

УДК 577.21

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВЫХ СТРАТЕГИЙ БИОИНФОРМАТИКИ НА ЭТАПЕ ПРОЕКТИРОВАНИЯ РАСТЕНИЙ С РЕДАКТИРОВАННЫМ ГЕНОМНОМ (ОБЗОР)

© 2023 г. И. В. Яковлева¹ *, А. М. Камионская¹

¹ Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Федеральное государственное учреждение
“Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук”, Москва, 117312 Россия

*e-mail: iacgea@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 16.06.2023 г.

После доработки 30.06.2023 г.

Принята к публикации 06.07.2023 г.

Идентификация рисков, связанных с новыми сельскохозяйственными продуктами растительного происхождения, полученными технологией геномного редактирования, — важный компонент генной инженерии. Острая дискуссия продолжается во всем мире о сходстве и различиях между “старыми” рисками “классических” ГМО и “новыми”, связанными с геномным редактированием растений, отсутствием методов идентификации новых рисков и их оценки. В настоящей статье разрабатывается новый перспективный инструмент обеспечения биобезопасности — концепция “безопасного проектирования”, вводящая хорошо известные стандарты безопасности в биоинженерию растений. Суть этой стратегии состоит в проведении редизайна для последовательной минимизации или предотвращения рисков, а также нецелевых эффектов геномного редактирования на этапе концепта. Учитывая, что корреляция между предсказанными *in silico* и определенными экспериментально нецелевыми эффектами гРНК является основной проблемой, осложняющей применение системы CRISPR, большинство исследований сегодня сосредоточено на эффективности дизайна гРНК. Напротив, настоящая работа сфокусирована на биоинформатическом поиске и изучении потенциальных промоторов, рассматриваемых как источник потенциальных рисков в случае их нецелевого редактирования и соответствующего изменения транскрипционной активности. Эти стратегии представлены нами в виде схемы оценки рисков для целей регулирования новых генетических технологий.

Ключевые слова: геномное редактирование растений, оценка рисков, биобезопасность, биоинформатика, нецелевые эффекты

DOI: 10.31857/S0555109923060211, **EDN:** CYEAXH

Достижения в технологии геномного редактирования произвели революцию в геномной селекции растений [1]. В настоящее время во всем мире ведутся острые дискуссии [2–4] по сопоставлению сходств и различий “старых” рисков “классических” ГМ растений и “новых”, связанных с геномным редактированием, по принципиальной возможности использования существующих методов для выявления и оценки новых рисков, а также проблем, связанных с трансграничным перемещением новых сельскохозяйственных культур и растительных продуктов.

Поскольку стандарты, а также лабораторные и биоинформатические методы детекции результатов геномного редактирования растений не разработаны, остается ключевой вопрос: как можно идентифицировать, контролировать и маркировать отредактированные культуры на рынке?

В данном обзоре основное внимание уделяется следующим вопросам:

— анализ потенциальных рисков сельскохозяйственных культур, полученных геномным редактированием, с целенаправленной и нецелевой модификацией для того, чтобы установить существуют ли какие-либо критические риски растений с отредактированным геномом по сравнению с традиционными культурами;

— обсуждение частоты нецелевого редактирования при использовании технологии CRISPR/Cas в сопоставлении со спонтанным мутагенезом и классической селекцией с использованием химических и физических факторов воздействия;

— возможность использования нового биоинформатического метода — множественного выравнивания для сильно различающихся последовательностей (MAHDS, Multiple Alignment for Highly

Divergent Sequences) [5] для прогнозирования потенциальных промоторов и связанных с ними рисков. Учитывая, что корреляция между предсказанными *in silico* и определенными экспериментально нецелевыми эффектами гРНК является основной проблемой, осложняющей применение системы CRISPR, большинство исследований сегодня [6, 7] сосредоточено на эффективности дизайна гРНК. Напротив, настоящая работа сфокусирована на интеграции биоинформатического метода MANDS [5] в новую схему оценки рисков растений с отредактированным геномом. Разработка концепции “безопасного проектирования” для растений с отредактированным геномом — новый подход, который привносит в биоинженерию растений известные идеи “безопасности” и “стандартов безопасности”.

Представленная здесь новая методология и новые инструменты для оценки рисков продуктов геномного редактирования растительного происхождения могут быть использованы в разработке научной и методологической базы регулирования геномной инженерии.

МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Был проведен обзор литературных источников, относящихся к сфере данной работы с использованием данных PubMed, Google Scholar, Web of Science и Elibrary. Поиск проводился на английском языке по следующим ключевым словам и сочетаниям: «растения с отредактированным геномом», «оценка рисков», «безопасное проектирование», «биобезопасность», «регулирование», «биоинформатика», «нецелевое редактирование», «контроль», а также с помощью “+”, “И” и “ИЛИ” для уточнения результата. Временной период 2018–2022 гг. был выбран, поскольку в работах Моджеевского с соавт. [8, 9] был ранее представлен анализ литературных источников за период 2000–2018 гг. Отбор статей (аннотации и/или полного текста) осуществлялся по критериям соответствия теме обзора:

- использование модельных растений или сельскохозяйственных культур;
- геномное редактирование растений, осуществленное с помощью CRISPR;
- геномное редактирование растения (SDN1 и SDN2), подтвержденное (точечная мутация, делеция или вставка);
- установленные нецелевые эффекты;
- оценка соотношения различных типов мутационного генома в растениях.

Почему оценка рисков имеет решающее значение? Пандемия COVID-19 заставила страны усилить свои позиции по целостности национальных и глобальных систем биобезопасности [10], идентификации рисков и определении границ их до-

пустимости, установлении правил трансграничной передачи. Форсированная пандемией была запущена глобальная инициатива “Единая биобезопасность” (One Biosecurity) [11], представляющая собой междисциплинарный подход к политике и исследованиям в области биобезопасности, основанный на взаимосвязи между здоровьем человека, животных и растений для эффективного предотвращения и смягчения воздействия междисциплинарных рисков, которые выходят за привычные границы здравоохранения, сельского хозяйства и окружающей среды. Целесообразно сменить действующую парадигму предотвращения рисков с помощью пограничных проверок и карантинных мер на оценку рисков, выходящую за секторальные и национальные границы и оценивающую глобальный риск, установить международные правила глобальной биобезопасности и биозащиты.

Отсутствие методов выявления продукции растительного происхождения, полученной геномным редактированием, и контроля за ее оборотом создает угрозу неконтролируемого оборота линий сельскохозяйственных культур с незадекларированными генетическими изменениями, особенно, для импортируемой продукции.

Разработка научных подходов к оценке биобезопасности новой сельскохозяйственной продукции растительного происхождения. По словам Генерального секретаря ООН А. Гутерриша, более 88 миллионов человек в мире страдали от сильного голода в 2020 г., что на 20% больше, чем в 2019 [12]. Перед лицом указанных тенденций, а также резко возросшего мирового спроса на продукты питания и топливо, вызванных сегодня экономическим кризисом, геномное редактирование сельскохозяйственных культур открывает огромные возможности для повышения их урожайности [13–15].

Для продукции генетических технологий базовым элементом, определяющим безопасность конечной продукции, являются научно-обоснованные риски [16, 17]. В соответствии с устоявшимся определением Организации экономического сотрудничества и развития (OECD) “научно обоснованный риск — это потенциально вредное воздействие, вызванное опасным событием (или рядом событий)” [18].

