisia systeemejä paremmiksi synteettisen DNA:n avulla tai yhdistämällä eri eliöistä löytyviä ominaisuuksia halutun lopputuloksen aikaansaamiseksi. DNA:ta voidaan tuottaa kemiallisella synteetillä, joten tietyn nukleinihapposekvenssin tuottaminen onnistuu laboratorioissa ilman, että se täytyisi eristää elävästä solusta.

Synteettinen biologia voi tarjota myös ratkaisuja luonnonsuojeluun, koska uhanalaisen eläinlajin menestys tulevaisuudessa voi olla kirjoitettu niiden perimään. Pienessä populaatiossa selviytymisen kannalta vahingolliset perinnölliset ominaisuudet voivat lisääntyä ja esimerkiksi tietyt sairauksille altistavat geenit saattavat yleistyä. Mitä pienemmäksi populaation koko pääsee, sitä todennäköisemmiksi haitalliset geenimuodot eli alleelit tulevat. Tähän viittaa termi geneettinen kuormitus (eng. genetic load)[21]. Isossa populaatiossa eri alleelien kirjo on rikkaampi, ja eliöiden selviämisen ja evoluution kannalta hyödyllisten alleelien esiintyvyys populaatiossa kasvaa.

Biodiversiteettiä voidaan suojella synteettisten biologian avulla monella tasolla; estämällä uhanalaisten eläinten sukupuuttoja suojellaan lajirikkautta, ja kasvattamalla vaarantuneiden eläinten populaatiokokoja voidaan ylläpitää erilaisten eliömuotojen tasaista jakautumista ekosysteemeissä. Uhanalaisten eliöiden suojelu geenitekniikan menetelmien avulla, ekologian muokkaus (eng. ecological engineering) ja eliöiden avustettu evoluutio voivat olla tulevaisuuden työkaluja biodiversiteetin turvaamiseksi. Vaarantuneita populaatioita voidaan yrittää pelastaa käyttämällä apuna geneettisesti samankaltaisen populaation eliöitä. [22] Tästä käytetään

nimitystä geneettinen pelastus (eng. genetic rescue). [21] Syyt eliöiden uhanalaisuuteen ovat vaihtelevia, samoin kuin synteettisen biologian menetelmät, joilla niitä vastaan voidaan taistella.

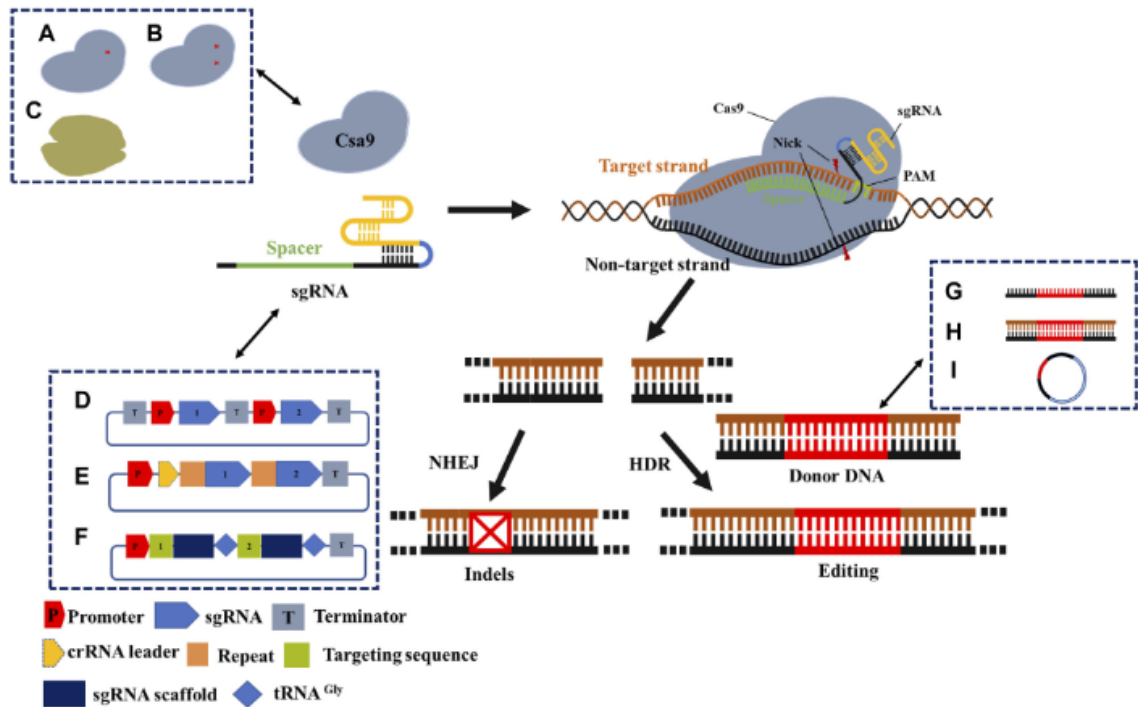
3. ERILAISET GEENITEKNIIKAN MENETELMÄT

Synteettisessä biologiassa hyödynnetään aktiivisesti erilaisia geenitekniikan menetelmiä. Seuraavissa kappaleissa käydään läpi lupaavimpia tekniikoita, joita voidaan hyödyntää biodiversiteetin suojelussa. Menetelmien avulla voidaan aikaansaada hyödyllisiä ominaisuuksia, jotka auttavat uhanalaisia ja vaarantuneita lajeja. Toisaalta osa menetelmistä tarjoaa ratkaisuja haitallisten eliöiden torjumiseen. Tekniikoiden sovelluksia luonnonsuojelussa käsitellään esimerkkien avulla luvussa 4.

3.1 CRISPR/Cas-geenimuokkaus

CRISPR/Cas (engl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR associated protein) on prokaryooteista löytyvä immunologinen systeemi, jota käytetään vierailta, usein virus- tai bakteeriperäisiltä, nukleiinihapoilta suojautumiseen. CRISPR-mekanismissa osa soluun tunkeutuneesta vieraasta perimästä talletetaan osaksi isäntäorganismien genomia. Nämä esimerkiksi virusperäiset sekvenssit vuorottelevat toistuvien CRISPR-sekvenssien välissä. Kun prokaryootti tunnistaa aiemmin kohdatun nukleiinihapon talletetun sekvenssin avulla, CRISPR-sekvenssit transkriptoidaan RNA:ksi. Tämä esiaste CRISPR-RNA (pre-crRNA) pilkotaan siten, että muodostuu yksittäisiä virusperäisiä sekvenssejä sisältäviä opas-RNA:ita (gRNA, eng. guide RNA). gRNA muodostaa kompleksin yhden tai useamman Cas-proteiinin kanssa. Cas-proteiinit ovat nukleaaseja, jotka kykenevät pilkkomaan DNA:ta. Jossain tapauksissa Cas-proteiinin kanssa on kompleksissa myös toinen RNA-molekyyli, tracrRNA (eng. trans-activating CRISPR RNA). gRNA toimii oppaana Cas-nukleaasille ja niiden muodostama kompleksi sitoutuu komplementaarisen nukleiinihapposekvenssin avulla osaksi viruksen perimää ja pilkkoo sen toimimattomaksi estäen infektion. [23–25] CRISPR-mekanismien toimintaa on esitetty kuvassa 1.

CRISPR/Cas-systeemejä tunnetaan useita erilaisia, ja niitä voidaan luokitella erilaisten Cas-nukleaasien perusteella. Osassa CRISPR systeemejä on useasta Cas-alayksiköstä koostuva kokonaisuus, kun taas joissakin nukleaaseja on vain yksi. Laajimmin biotekniikan käytössä oleva CRISPR/Cas-systeemi on Cas9-proteiinin sisältävä kokonaisuus. Tämä systeemi on alun perin löydetty *Streptococcus pyogenes* -bakteerista. Cas9 on tässä CRISPR-systeemissä ainoa nukleaasi. [25]



Kuva 1. CRISPR-Cas9-geenieditoinnin mekanismi ja optimointistrategiat. Kuvassa A, B ja C ovat erilaisia Cas-proteiineja kuten inaktivoitu tai aktiivinen Cas9. sgRNA voidaan tuottaa eri tavoin, kuten käyttämällä yhtä tai useampaa promoottoria yhtä sgRNA-geeniä kohden (kuvassa D-F). sgRNA:n ja Cas-proteiinin kompleksi tunnistaa kohdegeenin Pam-alueen avulla (eng. Protospacer adjacent motif), ja Cas saa aikaan kahden juosteen katkoksen DNA:ssa. Jos mallijuostetta ei ole saatavilla, solu korjaa katkoksen NHEJ-metodilla, mikä johtaa mutaatioihin. Jos soluun on lisätty malli-DNA:ta (kuvassa Donor DNA), sitä voidaan käyttää mallina homologisessa rekombinaatiossa (HDR), jolloin katkoksen tilalle voidaan liittää haluttu DNA-sekvenssi. Malli-DNA voi olla yksi- tai kaksijuosteista tai plasmidina. [24]

CRISPR/Cas-menetelmää voidaan hyödyntää geenimuokkauksessa, sillä sen avulla voidaan tunnistaa tietty kohta DNA:sta ja leikata se pois. Kun tunnetaan tietyn kohdegeenin sekvenssi, voidaan sille komplementaarisen Cas-nukleaasiin kytketyn gRNA:n avulla leikata se pois. Kohdegeenille komplementaariset sekvenssit voidaan tuottaa synteettisesti. [24] Biotekniikassa käytössä olevassa CRISPR/Cas9-systeemissä on Cas9-nukleaasin kanssa kompleksissa vain yksi opas-RNA (sgRNA, eng. single guide RNA), joka koostuu gRNA:sta ja tracrRNA:sta. sgRNA toimii sekä kohdesekvenssin tunnistamisessa että nukleaasin aktivoimisessa. Cas9 sisältää kaksi nukleaasidomeenia, ja se saa aikaan DNA:ssa kummankin juosteen katkeamisen. Prokaryooteilla katkoksen korjaamiseen on käytössä ainoastaan homologinen korjaus (eng. Homology directed repair, HDR). Eukaryooteilla juosteiden korjaamiseen voidaan käyttää myös ei-homologista päiden yhteenliittämistä (eng. non-homologous end joining, NHEJ). Mikäli kummatkin Cas9:n nukleaasidomeeneista ovat aktiivisia, kahden juosteen katkos korjataan NHEJ-menetelmällä, mikä voi johtaa mutaatioihin kohdegeenissä. Näin voidaan esimerkiksi hiljentää geeni (eng. knock-out). Inaktivoimalla toinen domeeni voidaan saada aikaan vain yhden juosteen katkeaminen. Tällöin voidaan HDR-mekanismin avulla lisätä soluun tuotu synteettinen DNA-fragmentti osaksi kohdegeeniä, jolloin on mahdollista tuoda esiin kokonaan uusia ominaisuuksia.

3.2 TALEN- ja sinkkisorminukleaasit

CRISPR/Cas9-systeemin tapaan transkriptioaktivaattorin kaltaiset tehostajanukleaasit (eng. transcription activator-like effector nuclease, TALEN) ja sinkkisorminukleaasit ovat tietyn DNA-sekvenssin tunnistamiseen ja leikkaamiseen käytettäviä geenieditointisysteemejä.

Sinkkisorminukleaasit sisältävät sinkkisormi-rakenteen, joka on yksi yleisimmistä DNA:han kiinnittyvistä proteiinirakennesista. Sinkkisormi-rakenteita esiintyy luontaisesti useita erilaisia, ja näistä jokainen kykenee tunnistamaan noin kolmen emäsparin pituisen DNA-sekvenssin. Geenieditointisovelluksissa useampi sinkkisormi-rakenne on liitetty yhteen FokI-restriktioentsyymin kanssa, joka saa aikaan kahden juosteen katkoksen DNA:han, kun suunnitellut sinkkisormi-rakenteet löytävät kohdesekvenssin ja sitoutuvat siihen. Sinkkisorminukleaasit ovat tehokas työkalu esimerkiksi viljeltyjen ihmissolujen muokkaamiseen, mutta niiden haittapuolia ovat esimerkiksi huono saatavuus tiettyihin kohdesekvensseihin sekä erilaisten sinkkisorminukleaasien patentoimisesta johtuvat rajoitukset. [26]

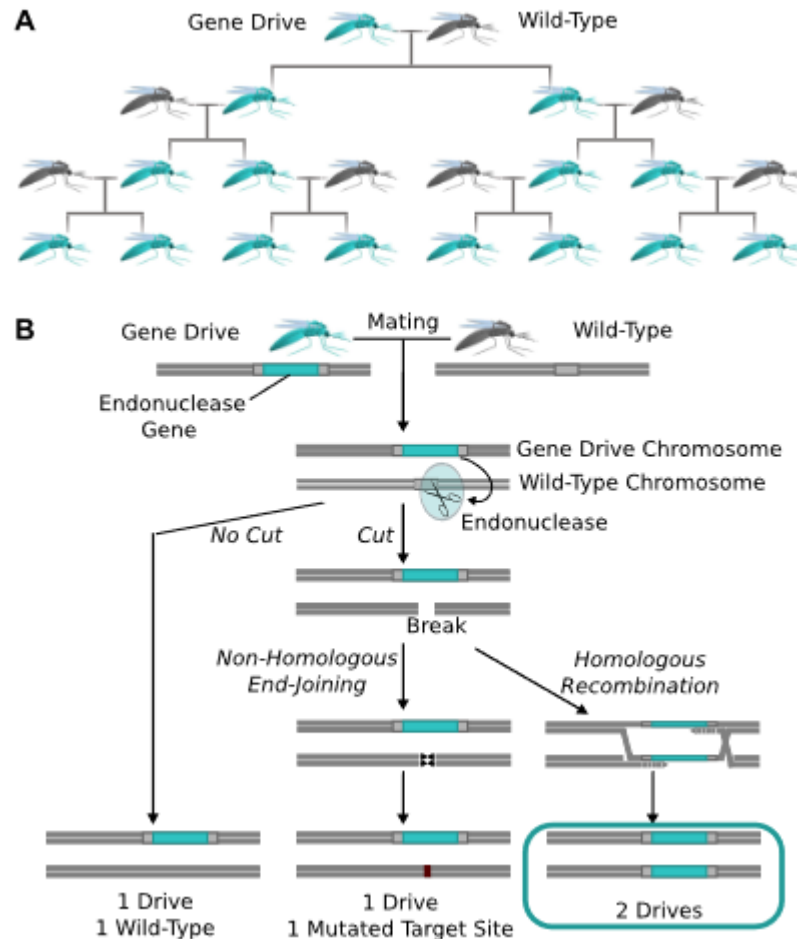
Alun perin kasvibakteereista löydetty DNA:han kiinnittyvä proteiinirakennesosa, TALE (eng. transcription activator-like effector), koostuu useista vaihtelevan toistojakson rakenteista. Jokainen yksittäinen rakenne kykenee tunnistamaan yhden emäsparin DNA:sta. DNA:han kiinnittyvä TALE voidaan muokata halutun kohdesekvenssin mukaiseksi, ja siihen voidaan liittää FokI-nukleaasi. Muokattua kokonaisuutta kutsutaan TALEN-systeemiksi, ja se mahdollistaa joustavamman kohdesekvenssien suunnittelun verrattuna sinkkisormi-nukleaaseihin. [26]

