

A GMO 2.0 során használt „génollók” kaotikus zavart okoznak a növények genomjában

háttéranyag

Fenntarthatóság Felé Egyesület

Miközben az EU döntéshozói azon ügyködnek, hogy kivonják az uniós GMO-szabályozás hatálya alól a génmódosított növények új generációját – nem lenne hatásvizsgálat, engedélyezni, sőt jelölni sem kéne az új GMO-kat –, egyre több kutatás támasztja alá azt, hogy ezek a technológiák egyáltalán nem olyan precízek illetve biztonságosak, mint azt a pártolói állítják. A Testbiotech egyik összefoglalója például arra hívja fel a figyelmet, hogy egy nemzetközi kutató csoport arról számolt be, hogy kromotripsizist (destruktív kromoszóma-átrendeződést) figyeltek meg egy CRISPR/Cas technológiával előállított génmódosított paradicsomokban.

Nem tervezett, destruktív kromoszóma-átrendeződés a „génszerkesztett” növényekben

A kromotripsizisről már a géntechnológiai óriáscégektől független kutatók hálózata, az ENSSER 2023. januári CRISPR- állásfoglalásában olvashatunk, ekkor még csak az új génmódosítási technikákkal előállított emlős (és emberi) sejtekben figyeltek meg kromotripsizist:

Az a tény, hogy a CRISPR/Cas eljárásban a "szerkesztés" célzottan a genom adott szekvenciájára irányítható, adta az alapját annak az állításnak, hogy a módszer pontos és előrejelezhető eredményeket szolgáltat. A szerkesztés azonban csak azután következik be, hogy a CRISPR/Cas végrehajtotta funkcióját, amelynek a célja a legtöbb esetben az, hogy kettős szálú DNS-szakadást hozzon létre. Maga a szerkesztés az ezt követő DNS-javítási folyamatok aktiválódásából ered, s e folyamatok során gyakran fordulnak elő hibák. Így a szerkesztés eredménye sem nem precíz, sem nem áll teljes mértékben a génmérnök irányítása alatt, hiszen a sejt saját DNS-javítási folyamatainak alakulásaitól függ.

*Ennek következtében nemcsak a tervezett genetikai módosítás jöhet létre a CRISPR/Cas génszerkesztési folyamatban, hanem az nem kívánt mutációkat (DNS-károsodást) is eredményezhet, akár a tervezett szerkesztési helyen ("célzott"), akár a genom más területein ("céltévesztő"). Ezek a nem tervezett mutációk magukban foglalhatják nagy DNS-szakaszok törlését, beszúrását vagy átrendeződését, mutáns fehérjék termelődését eredményező, új génszekvenciák létrehozását, nem tervezett módosításokat a genomnak a célzott helyhez hasonló részein, de **kromoszóma-átrendeződés** is felléphet (**kromothripszis** – olyan destruktív genomátrendeződés, amelyben széttöredezett kromoszómadarabok újrendeződése véletlenszerűen következik be), ami komoly biztonsági aggályokat vet fel.*

A génszerkesztett növények esetében (akár a CRISPR/Cas, akár más új genetikai módosítási módszerekkel készültek), a génszerkesztési folyamat egésze (szövettenyésztés, sejtranzformáció, a génszerkesztési eljárás célzott vagy céltévesztő kimenetelei) szükségszerűen eredményez nem kívánt módosult génfunkció-mintázatokat. Ezek pedig változásokat idézhetnek elő a növény biokémiai folyamataiban oly módon, hogy az váratlanul új toxinokat vagy allergéneket termeljen, ismert toxinjait vagy allergénjeit megváltozott szinteken termelje, avagy tápértéke változzon. Ezek a változások negatív hatással lehetnek az ezen növényeket fogyasztó emberi vagy állati szervezetek egészségi állapotára, valamint a tágabb ökoszisztémára is, amint arra bizonyos kutatók felhívták a figyelmet.

Néhány hónappal később hívta fel a figyelmet a Testbiotech, hogy egy nemzetközi kutató csoport arról számolt be, hogy kromotripszist figyeltek meg CRISPR/Cas technológiával előállított génmódosított paradicsomokban is.