С научной точки зрения, следуя “принципу эквивалентности”, продукты с эквивалентными характеристиками должны обладать одинаковым уровнем рисков, связанным с внутренними характеристиками продукта, независимо от метода его получения. Однако признание факта, что генетическая модификация через трансгенез потенциально может представлять определенные риски, послужило основанием для введения специального регулирования, применяемого во всем мире к ГМ продуктам растительного происхожде-

ния, считающимися “новыми, неизвестными” [19–21]. Не изменило ситуацию и то, что сумма научных знаний (familiarity), накопленная за 25 лет широкомасштабных международных исследований рисков ГМО, делает ГМ растения не менее “известными”, чем продукция традиционных методов селекции.

Разработка подходов по дифференциации потенциальных рисков трансгенных организмов (ГМО) и организмов с направленными изменениями генома. Потенциальные риски и методология оценки рисков классических (трансгенных) ГМ растений неоднократно подробно описывались в различных международных документах, например, в Руководстве UNEP/CBD (Программа Организации Объединенных Наций по окружающей среде/Конвенция о биологическом разнообразии) по оценке рисков живых модифицированных организмов [22], многотомном руководстве Института Эдмондса (Вашингтон, США) [23], Директиве ЕС № 2001/18/ЕС [24], стандарте Персидского залива – GSO 2141:2011 [25], а также в национальных правовых актах, например, в российской “Методике производства экспертиз (исследований) биологической безопасности генно-инженерно-модифицированных растений для выращивания (выпуска в окружающую среду) на территории Российской Федерации” [26]. Для дальнейшего анализа воспользуемся новейшими определениями, введенными в связи с появлением новой технологии – геномного редактирования рядом стран: США [27], Аргентина [28], Япония [29–31]. Примером обновления понятийного аппарата генной инженерии может послужить и проект российского Федерального закона № 134176-8 “О внесении изменений в Федеральный закон “О государственном регулировании в сфере генно-инженерной деятельности” (2022 г.) [32]. Ключевым моментом новых международных определений является концепция дифференциации “трансгенных” организмов и “организмов с направленными геномными изменениями – организмов с отредактированным геномом”.

Не претендуя на исчерпывающие определения, можно достаточно обоснованно разделить получаемые генной инженерией растения на различающиеся группы объектов:

- трансгенный организм – это растение, генотип которого был изменен методами генной инженерии и которое содержит вставки рекомбинантных ДНК (или РНК);

- отредактированный организм – растение, генотип которого был изменен при помощи методов генной инженерии и в котором не содержатся вставки рекомбинантных ДНК (или РНК), или содержатся вставки, идентичные последовательностям, встречающимся в естественном генофонде этого растения.

Трансгенные линии растений, независимо от используемой технологии получения, однозначно подпадают под установленную действующую регуляторную сферу ГМО. Однако приведенная дифференциация ставит вопрос о неприменимости действующих нормативных положений и методик, касающихся оценки рисков, к растениям с отредактированным геномом, так как краеугольным камнем в действующих руководствах является вставка рекомбинантных ДНК (или РНК). Очевидно, что требуется серьезный пересмотр схемы принятия решений в отношении регулирования или дерегулирования отредактированных линий растений и изменение инструментальной базы для оценки связанных с ними потенциальных рисков [28].

Логично предположить, что в соответствии с определением, отредактированные линии растений будут содержать генно-инженерный материал, идентичный последовательностям, встречающимся в естественном генофонде. Можно согласиться, что удаление или замена одной пары оснований – это результат, который можно получить и с помощью традиционной селекции [33, 34]. Правомерным кажется и предположение, что любые риски, связанные с такими отредактированными растениями, будут аналогичными, равными или даже меньшими, чем риски, связанные с культурами, полученными известными методами селекции, или уже коммерциализованными продуктами [35].

Система CRISPR/Cas [36] – высокоэффективный и достаточно точный инструмент геномного редактирования растений, однако установлено, что редактирование сопровождается и нежелательными нецелевыми эффектами (off-targets). Необходимо оценить: реализуются ли случаи, когда off-targets вызывают потенциальные риски, критические для биобезопасности.

Результаты анализа литературных данных. На основе разработанных критериев было отобрано, в целом, 137 статей. В большинстве статей (77) для разработки направляющей гРНК и прогнозирования потенциальных нецелевых сайтов редактирования использовались стандартные инструменты биоинформатики, такие как CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>) и Cas-OFFinder (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>). Ряд авторов использовали альтернативные методы с инструментами поиска локального выравнивания (BLAST) для прогнозирования потенциальных нецелевых сайтов. Анализ показал, что только 20% статей (28) описывают нецелевые эффекты геномного редактирования, причем потенциальные нецелевые сайты, предсказанные *in silico*, были проанализированы после редактирования методом глубокого секвенирования (NGS, next generation sequencing).

Большинство описанных в источниках нецелевых эффектов геномного редактирования представляли собой небольшие вставки или делеции (1–22 п.н.) или точечные нуклеотидные замены, тогда как крупные делеции (>100 п.н.) встречались редко [37].

Проведенный анализ также показал, что обнаруженные экспериментально нецелевые сайты геномного редактирования имели не более 3 несовпадений (1–3 п.н.) с целевым геном-мишенью и располагались, в основном, в белок-кодирующих областях, чаще в гомологах целевого гена.

Следует отметить, что в 92% отобранных статей предсказанные нецелевые сайты были амплифицированы методом ПЦР, а ампликоны проанализированы секвенированием и выравниванием с эталонными последовательностями. Только в 9 статьях приведены данные полногеномного секвенирования отредактированных линий растений (WGS, whole genome sequencing).

Рассмотрим далее источники нецелевого редактирования генома растений и сопряженные с ними потенциальные риски.

Метод доставки. Одним из источников потенциальных рисков для отредактированных растений является способ доставки. Доставка в клетки растений компонентов геномного редактирования осуществляется двумя основными методами: в составе вирусного вектора или биобаллистической трансформацией.

Нуклеаза Cas9 наиболее популярна для редактирования растений. Однако конструкции CRISPR (кассеты ДНК, экспрессирующие белок Cas и направляющая РНК) могут деградировать или случайно интегрироваться в неизвестные сайты в геноме растения, вызывая побочные эффекты — неспецифические изменения, тем самым повышая риски редактирования.

Покажем, что вероятность реализации этого потенциального риска мала, но последствия могут быть серьезными. В работе [38] авторы продемонстрировали, что в случае использования конструкции Cas9/sgRNA, в целевом гене *eIF4E* у трансформированных растений огурца поколения T1 наблюдались лишь небольшие делеции и однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), а в предполагаемых нецелевых сайтах делеции не были обнаружены. При этом гомозиготное потомство T3 с отредактированным геном *eIF4E* продемонстрировало иммунитет к инфекции, вызываемой вирусом пожелтения жилок огурца (*Ipomovirus*), и устойчивость к потивирусам: вирусу желтой мозаики цуккини (ZYMV) и вирусу кольцевой пятнистости папайи (PRSV). В этом случае общий уровень риска можно оценить как низкий.

Напротив, исследование [39] показало, что при геномном редактировании гексаплоидных протопластов пшеницы, направленном на популярную

биологическую мишень EPSPS (5-енолпирувил-шикимат-3-фосфатсинтаза), крупные вставки (≥ 20 п.н.) последовательности, встроенной из ДНК вектора, обнаруживались с низкой частотой до 8.5% от общего числа инделей. Но последствия для отредактированной линии пшеницы могут быть очень серьезными, поскольку реализовалась SDN3 модификация, и линия может получить статус ГМО с соответствующим регулированием.

