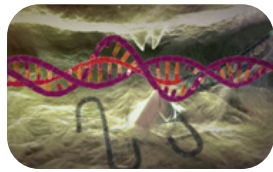


Arbeitsblatt 1 (Grundlagen)

CRISPR/Cas9 – ein Skalpell für das Erbgut

Arbeitsauftrag

Schauen Sie sich den Film "Genom-Editierung mit CRISPR/Cas9" an.



Link:

<https://www.mpg.de/11018867/crispr-cas9>

Zeitaufwand

20 - 30 min inklusive der Bearbeitung der Fragen

Vorkenntnisse

- Bau der DNA und RNA, Transkription
- Unterschiede Viren, Bakterien und höhere Organismen
- Arbeitsweise von Enzymen

Beantworten Sie folgende Fragen:

- 1** Bakterien werden durch Viren angegriffen und durch deren Erbmaterial „umprogrammiert“. Beschreiben Sie, wie sich Bakterien vor diesem Angriff schützen können.

Bakterien erwerben eine Immunität, indem sie nach einem Angriff durch ein Virus einen Teil der Virus-DNA in ihre eigene DNA einbauen können. Die Zelle übersetzt diesen Teil in ein RNA Molekül. Bei erneutem Angriff bindet die CRISPR-RNA, bestehend aus der Information des Virus und des Bakteriums gemeinsam mit einem anderen Abschnitt (genannt tracer-RNA) an das Enzym Cas9. Dieses Enzym schneidet nun gezielt die Viren-DNA und macht sie damit unschädlich.

- 2** Zwei revolutionäre Entdeckungen machen das CRISPR/Cas9-System so wertvoll für die Wissenschaft. Benennen Sie diese.

Die tracer-RNA und die CRISPR-RNA lassen sich zu einem einzigen Molekül fusionieren. Ein modifiziertes Cas9-System lässt sich auch in höheren Organismen einsetzen.

- 3** Zählen Sie die Bestandteile des CRISPR/Cas9-Systems und deren Funktionen auf. Welcher Bestandteil des CRISPR/Cas9-Systems bestimmt den DNA-Abschnitt, der durch das Virus geschnitten wird?

Die CRISPR-RNA bestimmt welcher Abschnitt des Virus geschnitten wird.
Tracer-RNA wird benötigt, damit die CRISPR-RNA an das Cas9 Protein binden kann.
Das Cas9 Protein zerschneidet die Virus DNA an der durch die CRISPR-RNA bestimmten Stelle.

- 4** Das CRISPR/Cas9-System wird auch als Skalpell für das Erbgut bezeichnet. Bewerten Sie, ob dies ein passender Begriff ist.

Es wird so genannt, weil es sehr präzise die (Viren-)DNA an beliebiger Stelle schneiden kann. Dadurch können Gene ausgeschaltet werden oder durch Einfügen eines RNA-Moleküls ein Gen ausgetauscht werden.

- 5** Welchen Nutzen könnte diese Technik in Zukunft für den Menschen haben?

Genetisch bedingte Krankheiten könnten in Zukunft geheilt werden. Erworbene Mutationen könnten rückgängig gemacht werden.

- 6** Kennen Sie Beispiele für genetisch bedingte Krankheiten? Nennen Sie drei Beispiele. Recherchieren Sie dazu evtl. auch im Internet.

Beispiele: Sichelzellenanämie, ererbte Blindheit, Cystische Fibrose, Huntington Krankheit.

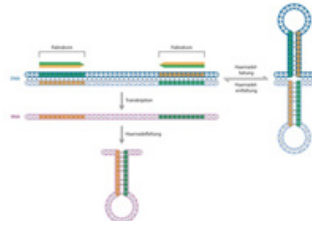


Arbeitsblatt 2 (Grundlagen)

Aufbau des CRISPR-Abschnitts

Arbeitsauftrag

Lesen Sie den folgenden Abschnitt des Themenportals Genom-Editierung: Palindrome im Erbgut. Aufbau des CRISPR-Abschnitts.



