

# Primjena CRISPR/Cas9 tehnologije u biljaka i implikacije na zakonodavnu regulativu

---

**Kubat, Mirela**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:318520>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-03**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO- MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**PRIMJENA CRISPR/Cas9 TEHNOLOGIJE U BILJAKA I**  
**IMPLIKACIJE NA ZAKONODAVNU REGULATIVU**  
**APPLICATION OF CRISPR/Cas9 TECHNOLOGY IN PLANTS**  
**AND ITS IMPLICATION ON LEGISLATIVE REGULATION**

**SEMINARSKI RAD**

Mirela Kubat

Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Nenad Malenica

Zagreb, 2017.

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1 Klasični pristup genetičke modifikacije biljaka .....	1
1.2 Ciljana modifikacija genoma biljaka .....	2
1.2.1 ZFN .....	3
1.2.2 TALE nukleaze (TALEN) .....	4
1.2.3 CRISPR-Cas9.....	4
1.2.4 Usporeba tri sustava ciljane modifikacije genoma (ZFN, TALEN, CRISPR).....	6
2. CRISPR/Cas SUSTAV BAKTERIJSKE IMUNOSTI.....	8
3. PRIMJENA CRISPR/Cas9 SUSTAVA U OPLEMENJIVANJU BILJAKA .....	9
3.1. Prvi CRISPR/Cas9 eksperimenti na biljkama.....	9
3.2. Oplemenjivanje biljaka pomoću CRISPR/Cas tehnologije – danas .....	10
3.3. Oplemenjivanje biljaka pomoću CRISPR/Cas tehnologije – sutra .....	15
4. DNA-NEOVISNO UREĐIVANJE GENOMA BILJAKA.....	15
4.1. DNA-neovisno uređivanje genoma biljaka s prethodno sastavljenim CRISPR/Cas9 ribonukleoproteinima .....	17
4.2. Implikacije na zakonodavnu regulativu.....	17
5. LITERATURA .....	19
6. SAŽETAK.....	21
7. SUMMARY .....	22



# 1. UVOD

Posljednjih nekoliko godina svjedočimo revoluciji u biologiji, do koje je došlo otkrićem nove kategorije nukleaza koje omogućuju precizno uređivanje genoma. Od otkrića CRISPR/Cas9 sustava, uređivanje genoma se uvelike koristi u modifikaciji genoma biljaka, karakterizaciji funkcije gena i poboljšanju odlika biljaka, prvenstveno indukcijom mutacija preko ne-homolognog spajanja krajeva (*non-homologous end joining*, NHEJ) nakon izazivanja dvostrukih lomova DNA (DSB) pomoću CRISPR/Cas9 sustava (Yin, 2017).

## 1.1 Klasični pristup genetičke modifikacije biljaka

Genetičke modifikacije biljaka u biologiji nisu novost, a transformacija pomoću bakterije tla *Agrobacterium tumefaciens* jedan je od prvih načina. Već 1967. godine objavljeni su prvi dokazi prisutnosti bakterijske DNA (*A. tumefaciens*) u DNA ekstrahiranoj iz stanica tumora vrata korijena (*crown gall*). Korak bliže razumijevanju tog procesa napravljen je otkrićem Ti plazmida virulentnih sojeva *A. tumefaciens*. Nakon zaraze biljke, dolazi do integracije strane DNA u kromosome biljke. T-DNA, ~23 kb dug fragmenat Ti plazmida, izrezuju bakterijske endonukleaze te ga potom bakterijski proteini usmjeravaju prema jezgri stanice gdje se odvija nasumična integracija ovisna o proteinima biljne stanice. Nakon otkrića ovog procesa, metodama genetičkog inženjerstva većina gena koje nosi T-DNA uklonjeni su i zamijenjeni genima od agronomskog interesa. Ovaj efikasan sistem prijenosa gena između bakterije i eukariota, jedinstven za biljke, ubrzo je postao standardna tehnologija za transformaciju biljaka, uvelike korišten za temeljna istraživanja i kreiranje GMO biljaka. Jedan od najvećih nedostataka te tehnologije su višestruke nasumične insercije, raštrkane po kromosomu ili tandemski ponovljene. Takve insercije mogu prekinuti rezidentne gene i dovesti do neželjenih fenotipskih posljedica.

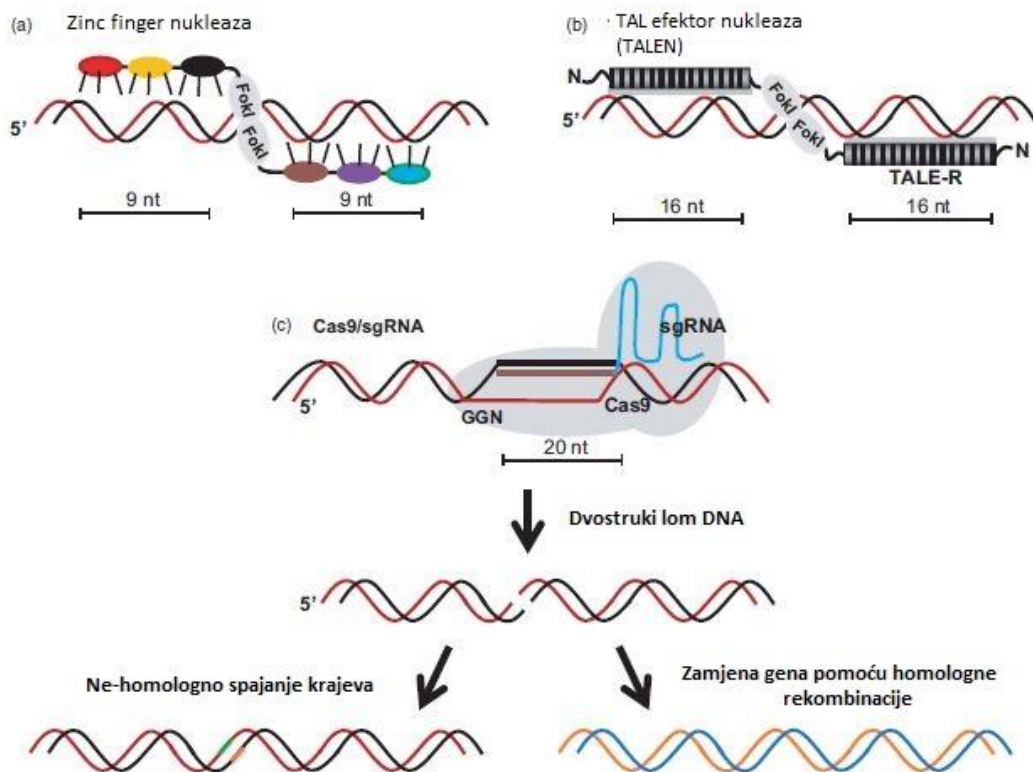
Drugi period uređivanja biljnih genoma dolazi uz otkrića *homing* i meganukleaznih enzima, koji su bili modificirani u alate za izradu ciljanih modifikacija genoma na točno određenom mjestu. *Szostak i sur.* su 1983. identificirali HO endonukleazu koja sudjeluje u popravku DSB (dvostrukog loma lanca, *double strand break*) u plijesni. HO endonukleaza pokazuje mjesto prepoznavanja od 24 pb (kasnije je pokazano da *homing*-endonukleaze posjeduju mjesta prepoznavanja od 12 do 40 pb). *Plessis i sur.* su identificirali *homing*-nukleazu I-Sce I. I-Sce I posjeduje mjesto prepoznavanja od 18 pb i uskoro se počela i

komercijalno koristiti. 1993, *Puchta i sur.* su pokazali da I-Sce I radi ciljane DSB u protoplastima *Nicotiana plumbaginifolia*. To je otvorilo put daljnjem preciznom uređivanju biljnih genoma, te je isti tim četiri godine kasnije pokazao da I-Sce I povećava frekvenciju DSB u prisutnosti predloška za popravak pomoću dvostruke homologne rekombinacije. (Quétier, 2015).

