



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA – PPGBIOTEC



DANIELE SOUSA MOTA

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Cas13a DE *Leptotrichia wadeii* E
ANÁLISE DE SUA APLICABILIDADE PARA DETECÇÃO DE
Plasmodium vivax E VÍRUS ZIKA**

MANAUS-AM

2020

DANIELE SOUSA MOTA

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Cas13a DE *Leptotrichia wadeii* E
ANÁLISE DE SUA APLICABILIDADE PARA DETECÇÃO DE
Plasmodium vivax E VÍRUS ZIKA**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Saúde.

ORIENTADOR: Dr. LUIS ANDRÉ MORAIS MARIÚBA

MANAUS – AM

2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M917p Mota, Daniele Sousa
Produção e purificação da proteína Cas13a de *Leptotrichia wadeii*
e análise de sua aplicabilidade para detecção de *Plasmodium vivax*
e vírus Zika / Daniele Sousa Mota. 2020
73 f.: il. color; 31

Orientador: Luis André Morais Mariúba
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Crispr. 2. Cas13a. 3. *Plasmodium vivax*. 4. vírus Zika. 5.
diagnóstico. I. Mariúba, Luis André Morais II. Universidade Federal
do Amazonas III.

DEDICATÓRIA

*À Deus, por estar sempre presente em
todos momentos da minha vida;
À minha querida mãe, Dinalva Mota,
pela educação, compreensão e pelo
exemplo de força e determinação;
Ao meu orientador, Dr. Luis André Mariúba,
pela paciência, dedicação e ensinamentos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao meu Deus por me conceder saúde, força, coragem e sabedoria para alcançar os meus objetivos e superar os obstáculos durante essa caminhada;

Agradeço também à minha família pelo amor, incentivo, compreensão nas ausências e pelo apoio incondicional. Em especial à minha mãe, que nunca mediu esforços para que eu tivesse a melhor formação possível, sempre me incentivando e apoiando.

Ao meu orientador, Dr. Luis André Morais Mariúba, que aceitou me orientar e pela oportunidade dada de ingressar em seu grupo de pesquisa. Obrigada professor, pelos seus ensinamentos, disposição, paciência e pela confiança em mim investida;

Aos meus amigos, Jéssica, Jander e Antônio, obrigada pela prontidão em querer ajudar, pelo incentivo e torcida sincera por minha conquista.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Jeniffer, Walter, Késsia, Natália, Edilene, Gabriela, Adélia, Juliane, André Luis, Raquel, Yuri, Jordan e Victor. Obrigada por todos os ensinamentos, reagentes, bancadas e conversas compartilhadas;

Aos meus amigos de pós-graduação: Samara, Lucas, Luana, Whendel, Regiane, Lorena, Natasha e Diego, pelo compartilhamento de conhecimento, pelas risadas, pelos momentos de descontração e lanches nas horas apropriadas;

Aos meus amigos de coração, Thiago, Ana Paula, Welton e Flávio, que mesmo estando longe nunca deixaram de me apoiar e sempre me davam palavras de força quando eu mais precisava. Agradeço o apoio, torcida e preocupação de vocês, não tenho palavras para descrever o tamanho da minha gratidão.

Aos meus amigos do Laboratório de Biodegradação (UFAM) pelo aprendizado, incentivo e companheirismo durante o primeiro ano de mestrado, em especial, a minha amiga Sam por todos os conselhos e conversas agradáveis.

Ao Laboratório de Purificação de Biomoléculas (UFAM) e ao Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde - CEBio (FIOCRUZ-RO), pelo suporte necessário para realização das etapas de purificação da proteína que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço principalmente ao técnico Júlio Nino (Ufam), por sua compreensão, rapidez e eficiência;

À Universidade Federal do Amazonas e ao PPG-BIOTEC pela oportunidade e conhecimentos adquiridos ao longo do curso;

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD / FIOCRUZ Amazônia) pela infraestrutura e amparo que permitiram a realização desta pesquisa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo para realização deste trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelo auxílio financeiro à execução desse projeto;

E, por fim, a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, participaram desta jornada para que este trabalho fosse desenvolvido.

Meus sinceros agradecimentos!

“Não é sobre vencer, é sobre não desistir. Se você tem um sonho, lute por ele. Existe uma disciplina para paixão, e não é sobre quantas vezes você é rejeitado, ou quantas vezes você caiu e foi derrotado, é sobre quantas vezes você se levantou com coragem e seguiu em frente.”

(Lady Gaga, 2019)

RESUMO

As doenças infecciosas continuam sendo um grande problema de saúde no mundo, fazendo parte de maneira significativa dos dados de morbimortalidade. O reconhecimento precoce destas enfermidades, através do uso de testes para diagnóstico rápidos e precisos, agilizam o tratamento do paciente, permitindo assim um melhor atendimento clínico. A malária e a febre do vírus Zika (ZIKV) são doenças infecciosas típicas das regiões tropicais do mundo, como a Amazônia brasileira. As ferramentas tradicionais para identificação dessas doenças possuem desvantagens que limitam a detecção, como baixa especificidade e sensibilidade. Logo, a busca de novos métodos capazes de superar estas dificuldades vem sendo almejada por muitos grupos de pesquisa públicos e privados. Neste campo, o sistema CRISPR-Cas vem ganhando destaque nos últimos 5 anos, contribuindo para importantes avanços no desenvolvimento de técnicas para detecção precisa de alvos moleculares. O objetivo geral deste trabalho foi realizar a expressão e purificação da proteína do sistema CRISPR-Cas13a, chamada LwCas13a, assim como validar sua atividade enzimática aplicando ferramentas para o diagnóstico de malária causada por *Plasmodium vivax* e para Zika vírus. Como resultados, obtivemos com sucesso a expressão e purificação da proteína recombinante LwCas13a, produção de CRISPR RNA (crRNA) e de RNA alvo sintético (ssRNA) específicos para *Plasmodium vivax* e ZIKV. Quais observamos reatividade da enzima LwCas13a com uma elevação da intensidade de fluorescência à medida que se aumentava as concentrações de ssRNA no sistema. Uma relação inversamente proporcional foi observada quando dsDNA foi utilizado. As amostras clínicas de pacientes infectados com ZIKV apresentaram reatividade positiva utilizando o método descrito. Não foram obtidos resultados satisfatórios para o diagnóstico de malária por *P. vivax* utilizando as ferramentas produzidas. Trabalhos futuros serão aplicadas as ferramentas produzidas a um N amostral maior de pacientes infectados por ZIKV e novos alvos moleculares que permitam a detecção eficiente *Plasmodium vivax* utilizando o sistema CRISPR-Cas13a.

Palavras-chaves: Crispr; Cas13a; *Plasmodium vivax*; vírus Zika; diagnóstico.

ABSTRACT

Infectious diseases remain a major health problem in the world, making a significant part of the morbidity and mortality data. The early recognition of these diseases, through the use of rapid and accurate diagnostic tests, speeds up the treatment of the patient, thus allowing for better clinical care. Malaria and Zika virus fever (ZIKV) are infectious diseases typical of tropical regions of the world, such as the Brazilian Amazon. Traditional tools for identifying these diseases have disadvantages that limit detection, such as low specificity and sensitivity. Therefore, the search for new methods capable of overcoming these difficulties has been pursued by many public and private research groups. In this field, the CRISPR-Cas system has been gaining prominence in the last 5 years, contributing to important advances in the development of techniques for the accurate detection of molecular targets. The general objective of this work was to perform the expression and purification of the protein of the CRISPR-Cas13a system, called LwCas13a, as well as to validate its enzymatic activity using tools for the diagnosis of malaria caused by *Plasmodium vivax* and for Zika virus. As a result, we successfully obtained the expression and purification of the recombinant protein LwCas13a, production of CRISPR RNA (crRNA) and synthetic target RNA (ssRNA) specific for *Plasmodium vivax* and ZIKV. Which we observed reactivity of the enzyme LwCas13a with an increase in fluorescence intensity as the ssRNA concentrations in the system increased. An inversely proportional relationship was observed when dsDNA was used. Clinical samples from patients infected with ZIKV showed positive reactivity using the method described. No satisfactory results were obtained for the diagnosis of *P. vivax* malaria using the tools produced. Future work will apply the tools produced to a larger sample of patients infected by ZIKV and new molecular targets that allow efficient detection of *Plasmodium vivax* using the CRISPR-Cas13a system.

Keywords: Crispr; Cas13a; *Plasmodium vivax*; Zika virus; diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo de imunidade adaptativa CRISPR/Cas	24
Figura 2: Ilustração esquemática da plataforma de detecção HOLMES	27
Figura 3: Ilustração esquemática de teste de diagnóstico rápido associado HUDSON e SHERLOCK	28
Figura 4: Mapa do vetor de expressão pC013 - huLwCas13a com o gene LwCas13a.....	38
Figura 5: Análise das diferentes condições de indução da proteína LwCas13a.....	51
Figura 6: Análise em gel SDS-PAGE 12% da expressão de LwCas13a induzida com 0,5 mM de IPTG à 21°C por 16 horas	52
Figura 7: Análise da purificação da proteína recombinante LwCas13a.....	53
Figura 8: SDS-PAGE 12% da purificação por cromatografia gel filtração.	54
Figura 9: Qualidade do crRNA em SDS-PAGE 12% corado com nitrato de prata.....	55
Figura 10: Análise por eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de amplificação por PCR de dsDNA.....	56
Figura 11: Qualidade do RNA alvo em SDS-PAGE 12% corado com nitrato de prata.	56
Figura 12: Medição cinética por fluorescência da atividade de LwCas13a utilizando concentrações diferentes de RNA alvo pré amplificado.	57
Figura 13: Medição cinética por fluorescência da atividade de LwCas13a utilizando diferentes concentrações de cDNA pré amplificado no ensaio com transcrição pela T7.	58
Figura 14: Medição cinética por fluorescência da atividade de LwCas13a utilizando amostras clínicas pré amplificadas.	59
Figura 15: Qualidade do crRNA em SDS-PAGE 12% corado com nitrato de prata.	60
Figura 16: Análise por eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de amplificação por PCR de dsDNA de malária.....	61
Figura 17: Medição cinética por fluorescência da atividade de LwCas13a utilizando concentrações diferentes de mRNA de <i>P. vivax</i>	62

LISTA DE QUADROS

Tabela 1: Oligonucleotídeos para construção do RNA guia (crRNA) para vírus ZIKV	43
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para amplificar o fragmento do sequenciais específicas de ZIKV	44
Tabela 3: Oligonucleotídeos para construção do RNA guia (crRNA) para <i>P. vivax</i>	45
Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados para amplificar o fragmento do sequenciais específicas de <i>P. vivax</i>	46

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
CAS	Proteína associada a CRISPR
cDNA	DNA complementar ao mRNA
CRISPR	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas com Intervalos Regulares
crRNA	RNA guia
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo Trifosfato
DO	Densidade óptica
dsDNA	DNA de dupla fita
HEPES	Ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1
IPTG	Isopropílico β-D-1-thiogalactopyranoside
Kb	Quilobase
kDa	Quilodáton
LB	Meio Luria-Bertani
LwaCas13a	Plasmídeo <i>Leptotrichia wadei</i> Cas13a
Mg²⁺	Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanometro
°C	Graus Celsius
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
Pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
Primer	Oligonucleotídeo iniciador
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcriptase Reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
ssRNA	RNA de fita simples
TAE	Tris-acetate-EDTA
TEMED	N, N, N', N' tetrametilenodiamina
VC	Volume de coluna

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
3. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivo geral:.....	35
3.2. Objetivo específicos:.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1. Fluxograma.....	37
4.2. Considerações éticas da pesquisa.....	37
4.3. Linhagens bacterianas	37
4.4. Plasmídeo... ..	38
4.5. Obtenção do plasmídeo pC013-huLwCas13a	39
4.5.1. Preparo de célula competente <i>E. coli</i> TOP 10	39
4.5.2. Transformação bacteriana de <i>E. coli</i> TOP 10	39
4.5.3. Extração de DNA plasmidial	40
4.6. Obtenção da proteína recombinante LwCas13a	40
4.6.1. Escolha da melhor linhagem bacteriana	40
4.6.2. Ensaio de expressão da proteína recombinante.....	40
4.6.3. Lise bacteriana e análise da expressão proteica em gel de SDS-PAGE	41
4.6.4. Purificação da proteína recombinante	42
4.6.5. Análise por “Western Blot”	43
4.7. Construção das sondas para ZIKV	43
4.7.1. Preparação para RNA guia (crRNA)	43
4.7.2. Preparação do RNA alvo (ssRNA)	44
4.8. Construção das sondas para <i>Plasmodium vivax</i>	45
4.8.1. Preparação para o RNA guia (crRNA)	45
4.8.2. Preparação do RNA alvo (ssRNA)	46
4.9. Detecção colateral da Cas13a	47
5. RESULTADOS	49
5.1. Obtenção da proteína recombinante LwCas13a	50
5.1.1. Ensaio de indução da proteína recombinante LwCas13a.....	50
5.1.2. Purificação da proteína recombinante LwCas13a	52
5.2. Obtenção das ferramentas para detecção de ZIKV	54

5.2.1. RNA guia (crRNA).....	54
5.2.2. dsDNA alvo.....	55
5.2.3. RNA alvo (ssRNA).....	56
5.3. Otimização dos ensaios para ZIKV	57
5.3.1. Detecção utilizando ssRNA	57
5.3.2. Detecção utilizando dsDNA	58
5.3.3. Detecção utilizando amostras clínicas	58
5.4. Obtenção das sondas para malária <i>vivax</i>	59
5.4.1. RNA guia (crRNA)	59
5.4.2. RNA alvo (ssRNA)	60
5.5. Otimização dos ensaios para malária	61
5.5.1. Ensaios de detecção com alvos de malária <i>vivax</i>	61
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÕES.....	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1. INTRODUÇÃO

Entre os muitos desafios à saúde, as doenças infecciosas, sem dúvida, destacam-se por sua capacidade de causar morbimortalidade nos países em desenvolvimento (LEE et al., 2010). Embora as doenças infecciosas possam se iniciar em uma região específica, elas podem se espalhar rapidamente a qualquer momento devido a expansão geográfica das populações humanas através da facilidade de viajar de uma parte do mundo para outra (JONES et al., 2008; MAY; GUPTA; MCLEAN, 2001). Uma chave para combater essa disseminação é o desenvolvimento de diagnósticos que possibilitem a detecção rápida e precisa do agente infeccioso para o melhor atendimento clínico e outras medidas de saúde pública para limitar a disseminação da doença (RAY; GHEDIN; CHUNARA, 2016).

Atualmente, os métodos de diagnóstico convencionais para detecção de doenças infecciosas, incluem cultura celular, microscopia, imunoensaios, bem como as estratégias de reação em cadeia da polimerase (PCR) (HAUCK et al., 2010). Durante décadas, a abordagem de cultura celular foi a estratégia mais comumente utilizada para a detecção causadas por doenças bacterianas, pelo qual os microrganismos eram cultivados em meio de crescimento, seguido de observação a olho nu ou por microscopia, sendo esta observação baseada na forma, tamanho e cor da colônia formada (LELAND; GINOCCHIO, 2007). A microscopia, por sua vez, possui a capacidade de reconhecer e detectar diretamente os agentes patogênicos de amostras dos pacientes sem a necessidade do processo de cultura (ARIAS et al., 2007). Alternativamente, os imunoensaios tem sido amplamente empregado para detectar a resposta imune específica de um patógeno desencadeada no hospedeiro. Entre esses métodos baseados em imunologia, os ensaios imunoabsorção enzimática (ELISA), imunoensaios fluorescentes, radioimunoensaios (RIA), imunoensaios de fluxo lateral, entre outros, foram desenvolvidos para o diagnóstico de doenças infecciosas (BAR-HAIM et al., 2019; JANI et al., 2002). Há pouco tempo, a reação em cadeia de polimerase (PCR) tem sido a técnica comumente utilizada para amplificar RNA ou DNA para detecção de patógenos, além disso, três outras abordagens baseadas em PCR foram desenvolvidas para o diagnóstico de doenças infecciosas, incluindo a PCR multiplex, PCR de transcriptase reversa e PCR em tempo real (HAUCK et al., 2010).

Embora essas técnicas de diagnóstico convencionais contribuam significativamente para detecção de patógenos, promovam a prevenção e tratamento de diversas doenças infecciosas, elas apresentam diversas limitações como serem onerosas, sensibilidade e especificidade variadas, além de exigir infraestrutura substancial e técnicos qualificados

(WANG et al., 2017). Portanto, há necessidade em desenvolver novas ferramentas de diagnóstico com características que incluem especificidade, sensibilidade, precisão, velocidade, reprodutibilidade, facilidade de uso, requisitos de infraestrutura e custo para impedir a disseminação, garantir a saúde pública e promover o tratamento de doenças infecciosas.

Recentemente, o entendimento aprimorado da estrutura e função das repetições palindrômicas curtas regularmente inter-espaçadas (CRISPR) e das proteínas associadas a CRISPR (Cas) resultou na rápida expansão de pesquisas e inovações biotecnológicas, com um grande potencial no campo de diagnóstico de doenças infecciosas. (BHATTACHARYYA; THAKKU; HUNG, 2018; TANG; FU, 2018). Aplicações mais recente utilizando as proteínas efectoras do tipo VI-A, conhecida por Cas13a, foram aproveitadas devido suas propriedades que permitem clivagem colateral para o desenvolvimento de diagnósticos de doenças infecciosas (ABUDAYYEH et al., 2016).

