Projektperiode: Januar - december 2021

**Projektets baggrund** (delvis gentagelse fra ansøgningen)

Ved forædling af danske elitesorter ønsker man ofte at forbedre nogle få egenskaber samtidig med sortens øvrige kvaliteter bevares. Det kan CRISPR-teknologien, og vi har derfor valgt at udvikle de værktøjer, som gør det muligt målrettet at forbedre for eksempel skimmelresistens og stivelseskvalitet.

*CRISPR-Saksen*: En CRISPR saks (CRISPR-Cas) består af hhv CRISPR delen, kaldet gRNA’et, der fungerer som en slags GPS, som guider Cas-saksen med meget stor præcision til det ønskede sted på kromosomet/genet. Herefter klipper Cas-saksen kromosomet/genet i to stykker, som hurtigt sættes sammen igen af cellens DNA reparations system, hvorved der opstår små mutationer i klippe stedet. gRNA 'GPS'en er et lille stykke RNA på ca 200 baser, hvoraf kun de 20 designes til at parre med tilsvarende på det udvalgte sted på kromosomet. Det er altså kun de 20 baser ud af hele CRISPR-Cas saksen, vi designer/specificerer til at klippe på et bestemt sted i et bestemt gen på et bestemt kromosom. Resten af CRISPR-Cas er uændret.

*Problemet*: Nyere data viser, at mængden af utilsigtede små genetiske ændringer (somaklonal variation) - der ofte også trænger igennem på fænotypen (udseende, vækst og udbytte) som følge af vævskultur arbejdet, hvor der anvendes en række hormoner til udvikling af hele ex-planten ud fra den nøgne protoplast celle - er langt højere end utilsigtede ændringer som følge af at CRISPR saksen evt skulle klippe et forkert sted (Li et al 2019). Det er altså i langt højere grad vævskulturen frem for anvendelse af CRISPR, som bør være en bekymring / have fokus i forhold til utilsigtede mutationer. Ved gentagende runder af vævskultur baseret forædling, ophobes mutationer.

Ved CRISPR forædling er det bla derfor ønskeligt at kunne lave alle de ønskede ændringer samtidigt / på én gang, således at ex-planten kun skal igennem **en** vævskultur runde.

Ønskes introduktion/forbedring af to egenskaber, fx skimmelresistens og stivelseskvalitet, så er det ønskeligt, at CRISPR-Cas saksene dirigeres hen til alle de ønskede steder i genomet i den enkelte protoplast celle i samme transformation, hvorved cellen kun skal igennem en vævskultur runde under regenerering til ex-plante. De enkelte CRISPR sakse, der som nævnt kun er forskellige mht gRNA GPS'en, skal følgelig hver især klippe effektivt, hvis CRIPSR teknologien skal blive et effektivt værktøj i forædlingen.

Kartoflens gener er ofte store, komplicerede og indeholder megen variation. Vore tidligere resultater, som er delvist underbygget af internationale studier, kunne tyde på, at CRISPR måske kunne virke bedre i starten ifht slutningen af gener.

**Projektets mål.**

Det overordnet formål er, ved brug af den nyeste og reneste DNA-CRISPR teknologi samt optimeringer heraf, at muligøre **forædling af mere end en’ egenskab i kartoffel på samme tid** mhbp at imødekomme samfundets stigende krav om miljøvenlig fremstilling og dyrkning af sikre, ’gen-frie’ kartoffelprodukter.

Det konkrete mål er

* at undersøge effekten af at målrette CRISPR mod starten versus midten eller slutning af et givent gen mhbp at optimere de enkelte CRISPR’s klippe effektivitet så meget, at CRISPR forædling af mere end ’en egenskab i samme protoplast celle muliggøres.
* at undersøge effekten af anvendelse af flere CRISPR sakse, der hver især dirigeres hen til de forskellige gener på forskellige kromosomer samtidigt i protoplast cellen, igen mhbp at den multi-gen-editerede protoplast celle helst kun skal igennem en vævskultur runde under regenerering til ex-plante.

