

Opgaver

CRISPR/Cas9 – Den Genteknologiske Revolution

Teoretiske spørgsmål

Opgave 1: Generelle spørgsmål

Nedenfor er nogle spørgsmål, der berører nogle af de mest centrale ting. Du kan besvare alle spørgsmål ud fra afsnittet Grundteori – CRISPR/Cas9.

- a. Proteinet, der kan genkende og klippe i DNA: _____
- b. Komponenten, som proteinet bruger til genkendelse af DNA: _____
- c. Angiv den normale PAM-sekvens: _____
- d. Hvor mange nukleotider bruges til at genkende en specifik DNA-sekvens: _____
- e. Reparationsmekanismen, som sammensætter enderne af et DNA-dobbeltstrengsbrud og kan danne ødelæggende mutationer: _____
- f. Proteinet danner dobbeltstrengsbruddet mellem disse to basepar efter PAM-sekvensen: _____
- g. Skriv den komplementære DNA-sekvens til: 5'-AGCGTATG-3': _____
- h. Oversæt den nye komplementære sekvens til dens komplementære RNA-sekvens: _____
- i. Reparationsmekanismen, der udnyttes til indsættelse af større DNA-sekvenser: _____

Opgave 2: Teoretiske spørgsmål

Nedenfor er nogle mere dybdegående forklaringsspørgsmål, som kan hjælpe med at opklare nogle af de centrale teoretiske elementer. Du kan besvare alle spørgsmål ud fra afsnittet **Grundteori – CRISPR/Cas9**.

a. Dobbeltstrengsbrud og reparationsmekanismer

- 1) Hvad er et dobbeltstrengsbrud?
- 2) Beskriv hovedforskellene på NHEJ og HDR.
- 3) Hvorfor sikrer NHEJ mutationsdannelse, hvis der laves dobbeltstrengsbrud med Cas9 på ét enkelt sted?

b. Cas9 og identifikation

- 1) Hvad er gRNA?
- 2) Hvad er en PAM-sekvens?
- 3) Beskriv kort identifikationsprocessen med Cas9, gRNA, PAM-sekvensen og den eftersøgte DNA-sekvens.

c. Molekylære strategier og genfunktioner

- 1) Hvad er multiplexing?
- 2) Beskriv kort forskellen på en insertion og erstatning af DNA-sekvens.
- 3) Forklar en loss-of-function mutation.
- 4) Forklar en gain-of-function mutation.

d. Leveringsmetoder

- 1) Hvilken leveringsmetode er uafhængig af cellens translationsmekanisme?
- 2) Hvilken leveringsmetode er afhængig af aktiv transskription?

e. Komplikationer

- 1) Hvorfor er off-target effekter farlige?
- 2) Hypotetisk set, beskriv og forklar om du forventer større eller mindre risiko for off-target effekter ved hver af følgende:

En længere PAM-sekvens

En kortere genkendelsessekvens (<20 nukleotider) på gRNA

Genmodificering i et ekstremt stort genom

Ved brug af mange gRNA til at ramme forskellige sekvenser i samme celle (multiplexing)

Opgave 3: Trinvis sgRNA-design og Cas9 dobbeltstrengsbrud

Nedenfor er en teknisk opgave – du skal selv designe sgRNA og lave et dobbeltstrengsbrud med Cas9. Du kan besvare alle spørgsmål ud fra afsnittet Grundteori – CRISPR/Cas9.

5' – AACAAGTACATCACTAGATGATCTAAGAGGTCAATAACACACTCTAAGATGATACTAACTAATTATC – 3'

3' – TTGTTTCATGTAGTGATCTACTAGATTCTCCAGTTATTGTGTGAGATTCTACTATGATTGATTAATAG – 5'

a. PAM-sekvens

Find og markér PAM-sekvensen for Cas9, så positionen for dobbeltstrengsbruddet kan bestemmes.

b. Identifikation

Find og markér de 20 nukleotider, som Cas9 bør kunne genkende ud fra denne PAM-sekvens.

c. sgRNA-design

Angiv den tilsvarende RNA-sekvens, som bruges i sgRNA, for at Cas9 kan genkende DNA-sekvensen:

d. Dobbeltstrengsbrud

Nu da du har designet sgRNA, kan Cas9 binde sig til dét og bruge det til at genkende DNA-sekvensen. Angiv placeringen af dobbeltstrengsbruddet.

