

CRISPR/CAS SISTEMI: PRIHODNOST DOLOČANJA NUKLEINSKIH KISLIN

Tanja GUČEK¹

Pregledni članek / review paper
Prispelo / received: 18. 10. 2021
Sprejeto / accepted: 15. 12. 2021

Izvleček

V zadnjih 40 letih so svet pretresle številne epidemije, ki so jih povzročili virusi kot je HIV, SARS, H1N1, Ebola, Zika in med zadnjimi SARS-CoV-2, vsem znan kot povzročitelj bolezni COVID-19. V vseh primerih je odziv javnega zdravstva na prisotno virusno grožnjo oviralo pomanjkanje hitrega, dostopnega in zanesljivega molekularnega diagnostičnega testiranja. Kljub temu, da živimo v zelo razviti družbi, ki je ustvarila številne tehnološke čudeže, hitro in natančno določanje patogenov še vedno predstavlja kritično točko tako v humani kot v rastlinski virologiji. Metode, ki omogočajo hitro, občutljivo in specifično določanje nukleinskih kislin so pogosto zahtevne in cenovno neugodne. Velik potencial v rastlinski diagnostiki predstavlja uporaba CRISPR/Cas sistemov, zaradi velike občutljivosti, specifičnosti, hitrosti, fleksibilnosti, robustnosti in preproste uporabe. CRISPR/Cas v kombinaciji s hitrimi testi omogoča poceni, natančno in hitro določanje, ki je primerno tudi za uporabo na terenu. V preglednem članku so opisane različne aplikacije CRISPR/Cas metod za določanje nukleinskih kislin, med drugimi tudi možnost določanja viroidov.

Ključne besede: Crispr, Cas proteini, metode za določanje, nukleinske kisline, viroid

CRISPR/CAS SYSTEMS: THE FUTURE OF NUCLEIC ACID DETECTION

Abstract

Over the past 40 years, the world has been shaken by a number of epidemics caused by viruses such as HIV, SARS, H1N1, Ebola, Zika and most recently, SARS-CoV-2, known to all as the causative agent of COVID-19. In all cases, the public health response to the present viral threat was hampered by a lack of rapid, accessible, and reliable molecular diagnostic testing. Despite living in a highly developed society, that has created many technological marvels, the rapid and

¹ Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Diagnostični laboratorij za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, e-naslov: tanja.gucek@ihps.si

accurate identification of pathogens still represents a critical point in both human and plant virology. Methods that enable rapid, sensitive and specific analysis of nucleic acids are often complex and cost-inefficient. The use of CRISPR/Cas systems represents great potential in plant diagnostics, due to its sensitivity, specificity, speed, flexibility, robustness and ease of use. CRISPR/Cas in combination with lateral flow assays (LFA) allows cost-effective, accurate and fast detection, which is also suitable for field use. In this review, several CRISPR/Cas applications for nucleic acid detection are discussed, including their potential for viroid detection.

Key words: Crispr, Cas proteins, detection methods, nucleic acids, viroid

1 UVOD

Rastlinski patogeni povzročajo obsežne ekonomske izgube in predstavljajo veliko grožnjo trajnostnem kmetijstvu (Mahas in sod., 2021). Med temi pomembno mesto zajemajo RNA virusi rodu Potexvirus (družina Alphaflexiviridae), Potyvirus (družina Potyviridae) in Tobamovirus (družina Virgaviridae), ki so zelo nalezljivi in razširjeni po celem svetu (Aman in sod., 2020). Zmanjšanje količine in kakovosti pridelka povzročajo tudi viroidi, ki imajo zelo širok spekter gostiteljev in lahko okužijo kmetijske in okrasne rastline ter nekatere drevesne vrste (Hadidi in sod., 2003). Eden izmed pomembnejših dejavnikov pri uspešnem nadzoru širjenja bolezni je zmožnost hitre in natančne določitve njenih povzročiteljev.