**Projektets plan, fremdrift og resultater.**

Vi har i tre arbejd pakker (AP1-3), undersøgt effekten, målt som klippe effektiviteten, af at målrette CRISPR mod starten versus slutningen af hhv stivelses biosyntese genet GWD 1 og et såkaldt ’Suseptibility gen’ (S-gen) i planten, kaldet DMR6-1 (AP1 og 2), kartoffel skimmel (*Phytophthora infestans*) ’high-jacker’ som led i infektionen. Den bedste CRISPR for hhv GWD 1 og DMR6-1, der er ligger på separate kromosomer, er herefter kombineret (AP3) mhbp at undersøge effektiviteten af samtidig CRISPR forædling af mere end ’en egenskab, der har stor indflydelse på mængden at det efterfølgende vævskulturs og sektions arbejde.

Vi har etableret en PCR-baseret metode, kaldet er Indel Detection of Amplicon Analysis (IDAA), til sikkert og hurtigt at vise CRISPR/Cas editering (mutationer) i komplekse genomer, såsom kartoffel. Vi har endvidere anvendt den seneste DNA-fri CRISPR/Cas teknologi, kaldet RNP (ribonukleoprotein), som sikrer at fremmed DNA ikke kan blive indsat under RNP mutagenese processen.

**AP1: Sammenligning af CRISPRs målrettet mod starten versus slutning af GWD 1 genet**

​GWD1 genet består af 33 exons (del af genet der bliver til mRNA og protein) fordelt på en 15.414 bp-region og er dermed et større og komplekst gen.

10 gRNA'er (GPS’er) blev designet til at målrette de ialt 10 RNP’er (CRISPR/Cas) mod starten (5’) eller slutningen (3’) af GWD1 genet. I lighed med andre undersøgelser, herunder i andre organismer end planter, varierede klippe effektiviteten af ​​de individuelle RNP'er betydeligt, og nogle genererede specifikke mutations(indel)-mønstre. RNP'er målrettet mod starten af ​​GWD1 gav betydeligt højere klippe effektivitet sammenlignet med til at målrette RNP'er mod slutning af GWD1 genet. Samtidig anvendelse af to særskilte RNP'er (multiplexing) målrettet mod slutningen ​​GWD1-genet gav en klar positiv synergetisk effekt på den samlede editering, altså 1+1 > 2.

****

**Figur 1**: Effekt af anvendelse af to samtidige RNPs (multiplexing) målrettet slutningen (3’) af GWD1 genet. 6 gRNA'er (gA, gB, gC, gD, gE og gI) blev designet til slutningen GWD1 og testet individuelt og i kombination som anvist. Teoretisk betegner sandsynlighed for editering fra begge gRNA’s. Det ses at alle gRNA kombinationer, udtagen gA + gC, giver en signifikant forøget samlet editering, altså at 1 + 1 > 2.

**AP2: Sammenligning af CRISPRs målrettet mod starten versus slutning af DMR6-1 genet**

DMR6-1 genet består af kun 4 exons (del af genet der bliver til mRNA og protein) fordelt på en 6.398 bp-region og er dermed et mindre gen end og må anses for værende mindre komplekst end fx GWD1.

6 gRNA'er (GPS’er) blev designet til at målrette 6 RNP’er (CRISPR/Cas) mod starten eller slutningen af DMR6-1 genet. Igen varierede klippe effektiviteten af ​​de individuelle RNP'er betydeligt, og nogle genererede specifikke mutations(indel)-mønstre.

I modsætning til ​​GWD1 gav RNP'er målrettet mod starten og slutning af DMR6-1 genet nogenlunde sammenlignelige klippe effektivitet. Samtidig anvendelse af to særskilte RNP'er (multiplexing) rettet mod starten eller slutningen af DMR6-1 genet gav generelt ikke yderligere effekt ifht den bedste af enkelte RNPs effektivitet.



