

# Videnskabelig vurdering af mulig forekomst og risikovurdering af fænomenet chromothripsis i planter frembragt med nye genomteknikker, herunder CRISPR-Cas

---

Rådgivningsnotat fra DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug

Per L. Gregersen og Henrik Brinch-Pedersen, Institut for Agroøkologi, Aarhus Universitet

# Datablad

---

Titel:	Videnskabelig vurdering af mulig forekomst og risikovurdering af fænomenet chromothripsis i planter frembragt med nye genomteknikker, herunder CRISPR-Cas
Forfatter(e):	Seniorforsker Per L. Gregersen og Professor Henrik Brinch-Pedersen, Institut for Agroøkologi, AU
Fagfællebedømmelse:	Adjunkt Claus K. Madsen, Institut for Agroøkologi, AU
Kvalitetssikring, DCA:	Specialkonsulent Stine Margaard Sarraf, DCA Centerenheden, AU
Rekvirent:	Landbrugsstyrelsen, Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri (FVM)
Dato for bestilling/levering:	23.11.2021 / 09.02.2022.
Journalnummer:	2021-0314148
Finansiering:	Besvarelsen er udarbejdet som led i "Rammeaftale om forskningsbaseret myndighedsbetjening" indgået mellem Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri (FVM) og Aarhus Universitet under ID nr. 1.21 "Ydelsesaf-tale Planteproduktion 2021-2024".
Ekstern kommentering:	Nej.
Eksterne bidrag:	Nej.
Kommentar til besvarelse:	Leveringen er revideret og erstatter den oprindelige levering fra den 07.02.2022. Revidering består i tilføjelse af manglende forfatternavne under citering.
Citeres som:	Gregersen L. P., Brinch-Pedersen H. 2022. Videnskabelig vurdering af mulig forekomst og risikovurdering af fænomenet chromothripsis i planter frembragt med nye genomteknikker, herunder CRISPR-Cas. 10 sider. Rådgivningsnotat fra DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug, Aarhus Universitet, leveret: 09.02.2022.
Rådgivning fra DCA:	Læs mere på <a href="https://dca.au.dk/raadgivning/">https://dca.au.dk/raadgivning/</a>

## English summary

Chromothripsis has so far not been shown to occur in plants following use of genome editing techniques. Based on available information (in particular that it has been observed in human cells following CRISPR-Cas treatment), it cannot, however, be excluded that this phenomenon could occur in rare cases in plants in the context of CRISPR-Cas mutations. Chromothripsis has been shown to occur in plants in the context of other techniques and processes, e.g. following haploid induction and gamma radiation mutagenesis. If present, chromothripsis would most likely occur as a chromosomal reorganization on-target of the CRISPR-Cas mutation. Hence, through observation in selected plants of the anticipated mutation following CRISPR-Cas treatment, concurrent chromothripsis is most probably excluded. The development of selection practices during the history of plant breeding has demonstrated that off-types that theoretically could have arisen from chromothripsis induced by mutagenesis have been efficiently deselected before release of new varieties. The assessment here is that the risk for occurrence of chromothripsis in plants (i.e. in released crop varieties) following the use of CRISPR-Cas would not exceed the risk after use of classical chemical/physical mutagenesis techniques. The risk is probably lower since the anticipated mutations caused by CRISPR-Cas can be checked by standard PCR and sequencing techniques, in contrast to the situation with classical mutagenesis, where the mutations occur randomly in the genome. Efficient genome-based methods exist to identify the result of chromothripsis-like processes, e.g. investigations of copy number of chromosome fragments.

## Baggrund

Landbrugsstyrelsen (LBST) har i en bestilling sendt til DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug den 23.11.2021, ønsket en vurdering af, om fænomenet chromothripsis, som forekommer i humane kræftceller, udgør en ny risiko ved anvendelse af nye genomteknikker i planter til frembringelse af nye afgrøder. Opgaven er således en videnskabelig redegørelse af eksisterende litteratur, som belyser fænomenet chromothripsis i planter. Redegørelsen skal især afdække, om fænomenet udgør en øget risiko i planter fremstillet med nye genomteknikker, herunder CRISPR-Cas-teknikkerne. Det ønskes endvidere belyst, om en planteforædler/forsker efter behandling af planter med CRISPR-Cas, har mulighed for at identificere og undgå uønskede effekter af chromothripsis i den dyrkede afgrøde, så afgrøder med chromothripsis-effekter ikke ender i kommerciel dyrkning.

