

Biologická olympiáda

Ročník: 55. Šk. rok: 2020/21

Celoštátne kolo

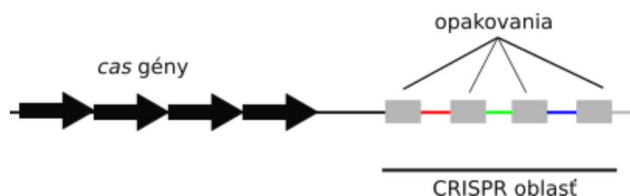
Kategória: A

Praktická úloha

Celoštátne kolo začína 13.00 a končí 15.30. Budete riešiť test a jednu praktickú úlohu. Na test máte 90 minút. Na praktickú úlohu 60 minút. **Za test môžete získať 80 bodov a za praktickú úlohu 44 bodov.** Test aj praktická úloha budú otvorené počas celého riešenia CK. Na niektoré otázky je správnych viac odpovedí. Body Vám budú udelené za každú správnu odpoveď. Za nesprávnu Vám budú odpočítané minimálne na 0. Ak test a praktickú úlohu neodošlete včas, test sa uzamkne a nebude sa dať odoslať. V takom prípade budú neplatné. Nenechajte si odoslanie na poslednú chvíľu pre prípadné problémy s internetom alebo kapacitou MS Forms. V prípade rovnosti bodov o poradí rozhodne čas riešenia testu.

* Tento formulár zaznamená vaše meno, zadajte svoje meno.

Téma: Mutagenéza kvasinkových buniek pomocou metódy CRISPR/Cas9



Cielená mutagenéza, alebo cielené editovanie genómu, je proces, pri ktorom do študovaného genómu vnášame konkrétnu zmenu (mutáciu). Cielená mutagenéza je mimoriadne užitočná metóda v molekulárnej genetike, ktorá vedcom umožňuje znefunkčniť gén v modelovom organizme, ktorý študujú, aby mohli skúmať jeho funkciu. Existuje niekoľko metód, ktoré cielenú mutagenézu umožňujú. Jednou z najrozšírenejších je v súčasnosti metóda CRISPR/Cas9, za ktorú bola v roku 2020 udelená Nobelova cena za chémiu pre Jennifer Doudna a Emmanuelle Charpentier, a ktorá umožňuje pomerne rýchle a efektívne editovanie genómu v širokom spektre modelových organizmov.

Vašou úlohou bude dnes pochopiť, ako CRISPR/Cas9 metóda funguje a vyriešiť úlohy týkajúce sa aplikácie tejto metódy v kvasinke *Saccharomyces cerevisiae*. Naším cieľom bude vyradiť z funkcie gén *ADE2*, ktorý kóduje jeden z enzýmov dráhy syntézy adenínu. Ak je tento gén znefunkčnený,

kvasinky si nedokážu samé syntetizovať adenín, a navyše sa v ich bunkách hromadí červeno sfarbený medziprodukt syntézy adenínu, ktorý nedokážu odbúrať.

Ako CRISPR/Cas9 funguje? Pôvodná funkcia tohto systému je špecifická bakteriálna imunita voči vírusom (bakteriofágom). Enzým Cas9 funguje ako nukleáza, to znamená, že štiepi DNA. Cas9 samotná nevie rozoznať, akú DNA má poštiepiť; navádzaciu funkciu má v tomto prípade tzv. navádzacia (*guide*) RNA (gRNA), ktorá je komplementárna k sekvencii konkrétnej vírusovej DNA. Po infekcii novým typom vírusu sú kúsky DNA vírusu zakomponované na špeciálne miesto v genómovej DNA baktérie, z ktorého sa vyrába gRNA: toto miesto sa nazýva CRISPR (*clustered regularly interspersed short palindromic repeats*) oblasť. V CRISPR oblasti sa striedajú jedinečné sekvencie nazývané tzv. oddeľovače (*spacers*), ktorých sekvencia je komplementárna k DNA rôznych vírusov, s ktorými sa baktéria (alebo jej predkovia) stretli, a tzv. opakovania (*repeats*), ktorých úloha je ohraničovať jednotlivé oddeľovače. (Obrázok znázorňuje CRISPR oblasť, spolu s pridruženými *cas* génmi, ktoré sa často nachádzajú v jej fyzickej blízkosti v genóme. Sivé obdĺžniky znázorňujú opakovania a farebné úsečky znázorňujú oddeľovače.).

