

## GENE EDITING - A HISTORY OF AND COMPARISON BETWEEN THE MOST COMMON METHODS

**Tudor SUCIU**

West University of Timisoara, Faculty of Chemistry, Biology, Geography, Department of Biology-Chemistry, Pestalozzi 16, Timișoara

\*Corresponding author e-mail: tudor.suciu98@e-uvv.ro

Received 15 January 2019; accepted 17 June 2019

### ABSTRACT

*Genome sequencing and editing is a domain that has gained rapid traction in the last 35 years, as increasingly advanced technologies led to new discoveries and, as a result, a more widespread use of the different gene editing methods we have access to and increased interest in the research and development of new methods. Moreover, the recent development of technologies such as CRISPR-Cas9 has allowed for both an increase in efficiency and a drastic decrease in costs and maintenance of the editing process, opening the pathway for affordable and therefore widespread genome editing. With clinical trials for CRISPR-Cas9 treatments in humans already funded and scheduled to take place in the near future, what was once a purely scientific debate has gained an ethical dimension as we get closer to being able to redefine humanity as a species. The purpose of this article is to summarize the history of gene editing, from the first genetically modified organism in 1973 up until the present day, and provide a comparative analysis between both old and new techniques, as well as offer an outlook on what these technologies might lead us to in the future.*

**KEY WORDS:** CRISPR, Cas9, ZFN, TALEN, gene editing, bacteria, Monsanto

Deși ingineria genetică a apărut ca domeniu de studiu abia în a doua jumătate a secolului trecut (Wright, 1993), modificările genetice ale organismelor vii ca urmare a influenței omului sunt un fenomen desfășurat constant de-a lungul a mii de ani, o dată cu apariția și dezvoltarea agriculturii de către primele civilizații omenești. Prin domesticirea animalelor și plantelor, oamenii au putut reproduce selectiv în acestea acele caractere utile supraviețuirii noastre, datorită unei preferințe pentru creșterea animalelor, respectiv consumul plantelor care prezentau respectivele trăsături. Putem observa impactul reproducerii selective, spre exemplu, urmărind de-a lungul mileniilor dezvoltarea lânii la *Ovis aries* (oaie) (Zohary et al. 1998), creșterea fructului la *Zea mays* (porumb) (Meyer & Purugganan, 2013) sau la *Citrullus lanatus* (pepene verde) și multe altele.

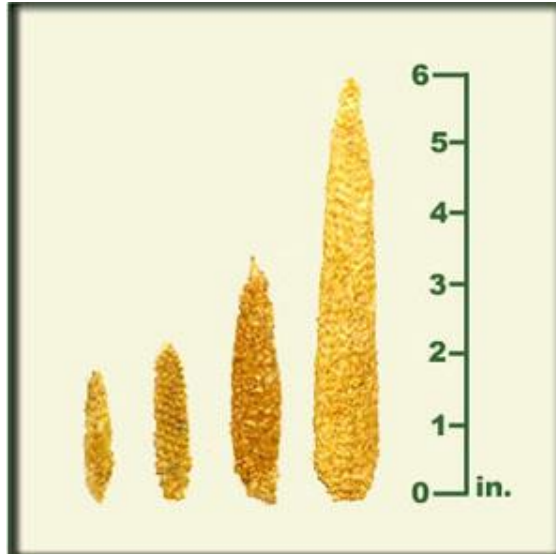


FIG. 1. Reprezentare a evoluției fructului la *Z. mays*.

Sursa: <https://www.texasbeyonhistory.net/trans-p/prehistory/images/AG-corn-evol.jpg>

În general, însă, reproducerea selectivă nu este considerată o metodă de inginerie genetică deoarece se produce de-a lungul unor perioade de timp foarte lungi și în mod pasiv și inconștient. Așadar, în continuare vom analiza metodele apărute ca rezultat al unui efort activ și voit de a modifica genomurile organismelor vii.

