

# CRISPR-Chip, ¿adiós definitivo a la amplificación para detectar genes diana?

Daniel Díaz Roblizo y Francisco José López Félix

**Resumen** — La detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos presentes en el genoma se ha convertido en una poderosa técnica de diagnóstico en las últimas décadas, debido al hallazgo de nuevos marcadores genéticos característicos de ciertas enfermedades. Los métodos de detección más usados a día de hoy requieren de equipamiento costoso y voluminoso, además de una previa amplificación del ADN muestreado, que alarga el tiempo de obtención de los resultados. Sin embargo, recientemente se ha desarrollado el CRISPR-Chip, un nuevo biosensor capaz de detectar secuencias específicas de nucleótidos en el genoma humano sin la necesidad de amplificar y en menos de 15 minutos, ya que cuenta con una sensibilidad de 1,7 femtomoles. Se trata de un transistor de efecto de campo basado en grafeno que aglutina la sensibilidad de este nanomaterial y la especificidad que otorga la capacidad de direccionamiento de la tecnología de repeticiones palindrómicas cortas (CRISPR, por sus siglas en inglés) mediante la proteína Cas9, desactivada catalíticamente y asociada a un ARN guía que la conduce específicamente a la secuencia de nucleótidos a detectar. De este modo, este nuevo biosensor, aún objeto de optimización, promete erigirse como un método de diagnóstico más rápido y barato que facilite en el ámbito clínico la detección de ciertas enfermedades.

**Palabras Claves** — Biosensor, CRISPR-Cas9, Distrofia Muscular de Duchenne, Grafeno, PCR.



## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el uso de la secuenciación del genoma completo (WGS) ha permitido la identificación de múltiples biomarcadores genéticos asociados a diversas patologías. Esto ha propiciado el desarrollo de nuevas herramientas moleculares cuyo fin es la detección de secuencias de ácidos nucleicos de interés [1], [2]; así como un mayor interés en la optimización de las técnicas ya existentes [3], dado que éstas en conjunción con los nuevos biomarcadores hallados suponen una mejora de los métodos diagnósticos existentes y abren la puerta a la medicina personalizada. Es decir, facilitan la detección de ciertas enfermedades en un paciente o el riesgo de padecerla en un futuro y, por ende, incrementa las posibilidades de superación de dichas enfermedades.

Recientemente el desarrollo de nuevos métodos de detección de ácidos nucleicos se ha cimentado en la revolucionaria tecnología CRISPR-Cas con objeto de mejorar las herramientas moleculares convencionales que abogan por dicho fin. Uno de ellos es la metodología SHERLOCK [1]. Esta metodología desarrollada en 2017 se basa en la conducción de la nucleasa Cas13a, mediante un ARN guía, hacia una secuencia de ARN diana con objeto de generar una señal fluorescente tras la hibridación entre el complejo Cas13a y dicha secuencia, previa amplificación de la secuencia diana por medio de la técnica recombinasa y polimerasa (RPA). Otra de estas nuevas metodologías, la metodología HOLMES, se desarrolló poco después. En 2018, Li et al. [2], desarrollaron esta nueva técnica que, a diferencia de la metodología SHERLOCK, emplea una nucleasa Cas12a que no requiere la necesidad de

conversión de ADN en ARN para detectar secuencias de ADN diana. Si bien es cierto que ambas metodologías se basan en un ARN guía fácilmente programable para mediar la detección de la secuencia diana, en ambos casos, al igual que con los métodos tradicionales de detección de ácidos nucleicos, se requiere de una previa amplificación de la secuencia diana.

Por lo tanto, estas nuevas metodologías de detección de secuencias de ácidos nucleicos de interés, así como las técnicas convencionales, siguen requiriendo mucho tiempo y son costosas de usar. Éstas requieren múltiples reacciones y reactivos, personal preparado y una instrumentación compleja como, en algunos casos, componentes ópticos que son caros y de gran tamaño, lo que dificulta la expansión de estas técnicas de detección en el ámbito clínico y, por ende, el avance de la prometedora medicina personalizada.