## 1.2 Ciljana modifikacija genoma biljaka

Zadnji val uređivanja genoma predvodi tehnologija koja koristi dizajnirane nukleaze i stanični sustav za popravak DNA kako bi precizno modificirala genomske sljedove. (Voytas, 2013.). Kao nukleaze u takvom sustavu za uređivanje genoma, do sada su korištene Zinc-finger nukleaze (ZFN; Pabo, 2001.), efektorske nukleaze nalik transkripcijskim aktivatorima (transcription activator-like effector nucleases (TALEN; Boch, 2009; Moscou et Bogdanove, 2009.), RNA-navođene nukleaze (RNA guided nucleases; RGN) iz CRISPR i CRISPR/Cas sustava (van der Oost, 2013.). CRISPR/Cas9 sustav je ubrzo postao najrašireniji alat zbog jednostavnosti kojom se može koristiti za uređivanje genoma, (Pennisi, 2013).

ZFN, TALEN i CRISPR/Cas sustavi funkcioniraju tako da se prvo dizajnira nukleaza specifična za odabrani slijed DNA te se potom unosi u stanicu, gdje izaziva dvostruki (dvolančani) lom DNA (*double strand break; DSB*) (Ding, 2016). DSB se obično popravljiva pomoću endogenog puta ne-homolognog spajanja (DNA) krajeva (NHEJ), koji je prirodno sklon pogreškama. NHEJ mehanizam popravka na mjestu dvolančanog loma DNA najčešće uvodi malu inserciju ili deleciju te tako uzrokuje pomak u okviru čutanja (*frameshift*) što najčešće ima za posljedicu inaktivaciju gena. Ako je u sustavu prisutan DNA fragment s homologijom ciljnom slijedu (donor DNA), DSB se može popraviti i homolognom rekombinacijom (HR), koristeći tu donorsku DNA kao kalup za popravak. NHEJ i HR su univerzalno prisutni u svim živim stanicama iako u biljnim stanicama koje se ne dijele prevladava NHEJ put popravka. Najveći izazov je dizajn umjetne nukleaze čije je ciljno mjesto reprogramabilno (Ding, 2016).



**Slika 1.** Uređivanje genoma pomoću ZFN (a), TALEN (b) i CRISPR/Cas9 (c) sustava. Preuzeto i prilagođeno iz Weeks, 2016.

### 1.2.1 ZFN

ZFN se konstruiraju fuzijom DNA-vezujućih *Zinc-finger* modula sa nukleaznom domenom restriktivske endonukleaze FokI (Slika 1a). Konkretno, jedna ZFN jedinica sastoji se od tri ili četiri vezujuća *Zinc-finger* modula, a svaki modul prepoznaje po jedan nukleotidni triplet. Funkcionalni sustav čine dva ZFN-a, koja mogu prepoznati jedinstvenu sekvencu (18-24 pb duga, sa 5-6 pb prazninom između dva ZFN-a). Na tom mjestu FokI radi DSB. ZFN su korišteni za ciljanje gena u različitim biljkama, uključujući *Arabidopsis* (*PPO*), duhan (*PAT*), kukuruz (*IPK1*) i soju (*DCL4a* i *DCL4b*), za efikasnu i nasljednu mutagenezu. (Shukla, 2009; Townsend, 2009; Osakabe, 2010; Zhang, 2010; Curtin, 2011). Dizajn zinc-finger modula je težak zbog kompleksnih interakcija između aminokiselinskih ostataka i parova baza ciljne sekvence. Detaljno razumijevanje interakcija između svakog pojedinog aminokiselinskog ostatka i svakog para baza olakšava dizajn točnog zinc-finger modula (Kumar, 2015).

### 1.2.2 TALE nukleaze (TALEN)

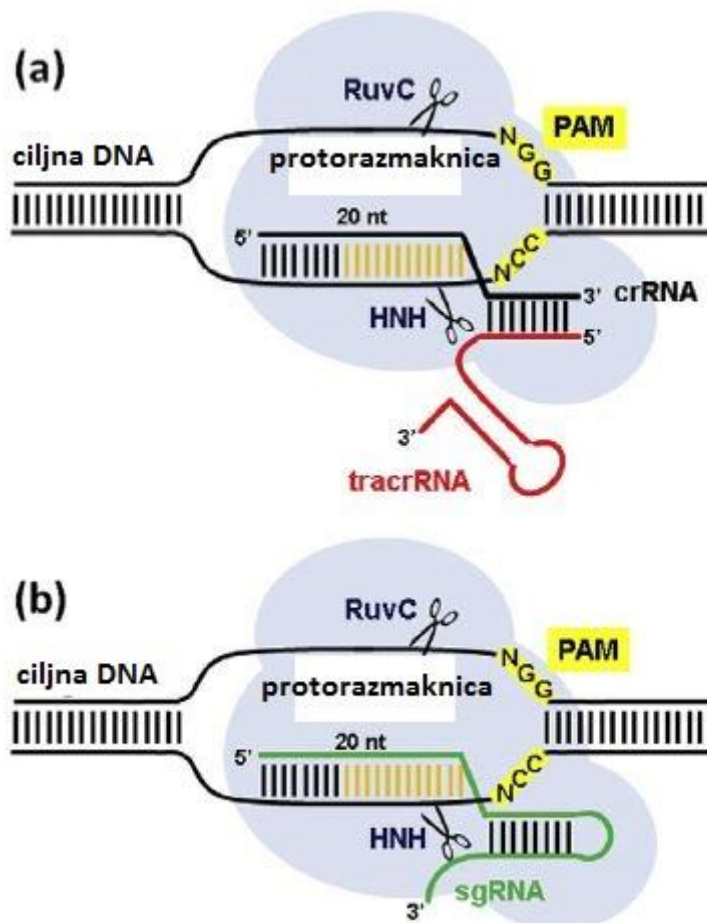
TALE nukleaze je nešto lakše dizajnirati, jer se na temelje na prepoznavanju proteinskih ponavljanja i nukleotidne sekvence u omjeru jedan prema jedan. Sastoje se od varijabilnih modula, svakog od 33-35 aminokiselinskih ostataka (Slika 1b). U svakom modulu, dva aminokiselinska ostatka na pozicijama 12 i 13 determiniraju sparivanje sa samo jednom bazom na ciljnoj sekvenci DNA. Njihova je konstrukcija olakšana pomoću efikasnih metoda DNA slaganja (*Golden Gate* kloniranje; Engler, 2008). Međutim, visoko repetitivne sekvence na kojima se TALE nukleaze baziraju, mogu potaknuti homolognu rekombinaciju *in vivo* (Bortesi, 2015).

### 1.2.3 CRISPR-Cas9

U usporedbi, cijepanje na temelju gRNA (korišteno u CRISPR/Cas9 sustavu; Slika 1c) se bazira na jednostavnom komplementarnom sparivanju baza sa ciljnom sekvencom DNA, pa nije potrebno sofisticirano proteinsko inženjerstvo za svaku ciljnu sekvencu. Potrebno je modificirati tek 20 nukleotida u gRNA da bi se prepoznao određeni slijed. Bilo koji broj gRNA može se proizvesti pomoću *in vitro* ili *in vivo* transkripcije koristeći dva komplementarna oligonukleotida. To omogućuje jeftino slaganje velikih gRNA biblioteka, što pak omogućuje korištenje CRISPR/Cas9 sustava visoko protočnim aplikacijama funkcionalne genomike (Bortesi, 2015).

