

CRISPR/Cas

EN IMMUNITEIT

ZICHTBAAR MAKEN IN DE KLAS

Beste docent,

Welkom bij de workshop *CRISPR/Cas en immuniteit zichtbaar maken in de klas*. We gaan de komende vijf kwartier vooral veel *doen*. We willen jullie kennis laten maken met een aantal activerende werkvormen rondom CRISPR/Cas en immuniteit. Jullie zullen de begrippen CRISPR en Cas vast al eens rond hebben horen zoemen, maar we kunnen ons voorstellen dat niet iedereen even goed op de hoogte is van het werkingsmechanisme en de toepassingen van CRISPR/Cas. We beginnen daarom met een korte presentatie over de CRISPR basics. Daarna gaan we aan de slag met de werkvormen zelf, waarbij de nadruk ligt op *het uitbeelden* van de desbetreffende processen.

Veel plezier!

Caspar Geraedts en Ingeborg van der Neut

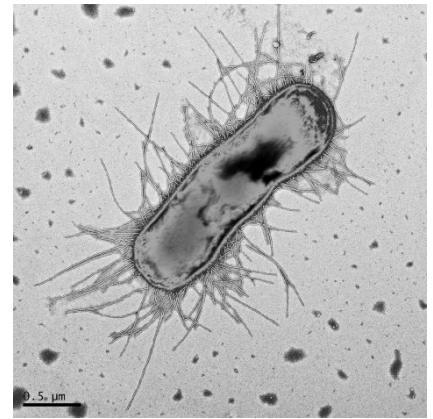


Colofon

Op dit lesmateriaal is de Creative Commons Naamsvermelding-Niet-commercieel-Gelijk delen 4.0 Nederland Licentie van toepassing (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.nl>). Het materiaal werd ontwikkeld door Caspar Geraedts (Vrije Universiteit, Amsterdam) en Ingeborg van der Neut (Ludger College, Doetinchem).

CRISPR/Cas in *E. coli*

We bevinden ons in een *E. coli* bacterie. De strook papier in het lokaal stelt het plasmide van de bacterie voor. Maar er dreigt gevaar: we worden geïnfecteerd door bacteriofagen (virussen). Gelukkig heeft *E. coli* een eigen afweersysteem: CRISPR/Cas. Op het plasmide zie je in kleur de CRISPR regio. Jullie gaan nu zelf uitbeelden hoe het enzym Cas9 met behulp van CRISPR het virale DNA onschadelijk kan maken.



