

CRISPR

- nye forædlingsteknologier i planter

En række nye fremskridt med CRISPR teknikken i spidsen har nu gjort det muligt at begrænse mutationer til de regioner i plantegenomet, man ønsker skal muteres

Mutationer i planter er vigtige, når der skal forædles for nye konkurrencedygtige plantesorter.

Hidtil har det kun været muligt at introducere mutationer tilfældige steder i genomet, og man har heller ikke kunnet bestemme, hvor mange mutationer man ville inducere.

En række nye fremskridt med CRISPR teknikken i spidsen har nu gjort det muligt at begrænse mutationerne til de regioner i genomet, man ønsker skal muteres. Den nye teknik kaldes præcisionsforædling.

Ideen med at indføre nye mutationer i planter og bruge dem i plante-forædlingen er ikke ny. I 1901 skrev den hollandske botaniker og genetiker ved Leiden Universitet *Hugo Marie de Vries* i sin bog »Die Mutationstheorie«:

»Knowledge of the laws of mutation will probably lead to the artificial production of mutations at will, and thus the creation of completely new properties in plants and animals«.

Det var seks år efter opdagelsen af Røntgenstråler, men der skulle alligevel gå 27 år, inden mutationer i planter blev beskrevet af den amerikanske gene-

tiker *Lewis John Stadler*, der beviseligt var lykkedes med at udvikle mutationer i byg.

Drømmen om præcisionsforædling

Inducerede mutationer i vore kulturplanter har altså været en realitet i 90 år og er i dag en naturlig del af de moderne afgrøder, vi dyrker. Nogle mutationer som fx appelsiner uden kerner er umiddelbart synlige for forbrugeren, men en lang række værdifulde mutationer er ikke synlige for den almindelige forbruger.

Et eksempel er den højt værdsatte »mlo resistens« i byg, som siden 1979 har hjulpet med at beskytte

planten imod angreb fra meldugsvampen. Resistens opnås igennem mutation af byggenes mlo gen, og der findes i dag mere end 30 forskellige mutationer opnået ved kemisk og fysisk mutationsbehandling, som giver mlo meldugresistens.

Men at skabe ny variation ved at inducere mange mutationer tilfældigt placeret i planter er en yderst upræcis og ressourcekrævende proces. Man skal lede længe efter en brugbar mutation, og man skal så skille sig af med andre uønskede mutationer igennem



Allerede her knap fem år efter dets opdagelse har CRISPR teknikken været anvendt i stort set alle vores vigtigste afgrøder

Figur 1: CRISPR/Cas værktøjet

Værktøjet består af en RNA-streng og et Cas-enzym. De første 20 nukleotider (gRNAet) af RNA-strengen kan designes således, at de er komplementære til 20 nukleotider i den sekvens i genomet, hvor man ønsker en mutation.

Det er dog en forudsætning, at de 20 komplementære nukleotider i genomet ligger lige foran

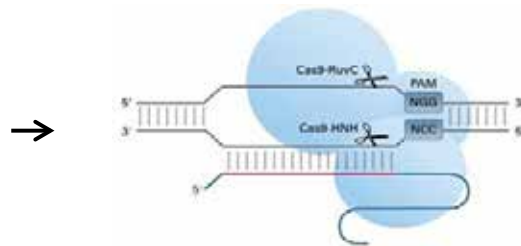
en såkaldt PAM-sekvens (NGG, se tekst). I cellen danner RNA-strengen og Cas-enzymet et kompleks, som binder sig til gRNAets komplementære nukleotider i genomet. Cas-enzymets vil herefter overlippe begge DNA strenge vha. enzymets to nuklease domæner (Cas9-RuvC og Cas9-HNH). (Figuren er benyttet med tilladelse fra ATUM).



RNA-streng med gRNA (rød) designet til en specifik sekvens i genomet

Cas enzym

Cas-RNA kompleks



gRNA (rød) binding til komplementære DNA sekvenser i genomet og overlippning af begge strenge

et længere krydsningsprogram. I lyset heraf er det derfor ikke underligt, at forskere og planteforædlere har drømt om at kunne frembringe mutationer præcise steder i genomet - og vel og mærke kun i de områder, man vil undersøge.