Успешный способ снизить нецелевые эффекты геномного редактирования — разработка репертуара Cas9 с высокой точностью и альтернативной (или ослабленной) специфичностью распознавания PAM (protospacer adjacent motif), в частности, с целью устранения требования NGG PAM (где N — любое основание). Например, в работе [40] был разработан новый вариант *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9), названный SpG, способный проявлять устойчивую активность с расширенным таргетингом — NGN PAM.

Противоположно, было показано [41], что в некоторых случаях риск нецелевого редактирования возрастает. Так, нуклеаза Cas12a осуществляла нецелевое редактирование в модельных экспериментах *in vivo* и создавала множественные двухцепочечные разрывы в рандомизированных сайтах с диапазоном несовпадений до 4 п.н. по сравнению с сайтом-мишенью.

Интересный пример успешного снижения нецелевых эффектов — использование мультиплексной системы CRISPR/Cas9 для одновременного нокаутирования генов *miR482b* и *miR482c* у томата с целью приобретения устойчивости к *Phytophthora infestans* [42]. Две из полученных отредактированных линий растений томата содержали нокаутированные гены *miR482b* и *miR482c*, а одна отредактированная линия — только *miR482b*. Однако у всех трех отредактированных линий томата симптомы фитофтороза были снижены по сравнению с аналогами дикого типа. Все три линии томатов, т.е. L1, L2 и L3, были изучены с целью поиска нецелевых эффектов, а три потенциальных нецелевых сайта (с высокой вероятностью нецелевых эффектов) — секвенированы *in silico*. Нецелевых изменений в предсказанных *in silico* сайтах обнаружено не было.

Однако следует отметить, что в данном исследовании, как и во многих других, для выявления нецелевых эффектов редактирования использовался широко распространенный, так называемый “предвзятый” подход, когда анализируется только целевой фрагмент, а систематическое исследование для выявления нецелевых эффектов в масштабах всего генома не проводится.

В плане снижения рисков весьма перспективно использование рибонуклеопротеинового комплекса (РНП) для прямой доставки CRISPR/Cas9 в протопласты, но на сегодня для растительных

объектов метод описан, в основном, для развития устойчивости к болезням сорта винограда Шардоне и сорта яблони Голден Делишес [43]. Редактированием гена MLO-7 была достигнута устойчивость к мучнистой росе у сортов винограда, и три гена: DIPM-1, DIPM-2 и DIPM-4 были редактированы у растений яблони для повышения устойчивости к бактериальному ожогу. Такой подход позволяет новым отредактированным сортам избегать регулирования по действующим в США правилам для ГМО. А в ряде стран: Аргентине, на Филиппинах, в Японии улучшенным отредактированным сортам яблок и винограда соответствует новый статус — “организм с отредактированным геномом”, что гарантирует упрощенное регулирование, отделенное от ГМО.

Во избежание регуляторных проблем и рисков, связанных с наличием трансгенов, введенные кассеты экспрессии для геномного редактирования растений могут быть удалены путем последующей генетической сегрегации. Например, в работе [44] предложен протокол для тонкой регуляции экспрессии генов на уровне трансляции у растений путем редактирования эндогенных открытых рамок считывания с использованием системы CRISPR/Cas9. С использованием этого метода, может быть легко получено поколение T0 без встроенного трансгена.

Однако метод генетической сегрегации имеет определенные ограничения, так как он не применим к культурам, размножаемым бесполом путем, таким, как картофель.

Направляющая РНК. Подбор направляющей РНК для уникальной последовательности в геноме растения обеспечивает высокую специфичность редактирования. Однако было показано, что комплекс Cas9-sgRNA способен взаимодействовать и с другими последовательностями нуклеотидов в геноме, обладающими высокой гомологичностью с последовательностью-мишенью [45].

Это второй серьезный источник нецелевых эффектов редактирования. Например, при изучении мутагенеза с помощью CRISPR/Cas9 на модельном растении *Nicotiana benthamiana* [46] было показано, что система CRISPR/Cas9 может быть не такой специфичной, как TALEN-индуцированный мутагенез, поскольку целевая последовательность sgRNA составляет всего 20 п.н. В общей сложности в геномной базе данных *N. benthamiana* (с использованием BLASTN) было идентифицировано 98 потенциальных нецелевых последовательностей, обладающих гомологией к сайту-мишени длиной в 20 п.н. Анализ 18 из идентифицированных сайтов-мишеней, имеющих 14–17 п.н., идентичных целевой последовательности, не представил доказательств нецелевого редактирования. Тогда как оставшиеся представляли собой нецелевые модификации.

В дальнейшем было показано, что для взаимодействия комплекса Cas9-sgRNA с геномной ДНК наиболее критична комплементарность первых 12 нуклеотидов, примыкающих к последовательности PAM, а несовпадения нецелевой последовательности с гРНК составляют 1–3 п.н.

В недавнем обзоре [47] было обнаружено, что нецелевые модификации наблюдались у 12 видов сельскохозяйственных культур, в том числе, большое число исследований (10 из 28) посвящено идентификации нецелевых эффектов геномного редактирования риса. Например, в случае трансформации риса (*Oryza sativa*) с помощью системы CRISPR/Cas9, опосредованной *Agrobacterium tumefaciens*, для одной направляющей гРНК были идентифицированы индели во множестве сайтов.

Как было показано, риск нецелевого редактирования возрастает со сложностью генома растений и наиболее вероятен в случае основных продовольственных культур: пшеницы, ячменя, кукурузы, обладающих большими и сложными геномами. Напротив, низкий уровень нецелевой активности нуклеазы Cas9 продемонстрирован для отредактированных линий растений томатов, винограда, цитрусовых и бананов, устойчивых к вирусам, грибам и бактериям [47, 48].

Частота нецелевых эффектов геномного редактирования. При рассмотрении частоты нецелевых эффектов, которые могут произойти в результате геномного редактирования сельскохозяйственных культур, важно проводить сравнение с частотой изменений генома, которые происходят у растений в естественных условиях. Независимо от источника генетических изменений мутация у высших растений может приводить к ошибкам, некоторые из которых могут вызывать прямые токсические эффекты, снижая синтез белка, разрушая клеточные мембраны, подавляя рост растений, приводя к слиянию хромосом или вызывая генетические изменения в популяции растений, которые могут быть переданы следующим поколениям. Растения постоянно подвергаются экологическому стрессу, в том числе действию ультрафиолетового излучения, озона и абиотических стрессов (засухи, затопления, загрязнения воздуха и почвы), которые могут вызывать целый ряд повреждений ДНК, в том числе одноцепочечные (SSB) и двухцепочечные разрывы (DSB) вследствие реакции на стресс [49]. DSB считаются одной из наиболее серьезных форм повреждения ДНК, поскольку они могут вызвать гибель клеток, потерю генетической информации или генотоксические эффекты, в случае, если не могут быть точно восстановлены. У высших растений DSB, в основном, восстанавливаются по механизму нехомологичного соединения концов. Для поддержания стабильности генома, фертильности и генетического

разнообразие в кодирующих регионах должны существовать точные механизмы репарации ДНК, а подверженная ошибкам репарация служит источником естественных мутационных вариаций, важных для эволюции растений и полезных для улучшения сельскохозяйственных культур [50]. В процессе селекции традиционно создавались мутации растений с использованием химических или физических факторов воздействия, случайным образом индуцируя DSB в геноме и редко получая желаемые фенотипы.

