

## Avances en el diseño y construcción de un biosensor para detectar a *Listeria monocytogenes*.

C.M Luna-Castro<sup>1</sup>, L.E Casados-Vazquez<sup>1,2</sup> y J.E Barboza-Corona<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup> Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. <sup>2</sup> Departamento de Alimentos División de Ciencias de la vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. \*Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Molecular. Ex-hacienda El Copal km. 9, carretera Irapuato-Silao; A.P. 311, C.P: 36500, Irapuato, Gto. México. Cel. 4621659334, monlu\_46@hotmail.com<sup>1</sup>, [josebar@ugto.mx](mailto:josebar@ugto.mx)\*

### RESUMEN:

La listeriosis es una enfermedad infecciosa bacteriana grave que se puede presentar tanto en los seres humanos como en los animales. En los humanos la bacteria responsable de esta enfermedad infecciosa es *Listeria monocytogenes* (*Lm*). Esta bacteria es un patógeno intracelular facultativo extensamente difundido en la naturaleza y que se encuentra adaptado para vivir, tanto en suelo como en el citosol de una célula eucariota. El género *Listeria* comprende bacilos Gram-positivos que pueden estar solos o formando cadenas cortas, no producen cápsula ni esporas. Este microorganismo crece a temperaturas que oscilan entre 0 y 45 °C, tolera diferentes rangos de pH (4.5-9.2). *Lm* se transmite principalmente a través de alimentos, llegando a ocasionar cuadros clínicos muy graves en el hombre, como septicemia, gastroenteritis, meningitis y encefalitis. Uno de los mecanismos regulatorios de *Lm* es el sistema Agr, el cual responde a la presencia de un péptido autoinductor (AIP) secretado por la propia bacteria. Este péptido forma parte del sistema de auto-inducción organizado en el operón *agrBDCA*. Debido a la importancia que tiene *Lm* como bacteria en alimentos, en este trabajo presentamos avances relacionados con el diseño y construcción de un biosensor para detectar a *Lm* aplicando principios de Biología Sintética.

**Palabras clave:** Biosensor, *Listeria monocytogenes* y sistema Agr.

### ABSTRACT:

Listeriosis is a serious bacterial infectious disease of humans and animals. In humans, *Listeria monocytogenes* (*Lm*) is the bacterium responsible to produce this infectious disease in humans. This bacterium is a facultative intracellular pathogen widely distributed in nature and it is adapted to live in both, soil and in the eukaryotic cytosol. The genus *Listeria* is constituted by Gram-positive bacilli that can be as a single cell or forming cell short chains, they neither produce capsule nor spores. This microorganism grows at temperatures ranging from 0 to 45 °C, and tolerates different pH values (4.5-9.2). *Lm* is transmitted mainly through food, and is responsible to produce serious clinical conditions in man, such as septicemia, gastroenteritis, meningitis and encephalitis. One of the regulatory mechanisms of *Lm* is the Agr system, which responds to presence of an extracellular autoinducing peptide (AIP), secreted by the same bacterium. Due to the importance of *Lm* as a food borne pathogenic bacterium, in this work we will show preliminary data about the design and construct of a biosensor to detect *Lm* using principles of Synthetic Biology.