U baktérií a archeónov sa vyskytuje viacero rôznych typov CRISPR/Cas systémov, no my sa zameriame na ten, ktorý sa najčastejšie využíva na editovanie genómov: CRISPR/Cas9. V prípade tohto systému sa celá CRISPR oblasť prepisuje ako jeden transkript, a špeciálny enzým (RNáza III) štiepi tento transkript v mieste každého opakovania tak, aby sa jednotlivé oddeľovače nachádzali na samostatných molekulách (gRNA). Každá gRNA sa potom spojí s enzýmom Cas9 za pomoci ďalšej RNA, tzv. tracrRNA, ktorá sprostredkúva spojenie Cas9 a gRNA.

1

Koľko samostatných gRNA vznikne z CRISPR oblasti na obrázku vyššie?
(1 bod)

CRISPR/Cas9 bol adaptovaný pre potreby molekulárnobiologického výskumu s niekoľkými úpravami. Molekuly gRNA a tracrRNA boli spojené do jednej molekuly, ktorú nazývame sgRNA (*single guide RNA*): táto molekula nesie aj oblasť komplementárnu k cieľovej molekule (pôvodná funkcia gRNA), aj oblasti potrebné pre spojenie s enzýmom Cas9 (pôvodná funkcia tracrRNA). Výhodou toho, že sgRNA je jedna molekula, je najmä jednoduchšia manipulácia – do buniek, ktorých DNA chceme editovať, je potrebné dostať iba Cas9 a sgRNA. Čo to však znamená "dostať do buniek"? V prípade niektorých modelových systémov, napr. hlísty *Caenorhabditis elegans*, ide doslova o dopravenie týchto molekúl do buniek prostredníctvom injekcie – proteín Cas9 a sgRNA vo forme RNA sú dopravené do buniek priamo. V prípade kvasiniek sa však postupuje inak. Kvasinky, podobne ako baktérie, majú vo svojich bunkách aj malé kruhové DNA – plazmidy. Plazmidy je možné využiť ako nástroj v molekulárnej biológii. Na plazmide môžeme do kvasinkových buniek dopraviť gény, ktoré kvasinka potom bude exprimovať – a takýmto spôsobom je možné do kvasiniek dostať aj gén kódujúci Cas9 a gén kódujúci sgRNA.

V nasledujúcej praktickej úlohe spolu prejdeme kompletnou CRISPR/Cas9 mutagenézou kvasiniek, ktorá zahŕňa nasledujúce kroky:

1. Výber cieľovej sekvencie pre mutagenézu a návrh konkrétnej sekvencie sgRNA
2. Príprava plazmidu nesúceho gény pre Cas9 a sgRNA (pEDIT)
3. Dopravenie plazmidu pEDIT a opravného templátu do buniek kvasiniek
4. Analýza fenotypu vzniknutých kvasiniek a výber mutovaných klonov
5. Overenie editácie genómu pomocou PCR a reštrikčného štiepenia

Krok 1: Výber cieľovej sekvencie pre mutagenézu a návrh konkrétnej sekvencie sgRNA



Naším cieľom je editácia génu *ADE2*. Zo sekvencie tohto génu je potrebné vybrať vhodnú cieľovú sekvenciu, ku ktorej bude sgRNA komplementárna. Princípom mutagenézy pomocou CRISPR/Cas9 je, že Cas9 vniesie na konkrétne miesto v genóme dvojvláknový zlom – teda preruší v jednom mieste obidve vlákna DNA. Bunky spravidla nie sú schopné opraviť takýto typ poškodenia DNA presne, a preto pri jeho oprave často dochádza ku vzniku krátkej, zvyčajne jednobázovej inzercie alebo delécie. Frekvencia vzniku mutácie týmto spôsobom však nemusí byť dostatočná. Preto sa spolu s Cas9 a sgRNA do buniek kvasiniek môže dopraviť aj tzv. opravný templát. Ide o úsek DNA, ktorý sa veľmi podobá na cieľovú sekvenciu (hovoríme, že je homologický), ale nesie niektoré zámerné zmeny – napríklad konkrétnu mutáciu, ktorú chceme do genómu vniesť (obrázok - rozdiel v sekvencii znázornený červenou). Bunky potom využijú opravný templát na opravu poškodenej sekvencie, pričom vnesú do genómu aj konkrétnu mutáciu, ktorú opravný templát nesie. (Mutácia sa nemusí nutne prekryvať s miestom, kde dôjde k vneseniu dvojvláknového zlomu, nemala by však byť príliš vzdialená.)