A „génollók” kaotikus zavart okoznak a növények genomjában

Első alkalommal mutatták ki a kromotripszist növényekben CRISPR/Cas alkalmazását követően

Rövid összefoglaló:

A legújabb publikációk szerint a „génollók” növényekben történő alkalmazása a korábban feltételezettnél jóval nagyobb kockázattal jár a genom mélyreható károsodása szempontjából. A genom kiterjedt területei is érintettek lehetnek.

Ebben az összefüggésben a kromotripsziszhez hasonló hatások meghatározó szerepet játszanak. A kromotripszis olyan jelenség, amely során egyetlen „katasztrofikus” eseményben több száz genetikai változás következhet be egyidejűleg. Ilyenkor a genetikai állomány számos szakasza felcserélődhet, megcsavarodhat, újrakombinálódhat, vagy akár el is vesztet. Korábban már ismert volt, hogy ilyen hatásokat kiválthat a CRISPR/Cas „génolló” alkalmazása emlős (és emberi) sejtekben. Most pedig első alkalommal növényekben is kimutatták a kromotripsziszhez hasonló hatásokat a CRISPR/Cas génolló alkalmazását követően.

A kromotripszis pontos mechanizmusai még nem teljesen ismertek. Azt azonban már tudjuk, hogy a genetikai állomány mindkét szálának egyidejű megszakadása kiválthatja ezeket a kaotikus hatásokat. Amikor a DNS mindkét szálát elvágják – ahogyan az a CRISPR/Cas „génolló” alkalmazása során jellemzően történik –, a kromoszómák elveszítik a kapcsolatot a folyamat során szétválasztott végekkel. Ha a kromoszómák törésének kijavítása nem sikerül megfelelően, a levált vég elveszhet, vagy átrendeződhet, és akár máshol be is épülhet.

A „génollók” alkalmazása jelentősen növeli a kromotripszis előfordulásának gyakoriságát. Emellett megnő annak a valószínűsége is, hogy a genomban bizonyos, egyébként védett területek is érintetté válnak. A lehetséges nem kívánt következmények széles körű kockázatokat foglalnak magukban, többek között a növény egészségi állapotának romlását, a környezettel való kölcsönhatásainak megváltozását, valamint a növény összetételének nem kívánt módosulását.

A Samach és munkatársai által közzétett eredmények új megvilágításba helyezik a génollók állítólagos precizitását: az új génmódosítási technikák lehetővé teszik, hogy a genomban meghatározott helyeket célozzanak meg, például génfunkciók kiiktatása céljából. Ugyanakkor ezeknek a „vágásoknak” a következményei nem előre jelezhetők, és nem is kontrollálhatók. A nem szándékolt genetikai változások a kromoszómák nagy szakaszait is érinthetik. Az új génmódosítási technikákkal előállított növények ezért nem tekinthetők eleve „biztonságosnak”, és a kockázatokat alaposan vizsgálni kell.

A „génollók” alkalmazása növeli a kromotripszis bekövetkezésének valószínűségét

Ha mutációk lépnek fel, a sejtek megpróbálják kijavítani a hibát, és sok esetben képesek helyreállítani az eredeti működést. Mivel a fontos génfunkciók gyakran különösen jól védettek a funkcióvesztéssel szemben, a mutációk nem azonos gyakorisággal fordulnak elő a genom minden pontján (Monroe et al., 2022).