Entre essas aplicações, um novo método denominado de SHERLOCK (Specific High Sensitivity Enzymatic Report Unlocking), utiliza a amplificação isotérmica dos ácidos nucleicos e atividade de RNase da proteína Cas13a, permitindo a detecção precisa de moléculas de DNA e RNA. A utilização da amplificação isotérmica por RPA garante o acúmulo de moléculas alvos, enquanto Cas13a atua no reconhecimento deste alvo. Quando a Cas13a combinada ao RNA guia (crRNA) interage com RNA alvo, a proteína ativa sua clivagem “colateral” de moléculas inespecíficas de RNAs vizinhos. Ao adicionar RNA repórter marcado com fluorescência, foi possível determinar a atividade da Cas13a quando a sequência alvo estava sendo detectada no ensaio, mesmo em baixíssimas concentrações (GOOTENBERG et al., 2017; KELLNER et al., 2019).

Embora tenha sido demonstrado o uso de SHERLOCK na detecção de isolados laboratoriais do vírus da dengue, zika e febre amarela (GOOTENBERG et al., 2017, 2018), não há resumos na literatura referentes a aplicação dessa tecnologia no diagnóstico clínicos de doenças endêmicas da região amazônica brasileira. As condições nessa região são favoráveis à transmissão de inúmeras doenças infecciosas, muitas delas são doenças bem conhecidas, enquanto outras, estão sendo descobertas regularmente na região (TAUIL, 2009). Nesse contexto, a malária é a doença endêmica mais importante da região devido à sua alta incidência. Segundo dados da OMS, cerca de 228 milhões de casos e 405 mil mortes em todo o mundo foram relatados em 2018. Mais de 40% dos casos relatados de malária na América do Sul ocorreram no Brasil e, mais de 99% de todos os casos registrados estavam concentrados na região amazônica, sendo o *Plasmodium vivax* a espécie predominante, atingindo 90% do total

de casos de malária na região (OMS, 2019, 2018, 2017). Várias abordagens foram desenvolvidas para diagnosticar malária, incluindo detecção por gota espessa e os testes rápidos (RDT) que são comumente utilizados para diagnosticar infecções causadas por malária *vivax*, porém estes métodos possuem menos sensibilidade para detectar casos com baixas parasitemias, causando atrasos no tratamento (PILLAY et al., 2019). Algumas décadas atrás, a PCR foi demonstrada como o método mais eficiente para a detecção de malária com baixos níveis de parasitas. No entanto, precisa de habilidades operacionais complicadas e equipamentos caros que geralmente não estão disponíveis em regiões com poucos recursos (BAIRD et al., 2016; ESHEL et al., 2017).

Um outro exemplo de doença endêmica, que foi recentemente introduzida na região, é a febre do vírus Zika (ZIKV). Desde 2015, o Brasil está em destaque na transmissão de ZIKV, especialmente quando a epidemia dessa doença foi seguida por surtos de microcefalia em recém-nascidos. O ZIKV se espalhou rapidamente pelo país e obteve o maior número de casos relatados no mundo com mais de 236 mil até o final de 2016 (OMS, 2017). Várias plataformas estão disponíveis para o diagnóstico de ZIKV, no entanto, as abordagens sorológicas padrão, com detecção de anticorpos, são limitadas devido à reatividade cruzada com outros flavivírus, como o vírus da dengue, gerando resultados inespecíficos. Portanto, o diagnóstico preciso requer métodos de detecção baseados em amplificação molecular de ácidos nucleicos, como a RT-PCR. Ainda que seja considerado o “padrão ouro” para detecção de ZIKV, essas técnicas são relativamente caras, exigem conhecimento técnico para executar, tempo para resultados relativamente altos e equipamentos especializados, que nem sempre estão disponíveis em institutos com recursos limitados (MAUK et al., 2017; PLOURDE; BLOCH, 2016).

Com base nessas características, o presente trabalho buscou obter uma proteína recombinante LwCas13a e moléculas de crRNA e ssRNA que pudessem ser aplicadas como ferramentas de diagnóstico para malária *vivax* e vírus Zika, além de avaliar amostras a partir de ensaios fluorimétricos. Acreditamos que nossos dados fornecerão uma base para o desenvolvimento de novas técnicas moleculares mais rápidas, específicas e sensíveis para o diagnóstico de doenças infecciosas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

GMR

Ribeirão Preto, 05/02/2020.

Dear Luis André Morais Mariúba,

Your paper **“CRISPR/Cas Class 2 systems and their applications in biotechnological processes”**, **GMR18478** was accepted for publication in the journal Genetics and Molecular Research. We will now prepare a pdf of the draft version, which you should review carefully and return in order to ensure timely publication.

Sincerely,



Francisco Alberto de Moura Duarte
Editor

1 **CRISPR/Cas Class 2 systems and their applications in biotechnological**
2 **processes**

3
4
5
6 **D. S. Mota ¹, J. M. Marques¹, J. M. Guimarães¹ and L. A. M. Mariúba*²**
7

8
9
10 ¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
11 Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil
12 ²Núcleo de Inovação Tecnológica
13 Instituto Leônidas & Maria Deane – Fiocruz Amazônia, Manaus, AM, Brasil
14

15
16
17 *Corresponding author:
18 E-mail: lamariuba@hotmail.com
19

20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

39 ABSTRACT

40 Since 2012, CRISPR/Cas technologies have revolutionized the field of modern molecular
41 biology and biotechnology due to their ability to direct a Cas nuclease to cleave specific
42 nucleic acid sequences with a guide RNA (crRNA), providing dynamic tools for many
43 applications, being naturally derived from the adaptive immune system of prokaryotes. The
44 most widely used toolbox for genome editing, modulation, and detection contains types II, V
45 and VI of class 2 systems, categorized and characterized by Cas9, Cas12, and Cas13,
46 respectively. In recent years, given the wide application of Class 2 CRISPR-Cas systems as
47 molecular tools, there has been a focus on the discovery, characterization, and specificity of
48 Cas effector nucleases from these systems, generating even more possibilities for the
49 development of new applications. We reviewed the scientific literature on current knowledge
50 of CRISPR-Cas systems and recent advances in biotechnology involving class 2 systems
51 between 2000 and 2019. For this, we searched for original articles indexed in the following
52 databases: PubMed, Scopus, SciELO, Periodicos Capes and Google Scholar, and used
53 keyword combinations such as “CRISPR / Cas Class 2 systems”, “Cas9”, “Cas12”, “Cas13”,
54 “Genome editing” and “diagnostic detection”. Eighty original articles were obtained, 55 of
55 them were selected for this review because they match with the keywords and the years of
56 publication.

57 **Keywords:** Gene editing; RNA cleavage; Biotechnological tools

58 INTRODUCTION

59 Bacteria and archaea domains have developed different defense mechanisms against foreign
60 nucleic acids derived from bacteriophages and mobile genetic elements (MGEs), among them,
61 clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) together with “CRISPR
62 associated proteins” (CAS) work together to form an adaptive immune system called
63 “CRISPR/Cas”. The system consist of several partially palindromic conserved repeats
64 separated by small, unique DNA patches, called spacers, they are acquired from invading
65 genetic elements, thus generating a “molecular memory” for further targeting of a foreign
66 nucleic acid using base complementarity of the coded sequence to effect the cleavage
67 (Barrangou et al., 2007; Garneau et al., 2010). CRISPR/Cas systems are currently grouped
68 into two distinct classes, six types and more than thirty subtypes that differ in their
69 components and mechanisms of action. The determining feature between two classes is the
70 effector nature of cleaving the target sequence, the Class 1 contains Cas protein complexes
71 with multiple subunits while Class 2 is characterized by having only one effector protein. The
72 nature of Class 2 systems are widely employed in a biotechnological toolkit since there are
73 fewer components to use compared to Class 1 systems (Koonin et al., 2017). Over the past
74 decade, the ability to reprogram Cas proteins by creating crRNAs (guide RNAs) designed to
75 bind and/or cleave specific DNA or RNA sequences has made them useful in a variety of
76 applications, including genome editing and modulation, specific control of gene expression
77 and nucleic acid detection (Wang et al., 2016). The knowledge expansion about CRISPR/Cas
78 systems has motivated the development of different research tools and made a major impact
79 in virtually all areas of life sciences, supporting important applications in various areas such
80 as biotechnology, agriculture and medicine. The focus of this review is to provide a brief
81 description of the current knowledge of CRISPR/Cas system, describing its discovery,
82 function, and classification, especially about recent advances in the application of this
83 powerful tool in biotechnological research using Class 2. This review provides key
84 information about the CRISPR/Cas system as well as the different class 2-based
85 biotechnological applications. Bibliographic sources were consulted to identify original
86

87 studies developed with CRISPR/Cas system, published in databases such as PubMed, Scopus,
88 SciELO, “Periodicos Capes”, and Google Scholar using the following keywords:
89 CRISPR/Cas systems; CRISPR/Cas Class 2 systems; Cas9; Cas12; Cas13; Genome editing
90 and diagnostic detection. As criteria for inclusion, consulted scientific articles were published
91 from 2000 to 2019.

92

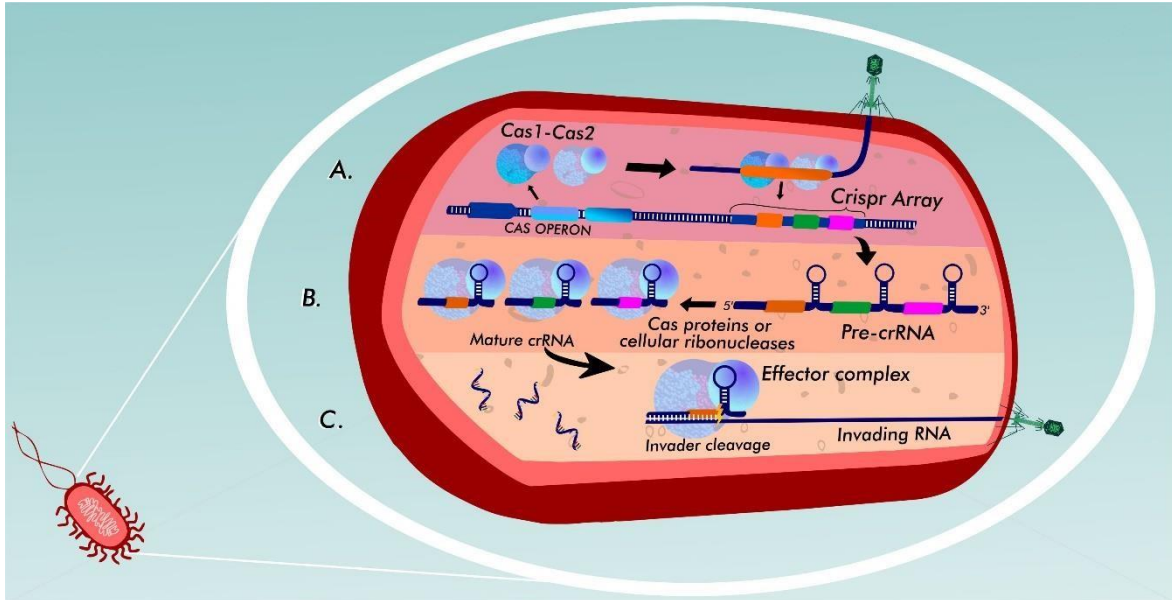
93 **CRISPR/CAS SYSTEM DISCOVERY**

94 CRISPR system was first reported in 1987, when Ishino et al. (1987) observed the presence of
95 a genetic structure containing 5 homologous repeats of 29 nucleotides being interrupted by 32
96 non-repetitive nucleotide sequences (spacers) in *Escherichia coli* during an analysis of gene
97 sequences involved in phosphate metabolism. This was followed by numerous reports of
98 similar sequences in other microbes, however until the mid-2000s there was no clear evidence
99 of the biological function or mechanism of these sequences (Van Soolingen et al., 1993). In
100 2002, the acronym CRISPR/Cas was officially named by Jansen et al. (2002) to bring
101 uniformity to the description of this sequences. In addition, the discovery of a conserved set
102 of operon-organized Cas genes were located adjacent to a CRISPR locus, indicating the Cas
103 genes along with the CRISPR locus have a functional relationship in prokaryotic organism
104 (Van Der Oost et al., 2009). The involvement of CRISPR elements as a hereditary adaptive
105 immune system was experimentally confirmed in 2005 when Bolotin et al. (2005), Mojica et
106 al. (2005) and Poursel et al. (2005) independently reported in their research that spacers were
107 similar to sequences derived from invasive mobile genetic elements (MGEs), including
108 bacteriophages, plasmids and transposons. Indeed comparative genomic analyzes have
109 suggested that the CRISPR system and Cas proteins actually work together and constitute an
110 acquired immunity system to protect prokaryotic cells against invading DNAs, similar to
111 eukaryotic RNA interference system (RNAi) (Mojica et al. 2016). In 2012 a major milestone
112 in CRISPR technology revolutionized the field of molecular biology and genetic engineering,
113 the group led by Doudna and Charpentier published an article revealing the first use of
114 CRISPR with Cas9 endonuclease being programmed with simple RNA molecules to cleave in
115 vitro specific sites in DNA strands (Jinek et al., 2012). Since this pioneering and subsequent
116 works, the CRISPR / Cas system has gained wide acceptance over other systems due to its
117 simplicity, speed and efficiency in modifying genes in any particular cell or tissue (Du et al.,
118 2016).

119

120 **CRISPR BIOLOGICAL MECHANISM: THE THREE PHASES OF ADAPTIVE** 121 **IMMUNITY**

122 At the molecular level, CRISPR/Cas-mediated immunity works through three main steps:
123 spacer adaptation or acquisition; crRNA processing or maturation and target interference or
124 cleavage (Figure 1).



125
 126 **Figure 1: CRISPR/Cas immune adaptive process.** The CRISPR-Cas defense mechanism occurs
 127 in three stages: adaptation, maturation and interference. (A) Adaptation: Invasive nucleic acid
 128 is recognized by the Cas1-Cas2 complex, incorporating the invasive sequence into the CRISPR
 129 spacer region. (B) Maturation: Pre-crRNA is generated by transcription of the CRISPR region
 130 and is processed into smaller RNA units, creating individual mature crRNAs. (C) Interference:
 131 Mature crRNAs guide Cas nucleases to specifically target their respective target nucleic acid
 132 sequences, resulting in cleavage of foreign DNA or RNA.

133

134 The adaptation or acquisition of spacers is the first stage in the construction of prokaryotic
 135 cell genetic memory. During this stage, Cas1 and Cas2 are the major proteins that plays
 136 crucial roles in recognizing and acquiring new protospacer DNA fragments as new spacer
 137 sequences in the CRISPR matrix during the first exposure to foreign nucleic acids (Figure 1A)
 138 (Yosef et al., 2012).

139 The second stage is crRNA processing, when after a second infection the components for
 140 target nucleic acid cleavage are synthesized to form the RNA-guided nuclease complex.
 141 Transcription of the CRISPR array begins with a primary RNA (pre-crRNA) within the leader
 142 region which is subsequently processed into a set of mature smaller RNAs (crRNA) which
 143 guide Cas proteins to invasive target sequences (Figure 1B) (Deltcheva et al., 2011).

144 Interference is the final stage of CRISPR adaptive immunity, which results in the cleavage of
 145 foreign nucleic acid by Cas nuclease through proper base pairing between the crRNA with the
 146 complementary sequence of double stranded DNA or single stranded RNA (Figure 1C). Thus,
 147 the processing and interference steps would be similar to the immune response of a
 148 “vaccinated” host against a particular specific nucleic acid (Marraffini et al., 2010).

149

150 **CRISPR/CAS SYSTEM DIVERSITY AND CLASSIFICATION**

151 CRISPR/Cas systems exhibit remarkable diversity and are present in almost all archaea, and
 152 in approximately 50% of analyzed bacteria domain, being absent in eukaryotes and viruses
 153 (Makarova et al., 2015).

154 These systems are classified into two general classes based on phylogenetic analysis,
 155 comparative genomics and protein constitution. Class 1 systems consist of a complex
 156 machinery, with multiple Cas proteins assisting in the recognition and cleavage of foreign

157 nucleic acids, while in the Class 2 system, they are formed from a single interference domain
 158 Cas effector protein. Interestingly Class 2 systems have only 10% of all sequenced
 159 CRISPR/Cas loci in prokaryote genomes, almost all within the bacteria domain (Wiedenheft
 160 et al., 2011).
 161 CRISPR systems have been further classified into six types and grouped into two classes:
 162 types I, III and IV (Class 1) and types II, V and VI (Class 2), which are currently subdivided
 163 into approximately 30 subtypes (Shmakov et al., 2015). Type I, II, and V (and probably IV)
 164 feature as target double stranded invading DNAs, while Type III systems cleave both DNA
 165 and RNA. Type VI systems exclusively cleave RNA, defending against RNA phages. In
 166 addition, systems which operate through DNA segmentation, each protospacer is made up of
 167 a short (2-5 bp) sequence called the protospacer adjacent motif (PAM), which plays a key role
 168 in immunologic recognition and spacer acquisition. In contrast, type III and VI complexes are
 169 regulated by sequences flanking protospacers of the target RNAs, referred as protospacer
 170 flanking site (PFS) (Koonin, 2017).

171

172 **BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS USING CRISPR-CAS CLASS 2 GENES**

173 The molecular characteristics of CRISPR/Cas Class 2 systems are the most used among
 174 researchers due to their simplicity and mechanism, depending only on small RNA molecules
 175 and Cas-specific protein. Class 2 has provided the development of molecular toolkits for
 176 various purposes, initiated with type II and followed by types V and VI (Mohanraju et al.,
 177 2016).