2

Nižšie je uvedená teoretická sekvencia genómovej DNA a opravného templátu (OT). Ak by v tejto sekvencii došlo k štiepeniu pomocou Cas9 nukleázy a bunka by zlom opravila pomocou opravného templátu, aký typ mutácie by bol do sekvencie vnesený? (Iba podčiarknutá báza je odlišná.)

gDNA:

CTGCGCCGGCGCGGCGCGCCTCTCTGCGCCTGCGCCGGCGCGGCGCGCCTCTCTGCGC
CTGCGCCGG

OT:

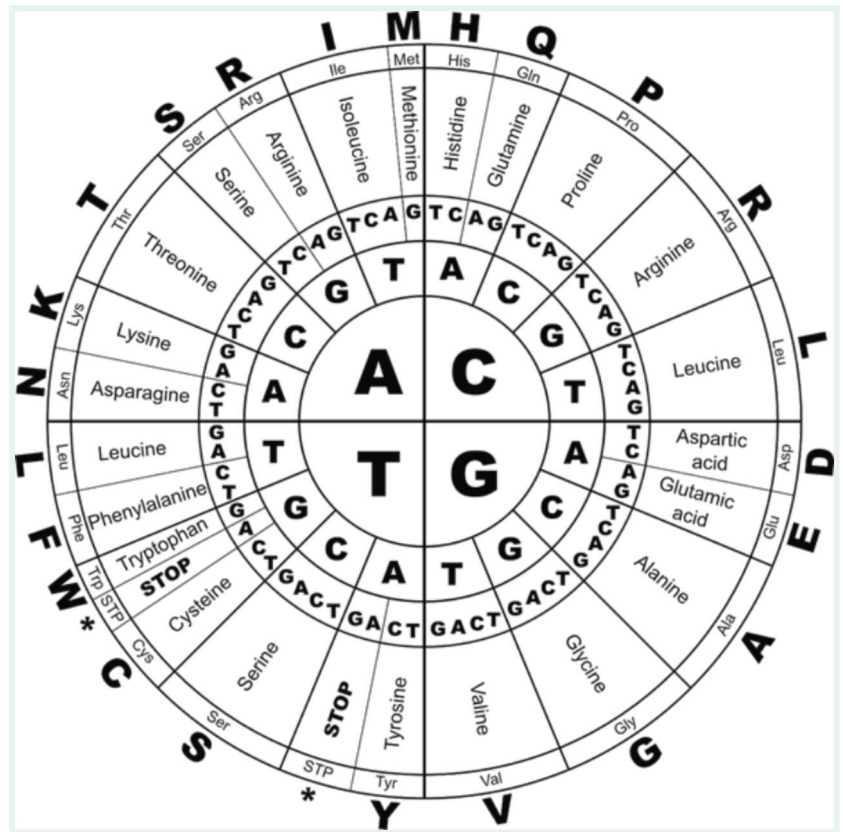
CTGCGCCGGCGCGGCGCGCCTCTGTGCGCCTGCGCCGGCGCGGCGCGCCTCTCTGCGC
CTGCGCCGG

(Počet bodov: 2)

- ☐ posunová (*frameshift*) mutácia
- ☐ jednobázová inzercia
- ☐ jednobázová delécia
- ☐ substitúcia

3

Táto mutácia:
(Počet bodov: 2)



- ☐ by spôsobila okamžité ukončenie syntézy polypeptidového reťazca
- ☐ by mohla byť synonymná
- ☐ by mohla viesť ku vzniku STOP kodónu
- ☐ by zmenila čítací rámec pri translácii tejto sekvencie

V našom experimente bude opravný templát niesť mutáciu, ktorá spôsobí vznik STOP kodónu. Ak opravný templát nesie STOP kodón, kde v rámci génu by sme mali vybrať cieľovú sekvenciu tak, aby sme maximalizovali pravdepodobnosť znefunkčnenia génu?

(Počet bodov: 4)

- ☐ Blízko ŠTART kodónu génu *ADE2*.
- ☐ Blízko STOP kodónu génu *ADE2*.
- ☐ V strede génu *ADE2*.
- ☐ Blízko 5' konca výslednej mRNA.
- ☐ Blízko 3' konca výslednej mRNA.
- ☐ Je to jedno, vnesenie STOP kodónu vždy znefunkční každý gén.