TALEN- ja sinkkisorminukleaasien käyttö geenimuokkauksessa on vähentynyt huomattavasti CRISPR/Cas-mekanismien yleistyessä. CRISPR-mekanismi on laajemmin ja helpommin muokattavissa erilaisiin käyttökohteisiin, ja sen käyttäminen on tarkempaa ja edullisempaa verrattuna muihin nukleaasi-geeniedointimekanismeihin. [26]

3.3 Geenijurit

Geenijuritekniikassa tietty DNA-sekvenssi leviää luonnonvaraisessa populaatiossa siten, että eliöille epätoivottuja ominaisuuksia voidaan poistaa tai suotuisia lisätä. Tällaisten itsenäisten geneettisten elementtien periytyminen seuraavalle sukupolvelle on tavanomaista todennäköisempää. Geenijurit ovat periytyvää geenieditointia. Yleensä tietystä geenistä peritään yksi kopio kummaltakin vanhemmalta, jolloin tietyn alleelin periytyminen todennäköisyys on 50:50. Geenijureissa tietty geneettinen elementti kopioituu kumpaankin sukusoluun, jolloin sen periytyminen eteenpäin yleistyy. Tällaisen super-Mendeliaanisen periytyminen myötä tietty geneettinen ominaisuus yleistyy populaatiossa nopeasti. Geenijurielementtien periytyminen todennäköisyys seuraavalle sukupolvelle voi olla jopa yli 90 %. [27,28] Geenijurin periytymistä ja toimintatapaa on esitetty kuvassa 2.

Ajurit voivat olla autosomaalisia tai linkittyneitä sukupuolikromosomeihin. Erilaisia geeniajureita ilmenee luontaisesti niin eläimissä, kasveissa kuin sienissäkin, ja ne vaikuttavat osaltaan evoluutioon. Ajurista ei kuitenkaan ole aina suoranaista hyötyä niiden isäntäeläimille.[28] Meioottiset geeniajurit häiritsevät tavanomaista meiosisia tai sulusolujen tuotantoa siten, että geeniajurin sisältämä alleeli yleistyy. Alleelin kopioituminen voi tapahtua hedelmöittymisen yhteydessä tai tapahtua ituradan soluissa ennen sitä. [29]



Kuva 2. Endonukleaasi-geeniajurin leviäminen ja toimintamekanismi. **(A)** Organismi, joka kantaa endonukleaasi-geeniajuria (sininen) parittelee luontaiseen kantaan kuuluvan yksilön kanssa. Ajuri periytyy eteenpäin jopa yli 90 % todennäköisyydellä ja leviää jo muutamassa sukupolvessa tehokkaasti koko populaatioon. **(B)** Geenijurin endonukleaasi katkaisee luonnonvaraisen vastinkromosomiin kummatkin juosteet. Kun solu korjaa katkoksen homologisella rekombinaatiolla, sen täytyy käyttää geenijuri-kromosomia mallina, jolloin ajuri kopioituu luonnolliseen kromosomiin. Jos katkoksen tekeminen epäonnistuu tai solu korjaa katkoksen NHEJ-menetelmällä, ajuri ei kopioitu. Ajurin täytyy siis tehdä katkos luotettavasti silloin kun homologinen rekombinaatio on mahdollista. [30]

CRISPR-tekniikkaa voidaan hyödyntää keinotekoisien geeniajuri-systeemien luomiseen. Leikkaamalla pois sulusolulinjassa esiintyvä geenin normaali alleeli, se korvautuu homologisen korjauksen kautta keinotekoisesti tuotetulla geneettisellä elementillä. [31] Geenijurikasettiin tarvitaan kolme elementtiä: Cas9-proteiinia koodaava geeni, gRNA:ta koodaava geeni sekä sivusekvenssit, jotka auttavat ajurikasettia kiinnittymään sen kohdepaikkaan kromosomissa. Kun geenijurikasetin geneejiä ilmennetään, gRNA:t ohjaavat Cas9-nukleaasin oikeaan kohtaan

muokkaamatonta vastinkromosomia, jonne Cas9 tekee katkoksen. Jos katkos onnistuu halutulla tavalla, se korjataan homologisilla rekombinaatiolla käyttämällä mallina geeniajurikromosomia. Näin geeniajuri kopioituu siten, että kummatkin kromosomiparit sisältävät sen, eli eliö on kyseisen geenin suhteen homotsygootti. Ajuria voidaan käyttää muuttamaan esimerkiksi solun metaboliareittejä tai hiljentämään tietty geeni kokonaan. [32] Geeniajurien käyttöä biodiversiteetin suojelussa on tutkittu eri lajeilla ja tekniikan sovelluksia on esitelty luvussa 4.

3.4 Kloonauus

Yksi uhanalaisten eläinten geneettiseen pelastukseen hyödynnettävä tekniikka on kloonauus. Kloonauksen avulla voidaan tuottaa geneettisesti samanlaisia yksilöitä. Yksi eniten käytetyistä kloonaustekniikoista on somaattinen tuman siirto -tekniikka (eng. somatic cell nuclear transfer, SCNT). Tässä tekniikassa somaattisen solun tuma siirretään munasoluun, josta on poistettu tuma. Käyttämällä hyväksi sähkövirtaa munasolu ja tuma saadaan sulautumaan yhteen, jonka jälkeen solu jakautuu. Näin tuotettu alkio voidaan siirtää sijaisäitiin, joka myöhemmin voi synnyttää kloonatun eliön. Syntynyt eliö on geneettisesti identtinen tumanluovuttaneen eliön kanssa. Ensimmäinen esimerkki kloonauksen avulla tuotetusta eläimestä oli vuonna 1995 syntynyt Dolly-niminen lammas. Sitten useita eläimiä, kuten lemmikkejä ja tuotantoeläimiä, on kloonattu. Esimerkiksi lääketiede on käyttänyt kloonattuja frettejä tarttuvien tautien tutkimuksessa. [21,33]

Usein SCNT-tekniikassa käytetään sidekudoksen soluja kuten fibroblasteja, joiden kerääminen kohde-eläimestä on helppoa. Fibroblastien säilöminen pakastamalla sekä niiden uudelleen sulattaminen on mahdollista. Yli sadan eläinlajin soluja on säilötty pakastamalla niitä eri puolilla maailmaa.[21] Yksi esimerkki tällaisesta biopankista on Yhdysvalloissa San Diegon eläintarhassa sijaitseva San Diego Frozen Zoo. Osa tuolla säilytyistä soluista kuuluu uhanalaisille tai jo sukupuuttoon kuolleille lajeille. [33]

SCNT-tekniikkaa on mahdollista toteuttaa myös eri lajien välillä (eng. interspecific SCNT, iSCNT). Tässä tekniikassa luovutettava tuma ja munasolu ovat peräisin eri lajeista. Biolääketieteellisessä tutkimuksessa iSCNT on osoittautunut hyödylliseksi solusignaaloinnin sekä alkion tutkimuksessa. [34]

3.5 Geenimuokkaus agrobakteerien avulla

Agrobakteerit ovat maaperässä elävä gramnegatiivisten bakteerien suku. *Agrobacterium tumefaciens* on suvun bakteereista tutkituin. Agrobakteerit kykenevät horisontaalisen geeninsiirron avulla siirtämään omaa DNA:taan osaksi kasvien genomia. Geeninsiirto perustuu bakteerien sisältämään Ti-plasmidiin (tumor inducing plasmid) tai Ri-plasmidiin (eng. root inducing). Pieni osa plasmidia, T-DNA (eng. transferred DNA), siirretään bakteerisolusta kasvisoluun konjuktin avulla. T-DNA integroituu osaksi kasvin genomia, jolloin sen sisältämiä geenejä voidaan ilmentää. Osa T-DNA:n geneeistä saa aikaan kasvi-hormonien synteesin, joka

johtaa solujen nopeaan jakaantumiseen ja kasvaimen muodostumiseen. Ri-plasmidin sisältävät bakteerit kuten esimerkiksi *Agrobacterium rhizogenes* voivat johtaa myös epätavalliseen juurien muodostamiseen. Osa T-DNA:n geeneistä koodaa epätavallisten aminohappojen, opiinien, tuotantoa, joita bakteeri voi hyödyntää hiilen ja typen lähteinään. [35]

A. tumefaciens -bakteeria käytetään laajasti hyväksi biotekniikassa kasvien muokkaamisessa. T-DNA voidaan siirtää plasmidiin, joka on helposti muokattavissa, ja T-DNA:han voidaan muokata geeni, joka halutaan siirtää kasvisoluun. T-DNA:sta voidaan myös poistaa geenit, jotka normaalisti aikaansaavat kasvaimen muodostumisen ja opiinisynteesin. Tutkimuksissa käytettävä T-DNA-plasmidi sisältää usein myös antibioottiresistanssia koodaavia geenejä, mikä mahdollistaa onnistuneiden transformaatioiden havaitsemisen ja erottelun. Usein käytetään kahden vektorin menetelmää (eng. binary vector system), jossa T-DNA-plasmidin lisäksi bakteerisolu sisältää inaktivoitua Ti-plasmidin, joka sisältää hyödyllisiä geenejä transformointiin. Agrobakteerien avulla toteutettua geenimuokkausta on hyödynnetty erityisesti tuotantokasveissa, joissa sitä on käytetty lisäämään vastustuskykyä muuttuville ympäristökijöille kuten kuivuudelle, kylmälle tai kuumalle lämpötilalle tai korkealle suolapitoisuudelle. Toisaalta kasveja on voitu muokata menetelmän avulla myös ratkaisemaan ihmisten terveyteen liittyviä ongelmia parantamalla kasvien ravintoarvoa. Tästä esimerkkinä on kultainen riisi, johon lisätty A-vitamiinin esiasteen beta-karoteenin synteesiä koodaava geeni. [35,36]

Kasvien lisäksi *A. tumefaciens* voi muokata myös sieni- ja leväsoluja ja myös ihmisen solujen muokkauksessa on onnistuttu. Laajan soveltuvuuden lisäksi agrobakteerien etuja geenimuokkauksessa on se, että menetelmä on kohtuullisen yksinkertainen, edullinen ja tarkka. Vaihtoehtoisena metodina kasvimuokkauksessa käytetään myös niin kutsuttua geenipyssy-menetelmää, jossa DNA:lla päällystetyt kultapartikkelit voidaan ampuu kasvisolun sisälle. Menetelmään liittyvien heikkouksien kuten useiden DNA-kopioiden syntymisen ja DNA:n molekyyliarakenteen heikkenemisen vuoksi *A. tumefaciens* -pohjainen transformatio on eniten käytössä oleva metodi kasvien geenimuokkaukseen. [35] Agrobakteereja on tutkittu myös CRISPR-Cas9-systeemin viemiseen kasvisoluun, mikä mahdollistaa entistä tarkemmin geenimuokkauksen ja kasvien geenisäätelyn tutkimisen[37].

4. MENETELMIEN SOVELLUKSIA LUONTOKADON TORJUMISESSA

Edellisessä luvussa esiteltyjä geenitekniikan menetelmiä voidaan hyödyntää monipuolisesti eliöiden perimän muokkaamisessa. Menetelmistä voi olla hyötyä esimerkiksi uhanalaisen eläimen selviytymisen kannalta hyödyllisten ominaisuuksien lisäämisessä tai vastaavasti eläimille haitallisten eliöiden torjumisessa. Tässä luvussa esitellään esimerkkien avulla tutkimuksia, joissa synteettistä biologiaa on hyödynnetty luontokadon torjumisessa.

4.1 CRISPR/Cas9-geenimuokkaus

CRISPR/Cas9-geenimuokkaus on tällä hetkellä eniten käytetty ja sovellettu geenieditointitekniikka, ja TALEN- tai sinkkisorminukleaaseihin perustuvia tutkimuksia luonnonsuojelutarkoituksiin ei juurikaan ole tehty. CRISPR-mekanismien avulla voidaan lisätä eliölle suotuisia ominaisuuksia, jotka auttavat sitä selviämään esimerkiksi ilmastonmuutoksesta. Toisaalta tekniikan avulla voidaan myös torjua haitallisia vieraslajeja ja patogeenejä. CRISPR-Cas9-kokonaisuus voi olla liitetty geeniajuriin, mutta muutokset voivat levitä tietyn populaation sisällä tehokkaasti myös, jos tarpeeksi suuri määrä tekniikan avulla muokattuja yksilöitä vapautetaan luonnonmukaiseen populaatioon.