Figuur 1. *Escherichia coli*

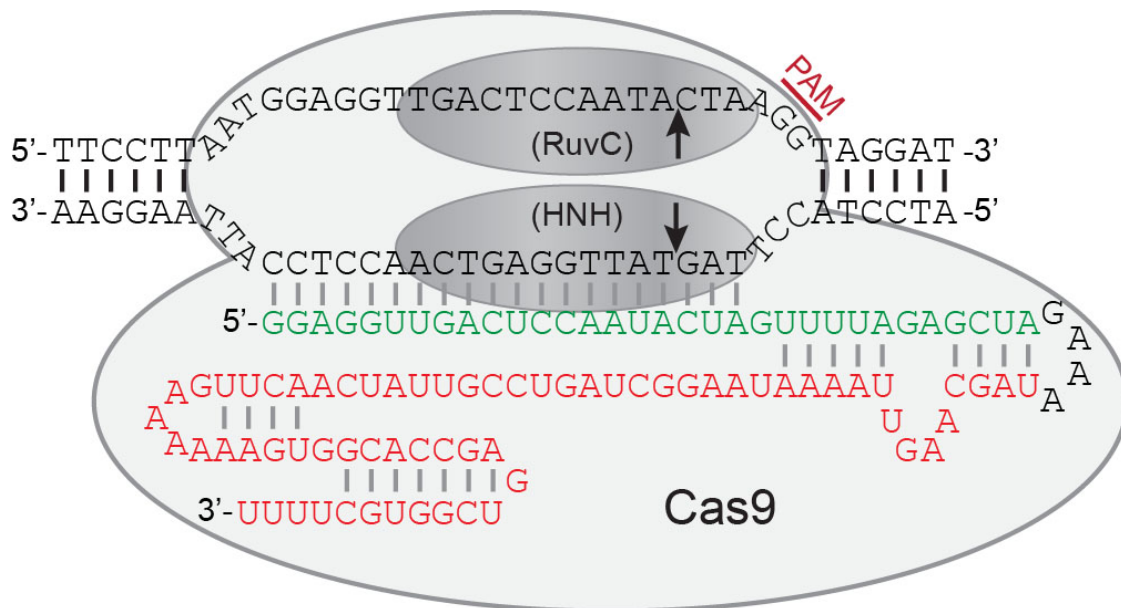
uitvoering

1. Bekijk de nucleotidenvolgorde van de plasmide. Zoek uit waar de (*palindromic*) *repeats*, de *spacers* en het gen dat voor het enzym Cas9 codeert zich bevinden.
2. Bekijk ook het DNA van 'jouw' virus. De PAM's (*protospacer adjacent motifs*) zie je in het rood. Zoek uit welke *spacer* voor dit virus codeert.
3. Stempel op een stuk kassarol het crRNA (*crispr RNA*) door de juiste spacer en de aanliggende repeat achter elkaar te stempelen.
4. Vouw het crRNA in een lus/haarspeld door de complementaire basen in het deel dat afkomstig is van de repeat aan elkaar te plakken.
5. Cas9 is een eiwit dat uit verschillende functionele domeinen bestaat:

REC domein	dit domein bindt aan het lusvormige, dubbelstrengs deel van het crRNA en zorgt ervoor dat het spacer-deel van het crRNA aan het DNA kan binden
PI domein	dit domein bindt aan een PAM op het virale DNA (5'-NGG-3' op de streng die niet aan het crRNA gebonden is) en verbreekt de waterstofbruggen in het DNA aan de 5'-zijde van het PAM
HNH domein	dit domein knipt de streng van het virale DNA die aan het crRNA gebonden is (precies drie nucleotiden verwijderd van het PAM)
RuvC domein	dit domein knipt de streng van het target DNA die <i>niet</i> aan crRNA gebonden is (precies drie nucleotiden verwijderd van het PAM)

Er zijn dus vier personen nodig om één Cas9-eiwit uit te beelden. Verdeel de rollenkaartjes binnen je groepje. De andere(n) binnen het groepje zijn de regisseur(s).

5. Jullie gaan nu in een *tableau vivant* uitbeelden hoe het Cas9-crRNA-complex bindt aan het virale DNA en dat kapot knipt. Als eindproduct maak je een foto van het tableau vivant. Zorg ervoor dat alle functionele domeinen op de foto zichtbaar zijn.



Figuur 2. Een Cas9-RNA-complex gebonden aan zijn target DNA. Het target DNA (bijvoorbeeld viraal DNA) is weergegeven in zwart. Het crRNA (eigenlijk gRNA; zie volgende activiteit) is weergegeven in groen en bruin, waarbij de eerste 20 nucleotiden vanaf het 5'-uiteinde overeenkomen met de protospacer in het target DNA. Bron: <https://web.science.uu.nl/developmentalbiology/boxem/CRISPR.html>.

aanpassingen/uitbreidingen

Je kunt bovenstaande opdracht meer gewicht geven door leerlingen (individueel of per groep) te vragen de foto van hun tableau vivant te voorzien van een bijschrift, en daarbij de verschillende onderdelen (crRNA, DNA, PAM, functionele domeinen) aan te wijzen. De bewerkte foto's kunnen vervolgens worden beoordeeld (door de docent of door medeleerlingen) en besproken in de klas.