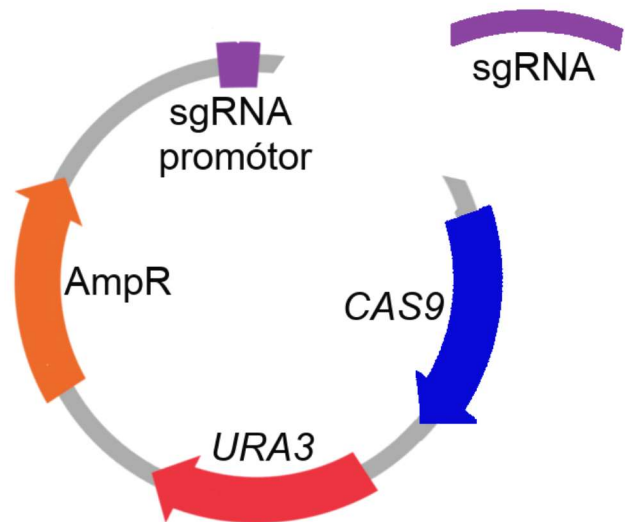
5' ကကကကကကကကကကက↓ကကကNGG 3'
3' ကကကကကကကကကကက↑ကကကNCC 5',

Miesto v *ADE2* géne, ktoré sme si vybrali ako cieľové miesto v našom experimente, je celé obsiahnuté v tejto sekvencii:

5' AGTGTTCCTGTGGAACAAGCCAGTGAGACGTCCCTATTGAA 3'
3' TCACAAGGACACCTTGTTCTCGGTCACTCTGCAGGGATAACTT 5'

Identifikujte v tejto sekvencii správne PAM miesto a cieľovú sekvenciu, a uveďte sekvenciu **transkriptu sgRNA** (v smere 5' → 3'), ktorý zodpovedá identifikovanej cieľovej sekvencii:

Krok 2: Príprava plazmidu nesúceho gény pre Cas9 a sgRNA (pEDIT)



Plazmid nesúci gény pre Cas9 a sgRNA pripravíme metódami molekulárneho klonovania. Predpokladajte, že máme k dispozícii dve molekuly DNA: 1. plazmid nesúci gén *CAS9*, ktorý bol poštiepený za promótorovou sekvenciou schopnou stimulovať transkripciu sgRNA (**vektor**) a 2. gén pre sgRNA (**inzert**) (obrázok).

Na to, aby sa tento plazmid udržal v bunkách baktérií, nesie gén *AmpR* – tento gén zabezpečuje baktériám, ktoré obsahujú plazmid, prežitie na médiách s prídavkom ampicilínu. Pre udržanie sa v bunkách kvasiniek obsahuje plazmid gén *URA3*: tento gén umožňuje bunkám kvasiniek, ktoré nemajú funkčný gén *URA3* vo svojom vlastnom genóme, prežiť na médiách bez uracilu, keďže gén *URA3* je nevyhnutný pre jeho syntézu.

Tieto dve molekuly DNA, z ktorých chceme pripraviť plazmid pEDIT, spojíme v procese ligácie, pomocou enzýmu nazývaného ligáza. Táto reakcia je efektívna vtedy, ak je v nej DNA vektoru a inzertu prítomná vo vhodnom pomere.

6

Obe molekuly máte k dispozícii v koncentrácii 10 ng/μl. Ideálny pomer na ligáciu je 80 ng inzertu k 100 ng vektora. Aký objem roztoku inzertu musíte pridať do ligačnej reakcie, ak ste do nej pridali 50 ng vektora? Výsledok uveďte v μl. (Počet bodov: 3)

7

Aký objem ligázy potrebujete v tejto reakcii použiť, ak máte k dispozícii jej roztok s koncentráciou 10 jednotiek/ μ l, a ideálne množstvo ligázy v reakcii by bola 1 jednotka na 10 ng DNA? Výsledok uveďte v μ l.

(Počet bodov: 3)

8

Plazmid pEDIT, ktorý vznikne ako výsledok ligácie, bude vnesený (transformovaný) do buniek baktérií, ktoré popri tom, ako sa budú samé deliť, namnožia aj plazmid pEDIT, ktorý tak budeme schopní získať späť z baktériálnej kultúry vo vysokej koncentrácii.

V akom type živného média musíme pestovať bunky baktérií, v ktorých chceme namnožiť plazmid pEDIT?