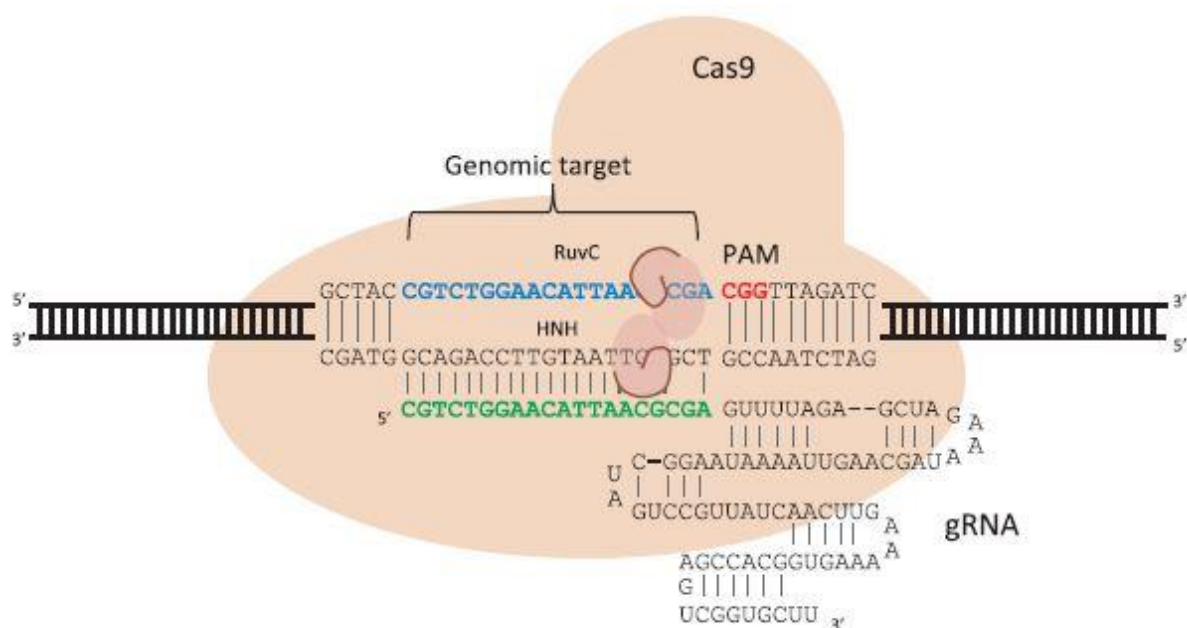
Cas9 ima dvije domene, RuvC i HNH (Slika 2.). Te domene cijepaju ciljnu DNA u pravilu 3-5 nukleotida uzvodno od motiva pridruženog protorazmaknici (*protospacer adjacent motif*; PAM) (Slika 2, Slika 3.) i ostavljaju tupe krajeve. Povremeno, Cas9 ostavlja ljepljive krajeve od 1-2 nt *in vitro*. Ljepljivi krajevi su korisni za precizno umetanje DNA molekula sa kompatibilnim ljepljivim krajevima, što se postiže NHEJ- pomognutom ligacijom (Kumar, 2015).





**Slika 2.** Domene Cas9 proteina i cijepanje navođeno (a) tracrRNA i (b) sgRNA. Preuzeto i prilagođeno iz Bortesi, 2015.

Komponente CRISPR/Cas9 sustava koji se koristi u genetičkom inženjerstvu čine: (Slika 3): (1) Cas9 protein sa signalnim peptidom za lokalizaciju u jezgri (nuclear localisation signal; NLS); (2) sgRNA koja na svom 5' kraju sadrži navodeću sekvencu komplementarnu ciljnom DNA slijedu u genomu; (na slici 2 prikazana zeleno). Na svom 3' kraju sadrži konzerviranu strukturu peteljke koja veže Cas9 nukleazu; (3) protorazmaknici pridružen PAM slijed (protospacer-adjacent motif; 5'-NGG-3'), pozicioniran nizvodno od ciljne DNA (na Slici 2 prikazan crveno). Zahvaljujući velikoj učestalosti PAM slijeda u genomu, Cas9/gRNA može ciljati skoro svaki gen na više mjesta (Ding, 2016).



**Slika 3.** Komponente CRISPR/Cas9 sustava. Preuzeto iz Mahfouz, 2014.

### 1.2.4 Usporeba tri sustava ciljane modifikacije genoma (ZFN, TALEN, CRISPR)

U teoriji, ZFN mogu ciljati bilo koju sekvencu, ali je zapravo izbor relativno ograničen dostupnošću modula koji se mogu konstruirati za odabrani DNA slijed. Po jedan funkcionalni ZFN par se može pripremiti otprilike na svakih 100 pb DNA sekvence koristeći javno dostupne biblioteke.

Izbor ciljne sekvence TALEN-a je ograničen potrebom za timidinskim ostatkom na 5' poziciji. Uz to, ne rade sve dizajnirane TALE nukleaze jednako efikasno *in vivo*. Neki parovi TALE nukleaza ne generiraju očekivane mutacije, te se svaki par mora eksperimentalnotestirati. Za razliku od ZFN i TALEN, kod CRISPR/Cas9 sustava jedini preduvjet za odabir ciljnog slijeda DNA jest prisutnost motiva pridruženog razmaknici (*protospacer adjacent motif*; PAM) (NGG ili NAG) nizvodno od ciljne sekvence. sgRNA može navesti Cas9 da cijepa slijed s manje od 100% homologije što se naziva nespecifično (*off-target*) cijepanje. Kod dizajna sgRNA sekvence se moraju pomno izabrati kako bi se izbjegli takvi slučajevi. U praksi, to smanjuje broj mogućih ciljnih sekvenci (Kumar, 2015).

**Tablica 1.** Usporedba sustava nukleaza za uređivanje genoma. Prilagođeno iz Kumar, 2015.

		<b>Homing- i meganukleaze</b>	<b>ZFN</b>	<b>TALEN</b>	<b>CRISPR/Cas9</b>
<b>Komponente sustava</b>	Modul specifičnosti	Domena prepoznavanja cilja	Zinc-finger domene	TALE domene	gRNA
	Modul za cijepanje	Nukleazna domena	Nespecifična FokI nukleazna domena	Nespecifična FokI nukleazna domena	Cas9 protein
<b>Dužina ciljne sekvence</b>		14-40	18-24	24-59	20-22
<b>Efikasnost prepoznavanja ciljne sekvence</b>		Niska	Visoka	Visoka	Visoka
<b>Efikasnost cijepanja</b>		Visoka	Visoka	Visoka	Visoka sa mogućnošću multipleksiranja
<b>Kompleksnost postavljanja eksperimenta</b>		Komplicirana procedura redizajniranja za svako novo ciljno mjesto i potrebna stručnost u proteinskom inženjeringu	Komplicirana procedura redizajniranja za svako novo ciljno mjesto i potrebna stručnost u proteinskom inženjeringu	Relativno laka procedura dizajniranja za svako novo ciljno mjesto	Laka i vrlo brza procedura dizajniranja za novo ciljno mjesto
<b>Nasumična integracija (<i>off-target</i> efekt)</b>		Detektiran	Detektiran	Detektiran	Detektiran

Još jedna od prednosti CRISPR/Cas9 sustava nad ZFN i TALEN je to što može cijepati metiliranu DNA. Otprilike 70% of CpG/CpNpG mjesta je u biljnom genomu metilirano, pogotovo CpG otoci koji se nalaze u promotorima i proksimalnim eksonima. Mogućnosti za uređivanje genoma su time puno šire, pogotovo kod monokotiledona sa visokim udjelom GC parova u genomu.