Voeg een wedstrijdelement toe door te benadrukken dat de bacterie maar beperkt tijd heeft om het virale DNA onschadelijk te maken voordat het zich innestelt in de plasmide. Eventueel kunnen de rolkaartjes voor het uitbeelden van Cas9 pas gegeven worden als de eerste vijf aminozuren van het Cas9 enzym zijn gevonden.

nabespreking

Ga bij de nabespreking in op de leerdoelen hieronder. Wijs leerlingen ook op de enorme diversiteit aan virussen die op de aarde voorkomt, en leg uit dat een groot deel van deze virussen een bacterie als gastheer heeft. Daarnaast kan ingegaan worden op de verschillen en overeenkomsten tussen dit bacteriële afweersysteem en ons eigen immuunsysteem (in hoeverre zijn de spacers in het plasmide bijvoorbeeld analoog aan onze geheugencellen?). Ook kan een vergelijking gemaakt worden met processen als RNA interferentie die van nature in onze cellen plaatsvinden.

doelen

Leerlingen kunnen in grote lijnen beschrijven hoe het CRISPR/Cas systeem bij bacteriën functioneert als afweermechanisme tegen indringing van bacteriofagen.

Leerlingen kunnen aangeven welke functionele domeinen het Cas9 enzym heeft, en hoe het Cas9-crRNA-complex ervoor zorgt dat het virale DNA wordt genikt.

Leerlingen kunnen overeenkomsten en verschillen aangeven tussen CRISPR/Cas (dat op moleculair niveau werkt) en ons eigen immuunsysteem (dat op cellulair niveau werkt).

nodig

voor de hele klas:

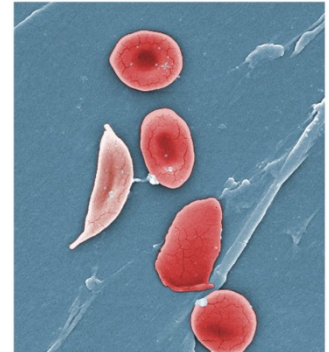
- het plasmide (van tevoren uitprinten, knippen en plakken)
- het virale DNA (op losse stroken)

voor elk groepje:

- een DNA-stempelset (alleen A, U, C en G)
- een stuk kassarol (om het crRNA te stempelen)
- de Cas9-rolkaartjes
- twee scharen
- plakband

genome editing met CRISPR/Cas

Sinds enkele jaren gebruiken onderzoekers Cas9 om het DNA van andere organismen te manipuleren. Daarvoor wordt in plaats van crRNA een kort stukje synthetisch gRNA (guide RNA) gebruikt. Omdat Cas9 heel precies kan knippen, én je het gRNA elke nucleotidenvolgorde kunt geven die je maar wil, is genome editing met Cas9 breed inzetbaar en relatief eenvoudig en goedkoop. Onderzoekers zijn er in geslaagd om menselijke stamcellen met een puntmutatie in het gen dat codeert voor hemoglobine met behulp van Cas9 te repareren. Dat gebeurt in twee stappen: (a) het defecte gen op verschillende plaatsen knippen met Cas9, en (b) zorgen dat de cel het kapotte DNA weer repareert met het juiste stukje DNA als template. Jullie gaan nu de eerste stap uitbeelden door je eigen gRNA te ontwerpen.



Figuur 3. Een puntmutatie in het gen voor hemoglobine veroorzaakt o.a. sikkelvormige rode bloedcellen.