# Besvarelse

## Introduktion

Chromothripsis blev første gang beskrevet i 2011 (Stephens et al., 2011) i cancerceller, som en proces hvor cellernes genom i et eller flere kromosomer lokalt bliver stærkt fragmenteret og sammensat igen i en reorganiseret form, hvor nogle af fragmenterne kan være tabt. Dette kan lede til ændret kopiantal for nogle gener og eliminering af andre gener bl.a. gener for tumor-suppressorer, hvilket kan bidrage til cancercellers ukontrollable vækst. Chromothripsis er siden blevet beskrevet for en lang række former af cancer (Cortés-Ciriano et al., 2020), og selvom fænomenets rolle for udviklingen af cancer ikke er endeligt afklaret, synes det at være en væsentlig mekanisme i de kromosomale ændringer, som observeres i cancerceller (Shorokhova et al., 2021)

Definitioner og forekomst i eukaryoter: Chromothripsis betegner én ud af tre underkategorier af såkaldt chromoanagenese, hvor de to andre former betegnes chromoplexy og chromoanasyntese. Detaljer i disse skal ikke beskrives her, men generelt dækker chromoanagenese over en kompleks genomisk reorganisering, som tilsyneladende kan finde sted inden for en enkelt celledeling, i hvad der betegnes som en katastrofisk begivenhed. Hidtidige studier tyder desuden på, at chromoanagenese er et generelt forekommende fænomen i eukaryote organismer (Pellestor et al., 2021). Sammenlignende genomstudier viser tydeligt, at større reorganiseringer af kromosomer (deletioner/duplikationer/inversioner/ translokationer) har bidraget væsentligt til diversificeringen af dyr og planter gennem evolutionen, og chromoanagenese-processer kan have bidraget til dette (Pellestor and Gatinois, 2020).

I planter blev chromothripsis første gang beskrevet i 2015 for krydsninger af *Arabidopsis thaliana*, hvor der sker haploid induktion (Tan et al., 2015). Når diploide celler reduceres til haploide celler elimineres kromosomet fra den ene krydsningsforælder, og chromothripsis er tilsyneladende en af de mekanismer, som kan medvirke i elimineringen af det ene kromosomsæt. Fænomenet er således fundet associeret med dårlig parring af kromosomerne under celledeling, hvorved et enkelt kromosom, eller en del af et kromosom, kan afsondres fra resten af genomet og undergå chromothripsis i en såkaldt mikrokjerne. Derudover synes fænomenet at være associeret med omstændigheder, hvor der forekommer dobbeltstrenget brud i kromosomernes DNA (Pellestor et al., 2021).

## Chromothripsis og CRISPR-Cas genom-redigering

Leibowitz et al. (2021) rapporterede om forekomsten af chromothripsis efter genom-redigering af humane celler in vitro med CRISPR-Cas9. Efter genom-redigering sås dannelse af mikrokerner i op til 10% af cellerne, og cytologiske undersøgelser viste, at det typisk var kromosomfragmenter distalt ift. CRISPR-skæringsstedet, som var afsnøret i disse mikrokerner. Enkelt-celle DNA-sekventering påviste chromothripsis i en stor del af

de 18 celler, hvorfra genomet blev sekventeret. En væsentlig observation i studiet var, at DNA'et i mikrokernel og dermed chromothripsis udelukkende sås "on-target", dvs. i den kromosomarm, hvor CRISPR-Cas9 lavede brud i DNA'et, og ikke i andre kromosomer. Forfatterne konkluderede, at der var behov for forsigtighed i anvendelsen af CRISPR-Cas til gen-terapi, fx ift. arvelige blodsygdomme. Der anvendes her et stort antal CRISPR-Cas-behandlede celler, og derfor vil en uheldig virkning af chromothripsis, fx eliminering af en tumor-suppressor, kunne slå igennem selv ved en lav hyppighed af chromothripsis.

