

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) to narzędzie do edycji genów. Umożliwia precyzyjne modyfikacje DNA. Zostało odkryte jako część systemu odpornościowego bakterii [1].

1. Jak działa CRISPR?

- 1) CRISPR działa w połączeniu z enzymem Cas9, który działa jako "nożyczki" tnące DNA. System działa w kilku etapach:
 - a. **Rozpoznanie celu:** CRISPR używa krótkiego odcinka RNA (gRNA - guide RNA), który jest komplementarny do docelowej sekwencji DNA. RNA prowadzi enzym Cas9 do odpowiedniego miejsca w genomie.
 - b. **Cięcie DNA:** Po dotarciu do docelowej sekwencji, Cas9 przecina dwie nici DNA, tworząc przerwę.
 - c. **Naprawa DNA:** Komórki próbują naprawić uszkodzoną sekwencję DNA, co może skutkować wprowadzeniem mutacji lub dodaniem nowego genu.

2. Zastosowania CRISPR

- 1) CRISPR ma szerokie zastosowania w różnych dziedzinach:
 - a. **Biotechnologia:** Edycja genów roślin, aby poprawić ich odporność na choroby, suszę, czy zwiększyć plony.
 - b. **Medycyna:** Potencjalne terapie genowe do leczenia chorób dziedzicznych, takich jak mukowiscydoza czy anemia sierpowata.
 - c. **Badania naukowe:** Badania nad funkcją genów i modelowanie chorób genetycznych.

3. Przykład w kontekście Arabidopsis

- 1) CRISPR może być użyty do wprowadzenia modyfikacji w genach Arabidopsis odpowiedzialnych za reakcje na stres suszy.
- 2) Można zaprojektować gRNA, aby wycelować w specyficzne geny regulujące tolerancję na suszę, a następnie użyć CRISPR do knock-out lub zmodyfikowania tych genów w celu poprawienia adaptacji roślin do warunków niedoboru wody.
- 3) Dzięki CRISPR można tworzyć bardziej odporne odmiany roślin, co ma znaczący wpływ na rolnictwo, zwłaszcza w obliczu zmian klimatycznych.

Projektowanie systemu CRISPR do edycji genów *Arabidopsis* z użyciem Biopythona

Cel:

- Nauczenie projektowania sekwencji gRNA do edycji genów.
- Wykorzystanie Biopython do edycji genów odporności na suszę w *Arabidopsis thaliana*.
- Zaprojektowanie gRNA do wyciszenia lub modyfikacji genu.

Wprowadzenie:

- *Arabidopsis thaliana* to modelowy organizm w badaniach roślinnych.
- CRISPR umożliwia modyfikację genów związanych z odpornością na suszę.
- W ćwiczeniu zaprojektujesz sekwencje gRNA do modyfikacji genów.

Krok 1: Przygotowanie środowiska

- Zainstaluj Biopython:

```
1 pip install biopython
```

- Załaduj sekwencje genów *Arabidopsis* do pliku `arabidopsis_genes.fasta`.

Krok 2: Analiza sekwencji genów

- Użyj Biopython do załadowania sekwencji genów.
- Identyfikuj miejsca docelowe CRISPR w sekwencjach genów.

Przykładowy kod:

```
1 from Bio import SeqIO
2 from Bio.Seq import Seq
3
4 # Załaduj sekwencje genów z pliku FASTA
5 def load_sequences(file_path):
6     return list(SeqIO.parse(file_path, "fasta"))
7
8 # Znajdź potencjalne sekwencje gRNA (20 nukleotydów + PAM "NGG")
9 def find_crispr_sites(sequence):
10    pam = "NGG"
11    sites = []
12    for i in range(len(sequence) - 23):
13        target = sequence[i:i+20]
14        pam_site = sequence[i+20:i+23]
15        if pam_site.endswith("GG"):
16            sites.append(target + pam_site)
17    return sites
18
19 # Przykład użycia
20 genes = load_sequences("arabidopsis_genes.fasta")
21 for gene in genes:
22     print(f"Gene ID: {gene.id}")
23     crispr_sites = find_crispr_sites(str(gene.seq))
24     print(f"Potential CRISPR sites: {crispr_sites[:5]}") # wyświetl tylko 5 pierwszych
```

Krok 3: Projektowanie sekwencji gRNA

- Wyszukaj potencjalne sekwencje gRNA w sekwencjach genów.
- Zidentyfikuj najbardziej odpowiednie miejsca do modyfikacji.

Krok 4: Analiza wydajności i specyficzności gRNA

- Upewnij się, że gRNA nie ma niepożądanych miejsc docelowych w genomie.
- Użyj dodatkowych algorytmów do oceny specyficzności.

Zadanie:

- Znajdź potencjalne miejsca CRISPR w jednym z wybranych genów.
- Wybierz najlepsze gRNA do edycji genu.
- Zapisz wyniki w pliku `selected_grnas.txt`.

Przykład formatu pliku wynikowego:

```
Gene ID: AT3G02990  
Selected gRNA: ACTGACTGACTGACTGACTGGG (pos: 150-170)
```

Dodatkowe wyzwania:

- Zintegruj narzędzia Biopythona do analizy specyficzności gRNA w całym genomie *Arabidopsis*.
- Zaprojektuj gRNA do edycji wielu genów jednocześnie.

Podsumowanie:

- Poznasz, jak używać narzędzi bioinformatycznych do projektowania gRNA.
- Nauczysz się, jak zwiększać odporność roślin na stresy środowiskowe.

Referencje:

- Biopython Tutorial and Cookbook
- Zhang, H. et al. (2019). *Genome editing in plants using CRISPR-Cas9*. Nature Reviews Genetics, 20(12), 769-788.

Bibliografia

- [1] J. A. Doudna i E. Charpentier. “The New Frontier of Genome Engineering with CRISPR-Cas9”. W: Science 346.6213 (28 list. 2014), s. 1258096. ISSN: 0036-8075, 1095-9203. DOI: 10.1126/science.1258096. URL: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1258096> (term. wiz. 22.10.2024).
- [2] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna i E. Charpentier. “A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity”. W: Science 337.6096 (17 sierp. 2012), s. 816–821. ISSN: 0036-8075, 1095-9203. DOI: 10.1126/science.1225829. URL: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1225829> (term. wiz. 22.10.2024).
- [3] J. A. V. Montecillo, L. L. Chu i H. Bae. “CRISPR-Cas9 System for Plant Genome Editing: Current Approaches and Emerging Developments”. W: Agronomy 10.7 (17 lip. 2020), s. 1033. ISSN: 2073-4395. DOI: 10.3390/agronomy10071033. URL: <https://www.mdpi.com/2073-4395/10/7/1033> (term. wiz. 22.10.2024).