



Редактирането на гени – нова техника с приложение в селекцията на растенията

(научен обзор)

Съществуват различни техники за подбор и въвеждане на желани характеристики при животни, растения и микроорганизми, използвани за производство на храни и фуражи: конвенционални техники за селекция, техники за генетична модификация и непрекъснато увеличаващият се брой техники, наречени нови техники за селекция. Новите техники могат да се използват в комбинация с другите две групи техники като всички те остават в употреба паралелно в по-голяма или по-малка степен.

Новите техники за селекция доразвиват последните постижения в областта на биотехнологията и молекулярната биология, а тяхното приложение и безопасност са предмет на задълбочени научни дискусии.

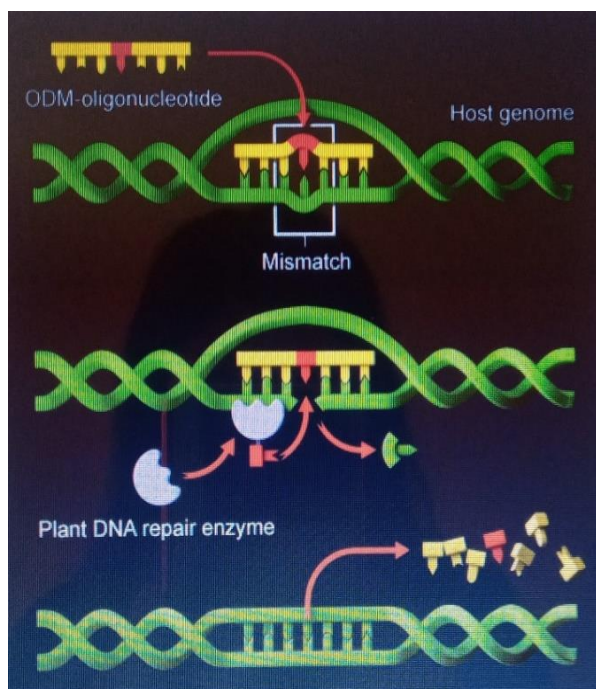
Една от новите техники за селекция, която се прилага при растенията, е **редактирането на генома**. Най-общо то има за цел да постигне или точно определена промяна на ДНК в клетката, или произволна промяна в точно определено място в ДНК молекулата. Това се постига с помощта на собствената репаративна система на клетката, която се активира посредством използването на:

- външна/чужда молекула ДНК (олигонуклеотид) при **насочената с нуклеотид мутагенеза** (*Oligonucleotide directed mutagenesis – ODM*);
- нуклеаза (*Site-directed nuclease – SDN*) – при **насочената с нуклеаза мутагенеза**;
- комбинация на двете.

Трябва да се подчертае, че мутациите получени чрез ODM и SDN ще бъдат трайно унаследявани, както тези при естествената мутагенеза. Унаследяването ще следва модела на Мендел в случаите, когато обект на мутагенезата са ядрени гени, митохондриални или пластидни генетични елементи.

НАСОЧЕНА С НУКЛЕОТИД МУТАГЕНЕЗА

Насочената мутагенеза посредством нуклеотид използва олигонуклеотиди за предизвикване (индуциране) на определени (цели) мутации в генома, обикновено в един или няколко съседни нуклеотида. Генетичните промени, които могат да бъдат получени чрез използването на ODM включват въвеждането на нова мутация (замяна на една или няколко базови двойки, изтриване или вмъкване) или обратна мутация.



Използваните при ODM олигонуклеотиди са с дължина от 20 до 100 нуклеотида и са синтезирани така, че да бъдат комплементарни с определена част от генома на клетката-реципиент с изключение на нуклеотида (нуклеотидите), които ще бъдат променени (фиг. 1). Олигонуклеотидите (в жълто) се свързват към последователността, към която са комплементарни в реципиентния геном, като това довежда до едно (или няколко) несъответствия в базовите двойки.