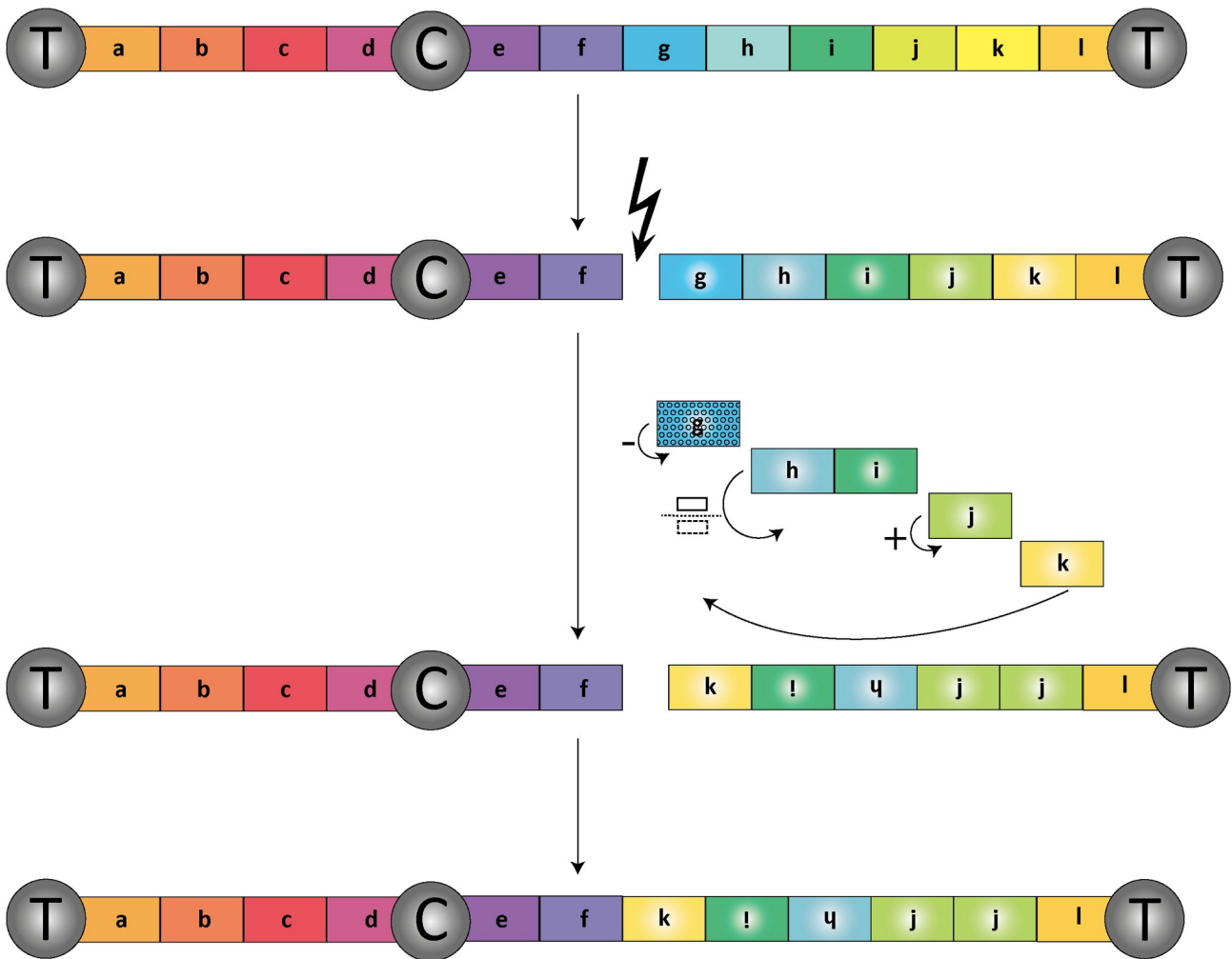
Az új génmódosítási technikák azonban eltérnek ezektől a természetes folyamatoktól: a CRISPR/Cas nukleáz (azaz a „génolló”) alkalmazása rendszerint a genetikai állomány mindkét szálának elvágását okozza. Ha a sejtek megpróbálják helyreállítani az eredeti génfunkciót, a nukleáz felismerheti a már kijavított célterületet, és újra elvághatja azt, ezzel megzavarva a javítási folyamatokat. Különösen növények esetében az érintett gének gyakran több példányban vannak jelen, ezért a „génollók” alkalmazása tipikusan több kettős szálú DNS-törést idéz elő a genomban, ráadásul egy meghatározott mintázatban (lásd pl. Sanchez-Leon, 2018). A „génollók” emellett lehetővé teszik olyan genetikai helyek módosítását is, amelyek egyébként különösen jól védettek a funkcióvesztéssel szemben (Kawall, 2019).