### Stadiile incipiente (1973-1990)

Printre cele mai vechi astfel de metode este cea descoperită în 1973 de către Herb Boyer și Stanley Cohen, a fost folosită pentru obținerea unei forme modificate de *Escherichia coli* ce prezintă rezistență la antibioticul numit tetraciclină prin modificarea ADNului plasmidial al bacteriei. Cei doi savanți au fragmentat plasmidele unor altor specii de bacterii, folosind enzime numite endonucleaze (mai specific, în cadrul acestui experiment, endonucleazele EcoRI și EcoRII) și au inserat fragmentele de ADN plasmidial obținute în plasmida bacteriei *E. coli* printr-o tehnică numită transformare, rezultând astfel o plasmidă nouă ce îngloba fragmentele de ADN plasmidial introduse. Un astfel de fragment, denumit R6-5, conține gena pentru rezistență la tetraciclină, genă ce s-a manifestat la bacteriile ce aveau plasmida nou obținută după modificarea genetică. (Cohen et al. 1973) Descoperirea lui Boyer și Cohen a fost crucială în dezvoltarea domeniului biotehnologiei, permițând utilizarea la scară industrială a bacteriilor cu funcții specifice

survenite din modificările genetice produse. Un exemplu ce ilustrează utilitatea acestor noi bacterii este producerea insulinei în specimene modificate genetic de *E. coli*, tehnică utilizată la scară largă din anul 1982 (Ladisich & Kohlmann, 1992).

### **Ingineria genetică în industria alimentară (1990-2005)**

Cu toate acestea, metoda lui Boyer și Cohen era limitată la organisme unicelulare, fiind capabilă să facă modificări doar la nivelul ADNului plasmidial. În anii '90, compania americană Monsanto extinde orizonturile ingineriei genetice în lumea plantelor prin introducerea culturilor agricole modificate genetic. Prin modificarea unei gene la *Solanum lycopersicum* (roșie), s-a creat așa-numita roșie Flavr Savr. Gena modificată este responsabilă de producerea enzimei numită poligalacturonază, enzimă care determină înmuierea roșiei, iar prin inserarea genei în anti-sens, s-au obținut versiuni modificate ale plantei ce produceau cantități mult mai mici de poligalacturonază, ceea ce a rezultat în obținerea unor roșii ce rămâneau ferme mult mai mult timp (Bruening & Lyons, 2000). Tot Monsanto va scoate pe piață la scurtă vreme mai târziu așa-numitele culturi Roundup Ready, versiuni modificate ale plantelor de *Glycine max* (soia), *Z. mays*, *Gossypium sp.* (bumbac) ș.a. ale căror modificări le fac rezistente la ierbicidul numit glifosfat (comercializat de companie sub numele de Roundup), precum și culturile „Bt” (utilizând ADN prelevat de la *Bacillus thuringiensis*), ce își produc propriul ierbicid (Altieri, 2004) (Gilbert, 2013).

### **Metodele moderne de editare genetică (2005-prezent)**

Una din cele mai importante inovații din domeniu și diferența cea mai mare dintre metodele anterior-prezentate și cele moderne de inginerie genetică este creșterea substanțială a gradului de specificitate în procesul de editare (Smith et al. 2014). De foarte multe ori, pentru a ajunge la rezultatele dorite, este nevoie de o singură corectură la câteva perechi de baze azotate sau de inserția unei secvențe de ADN într-o anumită poziție, acestea fiind posibile prin utilizarea tehnicilor apărute în ultimii 10 ani, dintre care cele mai importante pe care le voi descrie sunt, în ordinea cronologică a descoperirii lor, ZFN (zinc-finger nuclease), TALEN (transcription activator-like effector nuclease) și CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, Cas9 fiind una din proteinele asociate). Toate cele trei au în comun proprietatea de a produce rupturi în catena de ADN în poziții specifice, fiind programabile pentru a identifica și localiza anumite secvențe de baze azotate după care să se ghideze pentru secționarea catenei.