## Chromothripsis i planter efter CRISPR-Cas genom-redigering og mutagenese

Chromothripsis er ikke hidtil rapporteret i forbindelse med genom-redigering i planter med CRISPR-Cas. Det er velkendt, at CRISPR-Cas i nogle tilfælde kan medføre fjernelse af større stykker DNA omkring "target" (deletioner). At en mulig mekanisme bag disse deletioner kunne være chromothripsis, kan ikke afvises. Hvis der sker et andet dobbeltbrud i DNA'et i nærheden af "target" for CRISPR-Cas på samme kromosom, kan dette lede til en simpel deletion af et stykke DNA. Dette forsøges faktisk udnyttet i planter til at inducere kromosomændringer ved målrettet at udføre to skæringer med CRISPR-Cas (fx Schmidt et al., 2020). Hvis skæringen med CRISPR-Cas sker tæt på enden af et kromosom, er tab af det distale stykke observeret efter CRISPR-Cas i humane celler.

CRISPR-Cas genom-redigering i planter anses for at være yderst præcis, hvis den gRNA-konstruktion, som skal finde vej til mål-genet, er designet korrekt (Hahn and Nekrasov, 2019). Med præcision menes i denne sammenhæng, at der kun i begrænset omfang findes mutationer i andre gener end mål-genet ("target"), dvs. i såkaldte "off-target" gener (fx Feng et al., 2018). Hvis chromothripsis forekommer ved genom-redigering, vil der højst sandsynligt være tale om en utilsigtet "on-target" effekt, altså en effekt på DNA'et omkring "target"-sekvensen, som det også sås i humane celler hos Leibowitz et al. (2021). Simpel mutation med CRISPR-Cas leder som oftest til, at nogle få baser i DNA sekvensen er fjernet omkring "target"-sekvensen (fx Feng et al., 2018). Dette vil normalt blive tjekket ved PCR og sekventering hen over målet for mutationen, dvs. over et begrænset stykke DNA. De sjældne tilfælde, hvor der kan være sket fjernelse af større stykker DNA (fx >1 kb), vil falde ud som negative prøver og vil i standardprocedurer i en forædlingssammenhæng blive kasseret i selektionen af planter efter genom-redigeringen (Hahn and Nekrasov, 2019). Disse sjældne tilfælde af utilsigtede større deletioner er derfor ikke velbeskrevet, selvom de er kendt fra forskningen. På nuværende tidspunkt kan det ikke afvises, at chromothripsis kunne forekomme i sådanne bortselekerede tilfælde med større deletioner.

Mens chromothripsis ikke er beskrevet i forbindelse med brug af CRISPR-Cas i planter, så beskriver en nylig artikel forekomst af chromothripsis/chromoanagenese efter brug af klassisk mutagenese på planter (Guo et al., 2021). I en krydsningspopulation af poppel, hvor pollen var gamma-bestrålet, blev der fundet 2 linjer ud af 646, som viste typiske tegn på chromoanagenese, dvs. med en lokal ekstrem kromosomal reorganisering defineret som > 10 ændringer i kopiantal af kromosomfragmenter pr. kromosomarm. Disse ændringer blev bekræftet i en detaljeret analyse af de to linjer ved hjælp af DNA-sekventering, som også viste

forekomst af nye kromosomsammenføjninger, hvilket indikerede forekomst af chromoanagenese/chromothripsis.

Forekomst af chromothripsis-lignende reorganisering af kromosomer er også beskrevet i forbindelse med biolistisk transformation af ris og majs, hvor planteceller beskydes med guldparketter dækket af DNA (Liu et al., 2019). Forfatterne til dette arbejde sammenligner den fysiske effekt af partikelbeskydningen med mutation af planter ved hjælp af neutron-beskydning, som er en metode anvendt i klassisk mutationsforædling. Der sås enkelte tilfælde, hvor lokal ekstrem reorganisering af et kromosomfragment kunne beskrives som chromothripsis, som dette fænomen er beskrevet i humane celler.