Praktična prednost CRISPR/Cas9 sustava je i lakoća višestrukog uređivanja (*multiplexing*) tj.simultano uvođenje DSB-ova na više mjesta koje se može koristiti za

modifikaciju više gena u isto vrijeme. Korisno je za inaktivaciju (*knock-out*) gena ili cijelih genskih porodica. Na isti način mogu se dizajnirati velike genomske delecije ili inverzije, ciljajući dva široko odvojena mjesta cijepanja na istom kromosomu. Za višestruko uređivanje pomoću CRISPR/Cas9 sustava potrebni su Cas9 protein i različite gRNA specifične za različite sekvence. S druge strane, za višestruko uređivanje pomoću ZFN i TALEN potrebni su odvojeni dimerni proteini specifični za svako ciljno mjesto (Bortesi, 2015).

## 2. CRISPR/Cas SUSTAV BAKTERIJSKE IMUNOSTI

Sam CRISPR/Cas sustav je dio adaptivnog imuniteta bakterija i arheja, koji ih štiti od stranih nukleinskih kiselina (virusa; faga) tako što ih cijepa ovisno o slijedu. Imunitet se dobiva integracijom kratkih fragmenata strane DNA - razmaknica (*spacer*), između dva susjedna ponavljajuća slijeda na proksimalnim krajevima CRISPR lokusa. CRISPR slijedovi, uključujući razmaknice, se prepisuju tijekom susreta sa stranom DNA i procesiraju u male interferirajuće CRISPR RNA (*crRNA*), koje zajedno sa transaktivirajućim CRISPR RNA (*tracrRNA*) aktiviraju i navode Cas9 nukleazu. Takav sustav uvodi dvolančani lom u slijed u stranoj DNA (*protorazmaknica*) (Barrangou, 2007). U sustavima koji se koriste za uređivanje genoma, *tracrRNA* i *crRNA* su najčešće povezane kratkim slijedom – linker RNA, to jest eksprimirane kao kimerna gRNA (Slika 2). Uvjet za cijepanje DNA je PAM slijed, nizvodno od ciljnog slijeda (Gasiunas, 2012; Jinek., 2012).

U biljaka, efikasno uređivanje genoma pomoću CRISPR/Cas9 sustava obično se sastoji od četiri koraka. Prvo je potrebno konstruirati gen-specifičnu sgRNA (korak 1). Postoje brojni *in silico* alati za konstrukciju takvih sgRNA. Ipak, ti alati još nisu u potpunosti prilagođeni za biljne sisteme, te je potrebna sistematična i opširna analiza efikasnosti sgRNA u biljnim stanicama da bi se poboljšala točnost računalne selekcije. Aktivnost sgRNA najbrže je procijeniti u protoplastima (korak 2), prije konačnog korištenja u uređivanju genoma odabrane biljke. Nakon toga, komponente CRISPR/Cas9 sustava se ubacuju u biljne stanice (korak 3), najčešće preko transformacije posredovane agrobakterijama, bombardiranjem česticama, ili transfekcijom plazmida koji ih kodiraju.

Na navedeni način se Cas9 i gRNA ekspresijske kazete stabilno integriraju u biljni genom. Nakon ekspresije, cijepaju ciljna mjesta na kromosomima ovisno o slijedu nukleotida,

i stvaraju dvostruke lomove DNA (DSB) ovisne o poziciji. Popravak tih DSB-ova endogenim sistemima kao rezultat ima ciljane modifikacije genoma (Woo, 2015). Na kraju, transformirane i regenerirane biljke s ciljanim modifikacijama se identificiraju genotipiziranjem lančanom reakcijom polimeraze (polymerase chain reaction, (PCR)) i sekvenciranjem (korak 4.) (Yin, 2017).

### **3. PRIMJENA CRISPR/Cas9 SUSTAVA U OPLEMENJIVANJU BILJAKA**

#### **3.1. Prvi CRISPR/Cas9 eksperimenti na biljkama**

Ubrzo nakon otkrića CRISPR/Cas9 sustava, rađeni su i eksperimenti na biljkama. 2013. godine objavljena su tri znanstvena rada koja pokazuju da CRISPR/Cas9 sustav funkcionira i u biljnim sistemima. *Shan et al.(2013)* su radili na inaktivaciji endogenih gena u riži, protoplastima pšenice i kalusima riže. *Li et al.(2013)* su primijetili aktivnost cijepanja Cas9 proteina u protoplastima *Arabidopsis thaliana* i *Nicotiana benthamiana*. *Nekrasov et al.(2013)* su iskoristili tkivo lista *N. benthamiana* za agroinfiltraciju, te napravili knock-out gena za fitoen desaturazu (PDS) pomoću Cas9 (Schiml, 2016).

Konstruirali su GFP-om označen Cas9 za lokalizaciju u jezgri. GFP-Cas9 je zatim eksprimiran u tkivu lista *N.benthiana* pomoću standardnih protokola za agroinfiltraciju, te je zamijećena lokalizacija u jezgri. Napravljena je sgRNA sa vodećom sekvencom koja je komplementarna regiji od 20 pb u genu za fitoen desaturazu (*PDS*). sgRNA je bila stavljena pod kontrolu U6 promotor iz *Arabidopsisa*. U tkivu su eksprimirani GFP-Cas9 i sgRNA, a *A.tumefaciens* je korištena kao vektor. Da bi se detektirale mutacije u PDS lokusu, korištena je metoda delecije restrikcijskog mjesta (*restriction enzyme site loss method*) i PCR. Analiza 20 klonova koji potječu iz PCR produkta, pokazala je prisutnost indela u njih 17. Za ispitivanje ciljane mutageneze, nedigestirana genomska DNA iz negativne kontrole i tkiva u kojima su eksprimirani Cas9 i sgRNA, su amplificirane i digestirane, te je napravljena gel elektroforeza. Određena je mutacijska rata od 1.8% do 2.4% na temelju 4 odvojena eksperimenta. Ispitana je i mogućnost regeneracije biljaka iz modificiranih stanica. DNA ekstrahirana iz regeneriranih biljaka je zatim korištena za detekciju mutacija. Zamijećene su u samo 2 od 30 biljaka. U jednoj

biljci je zamijećena samo jedna vrsta mutacija, dok su u drugoj zamijećene 4 različite mutacije. Obje biljke su nosile divlji tip PDS lokusa, dok je druga biljka mozaična sa više mutacija uz divlji tip (Nekrasov, 2013).

Nakon početnog uspjeha primijećen je problem slabog nasljeđivanja željenih mutacija. *Feng et.al* su 2014. iskoristili Cas9 optimiran za ljudske stanice pod kontrolom dva CaMV 35S promotora i 12 različitih sgRNA pod kontrolom AtU6-26 promotora za ciljanje odabranih lokusa u *A.thaliana*. Analize T1 generacije pokazale su visoke frekvencije mutacija (30-92%), pri čemu je 1 pb insercija bila najčešća mutacija. Analize T2 i T3 generacija su pokazale pravilnu segregaciju i stabilno nasljeđivanje mutacija, zajedno s porastom nespecifičnih (*off-target*) mutacija, koje su rezultat prisutnosti nukleaznih transgena, a ne DNA-neovisnog RNP sustava (Schiml, 2016).