Например, было показано, что при радиационном облучении может быть достигнута частота мутаций от 6.63×10^{-3} на п.н. до 3×10^{-8} на п.н. [48]. С помощью радиационного мутагенеза было произведено более 3000 сортов сельскохозяйственных культур, которые используются во всем мире без нормативной оценки рисков (за исключением Канады) [51]. В соответствии с Базой данных ФАО/МАГАТЭ по мутантным сортам (<https://nucleus.iaea.org/sites/mvd>) на данный момент в мировом масштабе зарегистрировано 873 мутантных сорта риса, 307 сортов ячменя, 265 сортов пшеницы, 182 сорта сои и т.д.

С другой стороны, в полученной нами выборке литературных источников были выделены пять исследований [52–56], в которых проводилось полногеномное секвенирование растений с редактированным геномом, и результаты WGS отредактированных растений сравнивались с данными по спонтанным мутациям, а также с частотой мутаций, индуцированных нецелевым химическим мутагенезом или облучением. В качестве примера можно привести сравнение частоты спонтанных и химически индуцированных мутаций с частотой нецелевых эффектов геномного редактирования для модельного растения *Arabidopsis thaliana*.

В недавнем исследовании [53] частота спонтанных гаплоидных однонуклеотидных мутаций (SNM) для *Arabidopsis thaliana* (сравнение с эталонном “1001 геном”) составляла 6.95×10^{-9} на сайт на поколение (25 поколений). Частота вставок/делеций составляла 1.30×10^{-9} на сайт на поколение. Тогда как в случае ЭМС (этилметансульфонат)-индуцированной химической мутации арабидопсиса (экотип *Landsberg erecta*) было показано [57], что частота мутаций примерно на три порядка выше: 11×10^{-6} на сайт на поколение.

Что касается геномного редактирования *A. thaliana*, то среди 28 исследований, упомянутых ранее, только в двух сообщалось о нецелевых эффектах. В работе [52] авторы получили двойные мутанты, имеющие одну идентичную нецелевую вставку (с частотой мутаций по данным WGS, равной 9.8–97.3%), которая имела два несовпадения с геном-мишенью.

Таким образом, модификации генома с использованием CRISPR/Cas9 или других реаген-

тов геномного редактирования гораздо более сайт-специфичны, чем аналогичные модификации, получаемые с использованием традиционных в селекции растений подходов, а частота DSB, обнаруженных в нецелевых сайтах, вероятно, сопоставима или ниже, чем частота мутаций, индуцированных естественным путем [8, 9].

Риск геномного редактирования промоторов. Модуляция экспрессии генов — острая тема для онтогенеза растений, так как при модификации (или вставке) промоторных последовательностей возможно изменение профиля экспрессии любых генов в геноме растения, что может привести к изменениям в его развитии. Благодаря этому, культура может приобрести новые биологические свойства, которых не было запрограммировано в референсном геноме. Следовательно, мы можем рассматривать неспецифическое редактирование промоторных последовательностей как источник потенциальных рисков.

В то же время, Сонг с соавторами [58] исследовали прикладное значение SNP в промоторах для селекции сельскохозяйственных растений. При изучении накопления антоцианов в сортах зеленой капусты ими было показано, что SNP в положении 1118 (в геномной ДНК BoDFR1 длиной 1580 п.н.) влияет на уровень (высокий или низкий) экспрессии антоцианов. Следовательно, SNP в промоторной области может служить ПЦР-маркером в селекции, направленной на сохранение темно-зеленой окраски листьев во время сбора урожая независимо от времени года.

Этот пример показывает, что идентификация промоторных последовательностей в геноме эукариот с помощью компьютерных методов — важная задача биоинформатики. Однако проблема точного прогнозирования на сегодня не решена, так как даже самые лучшие алгоритмы могут предсказать один ложноположительный промотор на 103–104 основания ДНК. В результате невозможно отличить истинный промотор в геноме от ложных предсказаний.

Для обнаружения неспецифических (или скрытых) изменений в геноме растений нами разрабатывается “математический метод расчета множественного выравнивания для сильно различающихся последовательностей (MAHDS)” [59]. MAHDS позволяет строить статистически значимые выравнивания для нуклеотидных последовательностей, накопивших более 2.5 случайных замен (х) на один нуклеотид относительно друг друга, а именно в диапазоне от 2.4 до 4.4.

Оригинальные российские математические методы множественного выравнивания промоторных последовательностей позволяют осуществить расчет статистически значимых классов потенциальных промоторов и оценить затем их пересечения с потенциальными сайтами нецелевого редакти-

рования. Данные расчеты для генома риса находятся в стадии разработки [60, 61]. Например, в статье [62] проведено множественное выравнивание последовательностей промоторов генома риса (как модельного растительного генома), и найдено 37390 промоторов, предположительно неизвестных генов. Множественные выравнивания нуклеотидных последовательностей можно рассчитать на сайте <http://victoria.biengi.ac.ru/mahds/auth> (по состоянию на 07 июня 2023 г.).

Таким образом, данный метод — точный инструмент для выявления потенциальных промоторов неизвестных генов и прогнозирования возможных рисков.

КОНЦЕПЦИЯ БЕЗОПАСНОГО ПРОЕКТИРОВАНИЯ ДЛЯ РАСТЕНИЙ С РЕДАКТИРОВАННЫМ ГЕНОМ

Концепция безопасного проектирования (далее — **БП**) еще не получила широкого признания в биотехнологии, однако с 2009 г. она набирает популярность в синтетической биологии. Принципиальные позиции БП, которые делают этот подход применимым и перспективным для обеспечения безопасности продукции генетических технологий, в частности, геномного редактирования, следующие:

- БП устанавливает, что на стадии концепта определяются варианты дизайна для минимизации или предотвращения рисков, а затем они интегрируются в разработку;

- БП включает безопасность как цель и полезный признак конечного продукта;

- пассивное БП включает интегрирование в геном инструментов тестирования, контроля или самоуничтожения;

- БП направлено на безопасность продукта и связанных процессов на протяжении всего жизненного цикла: от фазы исследований и разработок (R&D) до производства, использования, переработки и утилизации.

Циклы проектирования в концепции БП повторяются, каждый раз достигая снижения неприемлемых рисков за счет использования различных стратегий.

Рассмотрим далее две стратегии, представляющие интерес для концепции БП в геномном редактировании растений.

Стратегия 1: разработка взаимосвязи генотип-фенотип для уменьшения нецелевых эффектов (off-targets). Реализация этого принципа происходит на начальной стадии разработки: стадии концепта.

Для реализации редактирования CRISPR/Cas9 используются инструменты биоинформатики с целью создания гидовой РНК с оптимизированной длиной последовательности и нуклеотидным

составом для высокоспецифичного распознавания сайта связывания в гене-мишени. В случаях, когда предполагается внесение вставок (технология SDN3), для обеспечения безопасности продукта допускается использование при проектировании только безопасных генетических элементов из списков GRAS (General Recognized as Safe, FDA) в США и QPS (Qualified Presumption of Safety, EFSA) в ЕС.