Zeitaufwand

ca. 30 min inklusive der Bearbeitung der Fragen

Vorkenntnisse

Bau der DNA und RNA

Link: <https://www.mpg.de/11032846/crispr-dna-abschnitt>

Beantworten Sie folgende Fragen:

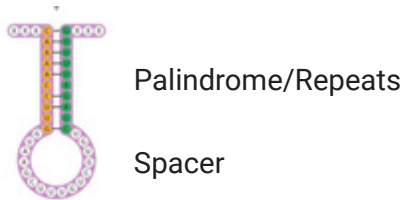
1 Wofür steht der Name CRISPR?

„Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats“, also „gehäuft auftretende, regelmäßig unterbrochene, kurze Palindrom-Wiederholungen“.

2 Erklären Sie den Begriff Palindrom im Zusammenhang mit dem CRISPR-System.

Die Buchstaben des genetischen Codes, die vier Basenmoleküle Adenin, Cytosin, Thymin und Guanin, besitzen dieselbe Reihenfolge wie im zweiten komplementären DNA-Strang – dort allerdings in entgegengesetzter Richtung gelesen.

- 3 Zeichnen Sie schematisch eine CRISPR-RNA (crRNA) und benennen Sie die für die Funktion relevanten Teile. Welcher Bereich enthält die individuell unterschiedliche Information für das Schneiden der Viren-DNA und woher stammen diese Abschnitte ursprünglich?



CRISPR bezeichnet Bereiche in prokaryotischen Genomen, die aus sich wiederholenden DNA-Abschnitten (den repeats) und zwischengeschalteten DNA-Bereichen mit variablen Sequenzen (den Spacern) bestehen. Jede crRNA besitzt einen oder mehrere Spacer, die von repeat-Fragmenten flankiert werden. Die wichtige Information der CRISPR/Cas-Systeme liegt abgespeichert in den Sequenzen der Spacer. Diese stammen ursprünglich aus Fremd-DNA wie Viren.

- 4 Nennen Sie die weiteren 3 „Bausteine“ die der CRISPR-Bereich enthält. Benennen Sie deren Funktion.
- **Promotor:** sorgt dafür, dass der CRISPR-Bereich abgelesen und in die sogenannte CRISPR-RNA (crRNA) übersetzt wird.
 - **CRISPR-assoziierte Gene (Cas):** Sie liefern die Bauanleitung für die Cas-Proteine – also die Enzyme, die den DNA-Strang durchtrennen.
 - **tracrRNA:** RNA-Molekül, das die Schneidemoleküle zusammen mit der crRNA zu ihren Zielorten auf der Viren-DNA führt.

- 5 Stellen Sie Ihre Ergebnisse in Form eines Kurzvortrags der Klasse vor.



Arbeitsblatt 3 (Grundlagen)

Arbeitsweise von CRISPR/Cas9

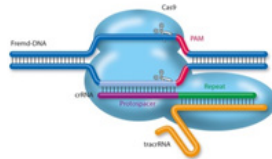
Arbeitsauftrag

Lesen die folgenden Abschnitte des Themenportals Genom-Editierung:

1. Aufgaben der Zelle
2. Arbeitsweise

Link:

<https://www.mpg.de/11018867/crispr-cas9>



Zeitaufwand

ca. 30 min inklusive der Bearbeitung der Fragen

Vorkenntnisse

- Aufbau und Umschreiben von DNA in RNA
- Richtung der Stränge: 5' -3' Richtung, Leitstrang und Folgestrang

Beantworten Sie folgende Fragen:

- 1 „Das CRISPR-Cas verleiht der Infektionsabwehr der Bakterien eine Art Gedächtnis“. Beurteilen Sie, ob dies ein treffender Begriff ist. Begründen Sie Ihre Entscheidung.

Ja, dies ist ein treffender Begriff, da nach einem Kontakt mit einem Virus ein kurzer Abschnitt der Viren-DNA zwischen die CRISPR-Sequenzen der Bakterien-DNA eingebaut wird. Diese Information wird auch an die Nachkommen weitergegeben. Die variablen Abschnitte zwischen den CRISPR-Sequenzen („spacer“) sind also eine Art Bibliothek sämtlicher Erreger, mit der die Zelle konfrontiert war.