4.1.1 Korallien lämmönkestävyyden lisääminen

CRISPR-tekniikkaa voitaisiin käyttää yhtenä työkaluna avustamaan korallien evoluutiota siten, että niiden vastustuskyky ilmastonmuutoksen aiheuttamille negatiivisille ilmiöille kasvaisi. Geenitekniikan menetelmät voivat olla monimutkaisempia kuin perinteiset avustetun evoluution menetelmät kuten valintajalostus, mutta ne voivat tarjota ratkaisun ongelmiin nopeammin ja edullisemmin. [19]

Koralleille kriittisiä ja hyödyllisiä ominaisuuksia ovat muun muassa kyky selviytyä lämpimämmässä ja happamammassa merivedessä, kestävyys korkealle ravinne- ja saastepitoisuudelle sekä fyysinen kestävyys myrskyjä vastaan. Näiden ominaisuuksien parantamiseksi on tärkeää tuntea miten korallien solubiologiset prosessit toimivat ja miten niiden geneettinen perimä on rakentunut. Erityisesti on tarpeen tutkia stressivastegeenejä, jotka auttavat sopeutumaan muuttuviin ympäristötekijöihin. [19] Esimerkiksi korallien alentunut kyky hajottaa myrkyllisiä happiradikaaleja on yhteydessä niiden vaalenemiseen, ja veden korkean lämpötilan sekä huonon vedenlaadun on tutkittu olevan yhteydessä oksidatiiviseen stressiin. Korallien geneettistä rakennetta on tutkittu esimerkiksi QTL-tutkimuksissa (eng. Quantitative trait loci), joiden avulla on löydetty DNA:n alueita, jotka ovat yhteydessä korkeampaan antioksidanttikapasiteettiin sekä kykyyn selviytyä korkeammassa lämpötilassa. [38] Korallien

tutkimisessa haasteena on kuitenkin ollut puute kokeellisista malleista sekä geneettisten metodeista, joilla geenien ja proteiinien toimintaa voisi tarkasti tutkia. [39]

Korallien CRISPR-geenimuokkauksesta on kuitenkin jo saatu positiivisia tuloksia. CRISPR/Cas9-muokkausta on tutkittu esimerkiksi riuttoja muodostavaan *Acropora millepora* -koralliin. Tutkimuksessa CRISPR/Cas9 -kompleksi siirrettiin mikroinjektiolla korallien hedelmöittyneisiin munasoluihin. Mutaatioiden onnistumisprosentti ei ollut korkea, sillä niitä havaittiin vain noin 50 %:ssa tutkittuja yksilöitä, mutta tuloksien perusteella tekniikka vaikutti lupaavalta. [40] Toisessa tutkimuksessa *A. milleporan*, lämpöshokkiin vastaavan geenin transkriptiotekijä HSF1 (Heat Shock Transcription Factor 1) voitiin hiljentää käyttämällä hyväksi CRISPR/Cas9-mikroinjektiolla. Tutkimuksessa osoitettiin, että geenimutaatio onnistui yli 90 %:ssa korallien esiastetoukkia. HSF1-geenin vaimentaminen johti siihen, että mutatoituneet yksilöt eivät kestäneet niin hyvin lämmintä vettä kuin luonnonmukaiset korallit, ja kuolivat veden lämpötilan ollessa 34 °C. Tuloksien perusteella HSF1-geenillä on suuri merkitys korallien selviämiseksi, ja yksi mielenkiintoinen tutkimuskohde olisi tutkia sen yli-ilmentämisen vaikutusta korallien lämmönkestävyydelle. [39]

Toisen korallilajin *Astrangia poculatan* muokkaamista on myös tutkittu usealla erilaisella menetelmällä. Uudessa ja vielä vertaisarvioimattomassa tutkimuksessa *A. poculatan* geenimuokkausta tutkittiin mikroinjektion lisäksi myös lyhyiden hiuspinni-RNA:iden avulla toteutetulla geenin hiljentämisellä sekä CRISPR-tekniikan avulla toteutetulla ”knock-in-mutaatiolla”, jonka avulla geneja voidaan lisätä. Tutkimuksessa toteutettu knock-in-mutaatio oli osoitus ensimmäisestä transgeenisestä korallinmuokkauksesta, sillä korallin perimään saatiin muokattua merivuokosta peräisin oleva DNA-sekvenssi. [41]

Vaikka korallien muokkauksessa on saavutettu teknisiä edistysaskelia, käytännön sovelluksia niiden muokkaamiseksi esimerkiksi paremmin lämpöä kestäviksi ei ole toteutettu. Ensimmäinen askel muokattujen korallien käyttämisessä olisivat kontrolloidut laboratoriokokeet, joita seuraisivat pienen mittakaavan kenttätutkimukset eristäytyneillä riutoilla [19]. Muokattujen korallien istuttaminen luontoon pitäisi kuitenkin toteuttaa harkiten, koska aiheeseen liittyvien biologisten mekanismien ymmärrys on vielä hyvin vähäistä, jotta voitaisiin kunnolla ennustaa muokkausten positiivisia tai negatiivisia vaikutuksia yksilölle tai ekosysteemille. [39] Yksi mielenkiintoinen tutkimuskohde voisi lisäksi olla korallien mikrobiomin tutkiminen ja sen mahdollinen muokkaaminen [19].

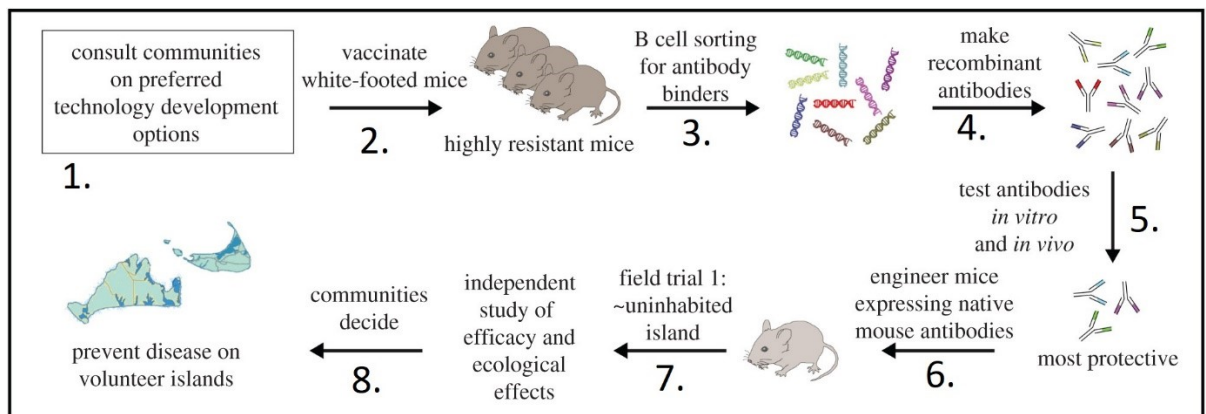
4.1.2 Punkkien levittämien tautien torjunta

Yhdysvalloissa toteutettu Massachusetts Institute of Technology – yliopiston Mice Against Ticks -tutkimusprojekti on tutkinut geenimuokattujen metsäpeurahiirujen (*Peromyscus leucopus*) hyödyntämistä punkkiperaisten tautien torjunnassa. Tutkimuksen kohteena olivat kahden saaren, Nantucketin ja Martha’s Vineyardin, metsäpeurahiirupopulaatiot. Näillä saarilla borreliosisin esiintyvyys suhteessa väestön kokoon on Yhdysvaltojen suurinta. [15] Saarten asukkaat otettiin

vahvasti tutkimuksessa huomioon ja heidän ajatuksiaan ja mielipiteitään kuunneltiin heti tutkimuksen alusta lähtien.

Borrelioosia aiheuttavan *Borrelia burgdorferi* -bakteerin ulkopinnan proteiinin (OspA) vasta-aineella (anti-OspA) voidaan saada aikaan vastustuskyky borrelioosille. Muokkaamalla hiirten ituradan soluihin anti-OspA:ta koodaava geeni voidaan saada aikaan periytyvä vastustuskyky borrelioosille, ja samaa lähestymistapaa voisi olla mahdollista käyttää myös muita punkkiperäisiä tauteja vastaan. Vasta-aineiden käyttämiseen liittyvä etu on, että niiden esiintyvyys on luontaisesti suuri, joten epätoivottujen ekologisten muutosten todennäköisyys on pieni. [15]

Mice against ticks -tutkimuksessa päädyttiin saarten asukasyhteisön pyynnöstä käyttämään cis-geenistä lähestymistapaa eli kaikki muokkauksissa käytetty DNA olisi peräisin ainoastaan metsäpeurahiiruilta, eikä muista lajeista peräisin olevia DNA-jaksoja käytettäisi. Borrelioosia vastaan rokotetuista hiiristä voitiin löytää vasta-aineita kuten anti-OspA:ta koodaavia alleleja. Hiirujen geenimuokkaukseen voidaan hyödyntää CRISPR-teknologiaa, mutta oleellista on, että saarten asukkaat eivät halunneet, että hiirille muokataan transgeenisia eli vierasperäisiä muutoksia kuten esimerkiksi CRISPR-pohjaista geeniajuria. Muokattuja hiiriä pitäisi siis vapauttaa luontoon merkittävä määrä sillä muutokset eivät periytyisi eteenpäin yhtä voimakkaasti kuin geeniajureilla toteutettuna. Tutkimuksen vaiheet on esitetty kuvassa 3.



Kuva 3. Mice against ticks -tutkimusprojektin vaiheet: 1. asukasyhteisöjen haastattelu heidän toiveistaan, 2. metsäpeurahiirujen rokotaminen, 3.–5. taudeilta suojaavien antigeenien tunnistaminen, monistaminen ja testaaminen, 6. antigeenejä koodaavien geenien muokkaus hiiriin, 7. kenttätutkimukset asumattomilla saarilla, 8. tutkimus vapaaehtoisilla asutetuilla saarilla. Muokattu lähteestä [15].

Tällä hetkellä Nantucketin tai Martha's Vineyardin saarien hiiriä ei olla vielä muokattu, sillä tutkimus on vielä kesken. Periytyviä geenimuokkauksia ei olla vielä toteutettu metsäpeurahiiruille, joten tutkijat testaavat erilaisia metodeja CRISPR-tekniikan avulla toteutettuun geenin siirtoon kuten alkion injektointia sekä munanjohtimen kautta tapahtuvaa nukleiinihappojen siirtoa, joka tunnetaan paremmin nimellä i-GONAD. Kun tutkijat ovat saaneet luotua tarpeeksi suuren määrän periytyvästi borrelioosille vastustuskykyisiä hiiriä, voidaan siirtyä kenttätutkimuksiin pienillä asumattomilla saarilla, joilta hiirien leviäminen muihin populaatioihin on mahdollisimman epätodennäköistä. Mikäli tutkimustulokset ovat positiivisia on myöhemmin mahdollista soveltaa tekniikka suuremmilla asutetuilla saarilla. Tulevaisuudessa vaihtoehtona on myös laajentaa

hiirien muokkaamista myös mantereelle ja hyödyntää geeniajuritekniikkaa vastustuskyvyn tehokkaaseen levittämiseen eri hiiripopulaatioiden välillä. Näin geenimuokattujen hiirien vaikutusta ekosysteemiin voidaan tutkia ennen mahdollisen ajurin käyttöönottoa. [15]

4.2 Geeniajurien käyttäminen luonnonsuojelussa

Geeniajurin avulla eliöihin muokattuja ominaisuuksia voidaan levittää tehokkaasti eteenpäin siten, että ne yleistyvät populaatiossa voimakkaasti jo muutamassa sukupolvessa. Edellä kuvatussa Mice Against Ticks -projektissa ajuriin perustuvaa tekniikkaa ei haluttu yhteisön mielipiteen takia käyttää, mutta tekniikkaa on tutkittu esimerkiksi haitallisten vieraslajien kuten jyrtsijöiden ja malariaa levittävien hyttysten torjunnassa.

4.2.1 Haitallisten jyrtsijöiden torjuminen

Uhanalaisille lajeille haitallisia jyrtsijöitä halutaan torjua erityisesti saari ekosysteemeissä. Esimerkiksi Uusi-Seelanti on julistanut vuonna 2016 aikovansa hävittää kaikki siellä elävät rotat, opossumit ja kärpät vuoteen 2050 mennessä. [27] Geeniajuria on ehdotettu yhdeksi vaihtoehdoksi haitallisten jyrtsijöiden hävittämiseksi ilman haitallisia myrkyjä.

