

Lärrarhandledning

CRISPR/Cas9

– för behandling av sicklecellanemi

För att förklara hur CRISPR/Cas9 fungerar har vi gjort en övning med fokus på hur Cas9-enzymet hittar en specifik sekvens och klipper DNA. Övningen har konstruerats som ett fall där metoden knyts ihop med den första godkända medicinska behandlingen för att bota patienter med sicklecellanemi.

Eleverna får med denna övning en förståelse för hur CRISPR/Cas9 kan användas för att utföra genomredigeringar och hur genterapin Casgevy fungerar, som är den första CRISPR/Cas9-baserade behandling som når patienter utanför kliniska prövningar. Övningen inleds med en text som beskriver orsaken till sjukdomen sicklecellanemi, en beskrivning av CRISPR/Cas9 och hur det används vid genomredigering för att bota patienter med sicklecellanemi.

Uppgiften fortsätter därefter som en klipp-och-klistra-övning för att förstå hur Cas9-enzymet tillsammans med guide-RNA fungerar och hittar var det ska klippa i en DNA-sekvens. Utöver detta får eleverna besvara frågor till den inledande texten samt om metoden.

Övningen går också bra att genomföra utan koppling till sicklecellanemi och Casgevy-terapin. Principen är densamma för all användning av CRISPR/Cas9. Om man bara vill jobba med metoden måste man dock ta bort vissa delar från elevinstruktionen.

Till denna övning ingår:

- en elevinstruktion
- ett utskriftsmaterial
- samt denna lärrarhandledning

Inför övningen rekommenderar vi att man har gått igenom CRISPR/Cas9 med eleverna, se gärna i PPT3: *Så fungerar CRISPR/Cas9*. Genterapin Casgevy beskrivs mer i detalj i PPT5: *Medicinska tillämpningar*. De bilderna passar bra om man vill inleda övningen med att kort gå igenom genterapi och sicklecellanemi eller göra en kort sammanfattning efter genomförd övning.

Tidsåtgång för övningen är cirka 60 min.

På följande sidor finns facit på frågorna i elevinstruktionen samt lästips.

Svar på frågor om sicklecellanemi och hemoglobin

1. Vilka subenheter bygger upp adult hemoglobin?

α -globin β -globin γ -globin

2. Vilka subenheter bygger upp fetalt hemoglobin?

α -globin β -globin γ -globin

3. Vilken gen är muterad när man har sicklecellanemi?

HBA1 *HBA2* *HBB* *BCL11A*

4. Vilket protein stänger av produktionen av fetalt hemoglobin när man är nyfödd?

α -globin β -globin γ -globin BCL11A

5. Hur påverkas produktionen av fetalt hemoglobin när det bildas mycket BCL11A-protein?

Det bildas mycket fetalt hemoglobin.

Det bildas lite fetalt hemoglobin.

6. Vad vill forskarna göra för att öka produktionen av fetalt hemoglobin hos en patient med sicklecellanemi (äldre än 3 månader)?

Forskarna vill öka produktionen av BCL11A-protein.

Forskarna vill stänga av genen som kodar för BCL11A.

Forskarna vill korrigera HBB-genen som kodar för β -globin.

Övning 1. CRISPR/Cas9 klipper DNA

Till genomförandet av pappersövningen behöver eleverna få en enkelsidig utskrift i färg av Cas9-enzymet, guide-RNA 1 och DNA-sekvens 1. Dessutom behöver eleverna ha tillgång till sax, färgpenna och eventuellt lite häftmassa för att hålla de olika bitarna på plats.

Svar på frågorna om CRISPR/Cas9

1. Hur många nukleotider lång är den guidande regionen på guide-RNA?

Den guidande regionen är 20 nukleotider lång.

2. Binder guide-RNA till PAM-sekvensen?

Nej, det är Cas9-enzymet som binder till PAM-sekvensen.

3. Var finns PAM-sekvensen och vad har den för funktion?

PAM-sekvensen finns på det DNA som man vill redigera. Det är den sekvens som Cas-enzymet känner igen. När Cas9 hittar en PAM-sekvens öppnar det upp den dubbla DNA-spiralen. På så sätt exponeras kvävebaserna i DNA-sekvensen och det guide-RNA som Cas9 är kopplat till försöker baspara.

I bakteriernas försvarssystem är PAM-sekvensen en kombination av nukleotider som inte finns i bakteriens eget genom, på så vis förstör Cas-enzymet inte bakteriens eget DNA. Om Cas-enzymet ändå hittar en PAM-sekvens så har det stött på virus-DNA inne i cellen. Enzymer klipper då ut en bit virus-DNA, precis bredvid PAM-sekvensen, som fogas in i bakteriens genom som ett minneskort (kallas för en spacer).

4. Var klipper Cas9 DNA i förhållande till PAM-sekvensen?

Cas9-enzymet klipper DNA tre baspar uppströms (mot 5'-änden) av strängen med PAM-sekvensen.

5. Vilken PAM-sekvens gäller för Cas9?

5' NGG 3'

6. Efter vilken PAM-sekvens klippte Cas9-enzymet i detta exempel (fyll i kvävebaserna)?

5' AGG 3'

Övning 3. Skapa ett eget guide-RNA

I övning 3 ska eleverna själva konstruera ett guide-RNA. Papperet med Cas9-enzymet återanvänds men man får plocka bort guide-RNA 1 och sätta dit guide-RNA 2 istället. De ska sedan klippa ut DNA-sekvens 2 med en rosa ruta. Den rosa rutan är till för att visa ett område i DNA som är extra känslig för förändringar.

Svar på frågorna (från fråga 6)

6. Fyll i den sekvens du skulle välja på guide-RNA för att få Cas9-enzymet att klippa DNA-strängen inom det markerade området.

Här är övningen gjord så att det bara finns en PAM-sekvens som ger ett klipp inom det rosa fältet. Guide-RNA sekvensen blir då: GAAGCAACUCGAACACUAUU

7. Vad är viktigt att tänka på när man konstruerar ett guide-RNA?

Man måste välja en specifik sekvens på guide-RNA så att den klipper på rätt plats i genomet, det är viktigt för att undvika off-target-effekt.

Tips!

Det finns många teoretiska övningar på engelska som beskriver genomredigering och flera av dem har varit inspiration till denna övning.

Biorad har en teoretisk övning som är kopplad till deras laboration Out of the blue, <https://www.bio-rad.com/en-se/applications-technologies/crispr-cas-gene-editing-teaching-resources?ID=Q5810DWDLBV5>

Minipcrbio har övningar om hur CRISPR/Cas kan användas för att bota sicklecellanemi eller för att slå ut gener i snäckor, <https://www.minipcr.com/educational-resources/>

Webbplatsen HHMI har en animering som visar CRISPR-metoden, <https://media.hhmi.org/biointeractive/click/CRISPR/>

Läs även artiklarna *Nya genterapier med CRISPR/Cas9* och *CRISPR i skolan* i Bi-lagan nr 1 2022.

Läs mer om Världens första CRISPR-terapi som är godkänd inom EU på gentekniknämndens sida, <https://www.genteknik.se/varldens-forsta-crispr-terapi-godkand-i-storbritanien/>

Elevinstruktion, utskriftsmaterial, powerpoints mm hittar du på Bioresurs webbplats under Resurser > Bioteknik samlat i rutan: Gensaxen CRISPR/Cas9 – den gentekniska revolutionen