

Briefing sulla biosicurezza

TWN
Third World Network
www.twn.my



Dicembre 2020

Perché gli organismi sottoposti a editing genomico non sono esclusi dal Protocollo di Cartagena sulla biosicurezza

Di **Eva Sirinathsinghi**

Nuove ed emergenti tecniche di editing genomico vengono promosse come metodi più veloci per modificare geneticamente le informazioni e le espressioni genetiche in regioni specifiche del genoma. Tali tecniche includono le brevi ripetizioni palindrome raggruppate regolarmente (CRISPR), le meganucleasi (MN), le nucleasi di dita di zinco (ZFN), le nucleasi effettrici simili ad attivatori di trascrizione (TALEN) e la mutagenesi diretta da oligonucleotidi (ODM). Lo sviluppo di tali tecniche ha suscitato accesi dibattiti su (1) se siano regolamentate dall'attuale legislazione sulla biosicurezza, (2) se siano sicure e (3) se debbano essere sottoposte alle stesse procedure di valutazione e gestione dei rischi degli organismi viventi modificati (OVM).

Un'argomentazione avanzata da quanti cercano di escludere dalla regolamentazione, anche a livello nazionale, gli organismi sottoposti a editing genomico con tecniche di ingegneria genetica è che essi non rientrano nella definizione di OVM contenuta nel Protocollo di Cartagena sulla biosicurezza della Convenzione sulla diversità biologica (CBD).

Questo articolo si propone di dimostrare che le tecnologie e le applicazioni di editing genomico attualmente in uso, comprese tutte le tecniche che utilizzano i sistemi CRISPR, rientrano chiaramente nella definizione di OVM del Protocollo, che comportino l'inserzione, la delezione o la modificazione di sequenze di genomi.

TWN THIRD WORLD NETWORK è un'organizzazione internazionale indipendente senza scopo di lucro per la ricerca e la sensibilizzazione, che si occupa di promuovere una maggiore attenzione alle esigenze, alle aspirazioni e ai diritti dei popoli del Sud e di favorire uno sviluppo giusto, equo ed ecologico.

Indirizzo: 131 Jalan Macalister, 10400 Penang, MALAYSIA **Tel:** 60-4-2266728/2266159 **Fax:** 60-4-2264505

Email: twn@twnetwork.org **Sito web:** www.twn.my



GENEWATCH UK è un gruppo di ricerca politica e di interesse pubblico senza scopo di lucro, che studia le conseguenze che la scienza e le tecnologie genetiche avranno sul cibo, la salute, l'agricoltura, l'ambiente e la società.

Indirizzo: 53 Milton Rd, Cambridge CB4 1XA, UK **Tel:** +44 (0)330 0010507

Email: mail@genewatch.org **Sito web:** www.genewatch.org

Il contenuto di questa pubblicazione può essere riprodotto o riutilizzato gratuitamente per scopi non commerciali, tranne dove diversamente indicato. Questa pubblicazione è autorizzata ai sensi della Licenza Creative Commons Attribuzione-NonCommerciale-CondividiAlloStessoModo 4.0 Internazionale.

La definizione di “organismo vivente modificato” secondo il protocollo di Cartagena

L'articolo 3 del Protocollo di Cartagena fornisce tre definizioni, che sono correlate e devono essere lette insieme: “organismo vivente modificato”, “organismo vivente” e “biotecnologia moderna”.

Per “organismo vivente modificato” si intende “un organismo vivente che possiede una nuova combinazione di materiale genetico ottenuta mediante la biotecnologia moderna”.

Pertanto, nel Protocollo, la definizione di organismo vivente modificato comprende solo gli organismi viventi che

- contengono nuove combinazioni di materiale genetico; e
- sono stati prodotti utilizzando le tecniche della biotecnologia moderna (paragrafo 208, *An Explanatory Guide to the Cartagena Protocol on Biosafety*: Mackenzie et al., 2003).

Per “organismo vivente” si intende “un'entità biologica in grado di trasferire o replicare materiale genetico, compresi organismi sterili, virus e viroidi”.

