



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Engineering of CRISPR-Cas9-based systems for diagnostics and biocomputing

Author:

Rosa Márquez Costa

Thesis Advisor:

Dr. Guillermo Rodrigo Tárrega

UPV Advisor:

Prof. Carmelo López del Rincón

València, June 2024

RESUMEN

Los sistemas CRISPR-Cas se basan en un mecanismo del sistema inmune adaptativo que se encuentra en bacterias y arqueas. Funcionan utilizando endonucleasas guiadas por ARN (proteínas Cas) para localizar y reconocer secuencias específicas de ácidos nucleicos. Este reconocimiento se realiza en conjunto con un ARN guía, lo que permite precisión y programabilidad de forma fácil y rápida. Estas características han hecho que los sistemas CRISPR-Cas sean revolucionarios en el campo de la ingeniería genética, permitiendo la edición específica del genoma, ensayos de regulación genética y, desarrolladas en los últimos años, aplicaciones de diagnóstico.

Los métodos de detección de ácidos nucleicos, como la qPCR, son la técnica de diagnóstico de referencia en la clínica debido a su alta sensibilidad y especificidad. Sin embargo, estas técnicas suelen requerir equipos sofisticados, procedimientos que requieren mucho tiempo y personal altamente cualificado, lo que las hace poco adecuadas para su uso en contextos de gran escala o con recursos limitados, como las pandemias. Los brotes recurrentes de enfermedades causados por diferentes virus, incluido el nuevo virus respiratorio SARS-CoV-2, suponen un reto a nuestra sociedad a escala global. De cara al futuro, debemos desarrollar métodos versátiles de detección de virus que permitan diagnósticos rápidos y fiables, que superen las limitaciones de las técnicas actuales y puedan usarse fácilmente fuera del laboratorio para aplicaciones en puntos de atención (POC).

Los sistemas CRISPR-Cas se han reconvertido en herramientas de diagnóstico de ácidos nucleicos gracias a la capacidad de algunas proteínas Cas de realizar cortes colaterales no específicos al reconocer su diana. Estas plataformas se basan principalmente en las proteínas Cas12 y Cas13. Nuestro objetivo es ampliar el conjunto de herramientas de diagnóstico CRISPR-Cas mediante el desarrollo de una nueva estrategia de detección de ácidos nucleicos basada en CRISPR-Cas9, cuyo modo de acción se basa en el desplazamiento de hebra en lugar de en la catálisis colateral, utilizando la nucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. A partir de una preamplificación, introducimos una baliza molecular adecuada para producir una señal fluorescente al interactuar con el complejo ternario CRISPR. Demostramos que los amplicones de ADN del SARS-CoV-2 generados a partir de muestras de pacientes pueden detectarse con CRISPR-Cas9. También demostramos la capacidad de realizar la detección simultánea de diferentes amplicones de ADN con la misma nucleasa, ya sea para identificar diferentes regiones de SARS-CoV-2 o diferentes virus respiratorios.

Para avanzar hacia aplicaciones POC, acoplamos el paso de preamplificación isotérmica con oligos biotinilados para producir amplicones marcados. Cuando se combina con CRISPR-Cas9 y sondas marcadas con FAM, esto permite la visualización colorimétrica de la detección mediante ensayos de flujo lateral (LFA) en tiras disponibles en el mercado. La lectura colorimétrica permite la interpretación de los resultados a simple vista, superando la necesidad de un fluorímetro. Detectamos con éxito SARS-CoV-2 a partir de

muestras de pacientes en la configuración LFA, y cuando se combinó con RT-RPA multiplexado, se logró la detección de dos regiones distintas del virus en una sola prueba.

Además, la ausencia de actividad colateral en nuestra metodología permite el procesamiento de secuencias posteriores adicionales. Esto no es factible con las proteínas Cas12 o Cas13, ya que su actividad colateral, aunque útil para el diagnóstico, degradaría cualquier secuencia adicional en la reacción. Por lo tanto, también pretendemos explorar la capacidad de integración de señales de nuestro método de detección basado en CRISPR-Cas9. Demostramos que diseños de circuitos lógicos de ADN pueden procesar diferentes señales de SARS-CoV-2 detectadas por los complejos CRISPR. También nos propusimos mejorar nuestro sistema CRISPR-Cas9 para detectar tanto proteínas como ácidos nucleicos. Nos propusimos diseñar un ARN guía condicional que respondiera a la presencia de la proteína *spike* del SARS-CoV-2. Para ello, insertamos un aptámero en el ARN guía para bloquear la actividad de Cas9 en ausencia de la proteína. En presencia de la proteína *spike*, la interacción aptámero-proteína hace que el motivo de bloqueo sufra un cambio conformacional, liberando el ARN guía y activando Cas9. Aunque logramos con éxito el escenario de bloqueo utilizando las secuencias reguladoras, es necesario seguir trabajando para identificar una secuencia que pueda inducir el cambio conformacional específico necesario para restaurar la actividad de Cas9 en presencia de la proteína *spike*.

En conjunto, esta plataforma de diagnóstico CRISPR-Cas9 permite una detección multiplexada en un solo tubo, complementando los métodos existentes basados en CRISPR, y ofreciendo un sistema extensible para aplicaciones en diagnóstico en el punto de atención y biocomputación.