### **3.2. Oplemenjivanje biljaka pomoću CRISPR/Cas tehnologije – danas**

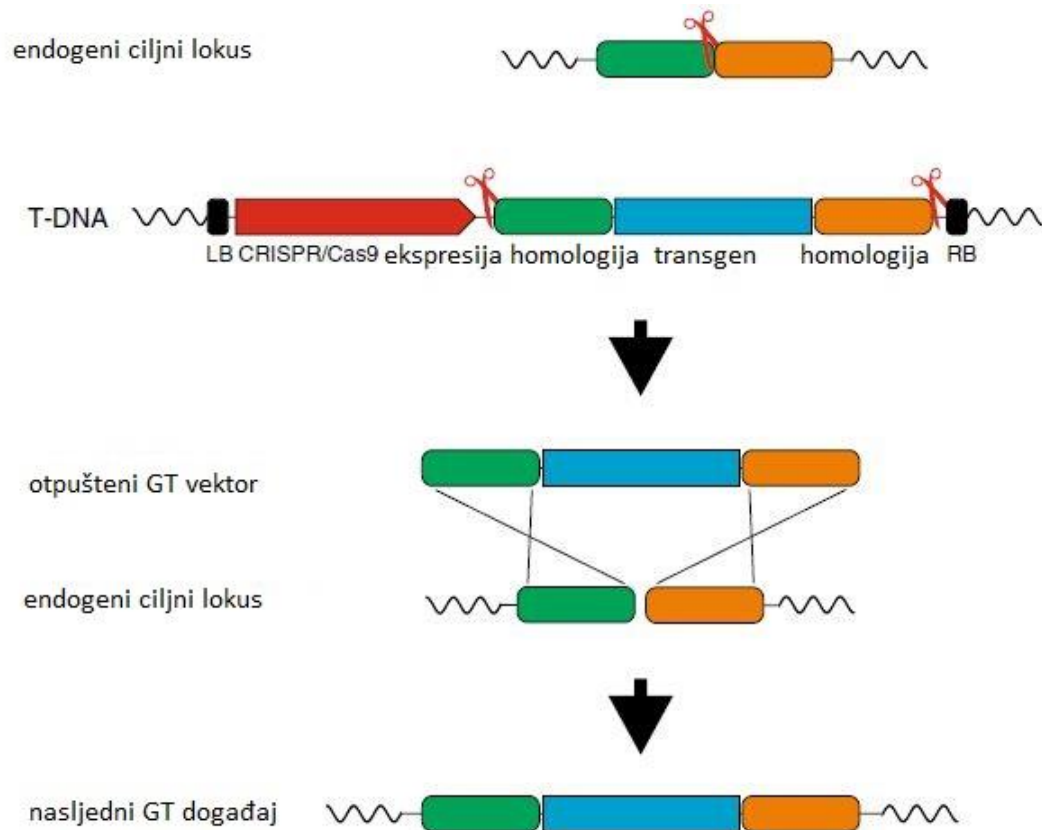
CRISPR/Cas tehnologija značajno povećava mogućnost poboljšanja odlika usjeva u usporedbi s konvencionalnim pristupima razmnožavanju. CRISPR/Cas je efikasan alat za induciranje nasljednih mutacija koje se ne mogu razlikovati od prirodnih alelnih varijanti. Križanje ili povratno križanje tako modificiranih biljaka može dati potomstvo bez transgena, što smanjuje potencijalne rizike i regulatorne uvjete koji se primjenjuju na transgene biljke.

Najjednostavniji način korištenja CRISPR/Cas za poboljšanje usjeva jest inaktivacija (*knock-out*) gena koji nose nepoželjna svojstva. Ovaj pristup je već korišten za povećanje otpornosti na patogene. Tako je npr. u riži je povećana otpornost na dvije gljivične bolesti (*blast* i *bacterial blight*), pomoću inaktivacije ERF transkripcijskog faktora i *SWEET* gena, koji imaju ulogu.... 2015. godine CRISPR tehnologijom dobivena je i T-DNA-neovisna uljana repica otporna na herbicide, promjenom samo jedne...CRISPR/Cas-om napravljena izmjena aminokiselina. Ovaj varijetet repice je dostupan u SAD-u. U sljedećih pet godina, kompanija Pioneer namjerava komercijalizirati kukuruz sa visokim udjelom amilopektina, koji je rodniji i poboljšanih hranjivih vrijednosti. Spomenuti kukuruz dobiven je inaktivacijom gena za biosintezu amiloze *Wx1*. Prekidom gena se može doći do agronomski značajnih svojstava, ali većina svojstava se može poboljšati tek preciznim genetskim modifikacijama.

Precizne modifikacije se mogu postići ciljanjem gena (GT, *gene targeting*) koji se odnosi na HDR (homologijom usmjeren popravak, *homology directed repair*)- posredovanom integracijom transgena u željeni lokus ili točkastim mutacijama. GT se može izvesti ako se ponudi DNA predložak za popravak DSB-a pomoću HDR, koji sadrži željene modifikacije te istodobno uzrokuje lom. GT je još uvijek neefikasan u biljkama, jer je NHEJ dominantni put popravka DSB-a u biljkama, unatoč prisutnom predlošku/supstratu za popravak. K tome, za mnoge biljke još uvijek nisu razvijeni postupci za uspješnu transformaciju i regeneraciju. Iako se izolirani protoplasti mogu transformirati vrlo uspješno i moguć je GT, regeneracija biljaka iz protoplasta još uvijek nije moguća za mnoge biljke (većinom jednosupnice kao što su pšenica i riža).

*Lowe i sur.* su nedavno napredovali u tom području te razvili visoko efikasni i široko primijenjiv način transformacije jednosupnica. Prekomjerno su ekspimirali *Baby boom (Bbm)* i *Wuschel2 (WS2)* gene nakon transformacije nezrelih embrija. Primijećen je povećan rast transformiranog tkiva u odnosu na netransformirano. Uspješno su transformirali i nekonvencionalna ciljna tkiva, kao što su fragmenti embrija iz zrelog sjemena.

Razvijena je i *in planta* GT metoda za biljke na kojima nije moguća uspješna transformacija. CRISPR/Cas9 konstrukt i predložak za popravak se transformiraju u biljni genom. Nukleaza, uz rezanje u ciljnom mjestu, reže i DNA predložak koji predstavlja supstrat za HDR (slika 4). GT se tako odvija tijekom životnog ciklusa biljke i kod ulaska u embrionalnu liniju može se dobiti sjeme sa željenim mutacijama. Potrebna je samo jedna uspješna transformacija. Pomoću ove metode, *Schimpl i sur.* su 2014. godine postigli precizne insercije u *Arabidopsisu* (Scheben, 2017).



**Slika 4.** Pregled in planta GT sustava. Nukleaza i DNA donorska sekvenca se nalaze na T-DNA koja se stabilno transformira u biljku. Nukleaza inducira dva DSB-a koji otpuštaju GT vektor i treći DSB koji aktivira ciljni lokus za HR. Donorska sekvenca se integrira u ciljni lokus koristeći regije homologije. Preuzeto i prilagođeno iz Schiml, 2016.

Ograničavajući učinak smanjenog broja HDR predložaka u transformiranim stanicama se može dokinuti korištenjem mehanizama replikacije iz geminivirusa, kako bi se povećao broj kopija predložaka za popravak (Baltes, 2014). Pomoću ovog pristupa, postignut je uspješan GT kotiledona, eksplantata lista i regeneracija biljaka rajčice (Cermak, 2015). Uz transformaciju pomoću agrobakterije, razvijena je i metoda biolistic transformacije (Altpeter, 2016). Pomoću biolistica moguće je uvesti veći broj predložaka za popravak. Regeneracijom embrija nakon transformacije bombardiranjem česticama (biolistic), primijećene su genske modifikacije i insercije specifične za mjesto u kukuruzu (Svitashev, 2016), soji (Li, 2015) i riži (Sun, 2016). Napravljena je i kombinacija viralne replikacije i biolistic transformacije stanica pšenice. Postignut je višestruk GT sva tri homeoalela, ali bez regeneracije uređenih biljaka (Gil-Humanes, 2017).



Uz HDR, NHEJ se također može upotrijebiti za precizno uređivanje genoma. Postignute su zamjene gena i insercije u genu za sintazu 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfata (*EPSPS* (Li, 2016)). Ciljana su dva susjedna introna uz prisutnost predloška za popravak sa točkastim mutacijama u intermedijarnom eksonu, pomoću transformacije bombardiranjem česticama (*biolistic*). Korištenjem dominantnog NHEJ popravka moguće je prevladati izazov nedovoljnih genskih modifikacija kada se koristi HDR.