Фиг. 1. Механизъм на мутагенеза насочена с олигонуклеотид

Репариращата система на клетката разпознава тези „грешки“ и ги отстранява като използва за матрица или външния олигонуклеотид или нуклеотидната последователност на родителската верига, за да синтезира втора напълно комплементарна верига ДНК. Ако мутагенният (ODM) олигонуклеотид се използва като матрица за репарацията, неговата последователност се копира в ДНК на растителната клетка. В резултат на това се получава желаната промяна в генома. Мутагенните олигонуклеотиди се разграждат в клетката, а индуцираните мутации се унаследяват стабилно.

При ODM външният олигонуклеотид принадлежи на растителния вид, който се подлага на мутагенеза, ето защо при тази техника за редактиране на генома се постигат естествени вариации на алелите на определени гени, които

могат да бъдат получени и чрез конвенционално кръстосване, но по-трудно и за по-продължително време.

Растенията, които успешно са модифицирани чрез ODM са царевица, пшеница, рапица и банан. Най-често тяхната модификация е свързана с придобиване на толерантност към хербициди с широка употреба, а по-ограничено – с разработване на линии култури с удължен срок на годност, устойчивост на вредители и за подобряване на качеството и повишаване на добива.

По отношение на нежеланите/непланираните молекулярни промени от ODM, вследствие на които биха могли да възникнат потенциални рискове, те могат да се дължат както на мутацията/ите, предизвикана от ODM, така и да са резултат от използваните методи за въвеждане на олигонуклеотидите в реципиентните клетки. Освен това нежелани ефекти могат да възникнат и при получаването на растителни култури от мутиралите клетки. Желаната мутация при ODM често е точкова мутация, която води до определена промяна на даден ген. Например хербицидната толерантност получена чрез ODM се дължи на точкова мутация в гените, чиито продукти участват в метаболитните пътища на хербицида в растителната клетка. По-рядко се цели *knock-out* мутация, при която се заглушава експресията на определен ген. При ODM поради насочването на мутациите към конкретни места в генома, което може да бъде много прецизно, се очакват много по-малко нежелани ефекти в сравнение с методите на селекция чрез случайна мутагенеза. Въпреки това, при прилагане техниката на ODM са възможни нежелани ефекти:

- мутации извън определеното място – в друг участък от ДНК молекулата, която също е комплементарна на външния нуклеотид и нежелана интеграция на целия/част от нуклеотида използван за ODM;
- експресия на слети протеини при някои от мутациите, при които се премахва ген;
- произтичащи от процеса на трансфекция и методите на регенерация;
- вследствие въздействие на ODM олигонуклеотида върху регулацията на генната експресия в клетката.

При оценката на рисковете, свързани с растенията получени чрез ODM, е необходимо да се обърне внимание на възможните промени в генофонда на определена

селскостопанска култура и на потенциалните рискове за околната среда, произтичащи от промените в агротехническите мероприятия при модифицираните култури.

В сравнение с трансфера на цели чужди гени, промените предизвикани с ODM в генома са доста по-малко мащабни. По отношение на тази специфика, трябва да се обърне внимание, че:

- ✓ Дори малки молекулни промени могат да доведат до ясно изразено влияние върху експресията на съответните гени и/или техните функции в конкретно културно растение;
- ✓ При някои от ODM подходите (например с няколко мутационни цикъла или използващи интегрирани олигонуклеотиди) могат да се засегнат големи участъци от генома.