Korábban már ismert volt, hogy a „génollók” alkalmazása jelentősen növeli a kromotripszis bekövetkezésének valószínűségét emlős- (és emberi) sejtekben (Ledford, 2020; Leibowitz et al., 2021; Amendola et al., 2022). Ennek következtében a CRISPR/Cas9 klinikai alkalmazása kapcsán komoly biztonsági aggályok merültek fel a katasztrofális DNS-átrendeződések miatt, amelyeket olykor már „CRISPRtripszisként” is emlegetnek (Amendola et al., 2022). Most pedig első alkalommal növényekben is kimutatták ezeket a hatásokat a CRISPR/Cas alkalmazását követően. Ezt megelőzően növényekben már más génmódosítási eljárásokkal összefüggésben is észleltek kromotripszist (Chu & Agapito-Tenfen, 2022).

A kromotripszis mechanizmusai

Egy friss publikáció szerint (de Groot et al., 2023) a kettős szálú DNS-törések a kromotripszis kiváltó tényezői lehetnek. Bár a folyamat minden részlete még nem teljesen ismert, az nem kérdéses, hogy különösen a CRISPR/Cas nukleáz alkalmazása jelentősen növelheti ezen hatások bekövetkezésének valószínűségét.

Feltételezhető, hogy a megzavart DNS-javítási folyamatok kulcsszerepet játszanak (de Groot et al., 2023): ha a sejtek nem tudják azonnal újraegyesíteni a DNS szétvált végeit, a kromoszómáról levált genomszakaszok végpontjain különböző folyamatok indulhatnak el. Ezek a folyamatok a levált kromoszómaszegmensek nagy részét érinthetik, és jelentős mértékű káoszt okozhatnak. A genetikai állomány egyes szakaszai megcsavarodva épülhetnek vissza, megkettőződhetnek, vagy akár teljesen el is veszhetnek. Bizonyos esetekben a feldarabolódott kromoszómák DNS-végei e változások ellenére újra összekapcsolódhatnak egymással; más esetekben viszont a kromoszóma más szakaszaival létesítenek új kapcsolatokat, ami a genetikai állomány szerkezetének jelentős átalakulásához vezethet (de Groot et al., 2023). A kromoszómák nagyobb szakaszai akár teljesen el is veszhetnek.



Ábra: Példák a kromotripszis által okozott hatásokra: a kromoszómáról levált genomszakaszok végpontjain különböző folyamatok indulhatnak el. A genetikai állomány egyes szakaszai megcsavarodva épülhetnek vissza, megkettőződhetnek, vagy akár teljesen el is veszhetnek (de Groot et al., 2023 alapján átdolgozva - Testbiotech).

Ezek a folyamatok többek között különféle típusú rákos megbetegedéseket válthatnak ki emlősökben (és emberekben) (Leibowitz et al., 2021; Amendola et al., 2022). Növényekben a génaktivitás megváltozhat, az anyagcsere-folyamatok és a növekedés zavart szenvedhet, illetve új alkotóelemek is termelődhetnek a növényekben. Mindez negatív következményekkel járhat az egészségre és a környezetre, valamint a növények kórokozókkal és klímastresszel szembeni ellenálló képességére is. A kockázatok általában nem becsülhetők meg előre, ezért minden esetben egyedileg kell vizsgálni őket.

Első megfigyelések növényekben

Egy friss tanulmány (Samach et al., 2023) paradicsomon végzett kísérleteket ír le. Annak érdekében, hogy a CRISPR/Cas alkalmazását követően azonosítani tudják a kromotripszist, a kutatók először olyan további géneket juttattak be, amelyek könnyen felismerhető szint eredményeznek.

Ezekben a növényekben a „génollókat” arra használták, hogy a mesterséges markergéneket hordozó DNS-szakaszt elválasszák a kromoszóma többi részétől. A kutatók azt várták volna, hogy a sejtek

úgy javítják ki ezt a vágást, hogy csak ez az egy hely módosul. A vágás előtti és utáni génszakaszoknak változatlanoknak kellett volna maradniuk.

