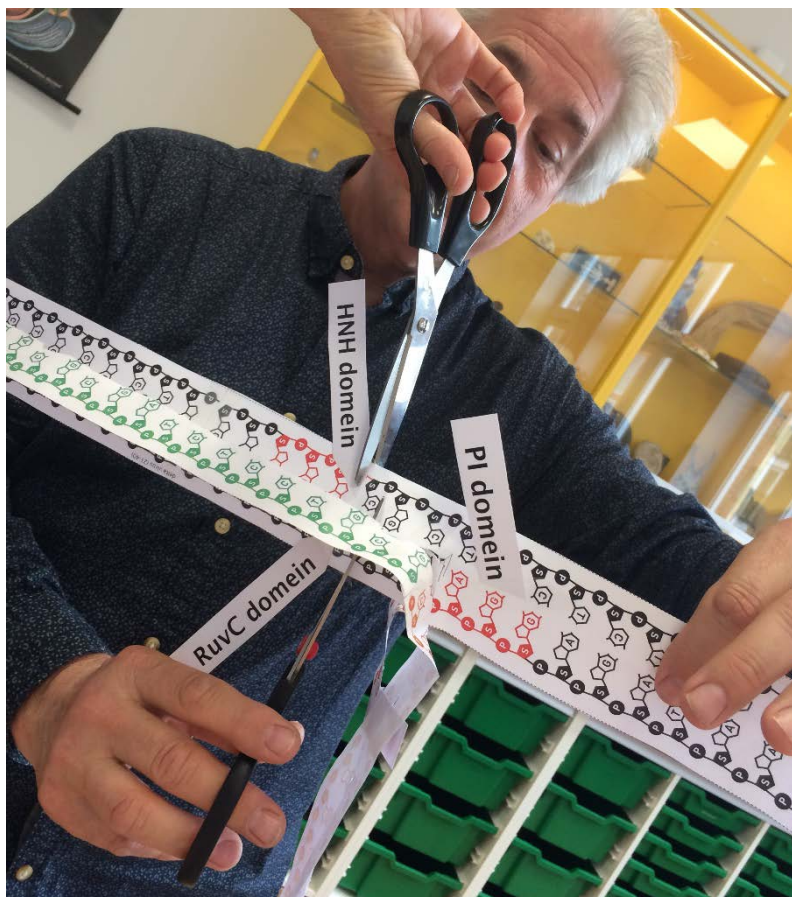


8. CRISPR/CAS MET PAPIER EN SCHAAR

Het CRISPR/Cas-systeem vormt feitelijk een verdedigingsmechanisme waarmee bacteriën zoals *E. coli* zich beschermen tegen bacteriofagen. Sinds enige jaren wordt CRISPR/Cas9 ook toegepast binnen de biotechnologie; met Cas9, een nuclease, kan namelijk heel precies in DNA worden geknipt. In dit uitbeeldpracticum staat het CRISPR/Cas-systeem zoals dat in *E. coli* functioneert centraal. Dat is best pittige materie, en het doel van het practicum is dan ook niet dat leerlingen alle details gaan snappen maar dat ze in grote lijnen begrijpen wat er gebeurt. Bovendien vormt CRISPR/Cas wél een mooie context waarbinnen basale leerdoelen zoals de principes van de basenparing en de eiwitsynthese herhaald kunnen worden. In een eventuele vervolgo opdracht kiezen leerlingen zelf spacers (gRNA) om een puntmutatie in het gen dat codeert voor hemoglobine (en dat sikkelcelanemie veroorzaakt) met behulp van Cas9 te repareren. Dit uitbeeldpracticum is ontwikkeld door Caspar Geraedts (VU Lerarenacademie, Amsterdam).



| | |
|-----------|--|
| duur | één lesuur (van 50 minuten), incl. uitleg en voor- en nabespreking |
| doelgroep | bovenbouw vwo |
| doelen | <p>Leerlingen kunnen:</p> <ul style="list-style-type: none">• in grote lijnen beschrijven hoe het CRISPR/Cas systeem bij bacteriën functioneert als afweermechanisme tegen indringing van bacteriofagen;• aangeven welke functionele domeinen het Cas9 enzym heeft, en hoe het Cas9-RNA-complex ervoor zorgt dat het virale DNA wordt geknipt;• overeenkomsten en verschillen aangeven tussen CRISPR/Cas (dat op moleculair niveau werkt) en ons eigen immuunsysteem (dat op cellulair niveau werkt).• uitleggen wat de voordelen zijn van Cas9 ten opzichte van andere eiwitten die in de biotechnologie gebruikt worden om DNA te knippen (zoals restrictie-enzymen). <p>vervolgopdracht over <i>genome editing met Cas9</i> Leerlingen kunnen:</p> <ul style="list-style-type: none">• in grote lijnen beschrijven hoe Cas9 gebruikt kan worden om in te grijpen in het genoom (of de genexpressie) van organismen;• uitleggen waarom bij de synthese van het gRNA rekening gehouden moet worden met het voorkomen van een PAM op het target DNA. |
| nodig | <ul style="list-style-type: none">• 1 rol plakband per groepje leerlingen• 2 scharen per groepje leerlingen• gekleurd papier |

voorbereiding plasmide (eenmalig)