178

179 **Type II: CRISPR/Cas9**

180 Cas9 endonuclease was the first CRISPR-associated effector protein to be widely used in
 181 genetic engineering. Cas9 has a bilobulated form containing a recognition lobe (REC) and a
 182 nuclease lobe (NUC), while the REC lobe is composed of two targeting domains, REC1 and
 183 REC2, the NUC lobe has the RuvC, HNH and PI domains. The HNH and RuvC nuclease
 184 domains are responsible for cleavage of the complementary and noncomplementary DNA
 185 strands, respectively. The PI domain recognizes the adjacent protospacer motif (PAM)
 186 sequence in non-complementary chain. Mature crRNA associates with a trans-activating
 187 crRNA (tracrRNA) resulting in a tracrRNA-crRNA secondary structure that can direct Cas9
 188 nuclease to induce DNA breaks in the PAM region (Nishimasu et al., 2014).

189 The CRISPR/Cas9 system has been used efficiently by the scientific community in different
 190 types of cells and organisms, including in therapeutic treatments of human diseases such as
 191 cancer, genetic disorders, viral diseases, as well as use in plants, bacteria and fungi.

192 - *Oncology*: The therapeutic uses of CRISPR/Cas9 system proved to be an extremely valuable
 193 and efficient tool for cancer genetic research. CRISPR/Cas9 has been used to accelerate the
 194 development of T cells chimeric antigen receptor (CAR) (Ren et al., 2017). It can also be used
 195 with pro-apoptotic effect on cancer cells by knocking out Programmed cell death protein 1
 196 (PD-1) (Zhao et al., 2018). It can be used alone or in combination with other treatments for *in*
 197 *vitro* and *in vivo* studies to combat the etiological factors HPV16 and HPV18 of cervical
 198 cancer (Zhen et al., 2016);

199 - *Genetic Diseases*: For many genetic diseases CRISPR/Cas9 technology can be used due its
 200 ability to produce genome-specific changes. This includes diseases such as Duchenne
 201 muscular dystrophy (DMD) caused by mutations in a gene located on the X chromosome. In
 202 this experiment, authors used a mouse model which have DMD, and obtained a dystrophy
 203 gene mutation correction in its descendants, carrying 2-100% of the corrected gene (Egorova
 204 et al., 2019). In another research authors were also able to correct mutant intestinal stem cells

205 of cystic fibrosis patients, and restore their function *in vitro*, providing the first step to
 206 advance gene therapy in CRISPR cystic fibrosis patients (Schwank et al., 2013). Clinical trial
 207 applications for the treatment of sickle cell disease using the CRISPR/Cas system have also
 208 made promising advances by correcting disease-causing mutations in pluripotent stem cells
 209 with Cas9-mediated activity and no off-target effects (Li et al., 2016a).

210 -*Viral Diseases*: CRISPR systems can be employed to combat viral diseases by disrupting
 211 viral replication mechanisms and restoring infected cells to normal. One of the most intensely
 212 investigated viral diseases is HIV, for which CRISPR/Cas9 was widespread in various
 213 therapeutic approaches. Kaminski et al. (2016) for example, employed Cas9/crRNA
 214 machinery for precisely remove excision of the HVI-1 provirus, being administered in culture
 215 of latently infected human CD4 + T cells. Recently, Wang et al. (2018) demonstrated the
 216 SaCas9/sgRNA gene-editing complex could be programmed to excise the latent HIV-1
 217 provirus and therefore inhibit HVI-1 infection. In addition, Cas9 has been used to target
 218 conserved regions, which are responsible for the persistence and replication of hepatitis B
 219 virus (HBV) (Zeisel et al., 2015);

220 - *Antimicrobial Potential*: Misuse or overuse of antibiotics has led to an increasing number of
 221 antimicrobial resistant bacteria. CRISPR/Cas9 system can be used as alternative to use
 222 alongside conventional antibiotics or as programmable antibiotic to deactivate specific
 223 bacterial sequences, avoiding drug resistance or returning of bacterial toxicity by cleaving
 224 crucial domains in your genome without disturbing remaining microbiota (Bikard et al.,
 225 2014);

226 - *Agricultural applications*: The practicality provided by CRISPR/Cas9 technology in genetic
 227 editing has provided user-friendly tools for developing new plant varieties, improving
 228 agricultural production, conferring resistance to certain viral, fungal or bacterial diseases, and
 229 modifying characteristics as the fruit size. The system was employed, for example, to develop
 230 cucumbers with broad virus resistance without affecting plant development (Chandrasekaran
 231 et al., 2016) and to improve yield of maize crops under water stress (Shi et al., 2017). It has
 232 also been successfully applied to different fruit trees, including strawberry (Zhou et al., 2018),
 233 banana (Kaur et al., 2018), apple (Nishitani et al., 2016) and kiwi (Wang et al., 2018a).

234

235 **Type V: CRISPR / Cas12**

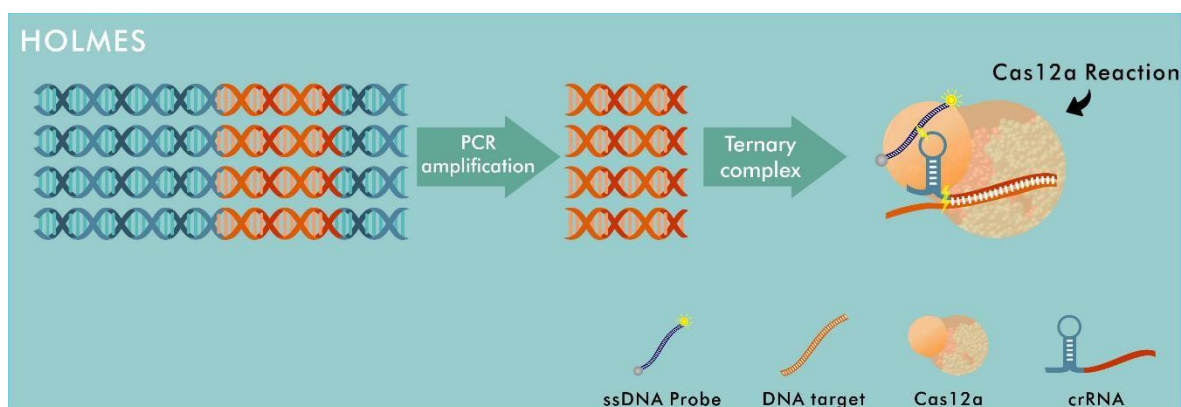
236 CRISPR-based genome editing tools have expanded by the discovery of new Class 2 effector
 237 proteins, such as type V proteins. Like Cas9 in size and shape, the Cas12 effector protein
 238 consists into two main lobes: one encompasses a nuclease lobe (NUC) and another of alpha
 239 helical recognition (REC). The REC lobe comprises two domains (REC1 and REC2), while
 240 the NUC lobe is composed of the RuvC domains (subdivided into I, II and III), PI, WED and
 241 BH, being absent the HNH domain, in contrast to the Cas9 endonuclease (Safari et al., 2019).
 242 The Cas12 system does not require a tracrRNA for processing mature crRNAs, which are
 243 processed by ribonuclease activity of Cas12 itself. In addition, Cas12 generates sticky ends
 244 which could increase the insertion efficiency of new DNA sequences in contrast to blind ends
 245 created by Cas9 (Jeon et al., 2018). With these advantages, Cas12 system has unique features
 246 to extend new genome editing tools, which can be used in a variety of biological approaches,
 247 including base editing, multiplex gene segmentation and epigenetic modulation (Safari et al.,
 248 2019).

249 Based on enzymatic characteristics Cas12 system was used to edit genome in various
 250 organisms. Its function was initially tested in *Escherichia coli* and obtained repression results
 251 with high degree of specificity and little off-target effect (Zhang et al., 2017). Similarly, the
 252 Cas12 system was used in *Clostridium* genus to produce a large number of chemicals and

253 fuels, such as n-butanol (Li et al., 2016b). In addition Cas12 has also been successfully used
 254 for genome editing in mammals, including human cells (Tsukamoto et al., 2018) mice (Teng
 255 et al., 2019) and swine (Wu et al., 2018).

256 The Cas12 system also has promises for use in nucleic acid detection methods for human
 257 genotyping and pathogen detection. Chen et al. (2018) recently reported the application of a
 258 technique for diagnosing invasive nucleic acids called DETECTR (DNA
 259 Endonuclease Targeted CRISPR Transcript). The technique consists in the ability of Cas12a
 260 endonuclease to cleave non-selective double stranded and single stranded DNA sequences
 261 triggered when crRNA binds to its complementary target DNA, allowing cleavage of
 262 neighboring nucleic acids. In this experiment, DETECTR utilizes collateral cleavage through
 263 a reporter nucleic acid that consists of a single stranded DNA containing a fluorophore, so
 264 that fluorescence emission is activated in the degradation of target DNA. Finally, another
 265 promising system developed called HOLMES (one-Hour Low-cost Multipurpose Highly
 266 Efficient System) is an accelerated detection platform for target DNA through a ternary
 267 complex (Cas12 - crRNA - target DNA), triggering trans-cleavage of undirected DNA,
 268 generating fluorescence lighting. Besides being a diagnostic tool for human disease,
 269 HOLMES can also be applied to determine homozygous and heterozygous genotypes,
 270 environmental and food monitoring (Figure 2) (Li et al., 2018).

271



272

273 Figure 2: Schematic illustration of HOLMES detection platform. In this platform, if a target
 274 DNA is in the reaction system, the Cas12/crRNA binary complex forms a ternary complex with
 275 the target DNA, triggering the Cas12 trans cleavage of the non-target DNA, generating
 276 fluorescence in the system.

277

278 **Type VI: CRISPR / Cas13**

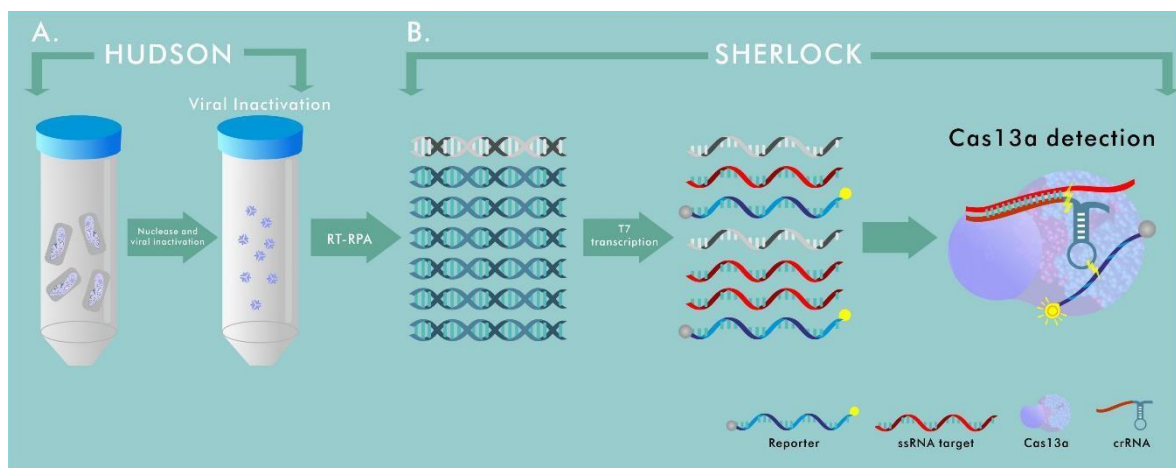
279 While most CRISPR / Cas systems target double stranded DNA, type VI systems are known
 280 to exclusively target RNA molecules. The Cas13 endonuclease adopts a bilobulated
 281 architecture consisting of two distinct ribonucleases. An RNase (REC) is responsible for pre-
 282 crRNA processing to generate mature crRNA and remains in the region after cleavage,
 283 forming the surveillance complex with Cas13. While the other RNase activity (NUC) is
 284 formed by two HEPN domains (Higher eukaryote-prokaryote nucleotide-binding domain),
 285 and together they form the target RNA cleavage site during viral interference step
 286 (Ahmadzadeh et al., 2019).

287 Like Cas12a, Cas13 molecules exhibit activity referred to as "collateral cleavage" when
 288 bound to a complementary target RNA (also known as "activator RNA"). The HEPN region
 289 becomes able to cut not only the target RNA, but any exposed RNA molecule, including free

290 non-complementary RNA or unbound complementary target RNA, resulting in target
 291 degradation as well as cleavage of other RNA sequences (Gootenberg et al., 2018).
 292 Therefore, a great effort is being made to establish and implement new systems capable of
 293 recognizing and/or cleaving selective CRISPR/Cas13-based RNA molecules, increasing the
 294 usefulness of CRISPR-based research tools. In addition, potential applications for new Cas13-
 295 based nucleic acid diagnostic platforms is enormous, including standardized testing for
 296 various infectious diseases, leading to more fast and precise clinical decision and point-of-care
 297 patient treatments.

298 The first of these platforms developed for molecular detection comprises the use of Cas13a
 299 nuclease “collateral activity” and is called SHERLOCK (High Sensitivity Enzyme Blocker
 300 for Reporter). This system is based on the combination of Recombinase Polymerase
 301 Amplification (RPA) and reverse transcription RPA (RT-RPA) isothermal amplification
 302 steps. Following recognition of the target RNA by crRNA-Cas13a complex, a fluorescent
 303 reporter RNA is cleaved through collateral activity providing an increase in fluorescent signal
 304 resulting in rapid, sensitive and accurate detection of specific RNAs (Gootenberg et al.,
 305 2017). More recently Gootenberg et al. (2018) introduced the SHERLOCKv2 platform with
 306 significant advantages over the first version. This include quantitative detection approach,
 307 enhanced sensitivity (below zeptomolar level), portability and multiplex detection (up to four
 308 targets) in single reaction with the use of Cas13, Cas12a and Csm6 proteins (which is a
 309 CRISPR type-III effector nuclease activated by cyclic adenylate molecules or linear adenine
 310 homopolymers terminated with a 2',3'-cyclic phosphate). In a further advance, Myhrvold et al.
 311 (2018) developed HUDSON (Heating Unextracted Diagnostic Samples to Obliterate
 312 Nucleases), a protocol which eliminates the need for nucleic acid extraction and allows the
 313 detection of pathogens directly from body fluids. HUDSON linked to SHERLOCK enabled
 314 highly sensitive detection of dengue virus in patients' blood, serum and saliva samples in less
 315 than two hours (Figure 3A-B).

316



317

318 **Figure 3: Schematic illustration of rapid diagnostic test associating HUDSON and**
 319 **SHERLOCK. (A) HUDSON is a SHERLOCK-linked method that eliminates the need for**
 320 **nucleic acid extraction through chemical reduction and heat to lyse viral particles and inactivate**
 321 **high levels of nucleases present in body fluids by releasing nucleic acids directly. (B)**
 322 **SHERLOCK integrates RT-RPA isothermal nucleic acid amplification with T7-dependent**
 323 **transcription of the target RNA through Cas13-mediated cleavage of nonspecific RNA coupled**
 324 **to a fluorophore.**

325

326 Finally, Cas13 systems have already been used for other research tools involving target RNA
327 degradation (Abudayyeh et al., 2016), RNA editing (Cox et al., 2017), live cell transcript
328 screening (Abudayyeh et al., 2017), regulation of pre-mRNA splicing (Konermann et al.,
329 2018) and resistance to plant virus RNA (Aman et al., 2018).

330

331

332 **FINAL CONSIDERATIONS**

333 There is no doubt that CRISPR/Cas-based technology, especially using class 2 has provided
334 more accessible and adaptable tools for editing, regulating, visualizing and detecting genomes
335 of different organisms. In addition to enabling rapid development in biological research and
336 biotechnology applications in different areas, the discovery of this prokaryotic immune
337 system has propelled a milestone in the history of microbiology. Given recent approaches to
338 bioinformatics a surprising number of new CRISPR/Cas systems have been unveiled, further
339 expanding knowledge about the CRISPR “universe”, which will serve not only to extend the
340 CRISPR/Cas “toolbox” but also in understanding the various ways which prokaryotes can
341 protect themselves from exogenous nucleic acids. However, as CRISPR revolution continues,
342 several challenges and concerns associated with this technology are also increasing, raising
343 social and ethical issues discussed by scientists and the general population, especially in gene
344 therapy applications. In humans for example, it was recently reported by a Chinese scientist,
345 Dr. He Jiankui, the birth of twins from embryos whose genome had been modified before
346 their transfer to the womb. The modification was performed using CRISPR/Cas9 disabling
347 copies of the CCR gene with the stated goal of preventing transmission of any HIV infection
348 transmitted by the parent. Although a plausible justification appears, the lack of any
349 confirmed assessment of consequences of this action casts doubt on why the scientist
350 performed such a procedure, further raising concerns about these applications, including
351 probable genetic inequality and its long-term ramifications. In addition, concerns such as off-
352 target effect, adaptive immune responses in humans, and inadvertent changes in human
353 germline have been reported. Therefore, CRISPR-based therapy still has a long way to go,
354 with several limitations to address.

355 Concluding, the perspectives for CRISPR technology is certainly positive. Improvements in
356 conventional tools are expected, and even more spectacular applications could be anticipated.
357 Similarly, regulatory agencies will need to consider the best way to increase responsible use
358 of this method without impeding research and technological development.

359

360 **CONFLICTS OF INTEREST**

361 The authors declare no conflict of interest.

362

363 **ACKNOWLEDGMENTS**

364 We are grateful to research supported by FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado
365 do Amazonas).

366

367 **REFERENCES**

368 Abudayyeh O, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, et al. (2016). C2c2 is a singlecomponent
369 programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*. 353: aaf5573.

370

371 Abudayyeh O, Gootenberg JS, Essletzbichler P, Han S, et al. (2017). RNA targeting with
372 CRISPR-Cas13. *Nature*. 550: 280–284.