Mentre il Protocollo di Cartagena non definisce il “materiale genetico”, la CBD lo fa: “il materiale di origine vegetale, animale, microbico o altro, contenente unità funzionali dell'ereditarietà”. Queste ultime sono intese come acidi nucleici contenenti informazioni genetiche. Nel contesto del Protocollo di Cartagena, il materiale genetico può essere interpretato come gli acidi nucleici che contengono unità funzionali dell'ereditarietà (paragrafo 201, *Explanatory Guide*).

Una “nuova combinazione di materiale genetico” può essere considerata come una combinazione la cui esistenza non era nota fino al momento in cui è stata prodotta per la prima volta. Unita alla definizione di materiale genetico della CBD, può quindi essere intesa come una nuova combinazione di acido nucleico contenente unità funzionali dell'ereditarietà (paragrafo 209, *Explanatory Guide*). È importante notare che la nuova combinazione si riferisce esclusivamente a una combinazione di materiale genetico, anche se questo non si traduce in un cambiamento osservazionale (paragrafo 210, *Explanatory Guide*).

Una nuova combinazione potrebbe derivare da una nuova forma di unità funzionale dell'ereditarietà, ad esempio, risultante da un cambiamento che altera la sequenza completa di nucleotidi all'interno dell'unità, che sia modificando, inserendo o eliminando uno o più nucleotidi. Potrebbe anche derivare da una nuova disposizione delle unità funzionali dell'ereditarietà, ad esempio l'introduzione di materiale genetico di specie diverse o il riarrangiamento del materiale genetico della stessa specie. Una nuova combinazione potrebbe derivare da un singolo cambiamento in una sequenza nucleotidica o da cambiamenti molto più consistenti (paragrafi 211-212, *Explanatory Guide*).

Secondo il Protocollo di Cartagena, la nuova combinazione di materiale genetico deve essere “ottenuta mediante la biotecnologia moderna”. Questo è un criterio fondamentale per la definizione di un OVM. Secondo il Protocollo, il fatto che un organismo sia o meno un OVM dipende dall'utilizzo della “biotecnologia moderna” per creare una nuova combinazione di materiale genetico.

Nel Protocollo di Cartagena, la “biotecnologia moderna” è definita come:

“L'applicazione di:

- a. tecniche in vitro dell'acido nucleico, compresa la ricombinazione dell'acido deossiribonucleico (DNA) e l'inoculazione diretta dell'acido nucleico in cellule o organuli, o
- b. fusione di cellule al di fuori della famiglia tassonomica, che superano le naturali barriere fisiologiche della riproduzione o della ricombinazione e che sono diverse dalle tecniche tradizionali utilizzate nell'incrocio e nella selezione”.

Pertanto, questa definizione include, senza limitarsi ad esse, le tecniche in vitro dell'acido nucleico applicate all'inserzione, la delezione e la modificazione del materiale genetico (paragrafo 215, *Explanatory Guide*). Le due condizioni sono che devono essere superate le naturali barriere fisiologiche della riproduzione o della ricombinazione, e che devono essere diverse dalle tecniche tradizionali utilizzate nell'incrocio e nella selezione.

In sintesi, affinché un organismo vivente possa essere definito un OVM ai sensi del Protocollo di Cartagena, deve soddisfare tre criteri:

1. l'organismo contiene nuove combinazioni

di materiale genetico;

2. è stato ottenuto mediante le tecniche della biotecnologia moderna (compresa l'applicazione di tecniche in vitro dell'acido nucleico o la fusione di cellule al di fuori della famiglia tassonomica); e

3. le tecniche della biotecnologia moderna utilizzate hanno superato le naturali barriere fisiologiche della riproduzione o della ricombinazione e sono diverse dalle tecniche tradizionali utilizzate nell'incrocio e nella selezione.