ZFN, prima dintre aceste tehnici apărută în 2010, operează ca un complex format dintr-o proteină cu rol de factor de transcriere (așa-numita proteină cu deget de zinc sau ZFP, numită astfel datorită structurii sale ce conține unul sau mai mulți atomi de zinc legați prin legături coordinative de

resturile aminoacizilor din proteină pentru a conferi stabilitate structurală) alături de o enzimă de tip nuclează numită Fok1. Proteina ZFP reprezintă componenta programabilă a complexului, fiind responsabilă de identificarea secvențelor de ADN căutate, și este construită prin asamblare modulară a „degetelor” componente. Fiecare „deget” poate recunoaște o secvență de 3 baze azotate, existând diferite „degete” pentru aproape fiecare secvență posibilă. Enzima Fok1 are simplul rol de a secționa catena dublă de ADN în locul indicat de proteina ZFP (Urnov et al. 2010).

Metoda TALEN, apărută la scurtă vreme după ZFN, este similară în multe aspecte cu aceasta, utilizând aceeași enzimă Fok1 pentru ruperea catenei de ADN. Diferența dintre cele două este că tehnica TALEN folosește pe post de factor de transcriere proteine provenite de la proteobacterii din genul *Xanthomonas*. În natură, bacteriile injectează acele proteine în corpul plantelor pe care le parazitează pentru a-i modifica genomul și a facilita astfel colonizarea plantei în cauză. Metoda TALEN este considerată similară cu ZFN în privința eficienței, însă are avantajul de a fi mai ușor de programat și folosit de către cercetători (Joung & Sander, 2013).

Nu în ultimul rând, cea mai recentă metodă a ingineriei genetice este reprezentată de complexul CRISPR-Cas, folosit prima dată în 2012 pentru clivarea in vitro a unei catene de ADN (Hsu et al. 2014). Acest complex, regăsit la marea majoritate a bacteriilor, a fost identificat ca fiind un mecanism de apărare a acestora împotriva virusurilor bacteriofage. Bacteriile ce supraviețuiesc infecției unui astfel de virus încorporează secvențe de ADN viral în poziții anume (denumite loci CRISPR). Pe baza acestor secvențe de ADN viral, bacteria își construiește un complex de proteine folosit ulterior la protecția împotriva aceluși tip de virus (Brouns et al. 2008). O anumită formă a acestui complex, denumită CRISPR-Cas9, a fost identificată ca fiind programabilă, folosind componenta CRISPR pentru a identifica secvențe specifice de ADN și Cas9 pe post de enzimă tip nuclează, servind astfel drept unealtă pentru modificări ale genomului similară cu ZFN sau TALEN. Spre deosebire de acestea, CRISPR prezintă avantajul unor costuri mult mai mici, precum și posibilitatea de a funcționa simultan în mai mulți loci CRISPR, crescând astfel substanțial viteza cu care se desfășoară procesul de editare (Cong et al. 2013)

Cele trei metode de inginerie genetică modernă sus-numite trec toate prin același proces - segmentează catena de ADN pentru a declanșa procesul de reparare pe bază de omologie al acesteia. Acest proces se poate desfășura în prezența sau în absența unui segment de ADN „donor”. În primul caz, vorbim de reparare prin omologie, caz în care se pot insera câteva baze azotate pentru a face o corectură la catena de ADN sau se pot introduce una sau mai multe gene în respectiva catenă la locul unde a avut loc segmentarea.

În cel de-al doilea caz, vorbim de concatenare neomoloagă, iar atunci fie cele două porțiuni de ADN sunt lăsate să fuzioneze din nou, ceea ce deseori provoacă ștergeri sau inserții minore de ADN ca urmare a unei alipiri imperfecte, fie are loc o a doua segmentare, ceea ce duce la eliminarea unei porțiuni mari din catena de ADN și alipirea fragmentelor rămase (Urnov et al. 2010).

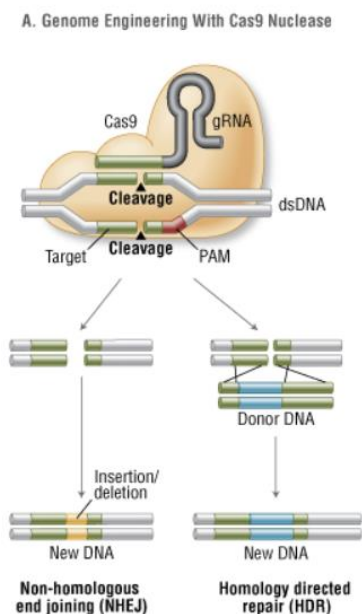


FIG. 2. Procesul de reparare pe bază de omologie la CRISPR-Cas9.