Det er velkendt, at inducerede mutationer i planter efter bestråling eller kemisk mutagenbehandling kan lede til store reorganiseringer af genomet, med fx deletioner, inversioner inden for samme kromosom eller translokationer, hvor kromosomfragmenter ombyttes mellem forskellige kromosomer (Lundqvist et al., 2011; Tanaka et al., 2010). Resultaterne fra Guo et al. (2021), og også fra Liu et al. (2019) mht. partikelbeskydning, tyder på, at ekstreme tilfælde af sådanne reorganiseringer efter mutagenese kan beskrives som chromoanagenese med chromothripsis som en mekanisme.

## Risikovurdering af chromothripsis i forhold til genomteknikker (især CRISPR-Cas)

Risici mht. chromothripsis efter brug af genomteknikker vurderes her på baggrund af brugen af andre allerede anvendte teknikker i planteforædlingen, dvs. at spørgsmålet er, om brugen af genomteknikker som CRISPR-Cas giver en øget sandsynlighed for at bringe tilfælde af chromothripsis ind i forædlede sorter. Da der ikke er rapporteret tilfælde af chromothripsis i forbindelse med brugen af CRISPR-Cas i planter, kan man ikke udsige noget om sandsynligheden for forekomst, kun at den er meget lav. For klassisk mutagenese med gamma-bestråling viser et studie (Guo et al. 2021) en forekomst af chromothripsis på 1-2 ud af 646. dvs. <0.3% i en mutantpopulation.

Mht. risiko for chromothripsis efter brug af CRISPR-Cas er det også vigtigt at skelne mellem situationer, hvor CRISPR-Cas forbliver tilstede i planten efter genom-redigering, og situationer, hvor CRISPR-Cas-konstruktet/komplekset er fjernet fra planten efter at have virket. Det sidste vil være det normale i en forædlings-sammenhæng, særligt for frøformerede planter, idet det transformerende konstrukt for CRISPR-Cas her let udspaltes fra den fremkaldte mutation i efterfølgende generationer. Nye forekomster af chromothripsis kan derfor ikke opstå på grund af CRISPR-Cas i disse senere generationer.

Som beskrevet ovenfor er chromothripsis hidtil mest kendt fra humane cancerceller og gen-terapi. Trods brug af de samme grundlæggende metoder er en direkte sammenligning af CRISPR-Cas anvendt i en planteforædlingssammenhæng med gen-terapi på patienter mht. risiko for utilsigtede effekter dog ikke rimelig at foretage pga. forskelle i kontekst. Det er en integreret del af moderne planteforædling at foretage en kraftig selektion i plantematerialet for at udvælge den bedst egnede plante blandt mange, mens gen-terapien vil blive foretaget på en unik patient, hvor forekomst af fejl i sagens natur skal være minimal, og

kravene til metoden mht. sikkerhed derfor selvsagt må være mangefold højere. Den moderne planteforædling anvender, både når det gælder klassisk planteforædling og mutationsforædling, en veletableret praksis for selektion over flere generationer for at bortselektere afvigende typer, hvilket gennem mange årtier har vist sin styrke til at udvælge de bedste nye sorter (Graham et al., 2020).

Bedømt på det foreliggende grundlag vil chromothripsis sandsynligvis kunne forekomme ved alle mutationsformer, da det synes at være en generel naturlig mekanisme i eukaryote celler, som kan forekomme under omstændigheder, hvor der sker dobbeltstregnet brud i DNA'et. Selvom fænomenet endnu ikke direkte er påvist i planter efter brug af CRISPR-Cas, kunne chromothripsis være én mekanisme (blandt flere) i fremkomsten af de kromosomale ændringer (deletioner/inversioner), som, skønt sjældne, allerede er kendte for genom-redigering med CRISPR-Cas.