Criterio 1: l'organismo contiene nuove combinazioni di materiale genetico

Per i sistemi basati su CRISPR, la tecnica comporta l'uso di sequenze di RNA guida (gRNA) prodotte sinteticamente per legarsi a una sequenza di DNA (o RNA) da "sottoporre a editing". Il gRNA, quindi, dirige l'enzima Cas9, o endonucleasi, verso la sequenza di interesse, dove taglia il DNA, attivando il meccanismo di riparazione del DNA della cellula. Se il processo di riparazione provoca l'inserzione o la delezione di piccoli pezzi di materiale genetico (gli 'indel'), il risultato è noto come applicazione SDN-1 (nucleasi sito-specifica di tipo 1). Le applicazioni SDN-1 sono utilizzate per distruggere i geni in maniera imprecisa. Altrimenti, se l'intenzione è quella di "sottoporre a editing" un gene, viene anche introdotto del DNA supplementare che funge da modello per l'alterazione desiderata, che può quindi essere copiata nel gene dell'organismo bersaglio. Questa tecnica è denominata SDN-2. I sistemi basati su CRISPR sono anche utilizzati per inserire DNA transgenico in un sito specifico, introducendo un modello di DNA insieme al macchinario CRISPR. Questa procedura è chiamata SDN-3.

Allo stesso modo, le tecniche TALEN, MN e ZFN possono essere concepite per realizzare applicazioni SDN-1, 2 e 3 di 'indel', modificazioni o inserzioni di sequenze di DNA transgenico. Tuttavia, esse sono diverse dai sistemi basati su CRISPR in quanto non utilizzano il gRNA per mirare a specifiche sequenze di DNA, ma sono invece enzimi a base proteica che hanno siti di riconoscimento del DNA per legarsi a specifiche sequenze di DNA di interesse e tagliarle.

L'ODM, invece, comporta l'introduzione di brevi tratti di DNA, chiamati oligonucleotidi, o ibridi di DNA/RNA. Questi oligonucleotidi sono identici alla sequenza bersaglio da modificare, tranne che per l'alterazione desiderata da introdurre. Questi modelli di DNA si legano alla sequenza bersaglio, dopodiché il meccanismo di riparazione naturale della cellula riconosce la discordanza della singola base tra il proprio DNA e quello del modello di riparazione.

Lo scopo di tutte le tecniche di editing genomico è quello di introdurre cambiamenti genetici precedentemente inesistenti al fine di produrre nuovi tratti negli organismi viventi, indipendentemente dal fatto che il DNA sia stato inserito o meno. Che siano impiegate per generare "indel", "modificazioni" o "inserzioni", tutte mirano a creare nuovi tratti generando nuove combinazioni di DNA, indipendentemente dal fatto che il DNA transgenico venga effettivamente inserito.

*È quindi chiaro che **tutte** le tecniche di editing genomico producono una nuova combinazione di materiale genetico, e dunque soddisfano il criterio 1.*

Criterio 2: l'utilizzo della biotecnologia moderna (compresa l'applicazione di tecniche in vitro dell'acido nucleico o la fusione di cellule al di fuori della famiglia tassonomica)

Attualmente, la stragrande maggioranza delle tecniche di editing genomico comporta l'applicazione di tecniche di acido nucleico, che prevedono l'uso di acidi nucleici RNA o DNA in una determinata fase del processo.

Le tecniche CRISPR (comprese le doppie nickasi e i "modificatori" delle basi) possono essere eseguite in diversi modi, che comportano tutti l'introduzione di acidi nucleici DNA o RNA. L'approccio classico è quello di introdurre plasmidi di DNA che codificano le CRISPR. Il plasmide è introdotto permanentemente nel genoma dell'organismo bersaglio e può essere successivamente rimosso tramite backcrossing, oppure può essere espresso temporaneamente. Sono state sviluppate tecniche più moderne senza DNA, che comportano l'introduzione di molecole di RNA messaggero che codificano il macchinario

CRISPR o l'introduzione diretta di ribonucleoproteine composte dalla proteina Cas9 insieme alla molecola di RNA guida (Metje-Sprink et al., 2019).

Come per le tecniche basate su CRISPR, i classici metodi TALEN, ZFN e MN comportano l'introduzione di plasmidi di DNA che esprimono ciascuno dei TALEN, ZFN o MN rispettivamente, introdotti nel genoma dell'organismo bersaglio permanentemente (e successivamente rimossi, se desiderato) o temporaneamente. È stato anche dimostrato che l'RNA messaggero codifica il macchinario TALEN nelle cellule vegetali (Stoddard et al., 2016).