Geeniajuria voidaan käyttää häiritsemään vieraslajien lisääntymistä esimerkiksi vaikuttamalla syntyvien eliöiden sukupuolijakaumaan tai hedelmällisyyteen. Yhdeksi vaihtoehdoksi on ehdotettu *t-Sry*-tekniikkaa, joka koostuu kahden geenin kompleksista. *t*-haplotyyppi on hiirissä luontaisesti esiintyvä autosomaalinen alue DNA:ssa, joka vaikuttaa negatiivisesti siittiöiden tuotantoon ja aiheuttaa hedelmättömyyttä sitä kantavissa urospuoლისissa yksilöissä. *t*-haplotyyppi on esimerkki luontaisesti ilmenevästä geeniajurista. Yksilöt, jotka ovat homotsygootteja *t*-haplotyyppin suhteen ovat steriilejä, mutta heterotsygoottien yksilöiden jälkeläiset perivät ominaisuuden yli 90 % todennäköisyydellä. *Sry* (eng. Sex-determining region y) on Y-kromosomissa sijaitseva sukupuolen määräävä geeni, joka johtaa urospuoლისten yksilöiden syntymiseen. Yhdistämällä *Sry*-geeni *t*-haplotyyppiin voitaisiin kehittää ajuri, jossa *t-Sry* leviäisi populaatiossa siten, että urospuoლისten yksilöiden määrä kasvaisi huomattavasti. Suurin osa koiraspuoleisen *t-Sry*-hiiren poikasista olisi koiraita, joista puolet olisivat steriilejä ja puolet lisääntymiskykyisiä. Teorian tasolla *t-Sry*-kompleksin käyttö vieraslajien hävittämisessä on mahdollista, mutta kokeellisia tutkimuksia aiheesta ei ole. [7,16]

Sry-geeni ja *t*-haplotyyppi esiintyvät hiirissä luontaisesti, mikä helpottaa mekanismin ymmärtämistä ja tutkimusta. Vaihtoehtona *t-Sry*-ajurille voisi olla täysin synteettinen CRISPR/Cas9-geeniajuri, joka perustuisi vastinkromosomin leikkaamiseen ja muokkaamiseen ajurikromosomin kaltaiseksi. Toisaalta yksi mahdollinen vaihtoehto voisi olla *t*-haplotyyppin ja Cas9/gRNA:n yhdistelmä, jossa CRISPR-editointi-systeemi periytyisi eteenpäin *t*-haplotyyppin mukana. Tässä systeemissä gRNA voisi kohdistua esimerkiksi geeneihin, jotka ovat tärkeitä naaraspuolisten eliöiden kehittymiselle ja hedelmällisyydelle. [16,42]

Teorian tasolla haitallisten jyrksijöiden hävittäminen geeniajurin avulla voisi olla hyvin mahdollista ja useita erilaista ajurimekanismeja on ehdotettu ratkaisuksi ongelmaan. Matemaattisten mallinnuksien perusteella esimerkiksi *t-Sry*-ajuri voisi tehokkaasti levitä populaation keskuudessa, vaikka se vaatisi useamman muokatun yksilön vapauttamista kuin synteettinen CRISPR-Cas9-ajuri. [16] Geeniajurien käyttöä nisäkkäillä on tutkittu huomattavasti vähemmän kuin hyönteisillä, mutta joitain käytännön tutkimuksia CRISPR-Cas9-geeniajurista hiirille on toteutettu [43,44]. Tutkimukset ovat vaikuttaneet lupaavilta, mutta myös useita teknisiä haasteita on löydetty. Toisaalta geeniajureiden käyttämiseen liittyy myös useita ekologisia, yhteiskunnallisia ja eettisiä kysymyksiä, jotka hidastavat niiden käyttöönottoa. Menetelmään liittyvistä haasteista kerrotaan lisää luvussa 5.

4.2.2 Malariaa levittävien hyttysten torjunta

Esimerkiksi Havaijin saarten lintulajit ovat kärsineet voimakkaasti vierasperäisen *C. quinquefasciatus* -hyttysten levittämästä malariasta. Nykyisten keinojen, kuten hyttysten toukkien hävittäminen, on ajanut tutkijat etsimään ongelmaan myös bioteknisiä ratkaisuja.

Jo aiemmin haitallisia hyttysiä on hävitetty vapauttamalla suuri määrä steriilejä uroshyttysiä luontoon. Hyttysten DNA:ta on voitu vahingoittaa esimerkiksi säteilytyksellä tai kemikaaleilla, mikä on tehnyt niistä lisääntymiskyvyttömiä. Toinen lähestymistapa on ollut muokata koirashyttysten perimää siten, että ne kantavat dominoivaa letaalia alleelia, jolloin niiden jälkeläiset kuolevat ennen aikuisiksi kehittymistä. Tällaisten hyttysten kenttätutkimuksia on toteutettu jo vuodesta 2009 alkaen, ja tulosten perusteella tekniikka on onnistuneesti vähentänyt hyttyspopulaatioiden kokoa esimerkiksi Brasiliassa ja Panamassa. Tämä lähestymistapa vaatii kuitenkin muokattujen jatkuvaa vapauttamista luontoon, sillä letaali ominaisuus ei leviä populaatiossa. [1]

Geeniajureihin perustuvat ratkaisut voisivat vaikuttaa hyttysten lisääntymiseen tai sukupuolijakaumaan tai muokata hyttysistä vastustuskykyisiä malarialoiselle. Osa ajureista on itseään rajoittavia kuten autosomaalinen X-kromosomin repijä -tekniikka (eng. X-chromosome shredder) tai Y-kromosomiin linkittyvät editorit (eng. y-linked editors). Nämä tekniikat vaikuttavat negatiivisesti naaraspuolisten yksilöiden kehittymiseen aiheuttamalla mutaatioita X-kromosomiin, mutta ne eivät kuitenkaan periydy eteenpäin populaatiossa. Itsestään leviäviä ajureita ovat esimerkiksi tiettyyn sekvenssiin kohdentuva CRISPR-Cas9-ajuri sekä Y-kromosomiin periytyväksi muokattu X-kromosomin repijä -tekniikka. Ajuritekniikoita ei ole juurikaan testattu *C. quinquefasciatus* -lajin hyttysille, mutta käytännön kokeita on suoritettu muilla lajeilla kuten ihmisiin malariaa tartuttavissa *Anopheles stephensi* -hyttysessä sekä denguekuumetta ja zikavirusta levittävässä *Aedes aegypti* -hyttysessä. [14] Esimerkiksi *A. spephensiin* on kehitetty CRISPR-Cas9-pohjainen ajuri, joka häkkitutkimuksissa levitti geenimuokkauksen yli 95 % luonnonmukaista hyttyspopulaatiota 5–11 sukupolvessa. [45]

C. quinquefasciatus -muokkaamista on tutkittu myös *Wolbachia* -bakteerin avulla. *Wolbachia* on yleinen niveljalkaisten ja sukkulamatojen bakteeri, joka periytyy naaraiden kautta. Bakteeri

vaikuttaa sille infektoituneen lajin lisääntymiseen siten, että infektoituneet koiraspuoleiset yksilöt eivät voi saada jälkeläisiä naaraiden, joilla ei ole *Wolbachia*-tartuntaa, kanssa. Mikäli sekä naaras että koiras ovat saaneet *Wolbachia*-tartunnan, ne voivat saada jälkeläisiä. Siten bakteeri aiheuttaa kelpoisuusedun, jossa vain sille infektoituneet eliöt voivat saada jälkeläisiä. Hyttysten *Wolbachia*-kanta voitaisiin muokata sellaiseksi, että se estää malarian leviämistä tai vaihtoehtoisesti vapauttaa suuri määrä *Wolbachialle* infektoituneita koirashyttisiä, mikä johtaisi naaraiden steriiliyteen. *Wolbachiaan* perustuvat ajuritekniikat voisivat tarjota luontaisen mekanismin malarian torjumiseen. Tekniikkaa on sovellettu kenttäolosuhteissa rajoitetuissa häikeissä, ja tulokset ovat olleet lupaavia. [14,46]

Erityisesti lintuihin vaikuttavan malarian tutkimus on vielä hyvin varhaisessa vaiheessa, mutta lupaavia tekniikoita ongelmaan on kehitetty jo useita. Ihmiseen vaikuttavan malarian tutkimus ja siihen tehdyt investoinnit voivat kuitenkin vauhdittaa myös aiheen tutkimusta luonnonsuojelutarkoituksissa. [21]

4.3 Lajin pelastaminen kloonauksen avulla

Uhanalaisten eläinten geneettinen monimuotoisuus on usein pientä. Laji on voinut kokea pullonkaulailmiön, jossa sen populaation koko on hetkellisesti romahtanut ja nykyiset yksilöt ovat pienen selviytyneen joukon jälkeläisiä, mikä lisää sisäsiittoisuuden ja geneettisen kuormituksen todennäköisyyttä. Luvussa 2.2 mainitun mustajalkahillerin lisäksi tällaisia lajeja ovat esimerkiksi przewalskinhevonen ja zairenleveähuulisarvikuono[33]. Zairenleveähuulisarvikuonoja on jäljellä ainoastaan kaksi yksilöä, joista kummatkin ovat naaraita[47]. Przewalskinhevonen on maailman uhanalaisin hevoslaji, jonka kaikki elossa olevat yksilöt ovat polveutuneet vain 12 hevosen populaatiosta[33].

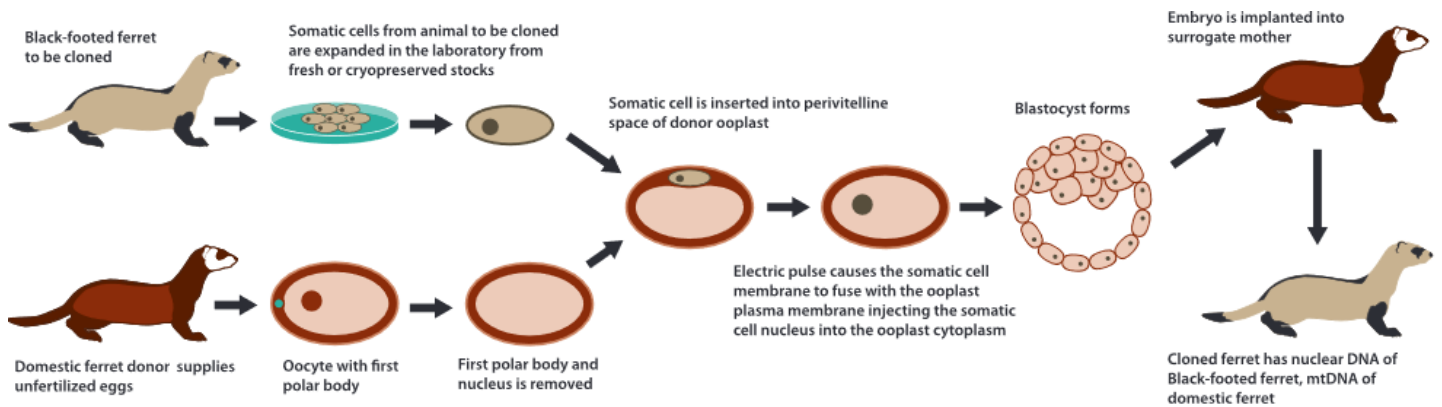
Lajin sisäistä geneettistä monimuotoisuutta voisi olla mahdollista lisätä kloonauksen avulla. San Diego Frozen Zoon kaltaisissa biopankeissa on säilytetty uhanalaisten tai jo sukupuuttoon kuolleiden eläinten solu- ja kudokset, jotka voivat olla peräisin yksilöistä, joiden geeniperimä eroaa nykyisin elävistä saman lajin yksilöistä. Kloonamalla uusia yksilöitä biopankkeihin säilytyn DNA:n avulla voitaisiin kasvattaa nykyisten populaatioiden geeniperimän rikkautta. [33]

Onnistunutta kloonattua alkioita varten tarvitaan useita munasoluja, ja koska uhanalaisten lajien munasoluja on vaikeasti saatavilla, on ollut tarpeen käyttää lajien välistä iSCNT-tekniikkaa. Näin voidaan myös käyttää uhanalaiselle eläimelle geneettisesti samankaltaista lajia sijaisäitinä. [21] iSCNT-tekniikan avulla on saavutettu onnistumisia mustajalkahillerin ja przewalskinhevosen kloonauksessa. Lisäksi on tutkittu voisiko zairenleveähuulisarvikuonon kloonata käyttämällä hyväksi sille läheisen sukulaisen, etelänleveähuulisarvikuonon, munasoluja. [33] Seuraavaksi esitellään tarkemmin mustajalkahillerin kloonausprojektia esimerkkinä iSCNT-tekniikan käyttämisestä uhanalaiselle eläimelle.

Tutkimusprojekti mustajalkahillerin kloonaukseksi alkoi vuonna 2013. Yhdysvaltain kala- ja villieläinvirasto (eng. U.S. Fish and Wildlife Service), on tehnyt hankkeessa yhteistyötä Revive &

Restore -organisaation kanssa, joka erikoistunut bioteknisten ratkaisujen etsimiseen luonnonsuojelutarkoituksiin. [48] San Diegon eläintarhan biopankkiin oli aiemmin ennen 1980-luvulla säilytetty uros- ja naaraspuolisen mustajalkahillerin ihosolunäytteet. Näytteet olivat peräisin eläimistä, jotka eivät olleet läheistä geneettistä sukua nykyisin elossa oleville mustajalkahillereille. [33]

Vuonna 2018 Revive & Restore -tutkimusryhmä sai Yhdysvaltojen hallinnolta luvan aloittaa laboratoriotutkimukset mustajalkahillerin kloonaukseksi. Lupa sisälsi myös oikeuden testata erilaisia hypoteettisia ratkaisuja soluviljelmässä mustajalkahillerin ruttovastustuskyvyn lisäämiseksi. Revive & Restore teki yhteistyötä kaupallisen lemmikkieläinten kloonauksen erikoistuneen ViaGen Pets -yhtiön kanssa. Tarkoituksena oli käyttää naaraspuolisen vuonna 1988 kuolleen mustajalkahillerin solunäytettä ja siirtää sen tuma osaksi kesyn fretin munasolua. [49] iSCNT-tekniikan mekanismi tutkimushankkeessa on esitetty kuvassa 4.