- 2 Erklären Sie die Bedeutung des Begriffs PAM und welche Rolle spielt er für den CRISPR-Komplex?

Der Begriff steht für „proto-spacer adjacent motif“, abgekürzt PAM. Nur wenn ein solcher drei Basen-langer Abschnitt neben der Erkennungssequenz liegt, kann Cas9 an den DNA-Faden binden.

3 Aus welchen Basen kann ein solche PAM-Sequenz bestehen?

Er besteht aus drei Basen - zwei Guanin-Basen und einer weiteren, beliebigen Base.

4 Übung: Unten finden Sie einen Abschnitt aus einer DNA-Sequenz. Unterstreichen Sie 6 PAM-Sequenzen in dem oberen Strang (5'-3').

5'-GCACGGCGGAGCGGTTCTTGGCAGCGGCCGCACGATCTCGTTGCCGCCGG-3'
3'-CGTGCCGCCTCGCCAAGAACCGTCGCCGGCGTGCTAGAGCAACGGCGGCC-5'

5'-GCACGGCGGAGCGGTTCTTGGCAGCGGCCGCACGATCTCGTTGCCGCCGG-3'
3'-CGTGCCGCCTCGCCAAGAACCGTCGCCGGCGTGCTAGAGCAACGGCGGCC-5'

5 Beschreiben Sie in Form eines Pfeildiagramms den **natürlichen** Ablauf des CRISPR/Cas9-Systems.

Übersetzung der CRISPR- und „spacer“-Sequenzen in die CRISPR-RNA (crRNA) -->
RNAse III entfernt Teile dieser crRNA --> tracrRNA lagert sich an -->
fertige crRNA und tracrRNA verbinden sich und zeigen Cas9 die Bindungsstelle (zusätzlich PAM notwendig zur Erkennung) --> Entspiralisierung der DNA Stränge -->
Anlagerung von crRNA/tracrRNA an einen DNA-Strang --> Durchtrennung der Stränge

6 Man kennt heute verschiedene CRISPR-Cas-Klassen. Welchen Vorteil hat das CRISPR/Cas9- System für Biotechnologische Anwendungen?

CRISPR/Cas9 ist eines der am einfachsten arbeitenden Systeme. Es benötigt mit der CRISPR- und tracrRNA nur zwei RNA-Moleküle sowie das Cas9-Protein, um fremde DNA gezielt zu zerschneiden. Die beiden RNA-Moleküle lassen sich im Labor sogar zu einem einzigen „guide-RNA“-Molekül fusionieren, was die Handhabung noch weiter vereinfacht. Außerdem funktioniert CRISPR/Cas9 nicht nur in Bakterien, sondern auch in Zellen mit Zellkern.

- 7 In einem Bakterium leiten die beiden natürlich vorkommenden RNA-Moleküle (crRNA und tracrRNA) das Enzym Cas9 an die richtige Position der Viren-DNA. Erklären Sie wie dieses System **künstlich modifiziert** werden kann und welchen Vorteil dies hat.

Eine Single Guide RNA ist ein künstlich hergestelltes Molekül, das dem Enzym Cas9 die Erkennungssequenz, an der dieses die DNA schneiden soll, übermittelt. Die Single Guide RNA übernimmt damit die Funktion der beiden natürlich vorkommenden RNA-Moleküle in einer Bakterienzelle (crRNA und tracrRNA). Die Entwicklung einer Single Guide RNA ermöglichte die Herstellung einer programmierbaren, RNA-geleiteten Nuklease.

- 8 Erläutern Sie warum Bakterien vor Schnitten durch das CRISPR-System in den eigenen Genen geschützt sind.

Bakterien besitzen in ihrem Genom kein solches PAM für ihr Virenabwehrenzym, weshalb sie sicher vor Schnitten in den eigenen Genen sind.

- 9 Diskutieren Sie in Partnerarbeit inwiefern Lamarcks Theorie neu überdacht/bewertet werden muss.

In der Diskussion können verschiedene Aspekte angesprochen werden, z.B. welche Aspekte von Lamarcks Theorie stimmen, wo sind die Schwachstellen von Darwins Theorie, die Bedeutung des Viren-erbeguts für das Immunsystem, epigenetische Aspekte.