Za identifikacijo specifičnih tarčnih nukleinskih kislin so bile v rastlinski virologiji razvite številne metode, katerih uporabnost je odvisna od zanesljivosti, občutljivosti, ponovljivosti, hitrosti, zahtevnosti in cene (Narayanasamy, 2011). Med temi v sodobni diagnostiki prevladujejo tehnike na osnovi PCR, sekvenciranja in metod izotermalnega pomnoževanja (Guček in sod., 2017, Aman in sod., 2020). Kljub številnim izboljšavam imajo te metode še vedno omejitve, kot so cena, čas, oprema, zahtevno načrtovanje, posledično visoko usposobljen kader in vpliv inhibitorjev, kar pogosto vodi v neustrezne rezultate (Mahas in sod., 2021). Omenjeno tako oteži možnost hitrega in enostavnega določanja, zato je potrebno razviti nove metode s posodobljenimi rešitvami.

Velik potencial v rastlinski diagnostiki predstavlja uporaba CRISPR sistema v kombinaciji s Cas proteini kot so Cas12a, Cas13a in Cas14 (Chen in sod., 2018; Gootenberg in sod., 2017; Harrington in sod., 2018). CRISPR/Cas12a sistem ima možnost cis- in trans-rezanja enoverižnih DNA molekul (ssDNA), slednji posledično omogoča določanje nukleinskih kislin, cis- pa se uporablja za genetski inženiring. V zadnjih petih letih je bil CRISPR sistem razvit za določanje številnih patogenov, zaradi ato-molarne (aM, 10^{-18}) občutljivosti, specifičnosti, hitrosti, fleksibilnosti, robustnosti in preproste uporabe. Visoka občutljivost je mogoča ob

predhodni namnožitvi tarče s PCR, LAMP ali RPA (pomnoževanje rekombinazne polimeraze, ang. recombinase polymerase amplification) (Wang in sod., 2020).

2 CRISPR/Cas sistemi

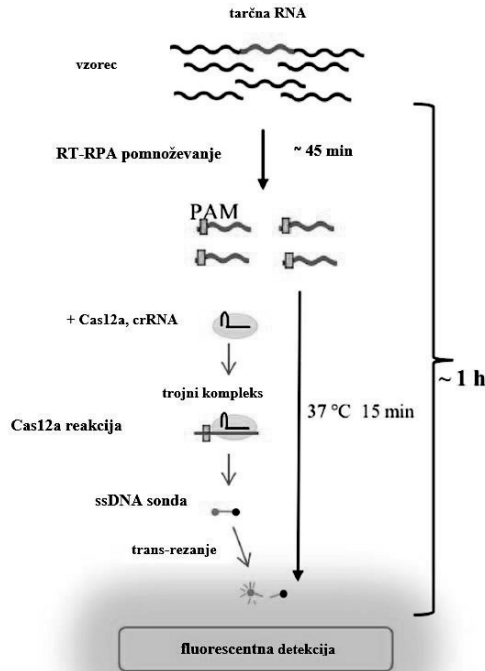
Metoda CRISPR/Cas je ena od novejših diagnostičnih metod, v osnovi razvita za genski inženiring, ki temelji na sistemu, ki ga bakterije in arheje uporabljajo za obrambo pred virusi (Jinek in sod., 2012; Wang in sod., 2020). CRISPR (angl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats, slo. gruče enakomerno prekinjenih kratkih palindromskih ponovitev) sistem se v kombinaciji s Cas proteini (ang. CRISPR-associated endoribonuclease systems, slo. s CRISPR povezane endonukleaze) (Cas12a, Cas13a in Cas14) uporablja za določanje nukleinskih kislin (Chen in sod., 2018; Gootenberg in sod., 2017; Harrington in sod., 2018). Cas13a deluje kot RNaza, ki jo lahko CRISPR RNA (crRNA) molekule reprogramirajo v rezanje označenih ne-tarčnih RNA molekul (Gootenberg in sod., 2017). Podobno Cas12a vsebuje z DNA-aktivirano splošno aktivnost, da deluje kot DNaza, ki lahko neodvisno reže nespecifične enoverižne DNA (ssDNA) molekule, ko nastane kompleks Cas12a/crRNA/tarčna DNA (Chen in sod., 2018). Kompleks Cas12a-crRNA lahko specifično prepozna in reže tarčno zaporedje s prepoznavanjem motiva PAM (ang. protospacer adjacent motif) in komplementarnostjo med tarčo in crRNA (Chen in Doudna, 2017) (slika 1). Prepoznavanje motiva PAM je odvisno od specifičnega zaporedja (5'-TTTN), ki ga prepozna Cas12a protein, in je osnova, da lahko Cas12a protein deluje kot helikaza in odvijje tarčno DNA (Sundaresan in sod., 2017). Po odvitju se crRNA veže na tarčo, kar naprej aktivira nespecifično trans-rezanje ssDNA (Chen in sod., 2018).