Kuva 4. Mustajalkahillerin kloonauks. Fretin (kuvassa alhaalla vasemmalla) hedelmöittymättömistä munasoluista erotetaan tuma. Mustajalkahillerin kudospäytteestä saadun solun tuma sulautetaan munasolun sisään sähköpulssein avulla. Munasolun jakautuessa syntyy alkiorakkula, joka siirretään sijaisäitiin toimivaan frettiin. Myöhemmin syntyvä poikanen vastaan tuman DNA:n osalta mustajalkahillereille, mutta sen mitokondrio-DNA on peräisin fretistä. [50]

Vuonna 2019 tutkimusryhmä onnistui luomaan kloonattuja mustajalkahillerin alkioita, mikä todisti, että fretin sukusolut ovat epigeneettisesti yhteensopivia mustajalkahillerin genomien kanssa. Vuosi myöhemmin kolmeen eri frettiin siirrettiin kloonattu munasolu. Yksi näistä raskauksista onnistui ja Elizabeth Ann -nimen saanut ensimmäinen kloonattu mustajalkahillereille syntyi vuoden 2020 joulukuussa. [49] Geneettisten analyysien perusteella Elizabeth Ann on muuten paitsi mitokondrionaalisen DNA:n perusteella geneettisesti 100 % mustajalkahillereille. Mitokondrionaalinen DNA (mtDNA) periytyy eteenpäin naaraspuolisilta yksilöiltä, eli jos kloonattu yksilö parittelisi luonnonvaraisen mustajalkahillerin kanssa ja näiden urospuoliset jälkeläiset edelleen luonnonvaraisten naaraiden kanssa, syntyisi poikasia, joilla myös mtDNA olisi samanlainen kuin villeillä mustajalkahillereillä. [33]

Valitettavasti vuonna 2022 Elizabeth Ann:llä todettiin kohtuun vaikuttava sairaus, joka estää sen lisääntymisen. Olisi siis tarpeen toteuttaa kloonauus uudestaan, mikäli halutaan tutkia kloonattujen yksilöiden ja villien mustajalkahillerien lisääntymistä ja poikasia. Elizabeth Annin kloonauus oli kuitenkin osoitus tekniikan toimivuudesta käytännön tasolla. Revive & Restore on tutkinut myös vaihtoehtoja ruttovastustuskyvyn lisäämiseksi vasta-aineisiin perustuvalla tekniikalla. Yksi organisaation tutkimusprojekteista keskittyy kehittämään geneettistä rokotetta, jonka avulla vastustuskyky rutolle voisi periytyä eteenpäin. [49]

4.4 Tautien torjuminen agrobakteeri-geenimuokkauksella

C. parasitican aiheuttamaa amerikanjalaville tuhoisaa tautia on aiemmin yritetty torjua risteyttämällä amerikanjalavia taudille vastustuskykyisten kiinanjalavien kanssa. Tavanomainen jalostus on kuitenkin osoittautunut hitaaksi ja epävarmaksi, mikä on saanut tutkijat kääntymään synteettisen biologian puoleen. [11]

Ensimmäinen agrobakteerien avulla toteutettu geeninsiirto-systeemi kehitettiin amerikankastanjaan jo vuonna 2005, ja tulokset olivat vakuuttavia tekniikan toteuttavuuden kannalta. Menetelmässä *A. tumefaciens* -agrobakteerin avulla siirrettiin kolme eri geeniä amerikankastanjan somaattiseen soluun käyttämällä hyväksi synteettistä plasmidivektoria. Ensimmäiset siirtogeeniset puut istutettiin kenttätutkimuksissa jo seuraavana vuonna. [51,52]

Amerikankastanjan geenimuokkaukseen suojelutarkoituksessa on keskittynyt erityisesti "American Chestnut Research and Restoration Project" -tutkimusryhmä (ACRRP) Yhdysvalloissa[53]. Oksalaatti oksidaasi -entsyymiä koodaavan geenin on havaittu olevan tehokas vastustuskyvyn luomisessa sieni-infektioille. Kyseisen entsyymi kykenee rikkomaan *C. parasitican* tuottamaa myrkyllistä oksaalihappoa, joka on tuhoisaa amerikankastanjan solukoille. [54] Oksalaatti-oksidaasi on yleinen entsyymi esimerkiksi monissa viljoissa, mutta amerikankastanja ei luontaisesti tuota sitä. Siirtämällä amerikankastanjaan alun perin vehnästä peräisin oleva oksalaatti-oksidaasi-geeni saatiin aikaan tehokas suoja *C. parasiticaalle*. Tämän lisäksi ACRRP-ryhmä testasi yli 30 alun perin kiinankastanjasta peräisin olevaa geeniä, mutta ne eivät tuottaneet yhtä hyvää suojaa sieni-infektiota vastaan. Yksittäinen kopio hyvin ilmennettyä oksidaasi-oksilaatti-geeniä tarjoaa tutkimusten perusteella samanlaisen suojan taudille kuin luonnonmukaisilla kiinankastanjoilla. Toinen kyseiseen geeniin liittyvä etu on, että se periytyy dominoivasti, joten ominaisuuden leviäminen eteenpäin on tehokasta. Toisaalta oksidaasi-oksilaatti ei itsessään tapa sientä, vaan vaikuttaa sen toimintaan, minkä vuoksi patogeenillä ei ole voimakasta selektiivistä painetta muuntautua entsyymille vastustuskykyiseksi. Tämän vuoksi oksidaasi-oksilaatin avulla saavutetun vastustuskyvyn oletetaan olevan pitkäkestoinen. [11]

ACRRP:n kehittämä muuntogeeninen amerikankastanja on nimetty Darling 58:ksi, ja kasveja on jo istutettu säädellyille pelloille. Jotta muuntogeeninen amerikankastanja voidaan hyväksyä laajempaan käyttöön ja istutettavaksi metsiin, sen täytyy saada vielä luvat Yhdysvaltojen ympäristösuojeluvirastolta ja Yhdysvaltain maatalousministeriöltä sekä Yhdysvaltojen elintarvike- ja lääkevirastolta FDA:lta, koska kastanjoita käytetään myös ruuaksi. [5] Lupamenettely ei

kuitenkaan ole vielä valmis ja sen valmistumista on vaikea arvioida, sillä kyseessä on ensimmäinen siirtogeeninen organismi, jota ollaan Yhdysvalloissa hyväksymässä luonnonsuojelua varten. [55]

Agrobakteerien avulla toteutettu geenimuokkaus on osoittautunut lupaavaksi kasveille haitallisten tautien torjunnassa. Amerikankastanjaan perehtyneet tutkimukset ovat edenneet pisimmälle, mutta menetelmää on tutkittu myös muihin puulajeihin kuten amerikanjalavaan. Esimerkiksi eräässä tutkimuksessa agrobakteereihin liitettiin plasmidivektori, jonka avulla saatiin tuotettua antimikrobista peptidiä, jolla lisäsi tutkitusti puun vastustuskykyä hollanninjalavantaudille. [12]

5. POHDINTA

Synteettisen biologian hyödyntäminen luonnonsuojelutarkoituksiin on verrattain uusi tutkimushaara, ja alan tutkimuksia on toteutettu huomattavasti vähemmän verrattuna esimerkiksi lääketieteelliseen tai teolliseen biotekniikkaan. Erilaisten geenitekniikan menetelmien nopea kehitys ja niiden sovellettavuus on kuitenkin johtanut synteettisen biologian menetelmien tutkimiseen myös biodiversiteetin suojelussa. Synteettisen biologian menetelmät voivat auttaa luontokadon torjumisessa, mutta niihin liittyy vielä useita teknisiä, sosiaalisia ja eettisiä haasteita. Tässä luvussa käydään läpi aiemmin esitelyihin tekniikoihin liittyviä mahdollisuuksia ja riskejä. Lisäksi analysoidaan synteettisen biologian roolia osana luonnonsuojelua tulevaisuudessa.

5.1 Geenitekniikan menetelmien tehokkuus ja vaikutukset

Osa synteettisen biologian menetelmistä on kehittynyt pidemmällä kuin toiset. Osa tekniikoista on vielä hyvin uusia, eikä niiden soveltamista ole tutkittu vielä käytännössä. Luvussa 4 esitellyjä tutkimuksia sekä niissä käytettyjen menetelmien mahdollisuuksia ja haasteita on koottu yhteen taulukossa 1.

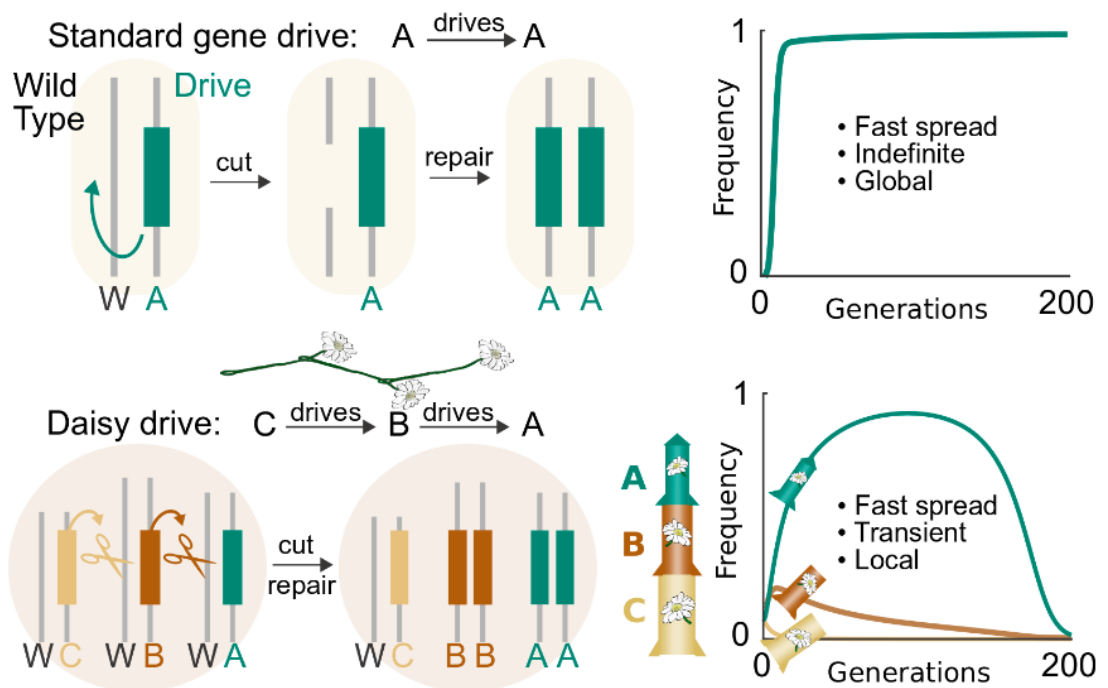
Yksi geeniajuri-tekniikkaan liittyvä kysymys on, kehittykö kohde-eliöille kyky vaientaa ajurisysteemiä siten, että se muuttuu tehottomaksi. Tässä CRISPR-systeemin kaltaiset synteettiset ja tiettyyn geeniin kohdistuvat ajurit voivat olla haasteellisia. Luontaisesti ilmenevien ajurien käyttäminen saattaa olla tehokkaampaa, koska luontaiset ominaisuudet eivät ole niin alttiita evolutiivisille muutoksille. Erityisesti CRISPR-geeniajureiden kopioitumismekanismi perustuu kahdenjuosteen katkoksen korjaamiseen HDR-mekanismilla. Mikäli Cas-nukleaasin tekemä katkos epäonnistuu tai solu korjaa katkoksen NHEJ-menetelmällä, haluttu muutos ei kopioitu eteenpäin vaan syntyy odottamattomia mutaatioita. Toimivien geeniajurien kehittämisessä onkin tarpeen varmistaa, että Cas-nukleaasin aktiivisuus ajoittuu oikein tehokkaan HDR-mekanismiin kanssa. [16] Tämä on ollut haasteena erityisesti nisäkkäisiin kohdistuvien ajurien kehittämisessä[43].

Toinen geenimuokkaamiseen liittyvä haaste on oikeiden geenien ja niiden mekanismien tunnistus. Esimerkiksi korallien geeniperimän rakenteesta ja solubiologiasta on olemassa vielä verrattain vähän tietoa, jotta niitä osattaisiin muokata paremmin lämpöä kestäviksi[19]. Bioinformatiikan ja erityisesti koko genomin sekvensointimenetelmien kehitys auttaa kuitenkin selvittämään uusien geenien tutkimista[18].

Kolmantena ajuritekniikan pitäisi vaikuttaa vain kohdelajiin, eikä levitä muihin eliöihin. Koska geeniajureista ei ole olemassa vielä kenttätutkimuksia, niiden laajempia vaikutuksia ekosysteemitasolla on vaikea arvioida. Siirtogeenit voivat siirtyä horisontaalisesti eri populaatioiden välillä, mikä voi tuottaa haitallisia tai ennustamattomia seurauksia. Esimerkiksi jos geeniajuria päädytään käyttämään haitallisten jyrksijöiden hävittämisessä tietyltä saarelta, on

hyvin mahdollista, että muokatut jyräjät pääsevät salamatkustamaan pois saarelta esimerkiksi laivojen mukana ja levittämään geeniajurin mantereella eläviin populaatioihin. Teorian tasolla itseään ylläpitävä geeniajuri voi levitä eliöihin jopa globaalilla tasolla, jolloin sen vaikutukset voivat olla huomattavat. [27,30]

Yksi ratkaisu geeniajurien liialliseen leviämiseen voisi olla MIT-yliopistossa tutkitut daisy-geeniajurit, joiden nimi tulee englannin päivänkakkaraa tarkoittavasta sanasta "daisy". Tässä lähestymistavassa geeniajurin eri osat kuten sgRNA, Cas9 sekä siirtogeneeni on erotettu toisistaan ja liitetty päivänkakkaran vartta muistuttavaksi ketjuksi. Tässä ketjussa ajurin yksi osa vaikuttaa seuraavaan, joten geeniajurin teho loppuu hiljalleen sukupolvien kuluessa, kun ajurin ensimmäisen osan vaikutus ehtyy. Tällainen ajuritekniikka vaikuttaisi lokaalisti, ja sen epätoivotut vaikutukset muihin populaatioihin olisivat pienemmät. [56] Daisy-ajurin tekniikkaa ja eroavaisuuksia tavanomaiseen CRISPR-ajuriin on esitetty kuvassa 5.



