MÉTODO PARA DETECTAR INSERCIONES DE ESPACIADORES EN ESTRUCTURAS CRISPR

TECNOLOGÍA PATENTADA

DATOS DE CONTACTO:

Relaciones con la Empresa
Oficina de Transferencia de Resultados de la Investigación-OTRI
Universidad de Alicante
Tel.: +34 96 590 99 59
Email: areaempresas@ua.es
http://innoua.ua.es

RESUMEN

Las repeticiones CRISPR forman parte de un sistema inmunitario descrito recientemente en procariotas. Las agrupaciones de repeticiones CRISPR contienen intercaladas secuencias espaciadoras únicas que sirven de guía para reconocer y degradar ácidos nucleicos infecciosos. El grupo de investigación de Microbiología Molecular de la Universidad de Alicante ha desarrollado un novedoso método que permite la selección positiva de adquisición de espaciadores en estructuras CRISPR artificiales denominadas módulos de inserción.

Este procedimiento se caracteriza porque permite detectar integraciones de espaciadores mediante una selección independiente de la inmunización conferida por dichos espaciadores. La inserción de un espaciador en los módulos artificiales produce un cambio en la fase de lectura de un gen testigo adyacente, generándose una proteína funcional. La constatación de la correspondiente actividad proteica permite identificar aquellas células en las que ha tenido lugar la adquisición. Se buscan empresas interesadas en adquirir esta tecnología para su explotación comercial.



INTRODUCCIÓN

A lo largo de la evolución, los organismos procariotas (bacterias y arqueas) han desarrollado distintos mecanismos de defensa para protegerse frente a la invasión de elementos externos (plásmidos, virus, etc.).

Entre estos mecanismos de defensa, se encuentran las eliminaciones o modificaciones de los receptores de membrana para evitar la adsorción de virus, los mecanismos que evitan la introducción del material genético de virus en la célula y las enzimas de restricción (que cortan el DNA invasor en secuencias diana específicas). A estos mecanismos defensivos, cabe añadir otro más: **el sistema inmune CRISPR-Cas.**

El sistema inmune CRISPR-Cas es un novedoso mecanismo de defensa que se caracteriza por poseer un carácter **altamente adaptativo**, ya que permite a las células procariotas incorporar en su genoma fragmentos de DNA exógeno que servirán como guía para identificar futuros invasores y evitar su infección. Se trata de un mecanismo **heredable**, transmitiendo por tanto el beneficio de la inmunización a las células hijas.

Los sistemas CRISPR-Cas se han identificado en la mayoría de las arqueas y en aproximadamente la mitad de las bacterias analizadas hasta la fecha. Cada sistema individual está constituido por una o varias agrupaciones de repeticiones de DNA denominadas **CRISPR** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) y un conjunto de genes que codifican las

proteínas **Cas** (CRISPR associated), funcionalmente relacionadas con las CRISPR.

Estas repeticiones se encuentran regularmente espaciadas por secuencias no reiteradas (denominadas **espaciadores**), algunas de las cuales derivan de fragmentos genéticos móviles (tales como plásmidos y virus). Adyacente a cada agrupación de repeticiones-espaciadores, hay una **secuencia líder** donde se localiza el promotor responsable de la transcripción de esta región para generar un transcrito denominado pre-crRNA.

Los sistemas CRISPR-Cas producen la **degradación del DNA exógeno** que contiene secuencias complementarias a los espaciadores.

Un sistema CRISPR-Cas activo es capaz de insertar nuevos espaciadores entre el líder y la repetición contigua (proceso denominado adquisición). Esta inserción conlleva la duplicación de la repetición adyacente al sitio de la inserción. La adquisición de un nuevo espaciador proporciona inmunidad frente a las moléculas que contiene la secuencia de la cual deriva. Para ello, los pre-crRNAs son procesados dando lugar a las moléculas de crRNA que contienen un único espaciador. Cada uno de estos crRNAs aparea con su secuencia complementaria en una molécula de DNA, reclutando a continuación proteínas Cas específicas que producen su degradación.

El sistema CRISPR-Cas, además de actuar como un **sistema inmune**, se ha relacionado con otras funciones tales como la **regulación de la expresión génica** y la **reparación de ácidos nucleicos**.