НАСОЧЕНА С НУКЛЕАЗА МУТАГЕНЕЗА

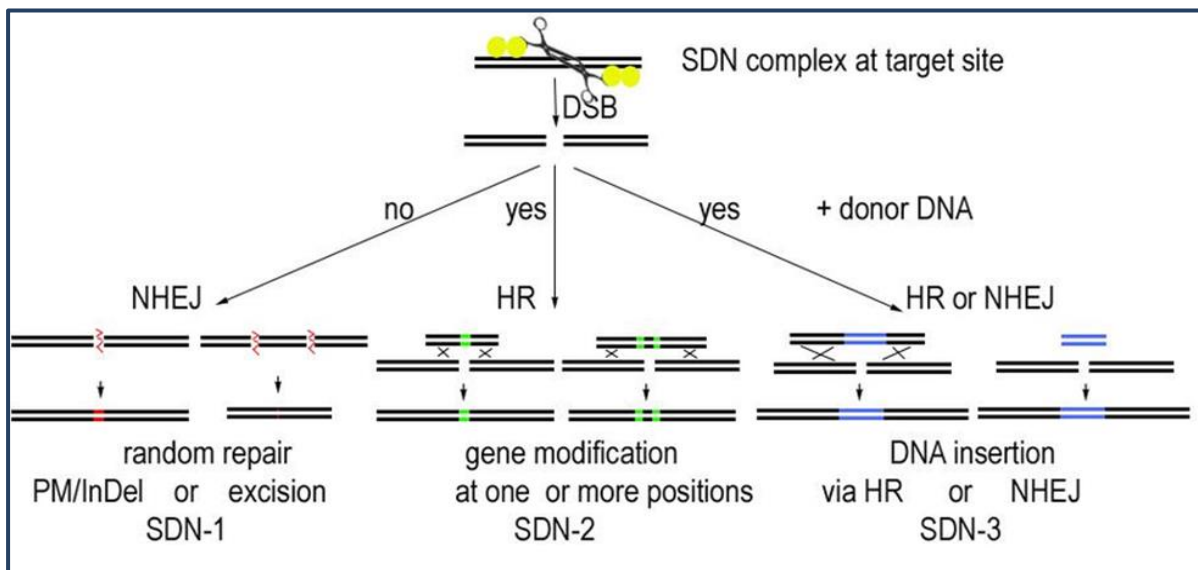
Редактирането на генома придобива по-широко приложение след разработването на насочени нуклеази, които предизвикват двойноверижни разкъсвания на ДНК молекулата на точно определени места. Целта на разкъсването е да се направи възможно вмъкването на тези места на случайни (SDN1) или неслучайни (SDN2) мутации или на големи сегменти (SDN3) (фиг. 2).

И трите приложения на техниката SDN се основават (както и ODM) на естествените клетъчни механизми за репарация на ДНК. SDN1 се осъществява чрез процес на нехомоложно свързване на отворените краища (*nonhomologous end joining – NHEJ*), а SDN2 и SDN3 – на репарацията чрез хомоложна рекомбинация (*homology-directed repair – HDR*).

Двойноверижните разкъсвания се „поправят“ чрез HDR или NHEJ. По-съвършен от гледна точка на клетъчната цялост е HDR механизъмът, тъй като при него се възстановява разкъсването и всяко разграждане на базови двойки, съседни на среза, като се използва сестрински хроматид¹ като матрица. Когато SDN присъства, обаче, процесът на репарация, водещ до възстановяване на мястото на срязване предизвиква ново разкъсване от нуклеазата. Това редуване на разкъсване и поправка продължава, докато

¹ Сестрински хроматиди – идентични нуклеопротеинови молекули, които са събрани заедно от центромера

не се получи неточна репарация, което довежда до мутация в определеното място в ДНК. При *NHEJ* механизъмът резултатът може да бъде или точна репарация на двойната верига или поправка с неточности, най-често малки инсерции или делеции. Като резултат от това може да се получи заглушаване експресията на определен ген, напр. чрез изместване на рамката за четене или чрез промяна на критичен регион на кодиращия протеин. Ето защо механизъмът NHEJ се счита за „предразположен към грешки“ и се използва за целенасоченото вмъкване на случайни мутации при SDN1.