Kuva 5. Tavallisen CRISPR-geeniajurin erot verrattuna Daisy-ajuriin. Kuvassa ylhäällä: Tavanomaisessa synteettisessä geeniajuritekniikassa kaikki geeniajurin osat on sijoitettu samaan kromosomiin, josta ne kopioituvat HDR-mekanismiin avulla vastinkromosomiin. Ajuri leviää nopeasti ja voi teoriassa saavuttaa jopa globaalitason. Kuvassa alhaalla: Kolmiosaisessa Daisy-geeniajurissa osa C ajaa B:tä ja osa B ajaa A:ta. Eri osat on sijoitettu eri puolille genomia, joten ne eivät kopioidu samaan kromosomiin. Daisy-geeniajuri leviää aluksi nopeasti, mutta kun C-osan yleisyys populaatiossa romahtaa, se vaikuttaa ketjureaktiona lopulta muihin geeniajurin osiin, mikä johtaa ajurin tehon loppumiseen. [57]

Taulukko 1. Biodiversiteetin suojeluun liittyviä synteettisen biologian tutkimuksia

Tutkimuskohde	Ongelma	Tekniikka	Mahdollisuudet (+) / Riskit (-)	Tutkimuksen tilanne
Korallien lämmönkestävyyden lisääminen	Muuttuva ympäristö, korallien vaaleneminen	CRISPR/Cas9-geenimuokkaus	+ HSF1-transkriptiotekijän yli-ilmentäminen, mikrobiomin muokkaaminen[39] - Puutteellinen tietämys korallien perimästä ja solubiologiasta, mahdolliset negatiiviset vaikutukset ekosysteemille [19]	Korallien perimän rakennetta on tutkittu QTL-tutkimuksissa[38] HSF1-geenin hiljentäminen onnistunut CRISPR/Cas9-muokkauksella [39] Ensimmäinen trans-geeninen korallin muokkaus toteutettu [41]
Punkkeja levittävien hiirien muokkaus	Punkkiperäiset taudit kuten borrelioosi ja puutiaisaivokuume	Vasta-aineiden lisääminen Cis-geenisellä CRISPR/Cas9-muokkauksella	+ Hiirien periytyvä vastuskyky borrelioosille, positiiviset vaikutukset ihmisten terveyteen, yhteisön mielipiteiden kuuntelu[15] - Epätoivotut vaikutukset ekosysteemille, menetelmän tehottomuus, muuntogeenisten yksilöiden leviäminen [15]	Tauteja levittävien bakteerien vasta-aineita sekä CRISPR-mekanismien siirtometodeja alkioon on tutkittu, mutta geenimuokkausta ei ole vielä toteutettu[15]
Haitallisten jyräjien torjuminen	Vieraslajien aiheuttamat sukupuutot	Erilaiset geeniajuritekniikat	+ Hiirien sukupuolijakauman ja hedelmällisyyden muokkaaminen luontaisella <i>t-Sry</i> -ajurilla [16] - Geeniajurien mahdollinen tehottomuus, ekologiset, sosiaaliset ja eettiset haasteet [27]	Useaa geeniajuri-systeemiä on tutkittu teorian tasolla ja käyttämällä matemaattisia mallinnuksia [7,16,42] Joitain tutkimuksia CRISPR-Cas9-geeniajurista hiirille toteutettu [43,44]

Hyttysten torjunta	Uhanalaisille linnuille haitallinen malaria	Erilaiset geeniajuritekniikat	<p>+ Hyttysten sukupuolijakauman ja hedelmällisyyden muokkaaminen tai malariavastustuskyvyn lisääminen X- ja Y-kromosomaalisilla ajureilla, CRISPR/Cas9-ajurilla tai <i>Wolbachia</i>-bakteerin avulla [14]</p> <p>- Geeniajurien mahdollinen tehottomuus, ekologiset, sosiaaliset ja eettiset haasteet [27]</p>	<p>Ihmiseen malariaa tartuttavan <i>A. spephensi</i> -hyttysten CRISPR-Cas9-ajurin tutkimukset lupaavia rajatuissa kenttäolosuhteissa [45]</p> <p>Rajattuja kenttätutkimuksia lintuihin malariaa levittävän <i>C. quinquefasciatus</i> muokkaamisesta <i>Wolbachia</i>-bakteerilla [46]</p>
Uhanalaisen eläimen kloonaus	Populaatioiden pieni koko, geneettinen kuormitus	iSCNT-kloonaus	<p>+ Uhanalaisten eläimien geneettisen monimuotoisuuden parantaminen, lajin pelastaminen sukupuutolta [33]</p> <p>- Kloonattujen eliöiden selviäminen ja lisääntyminen, yhteiskunnalliset ja eettiset haasteet [33,34]</p>	<p>Mustajalkahillerin ja Przewalskinhevosen kloonauksessa onnistuttu, mutta kloonatut yksilöt eivät ole vielä lisääntyneet [33,49]</p> <p>Zairenleveähuulisarvikuonon kloonamista tutkittu [33]</p>
Uhanalaisten puiden taudinkestävyyden lisääminen	Homesientien aiheuttamat taudit	Geenimuokkaus agrobakteerien avulla	<p>+ Amerikankastanjan ja amerikanjalavan muokkaaminen vastustuskykyiseksi homesieni-infektiota vastaan [12,52]</p> <p>- Lainsäädäntöön liittyvät haasteet ja eettiset kysymykset [5]</p>	<p>Amerikankastanja on muokattu ilmentämään vehnän oksidaasi-oksilaatti entsyymiä, joka tarjoaa vastustuskyvyn taudille. Muuntogeenisiä puita on istutettu säädelyille pelloille, mutta laajempi lupamenettely kesken. [55,58]</p> <p>Amerikanjalavan muokkaamista ilmentämään antimikrobista peptidiä on tutkittu [12]</p>

Uhanalaisten eliöiden kloonamisessa ei olla aiemmin saavutettu erityistä menestystä ja useat yksiöt ovat kuolleet varhaisella iällä. Vaikka SCNT-kloonausprosessi on käytännön tasolla samankaltainen eri nisäkäslajeilla, se on toiminut joillekin lajeille paremmin kuin toisille, ja syitä tähän ei vielä juurikaan tunneta. Uhanalaisten villieläinten jalostaminen ja niiden saaminen lisääntymään vankeudessa on myös vaikeampaa kuin kotieläinten, joiden kloonauksessa on saavutettu enemmän menestystä. Lisäksi kaupallisilla yhtiöillä, jotka kloonavat kotieläimiä, on enemmän taloudellisia resursseja käytössään kuin suojelubiologian tutkimusryhmillä. [33] Kloonattu mustajalkahilli ei kyennyt lisääntymään, ja kloonattu przewalskinhevonen ei ole vielä sukukypsä, joten tutkimustietoa kloonattujen uhanalaisten eläimien jälkeläisistä ei vielä ole [48].

Uhanalaisten kasvien muokkauksessa agrobakteereilla on saatu aikaan onnistuneita tuloksia, vaikka muuntogeenisiä kasveja ei olla vielä hyväksytty istutettaviksi luontoon [55]. Agrobakteereita on jo pitkään käytetty hyväksi biotekniikassa ja tutkimuksia erilaisten kasvien muokkauksessa niillä on toteutettu paljon. Tekniikka on kuitenkin kehittynyt jatkuvasti ja yhdistettynä CRISPR-tekniikkaan se tarjoaa entistä tarkemman menetelmän kasvien geenimuokkaukseen [37].

CRISPR/Cas-tekniikan vahvuus on sen monipuolisuus, sillä sen avulla voidaan tuottaa transgeenisä eliöitä, hiljentää geenejä ja toteuttaa nopeasti leviäviä geeniajureita. Menetelmää hyödynnetään jollain tavoin useimmissa tässäkin tutkielmassa esitellyissä tutkimuksissa. CRISPR/Cas muokkauksen haasteita ovat esimerkiksi sen kohdistuminen väärin kohteisiin, Cas9-nukleaasin sytotoksisuus ja rajoittunut usean geenin muokkaamistehokkuus. CRISPR-systeemi voidaan optimoida sitä hyödyntävän sovelluksen mukaan. Esimerkiksi muokkaamalla käytettyä sgRNA:ta tai Cas-nukleaasia voidaan vaikuttaa haluttuun muokkaukseen ja sen tarkkuuteen. Viime vuosina on kehitetty erilaisia korkean tarkkuuden Cas9-variantteja, joilla voidaan esimerkiksi parantaa PAM-alueen tunnistuskykyä ja DNA-spesifisyyttä. [24]

5.2 Bioeettiset näkökulmat

Eläimien geenimuokkaukseen ja erityisesti geeniajurien käyttöön liittyy useita eettisiä kysymyksiä. Yhteisön suhtautuminen geenimuokkaukseen vaihtelee ja tukea uusille hankkeille ja geenimuokattujen organismien tuottamiselle voi olla hankala saada. Kun tekniikan kohteena on jaettu ympäristö, erityisesti geenimuokattujen eliöiden epätoivotut tai peruuttamattomat vaikutukset herättävät huolia.

Yksi peruste geenitekniikan menetelmien puolesta on se, että ihmiset ovat jo tuhansien vuosien ajan toiminnallaan muokanneet sekä villieläinten että tuotantoeläinten evoluutiota. Lisäksi luonnollisen evoluution mukana on siirtynyt geneettistä materiaalia horisontaalisesti eri lajien välillä. Esimerkiksi lehmät jakavat 25 % genomistaan käärmeiden kanssa, vaikka niiden sukulaisuussuhde lajeina on kaukainen [15]. Ihminen on ratkaissut esimerkiksi haitallisten vieraslajien torjumisen tähän asti myrkyillä, joilla on paljon epätoivottuja ympäristövaikutuksia. Synteettisen biologian kehitys on tuonut geenimuokkaukseen nopeampia, tarkempia ja tehokkaampia menetelmiä. Ihminen on pitkälti omalla toiminnallaan aiheuttanut nykyisen teollisen

ajan sukupuuttoaallon, joten voisi olla vaikeaa perustella, miksi synteettistä biologiaa ei voisi käyttää apuna ratkaisemaan luontokatoon liittyviä ongelmia. Toinen eettinen kysymys koskeekin sitä, että onko väärin olla käyttämättä työkaluja, jotka voisivat estää eläinten kuolemista sukupuuttoon. Geenijuriteknikkaa ollaan tutkittu myös ihmisille haitalliseen malariaan, ja jo vuosikymmenen viive tekniikan käyttöönotossa voisi tarkoittaa miljoonia muuten estettävissä olevia kuolemia[27]. Vakavat ongelmat tarvitsevat tehokkaita ratkaisuja, ja erityisesti ihmishenkien pelastamiseen ollaan valmiina investoimaan.

Geenijureihin liittyy paljon eettisiä kysymyksiä, jotka täytyy ratkaista ennen kuin niitä voidaan käyttää luonnollisissa elinympäristöissä. Yksi kysymys on, että onko oikein käyttää geenijuriteknikkaa vieraslajien hävittämiseen. Osa tutkijoista onkin vaatinut lykkäystä geenijurien käyttöönotolle luonnonsuojelussa. Tekniikkaa ei olla tutkittu vielä tarpeeksi, jotta sen laaja-alaisia vaikutuksia osattaisiin arvioida. Osa tutkijoista on linjannut, että itseleviävän geenijurin käyttäminen hävittämään tietyn lajin paikallinen populaatio ei ole turvallista, sillä riski ajurin leviämiseen globaalisti on suuri. [27,59] Esimerkiksi MIT-yliopiston tutkija Kevin Esvelt on kertonut, että oli virhe lisätä geenijurit potentiaalisiksi vastaukseksi vieraslajien hävittämiseen hänen aiemmin kirjoittamassa julkaisussaan[27]. Geenijurien vaikutuksia olisi tarpeen tutkia ensin pienessä mittakaavassa, esimerkiksi pienillä eristäytyneillä saarilla, ja positiivisten tulosten myötä siirtyä isompaan mittakaavaan. Lisäksi Daisy-ajurin tapaisilla vain paikalliseen populaatioon vaikuttavilla ratkaisuilla voidaan välttää ajurin leviäminen laajemmalle alueelle, kuin on tarkoitus. Tätä lähestymistapaa on ehdotettu esimerkiksi aiemmin mainitun Mice against ticks -ryhmän tutkimuksessa[15]. Lisäksi useassa eri tutkimuksessa on painotettu, että ratkaisuissa tulee ottaa huomioon paikalliset yhteisöt ja sidosryhmät, erityisesti alkuperäisasukkaat ja marginaalissa olevat yhteisöt[5,27,60]. Koska ympäristö on jaettu, siihen tehdyissä muokkauksissa täytyy ottaa huomioon kaikki mielipiteet.

Kloonaukseen liittyy kysymys siitä, onko kloonattu laji enää sama kuin alkuperäinen uhanalainen laji. Kloonattu yksilö voi esimerkiksi sisältää mt-DNA:ta sijaisäidiltään. Esimerkiksi zairenlevähuulisarvikuonojen perimän täydellinen pelastaminen on mahdotonta, koska lajin yksilöitä on jäljellä niin vähän. Toisaalta kloonaus on kallista, ja osa luonnonsuojelijoista on ilmaissut huolensa siitä, että vähentääkö kyky kloonata harvinaisia eläimiä kiinnostusta perinteisempiin suojeluhankkeisiin kuten suojelualueiden perustamiseen. [33] Osa tutkijoista on suhtautunut epäillen esimerkiksi siihen, auttaako mustajalkahillerin kloonaminen todellisuudessa sen luonnollisen populaation selviämistä. Mustajalkahillereiden pääasiallinen uhka on rutto ja niille sopivien elinalueiden vähentyminen. Vaikka mustajalkahillereitä muokattaisiin vastustuskykyiseksi rutolle, se uhkaa kuitenkin myös niiden pääasiallista ruuanlähdeä, preeriakoiria. Toisaalta viime vuosikymmenen aikana preeriakoirien levinneisyys on vähentynyt yli 95 % ihmisten tekemien myrkytysten takia. [61] Mustajalkahillereiden tehokkaassa suojelussa pitäisi siis ensisijaisesti kiinnittää huomiota niiden elinalueiden turvaamiseen.