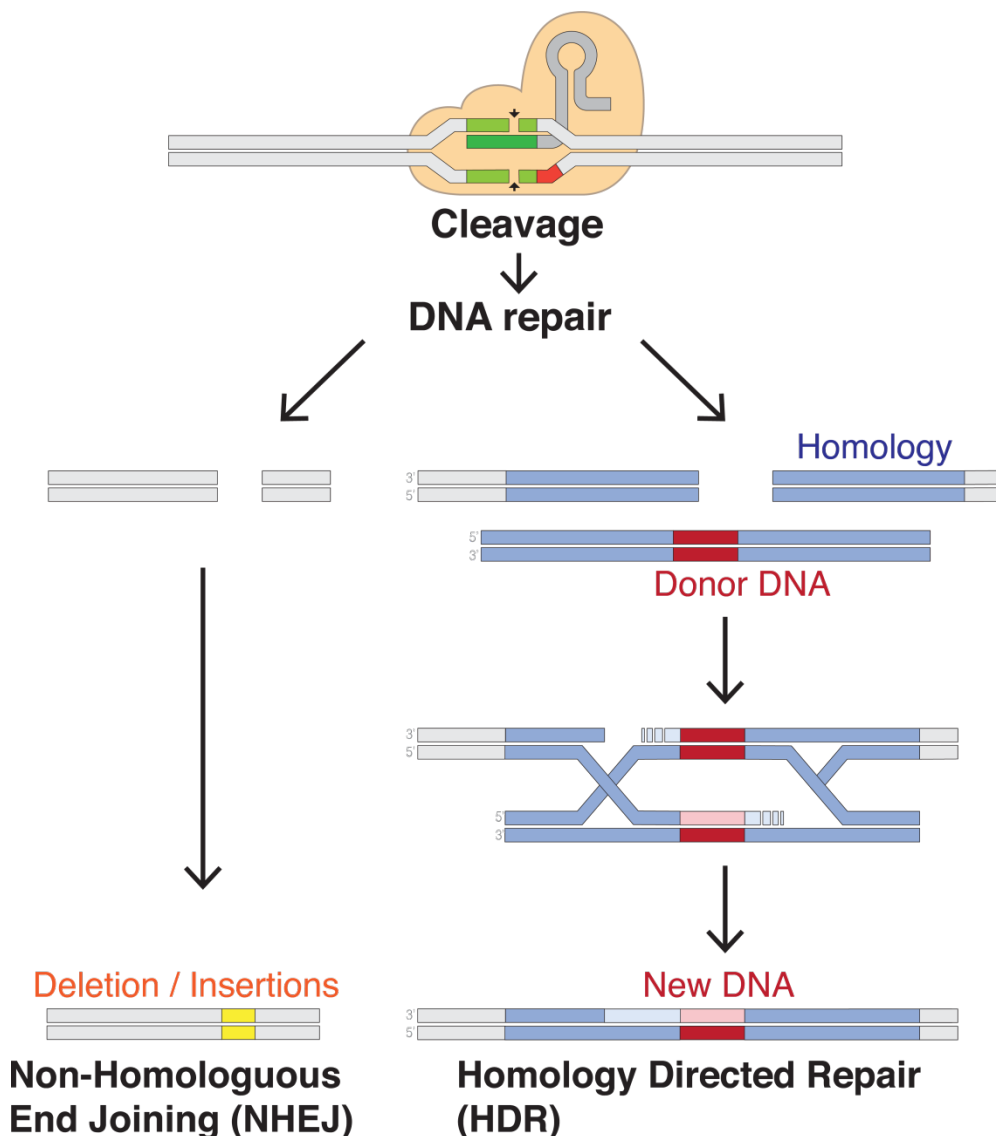
uitvoering stap a (knippen)

1. Jullie krijgen een strook DNA met daarop een deel van de nucleotidenvolgorde van het gen voor hemoglobine. De puntmutatie is in kleur aangegeven.
2. Het synthetische gRNA dat onderzoekers gebruiken bestaat uit een variabel deel van 20 nucleotiden (*de spacer*), en een vast, lusvormig deel (*de scaffold*). De scaffold is al voor jullie geprint. Vouw het scaffold RNA in een lus/haarspeld door de complementaire basen aan elkaar te plakken (zie figuur 2 op pagina 4).
3. De bedoeling is om Cas9 op twee plaatsen in het gen te laten knippen, aan weerszijden van de mutatie. We hebben dus twee verschillende spacers nodig. Zoek in het DNA naar twee geschikte plekken om Cas9 te laten knippen. Hou hierbij rekening met de aanwezigheid van een PAM. Stempel de bijbehorende spacers.
4. Verbind tenslotte elk van de spacers met een (gevouwen) scaffold. Het gRNA is nu klaar voor gebruik. Controleer je gRNA eventueel door het DNA daadwerkelijk te knippen.