No obstante, en 2019 Hajian et al. [4] han logrado desarrollar un nuevo biosensor denominado CRISPR-Chip que aúna la tecnología CRISPR-Cas9 con el nanomaterial grafeno y que se erige como un dispositivo integrador que supera gran parte de las barreras actuales en este campo. Es decir, este biosensor combina la capacidad selectiva del sistema CRISPR-Cas9 con la potente sensibilidad del grafeno, lo que le otorga la capacidad de realizar una fácil, rápida y selectiva detección de la secuencia diana contenida en la muestra de ácidos nucleicos de interés sin necesidad de una previa amplificación de ésta. Su éxito ya es una realidad, ya que ha permitido la detección eficaz de casos de distrofia muscular de Duchenne (DMD), una enfermedad hereditaria con herencia de tipo recesiva y ligada al cromosoma X. Por tanto, dado que además se trata de un dispositivo móvil, estamos ante un

biosensor que promete revolucionar el campo de la medicina diagnóstica mediante la simplificación y comodidad que aporta.

## 2. ¿CÓMO FUNCIONA EL CRISPR-CHIP?

El CRISPR-Chip es un transistor de efecto de campo (gFET) compuesto por un sistema de tres terminales y un canal. Estos tres terminales consisten en un electrodo de fuente, un electrodo de drenaje y otro de puerta líquida, respectivamente. Así mismo, el canal consiste en un canal de grafeno, un nanomaterial muy sensible a la adsorción y a la interacción de las moléculas cargadas en su superficie, y que, por ende, presenta una capacidad conductora muy susceptible a cambios en el campo eléctrico [5], que lo hace ideal como canal emplazado entre los electrodos de fuente y drenaje del CRISPR-Chip (Figura 1). Los cambios en la conductividad de este canal se producen en función del campo eléctrico, y son los que hacen variar los flujos de corriente eléctrica que permiten discernir entre la presencia o ausencia de la secuencia de ácidos nucleicos de interés en la muestra analizada.

Para ello, sobre el grafeno se encuentran adheridos varios complejos CRISPR-cas9, caracterizados por la presencia de un ARN guía, complementario a la secuencia que se quiere detectar, que conduce al otro elemento del complejo, una nucleasa Cas9 cuya capacidad catalítica está desactivada (Cas9d), hacia dicha secuencia [6]. Esto permite la hibridación entre dicho ARN guía y la secuencia de interés y, por ende, la modulación de las características eléctricas del transistor y el consecuente cambio en la intensidad de la corriente que pasa por el canal, que es lo que permite en última instancia el reconocimiento de secuencias específicas en el genoma. Además, esta hibridación entre el ARN guía y la secuencia de ácidos nucleicos de interés cargada negativamente no solo causa un cambio en la conductividad del canal, sino que también desencadena la formación de una capa permeable de iones sobre la superficie del grafeno [4]. Esto genera una diferencia de concentración de iones entre la solución de la muestra y la capa permeable que, a su vez, genera un potencial de Donnan-Gibbs [7] que desencadena la alteración del campo eléctrico entre los electrodos de fuente y el de puerta líquida, lo que resulta en una modulación adicional de la corriente del canal de grafeno. Esto permite una detección muy fina, más allá de la longitud de cribado de Debye, es decir, sobrepasar la distancia sobre la cual puede ocurrir una separación significativa de carga.

Por otro lado, el electrodo de puerta líquida se encuentra en contacto con la muestra de ácidos nucleicos a analizar y tiene una importancia capital, ya que el voltaje aplicado en este electrodo controla la corriente eléctrica que fluye a través del canal entre el electrodo de fuente y el de drenaje.