## INTRODUCCIÓN

El género *Listeria* comprende bacilos Gram positivos que pueden estar solos o formando cadenas cortas, no producen cápsula ni esporas. Este microorganismo crece a temperaturas que oscilan entre 0 y 45 °C, tolera diferentes rangos de pH (4,5- 9,2) y sobrevive a altas concentraciones de NaCl (Rocourt y Buchrieser 2007). La listeriosis es una enfermedad infecciosa bacteriana grave del hombre. La bacteria responsable de esta es *Listeria monocytogenes* (*Lm*) la cual es un patógeno intracelular facultativo extensamente difundido en la naturaleza y que se encuentra adaptado para vivir (Vázquez *et al.*, 2001). *Lm* se transmite principalmente a través de alimentos, llegando a ocasionar cuadros clínicos muy graves como septicemia, gastroenteritis, meningitis y encefalitis. El grupo de mayor riesgo comprende a los recién nacidos, individuos inmunocomprometidos, mujeres embarazadas y adultos de la tercera edad (Wagner y McLauchlin 2008). Además de contar con genes implicados en la virulencia, *Lm* tiene la capacidad de formar biopelículas, que son capaces de adherirse a una gran variedad de superficies incluyendo acero inoxidable, poliestireno y vidrio (Mafu *et al.*, 1991). Se ha descubierto que las bacterias también producen y responden a señales extracelulares producidas por otras bacterias. Este mecanismo de comunicación intercelular se denomina “quorum sensing” (QS). Las bacterias comunican su presencia a las demás usando pequeñas moléculas de señalización química denominadas autoinductores (AIs) o feromonas. Las moléculas autoinductoras en bacterias Gram positivas son pequeñas fracciones de oligopéptidos modificados, que le confieren a la bacteria la capacidad para comunicarse de forma específica (Williams *et al.*, 2005). El ejemplo más conocido de estos sistemas de QS es el descrito en *Staphylococcus aureus* denominado Agr (por sus siglas en inglés (*accessory gene regulator*)) (Barrett y Hoch 2008). El género *Listeria* consta de este sistema (*agr*) que desempeña un papel crítico en la producción de biopelículas, la expresión de factores de adhesión e internalinas. En el género *Listeria* los cuatro genes *agrBDCA* se organizan como un operón, los cuales codifican para un sistema de dos componentes (*agrC/agrA*), una histidina cinasa (*agrC*), un regulador de respuesta (*agrA*), un péptido precursor (*agrD*) y una proteína que está implicada en el procesamiento de *agrD* (*agrB*) en un péptido cíclico autoinductor AIP (por sus siglas en inglés *autoinducer peptide*) (Wright *et al.*, 2005). El AIP es un péptido de siete a nueve residuos con los cinco residuos C-terminal envueltos en un anillo de tiolactona. En la estructura de anillo, la cadena lateral de cisteína está directamente relacionada con el resto de ácido carboxílico en el residuo C-terminal. Los objetivos que se desarrollaran en este trabajo son: (i) Generar un módulo para detectar a *Lm* e introducirlos en *E. coli*, (ii) comprobar la funcionalidad del biosensor mediante su activación usando el péptido autoinductor AIP y (iii) demostrar la efectividad del biosensor para detectar *Lm*. Por otro lado, el desarrollo de biosensores usando la Biología Sintética es relativamente nuevo, y se han desarrollado para detectar compuestos como el arsénico en agua, carne en descomposición y bacterias patógenas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae* (Saeidi *et al.*, 2011; Hwang *et al.*, 2014; Holowko *et al.*, 2016). Sin embargo, hasta el momento no se tienen reportes del desarrollo de un biosensor para detectar *L. monocytogenes*. En este trabajo se diseñó y se construirá un biosensor para detectar a *Lm*, hasta el momento se cuenta con la primera parte del circuito biológico y se está trabajando con la elaboración de la segunda, para así lograr obtener el biosensor; a la par se está trabajando con la producción recombinante del péptido autoinductor.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Primeramente, se realizó un análisis para diseñar un módulo genético que nos permitiera detectar a *Lm*. Ya que previamente se han introducido genes de *Lm* en *E. coli* y expresado proteínas funcionales (Grammarini *et al.*, 2003; Rieu *et al.*, 2007), esperamos que AgrA y AgrC se sinteticen y plieguen de manera correcta formando proteínas activas. Para lograr lo anterior, se realizó una búsqueda en la plataforma de NCBI para obtener la secuencia del genoma de *Lm*. Una vez que se obtuvo esta, se localizaron los genes que codifican para el operón del sistema agr (*agrBDCA*). Con esta información se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar los genes *agrC*, *agrA* con su terminador, esto se llevó a cabo la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase de Thermo Scientific, las condiciones de amplificación fueron: un paso de desnaturalización inicial de 98°C /30s, 30 ciclos (98°C /10 s, 55 °C/30 s, 72°C /35s) y una extensión final de 72°C /5 min, posterior almacenamiento a 12°C. Los genes *agrC*, *agrA* están regulados por el promotor *cspA* del vector pCold, conformando la primera construcción *cspA-agrC-agrA-term/pCold*. La expresión de estos genes se llevará a cabo mediante qPCR. Este operón codifica para una proteína transmembranal AgrC que actuará como proteína sensora tipo cinasa, la cual detectará al péptido AIP y fosforilará a la proteína reguladora AgrA activándola (AgrA-P). La segunda construcción con la que se está trabajando actualmente, está localizada rio abajo, y estará conformada por un gen reportero (*rfp*) bajo el control del promotor pII (pII-RFP), el cual se activará por acción de AgrA-P, se sintetizará RFP y se podrá detectar la presencia de *Lm*. Con las piezas genéticas anteriores se pudo lograr armar el biosensor (Figura 11 A). La primera construcción fue clonada en el vector pCold y se fue introducida en *E. coli* Top 10 por electroporación y cultivada en agar-LB suplementado con ampicilina (100mg/mL); Se obtuvo el DNA plasmídico de varias de las transformantes y la selección de una clona positiva se llevó a cabo mediante un análisis de restricción con las enzimas KpnI y BamHI, la digestión se monitoreo en geles de agarosa al 1%. El PCR se realizó con los DNA's de las clonas positivas, y como control positivo se utilizó DNA proveniente de *Lm*, esto para corroborar la amplificación de los genes *agrC*, *agrA* y su terminador en las construcciones y por último el DNA obtenido se mandó secuenciar.