DESCRIPCIÓN TÉCNICA

La presente invención se refiere a un **método para obtener y detectar inserciones de espaciadores en estructuras artificiales (módulos de inserción)** basadas en repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (**CRISPR**) localizadas dentro de una unidad transcripcional que incluye la secuencia de un gen testigo cuya pauta de lectura de traducción se encuentra desplazada. Una nueva inserción restaura la pauta de lectura del gen testigo, produciendo una proteína funcional (*Figura 1*).

La actividad de dicha proteína permite detectar la inserción del espaciador y seleccionar células adaptadas, independiente de la inmunización proporcionada por el nuevo espaciador.

La unidad CRISPR-espaciador insertada **comprende un número de nucleótidos no múltiplo de tres**.

El espaciador contenido en el módulo de inserción, en el caso de que esté constituido por más de una CRISPR, comprende un **codón de terminación críptico** para evitar seleccionar duplicaciones generadas mediante recombinación homóloga entre repeticiones (*Figura 1*).

El módulo de inserción contiene la secuencia conocida como líder, que habilita la intervención del mecanismo de adquisición.

Para realizar el proceso, se parte de cultivos de células con la construcción artificial, de los que se extiende un volumen determinado en medio de cultivo sólido que permite la selección de la actividad proporcionada por la proteína codificada por el gen testigo.

De ese modo, se ha utilizado un gen testigo que confiere resistencia a cloranfenicol y, en consecuencia, se ha seleccionado en medio conteniendo dicho antibiótico. Tras incubar, aparecerán colonias conteniendo presumiblemente una inserción.

Tras descartar, mediante una PCR (Polymerase Chain Reaction) que se trate de un falso positivo, se procede a la extracción del vector con la inserción y a su secuenciación.

El análisis de los espaciadores insertados resulta de utilidad en **estudios del proceso de adquisición**, y estos espaciadores, se pueden utilizar para **proporcionar inmunidad específica frente a elementos genéticos que contengan una secuencia reconocible por el sistema de inmunidad**, similar a la secuencia del espaciador y adyacente a un motivo de 2-3 nucleótidos característicos del sistema particular.