Der kan argumenteres for, at CRISPR-Cas kan lave ændringer i genomet, som ikke umiddelbart kan fremkomme efter klassisk mutagenese (Kawall, 2021), fx samtidig redigering af mange gener. På den anden side er fordelen ved CRISPR-Cas, at man målrettet kan tjekke om målet for redigeringen er opnået, hvilket ikke er tilfældet for klassisk mutagenese med fx gamma-bestråling, som i sin essens giver effekter helt tilfældigt ud over genomet, selvom der kan forekomme nogle hot-spots af mutationer. Specifikt mht. chromothripsis vil situationen være tilsvarende: ved CRISPR-Cas kan man efter alt at dømme mere sikkert udelukke, at der er fundet chromothripsis sted i selekterede planter, fordi man, som beskrevet ovenfor, ved, hvor man skal kigge, mens man ikke ved, hvor i genomet man skal lede efter dette fænomen i en mutant skabt ved klassisk mutagenese. Risikoen for at bringe tilfælde af chromothripsis ind i forædlede sorter, synes derfor at være mindre for CRISPR-Cas end for klassisk mutagenese, som er blevet anvendt rutinemæssigt i planteforædlingen gennem snart et århundrede (Brinch-Pedersen et al., 2018). Som beskrevet ovenfor har selektionsmetoderne i planteforædlingen effektivt kunnet tage hånd om afvigende typer efter klassisk mutagenese, og det må forventes, at dette også vil være tilfældet mht. forekomst af chromothripsis for sorter, der er baseret på mutagenese med CRISPR-Cas. Den stadig manglende observation af chromothripsis efter brug af CRISPR-Cas i planter i det seneste årti understøtter dette.

Vurderingen her er, at virkningerne af en eventuel forekomst af chromothripsis i en plante vil være ens uafhængigt af mutationsmetoden, dvs. at der sandsynligvis ikke ville være forskel på virkningerne efter chromothripsis induceret af klassisk mutagenese eller af genom-redigering. Igen viser erfaringerne fra det seneste århundredes mutationsforædling, at planteforædlingen har været effektiv i bortselektionen af afvigende fænotyper, som kunne være skabt på baggrund af induceret chromothripsis efter mutagenese.

## Undersøgelser for chromothripsis efter brug af CRISPR-Cas

Ud over selektionen i forædlingsprocessen kan der også foretages mere målrettede undersøgelser af, om chromothripsis-lignende reorganiseringer af kromosomer har fundet sted i planter udviklet efter CRISPR-

Cas mutation. Først og fremmest skal det, som tidligere nævnt, bekræftes ved PCR og sekventering, at mutationen efter CRISPR-Cas er den forventede. Derudover kan forskellige genom-baserede metoder anvendes til at identificere eventuelle kromosomforandringer, fx 1) opgørelse af kopiantal af kromosomfragmenter ved hjælp af DNA-sekventering eller chip-baseret komparativ kromosomhybridisering (fx Guo et al., 2021); 2) sammenlignende optisk kortlægning ("optical mapping") af kromosomer (Yuan et al., 2020); eller 3) sammenlignende fuld genom-sekventering. Nogle af disse metoder er forholdsvis avancerede, men fx ved undersøgelser af kopiantal af kromosomfragmenter på basis af DNA-sekventering anvendes metoder, som efterhånden kan betragtes som standardmetoder, også i planteforædlingen. De vil således kunne anvendes rutinemæssigt.

## Konklusion

### Konkluderende sammendrag

- Chromothripsis er en naturligt forekommende proces og er dokumenteret at forekomme i planter i forbindelse med andre teknikker end CRISPR-Cas, fx haploid induktion, partikelbeskydning og mutagenese ved gamma-bestråling.
- Chromothripsis er ikke hidtil dokumenteret at forekomme i planter efter brug af genom-redigerings-teknikker. På det foreliggende grundlag kan det ikke afvises, at fænomenet kunne forekomme i endnu uopdagede sjældne tilfælde.
- Hvis tilstede, ville chromothripsis højst sandsynligt forekomme som en kromosomal reorganisering "on-target" ved brug af CRISPR-Cas. Ved observation af korrekt forventet mutation efter CRISPR-Cas (korte deletioner) i selekterede linjer vil samtidig forekomst af chromothripsis derfor efter alt at dømme være udelukket.
- Planteforædlingshistoriens udvikling af selektionsmetoder gennem årtier har vist, at sjældne afvigende typer forårsaget af mulig chromothripsis efter fx mutagenese effektivt er blevet bortselekteret i udviklede sorter.
- Vurderingen er, at risikoen for forekomst af chromothripsis i planter efter brug af CRISPR-Cas ikke overstiger risikoen efter brug af klassisk kemisk/fysisk mutagenese i planteforædlingen. Sandsynligvis er risikoen betydelig mindre, fordi CRISPR-Cas mutationer kan tjekkes ved standard PCR og sekventering i modsætning til situationen ved klassisk mutagenese, hvor mutationerne er tilfældige i genomet.
- Ud over bortselektion af afvigende typer i planteforædlingen kan målrettede genom-baserede metoder afdække, om chromothripsis-lignende kromosomændringer findes i planter udviklet med



CRISPR-Cas, fx undersøgelser af kopianstal af kromosomfragmenter ved hjælp af DNA-sekventering.