Néhány növény esetében azonban a szín intenzitása később megváltozott, ami arra utalt, hogy a génollók alkalmazása korántsem csak a célzott régiót érintette: a marker vagy eltűnt, vagy néhány esetben még intenzívebb színt eredményezett. Ezeknek a növényeknek a genetikai állományát ezt követően részletesebben is megvizsgálták. Ez a vizsgálat a nem szándékolt hatások széles skáláját tárta fel:

- Néhány esetben a mesterséges génmarkert a DNS mindkét szálán megtalálták, vagyis a DNS megszakadását követően az érintett génszakasz megkettőződött (a tulajdonság szomatikus crossing-over révén homozigóttá vált). Az így létrejött paradicsomok virágainak és termésének színe erőteljesen megváltozott.
- Több esetben a színezék elveszett, mert az adott kromoszómaszegmenst kromotripszis érintette. Ezekben az esetekben a teljes kromoszóma elvesztését, illetve nagymértékű DNS-átrendeződéseket, a genetikai állomány jelentős részeinek elvesztését, valamint génszakaszok új kombinációinak kialakulását figyelték meg.

„A kutatók (Samach et al., 2023) arra a következtetésre jutottak, hogy a génollók alkalmazása olyan „katasztrofikus esemény” volt, amely kiváltotta a kromotripszis folyamatát. Eddig ez a hatás növényekben nem volt ismert a „génollók” alkalmazásával összefüggésben, valószínűleg azért, mert korábban senki nem végzett ehhez hasonló vizsgálatokat. Valójában a kromotripszis hatásait nem mindig könnyű kimutatni: ha egy célzott génfunkció a génollók alkalmazása után megszűnik, azt okozhatja a genomban végrehajtott szándékolt vágás is, de kromotripszishoz hasonló változások is állhatnak mögötte, amelyek a genom jóval nagyobb részeit érintik.

A kísérleti eredményeket megfelelő súllyal kell figyelembe venni az új génmódosítási technikák növényekben való alkalmazásának szabályozásáról szóló további viták során.

Jelentősége az új génmódosítási technikákkal előállított növények szabályozása szempontjából

Emlős- (és emberi) sejtek esetében a génollók alkalmazása által kiváltott „*CRISPR*tripszis” hatásait már több éve intenzíven kutatják, mivel ezek – többek között – fejlődési rendellenességekhez és daganatos megbetegedésekhez vezethetnek (lásd: Leibowitz et al., 2021; Amendola et al., 2022).

Ezzel szemben növényekben ezt a jelenséget csak most mutatták ki a CRISPR/Cas génolló alkalmazásával összefüggésben (Samach et al., 2023). Megállapították, hogy a CRISPR/Cas alkalmazása a növények anyagcseréjének jelentős megváltozásához vezethet, ami kedvezőtlen hatásokkal járhat az egészségre és a környezetre, valamint veszélyeztetheti a növénynevelés jövőjét is.

Az eredmények a szabályozás fokozott szükségességére hívják fel a figyelmet: bár a DNS-töréseket más tényezők – például nagy dózisu radioaktív sugárzás – is kiválthatják, kérdéses, hogy ezek a változások ugyanazon a helyeken és ugyanolyan gyakorisággal következnek-e be, és ezáltal hasonló hatásokat eredményeznek-e.

Általánosságban feltételezhető, hogy a genetikai sokféleség növelése érdekében alkalmazott fizikai és kémiai módszerekkel kiváltott, nem célzott genetikai változások nem idéznek elő olyan eseményeket, amelyek természetes úton ne fordulhatnának elő (lásd pl. EFSA, 2021).

Más a helyzet az új génmódosítási technikák esetében: jól ismert, hogy a biotechnológiai mutagének (például a génollók) által kiváltott genetikai változások és az ezekből kialakuló mintázatok jelentősen eltérhetnek a „véletlenszerű” folyamatoktól várható változásoktól (áttekintés: Koller et al., 2023). Ezek a hatások elkerülhetetlenül befolyásolják, hogy a kromotripszis hol és milyen gyakran fordul elő a genomban. Emellett nem zárható ki, hogy a génollók és a sejten belüli DNS-javító folyamatok kölcsönhatásai elősegítik vagy felerősítik a kromotripszis kialakulását és lefolyását.

Több érintett szereplő abból indul ki, hogy a génollók használata felgyorsítja a nemesítést, mivel ezek az eszközök precízek. Most azonban ismét világossá vált, hogy a génollók alkalmazásának e gyakran hangoztatott előnyei ilyen formában nem valósulnak meg: a CRISPR/Cas számos, kiterjedt és váratlan genetikai változást idézhet elő, amelyeket részletesen meg kell vizsgálni nemcsak a biztonság, hanem a további nemesítésre gyakorolt következmények szempontjából is.