Однако анализ базы данных ЕС по культурам с редактированным геномом [64] обнаружил, что большинство отредактированных сельскохозяйственных растений — продукты технологии SDN1: рис, кукуруза, соя и пшеница. Садовые растения (томаты, яблони, ягодные культуры, папайя и др.), обладающие, например, устойчивостью к биотическому стрессу и болезням, также получены по технологии SDN1. Как уже было показано выше, частота нецелевых мутаций в этих случаях довольно низка.

Однако комплексный анализ рисков должен включать и иные факторы, например, изменение уровня нецелевых мутаций с течением времени.

Документально подтверждено [65], что с течением времени повышается эффективность редактирования генома с использованием CRISPR/Cas9 в культивируемых зародышах сои. Этот факт может указывать на продолжающуюся экспрессию Cas9 во время эмбрионального развития и роста растений, а также на возможность дозозависимого (концентрация × время) эффекта, способного увеличивать число нецелевых мутаций. Аналогичные исследования были проведены на соматических зародышах какао [66], когда технологией геномного редактирования было создано несколько стабильно трансформированных геномов соматических эмбрионов. После клонирования и секвенирования биоинформатически спрогнозированных нецелевых сайтов был задокументирован низкий уровень нецелевого редактирования. В то же время возникает вопрос, может ли продолжаться редактирование в случае стабильной интеграции sgRNA и Cas9? Существует вероятность, что анализ мутантного дерева какао, достигшего зрелости, продемонстрирует иной результат с точки зрения уровня нецелевых изменений и степени риска.

Интересной темой пассивного безопасного проектирования, пока еще слабо разработанной для растений, является тестирование генетических переключателей на стадии концепта, в частности для временной регуляции экспрессии. В настоящее время наиболее широко используемые химические переключатели относятся к группе гормонов, регулирующих рост и развитие растений, что позволяет точно управлять клеточными процессами [67]. Примером могут служить переключатели на основе Cas9-репрессора регуляторных гормональных жасмонат- и ауксин-зависимых сигнальных

путей, внедренные в арабидопсис (*Arabidopsis thaliana*). Этот инструмент, используемый для регуляции гормональных сигнальных путей, позволяет управлять стрессоустойчивостью и урожайностью сельскохозяйственных культур. Однако химические переключатели ограничены с точки зрения пространственно-временной активации системы из-за множества молекул-индукторов, диффузии и общих токсических эффектов.

Стратегия 2: разработка математических методов обнаружения искусственных перестроек в геноме растений. Подходы WGS дают возможность однозначно характеризовать результаты редактирования по всему геному. Однако в настоящее время качество и объем геномной информации для растений недостаточны, и существуют неопределенности в выявлении мутаций из-за однонуклеотидных вариаций (аллелей) и невозможности полной сопоставимости изучаемого генома и эталонного [5]. Локализация потенциальных нецелевых сайтов в кодирующих областях, интронах, промоторах, межгенных областях также очень важна, поскольку от этого зависит степень риска нежелательных последствий нецелевого редактирования. Необходимость выявления нецелевых эффектов редактирования генома привела к разработке методов обнаружения, которые ранее применялись к прокариотическим системам, но еще не были распространены на сельскохозяйственные культуры.

Недавняя сравнительная оценка биоинформатических моделей прогнозирования [6] показала, что для наборов данных различных организмов (человек, мышь, рыба данио) корреляция между предсказанной и фактической эффективностью гРНК сильно отличается. Одновременно было установлено, что на данный момент отсутствуют воспроизводимые правила дизайна гРНК для различных объектов редактирования.

Учитывая эти нерешенные проблемы, метод MANDS поиска неаннотированных потенциальных промоторов предоставляет новые возможности для разработки правил дизайна гРНК для растений. Во-первых, предсказанные потенциальные промоторы указывают на местонахождение и позволяют идентифицировать возможные гены. Во-вторых, если в предсказанных потенциальных промоторах обнаруживается непреднамеренная мутация (расположенная не ближе, чем 1000 п. н. upstream от известных генов), то она должна быть включена в процесс оценки рисков и принятия решения. Причина состоит в следующем: известно [68], что одиночные SNP демонстрируют различную аффинность связывания факторов транскрипции с альтернативными аллелями, и нецелевые изменения в промоторных последовательностях могут иметь функциональные последствия, связанные с формированием фенотипа.

Потенциальное место безопасного проектирования в системе регулирования отредактированных растений. Обобщая предложенные стратегии БП для растений, получаемых геномным редактированием, рассмотрим их место в системе регулирования и контроля объектов растительного происхождения. Предлагаемый подход БП может быть включен как дополнительная инструментальная оценка безопасности (на стадии проектирования и НИОКР) в действующую систему регистрации растений, полученных традиционной селекцией. В табл. 1 приведены этапы и методы предварительной оценки рисков при разработке и подготовке регистрационного досье растений с отредактированным геномом.

На стадии концепта нового отредактированного растения (этап 1) стратегия БП предусматривает выполнение для генома эталонного растения следующих процедур *in silico*:

Шаг 1: поиск и идентификация потенциальных нецелевых сайтов (ПНС) редактирования стандартными методами BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Cas-OFFinder (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>), или CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>) или другими. Анализ выявленных ПНС, принимая во внимание их локализацию: в кодирующих областях, интронах, промоторах, межгенных участках, так как от этого зависит степень риска возникновения нежелательных последствий нецелевого редактирования;

Шаг 2: прогнозирование потенциальных промоторных последовательностей (ПП) с помощью нового вычислительного метода (MANDS);

Шаг 3: выявление пересечений потенциальных промоторных последовательностей и потенциальных нецелевых сайтов. В случае если потенциальные нецелевые мутации попадают в область потенциальных промоторов, предсказанных MANDS, прогнозируемый риск отредактированного растения может быть высоким;

Шаг 4: редизайн с целью снижения потенциальных рисков. Итерации дизайна гРНК и выбор Cas для снижения рисков.

В то же время следует учитывать, что безопасность является общественной ценностью, и восприятие биобезопасности может различаться у разных заинтересованных сторон. Имеются в виду предварительные консультации разработчиков с регистрирующими органами и общественностью на этапе 1 с целью доказательства реализуемости концепта. Такой подход применяется на практике, например, в Аргентине [28]. Концепция БП допускает участие различных экспертов и заинтересованных сторон в каждом редизайне, выявлении рисков и определении факторов, необходимых для обеспечения безопасности.