Sono state dimostrate eccezioni limitate in laboratorio con l'uso di tecniche TALEN e MN (Luo et al., 2015) dove è stata eseguita la somministrazione diretta delle rispettive forme proteiche delle nucleasi nelle piante per generare un organismo con genoma modificato. Anche se questi metodi probabilmente non soddisfano le condizioni del criterio 2, attualmente sono molto meno efficaci dell'inserzione di plasmidi di DNA ed è improbabile che siano ampiamente utilizzati.

Le tecniche ODM vengono eseguite introducendo direttamente gli oligonucleotidi, che possono essere di DNA o ibridi di DNA/RNA, nel genoma dell'organismo bersaglio.

Le tecniche basate su CRISPR, ZFN e ODM prevedono tutte l'uso di acidi nucleici (DNA, o RNA, o ibridi di DNA/RNA) per svolgere funzioni di editing genomico, e quindi soddisfano il criterio 2. La maggior parte delle tecniche TALEN e MN, con poche eccezioni, comportano l'utilizzo di acidi nucleici (DNA o ibridi di RNA) per svolgere funzioni di editing genomico, e quindi soddisfano il criterio 2.

Inoltre, anche se la nuova combinazione di materiale genetico ottenuta mediante la biotecnologia moderna viene successivamente trasferita in un altro organismo attraverso tecniche tradizionali utilizzate nell'incrocio o nella selezione, l'organismo risultante è anch'esso un OVM secondo il Protocollo (paragrafo 214, *Explanatory Guide*). Tale definizione, pertanto, includerebbe organismi con genoma modificato che introducono una cassetta di DNA che codifica le nucleasi e che

viene successivamente rimossa con metodi di incrocio convenzionale (come spesso avviene con CRISPR, TALEN, ZFN e MN), il che soddisferebbe il criterio 2, poiché la fase precedente avrebbe già comportato l'applicazione di tecniche dell'acido nucleico per generare una nuova combinazione di materiale genetico.

Assicurare che il processo, e non solo il risultato, sia regolamentato secondo il criterio 2

È fondamentale sottolineare che il criterio 2 assicura che il processo, e non il risultato, sia regolamentato e valutato, al fine di consentire il rilevamento di effetti indesiderati, alcuni dei quali pregiudicano la distinzione teorica tra le applicazioni di ODM, SDN-1, 2 e 3. Sono state rilevate inserzioni involontarie di materiale genetico, sia all'interno che all'esterno dei siti bersaglio (Li et al., 2015; Liang et al., 2017; Ono et al., 2019; Norris et al., 2020; Skryabin et al., 2020), un effetto associato a tutte le nucleasi che introducono rotture del DNA a doppio filamento (compresi CRISPR, TALEN, ZFN and MN). Pertanto, sebbene lo scopo dei metodi ODM, SDN-1 o 2 non preveda l'inserzione permanente del DNA, l'evidenza attuale suggerisce che ciò potrebbe essere spesso un risultato teorico anziché pratico.

Tra gli altri effetti indesiderati documentati vi sono modificazioni in altre parti del genoma, ad esempio mutazioni, riarrangiamenti complessi e su vasta scala, traslocazioni, inserzioni e delezioni, e produzione di nuove proteine. (Wolt et al., 2016; Mou et al., 2017; Shin et al., 2017; Zhu et al., 2017; Kosicki et al., 2018; Tuladhar et al., 2019). Persino le alterazioni di un singolo nucleotide possono influire sulla funzione di un gene, che sia nel sito bersaglio o al di fuori di esso.

Inoltre, il processo di editing genomico di solito comporta tecniche di supporto identiche a quelle, più datate, della transgenesi, tra cui la trasformazione di cellule in coltura. Tali processi sono associati a effetti indesiderati come delezioni e riarrangiamenti (si veda, ad esempio, Kim et al., 2003; Latham et al., 2006; Makarevitch et al., 2003; Rang et al., 2005; Windels et al., 2003).