Por otra parte, se corroborará la funcionalidad del biosensor, mediante la inducción del sistema con la proteína autoinductora de *Lm* (AIP). Esta se producirá de manera recombinante en *E. coli*, tal y como se ha hecho con el AIP de *S. aureus*, el cual fue expresado recombinantemente en *E. coli* y purificado para los ensayos (Malone *et al.*, 2007). Para este caso, la secuencia *agrD* que codifica para el AIP se localizó en el genoma de *Lm*, como aún no se ha descrito la secuencia exacta del AIP proveniente de *Lm* se diseñaron diferentes juegos de oligonucleótidos específicos para obtener diferentes tipos de AIP y posterior a esto fueron hibridados (95°C por 5 min posterior a esto se bajó la temperatura hasta 25°C), los productos hibridados fueron digeridos con las enzimas de restricción EcoRI y NdeI por 2 horas a 37°C. Posteriormente el DNA digerido se purificó con el PCR purification Kit Jena Bioscience. Los fragmentos generados se clonaron en el vector pTXB1 previamente digerido con las enzimas de restricción EcoRI y NdeI por 2 horas a 37°C y estos fueron introducidos en *E. coli* Top 10 por electroporación y cultivados en LB-agar con ampicilina (100 mg/mL). Se obtendrá el DNA plasmídico de varias de las transformantes y la selección de una clona positiva será llevada a cabo con enzimas de restricción, PCR y por secuenciación. Se codificará una proteína de fusión entre la AIP y la inteina presente en el vector, se expresará y purificará por cromatografía de afinidad. Posteriormente se liberará el AIP de la resina

de acuerdo al protocolo establecido por el proveedor (Malone *et al.*, 2007). Una vez purificado el AIP, se realizarán pruebas para saber cuál es la cantidad necesaria para activar el biosensor. *E. coli* Top10/pColdI- *cspA-agrC-agrAterm-pII-rfp* se inoculará en 5 mL de LB suplementado con ampicilina y se crecerán durante la noche en agitación a 200 rpm y a 37°C. Posteriormente los cultivos se diluirán hasta a 0.2 a 600 nm y se cultivarán nuevamente hasta una densidad óptica de 0.5. Los cultivos se transferirán a una placa de 96 pocillos en alícuotas de 200 µL, se cuantificará el AIP y se agregarán concentraciones molares variables de AIP para conocer la concentración mínima necesaria para activar el biosensor. La placa se incubará a 37°C con agitación en un lector de microplacas (Biotek) y se medirá la fluorescencia de la proteína roja, se evaluará por un tiempo de 3 h con intervalos de 10 min entre cada lectura (Saeidi *et al.*, 2011).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