373

- 374 Ahmadzadeh V, Farajnia S, Rahbarnia L, Zarredar H, et al. (2019). CRISPR-Cas system:
375 Toward a more efficient technology for genome editing and beyond. *J. Cell Biochem.* 19: 114.
376
- 377 Aman R, Ali Z, Butt H, Mahas A, et al. (2018). RNA virus interference via CRISPR/Cas13a
378 system in plants. *Genome Biol.* 19: 1–4.
379
- 380 Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, et al. (2007). CRISPR Provides Acquired
381 Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science.* 315: 1709–1712.
382
- 383 Bikard D, Euler CW, Jiang W, Nussenzweig, PM, et al. (2014). Exploiting CRISPR-Cas
384 nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat. biotechnol.* 32: 1146–1150.
385
- 386 Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich, SD, et al. (2005). Clustered regularly interspaced
387 short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology.*
388 151: 2551–2561.
389
- 390 Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, et al. (2016). Development of broad virus
391 resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol. Plant Pathol.* 17:
392 1140–1153.
393
- 394 Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, et al. (2018). CRISPR-Cas12a target binding
395 unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science.* 360: 436–439.
396
- 397 Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh O, Franklin B, et al. (2017). RNA editing with CRISPR-
398 Cas13. *Science.* 358: 1019–1027.
399
- 400 Deltcheva E, Chylinski, K, Sharma, CM, Gonzales K, et al. (2011). CRISPR RNA maturation
401 by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature.* 471: 602–607.
402
- 403 Du QS, Cui, J, Zhang CJ, He K, et al. (2016). Visualization analysis of CRISPR/Cas9 gene
404 editing technology studies. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 17: 798–806.
405
- 406 Egorova TV, Zotova ED, Reshetov DA, Polikarpova AV, et al. (2019). CRISPR/Cas9 generated
407 mouse model of Duchenne muscular dystrophy recapitulating a newly identified large 430 kb
408 deletion in the human DMD gene. *Dis. Model. Mech.* 12: dmm037655.
409
- 410 Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, et al. (2010). The CRISPR/Cas bacterial
411 immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature.* 468: 67–71.
412
- 413 Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, et al. (2017). Nucleic acid detection
414 with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science.* 356: 438–442.
415
- 416 Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, et al. (2018). Multiplexed and portable
417 nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science.* 360: 439–444.
418
- 419 Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, et al. (1987). Nucleotide sequence of the iap
420 gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and
421 identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 169: 5429–5433.

- 422
423 Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM, et al. (2002). Identification of genes that are
424 associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 43: 1565–1575.
425
- 426 Jeon Y, Choi YH, Jang Y, Yu J, et al. (2018). Direct observation of DNA target searching and
427 cleavage by CRISPR-Cas12a. *Nat. Commun.* 9: 2777.
428
- 429 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, et al. (2012). A programmable dual-RNAguided
430 DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 337: 816–821.
431
- 432 Kaminski R, Chen Y, Fischer T, Tedaldi E, et al. (2016). Elimination of HIV-1 Genomes from
433 Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Sci. Rep.* 6: 22555.
434
- 435 Kaur N, Alok AS, Kaur N, Pandey P, et al. (2018). CRISPR/Cas9-mediated efficient editing in
436 phytoene desaturase (PDS) demonstrates precise manipulation in banana cv. Rasthali genome.
437 *Funct. Integr. Genomics.* 18: 89–99.
438
- 439 Konermann S, Lotfy P, Brideau NJ, Oki J, et al. (2018). Transcriptome Engineering with RNA-
440 Targeting Type VI-D CRISPR Effectors. *Cell.* 173: 665- 676.
441
- 442 Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. (2017). Diversity, classification and evolution of CRISPR-
443 Cas systems. *Curr. Opin. microbiol.* 37: 67–78.
444
- 445 Li C, Ding L, Sun CW, Wu LC, et al. (2016). Novel HDAd/EBV Reprogramming Vector and
446 Highly Efficient Ad/CRISPR-Cas Sickle Cell Disease Gene Correction. *Sci. Rep.* 6: 30422.
447
- 448 Li Qi, Chen J, Minton NP, Zhang Y, et al. (2016). CRISPR-based genome editing and
449 expression control systems in *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*.
450 *Biotechnol. J.* 11: 961–972.
451
- 452 Li SY, Cheng QX, Wang JM, Li, XY, et al. (2018). CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid
453 detection. *Cell Discov.* 4: 20.
454
- 455 Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, et al. (2015). An updated evolutionary
456 classification of CRISPR-Cas systems. *Nat. Ver. Microbiol.* 13: 722–736.
457
- 458 Marraffini LA, Sontheimer EJ. (2010). Self versus non-self discrimination during CRISPR
459 RNA-directed immunity. *Nature.* 463: 568–571.
460
- 461 Mohanraju P, Makarova KS, Zetsche B, Zhang F, et al. (2016). Diverse evolutionary roots and
462 mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science.* 353: aad5147.
463
- 464 Mojica FJM, Díez-Villasenor C, García-Martínez J, Soria E, (2005). Intervening Sequences of
465 Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J. Mol. Evol.*
466 60: 174–182.
467
- 468 Mojica FJM and Rodríguez-valera F, (2016). The discovery of CRISPR in archaea and
469 bacteria. *FEBS J.* 283: 3162–3169.

- 470
471 Myhrvold C, Freije CC, Gootenberg JS, Abudayyeh O, et al. (2018). Field-deployable viral
472 diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science*. 360: 444-448.
473
- 474 Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, et al. (2014). Crystal structure of Cas9 in
475 complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 156: 935–949.
476
- 477 Nishitani C, Hirai N, Komori S, Wada M, et al. (2016). Efficient Genome Editing in Apple
478 Using a CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* 6: 31481.
479
- 480 Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G, (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new
481 repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for
482 evolutionary studies. *Microbiology*. 151: 653–663.
483
- 484 Ren J, Zhao Y, (2017). Advancing chimeric antigen receptor T cell therapy with CRISPR/Cas9.
485 *Protein cell*. 8: 634–643.
486
- 487 Safari F, Zare K, Negahdaripour M, Barekati-Mowahed M, et al. (2019). CRISPR Cpf1
488 proteins: structure, function and implications for genome editing. *Cell biosci.* 9: 36.
489
- 490 Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, et al. (2013). Functional repair of CFTR by
491 CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*. 13:
492 653–658.
493
- 494 Shi J, Gao H, Wang H, Lafitte HR, et al. (2017). ARGOS8 variants generated by CRISPR/Cas9
495 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol. J.* 15: 207–
496 216.
497
- 498 Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, et al. (2015). Discovery and Functional
499 Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Mol. Cell*. 60: 385– 397.
500
- 501 Teng F, Li J, Cui T, Xu K, et al. (2019). Enhanced mammalian genome editing by new Cas12a
502 orthologs with optimized crRNA scaffolds. *Genome Biol.* 20: 15.
503
- 504 Tsukamoto T, Sakai E, Iizuka S, Taracena-Gándara M, et al. (2018). Generation of the
505 Adenovirus Vector-Mediated CRISPR/Cpf1 System and the Application for Primary Human
506 Hepatocytes Prepared from Humanized Mice with Chimeric Liver. *Biol. Pharm. Bull.* 41:
507 1089–1095.
508
- 509 Van Der Oost J, Jore MM, Westra ER, Lundgren M, et al. (2009). CRISPR-based adaptive and
510 heritable immunity in prokaryotes. *Trends Biochem Sci.* 34: 401–407.
511
- 512 Van Soolingen D, Haas PE, Hermans PW, Groenen PM, et al. (1993). Comparison of various
513 repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of
514 *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1987–1995.
515
- 516 Wang X, Huang X, Fang X, Zhang Y, et al. (2016). CRISPR-Cas9 System as a Versatile Tool
517 for Genome Engineering in Human Cells. *Mol. Ther - Nucleic Acids*. 5: e388.

- 518
519 Wang Z, Wang S, Li D, Zhang Q, et al. (2018). Optimized paired-sgRNA/Cas9 cloning and
520 expression cassette triggers high-efficiency multiplex genome editing in kiwifruit. *Plant*
521 *Biotechnol J.* 16: 1424–1433.
522
- 523 Wang Z, Wang W, Cui YC, Pan Q, et al. (2018). HIV-1 Employs Multiple Mechanisms To
524 Resist Cas9/Single Guide RNA Targeting the Viral Primer Binding Site. *J. Virol.* 92: e01135-
525 18.
526
- 527 Wiedenheft B, Lander GC, Zhou K, Jore MM, et al. (2011). Structures of the RNA-guided
528 surveillance complex from a bacterial immune system. *Nature.* 477: 486–489.
529
- 530 Wu H, Liu Q, Shi H, Xie J, et al. (2018). Engineering CRISPR/Cpf1 with tRNA promotes
531 genome editing capability in mammalian systems. *Cell Mol. Life Sci.* 75: 3593–3607.
532
- 533 Yosef I, Goren MG, Qimron U, (2012). Proteins and DNA elements essential for the CRISPR
534 adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 40: 5569–5576. Zeisel MB, Lucifora
535 J, Mason WS, Sureau C, et al. (2015). Towards an HBV cure: state-of-the-art and unresolved
536 questions--report of the ANRS workshop on HBV cure. *Gut.* 64: 1314–1326.
537
- 538 Zhang X, Wang J, Cheng Q, Zheng X, et al. (2017). Multiplex gene regulation by CRISPR-
539 ddCpf1. *Cell Discov.* 3: 17018.
540
- 541 Zhao Z, Shi L, Zhang W, Han J, et al. (2018). CRISPR knock out of programmed cell death
542 protein 1 enhances anti-tumor activity of cytotoxic T lymphocytes. *Oncotarget.* 9: 5208–5215.
543
- 544 Zhen S, Lu J, Wang LJ, Sun XM, et al. (2016). In Vitro and In Vivo Synergistic Therapeutic
545 Effect of Cisplatin with Human Papillomavirus16 E6/E7 CRISPR/Cas9 on Cervical Cancer
546 Cell Line. *Transl. Oncol.* 9: 498–504.
547
- 548 Zhou J, Wang G, Liu Z, (2018). Efficient genome editing of wild strawberry genes, vector
549 development and validation. *Plant biotechnol. J.* 16: 1868–1877.
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

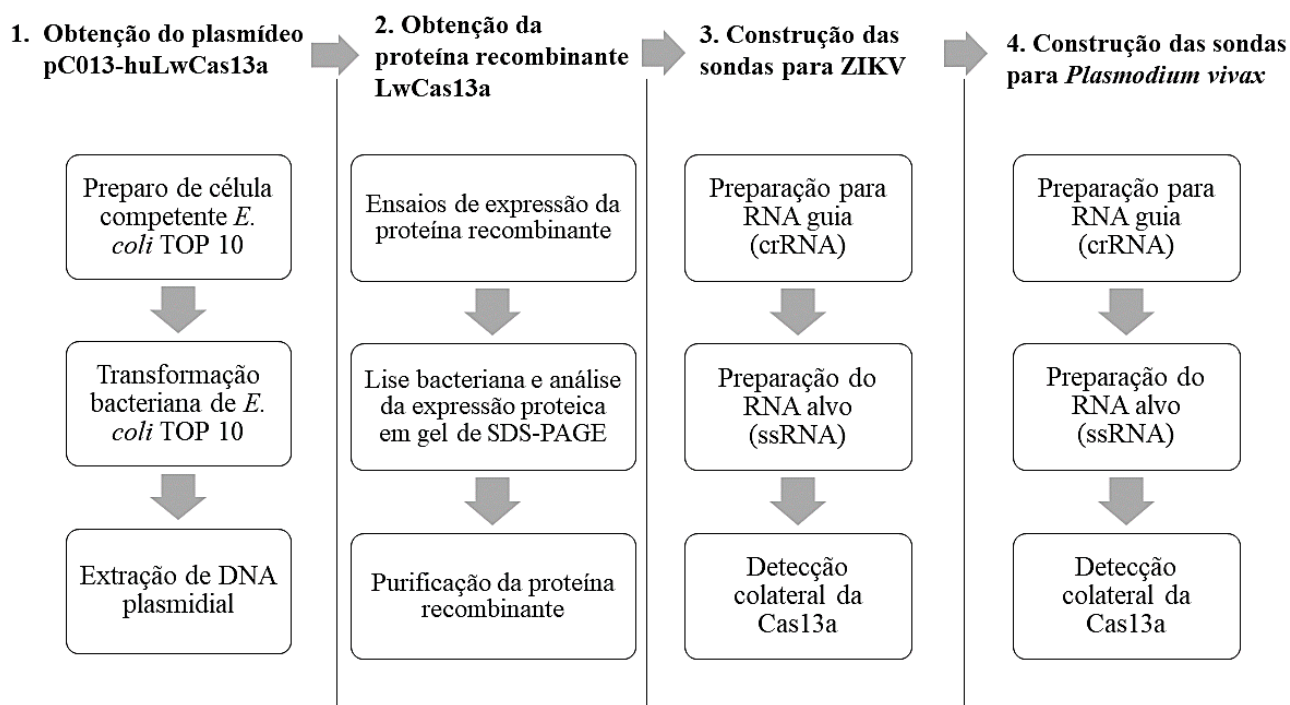
Produzir e purificar a proteína Cas13a de *Leptotrichia wadeii* e analisar sua aplicabilidade para detecção de *Plasmodium vivax* e vírus zika.

3.2. Objetivo específicos:

- Expressar e purificar a proteína LwCas13a;
- Produzir sequências de crRNA e mRNA selecionadas de vírus zika e *P. vivax*;
- Avaliar a atividade da proteína recombinante LwCas13a através de testes fluorimétrico;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Fluxograma



4.2. Considerações éticas da pesquisa

As amostras utilizadas neste trabalho fazem parte do projeto “Casos sintomáticos e assintomáticos de infecções pelo vírus Zika: estudo de características virológicas e da resposta imune em uma população da Amazônia Ocidental Brasileira”, aprovado pelo comitê de ética sob número CAAE 56745116.6.0000.5016. Os pacientes foram atendidos e as coletas das amostras realizadas no Hospital Adventista de Manaus (HAM) localizado na cidade de Manaus, Amazonas.

4.3. Linhagens bacterianas

As linhagens hospedeiras utilizadas foram:

- *Escherichia coli* TOP10: F' [lacIqTn10(telR)⁺mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔ M15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str®) endA1 nupG (Invitrogen™)]. Esta linhagem possibilitou a realização de manipulações genéticas, como a propagação e multiplicação de DNAs plasmidiais de expressão;

- *Escherichia coli* Rosetta-gami B(DE3): F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm lacY1 ahpC (DE3) gor522:Tn10 trxB pRARE (CamR, KanR, TetR (Novagen™)). Esta linhagem foi empregada para os ensaios de indução com a proteína recombinante.
- *Escherichia coli* BL21 (DE3): F- omp t hsdS_B (R_B -, m_B -) gal dcm (DE3) (Thermo Scientific™). Esta linhagem também foi empregada para testes de expressão da proteína recombinante.

4.4. Plasmídeo

Para o desenvolvimento do trabalho, o plasmídeo utilizado nas manipulações genéticas foi o pC013 - huLwCas13a (Addgene). Este plasmídeo de expressão tem cerca de 9.5 kb e apresenta o gene LwCas13a que codifica a proteína Cas13a, oriundo da bactéria *Leptotrichia wadeii* (Figura 1).

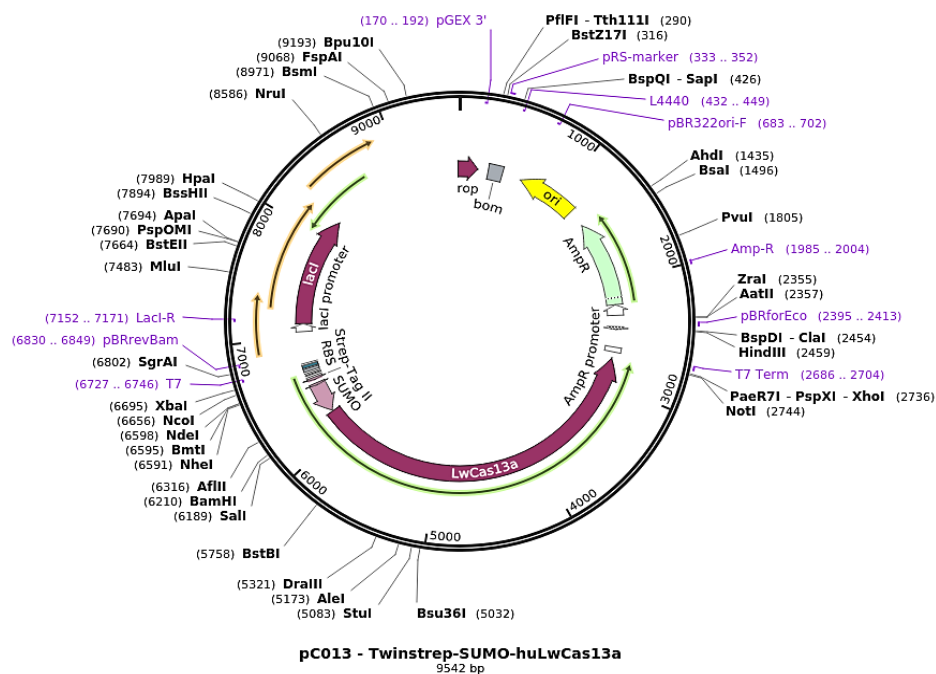


Figura 4: Mapa do vetor de expressão pC013 - huLwCas13a com o gene LwCas13a. Fonte: Addgene.