Criterio 3: le tecniche della biotecnologia moderna utilizzate hanno superato le naturali barriere fisiologiche della riproduzione o della ricombinazione e sono diverse dalle tecniche tradizionali utilizzate nell'incrocio e nella selezione

È chiaro che le tecniche di editing genomico sono diverse dalle tecniche tradizionali utilizzate nell'incrocio e nella selezione, poiché gli organismi sottoposti a editing genomico sono generati senza che avvenga alcun incrocio, ma attraverso l'uso delle tecniche della biotecnologia moderna per introdurre cambiamenti genetici. È anche evidente che esse superano le naturali barriere della riproduzione o della ricombinazione, poiché l'editing genomico consente di ottenere modificazioni che altrimenti non si verificherebbero naturalmente (cfr. articolo di Kawall, 2019). Come illustrato di seguito, le tecniche descritte possono essere utilizzate per eseguire una o più modificazioni che superano le naturali barriere della riproduzione o della ricombinazione.

Uno dei principali vantaggi per chi sviluppa gli OVM è la capacità di utilizzare l'editing genomico per eseguire alterazioni simultanee o successive del materiale genetico, un'applicazione chiamata multiplexing. Molti tratti delle piante dipendono da una moltitudine di geni. Le tecniche CRISPR, TALEN, ZFN e MN offrono ora un mezzo per raggiungere molti geni contemporaneamente, o più copie dello stesso gene (così come i paraloghi), cosa che, fino ad oggi, non è ancora stata realizzata con l'incrocio convenzionale, la mutagenesi chimica o le tecniche transgeniche (si veda, ad es., Kawall, 2019; Ran et al., 2018; Wang et al., 2018; Li et al., 2018; Qi et al., 2016; Cai et al., 2018; Bao et al., 2015; Suzuki et al., 2013; Hauschild et al., 2011). L'alterazione di tutte le copie di un gene è particolarmente pertinente per le piante, dato che molte specie hanno molteplici copie di un gene come conseguenza della poliploidia (la presenza di più di due copie di ogni cromosoma) o della ridondanza genetica (la presenza di più copie di un gene). Né l'incrocio convenzionale né le mutazioni naturali sono in grado di alterare tutte le copie di una sequenza genetica. Sebbene manchino attualmente dimostrazioni di multiplexing di diversi geni o di copie multiple di geni con l'ODM, in teoria tali alterazioni sono possibili (Jansing et al., 2019).

L'editing genomico permette inoltre di generare mutazioni in regioni del genoma che sono normalmente protette da meccanismi naturali di riparazione del DNA. La variazione genetica avviene spontaneamente negli organismi come risultato di numerosi meccanismi. Le mutazioni possono sorgere spontaneamente come conseguenza di fattori ambientali esterni, ad esempio la radiazione solare ultravioletta o l'esposizione a sostanze mutagene, o interni, a causa di errori durante la replicazione del DNA, o da sottoprodotti metabolici mutageni come, ad esempio, specie reattive dell'ossigeno. Le mutazioni derivanti da tali fattori provocano il reclutamento di meccanismi di riparazione del DNA che proteggono in modo preferenziale particolari regioni del DNA, come quelle che contengono i geni. I meccanismi di riparazione del DNA servono quindi a prevenire l'accumulo eccessivo di mutazioni nelle regioni del DNA in cui le sequenze devono essere conservate per mantenere le loro funzioni essenziali, ad esempio le sequenze che codificano i geni. Le tecniche di editing genomico, quindi, prevalgono sui meccanismi di riparazione endogeni e sono in grado di alterare le sequenze genetiche conservate. Inoltre, l'evidenza indica che le mutazioni risultanti dalle tecniche di editing genomico non sono riparate con gli stessi processi di quelle che si sono verificate naturalmente, con alti tassi di errore nelle riparazioni delle mutazioni indotte da CRISPR. (Brinkman et al., 2018). I sistemi CRISPR/Cas sono stati utilizzati per modificare le sequenze conservate, ad esempio quando applicati alle tecnologie di trasmissione genetica (Kyrou et al., 2018). Le tecniche TALEN, così come quelle ZFN, si sono anche dimostrate in grado di agire sulle sequenze conservate (Suzuki et al., 2013; Bilichak et al., 2020).