Таблица 1. Схема оценки рисков для растений с редактированным геномом

Этап	Риски	Стратегии	Методы /подходы	План испытаний
Этап 1. Разработка концепции и дизайна редактированного растения.	Потенциальные теоретические риски геномного редактирования	Дизайн и конструирование гРНК для снижения нецелевых эффектов. Выбор Cas белка: нативные Cas9, Cas12a, Cas13 или их мутантные формы. Тип редактирования: нокаут ген, точечные мутации, делеции, инсерции, др.	Биоинформатика. Использование официально рекомендованных безопасных организмов. Транскриптомика. Протеомика. Метабономика.	Шаг 1. Предсказание потенциальных нецелевых сайтов (ПНС) с использованием стандартных методов BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), Cas-OFFinder (http://www.genome.net/cas-offinder/), CRISPR-P 2.0 (http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2)
			Математический метод MANDS	Шаг 2. Предсказание потенциальных промоторов (ПП) неизвестных генов, идентификация регуляторных последовательностей.
			Биоинформатика	Шаг 3. Анализ пересечений ПП и ПНС.
				Шаг 4. Итерации дизайна гРНК и выбор Cas для снижения рисков.
Доказательство реализуемости концепта	Регуляторные, этические, социальные риски	Консультации с регуляторами, специалистами и широкой общественностью	Консультации	Предварительная заявка. Рабочие совещания с селекционерами, регуляторами, производителями, молекулярными биологами, специалистами по этике и праву, представителями общественности.
	Геномное редактирование	Нецелевые эффекты. Редактирование промоторов.	Экспериментальная оценка нецелевых эффектов.	ПЦР, ПЦР-РВ, NGS, WGS Анализ и идентификация нежелательных мутаций в ПНС. Шаг 1. Амплификация, секвенирование (NGS) и анализ области длиной 250–300 п.н., центрированной относительно разрыва. Результаты позволят анализировать вставки или замену оснований в месте разрыва, вставку ДНК в ПНС и мутации в результате репарации. Шаг 2. WGS геномов исходного и отредактированного растений.
	Регенерация растения	Нежелательные последствия редактирования нецелевых сайтов.	Экспериментальная оценка рисков поколения T ₀ .	Электрофорез белков в ПААГ с ДДС-Na в поколениях T ₀ .
	Размножение	Желательный / нежелательный фенотип. Наследуемость.	Оценка поколения T ₀ , наследуемости.	Экспериментальное исследование желательного/нежелательного фенотипа растения.

На этапе 2, когда растение с отредактированным геномом уже получено, стратегией БП предлагается, как более быстрый и экономичный вариант, проведение экспериментального анализа предсказанных потенциальных нецелевых сайтов. Принятие решения может рассматривать и учитывать различные варианты.

Первый случай, когда нецелевые изменения в ПНС не выявлены, это позволяет перейти к дальнейшим лабораторным исследованиям соответствия внесенных редактированием целевых изменений генома растения его фенотипу.

Во втором случае, при обнаружении в ПНС нецелевых изменений, можно рекомендовать следующий этап: проведение WGS исходного и отредактированного геномов растения и их сравнительный анализ с поиском положения внесенных делеций, вставок или больших хромосомных перестроек. В зависимости от полученных данных может проводиться оценка рисков и принятие решения о биобезопасности отредактированной культуры.

Редактированные растения, получившие оценку “низкий риск”, потенциально могут проходить процедуры регистрации по аналогии с традиционными сортами. Например, в России за государственную регистрацию и регистрационные испытания нового сорта или гибрида, отвечает Государственная комиссия по испытанию и охране селекционных достижений (ФГБУ “Госсорткомиссия”, Россия). В случае пищевого применения культуры проводятся дополнительные испытания и регистрация в соответствии с Техническим регламентом Таможенного союза 021/2011 “О безопасности пищевых продуктов”. В комплекс исследований для растений, полученных традиционной селекцией, входят: токсичность, аллергенность, нутриентный состав, пищевая ценность и др. в зависимости от категории продукта (детское питание, функциональное питание, продукты питания и др.). Несомненно, что в каждой стране есть свои нормативные требования к традиционным сортам и продуктам питания.

Следует отметить, что, в целом, в разных странах модели правового регулирования и подходы к контролю безопасности использования растений с отредактированным геномом существенно различаются. Бразилия и Аргентина стали пионерами биотехнологических инноваций, выведя отредактированные растения из-под ограничительного регулирования. В Аргентине, в соответствии с законодательством, регистрация, контроль и надзор в области геномных технологий осуществляется на основе риск-ориентированного подхода, разработанного с учетом научно-технических критериев, прежде всего наличия новой комбинации генетического материала в растении [28]. Несомненно, 2022 г. был плодотворным для выпуска

новых правил для отредактированных растений. Так, новые Филиппинские правила [69] предусматривают процесс дифференциации регулирования растений с отредактированным геномом от ГМО. Эти правила гласят, что продукты, в которых отсутствует новая комбинация генетического материала, будут соответствовать по нормативно-правовому статусу традиционной продукции. Индия [70] объявила об освобождении отредактированных растений, не несущих чужеродных генов, от обязательной обработки как ГМО. ЕС длительное время занимал противоположную позицию, но 5 июля 2023 г. Европейская комиссия внесла “Предложение о Регламенте для растений, полученных с помощью некоторых новых геномных технологий (NGT), и пищевых продуктах и кормах из них, а также о внесении поправок в Регламент (ЕС) 2017/625” [71]. Впервые в ЕС вводится новый термин — “Растение *NGT*”, который означает “генетически модифицированное растение, полученное путем направленного мутагенеза, цисгенеза, интрагенеза или их комбинации, при условии, что растение *NGT* не содержит какого-либо генетического материала, выходящего за пределы генофонда селекционеров, и который мог быть временно вставлен при разработке”. В рамках этого определения “растения *NGT категории 1*” считаются эквивалентными растениям, выведенным традиционным путем, и больше не потребуют предварительной оценки рисков на индивидуальной основе.

В России система регулирования вступает в новый этап: реформирование концепции российского законодательства в сторону регулирования, ориентированного не на процесс — генную инженерию, а на безопасность “продукта” генетических технологий (продукт-ориентированное регулирование) [72].

Австралия в 2021 г. обновила свой Закон о генных технологиях 2000 г., однако концепция процесс-ориентированного подхода была сохранена: “метод, используемый для модификации организма — центральный для определения того, является ли организм ГМО” [73]. В то же время “Регулятор генных технологий” (OGTR) исключает растения с модификацией типа SDN-1 из регулирования ГМО, в то время как организмы с модификацией SDN-2 и SDN-3 относит к ГМО. Австралийские правила не принимают во внимание число нуклеотидных замен, вставок, делеций, а также возможность обнаружения полученной нуклеотидной последовательности у совместимых видов.

Законодательство некоторых стран не так чувствительно к научно-техническим прорывам. Хороший пример — Канада, где используется модель оценки безопасности продукции независимо от способа получения, и также независимо разработа-

тываются критерии оценки безопасности любого нового продукта, поступающего на рынок. В новом канадском руководстве от 18 мая 2022 г. [74] установлено, что к редактированным культурам следует относиться как к традиционным культурам (т.е., без проведения предварительной оценки безопасности, применяемой к ГМ растениям) в тех случаях, когда пищевой продукт на их основе не является новым продуктом питания.

Технология геномного редактирования продолжает развиваться, и сегодня с ее помощью можно эффективно получать желаемые изменения генома, ведущие к получению новых видов и сортов растений. Данный обзор показал, что нецелевые эффекты, связанные с технологией геномного редактирования, не являются критическими, их можно выявить и минимизировать за счет улучшения таргетинга и методологий безопасного проектирования.