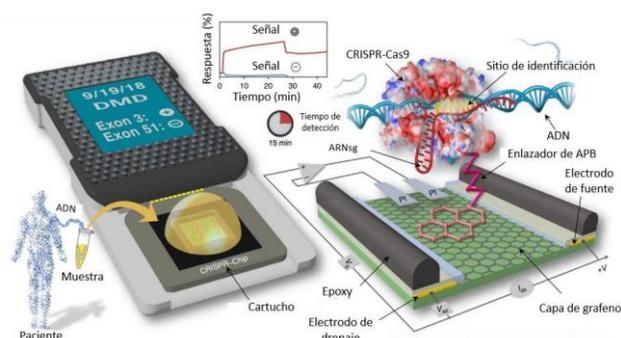


Fig. 1. Esquema del dispositivo CRISPR-Chip. Modificado de Hajian et al., 2019 [4].

Por último, el sensor que se ocupa de interpretar la respuesta dada por el Chip mide la intensidad de corriente existente entre los electrodos de fuente y de drenaje, y en base a ésta establece un porcentaje de respuesta de los complejos CRISPR-Cas9d hacia la muestra analizada. En concreto, el porcentaje es calculado atendiendo a la intensidad tras la adición de la muestra a analizar y a la intensidad obtenida tras la adición del tampón de ensayo tras la calibración del Chip. Estas mediciones se realizan tras la incubación a 37 °C del Chip con la muestra y tras un lavado con una solución de cloruro de magnesio que elimina todo el ADN no unido específicamente a los complejos CRISPR-Cas9d. Un mayor porcentaje de respuesta indica la presencia del gen de interés. De esta manera, se finaliza la detección de la secuencia de interés; un proceso que requiere finalmente sólo 15 minutos, 5 de incubación y 10 de lavado y medición [4].

## 3. PROCESO DE ADHESIÓN DE LOS COMPLEJOS CRISPR-CAS AL GRAFENO

La inmovilización del complejo CRISPR-Cas9d a la superficie del canal de grafeno es el paso más importante en el montaje del Chip, ya que del óptimo funcionamiento de este complejo depende la especificidad y capacidad de detectar la secuencia de ácidos nucleicos de interés. El primer paso para ello es la adición del ácido 1-pirenobutanoico (APB). Su anillo de pireno, de conformación tridimensional plana, interactúa electrostáticamente con el sistema de orbitales  $\pi$  del grafeno mediante el apilamiento aromático  $\pi - \pi$ , generando una unión no covalente entre el anillo aromático y la superficie de grafeno. A continuación, un grupo carboxilato presente en el extremo opuesto al grupo aromático del APB permite la formación de un enlace covalente con la enzima Cas9d, lo que permite la fijación del complejo CRISPR-Cas9d a la superficie del Chip. A su vez, los APBs cuyo grupo carboxilato quedan sin enlazar son bloqueados mediante su unión con amino-polietilenglicol 5-alcohol (PEG), impidiendo de este modo uniones inespecíficas con moléculas cargadas.

Finalmente, se añaden los ARN guías específicos de la secuencia a analizar y éstos se unen al Cas9d inmovilizado, terminando de este modo el proceso de fijación

del complejo CRISPR-cas9d a la superficie del grafeno (Figura 2) [4].

#### 4. APLICACIONES BIOMÉDICAS DEL CRISPR-CHIP

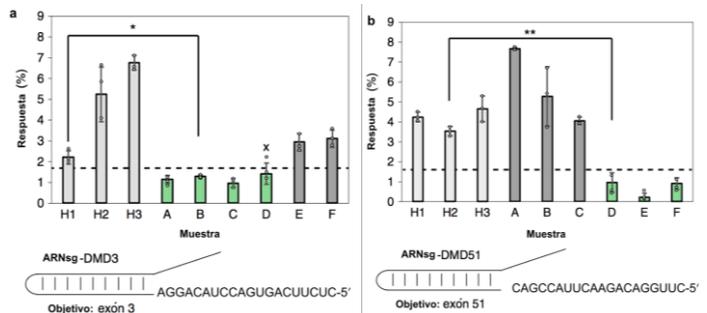
A pesar de que el CRISPR-Chip se trata aún de un prototipo, una de las principales bazas con las que cuenta es que su utilidad clínica se ha testado con éxito. En concreto, ha conseguido satisfactoriamente mostrar su capacidad para detectar mutaciones asociadas a la distrofia muscular de Duchenne, una enfermedad causada por una mutación que puede ocurrir en cualquiera de los 79 exones que presenta el gen de la distrofina, aunque normalmente consiste en grandes deleciones en los exones 2-10 y 45-55 [8].