La variazione genetica naturale si verifica anche durante la meiosi, la produzione di gameti come gli spermatozoi e gli ovuli. La meiosi, un processo biologico fondamentale, è responsabile della generazione della variazione genetica negli organismi a riproduzione sessuale, attraverso la ricombinazione del contenuto genetico ricevuto da entrambi i genitori. Lo scambio di materiale genetico tra i cromosomi durante questo processo avviene in modo non casuale, in regioni specifiche dei cromosomi talvolta definite "hotspot" di ricombinazione. Per contro, l'editing del genoma consente di alterare il DNA in regio-

ni chiamate “coldspot”, scavalcando queste limitazioni naturali. Le tecniche CRISPR/Cas sono state utilizzate per superare gli effetti del linkage drag, in cui i geni desiderati sono collegati a geni indesiderati in regioni a bassa ricombinazione. (Roldan et al., 2017; Soyk et al., 2017). Inoltre, si sta esplorando la tecnica CRISPR per la manipolazione degli eventi di ricombinazione meiotica al fine di aumentare la diversità genetica delle colture, anche se questo sembra essere in fase iniziale di ricerca e sviluppo. (Taagen et al., 2020).

Per riassumere, **tutte** le tecniche di editing genomico permettono di superare le naturali barriere della riproduzione e della ricombinazione attraverso una molteplicità di meccanismi, oltre a essere diverse dalle tecniche tradizionali utilizzate nell'incrocio e nella selezione, e quindi soddisfano il criterio 3.

Ringraziamenti

Ringrazio la Dott.ssa Sarah Agapito-Tenfen del Centro di biosicurezza di GenØk, in Norvegia, e i colleghi della Third World Network per avere rivisto questo articolo.

Questo articolo è stato prodotto con il parziale contributo finanziario del SwedBio/Stockholm Resilience Centre.

La **Dott.ssa Eva Sirinathsinghji** ha un dottorato in neurogenetica ed è una ricercatrice di biosicurezza con una formazione in scienze biomediche. Lavora per campagne della società civile sui rischi delle tecnologie di ingegneria genetica, comprese quelle nuove.

Bibliografia

Bao Z, Xiao H, Liang J, Zhang L, Xiong X, Sun N, Si T, Zhao H (2015). Homology-integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR) system for one-step multigene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth. Biol.* 4(5): 585-594. doi: 10.1021/sb500255k. Epub 2014 Sep 19. PMID: 25207793.

Bilichak A, Sastry-Dent L, Sriram S, Simpson M, Samuel P, Webb S, Jiang F, Eudes F (2020). Genome editing in wheat microspores and haploid embryos mediated by delivery of

ZFN proteins and cell-penetrating peptide complexes. *Plant Biotechnol. J.* 18(5): 1307-1316. doi: 10.1111/pbi.13296. Epub 2019 Dec 3. PMID: 31729822; PMCID: PMC7152605.

Brinkman EK, Chen T, de Haas M, Holland HA, Akhtar W, van Steensel B (2018). Kinetics and fidelity of the repair of Cas9-induced double-strand DNA breaks. *Mol. Cell* 70: 801-813.e806. doi: 10.1016/j.molcel.2018.04.016

Cai Y, Chen L, Liu X, Guo C, Sun S, Wu C, Jiang B, Han T, Hou W (2018). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of GmFT2a delays flowering time in soya bean. *Plant Biotechnol. J.* 16(1): 176-185. doi: 10.1111/pbi.12758

Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, Queisser AL, Carnwath JW, Lucas-Hahn A, Zhang L, Meng X, Gregory PD, Schwinzer R, Cost GJ, Niemann H (2011). Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108(29): 12013-12017. doi: 10.1073/pnas.1106422108. Epub 2011 Jul 5.

Jansing J, Schiermeyer A, Schillberg S, Fischer R, Bortesi L (2019). Genome Editing in Agriculture: Technical and Practical Considerations. *Int. J. Mol. Sci.* 20(12): 2888. doi: 10.3390/ijms20122888. PMID: 31200517; PMCID: PMC6627516.

Kawall K (2019). New Possibilities on the Horizon: Genome Editing Makes the Whole Genome Accessible for Changes. *Front. Plant Sci.* 10: 525. doi: 10.3389/fpls.2019.00525. PMID: 31068963; PMCID: PMC6491833.