**Figur 2**: Effekt af at målrette 4-5 RNPs/gRNAs enkeltvis i starten (5’) versus slutningen (3’) af hhv GWD 1 og DMR6-1 genet. Kun for GWD1 giver målretning af RNP/gRNAs i starten versus slutning af genet en signifikant forøget editering.

**AP3: Samtidig anvendelse af bedste GWD 1 og DMR6-1 bedste CRISPR (GPS-gRNA)**

For at undersøge, om en RNP er rettet mod ét kromosom kan påvirke effektiviteten af ​​en RNP rettet mod et andet kromosom, valgte vi de bedste to RNP'er/gRNA'er målrettet slutningen (3′-enden) af ​​hhv GWD1 (kromosom 5) og DMR6-1 (kromosom 3) og udførte individuelle - og kombinerede GWD1- og DMR6-1 RNP-transformationer. Samtidig anvendelse af RNP'er rettet mod både GWD 1 og DMR6-1gav ingen eller en let negativ effekt sammenlignet anvendelse af de enkelte RNPs.

*Konklusion og publicering af data:*

* Individuelle RNPs rettet mod start (5’ enden) versus slutning (3’ enden) af et gen: kun for det større GWD1 gen gav RNPs rettet mod starten af genet en klart større klippe effektivitet sammenlignet med RNPs rettet mod slutningen af genet.
* Synergi i klippe effektivitet (1 + 1 > 2) ved anvendelse af to RNPs rettet mod samme gen fandt vi kun for RNPs rettet mod slutningen af det større GWD1 gen, hvor editering fra individuelle de RNPs i forvejen var lav.
* Synergi i klippe effektivitet ved samtidig anvendelse af to RNPs rettet mod to forskellige kromosomer, blev (desværre) ikke observeret for de her to undersøgte gener.

Underliggende mekanismer for disse observationer er spekulative.

Hypotetisk set kunne DMR6-1 kromatinstrukturen - i sammenligning med kromatinstrukturen for GWD1-genet generelt - være i en mere åben tilstand eller kan reagere anderledes i forhold til den enzymatisk fjernelse af cellevæggen under protoplast isolering og efterfølgende cellevæg genopbygning. DMR6-1 er sammenlignet med GWD1 også kodet af en væsentlig mindre kromosomregion, hvilket kan tænkes at influere på histone paknings-strukturen for de pågældende gener. Tilgængeligheden for CRISPR-gensaksen til de to gener kunne følgeligt være forskellig.

Disse undersøgelser er kun indledende og bør foranledige meget større anlagte undersøgelser, der er nødvendige for at tilgå og optimere præcisionsavl i planter, her eksemplificeret ved kartofler.

De beskrevne resultater er publiceret i det fokuserede internationalt tidsskrift ’Frontiers of Genome Editing (Carlsen et al 2022)’ og vi forventer at offentliggøre resultaterne og i populærvidenskabelige interviews / artikler, der bla retter sig mod danske kartoffelavlere.

**Publikationer og møder med til relation til projektet**

Hvad er CRISPR/Cas9 og er det løsningen på kartoffelskimmel?, Store Kartoffel dag, Vingsted hotel & konferencecenter, Vingsted hotel & konferencecenter, 28.02.2020, Talk, Bent L. Petersen

Nam Phuong Kieu, Eu Sheng Wang, Petersen BL, Marit Lenman, Erik Andreasson (2021) CRISPR/Cas9 (genome) edited mutations in Susceptibility genes confer increased late blight resistance in potato. *Sci Rep*, https://doi.org/10.1038/s41598-021-83972-w

Frida Meijer Carlsen, Ida Elisabeth Johansen, Zhang Yang, Ying Liu, Ida Nøhr Westberg, Nam Phuong Kieu, Bodil Jørgensen, Marit Lenman, Erik Andreasson, Kåre Lehmann Nielsen, Andreas Blennow, Bent Larsen Petersen (2022) Strategies for Efficient Gene Editing in Protoplasts of Solanum tuberosum, Theme: Determining gRNA Efficiency Design by Utilizing Protoplast’, Frontiers in Genome Editing. doi: 10.3389/fgeed.2021.795644