1. Print het materiaal voor de plasmide. De plasmide dient alleen ter ondersteuning van de uitleg en wordt niet ‘verbruikt’. Je kunt ‘m dus meerdere keren gebruiken. Om het visueel aantrekkelijker en inzichtelijker te maken print je de verschillende delen van de plasmide, en met name de CRISPR-onderdelen, op gekleurd papier (A4). Gebruik de volgende kleuren en aantallen:
 - het Cas9 gen op lichtblauw/paars papier (1 keer)
 - repeat DNA deel A en deel B op geel/oranje papier (elk 2 keer)
 - spacer DNA alfa, bèta en gamma-virus op lichtgroen papier (1 keer)
 - spacer DNA delta, epsilon en omega-virus op lichtgroen papier (1 keer)
 - overig DNA op wit papier (2 keer)
2. Plak van het repeat DNA de delen A en B aan elkaar (het 3'-einde van A gaat aan 5'-einde van B). Knip het repeat DNA en de overige delen vervolgens los langs de stippellijntjes. Maak dan één streng/plasmide door de fragmenten in de onderstaande volgorde aan elkaar te plakken:

vier stukken overig DNA – vier stukken Cas9 gen – repeat A+B – spacer alfa-virus – repeat A+B – spacer bèta-virus – repeat A+B – spacer gamma-virus – repeat A+B – spacer delta-virus – repeat A+B – spacer epsilon-virus – repeat A+B – spacer omega-virus – repeat A+B – vier stukken overig DNA

De spacers voor het delta, epsilon en omega-virus kun je eventueel weglaten, omdat deze virussen bij het uitbeelden verder geen rol spelen. Ook kun je (door extra stroken ‘overig DNA’ in te voegen) de uiteinden van de plasmide met elkaar verbinden zodat echt een cirkelvormig model ontstaat.

voorbereiding

1. Print dan het materiaal voor de leerlingen, op wit papier maar wél in kleur. Zelf print ik alles op A3, m.u.v. de rolkaartjes (en de plasmide). Voor stap 1 (repeat RNA vouwen) – ga ik uit van één exemplaar per leerling, al kun je leerlingen natuurlijk ook in tweetallen laten werken. Voor stap 2 (spacer RNA binden aan DNA) en stap 3 (Cas9 uitbeelden) ga ik uit van groepjes van vijf (of eventueel vier of zes) leerlingen. Voor een klassenset (30 leerlingen) print je dan:
 - repeat RNA deel A en deel B (elk 5 keer)
 - spacer RNA (elk 2 keer)
 - DNA alfa, bèta en gamma-virus (elk 2 keer)
 - rolkaartjes (A4) (6 keer)
 - werking Cas9 schematisch (6 keer)
 - werking Cas9 schematisch (in DNA font) (6 keer)
 - eventueel de instructies voor de leerlingen (opdrachten staan ook in PowerPoint)

2. Plak van het repeat RNA de delen A en B aan elkaar. Om het helemaal netjes te doen knip je eerst de witranden weg. Knip daarna de individuele strengen repeat RNA los. Knip ook de strengen spacer RNA los (in ieder geval die van het alfa, bèta en gamma-virus; de rest kan in principe weggegooid). Maak tenslotte van elk stuk (viraal) DNA één streng door te knippen langs de stippellijnen en de drie fragmenten aan elkaar te plakken.
3. Hang de plasmide op in de klas, en geef elk groepje het volgende materiaal:
 - een streng virus DNA (alfa, bèta of gamma)
 - een streng van het bijbehorende spacer RNA (alfa, bèta of gamma)
 - rolkaartjes
 - twee scharen
 - een rol plakband
 - (voor elke leerling) een streng repeat RNA

uitvoering

Wissel in je les af tussen stukjes uitleg en het uitbeelden (in drie stappen) door de leerlingen. Gebruik de PowerPoint eventueel als leidraad.