Selv om dette i et vist omfang har været muligt i en årrække, har opdagelsen af CRISPR/Cas systemet i 2013 sat skub i udviklingen. Der kan i dag med en relativ simpel teknologi laves mutationer udvalgte steder i genomet og med en sikkerhed, så man med enkelte midler kan evaluere, om mutationen har den ønskede effekt.

En anden ting, som har fremmet CRISPR/Cas teknologiens anvendelsespotentialer, er, at den kan udføres effektivt i afgrødeplanter og ikke kun i modelplanter. Allerede her knap fem år efter dets opdagelse har CRISPR teknikken været anvendt i stort set alle vores vigtigste afgrøder. I første omgang sigtede man efter at udvikle CRISPR baserede versioner af mutationer, som man kendte effekten af allerede fra de traditionelle mutationsprogrammer.

Herved kan man slippe af med uønskede sidemutationer, som findes i planter, lavet med de traditionelle mutationsmetoder. Man kan kort sagt nøjes med de mutationer, som giver den ønskede egenskab og undgå alle de ukendte sidemutationer, som fx kemiske eller fysiske mutationer giver. Det siger sig selv, at sådanne planter er attraktive til forædling.

Hvordan fungerer CRISPR/Cas?

CRISPR/Cas systemet blev først opdaget som en forsvarsmekanisme i bakterier imod virusangreb. Siden da er man blevet meget klogere på mekanismen, så den kan anvendes konstruktivt til at fremvirke mutationer i fx planter.

Men hvordan virker det så? CRISPR/Cas værktøjet består af en RNA-streng og et enzym kaldet Cas. De første 20 nukleotider af RNA-strengen kaldes guide RNAet (gRNAet). Disse 20 nukleotider kan gøres komplementære til en tilsvarende 20 nukleotid DNA-sekvens i en organismes genom, som ønskes muteret (figur 1).

Når RNA-strengen og Cas-enzymet overføres til en celle, vil de danne et kompleks, og sammen vil de finde de komplementære 20 nukleotider i cellens genom og binde sig til DNA sekvensen. Her vil Cas klippe DNA dobbeltstrengen over og forårsage et kromosombrud, som det fx også sker ved bestråling (figur 1).

En forudsætning, for at Cas-enzymet vil klippe, er dog, at der i organismens DNA findes en såkaldt PAM-sekvens lige foran den komplementære DNA sekvens. PAM-sekvensen består af to guaniner (G) efterfulgt af et hvilken som helst af de fire nukleotider (G,C,A,T) (figur 1).

Tilfældige mutationer

Mutationerne opstår, når kromosombruddet bli- ➤

ver repareret igen. Dette sker vha. organismens egne reparationsenzymmer. Ved standard celledelinger opstår der ofte brud på kromosomerne, og celler besidder derfor enzymer, som kan reparere disse brud (figur 2).

Den mest almindelige reparation sker via en mekanisme, som kaldes NHEJ (non-homologous end-joining), hvor DNA strengene splejses sammen igen. Dette sker i nogle tilfælde lidt upræcist, så der tabes eller indsættes ekstra nukleotider i kromosombruddet (figur 2).

Ved CRISPR/Cas kan der opstå mutationer på lige netop det sted, som de 20 nukleotider i gRNAet matcher til. Heraf ordet »præcision« i præcisionsforædling.

Hvis gRNAet er designet til at binde sig til en sekvens i et gen, så kan mutationen fx forårsage inaktivering af genet ved at ødelægge læserammen for aminosyre rækfølgen. Når DNA strengen er repareret ved NHEJ, kan man ikke se, om det oprindelige brud har været forårsaget af fx stråling eller af CRISPR/Cas.

Rekombination efter DNA brud

Men kromosombrud kan også reparerer ved noget, man kalder homolog rekombination (figur 2).

Denne reparation kræver tilstedeværelsen af en DNA streng med komplementære DNA sekvenser, der kan anvendes som skabelon for reparationen.