V kombinaciji Cas proteinov z utišanimi fluorescentnimi sondami in korakom namnožitve tarče (PCR, RPA, LAMP), so bile razvite številne metode za določanje nukleinskih kislin, kot so SHERLOCK (Gootenberg in sod., 2017), HUDSON (Myhrvold in sod., 2018), DETECTR (Chen in sod., 2018), HOLMES (Li in sod., 2018, 2019) in E-CRISPR (Dai in sod., 2019). Omenjene metode se razlikujejo glede na analiziran vzorec (DNA/RNA), vrsto predhodnega pomnoževanja (PCR/RPA/LAMP), način detekcije (fluorescenca/hitri testi/elektrokemija), občutljivost (pM/aM/zM), možnost kvantifikacije, časovni obseg ter možnost uporabe na terenu (preglednica 1) (Wang in sod., 2020).

Zaradi ato-molarne občutljivosti (aM) in specifičnosti, so bile CRISPR/Cas aplikacije razvite predvsem pa hitro določanje virusov kot so ZIKA, Denge, HPV-16 in SARS-CoV-2, ker čas testiranja skrajšajo na 1 uro (Gootenberg in sod., 2017; Myhrvold in sod., 2018; Dai in sod., 2019; Broughton in sod., 2020).

CRISPR/Cas sistem je pogosto uporabljen tudi zaradi velike specifičnosti, saj zazna spremembe na nivoju že enega nukleotida in je lahko primeren za analizo

SNP (ang. single nucleotide polymorphism, slo. enojni nukleotidni polimorfizmi), ki jih lahko zaznamo z vnosom spremembe v crRNA zraven SNP in testiranjem vsake tarče s specifično in spremenjeno crRNA (Myhrvold in sod., 2018).



Slika 1: CRISPR/Cas-RT-RPA sistem za pomnoževanje in fluorescentno določanje RNA tarče. Z uporabo Cas12a, crRNA in ssDNA sonde tarčo lahko določimo v 1 uri (Li in sod., 2018).

Veliko prednost pred ostalimi metodami predstavlja tudi uporaba hitre »izolacije«, ki ne potrebuje zahtevne izolacije nukleinskih kislin, ki je velikokrat kritični korak pri določanju patogenov (Myhrvold in sod., 2018). Metoda CRISPR je tako v kombinaciji z RPA, ki ima glede na ostale načine predhodnega pomnoževanja najboljšo občutljivost, in kompatibilnimi hitrimi testi (ang. lateral flow assay, LFA), primerna tudi za uporabo na terenu. Sistem CRISPR/Cas-RPA kljub cenovno ugodni in hitri analizi (1 h) omogoča občutljivo določanje, ki je primerljivo s qPCR (ang. quantitative PCR) in ddPCR (ang. digital-droplet PCR) (Gootenberg et al., 2017).

Preglednica 1: Reprezentativne aplikacije določanja nukleinskih kislin s CRISPR/Cas13 in Cas12 proteini (povzeto po Wang et al., 2020).