Mammut DNA

Et stykke over den nordlige polarcirkel ligger Wrangeløen isoleret i det sibiriske ishav. Øen blev opdaget i den sidste del af 1800-tallet, efter man havde hørt om dens eksistens fra et urfolk, kaldet tjukterne. Efter flere ekspeditioner, har man fundet ud af, at øen har vrimlet med mammuter frem til 1700 f.Kr. Der betyder, at mammuterne er uddøde godt og vel 1000 år, efter at Pyramiderne i Giza blev bygget, for at sætte det i perspektiv. Man regner med, at denne mammutpopulation var den sidste til at overleve og dermed kan man være heldig at finde velbevarede eksemplarer. Disse indeholder DNA, som kan isoleres, oprenses og sekventeres. Dermed kan man også anvende CRISPR/Cas9 til at behandle det med. Alt dette ligger til grundlag for "Woolly Mammoth Revival" projektet, der har til mål at genskabe levedygtige mammuter ud fra disse DNA-prøver. Et udsnit på 47 bp af DNA fra en omtrent 4060 år gammel mammut fra Wrangeløen er vist herunder, og nu er det din opgave at bruge CRISPR/Cas9 til at klippe i det. Du kan besvare alle spørgsmål ud fra afsnittet **Grundteori – CRISPR/Cas9**.

1 47

5' - AAAGGCAGCTACTAATCTAAGATGTGCCTTGATGAGCACCTCAAGGC - 3'

3' - TTTCCGTCGATGATTAGATTCTACACGGAAGCTACTCGTGGAGTTCCG - 5'

a. Find alle PAM-sekvenserne som kan genkendes af Cas9 fra pyogenes.

b. Brug nu PAM-sekvensen længst mod 3'-enden på den øverste DNA-streng. Find de 20 nukleotider, der skal indsættes i sgRNA, der kan anvendes til genkende mammut DNA-sekvensen. (Hint: 'Design af sgRNA')

c. Nu skal du bruge dit designede sgRNA til at klippe DNA'et over ved brugen af Cas9. Angiv hvor på DNA-strengene, at Cas9 vil binde og vis det forventede sted, hvor dobbeltstrengsbruddet vil blive lavet. (Hint: 'Beskrivelse af Cas9-proteinet og identifikation af en specifik DNA-sekvens')

d. En ny prøve af mammut DNA er blevet oprenset, men denne har en lidt anderledes sammensætning af DNA-sekvensen, grundet en punktmutation. Mutationen i DNA-sekvensen er vist med rød. Forklar om du tror, at du ville kunne genbruge dit sgRNA til at lave et dobbeltstrengsbrud med Cas9.

5' - AAAGGCAACTACTAATCTAAGATGTGCCTTGATGAGCACCTCAAGTC - 3'

3' - TTTCCGTTGATGATTAGATTCTACACGGAAGCTACTCGTGGAGTTACG - 5'

e. Endnu et eksemplar blev fundet, men her sås en anden mutation. Forklar om du tror, at du kan bruge dit sgRNA her.

5' - AAAGGCAACTACTAATCTAAGATGTCCTTGATGAGCACCTCAAGGC - 3'

3' - TTTCCGTTGATGATTAGATTCTACACGGAAGCTACTCGTGGAGTTCCG - 5'

De korrekte svar til opgaverne kræver læreradgang og findes under fanen 'Undervisning' > 'Lærervejledninger'. Adgang til disse tilsendes til lærere efter henvendelse over mail til: biotech@bio.dtu.dk