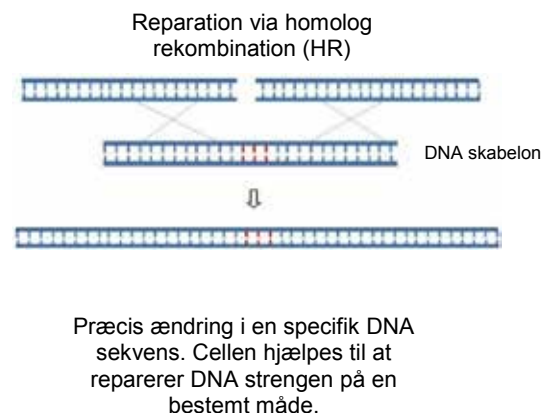
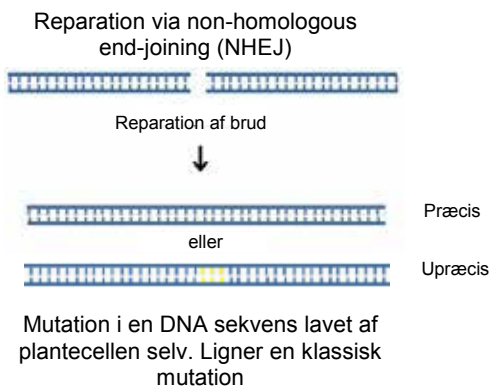
Mutationer via homolog rekombination kan induceres ved at designe en DNA-streng med komplementære sekvenser på hver side af kromosombruddet, men med ændringer nær kromosombruddet. Når denne DNA-streng overføres til cellen sammen med CRISPR/Cas værktøjet, vil ændringerne blive inkorporeret i kromosomet under reparationen af kromosombruddet, og herved kan der ændres nogle få nukleotider til præcist de nukleotider, man ønsker i stedet.

Homolog rekombination kan også anvendes til at indsætte længere DNA sekvenser - fx gener fra en anden organisme fra enten samme art eller en anden art. Her vil der så være tale om noget, der ligner en klassisk GMO.

Figur 2. Induktion af mutationer

Mutationer opstår, når cellen selv reparerer det dobbeltstrengede brud. Den mest almindelige reparation sker via NHEJ, hvor DNA-strengene splejses sammen igen. Sammensplejsningen kan ske enten præcist eller upræcist. Når sammensplejsningen er upræcis, opstår der mutationer ved, at der tabes eller indsættes et tilfældigt antal nukleotider i kromosombruddet. Kromosombrud kan også reparerer ved homolog rekombination. Ved denne reparation kan man ændre nogle få nukleotider til præcist de nukleotider, man ønsker i stedet.