uitvoering stap b (repareren) [deze stap voeren we in deze workshop niet uit]

5. Een cel beschikt van nature over mechanismen om breuken in het DNA te repareren. Voor Cas9 zijn twee mechanismen belangrijk (zie figuur 4). De makkelijkste en snelste manier voor de cel zelf is *non-homologous end joining* (NHEJ), waarbij de twee uiteinden gewoon weer aan elkaar geplakt worden, vaak met insertie of deletie van enkele nucleotiden. Als er een homolog stukje DNA aanwezig is (bijvoorbeeld in de vorm van een homolog chromosoom), dan kan de cel dat homologe DNA als template gebruiken. Dat noem je *homology directed repair* (HDR). Als het doel is om een defect gen uit te schakelen, dan is knippen met Cas9 gevolgd door NHEJ vaak voldoende. Echter, voor precieze genome editing moet het HDR mechanisme in werking treden, en moet er dus een template aangeboden worden.

6. Bekijk de figuur hieronder. Beeld nu beide reparatiemechanismen uit met behulp van de het door Cas9 geknipte DNA, en het template DNA.



Figuur 4. Twee manieren waarop de cel breuken in het DNA kan repareren: non-homologous end joining en homology directed repair. Bron: Mariuswalter (CC BY-NC-SA).

nabespreking

Ga bij de nabespreking in op de leerdoelen hieronder. Daarnaast kan besproken worden op welke andere manieren met behulp van Cas9 kan worden ingegrepen in het genoom of de genexpressie van een organisme (zie de bronnen op de laatste pagina).

doelen

Leerlingen kunnen in grote lijnen beschrijven hoe Cas9 gebruikt kan worden om in te grijpen in het genoom (of de genexpressie) van organismen.

Leerlingen kunnen aangeven wat de voordelen zijn van Cas9 ten opzichte van andere eiwitten die in de biotechnologie gebruikt worden om DNA te knippen (zoals restrictie-enzymen).

Leerlingen kunnen uitleggen waarom bij de synthese van het gRNA rekening gehouden moet worden met het voorkomen van een PAM op het target DNA.

Leerlingen kunnen in grote lijnen beschrijven hoe de reparatiemechanismen non-homologous end joining en homology directed repair verlopen.

nodig

voor elk groepje:

- het DNA met de nucleotidenvolgorde van het gen voor hemoglobine
- het scaffold RNA
- een DNA-stempelset (alleen A, U, C en G)
- een stuk kassarol (om het spacer RNA te stempelen)

gene drive met CRISPR/Cas

CRISPR/Cas kan ook ingezet worden om het genoom van een hele populatie (diploïde) organismen te veranderen. Dat gaat in een aantal stappen (zie figuur 6):

(a) een nieuw/aangepast gen wordt ingebracht in een klein aantal organismen, *gekoppeld* aan de genen die coderen voor Cas9 en het bijbehorende gRNA,