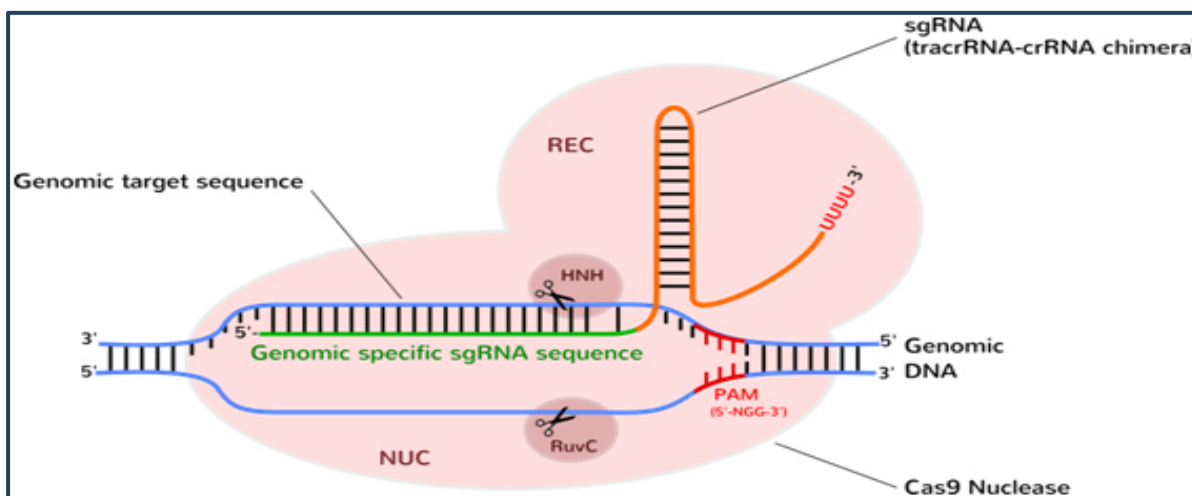


Фиг. 2. Планирани резултати от репарацията на разкъсаната от SDN двойна верига ДНК. SDN комплексът е разположен в горната част на фигурата и е свързан с целевата последователност. Репарацията се осъществява чрез нехомоложно свързване на отворените краища или чрез хомоложна рекомбинация с помощта на ДНК от донора, като при SDN1 двойните ДНК разкъсвания водят до случайни точкови мутации (PM) и къси вмъквания/делеции (InDel) или изрязвания; при SDN2 хомоложната донорска ДНК се използва за получаване на промени в нуклеотидната последователност чрез хомоложна рекомбинация, а при SDN3 – ДНК може да бъде интегрирана в растителния геном с помощта на нехомоложно свързване на получените отворени краища или хомоложна рекомбинация.

При репарацията чрез хомоложна рекомбинация за възстановяване на целевия участък като матрица се използва ДНК молекула с последователност комплементарна на този участък и репарацията се осъществява без грешки. При този процес могат да се използват и екзогенни хомоложни олигонуклеотиди, които са въведени в клетката за целите на редактирането на генома (при SDN2 и SDN3).

Първоначално ограничен успех в областта на насочената с нуклеаза мутагенеза е постигнат чрез насочване с протеин като са използвани мегануклеази, нуклеази с цинкови пръсти (*zinc finger nucleases* – ZFNs) и нуклеази, подобни на транскрипционен активатор (*transcription activator-like effector nucleases* – TALENs). ZFN и TALEN са разработени с цел да разпознават специфични последователности в молекулата на ДНК и да я разрезват в тези области. ZFN и TALEN са по-малко популярни в момента поради своята трудоемкост и сложност.

Техниките за редактиране на генома бързо се развиват след разработването на насочени посредством РНК SDN на базата на бактериалната CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)² и CRISPR-асоциираните (*CRISPR-associated protein* – Cas) нуклеази. CRISPR-Cas9 бързо се превръща в предпочитаната техника за редактиране на генома поради своята простота, ефективност и гъвкавост, а заради голямата си прецизност е наречена „молекулярна ножица“. За осъществяването ѝ са необходими два компонента: единична водеща РНК (*single guide RNA, sgRNA*) и ендонуклеазата Cas9 (фиг. 3).