Protein	Metoda	Nukleinska kislina	Pomnoževanje	Izotermalnost	Odčitavanje	Občutljivost*	Kvantifikacija	Čas	Prenosljivost	Referenca
Cas 13	SHERLOCK	RNA/DNA	RPA	DA	Fluorescenca	aM	NE	2 - 5 h	DA	Gootenberg in sod., 2017
	SHERLOCK v2	RNA/DNA	RPA	DA	Fluorescenca Kolorimetrični hitri testi	zM	DA	0,5 - 3 h	DA	Gootenberg in sod., 2018
	HUDSON + SHERLOCK	RNA/DNA	RPA	DA	Fluorescenca Kolorimetrični hitri testi	aM	NE	< 2 h	DA	Myhrvold in sod., 2018
Cas 12	DETECTR	DNA	RPA	DA	Fluorescenca	aM	NE	~1 h	DA	Chen in sod., 2018
	HOLMES	DNA/RNA	PCR	NE	Fluorescenca	aM	NE	~1 h	NE	Li in sod., 2018
	E-CRISPR	DNA	/	DA	Elektrokemija	pM	DA	~1 h	DA	Dai in sod., 2019
	HOLMESv2	DNA/RNA	LAMP	DA	Fluorescenca	aM	DA	~1 h	DA	Li in sod., 2019

*aM, ato (10^{-18}) molarno; zM, zepto (10^{-21}) molarno; pM, piko (10^{-15}) molarno

2.1 CRISPR/cas sistemi in viroidi

Viroidi so najmanjši in najenostavnejši rastlinski patogeni (246- 401 nt), ki se hitro širijo, tako med rastlinami istega gostitelja kot tudi med različnimi gostitelji (Flores in sod., 2005). Tako obstaja tveganje, da se zaradi zelo intenzivnega globalnega trgovanja z rastlinskim materialom lahko pojavijo nove viroidne bolezni, ki na nekem gostitelju ne kažejo bolezenskih znamenj, na drugem pa povzročijo pravo epidemijo (Hadidi in sod., 2017).

Viroidi so lahko prisotni v rastlinah, ki ne kažejo bolezenskih znamenj, in so pod mejo detekcije metod, ki so v rutinski uporabi. Optimizacija metod za določanje rastlinskih patogenov, kot so viroidi, je zelo zahtevna, vsaka kombinacija viroid-gostitelj je namreč specifična, prav tako viroidi po rastlini niso homogeno razporejeni, zato je zelo pomembno že samo vzorčenje. Njihova koncentracija se hitro spreminja in je zelo odvisna od vplivov okolja (Malfitano in sod., 2005; Mumford in sod., 2000). Za določanje viroidov v hmelju so najpogosteje v uporabi PAGE, dot-blot in RT-PCR. Omenjene metode omogočajo zanesljivo določanje, vendar so časovno obsežne, občutljive na inhibitorje in zdravju škodljive (Guček in sod., 2017). Za viroide v hmelju je bila nedavno razvita občutljivejša metoda RT-PCR v realnem času (RT-qPCR), ki omogoča sočasno določanje več tarč in kvantifikacijo (Guček, 2020). Zaradi številnih omejitev omenjenih metod velik potencial v diagnostiki viroidov predstavlja uporaba CRISPR sistema v kombinaciji s Cas proteini kot so Cas12a, Cas13a in Cas14 (Chen in sod., 2018;

Gootenberg in sod., 2017; Harrington in sod., 2018) ob predhodni namnožitvi tarče s PCR ali RPA. Metoda CRISPR je bila po naših podatkih za viroide razvita samo za ASSVd v jablani, ki v kombinaciji z RT-RPA omogoča vizualno določanje brez izolacije in drage opreme (Jiao in sod., 2020). ASSVd so določili na osnovi CRISPR/Cas12a-RT-RPA sistema in metodo razvili za določanje štirih virusov pri jablani. Z razvito metodo jim je uspelo določiti viruse in viroid neposredno iz ekstrakta listov v času manj kot ene ure (Jiao in sod., 2020).

3 ZAKLJUČEK

Na področju rastlinske virologije razvoj novih metod za določanje patogenov, zaradi specifičnih interakcij med rastlinami in patogeni, ne poteka tako hitro kot v humani diagnostiki. Pojav in razvoj bolezni rastlin lahko preprečimo oziroma omejimo z uporabo fitofarmaceutskih sredstev, vzgojo odpornih sort in zanesljivo diagnostiko. Obstajajo tudi povzročitelji bolezni kot so virusi in viroidi, ki lahko povzročijo neozdravljive bolezni. Za omejitev širjenja le-teh bolezni je ključna hitra in zanesljiva diagnostika. Ne glede na velik napredek pri določanju rastlinskih patogenov v zadnjih 50. letih, imajo metode, ki so v rutinski uporabi, še vedno številne omejitve, kot so cena, čas, oprema, zahtevno načrtovanje, posledično visoko usposobljen kader in vpliv inhibitorjev, kar pogosto vodi v neustrezne rezultate.

