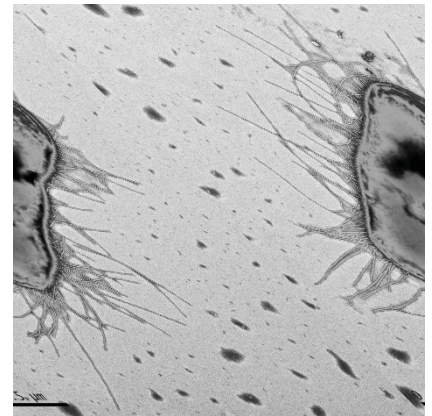


CRISPR/Cas in *E. coli*

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

stap 1. repeat RNA vouwen [individueel of per tweetal]

Pak één van de oranje streken RNA, en maak je eigen repeat RNA. Zoek de complementaire basen, vouw de hairpin en plak vast met plakband.

stap 2. spacer RNA binden aan DNA [per groepje]

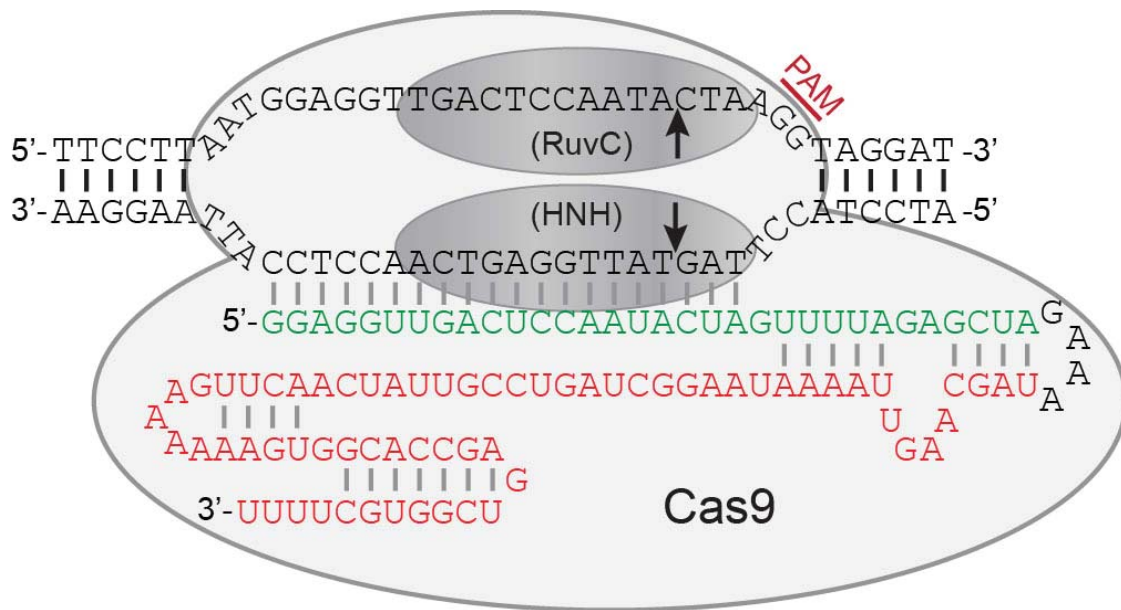
Bekijk het DNA van 'jullie' virus. De PAM's (*protospacer adjacent motifs*) zie je in het rood. Zoek in het virus-DNA naar het stuk DNA dat complementair is aan je spacer RNA (groen). Controleer of op de andere streng inderdaad een PAM ligt.

stap 3. Cas9 uitbeelden [per groepje]

Beeld uit hoe Cas9 aan het virus-DNA bindt en dat knipt. Het Cas9-enzym heeft vier 'domeinen' met elk een specifieke functie:

- REC domein** dit domein bindt aan het repeat RNA en zorgt ervoor dat het spacer RNA 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 spacer RNA 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 spacer RNA gebonden is (precies drie nucleotiden verwijderd van het PAM)
- RuvC domein** dit domein knipt de streng van het target DNA die *niet* aan het spacer RNA gebonden is (precies drie nucleotiden verwijderd van het PAM)

Er zijn dus vier personen nodig om één Cas9-eiwit uit te beelden. Verdeel de rollen binnen je groepje. De andere(n) binnen het groepje zijn de regisseur(s). Maak een foto waarop de vier domeinen en hun functies goed te zien zijn. Stuur deze op naar je docent.



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

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).