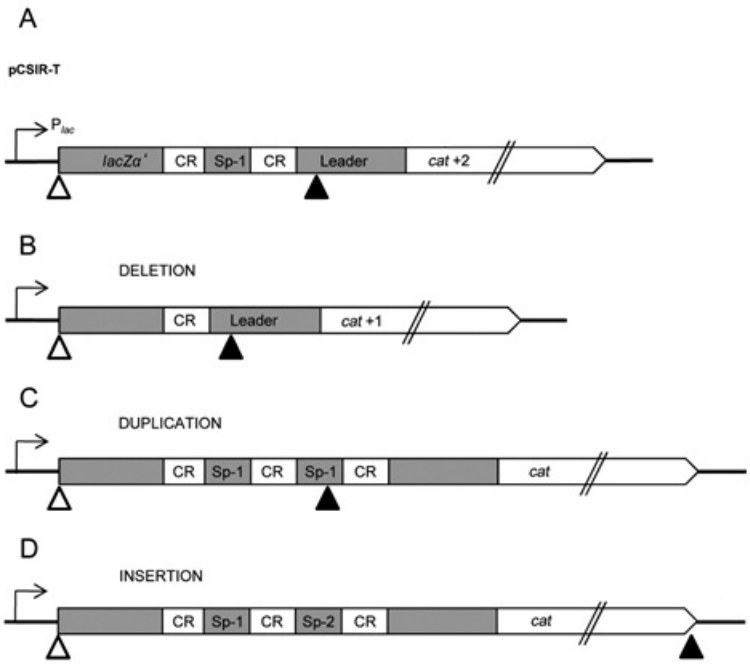


*Figura 1: Representación esquemática del módulo de inserción CRISPR clonado en el plásmido pCSIR-T y de los posibles eventos de inserción y recombinación. (**A**) El módulo de inserción en pCSIR T consta de un líder y dos unidades CRISPR (CR) separadas por un espaciador (Sp-1), fusionado aguas arriba a un fragmento del gen lacZα (lacZα') y, aguas abajo, a la secuencia completa del gen cat fuera de fase (cat+2). Se indica el codón de inicio de la traducción lacZ-α (triángulo blanco). La traducción de los transcritos generados desde el promotor lac (Plac, representado con una flecha) termina en el líder (triángulo negro). La traducción del transcrito generado a partir de Plac acaba en el líder en caso de delección (cat seguiría fuera de fase, cat+1) (**B**), en el espaciador duplicado (Sp-1) en caso de duplicación CRISPR espaciador (**C**), o en el codón de terminación de la secuencia codificante de cat en el caso de la inserción (**D**) de un espaciador nuevo (Sp-2)*

VENTAJAS Y ASPECTOS INNOVADORES

La inserción de nuevas unidades CRISPR-espaciador es un evento poco frecuente cuya detección requiere realizar un escrutinio al azar de las agrupaciones CRISPR de un gran número de clones. Tan sólo cuando dicha adquisición produce un cambio en el patrón de inmunidad (provoca la degradación de nuevas moléculas diana) es posible seleccionar las células adaptadas. Esto causa un sesgo que impide detectar inserción de otros tipos de secuencias y no se puede realizar en cepas donde el sistema de inmunidad CRISPR esté silenciado.

En este sentido, disponer de una **herramienta para detectar las inserciones de los espaciadores mediante una selección independiente de sus consecuencias sobre la degradación de posibles elementos genéticos diana** resulta muy ventajosa respecto a los sistemas no seleccionables utilizados en la actualidad.

ESTADO ACTUAL

Tras múltiples ensayos, se ha conseguido optimizar la tecnología a **nivel laboratorio**.

El grupo de investigación posee el know-how necesario para su **escalado industrial**.

Es posible realizar una **demostración comercial** para aquellas empresas interesadas en explotar comercialmente esta tecnología.

APLICACIONES DE LA OFERTA

La presente invención se enmarca dentro del campo de la Genética, y se refiere a un método para detectar inserciones de espaciadores mediante selección independiente de la interferencia a partir de estructuras artificiales basadas en CRISPR.

Los sistemas CRISPR-Cas encuentran su aplicación en distintos sectores industriales:

- Son una valiosa herramienta para el estudio comparativo entre poblaciones de una misma especie.
- Son de gran utilidad en estudios relacionados con Ecología microbiana y de Metagenómica.
- La manipulación del sistema CRISPR-Cas permite que bacterias de interés biotecnológico puedan conseguir resistencia frente a determinados fagos, o bien evitar la propagación de plásmidos que confieran resistencia a antibióticos.
- Los mecanismos de corte específico guiados por RNA a DNA del sistema CRISPR-Cas, se pueden usar como herramientas tanto en Biología molecular como en Ingeniería genética. En la actualidad, se está optimizando su uso para regulación de expresión génica y edición de genomas (genome editing) de organismos procariotas y eucariotas (incluidas células humanas), permitiendo el silenciamiento y sustitución eficaz de genes in vivo con múltiples aplicaciones, tales como terapia génica en el caso de animales, o modificación de plantas para agroalimentación.

En este sentido, la estructura artificial de la presente invención permite su uso para obtener nuevos espaciadores que sirvan de guía ("anticuerpos") para el sistema.

COLABORACIÓN BUSCADA

Se buscan empresas interesadas en adquirir esta tecnología para su **explotación comercial** mediante:

- Acuerdos de licencia de la patente.
- Búsqueda de oportunidades de financiación para desarrollar nuevas aplicaciones, adaptarlo a las necesidades específicas de las empresas, etc.
- Acuerdos en materia de transferencia de conocimiento.

DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Esta tecnología se encuentra protegida mediante solicitud de patente.

- Título de la patente: “Método para detectar inserciones de espaciadores en estructuras CRISPR”
- Número de solicitud: P201300203
- Fecha de solicitud: 26 de febrero de 2013

SECTORES DE APLICACIÓN (5)

Agroalimentación y Pesca
Biología
Biología Molecular y Biotecnología
Farmacéutica, Cosmética y Oftalmológica
Medicina y Salud