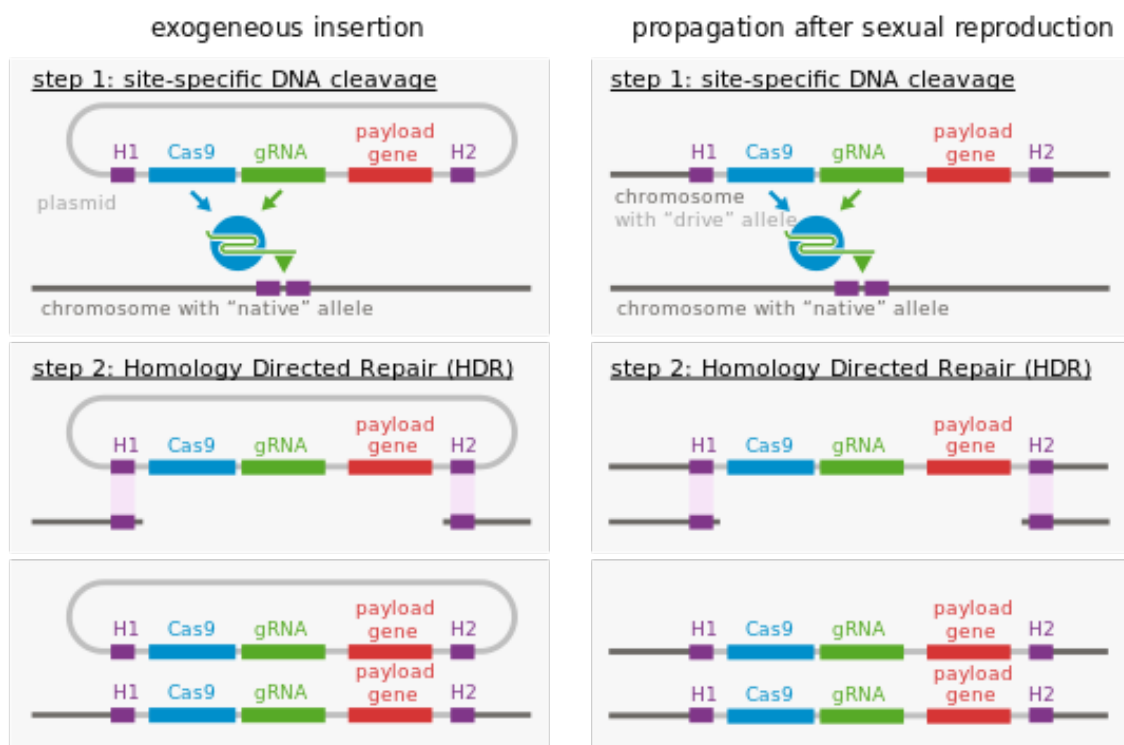
(b) de transgene individuen worden uitgezet in het natuurlijke verspreidingsgebied,

(c) in zygoten die ontstaan uit kruisingen tussen een transgeen en een wild type individu komt Cas9 tot expressie, waardoor het nieuwe gen én de genen voor Cas9 en gRNA ook in het homologe chromosoom worden ingebouwd,

(d) binnen een aantal generaties dragen alle individuen het nieuwe gen, en de genen voor Cas9 en gRNA.



Figuur 5. *Anopheles gambiae*, de belangrijkste vector van malaria op het Afrikaanse continent.



Figuur 6. Schematische weergave van het mechanisme van gene drive met behulp van CRISPR/Cas. Bron: Thomas Julou (CC BY-NC-SA).

uitvoering

1. We gaan met de hele groep uitbeelden hoe we met behulp van CRISPR/Cas het genoom van een hele populatie kunnen veranderen.

oefenen (als *Hardy-Weinberg met Lego* van Gee van Duin, NIBI-conferentie 2006)

2. Per persoon krijg je twee Lego-blokjes: die stellen twee homologe stukjes DNA, bijvoorbeeld een genenpaar, voor. Voortplanting beeld je uit door *zonder te kijken* met een partner één blokje uit te wisselen. Jullie veranderen dan als het ware in je eigen nakomelingen (generatiewisseling). Dat voortplanten doe je een aantal keer achter elkaar (met wisselende partners, om inteelt te voorkomen).