4.5. Obtenção do plasmídeo pC013-huLwCas13a

4.5.1. Preparo de célula competente *E. coli* TOP 10

Antes da realização da transformação, foi preparada a célula competente de *E. coli* TOP 10 após sucessivas lavagens com glicerol 10,0%, para tornar-se apta para receber DNA exógeno por meio eletroporação. Para isso, uma única colônia da bactéria foi inoculada em 3 mL de meio LB líquido e levada ao shaker à 37°C overnight. Decorrido este período, a cultura que foi inoculada em 300 mL de LB (sem antibióticos) e mantido em agitação até atingir O.D600 =0,7. Após, o frasco contendo a cultura foi esfriado no gelo por 30 minutos e então a cultura foi dividida em tubos cada um com 50 mL de capacidade e centrifugados a 3.500 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado imediatamente e as células ressuspensas gentilmente até soltar e dissolver o pellet, usando 10 mL de glicerol 10% estéril e gelado. Em seguida ocorreu nova centrifugação a 3.500 g por 8 minutos, descartado o sobrenadante e ressuspensado novamente em 10 mL de glicerol 10% gelado e estéril. Estas lavagens foram repetidas por mais 4 vezes centrifugando as células. O pellet foi ressuspensado em 15 mL de glicerol 10% gelado e estéril, centrifugado e agora ressuspensado em 1 mL de glicerol 10% gelado e estéril. As células competentes foram alíquotadas em volume de 50 µL e congeladas imediatamente em nitrogênio e estocadas em freezer na temperatura de -80°C.

4.5.2. Transformação bacteriana de *E. coli* TOP 10

As bactérias competentes TOP10 foram retiradas do freezer -80 e deixadas descongelando em banho de gelo por 10 minutos, foi transferido 1 µL do DNA plasmidial pC013 para o tubo contendo 50 µL da bactéria, repassando a mistura para uma cubeta de 1mm, a qual foi incubada no gelo por 5 minutos. Foi aplicado um pulso de 1900 kV em aparelho de eletroporação (Electroporator 2510) e imediatamente após o pulso elétrico adicionou-se 500 µL de meio LB líquido, após isso, foi transferindo o conteúdo para um microtubo de 1,5 mL. Incubou-se a 37°C por 1 hora com agitação lenta para estabilização. Em seguida, alíquotas de 100 µL do sistema foram plaqueadas em LB-ágar contendo ampicilina (200 µg/mL) e incubadas invertidas em estufa a 37°C por 16 horas.

4.5.3. Extração de DNA plasmidial

A extração e purificação do DNA plasmidial da colônia transformada foi realizada através do Plasmid Mini, Midi and Maxi Kits (Qiagen[®]), seguindo as recomendações do fabricante. Uma colônia contendo o plasmídeo com o gene de interesse foi utilizada como inóculo em 100 ml de meio LB líquido suplementado com 50 µg/mL de ampicilina sendo mantida sob agitação 150 rpm, a 37°C, por 16 horas. Em seguida, uma fração da amostra foi sedimentada por meio de centrifugação a 6.000 x g, a 4°C, por 15 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado bacteriano foi então utilizado para a extração de DNA plasmidial. O protocolo de purificação do kit baseia-se na técnica modificada de lise alcalina pela adição dos tampões P1, P2 e P3, seguida pela ligação do DNA plasmidial à resina de troca-aniônica Qiagen previamente equilibrada com tampão QBT. Proteínas, RNA, pigmentos e impurezas de baixo peso molecular são removidos por meio de duas lavagens com tampão QC de média salinidade. O DNA é eluído pelo tampão QF de alta salinidade e, então, concentrado e desalinizado por meio de precipitação em isopropanol e lavagem com etanol 70%. O DNA resultante foi diluído em água nuclease-free. A quantificação foi feita através do BioDrop-µLITE.

4.6. Obtenção da proteína recombinante LwCas13a

4.6.1. Escolha da melhor linhagem bacteriana

Os procedimentos empregados no preparo da célula competente e transformação de *E. coli* (DE3): Rosetta-gami e BL21 foram os mesmos descritos nos procedimentos para células TOP10 (seção 5.3.1 e 5.3.2). Após a transformação, alíquotas de 100 µL do sistema foram plaqueadas em LB-ágar contendo ampicilina (50 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL) e incubadas invertidas em estufa a 37°C por 16 horas.

4.6.2. Ensaio de expressão da proteína recombinante

Para realizar os testes de expressão, foram feitos pré-inóculos com as colônias resultantes da transformação, estas foram analisadas e isoladas individualmente em 4 tubos contendo cada um 3mL com LB líquido suplementado com os antibióticos ampicilina e cloranfenicol e crescidas em overnight a 37°C sob agitação a 150 rpm.

Os pré-inóculos foi diluído em 1 litro de meio LB líquido contendo os antibióticos apropriados e incubado a 37°C sob agitação a 150 rpm, até a cultura atingir uma densidade óptica entre 0,6 e 0,7 com comprimento de onda de 600nm. Ao atingir o ponto de crescimento, os testes de expressão da proteína foram realizados pela suplementação com IPTG e lactose, o crescimento foi mantido durante os períodos de 3 e 16 horas em temperatura de 21° e 37°C. Após isso, as células foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C, o precipitado com as bactérias (pellet) foi armazenado no freezer (-20°C) e o sobrenadante descartado.

4.6.3. Lise bacteriana e análise da expressão proteica em gel de SDS-PAGE

O pellet celular foi ressuscitado em 50 mL do tampão de lise (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 8.0). Em seguida, as células foram submetidas a cinco ciclos de sonicação (Processador Ultrassônico UP100H) por um período de 30 segundos, seguidos de 30 segundos de descanso permanecendo no gelo durante todo processo. Após a lise, o sistema foi centrifugado durante 20 minutos a 4 ° C a 14.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e filtrado através de um filtro Stericup de 0,22 µm (EMD Millipore).

Após isso, o sobrenadante foi analisado por gel de eletroforese SDS-PAGE 12%, preparado conforme Laemmli (1970) e Sambrook (1989). A amostra foi aplicada diretamente no gel e preparada com tampão de amostra 2x (1,5 M Tris pH 6.8, glicerol 25%, SDS 7%, 2-mercaptoetanol 12%, azul de bromofenol 0,25%) e aquecida por 5 minutos a 95°C. A corrida foi feita em tampão de corrida tris/glicina/SDS, com voltagem a 140 V com duração de aproximadamente 1 hora.

Posteriormente, o gel foi retirado do sistema, sendo corado com a solução PhastGel® Blue R por 15 minutos e em seguida foi descorado em uma solução descorante até a visualização das bandas de proteína. Após a coloração do gel, este foi visualizado no fotodocumentador iBright FL1000 (Invitrogen™) para verificar o rendimento e a expressão da proteína nas linhagens escolhidas. O sobrenadante contendo o extrato proteico foi submetido à purificação da proteína de interesse.

4.6.4. Purificação da proteína recombinante

O sobrenadante obtido após a expressão foi primeiramente purificado utilizando a cromatografia de afinidade com a coluna contendo Strep-Tactin Sepharose (StrepTrap™ HP 1 mL) em afinidade a cauda de Twin-Strep-tag (24 aminoácidos) inserida na proteína recombinante. A coluna foi inicialmente lavada com 5 VC (volume da coluna) de água destilada e equilibrada em 5 VC de tampão de lise frio (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 8.0) a 1 mL/min. Após o equilíbrio, a coluna foi carregada com o sobrenadante da lise contendo a proteína de interesse, e posteriormente a coluna foi lavada com 5 a 10 VC com tampão de lise. A coluna foi ressuspensa em 2 VC de tampão de digestão (Tris-HCl 30 mM, NaCl 500 mM, DTT 1mM, SUMO protease 250U, pH 8,0) e o sobrenadante ficou em contato com o tampão na resina por cerca de 16 horas a 4°C. Posteriormente, a solução clivada contendo Cas13a sem marcação foi eluída em 4 VC com tampão de lise e as frações foram coletadas em microtubos de 1 mL. Em seguida, a coluna foi lavada em 4 VC com tampão de lavagem (2,5 mM destiobiotina em tampão de lise) para retirada da cauda Twin-Strep-SUMO ligada a resina e regenerada aplicando 5 VC de 1 mM HABA para remoção da destiobiotina. A purificação foi analisada em SDS-PAGE 12% e as frações contendo Cas13a foram reunidas e concentradas na coluna Amicon®Ultra 100 kDa (Millipore).

Em seguida, a proteína concentrada foi carregada em uma coluna de filtração em gel via FPLC. A coluna de cromatografia de exclusão por tamanho (Superdex® 200 Increase 10/300 GL, GE) foi equilibrada com 5 VC de tampão de exclusão (HEPES 10 mM pH 7,0, MgCl₂ 5 mM, NaCl 1M, DTT 2 mM) a 0,75 mL / min. A amostra foi aplicada em cromatografia de exclusão de tamanho, seguido de eluição em 1 VC, lavada com 1 VC e equilibrada com 2 VC. As frações contendo pico foram analisadas em SDS-PAGE 12% e posteriormente foram concentradas e armazenadas em tampão de Armazenamento (NaCl 600 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, glicerol a 5%, DTT 2 mM) e congeladas a -80. A concentração de proteínas foi determinada através do método de Bradford utilizando-se a solução albumina de soro bovino (BSA) como padrão (BRADFORD, 1976).

4.6.5. Análise por “Western Blot”

A confirmação da purificação foi realizada pela técnica de Western Blot, segundo TOWBIN et al., (1979). Para isso, a amostra purificada foi separada por eletroforese SDS-PAGE 12% e transferida para membrana de nitrocelulose (Millipore) embebida em tampão de transferência (48mM Tris, 39mM glicina, 0,02% SDS e 20% metanol). O sistema foi colocado em uma cuba específica para eletrotransferência (Trans-Blot SD semi-dry system, Bio-Rad) sendo submetido a uma voltagem constante de 10 V durante 60 minutos. Após a membrana ser retirada do sistema, realizou-se a revelação utilizando kit comercial Western Breeze® (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante.

4.7. Construção das sondas para ZIKV

4.7.1. Preparação para RNA guia (crRNA)

Os moldes do crRNA foram produzidos a partir de oligonucleotídeos de DNA de fita simples (Tabela 1). Os oligonucleotídeos específicos para o crRNA de vírus zika foram desenhados com base no protocolo de Kellner et al., (2019) e sintetizados pela empresa IDT bioscience (Integrated DNA Technologies).

Tabela 1: Oligonucleotídeos para construção do RNA guia (crRNA) para vírus ZIKV

Oligonucleotídeos	Sequência	N°
Vírus Zika Gene <i>poly</i>	Forward 5'- AAG GCA AAC TGT CGT GGT TCT AGG GAG TGT TTT AGT CCC CTT CGT TTT TGG GGT AGT CTA AAT CCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA ATT TC -3'	89
	Reverse 5'- GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGA TTT AGA CTA CCC CAA AAA CGA AGG GGA CTA AAA CAC TCC CTA GAA CCA CGA CAG TTT GCC TT -3'	89

* Obs: Sequências destacadas em negrito referem-se ao promotor da enzima T7.

Os dois oligonucleotídeos referentes ao crRNA foram aquecidos juntos (concentração final: 10 µM cada) em um microtubo por 1 minuto a 95°C e posteriormente colocados a 4°C por 5 minutos. O DNA de fita dupla produzido foi então incubado para transcrição in vitro com

a polimerase T7 a 37°C em durante a noite no termociclador utilizando o T7 RNA Polymerase Kit (Cellco) de acordo com as instruções do fabricante.

Os crRNAs foram purificados usando RNAXP clean beads (Beckman Coulter) a uma razão de 2 X para o volume de reação, com uma suplementação adicional de 1.8 X de isopropanol a 100% (Sigma). Após a purificação, o crRNA foi analisado por SDS-PAGE corado com nitrato de prata (Herring et al., 1982), quantificado por espectrofotometria (BioDrop- μ LITE) e armazenado em -80

4.7.2. Preparação do RNA alvo (ssRNA)

Para extração de RNA das 5 amostras utilizadas neste estudo foram realizadas com o kit comercial QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. Após extração, dez nanogramas de RNA de vírus Zika foram transcritos pela primeira vez com o kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Dois microlitros da reação reversa foram amplificados com Taq Pol DNA Polymerase (Cellco) de acordo com as instruções do fabricante. As condições de PCR foram de 10 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 40 segundos a 95°C, 40 segundos a 58°C, 1 minuto a 72°C e um passo final de 5 minutos a 72°C. Os primers específicos utilizados neste estudo para ZIKV foram desenhados com base nas sequências do protocolo Kellner et al., (2019) adicionados de região promotora T7 os antecedendo e as sequências dos oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa IDT bioscience (Integrated DNA Technologies) (Tabela 2).

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para amplificar o fragmento do sequenciais específicas de ZIKV

Oligonucleotídeos	Sequência	N°
Vírus zika Gene <i>poly</i>	Forward 5'- GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGA CAC CGG AAC TCC ACA CT -3'	50
	Reverse 5'- GCC AGA GGA CAG CCT TCC C -3'	30

* Obs: Sequências destacadas em negrito referem-se ao promotor da enzima T7.

Ao final da reação, os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM pH 8,5, EDTA 1 mM), corado com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL). As corridas foram feitas em tampão TAE, sob voltagem de 90 V por 30 minutos. O gel foi visualizado e documentado pelo sistema iBright FL1000 (Invitrogen™). O padrão de massa molecular usado no gel de agarose foi o 3 Kb Mid Range DNA ladder (Cellco).

Os produtos de amplificação de PCR foram transcritos pela polimerase T7 mediante incubação a 37°C em *overnight* no termociclador utilizando o T7 RNA Polymerase Kit (Cellco) de acordo com as instruções do fabricante. Os RNAs alvo produzidos foram purificados com o MEGAclear™ Kit (Thermo Fisher), por meio de tubos de coleta e eluição livres RNase fornecidos com o kit. Após a purificação, o RNA foi analisado por SDS-PAGE corado com nitrato de prata (Herring et al., 1982), a concentração das amostras foi realizada por espectrofotometria (BioDrop-µLITE) e armazenadas em -80.

4.8. Construção das sondas para *Plasmodium vivax*

4.8.1. Preparação para o RNA guia (crRNA)

Os oligonucleotídeos específicos para o crRNA de *Plasmodium vivax* foram desenhados baseado no protocolo de Kellner et al., (2019) e sintetizados pela empresa IDT bioscience (Integrated DNA Technologies). Foi acrescentado nos oligonucleotídeos *reverse* a sequência promotora para enzima T7. As sequências dos crRNA utilizadas estão descritas na Tabela 2.

Tabela 3: Oligonucleotídeos para construção do RNA guia (crRNA) para *P. vivax*

Oligonucleotídeos	Sequência	Nº
<i>Plasmodium vivax</i> Gene <i>pvmdr-1</i>	Forward 5'- GGG AAG AAA TTA AAA GAT AGT TTT AGT CCC CTT CGT TTT TGG GGT AGT CTA AAT CCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA -3'	75
	Reverse 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG ATT TAG ACT ACC CCA AAA ACG AAG GGG ACT AAA ACT ATC TTT TAA TTT CTT CCC -3'	75

* Obs: Sequências destacadas em negrito referem-se ao promotor da enzima T7.

Os dois oligonucleotídeos referentes ao crRNA foram aquecidos juntos (concentração final: 5 μ M cada) em um microtubo por 1 minuto a 95°C e posteriormente colocados a 4°C por 5 minutos. O DNA de fita dupla produzido foi então incubado para transcrição in vitro com a polimerase T7 a 37°C em durante a noite no termociclador utilizando o T7 RNA Polymerase Kit (Cellco) de acordo com as instruções do fabricante.

Os crRNAs foram purificados usando RNAXP clean beads (Beckman Coulter) a uma razão de 2 X para o volume de reação, com uma suplementação adicional de 1.8 X de isopropanol a 100% (Sigma), de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação, o crRNA foi analisado por SDS-PAGE corado com nitrato de prata e a concentração das amostras foi realizada por espectrofotometria (BioDrop- μ LITE) e armazenadas em -80.

4.8.2. Preparação do RNA alvo (ssRNA)

Para extração do DNA genômico de *Plasmodium vivax* utilizou-se o kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o DNA referente a sequência alvo de *P. vivax* foi amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para reação, utilizou-se a Taq Pol DNA Polymerase (Cellco) de acordo com as instruções do fabricante. Os primers específicos utilizados neste estudo para *Plasmodium vivax* foram desenhados com base nas sequências depositadas no banco de dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). A sequência dos oligonucleotídeos foram construídas utilizando o programa Primer-Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) e sintetizados pela empresa IDT bioscience (Integrated DNA Technologies), com uma sequência promotora T7 as antecedendo (Tabela 4).

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados para amplificar o fragmento do sequenciais específicas de *P. vivax*

Oligonucleotídeos	Sequência	Nº
<i>Plasmodium vivax</i> Gene <i>pvmdr-1</i>	Forward 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAG CAT CTT ACG CGT TTG GTT-3'	39
	Reverse 5'-TGG AGT TGC TAA AGA GAA GTG GG-3'	23

*Obs: Sequências destacadas em negrito referem-se ao sítio da enzima T7.

A programação da reação de polimerização foi composta desnaturalização inicial a 95° por 10 minutos, seguida de 30 ciclos passando pelas etapas de desnaturalização a 95°C por 40 segundos, anelamento dos iniciadores com as fitas moldes na temperatura de 58°C por 40 segundos, extensão das novas fitas 1 minuto a 72°C e um passo de extensão final de 5 minutos a 72°C. Ao final da reação a mesma foi interrompida por resfriamento a 4°C.

Ao final da reação, os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM pH 8,5, EDTA 1 mM), corado com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL). As corridas foram feitas em tampão TAE, sob voltagem de 90 V por 30 minutos. O gel foi visualizado e documentado pelo sistema iBright FL1000 (Invitrogen™). O padrão de massa molecular usado no gel de agarose foi o 3 Kb Mid Range DNA ladder (Cellco).