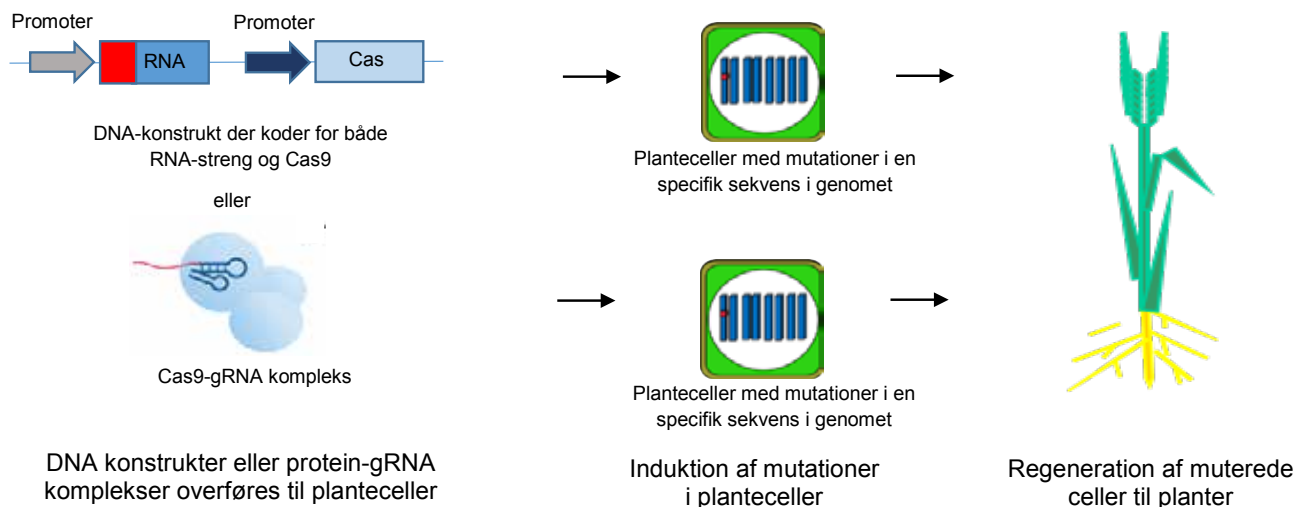
Dette kræver dog tilstedeværelsen af en DNA-streng, der kan anvendes som skabelon for reparationen. Skabelonen designes med komplementære sekvenser på hver side af kromosombruddet, men med ønskede ændringer nær kromosombruddet. Når denne DNA-streng overføres til cellen sammen med CRISPR/Cas værktøjet, vil ændringerne blive inkorporeret i kromosomet under reparationen af kromosombruddet.



Figur 3. Overførsel til planter

CRISPR/Cas værktøjet kan overføres til planteceller og inducere kromosombrud uden integration af fremmed DNA i plantegenomet. Værktøjet kan leveres til planteceller som et DNA-konstrukt eller som et protein-RNA kompleks. I cellerne vil de inducere

kromosombrud på præcist det sted, de er designet til og efterfølgende gå til grunde. Det er derefter en forudsætning, at man kan regenerere planter fra de celler, hvor mutationer er induceret.



Overførsel til planter

Det er nu muligt at overføre CRISPR/Cas værktøjet til planteceller, og inducere kromosombruddene uden integration af fremmed DNA i plantegenomet. Værktøjet kan overføres til planteceller som et DNA-konstrukt, der ikke integreres i plantegenomet eller som det protein-RNA kompleks, der bliver dannet i cellen mellem Cas-enzymet og RNA-strengen, før komplekset binder sig til den komplementære sekvens (figur 3).

Fælles for begge metoder er, at de kan overføres enten ved partikel bombardement af planteceller eller ved at få protoplaster (planteceller uden cellevæg) til at optage dem.

Det er derefter en forudsætning, at man kan regenerere planter fra de celler, hvor mutationerne er induceret. Valg af metode til overførsel afhænger af den specifikke plantearts evne til at regenerere planter fra planteceller med en cellevæg eller fra protoplaster.

Præcisionsforædlede planter på hylderne?

Når en mutation er fremkommet ved NHEJ, kan

man ikke se, om der har været brugt CRISPR/Cas eller en af de andre klassiske mutationsmekanismer.

I mange tilfælde vil mutationen også kunne være fremkommet i naturen uden bevidst menneskelig indgriben. Det gælder også for planter importeret til EU.

Der diskuteres i Europa i disse måneder seriøst, hvordan man skal forholde sig til afgrøder tilvirket ved præcisionsforædling. Klassiske mutationer kan frit bruges til at skabe ny variation inden for en art, men hvad med mutationer lavet ved CRISPR/Cas - er det en GMO?

I vores nærmeste naboland Sverige har man allerede besluttet, at mutationer frembragt med CRISPR/Cas ikke er GMO, og fornylig vurderede generaladvokat Bobek ved Europadomstolen i sin anbefaling, at der ikke er grundlag for at skelne imellem nye mutageneseteknikker og gamle mutageneseteknikker i EUs udsætningsdirektiv.

Cand.agro. og ph.d. Henrik Brinch-Pedersen er professor, MSO, og cand.agro. ph.d. Inger Bæksted Holme er forsker - begge ansat ved Institut for Molekylær Biologi og Genetik, AU.