1. Bij stap 1 (repeat RNA vouwen) gaan de leerlingen op zoek naar de lus (hairpin) in het RNA. Door de strook papier te vouwen en heen en weer te bewegen vinden ze de complementaire basen meestal redelijk snel. Laat de leerlingen de complementaire delen aan elkaar plakken met plakband.
2. Wijs de leerlingen na stap 1 op het feit dat het repeat RNA in werkelijkheid langer is (zie ook de afbeeldingen *werking Cas9 schematisch*). Uit praktische overwegingen is hier gekozen voor een kortere sequentie met één duidelijke lus.
3. Bij stap 2 (spacer RNA binden aan DNA virus) is het goed om aan te geven dat de in het rood aangegeven PAM's gewoon normale nucleotiden zijn. Alle sequenties met patroon 5'-NGG-3' noem je een PAM omdat ze aan het PI-domein van het Cas9-eiwit (kunnen) binden. Net naast het stuk DNA dat aan de spacer bindt bevindt zich per definitie een PAM, maar het is niet zo dat bij alle PAM's in het virale DNA verschillende spacers voorkomen.
4. Bij stap 3 (Cas9 uitbeelden) is het de bedoeling dat de leerlingen met de stroken papier, de scharen en het plakband de werking van het Cas9-enzym uitbeelden (en daar bijvoorbeeld een foto van maken). Laat de leerlingen de spacer en één van de repeat RNA's aan elkaar vastplakken. Laat de leerlingen ook de twee DNA-strengen in het virus-DNA losknippen, zodat de spacer aan de juiste streng geplakt kan worden.
5. De afbeelding *werking Cas9 schematisch* wordt bij stap 3 als voorbeeld gebruikt. Van deze afbeelding bestaan twee versies: één versie afkomstig van Wikipedia, en één versie die daarop gebaseerd is, maar is opgemaakt met de nucleotidenplaatjes van de stempelset. Wijs de leerlingen erop dat de nucleotidenvolgorde in het DNA en spacer RNA op deze afbeeldingen niet overeenkomen met één van de virussen (alfa, bèta of gamma) van de leerlingen.

(na)denkwerk

1. Ga bij de nabespreking in op de leerdoelen die hierboven zijn geformuleerd. Wijs de 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.
2. Bespreek de verschillen en overeenkomsten tussen het 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.
3. Vraag de leerlingen of ze kunnen bedenken wat de functie is van de PAM/PI-controle. Of anders geformuleerd: een spacer van zont is al zeer specifiek, dus waarom is het CRISPR/Cas-mechanisme zó geëvolueerd dat de aanwezigheid van nog een sequentie van znt net naast de spacer (de PAM dus) voorwaardelijk is voor de werking van Cas9? De reden hiervoor is natuurlijk dat zonder PAM/PI-controle, Cas9 (in combinatie met het spacer RNA) in het DNA van *E. coli* zelf zou knippen.

aanpassen/uitbreiden

1. Je kunt bovenstaande opdracht meer gewicht geven door leerlingen (individueel of per groep) te vragen hun foto te voorzien van een bijschrift, en daarbij de verschillende onderdelen (spacer RNA, repeat RNA, 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.
2. Voeg eventueel 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.

bijlagen

- sequenties DNA en RNA
- rolbeschrijvingen
- afbeeldingen *werking Cas9 schematisch*
- instructies voor leerlingen
- PowerPoint

uitbreiden: vervolgo opdracht over genome editing met Cas9

1. Print voor alle leerlingen (of per tweetal) het werkblad genome editing met Cas9, bij voorkeur in kleur.
2. Print (en knip en plak) eventueel ook een aantal stroken papieren hemoglobine (voor de uitvoering van deze activiteit is dat niet strikt noodzakelijk, maar het geeft wel meer beeld).
3. Laat de leerlingen de instructies op het werkblad stap voor stap volgen. Bij deze vervolgo opdracht gaat het er met name om dat de leerlingen zich realiseren dat je eenvoudig door het kiezen/ontwerpen van spacers, Cas9 heel precies in DNA kunt laten knippen. Er moet een combinatie van twee spacers worden gevonden die zorgt voor een breuk/knip aan weerszijden van de gegeven puntmutatie.
4. In de PowerPoint wordt op een tweetal slides aangegeven waar de PAM's zich bevinden (stap a), en waar Cas9 bij elke PAM zou knippen (stap b). De streepjes staan maar aan één kant (bij de streng waar ook de PAM ligt), maar Cas9 knipt in werkelijkheid natuurlijk beide strengen (zo ontstaan zogenaamde blunt ends). Op de volgende slide (stap c en d) in de PowerPoint staan in groen vier spacers weergegeven, waarvan er twee zorgen voor een knip 'links' van de puntmutatie (de bovenste en de derde van boven), en twee voor een knip 'rechts' van de puntmutatie (de tweede en de vierde van boven). Spacers die gedeeltelijk buiten het getoonde fragment zouden vallen laten we hier buiten beschouwing. De vier spacers op slide 20 leveren in principe vier mogelijke combinaties/paren op. De combinatie van de tweede en derde van boven kan echter niet gebruikt worden omdat Cas9 dan in de PAM van de ander zou knippen.