

Faglig rapport for projekt:

## Optimering af forædling i kartofler med DNA fri CRISPR-Cas

Projektperiode: januar - december 2020

I projektet lykkedes det med at effektivt generere mutationer i kommercielle kartoffellinier ved at bruge DNA-fri CRISPR editering. Metoden har desuden vist sig nogle tilfælde være mere effektiv end den tidligere DNA baserede protokol og har fordelen ved at helt udelukke brug af DNA i protokollen hvilket er en forudsætning for videre kommercialisering.

### Generelle bemærkninger om projektets plan og fremdrift.

Tre specifikke forhold har især været udfordrende for projektets fremdrift og derfor har direkte hensyn blevet gjort for at løse disse problemer.

1. Personale: Ifølge planen, skulle MSc Ying Liu ansættes på projektet, da hun med et års erfaring fra sit speciale på CRISPR i kartofler kunne gå direkte ind i projektet. Ying Liu hoppede imidlertid fra, da hun fik tilbudt anden stilling. Vi ansatte i stedet Frida, Meier Carlsen, som havde erfaring med CRISPR fra sit speciale.

Der var en forventning om, at ved projektets start, Ying Liu's data med CRISPR på glukon vand dikinase (GWD)-genet var robuste nok til at gå direkte videre med i dette projekt. Imidlertid opdagedes her flere fejl i de eksperimentelle data, og vores CRISPR team overtog derfor i slutningen af 2019 Ying Liu's arbejde med CRISPR på GWD-genet det var nødvendigt at udskifte forsøgsmaterialer og lave flere forsøg om.

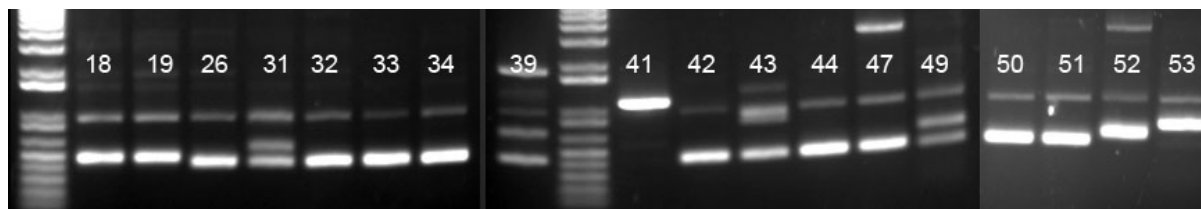
2. Regenerering af planter: Mens CRISPR-teknologien virker overordentlig godt på enkelte celler fra kartofler (protoplaster), har vi omvendt pga. et tvungent skift af klimakammer haft problemer med regenereringens sidste trin, hvor kartoffelskud induceres fra u-differentieret væv, calli. Vi er nu i færd med at reetablere plante-regenerering, men har derfor ikke fået de CRISPR-forædlede planter, som vi havde forventet.

3. Corona: Coronasituationen har været udfordrende men ikke årsaget alvorlige forsinkelser for projektplanen. På trods af disse udfordringer, har vi opnået følgende resultater.

### Resultater for AP1: Sammenligning af mutationer ved DNA-baseret og RNP CRISPR-Cas mutagenese.

#### *Mutationer med DNA baseret CRISPR:*

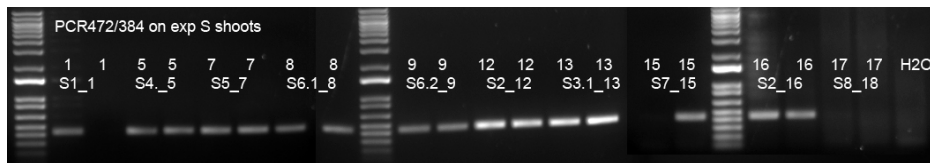
Når planter lavet med DNA baseret CRISPR analyseres med PCR, ses insertioner – her i GBSS genen - tydeligt som fragmenter, der er større end forventet. Det ses her i bane 18, 19, 31, 39, 41, 43, 47, 52 og 53. Insertionerne blev bekræftet ved sekventering i alle disse planter. For eksempel havde plante 47, hvor et bånd ses over tallet "47" har en over 2 kb insertion.