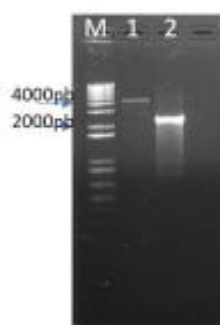
Una vez diseñado el módulo para la detección de *Lm* se llevó a cabo la extracción del DNA de la bacteria y la amplificación de los genes *agrC-agrA* con su terminador, obteniendo un amplicón de aproximadamente 2321 pb (Figura 1 carril 2). El amplicón se digirió, purificó y fue puesto a ligar (Figura 2, carril 2) en el vector pCold (Figura 1, carril 1) previamente digerido (Figura 2, carriles 5 y 6). Se obtuvieron varias clonas positivas, las cuales se observan en la Figura 3 (carriles 1-5), en las cuales se liberan dos fragmentos de 2321pb (inserto) y 4400 pb (vector) cuando la construcción fue digerida con KpnI y BamHI. Una vez obtenida la clona positiva, se realizó PCR para amplificar el fragmento (genes *agrC* y *agrA* con su terminador) de las clonas positivas (Figura 4 carriles 2-5), de los cuales se decidió trabajar con la que se encuentra en el carril 3 que es la clona C-22 ya que se logra observar una mejor amplificación, se utilizó un control positivo utilizando DNA proveniente de *Lm* (Figura 4 carril 1).

Posteriormente se logró la amplificación de la secuencia promotora pII proveniente de *Lm* con un tamaño de 237pb (Figura 5 carril 1 y 2), una vez amplificada la secuencia, se procedió a hacer una digestión con las enzimas de restricción BamHI y PstI toda la noche a 37°C y después se purificó y cuantificó (Figura 6 carril 1 y 2). También se amplificó el gen *rfp* con un tamaño de 730 pb (Figura 7 carril 1), una vez amplificado se digirió con la enzima PstI toda la noche a 37°C, se purificó y cuantificó (Figura 8 carril 2).

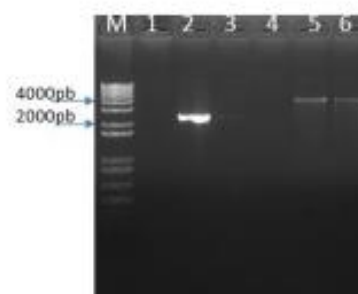
Para el diseño de los oligonucleótidos del péptido autoinductor (AIP), se procedió a hacer varios juegos. Una vez diseñados se diluyeron a 100 µM y se tomaron 20µL de oligonucleótido directo y 20 µL del oligonucleótido reverso de cada juego, fueron hibridados a 95°C por 5 min y se dejó bajar la temperatura hasta 25°C. Una vez hibridados se digirieron por 16h a 37°C con las enzimas NdeI y EcoRI, y se purificaron (Figura 9 carriles 1-4). El vector pTXB1 se digirió por 16h a 37°C y se purificó (Figura 9 carril 5).

Se realizó una curva de crecimiento de *Lm* para ver su comportamiento durante 64 h, haciendo lecturas de la densidad óptica cada 3h. Para esto 45 mL de medio LB fueron inoculados con 500 µL con un cultivo de 12h de crecimiento, todo esto se realizó a una temperatura de 37°C (Figura 10), en el cual se pudo observar que a las 16h hay un decremento en la densidad y otro después de las 30h.