Velik potencial za določanje rastlinskih patogenov, kot so virusi in viroidi, predstavlja uporaba CRISPR sistema, ki omogoča ogromno različnih aplikacij. Do sedaj razvite metode CRISPR sistema se razlikujejo glede na uporabljene Cas proteine, analiziran vzorec (DNA/RNA), vrsto predhodnega pomnoževanja (PCR/RPA/LAMP), način detekcije (fluorescenca/hitri testi/elektrokemija), občutljivost (pM/aM/zM), možnost kvantifikacije, časovni obseg ter možnost uporabe na terenu. Metoda je kljub zelo veliki občutljivosti (aM, 10^{-18}) in specifičnosti, hitra, fleksibilna, robustna in preprosta za uporabo. Zaradi številnih prednosti zato ni nenavadno, da je bil v zadnjih petih letih CRISPR sistem razvit za določanje številnih patogenov, tako v humani kot rastlinski virologiji. V prihodnosti bodo različne aplikacije CRISPR sistema omogočale hitro in zanesljivo določanje rastlinskih patogenov in bodo znatno pripomogli k izboljšani sliki trajnostnega kmetijstva v svetu.

Zahvala. Avtorica se za finančno podporo zahvaljujem Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (raziskovalni program P4-0077).

4 VIRI

- Aman, R., Mahas, A., Marsic, T., Hassan, N., Mahfouz, M.M. "Efficient, Rapid, and Sensitive Detection of Plant RNA Viruses With One-Pot RT-RPA–CRISPR/Cas12a Assay." *Frontiers in Microbiology*. 2020; 11: 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.610872>.
- Broughton, J.P., Deng, X., Yu, G., et al. CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol*. 2020; 38(7): 870-874. doi:10.1038/s41587-020-0513-4
- Chen, J. in Doudna, J. The chemistry of Cas9 and its CRISPR colleagues. *Nat Rev Chem* 1. 2017; 0078. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0078>
- Chen, J.S., Ma, E., Harrington, L.B., Tian, X., Doudna, J.A. CRISPR-Cas12a target binding unleashes single-stranded DNase activity. *bioRxiv*. 2018; 1-5. doi:10.1101/226993
- Dai, Y., Somoza, R.A., Wang, L., et al. Exploring the Trans-Cleavage Activity of CRISPR-Cas12a (cpfl) for the Development of a Universal Electrochemical Biosensor. *Angew Chemie - Int Ed*. 2019; 58(48): 17399-17405. doi:10.1002/anie.201910772
- Flores, R., Hernández, C., Martínez de Alba, A. E., Daròs, J. A., Di Serio, F. "Viroids and viroid-host interactions." *Annual Review of Phytopathology*. 2005; 43: 117-139.
- Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Lee, J.W., et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science* (80-). 2017; 356(6336): 438-442. doi:10.1126/science.aam9321
- Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Kellner, M.J., Joung, J., Collins, J.J., Zhang, F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*. 2018; 360(6387), 439–444.
- Guček, T., Trdan, S., Jakše, J., Javornik, B., Matoušek, J., Radišek, S. Diagnostic techniques for viroids. *Plant Pathology*. 2017; 66(3): 339-358, doi: 10.1111/ppa.12624.
- Guček, T. *Biologija viroida razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) in razvoj metod za določanje viroidov v hmelju : doktorska disertacija = Biology of citrus bark cracking viroid (CBCVd) and development of methods for detection of viroids in hop : doctoral dissertation*. 2020. Ljubljana: [T. Guček], XIV, 139 str., [33] str. pril., ilustr. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=121584>.
- Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Semancik, J. *Viroids*. CSIRO Publishing, 2003, Collingwood, Australia.
- Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Palukaitis, P. *Viroids and Satellites*. Academic Press. 2017.
- Hammond, R.W. in Zhang, S. 2016. Development of a rapid diagnostic assay for the detection of tomato chlorotic dwarf viroid based on isothermal reverse-transcription-recombinase polymerase amplification. *J Virol Methods*. 236:62-67. doi:10.1016/j.jviromet.2016.06.013
- Harrington, L.B., Burstein, D., Chen, J.S., et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science*. (80-). 2018;362(6416): 839-842. doi:10.1126/science.aav4294
- IHPS. 2020. Končno poročilo s področja strokovnih nalog zdravstvenega varstva rastlin za leto 2019. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (Žalec).
- Ivanov, A. V., Shmyglya, I. V., Zherdev, A. V., Dzantiev, B.B., Safenkova, I. V. The challenge for rapid detection of high-structured circular rna: Assay of potato spindle tuber viroid based on recombinase polymerase amplification and lateral flow tests. *Plants*. 2020; 9(10): 1-11. doi:10.3390/plants9101369

