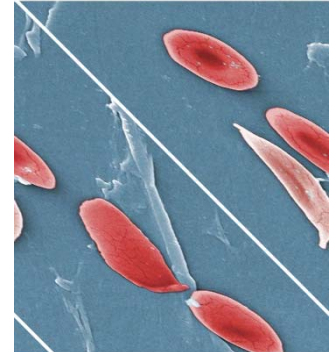


genome editing met Cas9

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 een juist stukje DNA als template.



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

uitvoering

stap 1. spacers (gRNA) ontwerpen

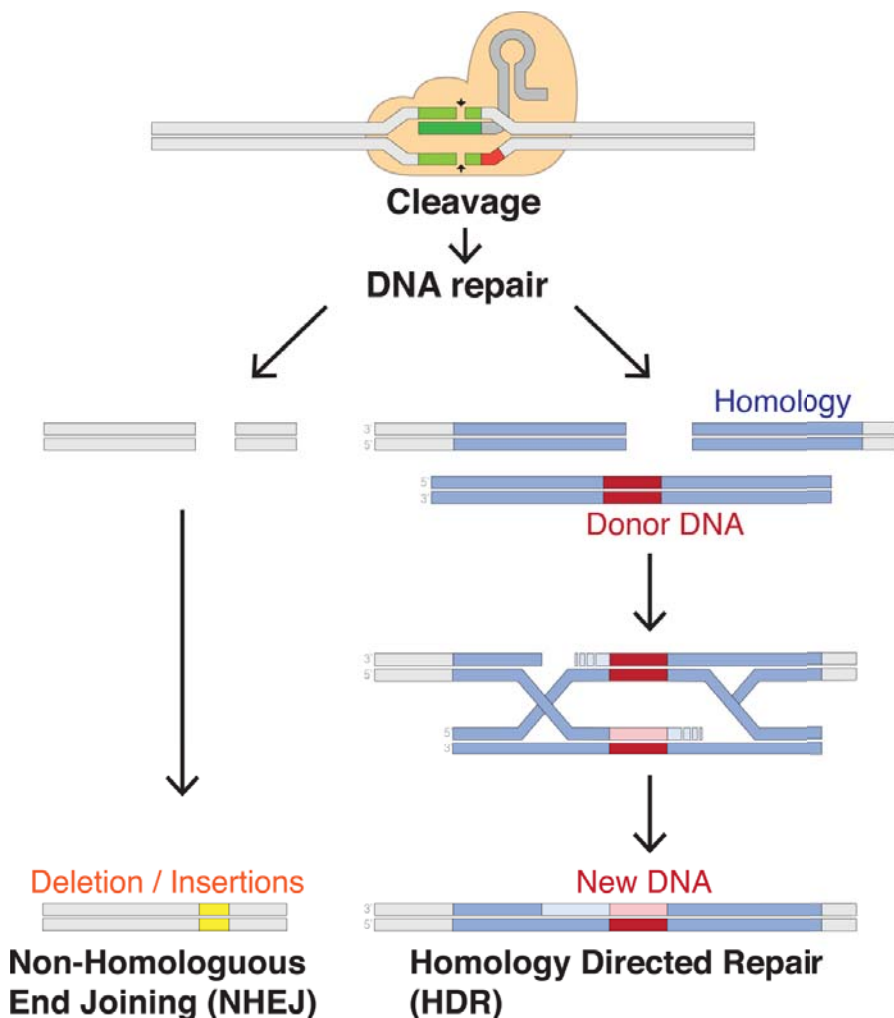
De bedoeling is om Cas9 op twee plaatsen in het gen te laten knippen, aan weerszijden van de puntmutatie. We hebben dus twee verschillende spacers nodig. Jullie krijgen voor deze opdracht werkblad met daarop een deel van de nucleotidenvolgorde van het gen voor hemoglobine. Op iedere tafel ligt ook een papieren model van hetzelfde DNA-fragment. De puntmutatie is op beide in kleur aangegeven.

- Zoek eerst de PAM's (omcirkel).
- Bedenk voor elke PAM waar RuvC en HNH dan zouden knippen (zet een streepje).
- Kies een goede combinatie van twee PAM's / knipplekken.
- Markeer of onderstreep tot slot de basenvolgorde van de twee bijbehorende spacers (van 20 nt) in de RNA-versie van het fragment.

stap 2. repareren [deze stap voeren we in deze workshop niet uit]

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.

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).

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).