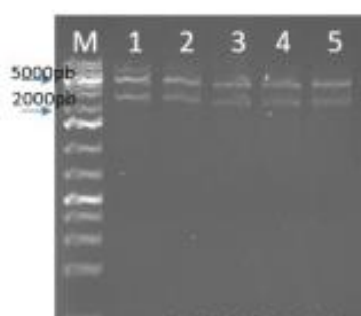
Hasta el momento se cuenta con la primera construcción que conforma nuestro biosensor (Figura 11 B), se está trabajando con la segunda, y en la parte de la producción del péptido recombinante se está trabajando con la ligación de esta construcción para después proceder a purificarlo.



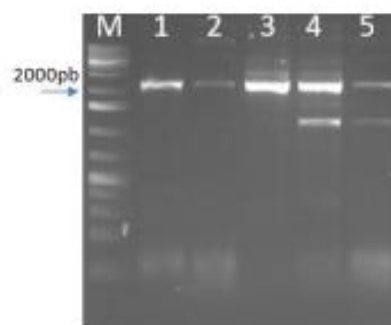
**Figura 1.** Vector pCold y amplificación de genes *agrC-agrA term*. M: Marcador de 1Kb, Carril 1: Vector pCold, Carril 2: Amplificación de los genes *agrC-agrA term*



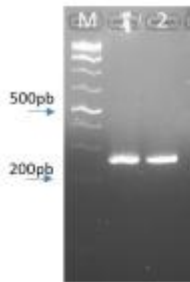
**Figura 2.** Fragmento y vector listo para ligar. M: Marcador de 1Kb, Carril 2: genes *agrC-agrA term* digeridos y purificados, Carril 5 y 6: vector pCold listo para ligar



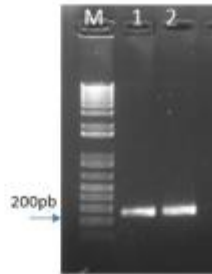
**Figura 3.** Clonas positivas pCold-*agrC-agrA term*/*E. coli* Top 10. M: Marcador de 1Kb, Carriles 1-5: Clonas positivas



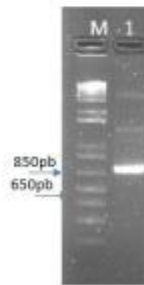
**Figura 4.** Amplificación de los genes *agrC-agrA term* en clonas positivas. M: Marcador de 1Kb, Carril 1: Control positivo DNA *Lm* Carril 2: Clona C-7, Carril 3: Clona C-22, Carril 4 y 5: Clonas C-13 y C-14



**Figura 5.** Amplificación de la secuencia promotora pII. M: Marcador de 1Kb, Carril 1 y 2: Amplificación promotor *pII* *L. monocytogenes*



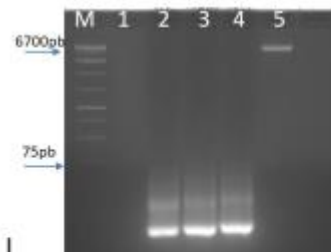
**Figura 6.** Secuencia promotora pII lista para ligar. M: Marcador de 1Kb, Carril 1 y 2: secuencia promotora digerida y purificada



**Figura 7.** Amplificación del gen reportero *rfpM*: Marcador de 1Kb, Carril 1: Amplificación gen *RFP*



**Figura 8.** Gen *rfp* listo para ligar. M: Marcador Kb, Carril 2: gen *rfp* purificado y digerido



**Figura 9:** Aip hibridados, digeridos y purificados Marcador de 1Kb, Carril 1: A+M, Carril 2: A+AM, Carril 3: A+AKM, Carril 4: A+AKSM, Carril 5: Vector digerido y purificado pTXB1