(Počet bodov: 2)

- ☐ Médium s prídavkom ampicilínu.
- ☐ Médium bez ampicilínu.
- ☐ Médium s prídavkom ampicilínu, ale bez uracilu.
- ☐ Médium bez ampicilínu a bez uracilu.

Krok 3: Dopravenie plazmidu plazmidu pEDIT a opravného templátu do buniek kvasiniek

Potom, ako identitu plazmidu pEDIT overíme sekvenovaním (metóda schopná prečítať sekvenciu DNA), môžeme pokračovať v experimente: transformáciou plazmidu pEDIT do kvasinkových buniek. Transformácia je proces, pri ktorom je DNA (ako napr. plazmid) dopravená do buniek baktérií či kvasiniek. V rámci tohto procesu je bunková stena mikroorganizmov opracovaná takým spôsobom, aby bola priepustná pre DNA. V prípade nášho experimentu opracujeme bunkovú stenu kvasiniek chemicky, obmývaním roztokom s prídavkom chloridu lítneho, a následným tepelným šokom, počas ktorého sa v bunkovej stene vytvoria póry, cez ktoré DNA prenikne dovnútra buniek kvasiniek.

9

Aký genotyp musia mať bunky kvasiniek, ktoré využijeme na transformáciu plazmidu pEDIT? (Veľké písmená označujú funkčnú alelu génu, malé nefunkčnú alelu; pracujeme s haploidným kmeňom kvasiniek.)
(Počet bodov: 2)

- ☐ *ade2, ura3*
- ☐ *ADE2, ura3*
- ☐ *ADE2, URA3*
- ☐ *ade2, URA3*

Krok 4: Analýza fenotypu vzniknutých kvasiniek a výber mutovaných klonov

Po transformácii vysejeme kvasinky na vhodné rastové médium, kde sa v priebehu niekoľkých dní vytvoria kolónie.

10

Kvasinky, u ktorých prebehla úspešne transformácia plazmidu pEDIT do buniek a aj následné editovanie genómu:

(Počet bodov: 2)

- ☐ vytvoria biele kolónie
- ☐ vytvoria ružové kolónie
- ☐ nevytvoria kolónie na médiu bez uracilu
- ☐ vytvoria ružové kolónie iba na médiách s uracilom

V tabuľke nižšie vidíte výsledky nášho experimentu, pri ktorom boli použité rôzne množstvá plazmidu pEDIT a opravného templátu (OT) pri transformácii kvasiniek, kde bol zaznamenaný počet bielych a ružových kolónií kvasiniek, ktoré vyrástli na živnom médiu v Petriho miskách po transformácii. Z výsledku tohto experimentu vyplýva, že:

(Počet bodov: 2)

Množstvo plazmidu [µg]	Množstvo OT [µg]	Počet ružových kolónií	Počet bielych kolónií
0,5	0	0	5
0,5	0,2	0	5
0,5	0,3	2	4
0,5	0,5	4	1
1	0,5	8	1
2	0,5	13	7
3	0,5	20	6

- ☐ Počet kvasiniek, ktoré v procese transformácie prijímú plazmid, sa zvyšuje s množstvom plazmidovej DNA.
- ☐ Počet kvasiniek, ktoré v procese transformácie prijímú plazmid, sa zvyšuje s množstvom DNA opravného templátu.
- ☐ Prítomnosť opravného templátu zvyšuje pravdepodobnosť cielenej editácie genómu.
- ☐ Prítomnosť opravného templátu znižuje pravdepodobnosť cielenej editácie genómu.

Krok 5: Overenie editácie genómu pomocou PCR a reštrikčného štiepenia

Kolónie, u ktorých na základe analýzy sfarbenia predpokladáte, že došlo k editovaniu genómu, necháte rozrásť v tekutom médiu, a získate z nich genómovú DNA na ďalšiu analýzu.