## Referencer

- Brinch-Pedersen H, Gregersen PL, Holme I, Hebelstrup K, Hougs L et al. 2018. Vidensyntese om nye planteforædlingsteknikker og deres effekt på dansk landbrug. In: Brinch-Pedersen H, ed, Vol. 127: DCA - Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug.
- Cortés-Ciriano I, Lee JJ-K, Xi R, Jain D, Jung YL et al. 2020. Comprehensive analysis of chromothripsis in 2,658 human cancers using whole-genome sequencing. *Nature Genetics* 52, 331-341.
- Feng C, Su H, Bai H, Wang R, Liu Y et al. 2018. High-efficiency genome editing using a dmc1 promoter-controlled CRISPR/Cas9 system in maize. *Plant Biotechnology Journal* 16, 1848-1857.
- Graham N, Patil GB, Bubeck DM, Dobert RC, Glenn KC et al. 2020. Plant Genome Editing and the Relevance of Off-Target Changes. *Plant Physiology* 183, 1453-1471.
- Guo W, Comai L, Henry IM. 2021. Chromoanagenesis from radiation-induced genome damage in *Populus*. *PLOS Genetics* 17, e1009735.
- Hahn F, Nekrasov V. 2019. CRISPR/Cas precision: do we need to worry about off-targeting in plants? *Plant Cell Reports* 38, 437-441.
- Kawall K. 2021. The Generic Risks and the Potential of SDN-1 Applications in Crop Plants. *Plants* 10, 2259.
- Liu J, Nannas NJ, Fu F-f, Shi J, Aspinwall B, Parrott WA, Dawe RK. 2019. Genome-Scale Sequence Disruption Following Biolistic Transformation in Rice and Maize. *THE PLANT CELL* 31, 368-383.
- Leibowitz ML, Papathanasiou S, Doerfler PA, Blaine LJ, Sun L et al. 2021. Chromothripsis as an on-target consequence of CRISPR-Cas9 genome editing. *Nature Genetics* 53, 895-905.
- Lundqvist U, Franckowiak JD, Forster BP. 2011. Mutation categories. In: Shu QY, Forster BP, Nakagawa H, eds. *Plant mutation breeding and biotechnology*. Wallingford: CABI, 47-56.
- Pellestor F, Gaillard JB, Schneider A, Puechberty J, Gatinois V. 2021. Chromoanagenesis, the mechanisms of a genomic chaos. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.
- Pellestor F, Gatinois V. 2020. Chromoanagenesis: a piece of the macroevolution scenario. *Molecular Cytogenetics* 13, 3.
- Schmidt C, Schindele P, Puchta H. 2020. From gene editing to genome engineering: restructuring plant chromosomes via CRISPR/Cas. *aBIOTECH* 1, 21-31.
- Shorokhova M, Nikolsky N, Grinchuk T. 2021. Chromothripsis—Explosion in Genetic Science. *Cells* 10, 1102.
- Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR et al. 2011. Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development. *Cell* 144, 27-40.
- Tan EH, Henry IM, Ravi M, Bradnam KR, Mandakova T et al. 2015. Catastrophic chromosomal restructuring during genome elimination in plants. *eLife* 4, e06516.

Tanaka A, Shikazono N, Hase Y. 2010. Studies on Biological Effects of Ion Beams on Lethality, Molecular Nature of Mutation, Mutation Rate, and Spectrum of Mutation Phenotype for Mutation Breeding in Higher Plants. *Journal of Radiation Research* 51, 223-233

Yuan Y, Chung CY-L, Chan T-F. 2020. Advances in optical mapping for genomic research. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18, 2051-2062.