Figur 1. DNA baseret CRISPR analyseret med PCR.

#### *Mutationer med DNA-fri CRISPR:*

I planter lavet med DNA-fri CRISPR af GBSS genen ser vi ingen insertioner, dvs båndenes størrelse er ikke ændret på gelen (Figur 2). Og vi har ikke kunnet påvise insertioner ved sekventering eller IDAA.



**Figur 2.** DNA-fri CRISPR analyseres med PCR.

*Sekvensprofiler for DNA-baseret og DNA-fri CRISPR:* På sekvensniveau ser vi den samme mutations-profil med de fleste delektioner på 3, 4 eller 5 basepar, når vi sammenligner mutationer fra DNA-baseret CRISPR (fraserteret insertioner) med DNA-fri CRISPR. Disse analyser er lavet på CRISPR af GBSS-genet.

#### *Regenerering af skud:*

Det lykkedes os at regenerere ni planter, som var muteret i GBSS-genet med DNA-fri CRISPR, men blandt dem fandt vi desværre ingen med alle fire alleler muteret. Af de i alt 36 alleler i de ni planter var 10 muteret svarende to 28%. Det er mindre end, hvad vi har set med DNA-baseret CRISPR, men vi har ikke tilstrækkeligt data til at afgøre, om det er en reel forskel.

#### *Konklusion AP1:*

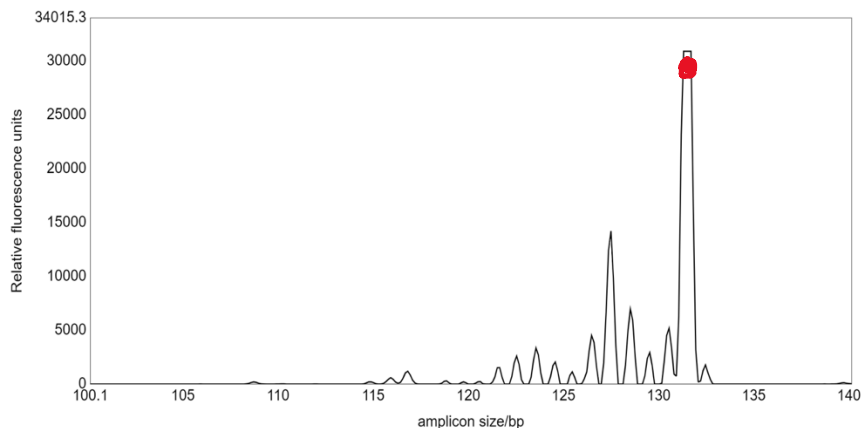
Vi har opnået den viden som var forventet. DNA-fri CRISPR forventes fungere lige så godt som DNA-baseret CRISPR. Der blev imidlertid regenereret færre skud end forventet for at sikkerstille forskellen mellem disse to strategier.

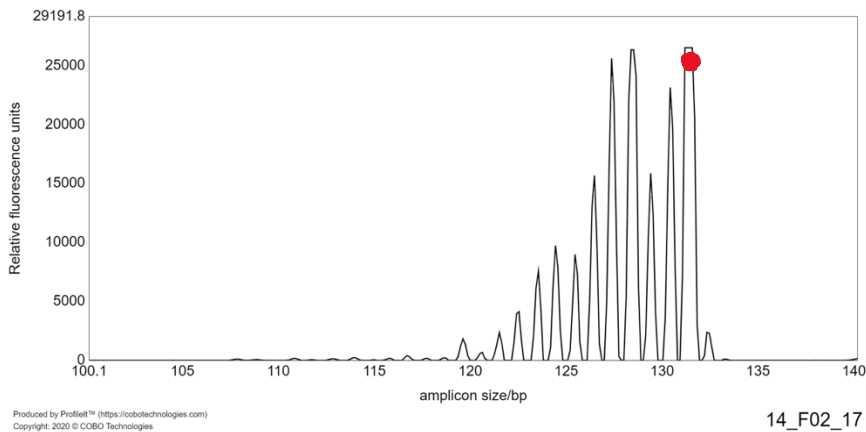
### **Resultater for AP2: Kan RNP CRISPR-Cas anvendes til udvælgelse af effektive gRNA?**