Kloonaustekniikkaa on myös tutkittu jo sukupuuttoon kuolleisiin eläimiin. Yhdysvalloissa toimiva Colossal-yhtiö pyrkii esimerkiksi palauttamaan villamammutin takaisin arktiseen luontoon käyttämällä hyväksi säilynyttä mammutin DNA:ta ja hyödyntämällä aasiannorsua iSCNT-kloonauksessa. [62] Tekniikan tasolla projekti voi olla mahdollinen, mutta aiheeseen liittyy valtavasti eettisiä kysymyksiä.

Synteettisen biologian menetelmiin saattaa sisältyä riski yksityisten tahojen tavoittelemasta hyödystä, josta koituu haittaa muille. Esimerkiksi joitain tekniikoita voitaisiin käyttää sotilastarkoituksiin. Moni tässä tutkielmassa esitellyistä tutkimuksista pyrkii avoimuuteen ja esimerkiksi Darling 58 -amerikankastanjoita ei olla patentoitu[5]. Mice against ticks- projektissa saarilla elävien yhteisöjen mielipiteet ja toiveet geenitekniikan käyttämisestä otettiin huomioon heti tutkimuksen alusta lähtien, ja tutkijat painottivat, että mikäli enemmistö ei halua, että alueen hiiriä muokataan taudeille vastustuskykyisiksi, käytännön toteutukseen ei ryhdytä. Avoin keskustelu geenitekniikan vaikutuksista vaikutti tutkimuksessa yhteisöjen positiivisempaan suhtautumiseen sitä kohtaan. [15] Vaikka tutkimusryhmät pyrkisivät avoimuuteen, on kuitenkin mahdollisuus, että niitä tukevat yksityiset yritykset tavoittelevat hyötyä tehdyistä tutkimuksista. Esimerkiksi Bayer ja ArborGen, jotka ovat kaupallisia metsätalousyhtiöitä, ovat rahoittaneet amerikankastanprojektiä ja Yhdysvaltain keskustiedustelupalvelu CIA kuuluu mammutin kloonausta tutkivan Colossal-yhtiön rahoittajiin[5,63]

5.3 Tulevaisuuden näkymät

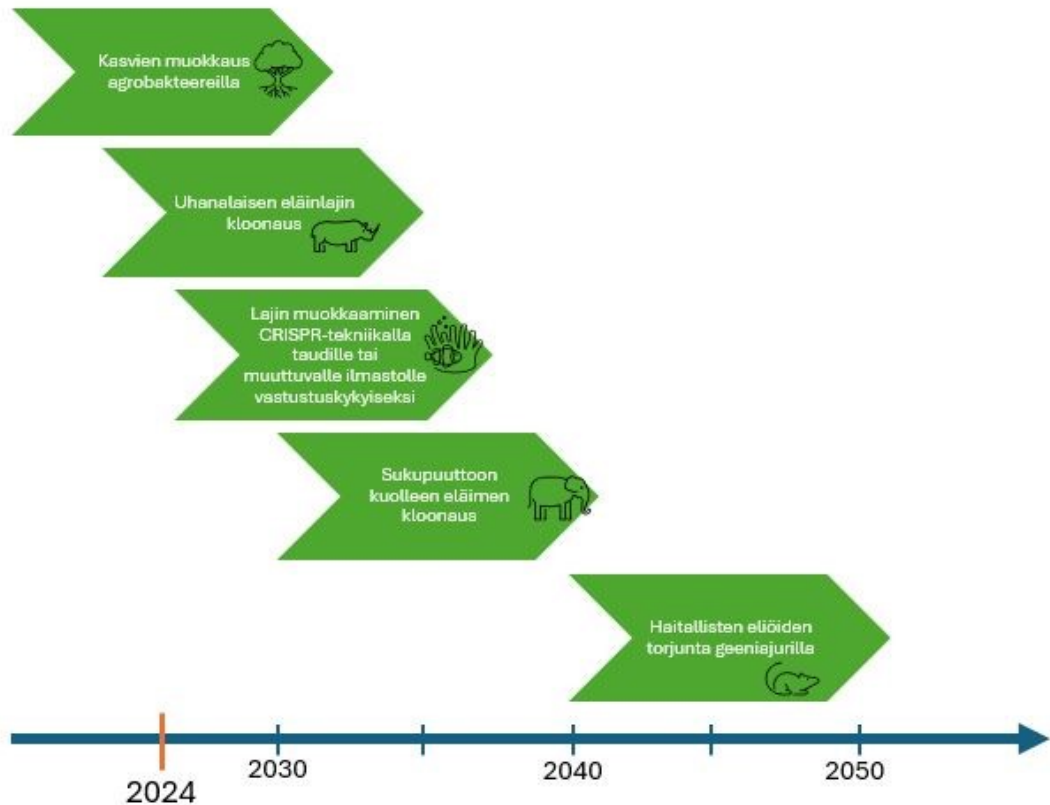
Tässä tutkielmassa esitettyjen synteettisen biologian menetelmien tulevaisuutta osana luonnonsuojelua on arvioitu kuvassa 6.

Agrobakteereilla toteutettu kasvien muokkaus on jo pitkään käytössä ollut tekniikka, jolla on saatu onnistuneita tuloksia aikaan. Jos Darling-58 amerikankastanjat saavat luvan metsäistutuksia varten, niistä tulee ensimmäinen hyväksytty muuntogeeninen organismi luonnonsuojelutarkoituksiin[55].

Uhanalaisten eläinlajien kloonaamisessa on jo saavutettu teknisiä edistysaskelia, mutta kestää vielä kauan ennen kuin niitä voidaan todella käyttää hyväksi luontokadon torjumisessa. Vaikka kloonattujen yksilöiden jälkeläiset olisivat elinvoimaisia, kestää kuitenkin kauan, että ne saisivat luvan luontoon vapauttamista varten[33]. Toisaalta sukupuuttoon kuolleen eläimen kloonaaminen saattaa edetä käytännön tutkimuksiin jo verrattain lähiaikoina, sillä Colossal-yhtiö on ottanut tavoitteekseen yrittää mammutin iSCNT-kloonausta jo vuonna 2027[64].

Lajien muokkaaminen CRISPR/Cas-tekniikan avulla vastustuskykyiseksi esimerkiksi tauteja ja ilmastonlämpenemistä vastaan on osoittautunut lupaavaksi, ja tekniikalla on monipuoliset hyödyntämismahdollisuudet. Vaarantuneiden eliöiden, kuten korallien, muokkauksessa voi kulua vielä kauan. Lajien perimän rakenteen tutkiminen vie aikaa, ja toisaalta muuntogeenisiä eliöitä säädellään voimakkaasti. Aiheeseen liittyvät laboratoriotutkimukset voisivat kuitenkin yleistyä jo lähivuosien aikana.

CRISPR/Cas-tekniikan hyödyntäminen geeniajureissa on edessä luultavasti vasta kaukaisessa tulevaisuudessa, sillä tehokkaasti leviävien geenimuokkauksien hyödyntämiseen liittyy paljon eettisiä ja teknisiä haasteita. Ajurien toimintaa on tarpeen tutkia tarkoin rajatussa ympäristössä ennen laajempaan mittakaavaan siirtymistä. Luonnollisiin ajureihin perustuvat systeemit ja edellä esitellyt lokaalisti toimivat Daisy-ajurit voisivat olla ensimmäisiä geeniajuritekniikan käytännön sovelluksia.



Kuva 6. Synteettisen biologian ratkaisut luonnonsuojelussa tulevaisuudessa

Synteettisen biologian tulevaisuuteen osana luonnonsuojelua vaikuttaa erityisesti lainsäädäntö. Alan tekninen kehitys on ollut niin nopeaa, että lainsäädännön on ollut vaikea pysyä siinä mukana. Geenimuokatut lajit saattavat ylittää valtioiden rajoja, mutta synteettistä biologiaa koskeva lainsäädäntö vaihtelee eri maissa ympäri maailman. Tällä hetkellä synteettiselle biologialle ei ole standardisoitua kansainvälistä määritelmää, eikä synteettisen biologian kehityksen valvomiseen ole kansainvälisiä sopimuksia. [5] Maailmanlaajuisen synteettisen biologian lakikehyksen luominen olisi myös hankalaa, sillä monissa maissa lainsäädännössä on merkittäviä puutteita ja viranomaisvalvonnan kapasiteetti on rajoittunutta. [65] Toisaalta lainsäädännöstä käytävä keskustelu saattaa vaihdella myös maan sisäisten viranomaisten välillä. Esimerkiksi Yhdysvaltain maatalousministeriö on linjannut, että jos CRISPR/Cas-tekniikalla muokattu eliö ei vaadi

lainsäädännöllistä valvontaa, jos kaikki siinä käytetty geneettinen materiaali on peräisin alkuperäisestä lajista. Tällöin muokattua organismia käsiteltäisiin samanlaisena kuin esimerkiksi perinteisillä jalostusmenetelmillä tuotettuja kasveja. Toisaalta Yhdysvaltojen FDA-virasto ei ole vielä linjannut tarkkaan, kuinka se säätelee geneettisesti muokattuja viljelykasveja. [60]

6. YHTEENVETO

Biodiversiteetin globaali väheneminen on vakava, monikasvoinen ja kiihtyvä uhka, ja sitä vastaan on tarpeen löytää tehokkaita ratkaisuja. Synteettisen biologian menetelmät eivät voi täysin syrjäyttää perinteisiä keinoja luonnonsuojeluun, mutta ne tarjoavat mielenkiintoisia vaihtoehtoja niiden rinnalle. Hyödynnettäviä tekniikoita ovat esimerkiksi CRISPR/Cas-geenimuokkaus, geeniajurit, SCNT-kloonaukset sekä kasvien geenimuokkaus agrobakteerien avulla. Tässä tutkielmassa esitellyillä tekniikoilla voitaisiin torjua haitallisia vieraslajeja, auttaa uhanalaisia eliöitä selviämään ilmastonmuutoksen vaikutuksista ja taudinaiheuttajista sekä lisätä uhanalaisen lajin geneettistä monimuotoisuutta.

Kirjallisuuden perusteella joitain lupaavia tuloksia on jo saatu aikaan. Esimerkiksi uhanalaiselle amerikankastanjalle agrobakteerien avulla tuotettu vastustuskyky homesientä vastaan on erittäin lupaava, ja siirtogeeniset puut kasvavat jo eristetyillä alueilla Yhdysvalloissa. Lisäksi uhanalaisten eläimien kloonauksessa on saatu aikaan positiivisia tuloksia mustajalkahillerin ja przerwalskinhevosen osalta. Eliöiden geenimuokkaus CRISPR/Cas-tekniikalla tarjoaa monipuolisen ja tehokkaan työkalun erilaisten eliöiden muokkaukseen, ja sen avulla on voitu esimerkiksi hiljentää korallien lämmönsäätelystä vastaava HSF1-geeni. CRISPR-tekniikkaa voitaisiin hyödyntää myös punkkien levittämille taudeille vastustuskykyisten metsäpeurahiirujen muokkaamisessa.

Toisaalta juuri minkään tässä tutkielmassa esitellyn tekniikan sovellusta luonnonsuojeluun ei olla vielä tutkittu käytännön tasolla eliöiden luontaisessa elinympäristössä. Siten niiden laajempia vaikutuksia yksilöön tai koko ekosysteemiin on vielä hankala arvioida, ja vaikuttaa siltä, että synteettisen biologian hyödyntäminen laajamittaisesti osana luonnonsuojelua ei ole mahdollista vielä ainakaan vuosikymmenen. Erityisesti geeniajurien käyttöönotto on vielä kaukana tulevaisuudessa. Bioeettiset kysymykset ja tekniikoihin liittyvät riskit jarruttavat kehitystä. Lisäksi lainsäädännön kehittyminen vaikuttaa synteettisen biologian hyödyntämiseen.

Luontokatoon liittyviä ongelmia esiintyy maailmanlaajuisesti ja synteettisen biologian menetelmien hyödyntäminen niiden ratkaisussa tarjoaa paljon aiheita lisätutkimuksiin. Esimerkiksi sammakkoeläimille haitalliseen kytridiomykoosi-tautiin voitaisiin etsiä ratkaisua geenimuokkauksen avulla. Lisäksi synteettisen biologian menetelmillä voitaisiin tutkia vaihtoehtoja korvaamaan teollisuudessa käytettäviä eläinperäisiä yhdisteitä.

Onnistuneissa hankkeissa vaaditaan yhteistyötä suojelubiologien, synteettisen biologian tutkijoiden sekä paikallisten ihmisyhteisöjen välillä. Menetelmiin liittyviä riskejä ja eettisiä kysymyksiä ei voi aliarvioida. Toisaalta biotekniikan kehitykseen liittyvät mahdollisuudet luontokadon torjumisessa on hyvä pitää mielessä. Geenitekniikan asiantuntijoiden on tarpeen olla hyvin perillä ekologiasta ja siitä, kuinka menetelmien sovellukset vaikuttavat eläinpopulaatioihin ja koko ekosysteemiin.