Moguće je i uređivanje samih baza, bez DSB, ukoliko se na Cas9 fuzionira enzim citidin deaminaza. Cilja specifično mjesto i djeluje na konverziju citidina u uridin, što vodi do supstitucije citozina sa timinom ili gvanina sa adeninom. Korištenjem Cas9 nikaze koja uvodi jednolančane lomove, bitno se povećava efikasnost u usporedbi sa inaktivnim Cas9, tako što se potiče zamjena odabrane baze. Primjenom ove tehnike, u riži, pšenici i kukuruzu je izmjerena uspješnost uređivanja <40% u usporedbi s transgeničnim biljkama (Zong, 2017).

CRISPR/Cas se također može koristiti za poticanje kromosomskih rearanžmana i pruža mogućnost za kontrolu mejotske rekombinacije. Iako je prekidanje vezanosti gena između gena za korisna i štetna svojstva izazov u uzgoju biljaka, čuvanje vezanosti između gena za korisna svojstva je poželjno. Oba scenarija se mogu postići kontrolom kromosomskih translokacija. Indukcijom DSB-ova na različitim kromosomima, može se postići recipročna zamjena dijelova kromosoma. Također, vezanost gena se može prekinuti indukcijom umjetnih prekriženja (*crossingover*). Indukcijom dvaju DSB-ova na istom kromosomu mogu se postići delecije i inverzije. Kromosomske inverzije mogu spriječiti mejotsku rekombinaciju između homologa da bi se stabilizirala veza između pozitivnih svojstava (Scheben, 2017).

**Tablica 2.** Lista ciljanih gena pomoću CRISPR/Cas9 sustava u različitim biljnim vrstama. S lijeva na desno stupci: biljna vrsta, ciljani geni, promotor za Cas9, Cas9 verzija, promotor za sgRNA, metoda uvođenja i reference. Preuzeto iz Kumar 2016.

Plant species	Target gene(s)	Promoter for Cas9	Cas9 version	Promoter for sgRNA	Delivery method	Reference
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtPDS3, AtFLS2, AtFACK1b and AtFACK1c</i>	35DPPDK	Plant codon-optimized Cas9	AtU6	Protoplast co-transfection and <i>Agrobacterium</i> infiltration	Li <i>et al.</i> (2013)
	<i>GFP</i>	35S	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> codon-optimized Cas9	OsU6	<i>Agrobacterium</i> -mediated transformation	Jiang <i>et al.</i> (2013b)
	<i>CHL1, CHL2, and TT4i</i>	OsUBQ1	Human codon-optimized Cas9	OsU3	<i>Agrobacterium</i> -mediated transformation	Mao <i>et al.</i> (2013)
	<i>BRI1, JAZ1, and YFP</i>	2 x 35S	Human codon-optimized Cas9	AtU6-26	<i>Agrobacterium</i> -mediated transformation	Feng <i>et al.</i> (2013)
<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>NbPDS3</i>	35DPPDK	Plant codon-optimized SpCas9	AtU6	<i>Agrobacterium</i> infiltration	Li <i>et al.</i> (2013)
	<i>NbPDS</i>	35S	Human codon-optimized SpCas9	AtU6	<i>Agrobacterium</i> infiltration	Nekrasov <i>et al.</i> (2013)
	<i>Nbpbs</i>	CaMVE35S	Human codon-optimized SpCas9	CaMVE35S	<i>Agrobacterium</i> infiltration	Upadhyay <i>et al.</i> (2013)
	<i>NbPDS</i>	2 x 35S	Human codon-optimized Cas9	AtU6	<i>Agrobacterium</i> infiltration	Belhaj <i>et al.</i> (2013)
	<i>GFP</i>	35S	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> codon-optimized Cas9	OsU6	<i>Agrobacterium</i> infiltration	Jiang <i>et al.</i> (2013b)
<i>Oryza sativa</i>	<i>OsPDS, OsBADH2, Os2g23823 and OsMPK2</i>	2 x 35S	Rice codon-optimized Cas9	OsU3	Transformation using particle bombardment	Shan <i>et al.</i> (2013b)
	<i>OsSWEET11 and OsSWEET14</i>	CaMV 35S	Wild-type SpCas9 and rice codon-optimized Cas9	OsU6	<i>Agrobacterium</i> -mediated transformation	Jiang <i>et al.</i> (2013b)
	<i>OsMYB1</i>	OsUBQ1	Human codon-optimized Cas9	OsU3	<i>Agrobacterium</i> -mediated transformation	Mao <i>et al.</i> (2013)
	<i>OsMPK2, OsSWEET11 and OsSWEET14</i>	CaMV 35S	Wild-type SpCas9 and rice codon-optimized Cas9	OsU6	bombardment <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation	Jiang <i>et al.</i> (2013b)
	<i>OsMYB1</i>	OsUBQ1	Human codon-optimized Cas9	OsU3	<i>Agrobacterium</i> -mediated transformation	Mao <i>et al.</i> (2013)
	<i>ROC5, SPP and YSA</i>	35S	Human codon-optimized Cas9	OsU6-2	<i>Agrobacterium</i> -mediated transformation	Feng <i>et al.</i> (2013)
	<i>OsMPK5</i>	35S	Human codon-optimized Cas9	OsU6	<i>Agrobacterium</i> -mediated transformation	Xie and Yang (2013)
	<i>CAO1 and LAZY1</i>	Ub1	Rice codon-optimized Cas9	OsU3	<i>Agrobacterium</i> -mediated transformation	Miao <i>et al.</i> (2013)
<i>Triticum aestivum</i>	<i>TaMLO</i>	2X35S	Rice codon-optimized Cas9	TaU6	Protoplast transformation	Shan <i>et al.</i> (2013b)
	<i>Tainox and TaPDS</i>	CaMVE35S	Human codon-optimized SpCas9	CaMVE35S	<i>Agrobacterium</i> -mediated transformation	Upadhyay <i>et al.</i> (2013)
	<i>TaMLO-A1</i>	Ub1	Plant codon-optimized Cas9	TaU6	Transformation using particle bombardment	Wang <i>et al.</i> (2014)
<i>Sorghum bicolor</i>	<i>DsRED2</i>	Rice Actin1	Monocot codon-optimized synthetic Cas9	OsU6	<i>Agrobacterium</i> -mediated transformation	Jiang <i>et al.</i> (2013b)
<i>Marchantia polymorpha L.</i>	<i>MpARF1</i>	CaMV 35S and MpEF1 $\alpha$	Human codon-optimized Cas9	MpU6-1	<i>Agrobacterium</i> -mediated transformation	Sugano <i>et al.</i> (2014)
<i>Citrus sinensis</i>	<i>CsPDS</i>	CaMV 35S	Human codon-optimized Cas9	CaMV 35S	<i>Agrobacterium</i> infiltration	Jiang and Wang (2014)

### 3.3. Oplemenjivanje biljaka pomoću CRISPR/Cas tehnologije – sutra

Tehnologije uređivanja genoma imaju veliki potencijal u rješavanju rastuće potražnje za namirnicama, koju će u skoroj budućnosti diktirati rast populacije i klimatske promjene. Tehnikama uređivanja genoma mogu se napraviti rodniji usjevi, sa većim nutritivnim vrijednostima, otporni na nametnike i tolerantniji na abiotski stres. Glavne prepreke koje se moraju savladati za povećanje uspješnosti ove tehnologije su slaganje kvalitetne pangenomske baze potencijalnih mjesta za uređivanje genoma korištenjem funkcionalne genomike u svrhu smanjenja nespecificnosti (*off-target* efekta). Nužno je sakupljanje i integracija znanja iz genomike, transkriptomike, fenomike i biotehnologije. Unatoč tekućim tehničkim i društvenim preprekama, samo četiri godine nakon što je CRISPR/Cas tehnologija prvi puta iskorištena za uređivanje biljnog genoma počinje se koristiti i u komercijalne svrhe, dok je poboljšanje usjeva na veliko samo pitanje vremena (Scheben, 2017).