scenario 1. *antistoffen tegen malaria in muggen*

3. We zijn een populatie muggen. Per mug krijg je twee keer twee witte, aan elkaar gekoppelde Lego-blokjes: elk koppel stelt een stukje DNA voor. Drie muggen in de populatie zijn transgeen: tussen hun witte blokjes zitten een blauw, een groen en een rood blokje (respectievelijk de genen voor Cas9, het gRNA én een gen dat codeert voor een antistof tegen *Plasmodium falciparum*, de veroorzaker van malaria). Als je na het voortplanten één normaal en één transgeen stukje DNA hebt, dan treedt het Cas9-HDR-mechanisme in werking en bouw je ook in het normale DNA het blauwe, groene en rode blokje in. We planten een aantal generaties lang voort.

scenario 2. *dochterloze muizen in Nieuw Zeeland*

4. We zijn een populatie muizen in Nieuw Zeeland. We zijn daar exoot en zorgen voor veel schade. Per muis krijg je weer twee keer twee witte, aan elkaar gekoppelde Lego-blokjes. Het geslacht wordt aangegeven door de X-en en Y-en op de Lego-blokjes. Drie (mannelijke) muizen zijn transgeen: zij dragen in hun DNA de genen voor Cas9, het gRNA én een gen dat ervoor zorgt dat alle vrouwelijke embryo's sterven. Let op: je kunt in deze ronde alleen voortplanten met iemand van het andere geslacht. Als je na het voortplanten één normaal en één transgeen stukje DNA hebt, én je bent een dochter (je hebt twee X-chromosomen), dan stap je uit de simulatie.

nabespreking

Ga bij de nabespreking in op het overkoepelende leerdoel hieronder. Er zijn – naar aanleiding van de oefenronde – natuurlijk al diverse mogelijkheden om allerlei begrippen uit de populatiegenetica te bespreken (klopt de genotypenverdeling met de verdeling die door de wet van Hardy-Weinberg voorspeld wordt? werd aan alle voorwaarden voldaan? hoe kun je met dit model mutaties, genetic drift of het bottleneck effect simuleren?). Naar aanleiding van de rondes mét Cas9 zou je erop kunnen wijzen dat inteelt of een verminderde fitness de verspreiding van Cas9 (en het

gen dat je wilt inbrengen) kunnen belemmeren. Daarnaast kan ingegaan worden op de ethische aspecten die bij dergelijke toepassingen een rol spelen.

doelen

Leerlingen ervaren hoe met behulp van Cas9 binnen relatief korte tijd het genoom van een hele populatie kan veranderen, door de Mendeliaanse genetica te manipuleren.

nodig

voor één klas (30 leerlingen):

Lego-blokjes (2x2 of anders), in de volgende kleuren:

- 120 wit
- 60 rood
- 60 blauw
- 60 groen
- 20 geel (voor het oefenen met Hardy Weinberg)

IMMUNITEIT

nodig

- 6 bakken per klas
- In iedere bak zitten 8 B-cellen. Dit zijn gesloten koffiebekertje met een beetje erin vastgelijmd en een strookje DNA waarop aangegeven staat welke VDJ combinatie voor deze antistof codeert. Eén van de beetjejes past op de schroeven die gebruikt zijn als antigenen.
- In iedere bak zitten 8 T-cellen. Dit zijn gesloten koffiebekertje met een beetje erin vastgelijmd en een strookje DNA waarop aangegeven staat welke VDJ combinatie voor deze T-celreceptor codeert. Eén van de beetjejes past op de schroeven die gebruikt zijn als antigenen.
- 10 lichaamscellen
- 2 macrofagen. Hiervoor is gekozen voor doorzichtige bekertjes met een extra bakje erin zodat je kan zien dat de ziekteverwekker afgeschermd van de celinhoud zit.
- 2 T-Helpercellen
- 3 virussen of bacteriën. Kleine bakjes of balletjes (piepschuim, tafeltennisballetjes) met schroef
- Gebruik Torx-schroeven en beetjejes omdat die het meest specifiek zijn.
- blauwe en groene tape
- Daarnaast is er voor in de klas een bak met reservemateriaal omdat leerlingen ook cellen bij moeten kunnen maken.

uitvoering

Voor je staat een bak met bekertjes die model staan voor cellen. Zet al deze cellen door elkaar op de tafel. In je bak zit ook een ziekteverwekker. Als dit een virus is, stop je alle virussen op één na in een lichaamscel.