Разработанные стратегии безопасного проектирования с использованием нового инструмента биоинформатики (MAHDS) применимы в качестве биоинформатической поддержки принятия решений о редизайне на стадии концепта редактированного растения и достижения оптимального баланса риск-желаемый фенотип. Этот подход будет в перспективе способствовать ограничению процедур по оценке рисков и сосредоточению процесса принятия решений на биоинформатическом анализе, WGS и молекулярной характеристике продуктов геномной инженерии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhu Y. // Biomed Res. Int. 2022. 2022:9978571. <https://doi.org/10.1155/2022/9978571>
2. Eriksson D., Custers R., Edvardsson Björnberg K., Hansson S.O., Purnhagen K., Qaim M. et al. // Trends Biotechnol. 2020. V. 38. P. 231–234. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.002>
3. Parrott W. // Physiol Plant. 2018. V. 164. № 4. P. 406–411. <https://doi.org/10.1111/ppl.12756>
4. Yunzhen L., Wenhao Y. // Sci. China Life Sci. 2020. V. 63. № 9. P. 1406–1409. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1693-4>
5. Korotkov E.V., Yakovleva I.V., Kamionskaya A.M. // Appl. Biochem. Microbiol. 2021b). V. 57. № 2. P. 271–279. <https://doi.org/10.1134/S000368382102006X>
6. Konstantakos V., Nentidis A., Krithara A., Paliouras G. // Nucleic Acids Research. 2022. V. 50. № 7. P. 3616–3637. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac192>
7. Yan J., Chuai G., Zhou C., Zhu Ch., Yang J., Zhang Ch., Gu F., Xu H., et al. // Brief. Bioinformatics. 2018. V. 19. P. 721–724. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx001>
8. Modrzejewski D., Hartung F., Sprink T., Krause D., Kohl Ch., Wilhelm R. // Environ. Evid. 2019. V. 8. P. 27. <https://doi.org/10.1186/s13750-019-0171-5>
9. Modrzejewski D., Hartung F., Lehnert H., Sprink T., Kohl C., Keilwagen J., Wilhelm R. // Front Plant Sci. 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.574959>
10. MacLeod A., Spence N. // Emerg. Top Life Sci. 2020. V. 4. № 5. P. 449–452. <https://doi.org/10.1042/ETLS20200343>
11. Hulme Ph.E. // BioScience. 2021. V. 71. № 7. P. 708–721. <https://doi.org/10.1093/biosci/biab019>
12. UN News. <https://news.un.org/en/story/2021/03/1087032>
13. CAST 2022. Council for Agricultural Science and Technology. <https://www.cast-science.org>
14. Lassoued R., Macall D., Hessel H., Phillips P.W.B., Smyth S.J. // Transgenic Res. 2019. V. 28. P. 247–256. <https://doi.org/10.1007/s11248-019-00118-5>
15. Hua K., Zhang J., Botella J.R., Ma C., Kong F., Liu B., Zhu J.K. // Mol Plant. 2019. V. 12. № 8. P. 1047–1059. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.06.009>
16. Brende B. In The Global Risks Report 2020 World Economic Forum, Washington, USA, 2019, 15th Ed. Zeneva, Switzerland. P. 9–10.
17. Bogner A., Torgersen H. // Policy. Front Plant Sci. 2018. V. 9. P. 1884. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01884>
18. Hellstrom T. // Technol. Soc. 2009. V. 31. P. 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.techsoc.2009.06.002>
19. Dragavtsev V. Academician Dragavtsev's Protest Against the Presidium of the Russian Academy of Sciences "Give GMO Norms". <https://rossaprimavera.ru/article/04f0c499>
20. Fagan J., Antoniou M., Robinson Cl. // GMO Myths & Truths: A Citizen's Guide to the Evidence on the Safety and Efficacy of Genetically Modified Crops and Foods. Earth Open Source. 2020.
21. Chuchulina E.O. // Bulletin of Science. 2019. V. 4. № 6. P. 130–134.
22. CBD 2012. Guidance on Risk Assessment of Living Modified Organisms. Convention on Biological Diversity. UNEP/CBD/BS/COP-MOP/6/13/Add.1; 2012. <https://www.cbd.int/doc/meetings/bs/mop-06/official/mop-06-13-add1-en.pdf>
23. Guidelines for Assessing the Impact of Genetically Modified Organisms on the Environment and Health; In 2 Parts; 2005. Part 1. Introductory information, Accompanying Texts to Block Diagrams; ISEU: Moscow, Russia. 2005.
24. European Commission 2001. Directive 2001/18/EC of The European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the Deliberate Release into the Environment of Genetically Modified Organisms. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32001L0018&from=EN>.
25. GSO 2141:2011. 2011 General Requirements for Genetically Modified Unprocessed Agricultural Products. <https://www.gso.org.sa/store/standards/GSO:563263/-GSO%202141:2011>.

26. Order of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation On Approval of the Methodology for the Production of Examinations (studies) of Biological Safety of Genetically Engineered Plants for Growing (release into the environment) on the Territory of the Russian Federation. 2020. <http://base.garant.ru/400229383/>.
27. USDA-Animal and Plant Health Inspection Service 2020. Fed. Regist. 85: 29790. <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2020-05-18/html/2020-10638.htm>.
28. Lema M.A. // J. Regul. Sci. 2021. V. 9. № 1. P. 1–15. <https://doi.org/10.21423/jrs-v09i1lema>
29. USDA_a 2019. MAFF Guidance for the Handling of Genome Edited Organisms under the Cartagena Act. — https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=MAFF%20Guidance%20for%20the%20Handling%20of%20Genome%20Edited%20Organisms%20under%20the%20Cartagena%20Act_Tokyo_Japan_11-15-2019.
30. USDA_b 2019. Final MAFF Guidelines for the Handling of Genome Edited Feed and Feed Additives. — https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Final%20MAFF%20Guidelines%20for%20the%20Handling%20of%20Genome%20Edited%20Feed%20and%20Feed%20Additives%20_Tokyo_Japan_03-22-2020.
31. USDA_c 2019. Japan Modifies Handling Procedures for Genome Edited Foods. <https://www.fas.usda.gov/data/japan-japan-modifies-handling-procedures-genome-edited-foods>.
32. Draft Federal Law № 134176-8. 2022. “On Amendments to the Federal Law “On State Regulation in the Sphere of Genetic Engineering Activities”. https://sozd.duma.gov.ru/bill/134176-8#bh_histtras.
33. Schiemann J., Robiński J., Schleissing S., Spök A., Sprink T., Wilhelm R.A. // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 284. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00284>
34. Globus R., Qimrom U. // Cell Biochem. J. 2018. V. 119. № 2. P. 1291–1298. <https://doi.org/10.1002/jcb.26303>
35. Metje-Sprink J. // Front. Plant Sci. 2019. V. 9. P. 133–141. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01957>
36. Ahmad N., Rahman M., Mukhtar Z., Zafar Y., Zhang B. // J Cell Physiol. 2020. V. 235. № 2. P. 666–682. <https://doi.org/10.1002/jcp.29052>
37. Sturme M.H.J., van Berg J.P., Bouwman L.M.S., De Schrijver A., de Maagd R.A., Kleter G.A., Battaglia-de Wilde E. // ACS Agric. Sci. Technol. 2022. V. 2. P. 192–201. <https://doi.org/10.1021/acsagascitech.1c00270>
38. Chandrasekaran J., Brumin M., Wolf D., Leibman D., Klap C., Pearlsman M. et al. // Mol. Plant Pathol. 2016. V. 17. № 7. P. 1140–1153. <https://doi.org/10.1111/mpp.12375>
39. Arndell T., Sharma N., Langridge P., Baumann U., Watson-Haigh N.S., Whitford R. // BMC Biotechnol. 2019. V. 19. № 1. P. 71. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0565-z>
40. Walton R.T., Christie K.A., Whittaker M.N., Kleinstiver B.P. // Science. 2020. V. 368. P. 290–296. <https://doi.org/10.1126/science.aba8853>
41. Murugan K., Seetharam A.S., Severin A.J., Sashital, D.G. // J. Biol. Chem. 2020. V. 295. № 17. P. 5538–5553. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.012933>
42. Hong Y., Meng J., He X., Zhang Y., Liu Y., Zhang C., Qi. H., Luan Y. // Phytopathology. 2021. V. 11. № 6. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-20-0360-R>
43. Malnoy M., Viola R., Junget M.-H., Koo O.J., Kim S., Kim J.S. et al. // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 1904. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01904>
44. Si X., Zhang H., Wang Y., Chen K., Gao C. // Nat. Protoc. 2020. V. 15. P. 338–363. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0238-3>
45. Graham N., Patil G.B., Bubeck D.M., Dobert R.C., Glenn K.C., Gutsche A.T. et al. // Plant Physiol. 2020. V. 183. № 40. P. 1453–1471. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01194>
46. Hahn F., Nekrasov V. // Plant Cell Rep. 2019. V. 38. № 4. P. 437–441. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2355-9>
47. Ahmad Sh., Wei X., Sheng Zh., Hu P., Tang Sh. // Brief Funct. Genomics. 2020. V. 19. № 01. P. 26–39. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elz041>
48. Faal G.P., Farsi M., Seifi A., Kakhki A.M. // Mol. Biol. Rep. 2020. V. 47. P. 3369–3376. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05409-3>
49. Waterworth W.M., Drury G.E., Bray C.M., Westet Ch.E. // New Phytol. 2011. V. 192. P. 805–822. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03926.x>
50. O’Conner S., Li L. // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 600117. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.600117>
51. Ellens K.W., Levac D., Pearson C., Savoie A., Strand N., Louter J., Tibelius C. // Transgenic Res. 2019. V. 28 (Suppl. 2). P. 165–168. <https://doi.org/10.1007/s11248-019-00153-2>
52. Xu W., Fu W., Zhu P., Li Z., Wang C., Wang C. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 17. P. 4125. <https://doi.org/10.3390/ijms20174125>
53. Weng M.L., Becker C., Hildebrandt J., Neumann M., Rutter M.T., Shaw R.G. et al. // Genetics. 2019. V. 211. № 2. P. 703–714. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301721>
54. Young J., Zastrow-Hayes G., Deschamps S. et al. // Sci. Rep. 2019. V. 9. P. 6729. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43141-6>
55. Tang X., Liu G., Zhou J., Ren Q., You Q., Tian L. et al. // Genome Biol. 2018. V. 19. P. 84. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1458-5>
56. Li J., Manghwar H., Sun L., Wang P., Wang G., Sheng H. et al. // Plant Biotechnol J. 2019. V. 17. № 5. P. 858–868. <https://doi.org/10.1111/pbi.13020>
57. Tsai H., Missirian V., Ngo K.J., Tran R.K., Chan S.R., Sundaresan V., Comai L. // Plant Physiol. 2013. V. 161. № 4. P. 1604–1614. <https://doi.org/10.1104/pp.112.213256>