Os produtos de amplificação de PCR foram transcritos pela polimerase T7 mediante incubação a 37°C em *overnight* no termociclador utilizando o T7 RNA Polymerase Kit (Cellco) de acordo com as instruções do fabricante. Os RNAs alvo produzidos foram purificados com o MEGAclear™ Kit (Thermo Fisher), por meio de tubos de coleta e eluição livres RNase fornecidos com o kit. Após a purificação, o RNA foi analisado por SDS-PAGE corado com nitrato de prata (Herring et al., 1982), a concentração das amostras foi realizada por espectrofotometria (BioDrop-µLITE) e armazenadas em -80.

4.9. Detecção colateral da Cas13a

Os ensaios de detecção foram realizados com 63 µg/mL de proteína Cas13a purificada, 10 ng /µL de crRNA purificado, 1M de HEPES, 40 U /µL de RNase Inhibitor (New England BioLabs), 8 µM de RNA repórter fluorescente (RNase Alert v2, Thermo Scientific) e concentrações variadas de RNA alvo purificado. Foram ainda realizados ensaios utilizando quantidades variadas de dsDNA amplificado por PCR, adicionando no ensaio 25 mM de mix rNTP, 1M de MgCl₂ e 5 U / µL T7 RNA Polimerase (Cellco).

As reações foram preparadas em gelo e cobertas com folha de alumínio para proteger o RNA repórter fluorescente da exposição à luz, as reações foram rapidamente agitadas em vórtex e centrifugadas usando centrifugador de placas por 10 segundos em temperatura

ambiente. Após a preparação da placa, as amostras foram colocadas no leitor de placas de fluorescência StepOnePlus (Applied Biosystems, EUA). A aquisição dos dados de fluorescência foi monitorada por 3 horas a 37°C com um intervalo de 5 minutos entre aquisições dos dados de cada poço.

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção da proteína recombinante LwCas13a

5.1.1. Ensaios de indução da proteína recombinante LwCas13a

Visando otimizar a expressão proteica para obtenção de maior rendimento da proteína LwCas13a, foram realizados inicialmente testes de indução em duas diferentes linhagens bacterianas de *E. coli* (DE3): BL21 e Rosetta-gami, utilizando os indutores lactose (10g/L) e IPTG (0.5 μ M) nos períodos de 3 e 16 horas em temperatura de 37°C, respectivamente. Passados os períodos de indução, os extratos proteicos foram analisados em gel de poliacrilamida seguida de coloração Coomassie Blue. Na figura 5A é possível observar um gel SDS-PAGE a 12% obtido após submeter às amostras a condições desnaturantes das frações solúveis, no entanto, nenhuma expressão diferenciada na região de aproximadamente 138,5 kDa foram observadas.

Diante da expressão negativa da proteína de interesse por SDS-PAGE, as frações foram analisadas por *western-blot* utilizando o anticorpo monoclonal anti-strep, contudo, através desse ensaio observamos que a proteína recombinante estava sendo bem expressa na linhagem Rosetta-gami nas diferentes condições, embora na canaleta 8 (Rosetta + IPTG + lactose) foi obtido em menor rendimento, enquanto aos ensaios de induções referentes a linhagem BL21 (DE3) não foram detectadas a produção da proteína recombinante pela técnica de *western-blot*. Pode-se observar ainda nas canaletas duas bandas muito próximas de expressão da proteína, o que pode justificar com sendo produtos de clivagem (Fig. 5B).

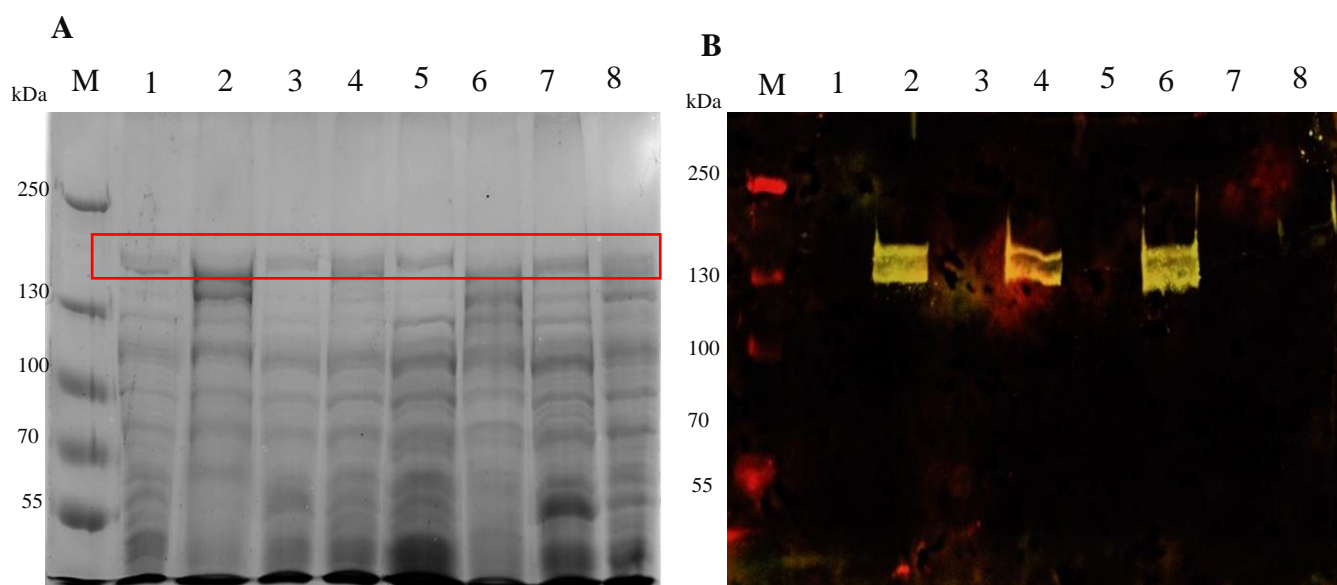


Figura 5: Análise das diferentes condições de indução da proteína LwCas13a. **A:** SDS-PAGE 12% - M: marcador PageRuler™ Ladder de peso molecular 250 kDa (Thermo Scientific); canaleta 1: Linhagem BL21, indução com IPTG por 3 horas; canaleta 2: Linhagem Rosetta, indução com IPTG por 3 horas; canaleta 3: Linhagem BL21, indução com lactose por 3 horas; canaleta 4: Linhagem Rosetta, indução com lactose por 3 horas; canaleta 5: Linhagem BL21, indução com IPTG por 16 horas; canaleta 6: Linhagem Rosetta, indução com IPTG por 16 horas; canaleta 7: Linhagem BL21, indução com lactose por 16 horas; canaleta 8: Linhagem Rosetta, indução com lactose por 16 horas. **B:** Análise por western-blot com as respectivas ordens de indução nas canaletas citadas em SDS-PAGE.

Porém, com o rendimento aparentemente satisfatório nas induções obtidas na linhagem *E. coli* Rosetta, optamos por trabalhar a expressão com IPTG por 16 horas, entretanto, duas adaptações no procedimento foram empregadas para aumentar a quantidade de proteína LwCas13a induzida. Estas adaptações envolveram o aumento da concentração de IPTG para 0,5 mM e a diminuição da temperatura para 21°C, enquanto o período de indução de 16 horas se fez necessário para alcançar quantidade suficiente de proteína para sua visualização por SDS-PAGE. Observa-se na figura 6 a presença de uma banda mais espessa nas fração solúvel apresentada canaleta 1 com o tamanho esperado para a proteína LwCas13a, aproximadamente 138,5 kDa, revelando melhoria na metodologia de expressão adotada, apesar de na canaleta 2 ter sido também observado a presença da proteína na fração insolúvel do sistema de expressão, indicativo de que um processo de otimização da lise celular poderia ser empregado durante os experimentos.

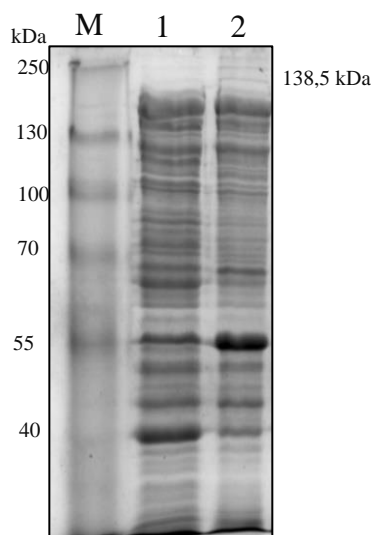


Figura 6: Análise em gel SDS-PAGE 12% da expressão de LwCas13a induzida com 0,5 mM de IPTG à 21°C por 16 horas. M: marcador PageRuler™ Ladder de peso molecular 250 kDa (Thermo Scientific); canaleta 1: lisado celular após indução; canaleta 2 - *pellet* (a seta indica a banda referente a expressão da proteína).

As frações solúveis foram, então, empregadas para a etapa de purificação da proteína recombinante. A produção em maior escala da proteína em *E.coli* Rosetta foi realizada depois de otimizado o processo de indução, cuja quantidade foi suficiente tanto para as etapas de purificação quanto para os subsequentes ensaios de detecção.

5.1.2. Purificação da proteína recombinante LwCas13a

A análise da purificação da proteína recombinante ocorreu por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE). Na figura 7A, nas canaletas 4 e 5 é possível a visualização de uma forte banda do tamanho esperado para proteína LwCas13a purificada a partir da fração solúvel por cromatografia de afinidade usando a resina StrepTactin Sepharose. A proteína foi purificada a partir de 50 mL de extrato bruto solúvel, resultante do cultivo de 1 litro de meio LB líquido inoculado com o clone recombinante demonstra grande produção da LwCas13a.

A diferença observada no peso molecular da banda correspondente a LwCas13a nas canaletas 4 e 5 se deve ao efeito da digestão com a protease SUMO. A banda espessa vista na canaleta 4 corresponde a purificação com clivagem da marcação TwinStrep–SUMO, resultando em uma proteína com peso molecular de aproximadamente 126,5 kDa, enquanto a banda da canaleta 5 corresponde a purificação com eluição por destiobiotina, sem clivagem da marcação, permanecendo com o mesmo tamanho molecular inicial.

A revelação de um *Western-blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-strep-tag (Sigma) confirmou a proteína recombinante estava sendo expressa devido ao reconhecimento da fusão TwinStrep pelo anticorpo anti-strep, embora nas canaletas 1,2,3 e 5 nota-se que os fragmentos obtidos possam ser produtos da clivagem sofrida pela proteína de interesse, além de que foi possível comprovar na canaleta 4 a digestão da marcação TwinStrep–SUMO (Figura 7B).

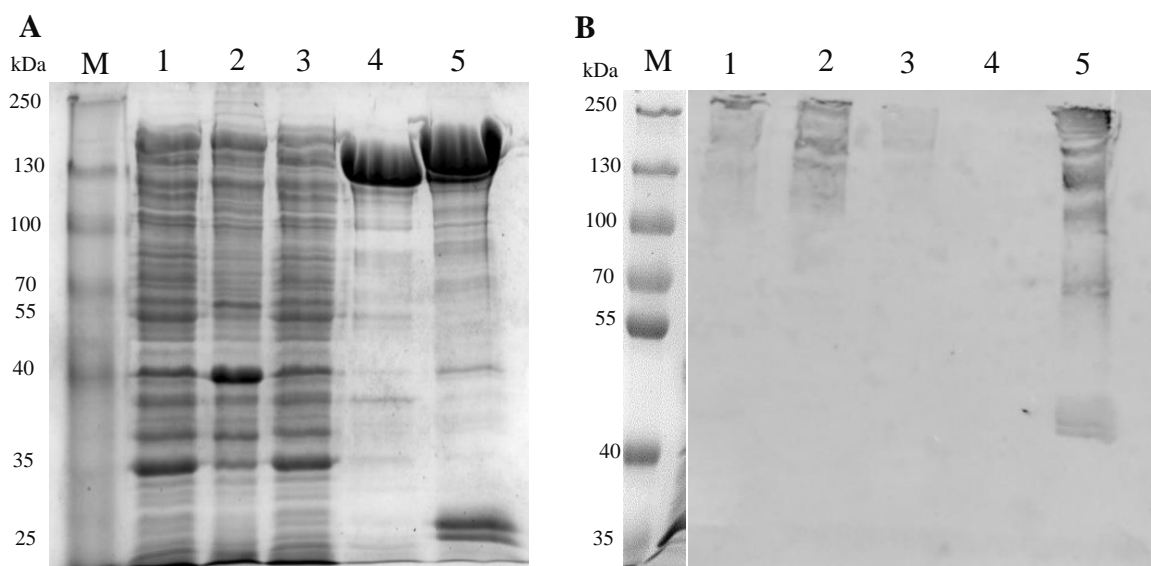


Figura 7: Análise da purificação da proteína recombinante LwCas13a. **A:** SDS-PAGE 12% da purificação por cromatografia de afinidade. **B:** Análise por Western-blot com anticorpo anti-strep. M – Marcador PageRuler™ Ladder de peso molecular 250 kDa (Thermo Scientific); canaleta 1 – sobrenadante de lisado celular após indução; canaleta 2 - *pellet* celular; canaleta 3 – sobrenadante após coluna StrepTactin; canaleta 4 – fração eluída após clivagem com a protease SUMO e canaleta 5 – fração sem clivagem com protease SUMO.

Como segunda etapa na purificação da LwCas13a, foi proposta a gel filtração da fração após SUMO obtida da cromatografia de afinidade a resina StrepTactin Sepharose. A proteína foi encontrada nas frações iniciais do gel filtração devido ao seu tamanho da massa molecular na ordem 126,5 kDa. As canaletas contendo pico foram analisadas em SDS-PAGE 12% e

observa-se que na canaleta 2 apresentou a maior quantidade de proteínas, enquanto na fração 3 apresentou em menor concentração (Fig. 8). Após os passos para confirmação da purificação, a amostra contendo a proteína de interesse foi concentrada em coluna de Amicon®Ultra 100 kDa (Millipore), obtendo ao fim em uma única amostra a concentração em 3,08 mg/mL.

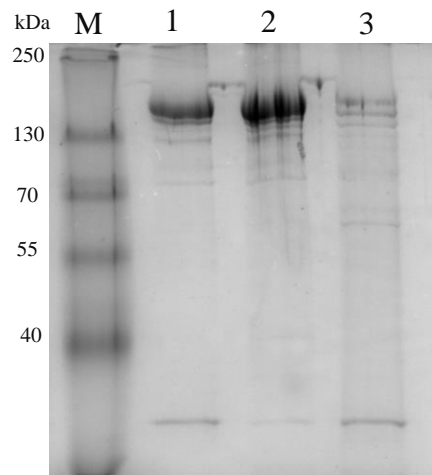


Figura 8: SDS-PAGE 12% da purificação por cromatografia gel filtração. M – marcador PageRuler™ Ladder de peso molecular 250 kDa (Thermo Scientific); canaletas 1-3 – frações contendo a LwCas13a.

5.2. Obtenção das ferramentas para detecção de ZIKV

5.2.1. RNA guia (crRNA)

A fim de observar a integridade e qualidade da purificação do crRNA, os nucleotídeos foram submetidos a análise por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% corado com nitrato de prata. A purificação foi realizada utilizando o kit RNAXP clean beads (Beckman Coulter), seguindo-se a metodologia descrita pelo fabricante. Pode-se observar na figura 4, um produto íntegro, onde crRNA aparece no tamanho esperado, entre 89 kb, embora tenha sido encontrado duas bandas inferiores o que presumimos que sejam resultantes de produtos de transcrição pela enzima T7 (Fig. 9). O rendimento do crRNA foi analisado por espectrofotometria, partindo-se de 1µL do material do crRNA purificado que teve uma média de 2111,7 ng/µL.

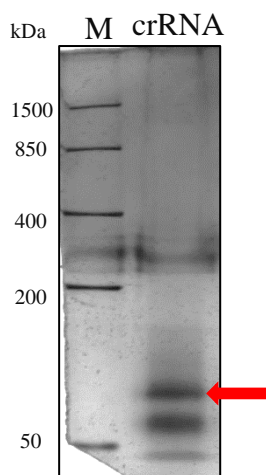


Figura 9: Qualidade do crRNA em SDS-PAGE 12% corado com nitrato de prata. M – Marcador FastRuler DNA Ladders Low range (Thermo Scientific) e canaleta 1 – crRNA purificado (a seta indica a banda referente ao tamanho exato do crRNA).

5.2.2. dsDNA alvo

Para realizar os testes de detecção a partir de dsDNA, o mRNA de ZIKV foi extraído e submetido a reação de transcrição reversa (RT) em diferentes concentrações. Após a obtenção de cDNA a partir do mRNA de zika, foram realizadas PCR utilizando-se o respectivo cDNA como molde e primers desenhados com base na sequência obtida por GOOTENBERG et al. (2017). Os produtos desta reação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 2%, resultando em fragmentos de 172 pares de bases, e estas se encontram íntegras, com poucos arrastes e pouquíssimas contaminações. Observa-se na figura 10A, nas canaletas de 1 a 5 apresentaram uma diminuição gradativa na intensidade das bandas devido a diminuição nas concentrações de cDNA adicionado às reações, respectivamente. Em seguida, realizamos reações de transcrição reversa e amplificação de cDNAs de amostras clínicas a partir de mRNAs extraídos de ZIKV (Fig. 10B).