Er zijn een aantal afspraken. Schroeven zijn antigenen. Ze mogen van de ziekteverwekker afgehaald worden om op het membraan gepresenteerd te worden. Dat presenteren doen we door ze er met tape op te plakken. Groen gebruiken we voor MHC-1 en blauw voor MHC-2. CD-8 geven we ook met groen aan en CD-4 met blauw. Schroeven staan voor antigenen en beetjejes voor T-cel receptoren en antistoffen.

En dan nu: aan het werk!

doelen

Leerlingen krijgen meer begrip en inzicht over de complexiteit van het afweersysteem en ervaren meer van de samenwerking tussen alle cellen.

Leerlingen leren dat de variatie in B-cellen veroorzaakt wordt door een knipmechanisme in het DNA

Leerlingen zien het verschil in werking tussen Tc en B-cellen.

nawoord

De werkvormen in deze workshop gaan niet alleen over hetzelfde onderwerp; ze zijn ook grotendeels gebaseerd op dezelfde didactische principes. Afgelopen jaren gaven wij workshops over het zichtbaar maken van voeding en vertering (2015), hormonale en neurale regulatie (2016) en fotosynthese en dissimilatie (2017). Binnen dezelfde 'traditie' vallen wat ons betreft de stempelset DNA (Caspar Geraedts en John Huizinga, NIBI 2014, 2015) en allerlei werkvormen die in de loop der jaren door Gee van Duin werden ontwikkeld en gepresenteerd. En er zijn (veel) meer voorbeelden. Kenmerkend voor genoemde werkvormen is dat steeds tastbare objecten (LEGO, knutselmateriaal, het eigen lijf, ...) gebruikt worden om biologische structuren voor te stellen, die door leerlingen worden gehanteerd, bewogen en/of gemanipuleerd. Zo wordt een (meestal complex) biologisch proces uitgebeeld. Leerlingen zijn geen toeschouwer, maar echt onderdeel van het model (ze vervullen bijvoorbeeld de rol van een bepaald enzym). We zouden deze werkvormen *uitbeeldpractica* kunnen noemen. Op de Vrije Universiteit Amsterdam is Caspar onlangs een promotieonderzoek gestart naar de specifieke kenmerken en de effectiviteit van zulke uitbeeldpractica. In het kader van dat onderzoek is een docentontwikkelteam gestart met als doel te onderzoeken (a) of uit bestaande good practices van uitbeeldpractica algemene ontwerpprincipes gedestilleerd kunnen worden, en (b) of uitgaande van die ontwerpprincipes weer nieuwe practica kunnen worden ontwikkeld. Als je het leuk vindt om hier meer over te weten of mee te denken, neem vooral contact op (c.l.geraedts@vu.nl).

verder lezen/kijken over CRISPR/Cas...

Voor meer informatie over CRISPR zie de URL hieronder (en andere pagina's op dezelfde website): <http://www.addgene.org/crispr/guide/>

Er zijn veel goede, korte video's te vinden die beschrijven wat je met CRISPR/Cas allemaal kan. De meeste van deze video's gaan echter niet echt in op het precieze werkingsmechanisme. De volgende video's zijn visueel wat minder aantrekkelijk maar gaan wat meer de diepte in:

<https://www.youtube.com/watch?v=TdBAHexVYzc> (Jennifer Doudna: eenvoudig)

<https://www.youtube.com/watch?v=SuAXDVBt7kQ> (Jennifer Doudna: complexer)

<https://www.youtube.com/watch?v=1BXYSGepx7O> (Ellen Jorgensen: maatschappelijk)