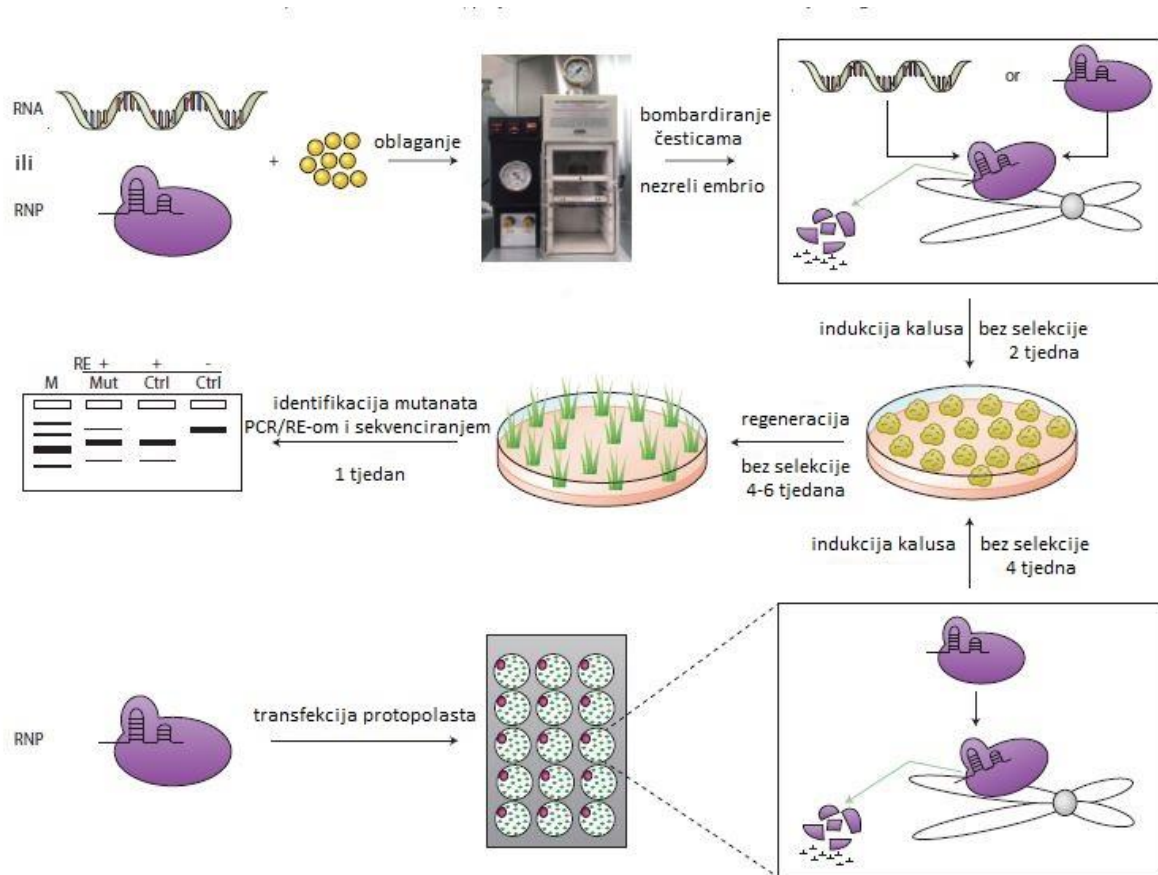
## 4. DNA-NEOVISNO UREĐIVANJE GENOMA BILJAKA

Kada se *A. tumefaciens* koristi kao vektor za uvođenje u stanicu, biljke nastale takvim uređivanjem genoma sadrže sljedove strane DNA, uključujući one koji kodiraju nukleazu, u genomu domaćina. Nakon što se identificira biljka s modifikacijom u željenom lokusu, T-DNA koja nosi gene za Cas9 i gRNA može se ukloniti. U vrsta koje se razmnožavaju nespolno uklanjanje tih slijedova koji potječu iz *A. tumefaciens* nije moguće križanjem i segregacijom (npr. vinova loza, krumpir i banana).

Transformirane plazmide koji kodiraju nukleaze za uređivanje genoma, u stanicama degradiraju endogene nukleaze i mali fragmenti koji prilikom toga nastaju se ponekad ugrađuju i na ciljna mjesta i nasumično u genom domaćina. Zato je moguće da ovaj pristup nije primjenjiv u biljkama ako je potrebno regulatorno dopuštenje (Woo, 2015).

Kada se biljni genom uređuje pomoću nukleaza koje su kodirane na plazmidima, biljke nastale takvim uređivanjem genoma se smatraju genetički modificiranim organizmima (GMO) i strogo su regulirane u nekim državama, što ograničava primjenu uređivanja genoma u biljnoj biotehnologiji i održivoj agrikulturi. Za rješavanje ovog problema daje DNA-neovisno uređivanje genoma. Do danas su opisane dvije metode takvog uređivanja genoma; uvođenje Cas9

kodirajuće mRNA i gRNA ili prethodno *in vitro* sastavljenih ribonukleoproteina, gotovog kompleksa Cas9 i gRNA (RNP), u stanice (Yin, 2015).



**Slika 5.** DNA-neovisno uređivanje genoma biljaka. Preuzeto i prilagođeno iz Yin, 2017.

CRISPR/Cas9 RNA (*in vitro* sintetizirani Cas9 i sgRNA transkripti) ili prethodno sastavljeni CRISPR/Cas9 RNP-ovi se unose u nezrele embrije bombardiranjem česticama. Drugi način unosa jest da se RNP-ovi transficiraju u biljne protoplaste. Potom se inducira formacija kalusa, iz kojih se regeneriraju sadnice pod uvjetima bez selekcije. Regenerirane biljke se pretraže za mutacije pomoću PCR/RE eseja. Uspješan indel na ciljnom mjestu uzrokuje nestanak 1 restrikcijskog mjesta. Primeri umnože lokus oko tog mjesta, a onda se PCR produkt reže s odgovarajućom restrikcijskom endonukleazom. Ako je dobiven indel, PCR fragment ostaje intaktan, a ako ciljanje nije uspjelo onda se reže kao i divlji tip. Najčešće imamo miks stanica (mozaicizam) sa indelom i bez njega (Slika 5) (Yin, 2017).

#### **4.1. DNA-neovisno uređivanje genoma biljaka s prethodno sastavljenim CRISPR/Cas9 ribonukleoproteinima**

Uvođenje ribonukleoproteina sastavljenih od Cas9 proteina i gRNA (RNP), umjesto plazmida ili T-DNA koji kodiraju RNP-ove, u biljne stanice uklanja mogućnost ugrađivanja rekombinantne DNA u genom domaćina. RGEN? RNP-ovi cijepaju ciljna mjesta na kromosomima odmah nakon transfekcije i ubrzo se razgrađuju endogenim staničnim proteazama, što smanjuje stopu mozaicizma i efekta nasumične ugradnje u regeneriranim biljkama. Budući da u navedenom eksperimentalnom pristupu nema potrebe za optimizacijom uporabe kodona (*codon usage*) ili pronalaska efikasnog promotora za ekspresiju Cas9 i gRNA, uporaba prethodno sastavljenih RGEN RNP-ova bi mogla proširiti primjenu uređivanja genoma na sve biljne vrste koje je moguće transformirati. Korištenje RGEN RNP-ova omogućuje *in vitro* predpretraživanje koji vodi izboru visoko aktivnih gRNA i genotipiziranje mutantnih klonova pomoću RFLP analize.