Det korte svar er ja, og da vi kun vil anvende DNA-fri CRISPR vil det være det vi gør fremadrettet. Desuden er prisen på syntetiske guide RNA (gRNA) faldet betydeligt. Vi har i flere forsøg sammenlignet DNA-baseret og DNA-fri CRISPR, og vi får i alle tilfælde bedre editering med DNA-fri CRISPR. Som eksempel er herunder vist DNA-baseret og DNA-fri CRISPR på den samme målsekvens i DMR6 genen i en kommerciel kartoffelsort. IDAA-analysen er lavet på celler/protoplaste 48 timer efter transformation. Øverst DNA-baseret, nederst DNA-fri, toppen markeret med rødt viser det ikke-muterede gen. Den DNA-baserede editering blev beregnet til 50% og den DNA-fri til 70%.

#### *Konklusion AP2:*

DNA-fri CRISPR (RNP CRISPR-Cas) kan anvendes til udvælgelse af effektive gRNA og giver i alle tilfælde bedre editering end DNA-baseret CRISPR.

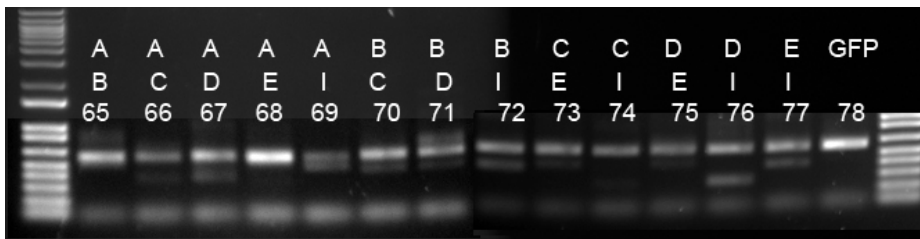




**Figur 3.** IDAA kromatogram for produkter genereret ved DNA-baseret (øverst) og DNA-fri CRISPR (nederst) på det samme gen-målssekvens i en kommerciel kartoffelsort lavet på protoplaster 48 timer efter transformation. Den DNA-baserede editering: 50% effektivitet; DNA-fri editering: 70% effektivitet. Rød markering er vildtype genet.

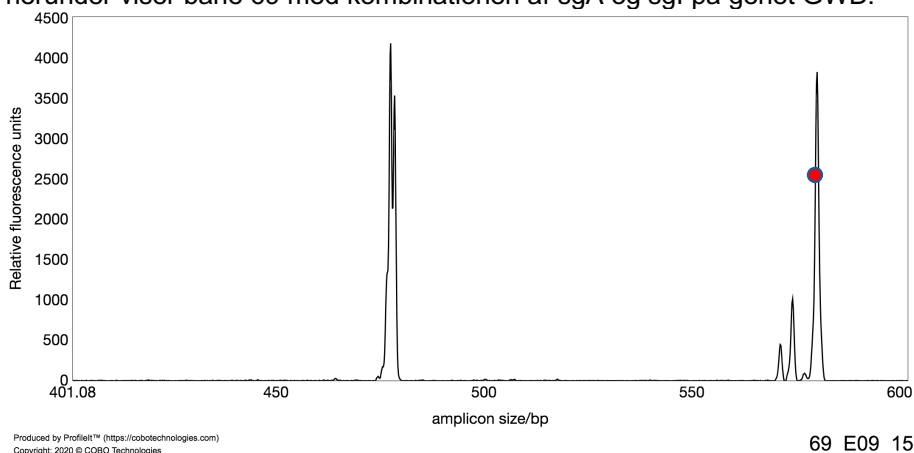
**Resultater for AP3: Kan kombinationer af flere gRNA optimeres, når gRNA leveres som RNP?**

Når to single guide RNA (sgRNA) kombineres på samme målssekvens vil mutationsproduktet fra dobbelteditering kunne ses som et mindre fragment på en gel af PCR-produkterne. Figur 4 viser resultater på GWD genet. Se for eksempel bane 66, 67, 69, 70, 72, 76 og 77 herunder. Bane 78 er den ikke muterede kontrol.