7. LÄHTEET

- [1] Piaggio AJ, Segelbacher G, Seddon PJ, Alphey L, Bennett EL, Carlson RH, et al. Is It Time for Synthetic Biodiversity Conservation? *Trends in Ecology & Evolution* 2017;32:97–107. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.10.016>.
- [2] Yang Q, Liu G, Casazza M, Gonella F, Yang Z. Three dimensions of biodiversity: New perspectives and methods. *Ecological Indicators* 2021;130:108099. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.108099>.
- [3] Purvis A, Hector A. Getting the measure of biodiversity. *Nature* 2000;405:212–9. <https://doi.org/10.1038/35012221>.
- [4] Living Planet Report 2022 <https://livingplanet.panda.org/> (accessed October 17, 2023).
- [5] Tibbetts JH. Synthetic Biology and Endangered Species: Should scientists genetically rewire nature to save species and habitats? *BioScience* 2022;72:610–7. <https://doi.org/10.1093/biosci/biac040>.
- [6] Roy HE, Pauchard A, Stoett P, Renard Truong T, Bacher S, Galil BS, et al. IPBES Invasive Alien Species Assessment: Summary for Policymakers. Zenodo; 2023. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8314303>.
- [7] Manser A, Cornell SJ, Sutter A, Blondel DV, Serr M, Godwin J, et al. Controlling invasive rodents via synthetic gene drive and the role of polyandry. *Proc Biol Sci* 2019;286:20190852. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0852>.
- [8] Kosch TA, Silva CNS, Brannelly LA, Roberts AA, Lau Q, Marantelli G, et al. Genetic potential for disease resistance in critically endangered amphibians decimated by chytridiomycosis. *Anim Conserv* 2019;22:238–50. <https://doi.org/10.1111/acv.12459>.
- [9] Becker MH, Brophy JAN, Barrett K, Bronikowski E, Evans M, Glassey E, et al. Genetically modifying skin microbe to produce violacein and augmenting microbiome did not defend Panamanian golden frogs from disease. *ISME COMMUN* 2021;1:1–10. <https://doi.org/10.1038/s43705-021-00044-w>.
- [10] Luedtke JA, Chanson J, Neam K, Hobin L, Maciel AO, Catenazzi A, et al. Ongoing declines for the world's amphibians in the face of emerging threats. *Nature* 2023;622:308–14. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06578-4>.
- [11] Powell WA, Newhouse AE, Coffey V. Developing Blight-Tolerant American Chestnut Trees. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2019;11:a034587. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034587>.
- [12] Newhouse AE, Schrodft F, Liang H, Maynard CA, Powell WA. Transgenic American elm shows reduced Dutch elm disease symptoms and normal mycorrhizal colonization. *Plant Cell Rep* 2007;26:977–87. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0313-z>.
- [13] Malaria. Duodecim Terveyskirjasto <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00620> (accessed November 29, 2023).
- [14] Harvey-Samuel T, Ant T, Sutton J, Niebuhr CN, Asigau S, Parker P, et al. *Culex quinquefasciatus*: status as a threat to island avifauna and options for genetic control. *CABI Agriculture and Bioscience* 2021;2:9. <https://doi.org/10.1186/s43170-021-00030-1>.
- [15] Buchthal J, Evans SW, Lunshof J, Telford SR, Esvelt KM. Mice Against Ticks: an experimental community-guided effort to prevent tick-borne disease by altering the shared environment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2019;374:20180105. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0105>.
- [16] Godwin J, Serr M, Barnhill-Dilling SK, Blondel DV, Brown PR, Campbell K, et al. Rodent gene drives for conservation: opportunities and data needs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2019;286:20191606. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1606>.
- [17] Maloney T, Phelan R, Simmons N. Saving the horseshoe crab: A synthetic alternative to horseshoe crab blood for endotoxin detection. *PLOS Biology* 2018;16:e2006607. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006607>.
- [18] Kosch TA, Waddle AW, Cooper CA, Zenger KR, Garrick DJ, Berger L, et al. Genetic approaches for increasing fitness in endangered species. *Trends in Ecology & Evolution* 2022;37:332–45. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2021.12.003>.

- [19] van Oppen MJH, Gates RD, Blackall LL, Cantin N, Chakravarti LJ, Chan WY, et al. Shifting paradigms in restoration of the world's coral reefs. *Global Change Biology* 2017;23:3437–48. <https://doi.org/10.1111/gcb.13647>.
- [20] Redford KH, Adams W, Carlson R, Mace GM, Ceccarelli B. Synthetic biology and the conservation of biodiversity. *Oryx* 2014;48:330–6. <https://doi.org/10.1017/S0030605314000040>.
- [21] Segelbacher G, Bosse M, Burger P, Galbusera P, Godoy JA, Helsen P, et al. New developments in the field of genomic technologies and their relevance to conservation management. *Conserv Genet* 2022;23:217–42. <https://doi.org/10.1007/s10592-021-01415-5>.
- [22] Hedrick PW, Fredrickson R. Genetic rescue guidelines with examples from Mexican wolves and Florida panthers. *Conserv Genet* 2010;11:615–26. <https://doi.org/10.1007/s10592-009-9999-5>.
- [23] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science* 2010;327:167–70. <https://doi.org/10.1126/science.1179555>.
- [24] Li W, Huang C, Chen J. The application of CRISPR /Cas mediated gene editing in synthetic biology: Challenges and optimizations. *Front Bioeng Biotechnol* 2022;10:890155. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.890155>.
- [25] Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL. *Lehninger principles of biochemistry*. Seventh edition. New York, NY : Houndmills, Basingstoke: W.H. Freeman and Company ; Macmillan Higher Education; 2017.
- [26] Yamamoto T, editor. *Targeted Genome Editing Using Site-Specific Nucleases: ZFNs, TALENs, and the CRISPR/Cas9 System*. Tokyo: Springer Japan; 2015. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-55227-7>.
- [27] Esvelt KM, Gemmell NJ. Conservation demands safe gene drive. *PLoS Biology* 2017;15. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003850>.
- [28] Wedell N, Price TAR, Lindholm AK. Gene drive: progress and prospects. *Proc Biol Sci* 2019;286:20192709. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2709>.
- [29] Barrett LG, Legros M, Kumaran N, Glassop D, Raghu S, Gardiner DM. Gene drives in plants: opportunities and challenges for weed control and engineered resilience. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2019;286:20191515. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1515>.
- [30] Esvelt KM, Smidler AL, Flaminia C, Church GM. Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. *eLife* 2014;3. <https://doi.org/10.7554/eLife.03401>.
- [31] Xuechun F, Link to external site this link will open in a new window, Víctor LDA, Link to external site this link will open in a new window, Enzo M, Link to external site this link will open in a new window, et al. Optimized CRISPR tools and site-directed transgenesis towards gene drive development in *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Nature Communications* 2021;12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23239-0>.
- [32] Courtier-Orgogozo V, Morizot B, Boëte C. Agricultural pest control with CRISPR-based gene drive: time for public debate. *EMBO Rep* 2017;18:878–80. <https://doi.org/10.15252/embr.201744205>.
- [33] Fritts R. Cloning Goes Wild. *Science* 2022;375:134–7. <https://doi.org/10.1126/science.acz9982>.
- [34] Sandler RL, Moses L, Wisely SM. An ethical analysis of cloning for genetic rescue: Case study of the black-footed ferret. *Biological Conservation* 2021;257:109118. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2021.109118>.
- [35] Hwang H-H, Yu M, Lai E-M. *Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: Biology and Applications*. *Arbo.j* 2017;2017. <https://doi.org/10.1199/tab.0186>.
- [36] Banta LM, Montenegro M. *Agrobacterium and Plant Biotechnology*. In: Tzfira T, Citovsky V, editors. *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*, New York, NY: Springer; 2008, p. 73–147. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72290-0_3.
- [37] Zhang S, Zhang R, Song G, Gao J, Li W, Han X, et al. Targeted mutagenesis using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas9 system in common wheat. *BMC Plant Biology* 2018;18:302. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1496-x>.
- [38] Jin YK, Lundgren P, Lutz A, Raina J-B, Howells EJ, Paley AS, et al. Genetic markers for antioxidant capacity in a reef-building coral. *Sci Adv* 2016;2:e1500842. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500842>.
- [39] Cleves PA, Tinoco AI, Bradford J, Perrin D, Bay LK, Pringle JR. Reduced thermal tolerance in a coral carrying CRISPR-induced mutations in the gene for a heat-shock transcription

- factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2020;117:28899–905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920779117>.
- [40] Cleves PA, Strader ME, Bay LK, Pringle JR, Matz MV. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in a reef-building coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2018;115:5235–40. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722151115>.
- [41] Warner JF, Besemer R, Schickle A, Borbee E, Changsut IV, Sharp K, et al. Microinjection, gene knockdown, and CRISPR-mediated gene knock-in in the hard coral, *Astrangia poculata*. *Developmental Biology*; 2023. <https://doi.org/10.1101/2023.11.16.567385>.
- [42] Leitschuh CM, Kanavy D, Backus GA, Valdez RX, Serr M, Pitts EA, et al. Developing gene drive technologies to eradicate invasive rodents from islands. *Journal of Responsible Innovation* 2018;5:S121–38. <https://doi.org/10.1080/23299460.2017.1365232>.
- [43] Grunwald HA, Gantz VM, Poplawski G, Xu X-RS, Bier E, Cooper KL. Super-Mendelian inheritance mediated by CRISPR–Cas9 in the female mouse germline. *Nature* 2019;566:105–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0875-2>.
- [44] Pfitzner C, Hughes J, White M, Scherer M, Piltz S, Thomas P. Development of zygotic and germline gene drives in mice 2020:2020.06.21.162594. <https://doi.org/10.1101/2020.06.21.162594>.
- [45] Adriana A, Link to external site this link will open in a new window, Gantz VM, Link to external site this link will open in a new window, Nijole J, Hsu-Feng L, et al. Efficient population modification gene-drive rescue system in the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature Communications* 2020;11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19426-0>.
- [46] Atyame CM, Cattel J, Lebon C, Flores O, Dehecq J-S, Weill M, et al. Wolbachia-Based Population Control Strategy Targeting *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes Proves Efficient under Semi-Field Conditions. *PLOS ONE* 2015;10:e0119288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119288>.
- [47] Hildebrandt TB, Hermes R, Colleoni S, Diecke S, Holtze S, Renfree MB, et al. Embryos and embryonic stem cells from the white rhinoceros. *Nature Communications* 2018;9:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04959-2>.
- [48] Using Genomic Tools for Population Management <https://www.aza.org/connect-stories/stories/using-genomic-tools-population-management-cloning-black-footed-ferret-przewalski-horse?locale=en> (accessed November 24, 2023).
- [49] Black-footed Ferret Project, Major Milestones - Revive & Restore <https://reviverestore.org/projects/black-footed-ferret/major-milestones/> (accessed December 12, 2023).
- [50] Wisely SM, Ryder OA, Santymire RM, Engelhardt JF, Novak BJ. A Road Map for 21st Century Genetic Restoration: Gene Pool Enrichment of the Black-Footed Ferret. *Journal of Heredity* 2015;106:581–92. <https://doi.org/10.1093/jhered/esv041>.
- [51] Polin LD, Liang H, Rothrock RE, Nishii M, Diehl DL, Newhouse AE, et al. Agrobacterium-mediated transformation of American chestnut (*Castanea dentata* (Marsh.) Borkh.) somatic embryos. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2006;84:69–79. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-9002-1>.
- [52] Steiner KC, Westbrook JW, Hebard FV, Georgi LL, Powell WA, Fitzsimmons SF. Rescue of American chestnut with extraspecific genes following its destruction by a naturalized pathogen. *New Forests* 2017;48:317–36. <https://doi.org/10.1007/s11056-016-9561-5>.
- [53] The American Chestnut Research & Restoration Project at ESF <https://www.esf.edu/chestnut/index.php> (accessed December 13, 2023).
- [54] Zhang B, Oakes AD, Newhouse AE, Baier KM, Maynard CA, Powell WA. A threshold level of oxalate oxidase transgene expression reduces *Cryphonectria parasitica*-induced necrosis in a transgenic American chestnut (*Castanea dentata*) leaf bioassay. *Transgenic Res* 2013;22:973–82. <https://doi.org/10.1007/s11248-013-9708-5>.
- [55] Regulatory Status <https://www.esf.edu/chestnut/regulatory.php> (accessed December 13, 2023).
- [56] Min J, Noble C, Najjar D, Esvelt KM. Daisyfield gene drive systems harness repeated genomic elements as a generational clock to limit spread. *bioRxiv* 2017. <https://doi.org/10.1101/104877>.
- [57] Esvelt K. Daisy Drives. MIT Media Lab <https://www.media.mit.edu/galleries/daisy-drives/> (accessed December 17, 2023).
- [58] Newhouse AE, Link to external site this link will open in a new tab, Powell WA. Intentional introgression of a blight tolerance transgene to rescue the remnant population of American chestnut. *Conservation Science and Practice* 2021;3. <https://doi.org/10.1111/csp2.348>.

- [59] A Call For Conservation with Conscience – SynBioWatch <https://www.synbiowatch.org/gene-drives-letter/> (accessed December 18, 2023).
- [60] Novak BJ, Maloney T, Phelan R. Advancing a New Toolkit for Conservation: From Science to Policy. *The CRISPR Journal* 2018;1:11–5. <https://doi.org/10.1089/crispr.2017.0019>.
- [61] Jachowski DS. Why Conservation Cloning Won't Save Endangered Species. *BioScience* 2023;73:5. <https://doi.org/10.1093/biosci/biac102>.
- [62] Woolly Mammoth De-extinction Project & Process | Colossal <https://colossal.com/mammoth/> (accessed December 19, 2023).
- [63] Boguslaw D. The CIA Just Invested in Woolly Mammoth Resurrection Technology. *The Intercept* 2022. <https://theintercept.com/2022/09/28/cia-extinction-woolly-mammoth-dna/> (accessed December 19, 2023).
- [64] Scientists Are Reincarnating the Woolly Mammoth to Return in 4 Years. *Popular Mechanics* 2023. <https://www.popularmechanics.com/science/animals/a42708517/scientists-reincarnating-woolly-mammoth/> (accessed December 19, 2023).
- [65] Macfarlane NBW, Adams J, Bennett EL, Brooks TM, Delborne JA, Eggermont H, et al. Direct and indirect impacts of synthetic biology on biodiversity conservation. *iScience* 2022;25:105423. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105423>.