Estas mutaciones resultan en la disfuncionalidad de la distrofina, lo que causa la degeneración progresiva del tejido muscular y, como consecuencia, complicaciones ortopédicas y respiratorias que conducen hacia una mayor mortalidad en pacientes con dicha enfermedad [9]. A día de hoy, para detectar estas mutaciones, al igual que con otras enfermedades hereditarias, se emplean metodologías que requieren la amplificación de ADN mediante PCR con objeto de detectar posteriormente deleciones conocidas en el gen de la distrofina, lo que dificulta la práctica rutinaria de estas técnicas diagnósticas en el ámbito clínico.

Urge por tanto la necesidad de un biosensor como el CRISPR-Chip, cuya habilidad para detectar las mutaciones asociadas a esta enfermedad fue evaluada usando dos Chips cuya diana, respectivamente, fueron los exones 3 y 51 del gen de la distrofina. Para ello, se usó material genómico procedente de varones con esta enfermedad con una gran deleción localizada en el exón 3 o 51. Así mismo, se usó material genómico de varones sanos y, por ende, sin la mutación en dichos exones. Satisfactoriamente, las réplicas testadas de ambos Chips lograron emitir una señal significativamente mayor en aquellas

que para la detección de estas deleciones requiso una cantidad ínfima de muestra genómica, comparable con la cantidad de material genómico que se puede extraer a partir de métodos simples bucales.

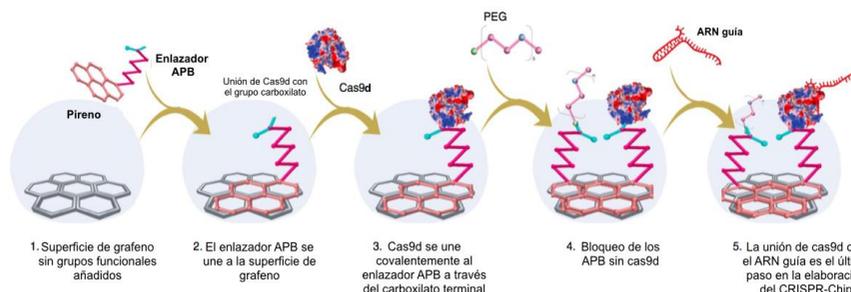
Estos resultados, por tanto, erigen al CRISPR-Chip como un nuevo biosensor capaz de facilitar una rápida y eficaz detección de mutaciones genéticas asociadas a enfermedades hereditarias, como la enfermedad de Huntington o la hemofilia, entre otras, y, que de esta manera, la medicina personalizada basada en la terapia génica sea una realidad en la clínica.



**Fig. 3.** Análisis de la respuesta del CRISPR-Chip ante muestras de individuos sanos (H1-H3) y de pacientes con DMD, con deleción en el exón 3 (A-C) o en el exón 51 (D-F) del gen de la distrofina. En la Fig. 3 (a) se representa la respuesta a la presencia del exón 3, donde D representa un falso negativo confirmado con secuenciación. En la Fig. 3 (b) se representa la respuesta a la presencia del exón 51. Modificado de Hajian et al., 2019 [4].