58. Song H., Park J.-I., Hwang B.-H., Yi H., Kim H., Hur Y. // *Agronomy*. 2020. V. 10. № 4. P. 602. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040602>
59. Korotkov E.V., Suvorova Y.M., Nezhdanova A.V., Gaidukova S.E., Yakovleva I.V., Kamionskaya A.M., Korotkova M.A. // *Symmetry*. 2021. V. 13. № 6. P. 917–937. <https://doi.org/10.3390/sym13060917>
60. Suvorova Y.M., Kamionskaya A.M., Korotkov E.V. // *BMC Bioinform.* 2022. V. 22(1). P. 42. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-03977-0>
61. Korotkov E.V., Kamionskaya A.M., Suvorova Yu.M. // *Biotechnologiya*. 2020. V. 36. № 4. P. 15–20. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-15-20>
62. Korotkova M.A., Kamionskaya A.M., Korotkov E.V. In: *Proceedings of the J. Physics: Conference Series; The VI Int. Conference on Laser&Plasma Researches and Technologies; LaPlas, USA; Moscow, Russia 2020*. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1686/1/012031>
63. Salieri B., Barruetaña L., Rodríguez-Llopis I., Jacobsen N.R., Manier N., Trouiller B. et al. // *NanoImpact*. 2021. V. 23. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2021.100335>
64. EU-SAGE 2022. <https://www.eu-sage.eu/genome-search>
65. Wolt J.D. // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2017. V. 149. P. 215–241. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts>
66. Fister A.S., Landherr L., Maximova S.N., Guiltinan M.J. // *Front Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 26. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00268>
67. Andres J., Blomeier T., Zurbriggen M.D. // *Plant Physiol.* 2019. V. 179. P. 862–884. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01362>
68. Hirsch C.D., Springer N.M. // *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 2017. V. 1860. P. 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.05.010>
69. Philippines 2022. Memorandum Circular No. 8, Series of 2022. https://www.da.gov.ph/wp-content/uploads/2022/06/mc08_s2022_Revised.pdf
70. DBTt 2022. Guidelines for the Safety Assessment of Genome Edited Plants; Government of India, Ministry of Science & Technology, DBTt; 2022. <https://dbtindia.gov.in/latest-announcement/guidelines-safety-assessment-genome-edited-plants-2022>
71. Proposal for a Regulation on Plants Obtained by Certain new Genomic Techniques and their Food and Feed, and Amending Regulation (EU) 2017/625. <https://www.europeansources.info/record/proposal-for-a-regulation-on-plants-obtained-by-certain-new-genomic-techniques-and-their-food-and-feed-and-amending-regulation-eu-2017-625/>
72. Yakovleva I.V., Kamionskaya A.M. // *Trends Biotechnol.* 2022. V. 40. № 6. P. 635–638. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.12.004>
73. OGTR 2021. Department of Health of Australia. Overview – status of organisms modified using gene editing and other new technologies. <https://www.ogtr.gov.au/resources/publications/overview-status-organisms-modified-using-gene-editing-and-other-new-technologies>
74. Health Canada 2022. Guidance on the Novelty Interpretation of Products of Plant Breeding, 2022. <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/legislation-guidelines/guidance-documents/guidelines-safety-assessment-novel-foods-derived-plants-microorganisms/guidelines-safety-assessment-novel-foods-2006.html#a5>

Using New Bioinformatics Strategies at the Design Stage of Genome-edited Plants

I. V. Yakovleva^{a, *} and A. M. Kamionskaya^a

^a Skryabin Institute of Bioengineering, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology”
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

*e-mail: iacgea@biengi.ac.ru

The identification of risks associated with novel agricultural products of plant origin obtained *via* genome editing is an important aspect of genetic engineering. An extensive discussion is currently ongoing worldwide to clarify the similarities and differences between the “old” risks of “classic” GM plants and the “new” ones associated with genome editing, the lack of existing methods for identification and assessment of new risks. We propose here the concept of “safe by design” as applied to protection that is a new interesting tool that introduces good known standards of safety into plant bioengineering. This approach states that design options are identified to minimize or prevent risks and off-target of genome editing at the concept stage. The correlation between experimentally determined and *in silico* predicted off-target gRNA activity is a major challenge in the CRISPR system application. Today the most studies are focused on efficiency of gRNA design, while we pay attention specifically to the bioinformatics search and study of potential promoters, as the potential risk associates with a possible unplanned change in the transcriptional activity of promoters. We conveyed these strategies in the form of a risk assessment framework for regulation of new genetic technologies.

Keywords: plant genome editing, risk assessment, biosafety, bioinformatics, off-targets