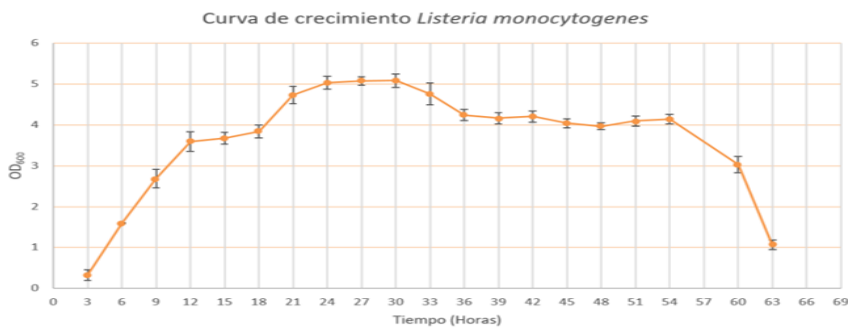


Figura 10. Curva de crecimiento *Listeria monocytogenes*



Figura 11. Diseño del biosensor y avances

- A) Diseño del biosensor con las piezas genéticas provenientes de *Lm*
- B) Avances del biosensor constituido por la primera construcción

## BIBLIOGRAFÍA

- Rocourt, J. Buchrieser, C (2007). Chapter 1: The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy, and Identification.
- Vázquez-Boland, J. Kuhn, M. Berche, P. Chakraborty, T. Domínguez-Bernal, G. Goebel, W (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol*; 14: 584-640.
- Wagner, M. McLauchlin, J (2008). Chapter 1: Biology. Liu D, editor. Handbook of *Listeria monocytogenes*. CRC Press, Taylor & Francis Group; p. 3-25.
- Mafu, A A., Roy, D., Goulet, J., Savoie, L (1991). Characterization of physicochemical forces involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces. *Appl Environ Microbiol* 57, 1969–1973.
- Williams, T. Bauer, S. Beier, D. and Kuhn, M (2005). Construction and characterization of *Listeria monocytogenes* mutants with in-frame deletions in the response regulator genes identified in the genome sequence. *Infect Immun*. 73:3152–3159.
- Barrett, JF. Hoch, JA (1998). Two-component signal transduction as a target for microbial anti infective therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 42: 1529–36.
- Wright, JS. Traber, KE. Corrigan, R. Benson, SA. Musser, JM. Novick, RP (2005). The agr radiation: an early event in the evolution of *Staphylococci*. *J Bacteriol* 187:5585-94.

- Saeidi Nazanin, Won Choon Kit, Lo Tat-Ming, Nguyen Hung Xuan, Ling Hua, Leong Susanna Su Jan, Poh Chueh Loo and Wook Chang Matthew (2011). Engineering microbes to sense and eradicate *Pseudomonas aeruginosa*, a human pathogen *Molecular Systems Biology* 7; Article number 521.
- Hwang In Young, Tan Mui Hua, Koh Elvin, Ho Loong Chun, Poh Loo Chueh, and Chang Wook Matthew (2014). Reprogramming Microbes to Be Pathogen-Seeking Killers School of Chemical and Biomedical Engineering, Nanyang Technological University Nanyang Drive, Singapore. *ACS Synth Biol.* 2014, 3, 228–237
- Holowko, BM. Wang, H. Jayaraman, P. and Poh, LC. (2016). Biosensing *Vibrio cholerae* with genetically engineered *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol.*
- Grammarini, C. Andreoni, F. Amagliani, G. Casiere, A. Barocci, S and Magnani, M (2003). High-level expression of the *Listeria monocytogenes* listeriolysin O in *Escherichia coli* and preliminary characterization of the purified protein. *Protein Expression and Purification* 28 (2003) 78–85.
- Rieu, A. Weidmann, S. Garmyn, D. Piveteau, P. Guzzo, J (2007). Agr system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: Role in adherence and differential expression pattern. *Appl Environ Microbiol.* 73,6125–6133.
- Malone, CL. Boles, BR. and Horswill RA (2007). Biosynthesis of *Staphylococcus aureus* Autoinducing Peptides by Using the *Synechocystis* DnaB Mini-Intein. Department of Microbiology, Roy J. and Lucille A. Carver College of Medicine, University of Iowa, Iowa City, Iowa 52242.