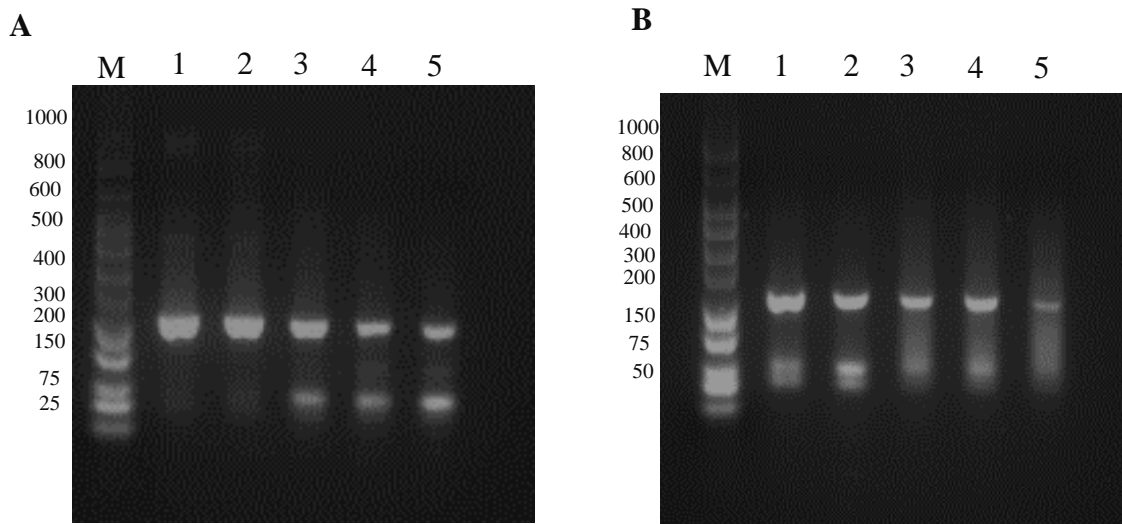


Figura 10: Análise por eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de amplificação por PCR de dsDNA. **A:** M – Marcador 1kb DNA Ladder (Cellco); 1-5 – amplificação de cDNA a partir de concentrações variadas de mRNA de ZIKV. **B:** M – Marcador 1kb DNA Ladder (Cellco); 1-5 amplificação de dsDNA a partir de amostras clínicas de mRNA de ZIKV.

5.2.3. RNA alvo (ssRNA)

Para realizar os ensaios com detecção a partir de ssRNA, os produtos de cDNA foram transcritos por T7 por 16 horas, purificados e submetidos a análise por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% corado com nitrato de prata. Observar-se na canaleta 2, um produto íntegro, onde ssRNA aparece no tamanho esperado, entre 172 kb (Fig. 11). O rendimento do RNA alvo foi analisado por espectrofotometria, obtendo uma média de 105 ng/ μ L.

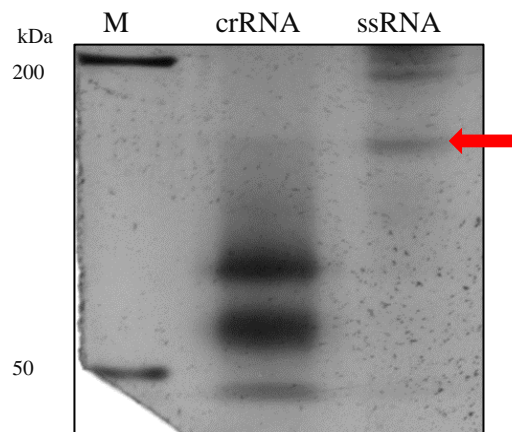


Figura 11: Qualidade do RNA alvo em SDS-PAGE 12% corado com nitrato de prata. M – Marcador FastRuler DNA Ladders Low range (Thermo Scientific); canaleta 1 – crRNA e canaleta 2 – RNA alvo purificado (a seta indica a banda referente ao tamanho exato do RNA alvo).

5.3. Otimização dos ensaios para ZIKV

5.3.1. Detecção utilizando ssRNA

Inicialmente, a atividade de clivagem colateral da CRISPR/Cas13a e a sensibilidade de detecção ao RNA alvo foram examinadas pela primeira vez. A proteína LwCas13a juntamente com o crRNA que visam reconhecer o mRNA de vírus zika, RNA fluorescente RNaseAlert v2, inibidor de RNase e duas concentrações distintas de ssRNA purificados de vírus zika foram incubados por 3 horas a 37°C. Para o controle negativo, não foram adicionados oligos de vírus Zika, o que demonstrou uma degradação inespecífica de fundo correspondente ao RNaseAlert (background). Em contraste, observamos nos ensaios que continham ssRNA na mistura, à medida que a concentração de ssRNA aumentou conseqüentemente os níveis de intensidades de fluorescência também aumentou, indicando ser diretamente proporcional às concentrações de RNA alvo (Fig. 12). Além disso, descobrimos a partir deste ensaio, que a proteína LwCas13a não exibia nenhuma atividade de RNase inespecífica, o que nos permitiu prosseguir com os ensaios posteriores de detecção.

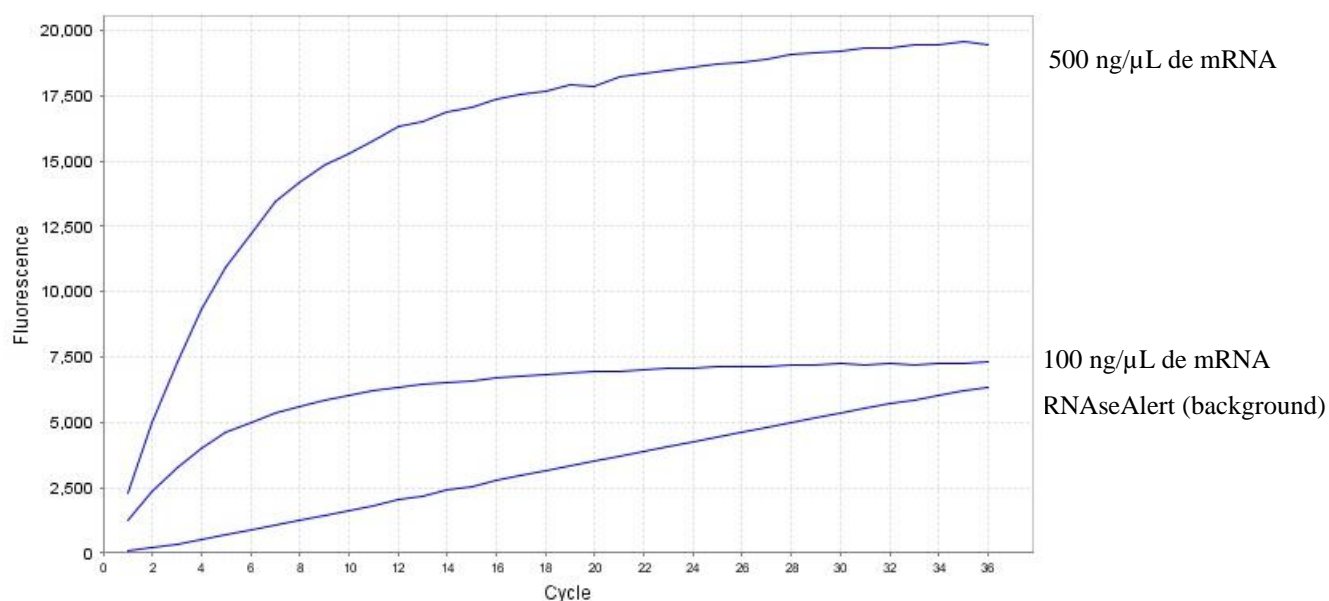


Figura 12: Medição cinética por fluorescência da atividade de LwCas13a utilizando concentrações diferentes de RNA alvo pré amplificado. A menor concentração obteve menor intensidade de fluorescência (100 ng/μL), enquanto em maior concentração (500 ng/μL) houve um aumento significativo na intensidade de fluorescência.

5.3.2. Detecção utilizando dsDNA

Como o mecanismo de CRISPR/Cas13a tem como alvo a molécula de RNA, introduzimos no ensaio a enzima T7 usando como alvo o cDNA pré-amplificado, o que possibilitou a etapa de transcrição junto a LwCas13a em uma única reação. Para demonstrar a sensibilidade do método proposto, uma série de concentrações de dsDNA foram aplicadas no sistema, no entanto, pode-se observar que em menores concentrações de dsDNA houve maior nível da intensidade de fluorescência, enquanto em maiores concentrações de alvo houve uma diminuição considerável de fluorescência no sistema de detecção pela LwCas13a (Fig. 13).

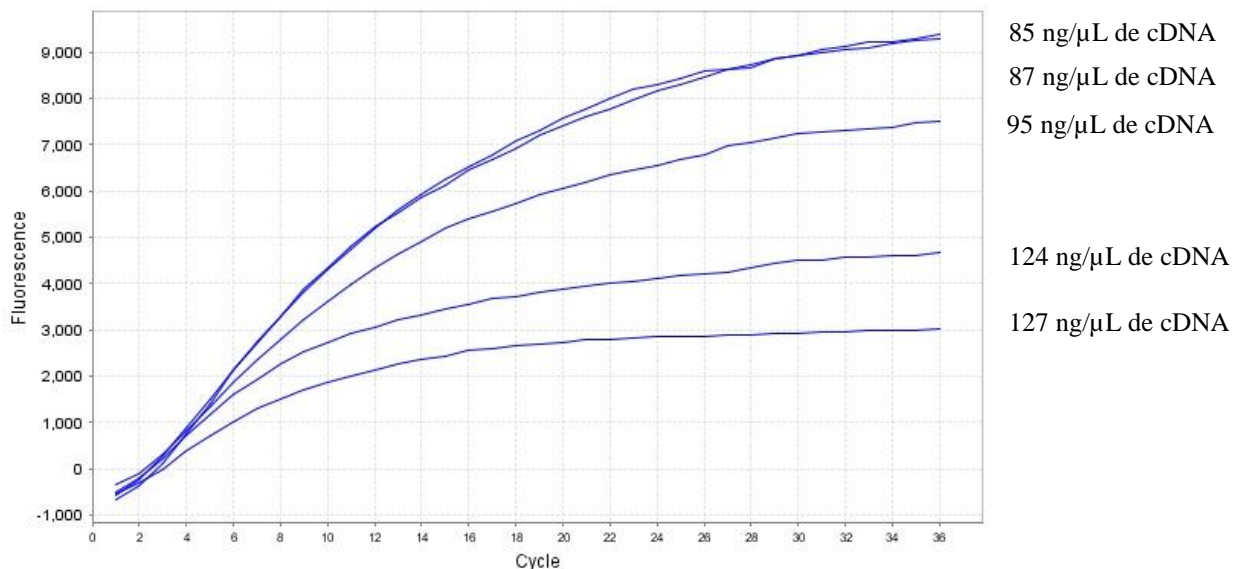


Figura 13: Medição cinética por fluorescência da atividade de LwCas13a utilizando diferentes concentrações de cDNA pré amplificado no ensaio com transcrição pela T7. As menores concentrações de cDNA (85-87 ng/μL) atingiram os maiores picos de fluorescência, enquanto as maiores concentrações obtiveram menores níveis (124-127 ng/μL).

5.3.3. Detecção utilizando amostras clínicas

Posteriormente, para avaliar a viabilidade da LwCas13a em amostras clínicas foi utilizado amostras extraídas de soro humano contaminado por ZIKV. Todas as 5 amostras usadas foram previamente confirmadas por qRT-PCR quanto à presença de RNA do vírus Zika. Notavelmente, os dados mostraram que o sistema foi eficiente em reconhecer e degradar RNA alvo de ZIKV em todas as amostras testadas. Conforme observado na figura 14, pode-se ainda

constatar que houve consistência com os resultados anteriores quanto aos níveis de fluorescência desproporcional com as concentrações de dsDNA aplicados aos ensaios.

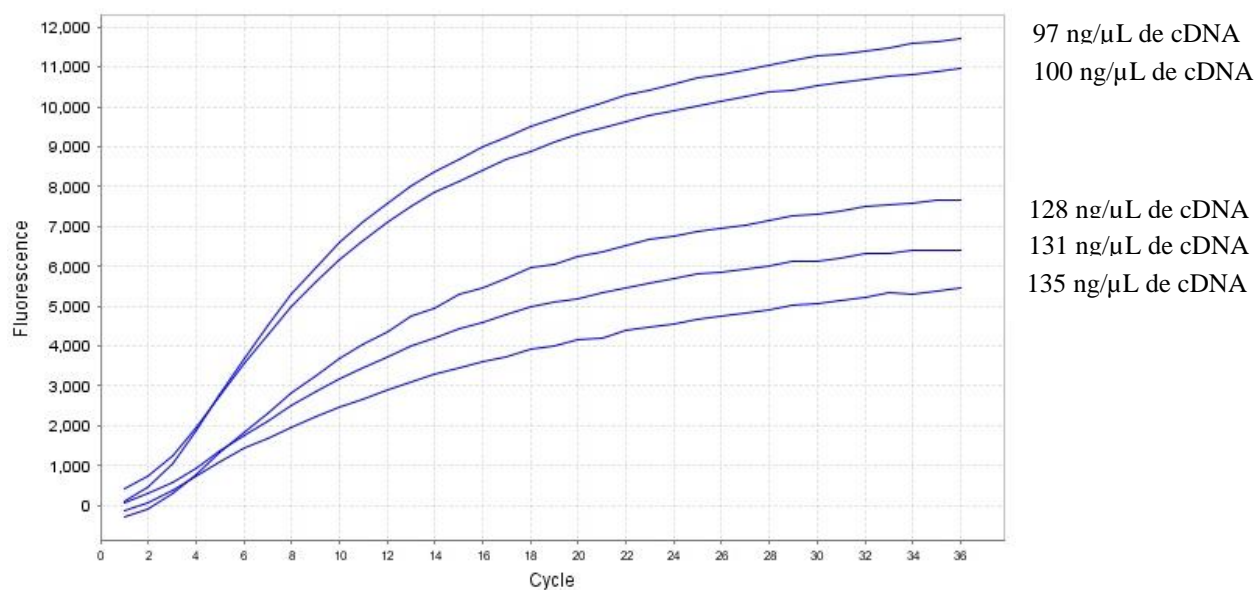


Figura 14: Medição cinética por fluorescência da atividade de LwCas13a utilizando amostras clínicas pré

5.4. Obtenção das sondas para malária *vivax*

5.4.1. RNA guia (crRNA)

Após os oligonucleotídeos de DNA referentes ao crRNA serem anelados, transcritos e purificados utilizando o kit RNAXP clean beads (Beckman Coulter), as sequências de crRNA foram submetidas em análise por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12% corado com nitrato de prata, a fim de observar a integridade e qualidade da transcrição e purificação. Pode-se observar na figura 15, um produto íntegro, onde crRNA aparece no tamanho esperado, entre 75 kb, embora tenha sido encontrado duas inferiores o que presumimos que sejam resultantes de produtos também de transcrição pela enzima T7 (Fig. 4). O rendimento do crRNA foi analisado por espectrofotometria, partindo-se de 1μL do material do crRNA purificado que teve uma média de 2200,5 ng/μL.

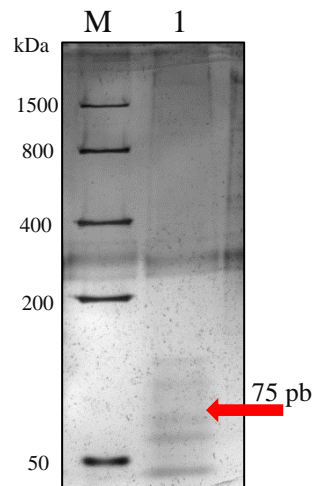


Figura 15: Qualidade do crRNA em SDS-PAGE 12% corado com nitrato de prata. M – Marcador FastRuler DNA Ladders Low range (Thermo Scientific) e canaleta 1 – crRNA purificado (a seta indica a banda referente ao tamanho exato do crRNA).

5.4.2. RNA alvo (ssRNA)

Um total de 250 ng/ μL de DNA de *Plasmodium vivax* foram obtidos da extração a partir de um volume de 5 mL de sangue coletado. Após obtenção do DNA, foi realizada PCR utilizando-se o respectivo DNA e os primers referentes ao gene *mdr-1*. O produto desta reação foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, resultando em fragmento de aproximadamente 550 pares de base, observa-se um produto íntegro e sem banda inespecífica (Figura 16).

Para realizar os ensaios com detecção a partir de ssRNA, os produtos de DNA foram transcritos por T7 por 16 horas e purificados. O rendimento do RNA alvo foi analisado por espectrofotometria, obtendo uma média de 8,5 ng/ μL

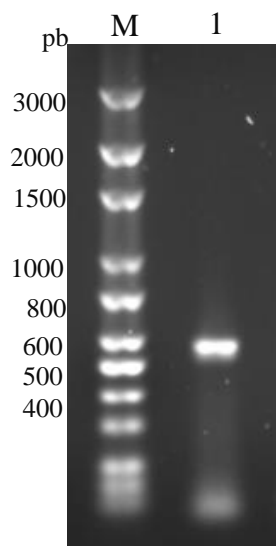


Figura 16: Análise por eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de amplificação por PCR de dsDNA de malária. M – Marcador 3kb DNA Ladder (Cellco); canaleta 1: amplificação de cDNA a partir de mRNA de *Plasmodium vivax*.

5.5. Otimização dos ensaios para malária

5.5.1. Ensaios de detecção com alvos de malária vivax

No teste de detecção para malária vivax, as moléculas de ssRNA purificadas foram submetidas a diluições seriadas na base 10 para avaliar a capacidade de detecção de alvo no método. Para isto, utilizou-se um pool da amostra de RNA como controle, em seguida foram realizadas diluições seriadas deste pool (1:10; 1:100; 1:1.000). Volume igual de tampão TE foi usado como controle negativo. No entanto, observar-se que as diluições aplicadas no ensaio, inclusive o controle, não demonstraram aumento no nível de fluorescência, indicativo de que não houve reconhecimento pelo sistema CRISPR/Cas13a ao alvo (Fig. 17). Ensaios posteriores foram empregados com moléculas de DNA em diferentes concentrações nos ensaios visando obter detecção, entretanto em nenhum houve resultados positivos (dados não mostrados).