Eddig úgy tűnik, hogy az Európai Bizottság abból indul ki: elegendő lenne, ha az új génmódosítási technikákkal előállított növények kockázatértékelése csak a szándékolt genetikai változásokra terjedne ki (lásd például: Testbiotech, 2023). Ebben az esetben azonban a kromotripszis hatásai sokszor rejtve maradnának. A következmények és a hosszú távú hatások számos tényezőtől függenek, például az adott génkombinációtól és a környezeti hatásoktól. Ezek a változások idővel észrevétlenül felhalmozódhatnak a nemesítési állományokban, és veszélyeztethetik a jövőbeli növény nemesítést, valamint az élelmezésbiztonságot is.

Hivatkozások:

Amendola M., Brusson M., Miccio A. (2022) CRISPRthripsis: the risk of CRISPR/Cas9-induced chromothripsis in gene therapy. *Stem Cells Transl Med*, 11_ 1003-1009.

<https://doi.org/10.1093/stcltm/szac064>

Chu, P. & Agapito-Tenfen, S.Z. (2022) Unintended Genomic Outcomes in Current and Next Generation GM Techniques: A Systematic Review. *Plants*, 11, 2997.

<https://doi.org/10.3390/plants11212997>

de Groot, D., Spanjaard, A., Hogenbirk, M.A., Jacobs, H. (2023) Chromosomal rearrangements and chromothripsis: the alternative end generation model. *Int J Mol Sci*, 24, 794.

<https://doi.org/10.3390/ijms24010794>

EFSA GMO Panel (2021) In vivo and in vitro random mutagenesis techniques in plants. *EFSA J*, 19(11): 6611. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6611>

Kawall K. (2019) New possibilities on the horizon: genome editing makes the whole genome accessible for changes. *Front Plant Sci*, 10: 525. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00525>

Koller F., Schulz M., Juhas M., Bauer-Panskus A., Then C. (2023) The need for assessment of risks arising from interactions between NGT organisms from an EU perspective,. *Environ Sci Eur*, 35(1): 27. <https://doi.org/10.1186/s12302-023-00734-3>

Ledford, H. (2020), CRISPR Gene Editing in Human Embryos Wreaks Chromosome Mayhem, *Nature* 583, 17-18, <https://www.nature.com/articles/d41586-020-01906-4>

Leibowitz M.L., Papathanasiou S., Doerfler P.A., Blaine L.J., Sun L., Yao Y., Zhang C.-Z., Weiss M.J., Pellman D. (2021) Chromothripsis as an on-target consequence of CRISPR-Cas9 genome editing. Nat Genet, 53(6): 895-905. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00838-7>

Monroe G., Srikant T., Carbonell-Bejerano P., Becker C., Lensink M., Exposito-Alonso M., Klein M., Hildebrandt J., Neumann N., Kliebenstein D., Weng M.-L., Imbert E., Ågren J., Rutter M.T., Fenster C.B., Weigel D. (2022) Mutation bias reflects natural selection in Arabidopsis thaliana. Nature, 602: 101-105. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04269-6>

Samach A., Mafessoni F., Gross O., Melamed-Bessudo C., Filler-Hayut S., Dahan-Meir T., Amsellem Z., Pawlowski W.P., Levy A.A. (2023) A CRISPR-induced DNA break can trigger crossover, chromosomal loss and chromothripsis-like rearrangements. BioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.05.22.541757>

Sanchez-Leon S., Gil-Humanes J., Ozuna C.V., Gimenez M.J., Sousa C., Voytas D.F., Barro F. (2018) Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. Plant Biotechnol J, 16: 902-910. <https://doi.org/10.1111/pbi.12837>

Testbiotech (2023) The mandate of EFSA and unintended genetic changes caused by NGTs, letter to the EU Commission, <https://www.testbiotech.org/sites/default/files/Lette%20Testbiotech%20Commission%20May%202023.pdf>



AGRÁRMINISZTÉRIUM

Ez a háttéranyag az Agrárminisztérium támogatásával készült.