#### 5. CARENCIAS DEL CRISPR-CHIP

No obstante, no es oro todo lo que reluce. El biosensor CRISPR-Chip sigue necesitando, al igual que otras metodologías, la previa purificación de las muestras genómicas a analizar, es decir, el dispositivo aún no integra las herramientas necesarias para ello. Sin embargo, esto no supone un grave inconveniente, ya que existen métodos rápidos y portátiles de purificación de ADN [10], aunque abre la posibilidad a la optimización del CRISPR-



**Fig. 2.** Esquema de la adhesión complejo CRISPR-CAS9d al canal de grafeno. Modificado de Hajian et al., 2019 [4].

muestras analizadas que contenían los exones diana 3 o 51 con respecto a las muestras genómicas analizadas que carecían de alguno de estos exones (Figura 3), resultando, además, útil para análisis cuantitativos [4]. Todo ello, sin necesidad de amplificar las muestras de ADN analizadas, lo que pone de manifiesto la gran ventaja que aporta este biosensor en el ámbito clínico, su alta sensibilidad, dado

Chip para que éste también integre dicha tecnología y facilitar en mayor medida su uso rutinario en el ámbito clínico.

Por otro lado, uno de los principales retos que aún tiene que superar el CRISPR-Chip es la detección con eficacia de enfermedades infecciosas, ya que en estos casos el número de copias de la secuencia de ácidos nu-

cleicos a detectar suele ser muy bajo *in vivo* [4]. Sin embargo, el CRISPR-Chip tiene potencial para superar este reto. Esto es debido a que la especificidad del biosensor es objeto de mejora mediante un incremento en la densidad de las nucleasas Cas9d en la superficie de grafeno, así como a la posibilidad de optimizar el canal geométrico de grafeno junto con la adición de moléculas cargadas, como el azul de metileno, después del paso final de lavado. Esto en su conjunto podría incrementar la respuesta del Chip a bajas concentraciones de la secuencia diana.

Así mismo, otra carencia, a priori, del CRISPR-Chip, debido a que emplea la nucleasa Cas9, es su limitación a detectar secuencias de ADN y no de ARN. Sin embargo, esto se puede solucionar mediante el uso de otras nucleasas más óptimas como las Cas13a [1], lo que permitiría expandir su potencial diagnóstico. Pero sin lugar a duda, la mayor carencia actual de este biosensor es su capacidad de detectar polimorfismos de un único nucleótido, la cual está aún por explotar y es lo que expandiría significativamente su aplicación clínica en un futuro.

## 6. CONCLUSIONES

El dispositivo CRISPR-Chip aglutina la nueva tecnología basada en el complejo enzimático CRISPR-Cas y el revolucionario nanomaterial grafeno. Es decir, aún la capacidad selectiva de la tecnología CRISPR-Cas y la alta sensibilidad de detección de biomoléculas que caracteriza a los gFETs. Esto ha derivado en el desarrollo de una potente metodología diagnóstica que apunta a revolucionar la medicina diagnóstica y a permitir el acercamiento de la terapia génica a la clínica, lo que, a su vez, pone de manifiesto las ventajas de aplicar nanomateriales en este campo, así como las múltiples aplicaciones de la tecnología CRISPR-Cas.

Su éxito en la detección de deleciones diana en el ADN de pacientes con DMD sin necesidad de ningún paso previo de amplificación del ADN es prueba de ello. No obstante, esto solo es el comienzo. Las posibilidades de detectar unas u otras dianas específicas son múltiples, dada la versatilidad del sistema CRISPR-Cas, que simplemente requeriría para cada caso la modificación de la secuencia de 20 nucleótidos que se encuentra en la región 5' terminal del ARN guía que forma parte del dispositivo.

Además, la sensibilidad que otorga el nanomaterial grafeno supone la gran ventaja de prescindir de la amplificación de las muestras de ácidos nucleicos a analizar, bastándole el ADN genómico extraído mediante hisopos bucales, y permitiendo, a su vez, disminuir el umbral de cantidad mínima de ADN capaz de ser detectada con respecto a métodos de detección desarrollados con anterioridad que no requieren de amplificación [9].