Kim S-R, Lee J, Jun S-H, Park S, Kang H-G, Kwon S, An G (2003). Transgene structures in T-DNA-inserted rice plants. *Plant Mol. Biol.* 52: 761-773. doi: 10.1023/a:1025093101021

Kosicki M, Tomberg K, Bradley A (2018). Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat. Biotechnol.* 36: 765-771.

Kyrou K, Hammond AM, Galizi R, Kranjc N, Burt A, Beaghton AK, Nolan T, Crisanti A (2018). A CRISPR-Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae*

- mosquitoes. *Nat. Biotechnol.* 36(11): 1062-1066. doi: 10.1038/nbt.4245
- Latham JR, Wilson AK, Steinbrecher RA (2006). The mutational consequences of plant transformation. *J. Biomed. Biotechnol.* 25376. doi: 10.1155/JBB/2006/25376
- Li R, Li R, Li X, Fu D, Zhu B, Tian H, Luo Y, Zhu H (2018). Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of γ -aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. *Plant Biotechnol. J.* 16(2): 415-427. doi: 10.1111/pbi.12781. Epub 2017 Aug 2. PMID: 28640983; PMCID: PMC5787826.
- Li Z, Liu ZB, Xing A, Moon BP, Koellhoffer JP, Huang L, Ward RT, Clifton E, Falco SC, Cigan AM (2015). Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiol.* 169(2): 960-970. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00783>
- Liang Z, Chen K, Li T, Zhang Y, Wang Y, Zhao Q, Liu J, Zhang H, Liu C, Ran Y, Gao C (2017). Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.* 8: 14261.
- Luo S, Li J, Stoddard TJ, Baltus NJ, Demorest ZL, Clasen BM, Coffman A, Retterath A, Mathis L, Voytas DF, Zhang F (2015). Non-transgenic Plant Genome Editing Using Purified Sequence-Specific Nucleases. *Mol. Plant* 8(9): 1425-1427. doi: 10.1016/j.molp.2015.05.012
- Mackenzie R, Burhenne-Guilmin F, La Viña AGM, Werksman JD in cooperation with Ascencio A, Kinderlerer J, Kumme K, Tapper R (2003). *An Explanatory Guide to the Cartagena Protocol on Biosafety*. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. xvi + 295pp.
- Makarevitch I, Svitashv SK, Somers DA (2003). Complete sequence analysis of transgene loci from plants transformed via microprojectile bombardment. *Plant Mol. Biol.* 52: 421-432. doi: 10.1023/a:1023968920830
- Metje-Sprink J, Menz J, Modrzejewski D, Sprink T (2019). DNA-Free Genome Editing: Past, Present and Future. *Front Plant Sci.* 14(9): 1957. doi: 10.3389/fpls.2018.01957. PMID: 30693009; PMCID: PMC6339908.
- Mou H, Smith JL, Peng L, Yin H, Moore J, Zhang XO, Song CQ, Sheel A, Wu Q, Ozata DM, Li Y, Anderson DG, Emerson CP, Sontheimer EJ, Moore MJ, Weng Z, Xue W (2017). CRISPR/Cas9-mediated genome editing induces exon skipping by alternative splicing or exon deletion. *Genome Biol.* 18(1): 108.
- Norris AL, Lee SS, Greenlees KJ, Tadesse DA, Miller MF, Lombardi HA (2020). Template plasmid integration in germline genome-edited cattle. *Nat. Biotechnol.* 38(2): 163-164. doi: 10.1038/s41587-019-0394-6
- Ono R, Yashuhiko Y, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y (2019). Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Communications Biology* 2: 57.
- Qi W, Zhu T, Tian Z, Li C, Zhang W, Song R (2016). High-efficiency CRISPR/Cas9 multiplex gene editing using the glycine tRNA-processing system-based strategy in maize. *BMC Biotechnol.* Aug 11; 16(1): 58. doi: 10.1186/s12896-016-0289-2. PMID: 27515683; PMCID: PMC4982333.
- Ran Y, Patron N, Kay P, Wong D, Buchanan M, Cao YY, Sawbridge T, Davies JP, Mason J, Webb SR, Spangenberg G, Ainley WM, Walsh TA, Hayden MJ (2018). Zinc finger nuclease-mediated precision genome editing of an endogenous gene in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) using a DNA repair template. *Plant Biotechnol. J.* 16(12): 2088-2101.
- Rang A, Linke B, Jansen B (2005). Detection of RNA variants transcribed from the transgene in Roundup Ready soybean. *Eur. Food Res. Technol.* 220: 438-443. doi:10.1007/s00217-004-1064-5
- Roldan MVG, Périlleux C, Morin H, Huerga-Fernandez S, Latrasse D, Benhamed M, Bendahmane A (2017). Natural and induced loss of function mutations in SIMBP21 MADS-box gene led to jointless-2 phenotype in tomato. *Sci. Rep.* 7(1): 4402. doi: 10.1038/s41598-017-04556-1
- Shin HY, Wang C, Lee HK, Yoo KH, Zeng X, Kuhns T, Yang CM, Mohr T, Liu C, Hennighausen L (2017). CRISPR/Cas9 targeting events cause complex deletions and insertions