Woo *i sur.* su transformirali RNP-ove u protoplaste tri biljne vrste i uspjeli inducirati ciljane modifikacije u svim slučajevima. RGEN inducirane mutacije su bile stabilne u odraslim biljkama koje su bile regenerirane iz protoplasta i prenesene su se na potomke. Vrlo važan aspekt ovakvog pristupa uređenja genoma jest da u procesu u biljkama ne ostaje rekombinantna DNA. Biljke proizvedene na opisan način mogle bi se isključiti iz važećih GMO regulativa, omogućujući masovno korištenje RNA-vođenog uređivanja genoma u biljnoj biotehnologiji i agrikulturi (Woo, 2015).

#### **4.2. Implikacije na zakonodavnu regulativu**

Još uvijek je nejasno kako će biljke kojima je uređen genom biti regulirane u okviru GMO legislative u Europskoj uniji i drugim državama. Naime, sva tri tipa opisanih nukleaza (ZFN, TALEN, CRISPR-Cas) uvode male insercije i delecije (indele) ili supstitucije na ciljnim mjestima na kromosomima koje se ne može razlikovati od prirodno nastalih ili kemijski induciranih genetičkih varijacija. Međutim, takve mutirane biljke bi se i dalje mogle svrstati u GMO kategoriju od strane regulatornih tijela u određenim državama, što bi i dalje ograničavalo njihovu širu primjenu (Woo, 2015).

U SAD-u, prvi CRISPR/Cas uređeni organizam već je dobio zeleno svjetlo od straneregulatornih tijela. Američka agencija za poljoprivredu (USDA) neće regulirati gljivu

koja je genetički modificirana ovom metodom. Gljiva *Agaricus bisporus* modificirana da ne posmeđi nakon rezanja može se kultivirati i prodavati bez da prolazi uobičajene regulatorne procese spomenute agencije . Fenotip je postignut inaktivacijom obitelji gena koji kodiraju polifenol oksidazu (PPO). Delecijom nekoliko pb u genomu, utišano je šest PPO gena i aktivnost enzima se smanjila za 30% (Waltz, 2016).

## 5. LITERATURA

- Barrangou R, 2013. CRISPR/Cas systems and RNA- guided interference. *WIREs RNA*, 4, 267-278.
- Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Nekrasov V, 2013. Plant genome editing made easy: targetes mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods*, 9, 39-49.
- Bortesi L, Fischer R, 2015. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33, 41-52.
- Ding Y, Li H, Chen LL, Xie K, 2016. Recent Advances in Genome Editing Using CRISPR/Cas. *Frontiers in Plant Science*, 7, 703-715.
- Gasiunas G, Barrangou B, Horvath P, Siksnys V, 2012. Cas9-crRNARibonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptative immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad.*, 109, 2579–2586.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E, 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptative bacterial immunity. *Science*, 337, 816–821.
- Kumar V, Jaim M, 2015. The CRISPR/Cas system for plant genome editing: advances and opportunities. *Journal of Experimental Botany*, 66, 47-57.
- Mahfouz M, Piatek A, Stewart CN, 2014. Genome engineering via TALENs and CRISPR/Cas9 systems: challenges and perspectives. *Plant Biotechnology Journal*, 12, 1006-1014.
- Nekrasov V, Staskawicz b, weigel D, Jones JDG, Kamoun S, 2013. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*, 31, 691-692.
- Puchta H, 2017. Applying CRISPR/Cas for genome engineering in plants: the best is yet to come. *Current Opinion in Plant Biology*, 36, 1–8.
- Quetier F, 2016. The CRISPR-Cas9 technology: Closer to the ultimate toolkit for targeted genome editing. *Plant Science*, 242, 65-76
- Scheben A, Wolter F, Batley J, Puchta H, Edwards D, 2017. Towards CRISPR/Cas crops – bringing togethes genomics and genome editing. *New Phytologist*, 10.
- Schimpl S, Puchta H, 2016. Revolutionizing plant biology: multiple ways of genome engineering by CRISPR/Cas. *Plant Methods*, 12.
- Waltz E, 2016. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature Biotechnology*, 34, 293.

Weeks DP, Spalding MH, Yang B, 2016. Use of designer nucleases for targeted gene and genome editing in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 14, 483-495.

Woo JW, Kim J, Kwon S, Corvalán C, Cho SW, Kim H, Kim SG, Kim ST, Choe S, Kim JS, 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins *Nature Biotechnology*, 33, 1162-1166.

Yin K, Gao C, Qiu J, 2017. Progress and prospects in plant genome editing. *Nature Plants*, 3



## 6. SAŽETAK

Posljednjih nekoliko godina svjedočimo revoluciji u biologiji do koje je došlo otkrićem nove kategorije nukleaza koje omogućuju precizno uređivanje genoma. Kao nukleaze u takvom sustavu za uređivanje genoma, do sada su se koristile *zinc finger* nukleaze (ZFN), efektorske nukleaze nalik transkripcijskim aktivatorima (TALEN), RNA-navođene nukleaze (RGN) iz CRISPR i CRISPR/Cas sustava. Zbog jednostavnosti kojom se može prilagoditi za uređivanje genoma, CRISPR/Cas9 sustav je ubrzo postao najrašireniji alat. Sam CRISPR/Cas sustav je dio adaptivnog imuniteta bakterija i arheja, koji ih štiti od stranih nukleinskih kiselina tako što ih specifično cijepa. Dva su osnovna dijela, sgRNA koja služi kao vodeća i Cas9 nukleaza. Takav sustav uvodi dvolančani lom (DSB) u slijed DNA. Popravak loma staničnim sustavom popravka kao rezultat ima ciljane modifikacije genoma. CRISPR/Cas tehnologija značajno povećava mogućnost poboljšanja odlika usjeva u usporedbi s konvencionalnim pristupima razmnožavanju. Sve spomenute nukleaze uvode male insercije i delecije (indele) ili supstitucije na ciljnim mjestima na kromosomima koje se ne može razlikovati od prirodno nastalih genetičkih varijacija. Biljke uređene CRISPR/Cas tehnologijom bi se mogle komercijalizirati mimo postojeće regulative, ali će se vjerojatno još uvijek smatrati GMO od strane regulatornih autoriteta u određenim državama, što bi moglo smanjiti korištenje programabilnih nukleaza u biotehnologiji biljaka i agrikulturi. Mogućnosti otvara DNA-neovisno uređivanje genoma, s prethodno sastavljenim ribonukleoproteinima. U biljkama ne ostaje rekombinantna DNA, te bi se biljke proizvedene DNA-neovisno mogle isključiti iz važećih GMO regulativa, omogućujući masovno korištenje RNA-vođenog uređivanja genoma u biljnoj biotehnologiji i agrikulturi.

## 7. SUMMARY

In the last couple of years, we are witnessing a revolution in biology, brought by discovery of nucleases which enable high precision genome editing. Till this day the nucleases used were zinc finger nucleases (ZFN), transcription activator like effector nucleases, and RNA-guided nucleases from CRISPR/Cas systems. Due to its simplicity, CRISPR/Cas system shortly became the most common used tool. Originally, the CRISPR/Cas system is found in bacteria and archaea, as a part of adaptive immune system, which protects them from exogenous nucleic acids, by sequence-specific cleaving. In the system, an sgRNA is present, which guides the nuclease, Cas9. This system makes a double strand DNA break. Site-specific modifications result from fixing the DSB by endogenous systems. CRISPR/Cas technology increases the possibility of enhancing crop traits by a great deal in comparison with classic crop breeding techniques. Programmable nucleases introduce small indels or substitutions which can not be distinguished from naturally occurring genetic variations. Plants edited by CRISPR/Cas could be commercialized bypassing the existing regulative, but will probably still be considered GMO in certain states, which could reduce usage of programmable nucleases in plant biotechnology and agriculture. DNA-free genome editing opens some possibilities. In plants that are edited with preassembled RNPs, there isn't any recombinant DNA left. These plants could be excluded from existing GMO regulatives, and open doors into mass usage of RNA-guided genome editing in plant biotechnology and agriculture.