Si bien es cierto que existen otros métodos con mayor sensibilidad, basados en la resonancia de plasmón de superficie [11], el dispositivo móvil CRISPR-Chip no requiere ni un equipamiento óptico voluminoso ni de múltiples reactivos, sino que únicamente precisa de un lector portátil digital y un tampón de reacción. No ob-

stante, el CRISPR-Chip aún se trata de un prototipo que requiere la optimización necesaria para resolver algunas de sus carencias previamente comentadas y que impulsen de manera definitiva su uso en el ámbito clínico. Sin embargo, presenta la materia prima necesaria para consolidarse entre los distintos métodos de detección de genes diana como el más cómodo y plausible de en un futuro contribuir a un diagnóstico rápido y eficaz de enfermedades hereditarias, entre otras múltiples aplicaciones.

## REFERENCIAS

- [1] Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Lee, J.W., et al. (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 356 (6336), 438-442. DOI: 10.1126/science.aam9321.
- [2] Li, S.Y., Cheng, Q.X., Wang, J.M., et al. (2018). CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. *Cell Discov.*, 4, 20. DOI: 10.1038/s41421-018-0028-z.
- [3] Lei, C., Xingye, C., Jie H., et al. (2016). Advances in digital Polymerase Chain Reaction (dPCR) and its Emerging Biomedical Applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 90, 459-474. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.082>.
- [4] Hajian, R., Balderston, S., Tran, T., et al. (2019). Detection of unamplified target genes via CRISPR-Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor. *Nature Biomedical Engineering*. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0371-x>.
- [5] Georgakilas, V., Tiwari, J.N., Kemp, K.C., et al. (2016). Non-covalent functionalization of graphene and graphene oxide for energy materials, biosensing, catalytic, and biomedical applications. *Chem. Rev.*, 116 (9), 5464-5519. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00620.
- [6] Sternberg, S.H., Redding, S., Jinek, M., et al. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490), 62-7. DOI: 10.1038/nature13011.
- [7] Ohshima, H. and Ohki, S. (1985). Donnan potential and surface potential of a charged membrane. *Biophys. J.*, 47(5), 673-678. DOI: 10.1016/S0006-3495(85)83963-1..
- [8] Aartsma-Rus, A., Ginjaar, I.B., Bushby, K. (2016). The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet.*, 53(3), 145-151. DOI: 10.1136/jmedgenet-2015-103387.
- [9] Bao, P., Huber, M., Wei, T.F., et al. (2005). SNP identification in unamplified human genomic DNA with gold nanoparticles probes. *Nucleic Acid Res.*, 33(2), e15. DOI: 10.1093/nar/gni017.
- [10] Rodríguez, N.M., Wong, W.S., Liu, L., et al. (2016). A fully integrated paperfluidic molecular diagnostic chip for the extraction, amplification, and detection of nucleic acids from clinical samples. *Lab Chip.*, 16(4), 753-63. DOI: 10.1039/c5lc01392e.
- [11] Ermini, M.L., Mariani, S., Scarano, S., et al. (2013). Direct detection of genomic DNA by surface plasmon resonance imaging: an optimized approach. *Biosens Bioelectron*, 40(1), 193-9. DOI: 10.1016/j.bios.2012.07.018.



**Daniel Díaz Roblizo**, recibió el título de Graduado en Biología por la Universidad de Sevilla en 2018. Actualmente es estudiante del primer curso del Máster de Biotecnología Sanitaria impartido por la Universidad Pablo de Olavide, especializándose en la rama de Nuevos Fármacos.



**Francisco José López Félix**, obtuvo el título de Graduado en Biotecnología por la Universidad de Cádiz en 2018. Actualmente es estudiante del primer curso del Máster de Biotecnología Sanitaria impartido por la Universidad Pablo de Olavide, especializándose en la rama de Nuevos Fármacos.