- Jakše, J., Radišek, S., Pokorn, T., Matoušek, J., Javornik, B. "Deep-sequencing revealed Citrus bark cracking viroid (CBCVD) as a highly aggressive pathogen on hop." *Plant Pathology*, 2015; 64(4): 831-842. <https://doi.org/10.1111/ppa.12325>.
- Jiao, J., Kong, K., Han, J., et al. Field detection of multiple RNA viruses/viroids in apple using a CRISPR/Cas12a-based visual assay. *Plant Biotechnol J.* 2020; Published online:1-12. doi:10.1111/pbi.13474
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E. A. Programmable Dual-RNA – Guided. *Science*, 2012; 337: 816-822.
- Kappagantu, M., Villamor, D.E. V., Bullock, J.M., Eastwell, K.C. A rapid isothermal assay for the detection of Hop stunt viroid in hop plants (*Humulus lupulus*), and its application in disease surveys. *J Virol Methods.* 2017; 245: 81-85. doi:10.1016/j.jviromet.2017.04.002
- Lee, H.J., Kim, H.J., Lee, K., Jeong, R.D. Rapid detection of peach latent mosaic viroid by reverse transcription recombinase polymerase amplification. *Mol Cell Probes.* 2020; 53(May): 101627. doi:10.1016/j.mcp.2020.101627
- Li, S.Y., Cheng, Q.X., Li, X.Y., et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. *Cell Discov.* 2018; 4(1): 18-21. doi:10.1038/s41421-018-0028-z
- Li, L., Li, S., Wu, N., Wu, J., Wang, G., Zhao, G., Wang, J., HOLMESv2: a CRISPR-cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation. *ACS Synth. Biol.* 2019; (10): 2228–2237.
- Mahas, A., Hassan, N., Aman, R., et al. Lamp-coupled crispr–cas12a module for rapid and sensitive detection of plant dna viruses. *Viruses.* 2021; 13(3). doi:10.3390/v13030466.
- Malfitano M., Barone M., Duran-Vila N., Alioto D. Indexing of viroids in citrus orchards of Campania, Southern Italy. *Journal of Plant Pathology.* 2005; 87: 115-121.
- Mumford R.A., Walsh K., Boonham N. A comparison of molecular methods for the routine detection of viroids. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin.* 2000; 30: 431-435.
- Myhrvold, C., Freije, C.A., Gootenberg, J.S., et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science* (80-). 2018.; 360(6387): 444-448. doi:10.1126/science.aas8836
- Narayanasamy P. Detection of Viruses and Viroid Pathogens in Plants, *Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis: Viral and Viroid Pathogens*, 2011;. 3: 7-220.
- Sundaresan, R., Parameshwaran, H.P., Yogesha, S.D., Keilbarth, M.W., Rajan, R. RNA-Independent DNA Cleavage Activities of Cas9 and Cas12a. *Cell Rep.* 2017; 21(13): 3728-3739. doi:10.1016/j.celrep.2017.11.100
- Wang, M., Zhang, R., Li, J. CRISPR/cas systems redefine nucleic acid detection: Principles and methods. *Biosens Bioelectron.* 2020;165(July):112430. doi:10.1016/j.bios.2020.112430