- at 17 sites in the mouse genome. *Nat. Commun.* 8: 15464.
- Skryabin BV, Kummerfeld DM, Gubar L, Seeger B, Kaiser H, Stegemann A, Roth J et al. (2020). Pervasive head-to-tail insertions of DNA templates mask desired CRISPR-Cas9-mediated genome editing events. *Sci. Adv.* 6(7): eaax2941.
- Soyk S, Lemmon ZH, Oved M, Fisher J, Liberatoro KL, Park SJ, Goren A, Jiang K, Ramos A, van der Knaap E, Van Eck J, Zamir D, Eshed Y, Lippman ZB (2017). Bypassing Negative Epistasis on Yield in Tomato Imposed by a Domestication Gene. *Cell* 169(6): 1142-1155. e12. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.032
- Stoddard TJ, Clasen BM, Baltes NJ, Demorest ZL, Voytas DF, Zhang F et al. (2016). Targeted mutagenesis in plant cells through transformation of sequence-specific nuclease mRNA. *PLoS One* 11: e0154634. doi: 10.1371/journal.pone.0154634
- Suzuki KT, Isoyama Y, Kashiwagi K, Sakuma T, Ochiai H, Sakamoto N, Furuno N, Kashiwagi A, Yamamoto T (2013). High efficiency TALENs enable F0 functional analysis by targeted gene disruption in *Xenopus laevis* embryos. *Biol. Open.* 2(5): 448-452. doi: 10.1242/bio.20133855. PMID: 23789092; PMCID: PMC3654262.
- Taagen E, Bogdanove AJ, Sorrells ME (2020). Counting on Crossovers: Controlled Recombination for Plant Breeding. *Trends Plant Sci.* 25(5): 455-465. doi: 10.1016/j.tplants.2019.12.017
- Tuladhar R, Yeu Y, Tyler Piazza J, Tan Z, Clemenceau JR, Wu X, Barrett Q, Herbert J, Mathews DH, Kim J, Hwang TH, Lum L (2019). CRISPR-Cas9-based mutagenesis frequently provokes on-target mRNA misregulation. *Nat. Commun.* 10: 4056. doi: 10.1038/s41467-019-12028-5
- Wang W, Pan Q, He F, Akhunova A, Chao S, Trick H, Akhunov E (2018). Transgenerational CRISPR-Cas9 Activity Facilitates Multiplex Gene Editing in Allopolyploid Wheat. *CRISPR J.* 1(1): 65-74. doi: 10.1089/crispr.2017.0010. PMID: 30627700; PMCID: PMC6319321.
- Windels P, De Buck S, Van Bockstaele E, De Loose M, Depicker A (2003). T-DNA integration in Arabidopsis chromosomes. Presence and origin of filler DNA sequences. *Plant Physiol.* 133: 2061-2068. doi: 10.1104/pp.103.027532
- Wolt JD, Wang K, Sashital D, Lawrence-Dill CJ (2016). Achieving Plant CRISPR Targeting that Limits Off-Target Effects. *Plant Genome* 9(3). doi: 10.3835/plantgenome2016.05.0047
- Zhu C, Bortesi L, Baysal C, Twyman RM, Fischer R, Capell T, Schillberg S, Christou P (2017). Characteristics of Genome Editing Mutations in Cereal Crops. *Trends Plant Sci.* 22(1): 38-52. doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.009