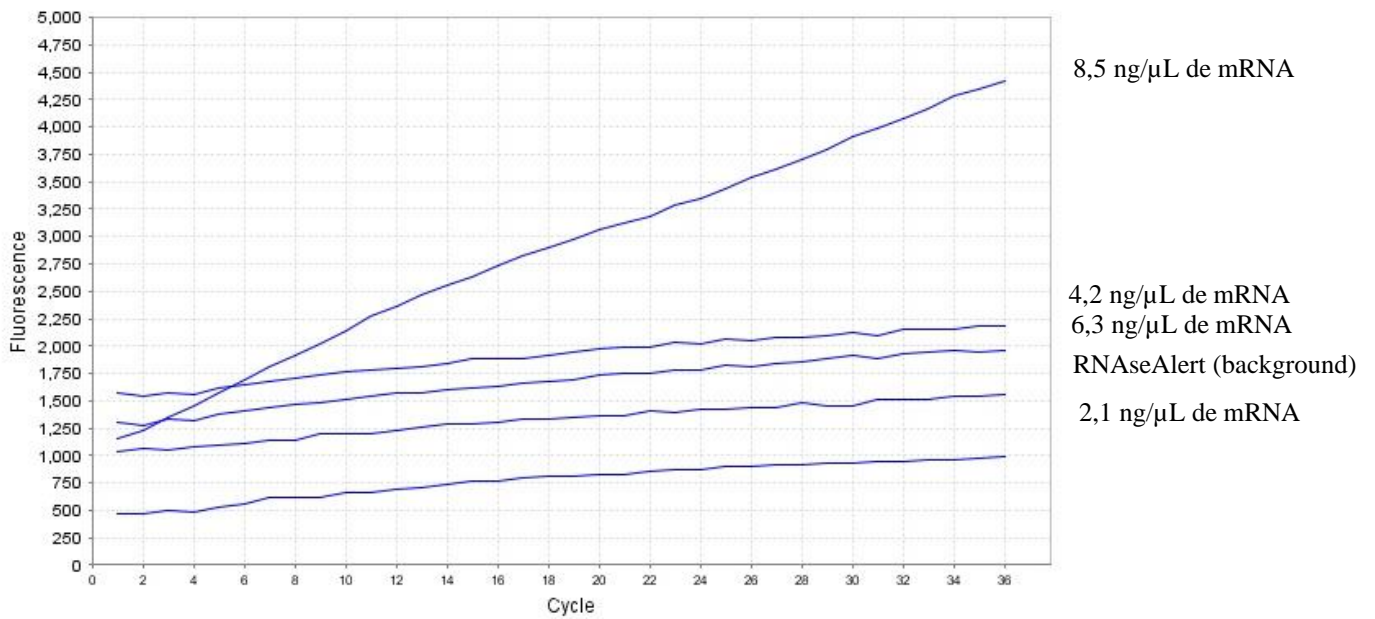


Figura 17: Medição cinética por fluorescência da atividade de LwCas13a utilizando concentrações diferentes de mRNA de *P. vivax*.

6. DISCUSSÃO

O diagnóstico direcionado as doenças infecciosas é de grande relevância médica devido aos surtos recorrentes de infecção, sua rápida propagação geográfica e pela gravidade das complicações clínicas (MAUK et al., 2017). Para o controle dessas infecções, é primordial a identificação precisa e sensível, de modo a estabelecer o correto tratamento dos pacientes e medidas profiláticas direcionadas. Para tanto, o desenvolvimento da tecnologia CRISPR / Cas13a (SHERLOCK) apresenta diversas vantagens sobre os diagnósticos moleculares tradicionais, como os testes de amplificação de ácido nucleico (PCR) ou testes baseados em antígenos, mostrando-se não ser menos eficiente que a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (qRT-PCR) (GOOTENBERG et al., 2017, 2018; METSKY et al., 2018).

Neste estudo produzimos testes de detecção baseado nesta tecnologia para alvos de malária *vivax* e ZIKV, explorando ainda avaliar seu desempenho em amostras clínicas. Para tal, escolhemos o ortólogo Cas13a de *Leptotrichia wadei* (LwCas13a) com base em sua característica de detecção com alta sensibilidade (50 pM) de RNA alvo, além de não exigir PFS (protospacer flanking site), o que lhe permite clivar em qualquer sequência do alvo (GOOTENBERG et al., 2017; KELLNER et al., 2019).

Na primeira parte do trabalho realizamos ensaios de indução para obter uma proteína recombinante LwCas13a altamente expressa, solúvel e que possa ser purificada em grandes quantidades para realização dos ensaios de detecção. Para isso, as linhagens de *E. coli* testadas nesse trabalho foram as BL21 e Rosetta-gami sob diferentes condições de cultivo. Após a lise celular, foi observado em SDS-PAGE um bom rendimento volumétrico do produto recombinante quando submetemos a linhagem *E. coli* Rosetta em resposta as combinações de cultivo: a adição de 500 mM de IPTG, cultivo a 37°C por 16 horas. Um fator que pode ter influenciado a produção da proteína recombinante LwCas13a bem como as quantidades acumuladas, estar nas combinações do vetor pC013 - huLwCas13a para a célula hospedeira, combinações estas que podem estar no estresse da proteína interesse para a célula hospedeira, os níveis basais e induzidos da polimerase T7 na linhagem de expressão, entre outros (JIA; JEON, 2016; ROSANO; CECCARELLI, 2014). Além disso, nos resultados obtidos por *western-blot* duas bandas foram reveladas, sendo que uma delas em tamanho aproximado de 138,5 kDa. A visualização destas duas bandas sugere uma degradação por proteases durante o processo de expressão da proteína recombinante.

Após os ensaios de expressão, prosseguiu-se com as etapas de purificação a partir da fração solúvel. Deste modo, a proteína foi purificada pela primeira vez por cromatografia de afinidade em coluna de streptavidina e, em seguida, sujeita a processamento a adição da protease SUMO para separar a etiqueta de fusão TwinStrep–SUMO, proporcionando um isolamento inicial da proteína de interesse de outras proteínas da cultura. Em análise por SDS-PAGE e posteriormente por *western-blot* das frações eluídas, verificou-se a existência de bandas de maior intensidade com peso molecular próximo da proteína LwCas13a (138,5 kDa).

Devido ainda restar uma quantidade significativa de proteínas contaminantes de baixa massa molar, a fração com marcação digerida foi submetida à cromatografia por filtração em gel. Esta segunda purificação eliminou principalmente os contaminantes de baixa massa molar (abaixo de 100 kDa), pode-se observar em gel de SDS-PAGE nitidamente a banda da proteína de interesse com rendimento de aproximadamente de 3,08 mg/mL, embora tenha apresentado ainda algumas bandas de tamanho inferior que presumimos serem contaminantes ou clivagem da proteína resultante das etapas de purificação. No entanto, pode-se considerar que a purificação de proteína foi satisfatória, uma vez que foram obtidos rendimentos comparáveis na literatura utilizando um processo desenvolvido em menos etapas de purificação (COX et al., 2017; GOOTENBERG et al., 2017). Além disso, foi demonstrado na literatura que a LwCas13a pode ser purificada em uma única etapa e ainda ser utilizada Ni-Sepharose por possuir uma cauda de histidina em sua etiqueta, o que poderia reduzir os custos e facilitar o processo (SAVINOVA et al., 2018). Assim, consideraremos que ainda é possível uma otimização no processo de purificação da proteína.

Simultaneamente a purificação de LwCas13a, projetamos sequências de crRNA para se ligar a sequência de 28 nucleotídeos referentes ao RNA alvo de ZIKV, baseado no protocolo de Kellner et al. (2019). Inicialmente, avaliamos a atividade específica de LwCas13a montando a reação com a molécula de ssRNA de ZIKV em duas concentrações distintas e ambas hibridizaram com o crRNA, onde foi possível confirmar de forma quantitativa em relação das abundâncias de alvo. Como pode ser observado, em maior concentração (500 ng/μL) resultou em ativação aumentada e acúmulo do sinal mais rápido de fluorescência, onde foi possível obter a detecção do alvo em menos de 30 minutos (sexto ciclo). Inserimos aos ensaios um controle negativo apresentando uma degradação basal inespecífica de fundo referente ao RNaseAlert

(background), o que nos confirmou ser inevitável remover ou inativar todas as RNases apesar de conter o inibidor de RNase na reação. Nossos resultados estão em concordância com os dados referentes ao controle negativo foram consistentes com os resultados publicados anteriormente por Savinova e colaboradores (2018).

Com a obtenção dos resultados positivos, prosseguimos com os ensaios avaliando concentrações variadas de dsDNA no sistema, onde foi observado que todas as concentrações apresentaram resultados positivos. Para confirmar sua utilidade clínica, das 5 amostras positivas pelo qRT-PCR, todas foram detectadas pela técnica. Curiosamente, foi observado uma maior fluorescência nas concentrações menores de dsDNA, enquanto nos ensaios que foram submetidos em maiores quantidades obtivemos diminuição da fluorescência. Este fato pode ser explicado por um possível feedback negativo da enzima Cas13a ao aumento da concentração de DNA, o qual até o momento não foi publicado reportado na literatura.

Enquanto na avaliação de detecção para malária *vivax*, foi constatado em nosso ensaio que não houve reconhecimento da molécula alvo pelo sistema, embora tenha sido observado, em diferentes concentrações de alvo, atividade de degradação basal inespecífica referentes ao RNaseAlert, como já descrito anteriormente. Acreditamos que esses resultados negativos se devem ao comprimento inferior da sequência de reconhecimento do crRNA para efetuar clivagem de ssRNA. Constatamos que LwCas13a requer espaçadores de pelo menos 28 nt de comprimento para clivar com eficiência o ssRNA alvo (KELLNER et al., 2019). Abudayyeh e colaboradores (2016) utilizaram a Cas13a de *Leptotrichia shahii* (LshCas13a) e em seus resultados mostraram que a proteína cliva o ssRNA exclusivamente ao reconhecer sequências alvo de 22-28 nt complementares ao espaçador do crRNA, que deve conter uma estrutura de pelo menos 24 nt de comprimento.

Diante disso, trabalhos futuros terão por objetivos desenhar novas sequências sintéticas para malária *vivax* visando permitir a correta identificação da proteína ao alvo, assim como aplicar aos ensaios um número maior de amostras infectadas por ZIKV de modo a permitir sua aplicabilidade em amostras clínicas. Além disso, inúmeras outras aplicações em potencial permanecem, dada a ampla gama de doenças infecciosas, bem como doenças genéticas acometidas no mundo. Outra possibilidade é atrelar essa técnica à biossensores eletroquímico para detecção local de doenças infecciosas para medir os níveis de mRNA em

amostras de soro de pacientes infectados em menor tempo, agilizando o processo de diagnóstico.

Esta abordagem é uma alternativa inovadora que merece uma investigação completa de seu potencial, pois grande parte do impacto desses ensaios dependerá dos detalhes da implementação. Indo além dos estudos de prova de conceito para um número maior de amostras relevantes sob condições reais, há grande expectativa aplicação futura deste novo método em campo, como em posto de atendimento e em hospitais, com notável sensibilidade, especificidade, velocidade e custo. À medida que as verdadeiras características de desempenho e os limites para detecção são determinadas e as especificações técnicas para um teste implantável são otimizadas, as possibilidades transformadoras dessa abordagem de diagnóstico e sua capacidade de atender à demanda atual por revolucionar o diagnóstico de doenças infecciosas se tornam cada vez mais claras.

A partir destes resultados, demonstramos a aplicabilidade do uso da tecnologia CRISPR /Cas13a como um método versátil para detecção de moléculas alvo de RNA e DNA do vírus zika. Estudos posteriores buscaram aplicar esta metodologia a um número maior de amostras e utilizando métodos isotérmicos para tornar esta metodologia mais rápida e prática em campo, assim como desenvolver novos alvos moleculares para diagnóstico de malária utilizando esta tecnologia.

7. CONCLUSÕES

Analisando os resultados obtidos nesse estudo, concluímos que:

- ✓ A melhor condição de indução da proteína recombinante LwCas13a encontrada foi a combinação do uso da cepa de *E. coli* Rosetta-gami, com IPTG (0,5 mM), a 21°C, por 16 horas;
- ✓ O uso de cromatografia por afinidade em coluna de Streptavidina e filtração em gel permitem o isolamento da proteína LwCas13a em estado funcional ativo;
- ✓ Os métodos empregados para a produção de crRNA e ssRNA alvo foram eficientes, sendo possível obter ao final altas concentrações destas ferramentas moleculares;
- ✓ O sistema de detecção CRISPR-Cas13a padronizado é aplicável a detecção de amostras clínicas de vírus Zika obtidas na região amazônica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUDAYYEH, O. O. et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. **Science (New York, N.Y.)**, v. 353, n. 6299, p. aaf5573, 5 Aug. 2016.
- ARIAS, M. et al. Clinical Evaluation of the Microscopic-Observation Drug-Susceptibility Assay for Detection of Tuberculosis. p. 44, 2007.
- BAR-HAIM, E. et al. Early Diagnosis of Pathogen Infection by Cell-Based Activation Immunoassay. **Cells**, v. 8, n. 9, p. 952, 22 Aug. 2019.
- BHATTACHARYYA, R. P.; THAKKU, S. G.; HUNG, D. T. Harnessing CRISPR Effectors for Infectious Disease Diagnostics. **ACS Infectious Diseases**, v. 4, n. 9, p. 1278–1282, 2018.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Crop Journal**, v. 5, n. 5, p. 407–415, 1976.
- COX, D. B. T. et al. RNA editing with CRISPR-CAS13. v. 0180, n. October, p. 1–15, 2017.
- GOOTENBERG, J. S. et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. **Science (New York, N.Y.)**, v. 356, n. 6336, p. 438–442, 28 Apr. 2017.
- GOOTENBERG, J. S. et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. **Science (New York, N.Y.)**, v. 360, n. 6387, p. 439–444, 2018.
- HAUCK, T. S. et al. Nanotechnology diagnostics for infectious diseases prevalent in developing countries. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 4–5, p. 438–448, 2010.
- JANI, I. V. et al. Multiplexed immunoassays by flow cytometry for diagnosis and surveillance of infectious diseases in resource-poor settings. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 4, p. 243–250, 2002.
- JIA, B.; JEON, C. O. High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli: Current status and future perspectives. **Open Biology. Royal Society of London**, 1 Aug. 2016.
- JONES, K. E. et al. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990–993, 21 Feb. 2008.

KELLNER, M. J. et al. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. **Nature Protocols**, v. 14, n. 10, p. 2986–3012, 2019.

LEE, W. G. et al. Nano/Microfluidics for diagnosis of infectious diseases in developing countries. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 4–5, p. 449–457, 2010.

LELAND, D. S.; GINOCCHIO, C. C. Role of cell culture for virus detection in the age of technologyClinical. **Microbiology Reviews**, Jan. 2007.

MAUK, M. G. et al. Point-of-Care Molecular Test for Zika Infection. **Clinical laboratory international**, v. 41, p. 25–27, Jun. 2017.

MAY, R. M.; GUPTA, S.; MCLEAN, A. R. Infectious disease dynamics: What characterizes a successful invader? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. **Anais...Royal Society**, 29 Jun. 2001

METSKY, H. C. et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. **Science**, v. 360, n. 6387, p. 444–448, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). World malaria report 2017. **World Health Organization (WHO)**, Libray Cataloguing-in-Publication, 2015. Geneva. Disponível em:<
<http://www.who.int/malaria/publications>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). World malaria report 2018. **World Health Organization (WHO)**, Libray Cataloguing-in-Publication, 2018. Geneva. Disponível em:<
<http://www.who.int/malaria/publications>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). World malaria report 2019. **World Health Organization (WHO)**, Libray Cataloguing-in-Publication, 2019. Disponível em:<
<http://www.who.int/malaria/publications>

PILLAY, E. et al. Evaluation of automated malaria diagnosis using the Sysmex XN-30 analyser in a clinical setting. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 15, 22 Dec. 2019.

PLOURDE, A. R.; BLOCH, E. M. A literature review of zika virusEmerging Infectious Diseases. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC)**, 1 Jul. 2016.

RAY, B.; GHEDIN, E.; CHUNARA, R. Network inference from multimodal data: A review of

approaches from infectious disease transmission *Journal of Biomedical Informatics*. **Academic Press Inc.**, , 1 Dec. 2016.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges *Frontiers in Microbiology*. **Frontiers Research Foundation**, 2014.

SAVINOVA, A. et al. CAS13A: Purification and use for detection of viral RNA. **Bulletin of Russian State Medical University**, v. 7, n. 2, p. 21–25, 2018.

SIQUEIRA, A. M. et al. *Plasmodium vivax* Landscape in Brazil: Scenario and Challenges. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 95, n. 6 Suppl, p. 87–96, 28 Dec. 2016.

TANG, Y.; FU, Y. Class 2 CRISPR/Cas: an expanding biotechnology toolbox for and beyond genome editing. **Cell & bioscience**, v. 8, p. 59, 2018.

TAUIL, P. L. The status of infectious disease in the amazon region *Emerging Infectious Diseases*, Apr. 2009.

TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 1979.

WANG, Y. et al. Application of nanodiagnostics in point-of-care tests for infectious diseases *International Journal of Nanomedicine*. **Dove Medical Press Ltd.**, , 4 Jul. 2017.