Sekvencia opravného templátu, ktorý sme použili v našom experimente, sa od sekvencie genómovej DNA líši nasledovne (obidve sekvencie sú uvedené v smere 5' → 3', odlišné sú iba podčiarknuté bázy):

gDNA: TAATCAAAAATGGTATAGCAGTTACCCAAAGTGTTCTGTGGAACAAGCCAGTGAGACGTCCC
OT: TAATCAAAAATGGTATAGCAGTTACCCAAAGTGTTCTGTGGAACAAGCTAGCGAGACGTCCC

12

Uved'te sekvenciu STOP kodónu, ktorý mutácia v opravnom templáte vniesla do genómovej sekvencie:

(Počet bodov: 4)

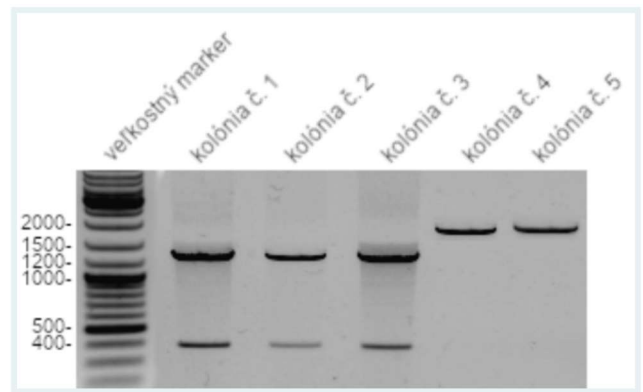
Okrem STOP kodónu zároveň mutácie na opravnom templáte vnášajú do sekvencie génu *ADE2* rozpoznávacie miesto pre reštrikčnú endonukleázu – enzým, ktorý je schopný viazať konkrétnu sekvenciu v DNA a poštíepiť DNA na tomto mieste. V tabuľke nižšie sú uvedené rozpoznávacie miesta pre vybrané reštrikčné endonukleázy.

Rozpoznávacie miesto ktorej reštrikčnej endonukleázy bolo vnesené do génu *ADE2* prostredníctvom mutácii na opravnom templáte?

(Počet bodov: 3)

Reštrikčná endonukleáza	Rozpoznávacie miesto (5' → 3')
AseI	ATTAAT
NruI	TCGCGA
ZraI	GACGTC
HindIII	AAGCCT
NheI	GCTAGC
NcoI	CCATGG
XhoI	CTCGAG

- ☐ AseI
- ☐ NruI
- ☐ ZraI
- ☐ HindIII
- ☐ NheI
- ☐ NcoI
- ☐ XhoI



Nižšie vidíte výsledok agarózovej gélovej elektroforézy. Princípom tejto metódy je umiestnenie gélu, v ktorom je prítomná DNA, do elektrického poľa, kde sa DNA, keďže je záporne nabitá, pohybuje smerom ku kladnej elektróde. Čím je DNA menšia, tým rýchlejšie sa pohybuje v géli, preto nám táto metóda umožňuje rozdeliť DNA podľa veľkosti. V prvej vertikálnej dráhe vidíte veľkostný marker – zmes molekúl DNA so známou veľkosťou, podľa ktorého potom môžeme odčítat aj veľkosť molekúl, ktoré nás zaujímajú. Čísla 1 – 5 označujú kolónie, z ktorých ste získali genómovú DNA pre vašu analýzu.

Ktoré z analyzovaných kolónií obsahujú bunky, u ktorých došlo k editácii genómu s využitím opravného templátu?

(Počet bodov: 6)

U kolónii, ktoré ste identifikovali, prebehla úspešná CRISPR/Cas9 editácia genómu: gén *ADE2* bol mutovaný, a nie je viac funkčný. V prípade tohto génu už vieme, načo slúži, a môžeme si na ňom overiť fungovanie tejto metódy v kvasinkách. CRISPR/Cas9 však možno použiť aj na editáciu genómu iných organizmov, vrátane ľudských bunkových kultúr. Vedci na celom svete dnes túto metódu používajú ako jeden z najúčinnějších nástrojov na štúdium funkcie doteraz nepopísaných génov. Samozrejme, táto metóda môže mať aj medicínske uplatnenie – ak by sme dokázali pozmeniť genóm pacientov, ktorí trpia na geneticky podmienené ochorenia tak, aby ich bunky produkovali funkčný proteín, ktorý bol predtým mutovaný, bolo by možné týchto pacientov vyliečiť aj zo závažných ochorení. Metóda CRISPR/Cas9 ako terapeutický prístup však ešte stále čelí mnohým technickým problémom a bioetickým dilemám, a jej použitie v medicíne je teda ešte stále otvorenou otázkou.

16

Poznámky k úlohe (nepovinné):

Tento obsah nevytvorila a neschválila spoločnosť Microsoft. Údaje, ktoré odošlete, sa pošlú vlastníčkovi formulára.

 Microsoft Forms