Sursa: [https://www.neb.com/-/media/nebus/files/feature-articles/images/fa\\_cas9\\_fig2\\_cas9forgenomeediting.png?la=en&hash=E8614E20FAB76135C1363B5DD58423B186AA8741&device=modal](https://www.neb.com/-/media/nebus/files/feature-articles/images/fa_cas9_fig2_cas9forgenomeediting.png?la=en&hash=E8614E20FAB76135C1363B5DD58423B186AA8741&device=modal)

Urmărind tendințele generale de evoluție ale metodelor folosite în ingineria genetică, putem constata două mari direcții de dezvoltare: pe de o parte, creșterea calitativă a procesului de editare, cuantificată prin gradul mai mare de specificitate, precum și reducerea costurilor materiale și creșterea randamentului acestui proces; iar pe de altă parte, o extindere treptată a plajei de opțiuni în ceea ce privește potențialele forme de viață ce pot suferi modificări genetice, de la organisme simple (bacterii precum *E. Coli*) la plante și apoi la celule animale, implicit celule de mamifere (Cong et al. 2013). Astfel, pentru prima dată în istoria umanității, avem acces la o tehnologie ce permite identificarea și corectarea de mutații genetice (Spielmann et al. 2016), iar

testările clinice pe oameni au început deja în Europa și SUA, în încercarea de a dezvolta un tratament pentru anemia falciformă (Banks, 2018). Cu toate acestea, posibilitatea de a redefini întregul genom uman și de a schimba radical modul în care privim viața pe Pământ aduce cu ea o serie de probleme de natură etică la care nu am găsit un răspuns, dar pe care va trebui să le soluționăm înainte ca această tehnologie să ia amploare, adică înainte să fie prea târziu.

### **Bibliografie**

- Altieri M. A. 2004. Genetic engineering in agriculture: the myths, environmental risks, and alternatives. Food First Books. 6 p.
- Banks M. 2018. First CRISPR Clinical Trial Begins in Europe. Scienceline. Retrieved from <https://scienceline.org/2018/11/first-crispr-clinical-trial-begins-in-europe/>
- Brouns S. J. J., Jore M. M., Lundgren M., Westra E. R., Slijkhuis R. J. H., ... van der Oost J. 2008. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*. 321(5891): 960–964.
- Bruening G., Lyons J. 2000. The case of the FLAVR SAVR tomato. *California Agriculture*. Retrieved from <http://calag.ucanr.edu/Archive/?article=ca.v054n04p6>
- Cohen S. N., Chang A. C., Boyer H. W., Helling R. B. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 70(11): 3240–3244.
- Cong L., Ran F. A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., ... Zhang F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 339(6121): 819–823.
- Gilbert N. 2013. A hard look at GM crops. *Nature*. 497(7447): 24.
- Hsu P. D., Lander E. S., Zhang F. 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6): 1262–1278.
- Joung J. K., Sander J. D. 2013. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 14(1): 49–55.
- Ladisch M. R., Kohlmann K. L. 1992. Recombinant human insulin. *Biotechnology Progress*. 8(6): 469–478.
- Meyer R. S., Purugganan M. D. 2013. Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. *Nature Reviews. Genetics*. 14(12): 840–852.
- Smith C., Gore A., Yan W., Abalde-Atristain L., Li Z., He C., Wang Y., Brodsky R. A., Zhang K., Cheng L., Ye Z. 2014. Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell*. 15(1): 12–13.
- Urnov F. D., Rebar E. J., Holmes M. C., Zhang H. S., Gregory P. D. 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews. Genetics*. 11(9): 636–646.
- Wright S. 1993. The social warp of science: writing the history of genetic engineering policy. *Science, Technology & Human Values*. 18(1): 79–101.
- Zohary D., Tchernov E., Kolska Horwitz L. 1998. The role of unconscious selection in the domestication of sheep and goats. *Journal of Zoology*. 245(2): 129–135.