Фиг. 3. Комплекс от Cas9 и sgRNA. Ножиците обозначават местата, където Cas9 срязва ДНК. (<https://www.bio-connect.nl/crispr-cas9-genome-editing-transfection-reagents/cnt/page/5171>)

Гените, кодиращи sgRNA и Cas9 се доставят в клетката и тя сама продуцира необходимите за процеса компоненти. Водещата РНК разполага с участък за свързване с Cas9 (в оранжево) и с нуклеотидна последователност, която е комплементарна на

² CRISPR са участъци от прокариотна ДНК, които съдържат множество повторения на къси части от гени

целевата част от генома (в зелено), който ще се редактира. Водещата РНК образува комплекс с Cas9 (в бледо розово), разпознава мястото за срязване и доставя нуклеазата до целта. Функцията на Cas9 е предизвикване на двойноверижно разкъсване на ДНК, след което клетката стартира своите механизми на репарация (чрез HDR или NHEJ).

Поради липсата на задълбочени познания за детайлите на механизмите, по които се осъществяват SDN мутациите, непланирани ефекти не могат да бъдат изключени. Най-често те произтичат от:

1. Насочването на използваните нуклеази може да не е достатъчно специфично: това води до възможността нуклеазата да предизвика вторични (извън целта) двойноверижни разкъсвания, които също да предизвикат мутагенеза. Установено е, че ZFN предизвикват значителна активност извън определеното място в ДНК и по-голямо клетъчно увреждане в сравнение с CRISP-Cas комплексът;
2. Дори когато насочването е достатъчно специфично, резултатът от репарацията при двойноверижното разкъсване, индуцирано от SDN, може да бъде различен (напр. точкови мутации, интегриране на чужди последователности, инверсии/транслокации на хромозомни участъци). Несигурността свързана с потенциалните нежелани ефекти е по-голяма при по-големи генетични промени;
3. *Knock-out* мутации, които са резултат от делеция водят до изместване на рамката на четене и потенциална експресия на слети гени;
4. Допълнителни източници на потенциални нежелани ефекти са свързани с необходимостта от доставяне на функционални нуклеази и донорска ДНК (при SDN 2 и 3) в растителната клетка за осъществяване на мутагенезата. Гените, кодиращи нуклеазата, и донорската ДНК се въвеждат временно или трайно в растителната клетка. Въвеждането на гените може да бъде постигнато по различни методи – за временно се прилагат електропорация, *Agrobacterium*-медирана трансформация, биолистична трансфекция, а за трайно се използва генетична трансформация (метод на генетичното инженерство, при който гените, кодиращи нуклеазата, се интегрират в генома на реципиента);
5. Използваните нуклеази също могат да предизвикат неблагоприятни ефекти в целевите клетки;

6. В зависимост от тяхната нуклеотидна последователност, водещите РНК на CRISPR/Cas нуклеазата могат да повлияят върху регулацията на генната експресия в клетката;
7. Също както при ODM, и при SDN могат да възникнат непланирани ефекти, свързани с осъществяването на самата мутация и с процеса на регенериране на растения от получените мутирани клетки.

Методите за **редактиране на растителния геном със SDN** са прилагани в последните години върху редица селскостопански култури (соя, царевица, рапица и др.) като са насочени към характеристики като толерантност към хербициди; устойчивост на вирусни заболявания; понижаване съдържанието на съединенията, блокиращи усвояването на хранителните вещества; подобряване на хранителните качества чрез увеличаване съдържанието на каротеноиди и промяна на каротеноидния баланс; модифициране на нишесте и мазнини; удължаване срока на годност; повишаване на качеството чрез редуциране на ензимното и неензимното покафеняване (при картофи); увеличаване на добива и подобряване на преобразуването на биомаса в био горива чрез понижаване съдържанието на лигнин.

Въпреки множеството неясноти, свързани с механизмите, по които се осъществяват мутациите, които са в основата на техниките за редактиране на растителния геном, проучванията в тази област продължат поради разнообразните ползи, които тези техники могат да предоставят на растениевъдството:

1. **Прецизна селекция**, която позволява постигане на желаната промяна в ДНК;
2. **Намаляване времето за селекция** (тъй като са необходими по-малко поколения растения, желаните резултати могат да се постигнат за 2 – 3 години в сравнение със 7 – 25 при конвенционалната селекция);
3. **Устойчивост към неприятели, плевели и болести** (позволява култивиране на растения без да се налага третиране с препарати за растителна защита);
4. **Устойчивост на абиотичен стрес** (повишаване толерантността към топлина, влага, соленост на почвата, засушаване и застудяване);