**Figur 4.** To sgRNA kombineret på samme målssekvens. Dobbelteditering i bane 66, 67, 69, 70, 72, 76 og 77. Bane 78: kontrol.

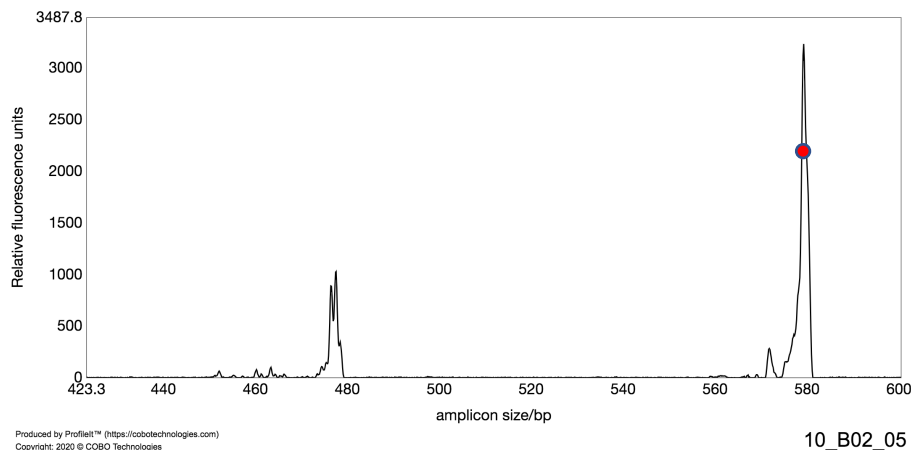
PCR båndenes styrke giver et fingerpeg om dobbelt-editeringens effektivitet, men analyseres data med IDAA, så ses deletionsproduktet til venstre og kan beregnes til 70% editering. Kromatogrammet herunder viser bane 69 med kombinationen af sgA og sgl på genet GWD.



**Figur 5.** IDAA kromatogram som viser bane 69 (i Figur 4) med kombinationen af sgA og sgl på genet GWD. Rød markering: vildtype.

Dette forsøg er lavet med DNA-baseret editering, og vi har nået at lave tilsvarende forsøg med DNA-fri editering om end ikke med helt så høj effektivitet. Herunder er vist DNA-fri editering med samme

kombination af sgA og sgl på GWD. Deletionsproduktet ses til venstre og editeringen kan beregnes til knapt 45%.



**Figur 6.** DNA-fri editering med samme målsekvens-kombination som i Figur 5. Deletionsproduktet ses til venstre og editeringen kan beregnes til knapt 45%. Rød markering er vildtype.

Resultaterne for oven er interessante, fordi vi ikke får særlig gode resultater ved brug af enkelt sgRNA på netop dette gen. Vi er derfor i gang med en mere systematisk analyse af dette, som også vil omfatte kombination af flere sgRNA med DNA-fri CRISPR.

#### *Konklusion AP3:*

Kombination af to gRNA giver mutationer, hvor et større stykke af genet mangler. Det kan sikre effektiv knock-out i tilfælde, hvor in-frame mutationer for eksempel deletion af 3 eller 6 bp, som fjerner en eller to aminosyrer ikke ødelægger proteinets funktion.

#### DNA-fri CRISPR

##### *Konklusion og publicering af data:*

Samlet set er der i projektet lykket med at effektivt generere mutationer i kommercielle kartoffellinier ved at bruge DNA-fri CRISPR editering. Metoden har desuden vist sig nogle tilfælde være mere effektiv end den tidligere DNA baserede protokol og har fordelen ved at helt udelukke brug af DNA i protokollen hvilket er en forudsætning for videre kommercialisering. Vi mener at vi kan indhente diverse forsinkelser og forventer på sigt endvidere at offentliggøre resultaterne i et fokuseret internationalt tidsskrift og i populærvidenskabelige interviews / artikler, der bla retter sig mod danske kartoffelavlere.