5. **По-високи добиви** с по-малък разход на торове и вода;
6. **Намаляване на хранителните отпадъци** – растителни продукти с удължен срок на годност (гъби, ябълки и картофи);
7. **Подобрени хранителни характеристики** (пшеница с по-високо съдържание на фибри, царевица с по-качествено нишесте, соя с по-високо съдържание на омега мастни киселини);
8. **Намаляване броя на разрешените генетично модифицирани растения**, с течение на времето и съобразно действащата правна рамка;
9. **Отговаряне на изискванията на обществото за устойчиво производство на храни** от култури с повишени добиви, като същевременно се опазва околната среда и се подпомага приспособяването към климатичните промени.

Безопасността на храните/фуражите получени от растения с редактиран геном е обект на обсъждания, като в момента тече обществена консултация по **научното становище на ЕОБХ³** относно валидността на заключенията направени от органа през 2012 г. (касаещи безопасността на растения получени чрез ZFN и други методи на основата на насочена мутагенеза) за растенията създадени с приложение на SDN (1 и 2) и ODM. **Окончателният вариант на становището се очаква през октомври тази година.**

Към момента се приема, че **растенията получени с техники на основата на мутагенеза попадат в обхвата на законодателството на Европейския съюз**, касаещо генетично модифицираните организми (Директива 2001/18/ЕО⁴), съгласно решението на Съда на ЕС (*Court of Justice of the European Union*) от 2018 г., а цялостната рамка за оценка на здравния риск и риска за околната среда от генетично модифицирани растения на ЕОБХ, може да бъде използвана като основа за разработката на подходящи подходи и методи за растенията получени чрез мутагенеза.

³ Европейски орган по безопасност на храните

⁴ Директива 2001/18/ЕО на Европейския парламент и на Съвета от 12 март 2001 година относно съзнателното освобождаване на генетично модифицирани организми в околната среда и за отмяна на Директива 90/220/ЕИО на Съвета

Източници:

1. Devos Y, Waigmann E, Papadopoulou N, Raffaello T, Schoonjans R and Healy A, 2020. Editorial: Advances in genetic engineering: EFSA public consultations in 2020. *EFSA Journal* 2020;18(2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.e18021> ISSN: 1831-4732
2. EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms), 2012. Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using Zinc Finger Nuclease 3 and other Site-Directed Nucleases with similar function. *EFSA Journal* 2012;10(10):2943
3. Explanatory note, New Techniques in Agricultural Biotechnology, SAM High Level Group of Scientific Advisors, April 2017
4. Feng Zhang, Yan Wen and Xiong Guo. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Human Molecular Genetics*, 2014, Vol. 23, Review Issue 1 pp 40–46
5. Lusser, M.; Parisi, C.; Plan, D. & Rodriguez-Cerezo, E. (2012): Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nature Biotechnology* 30:231–239
6. Noel J. Sauer, Jerry Mזורuk, Ryan B. Miller, Zachary J. Warburg, Keith A. Walker, Peter R. Beetham, Christian R. Schöpke, Greg F. W. Gocal. Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. *Plant Biotechnology Journal* (2016) 14, pp. 496–502
7. Puchta, H. and Fauser, F. (2014): Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *The Plant Journal*, *The Plant Journal* 78, 727–741
8. Riccroch, A. Global developments of genome editing in agriculture. *Transgenic Res* 28, 45-52 (2019)



Други научни становища и актуална информация от областта на здравето, хуманното отношение и благосъстоянието на животните, антимикробната резистентност, както и оценка на риска по цялата хранителна верига може да намерите на сайта на Центъра за оценка на риска по хранителната верига: <http://corhv.government.bg/>

6.07.2020 г.

ИЗГОТВИЛ:

ГЛ. ЕКСПЕРТ, А. ДИМИТРОВА

ДИРЕКЦИЯ „ОЦЕНКА НА РИСКА ПО ХРАНИТЕЛНАТА ВЕРИГА“

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0

