

Perspectivas en el desarrollo de un biosensor para detectar y destruir *Pseudomonas aeruginosa*

G. Casique-Arroyo¹, F. M. Gutiérrez-Sánchez², K. L. Macías-Sánchez³, J. E. Barboza-Corona^{1,2*}

¹Posgrado en Biociencias, Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca. ²Ingeniería en Alimentos, Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca. Departamento de Alimentos. ³Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería, Campus Guanajuato, Instituto Politécnico Nacional. josebar@ugto.mx

RESUMEN:

En el presente trabajo se proyecta la generación de un biosensor que permita la detección de *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria patógena de interés en alimentos, tomando como chasis *Escherichia coli*. En el contexto evolutivo, las bacterias han mejorado sus mecanismos para la producción de biopelículas, logrando una mejor adhesión a superficies sólidas. El chasis ha sido transformado con los genes necesarios para detectar al patógeno a través de quórum sensing, siguiendo las reglas de estandarización del iGEM. Asimismo, se pretende introducir el gen que sintetiza la proteína reportera GFP para indicar la presencia del patógeno a través de un cambio en fluorescencia. Además, también se consideró la inserción de un módulo que codifique una alginato liasa y un péptido antimicrobiano para la destrucción de la biopelícula y del patógeno, respectivamente. Ambos genes estarán bajo el control del promotor *lasI* que se activará únicamente tras la detección de *P. aeruginosa*.

Palabras clave: Alimentos, biología sintética, biopelículas, biosensor, *P. aeruginosa*, patógeno.

ABSTRACT:

In the present work the generation of a biosensor, which allows the detection of *Pseudomonas aeruginosa*, a pathogenic bacteria of interest in foods is scheduled, taking *Escherichia coli* as chassis. In the evolutionary context, bacteria have improved their mechanisms for the biofilm production, achieving a better adhesion to solid surfaces. The chassis has been transformed with the necessary genes to detect the pathogen through quorum sensing, following the rules of standardization of the iGEM. It is also intended transforms the chassis with a gene that synthesizes the GFP as reporter protein to indicate the presence of the pathogen through a shift in fluorescence. In addition, the insertion of the module containing an alginate lyase and an antimicrobial peptide for the destruction of the biofilm and the pathogen, respectively, was also considered. Both genes will be under the control of the *lasI* promoter that will be activated only after detection of *P. aeruginosa*.

Keywords: Biofilms, biosensor, foods, *P. aeruginosa*, pathogen, synthetic biology.

INTRODUCCIÓN

El género *Pseudomonas* es un grupo de bacterias ecológicamente significativo, incluye bacilos móviles aerobios ampliamente distribuidos en la naturaleza y caracterizados por su elevada versatilidad metabólica, manteniendo requerimientos nutrimentales simples. *Pseudomonas* spp. es encontrado en hábitats naturales incluyendo suelo, agua fresca, ambientes marinos; sin embargo, también ha sido aislado de instrumentos clínicos y soluciones asépticas (Franzetti y Scarpellini, 2006). Algunas especies son de importancia médica puesto que son considerados patógenos oportunistas para humanos y animales (Palleroni, 1992). *P. aeruginosa* es un patógeno Gram-negativo, ubicuo y oportunista, generalmente asociado con infecciones nosocomiales (Lyczak y col, 2000; Obritsch y col. 2005), reconocido como el principal patógeno oportunista en humanos, siendo causante de infecciones en pacientes inmunocomprometidos (Kerr y Snelling, 2009).

Los polisacáridos de la superficie celular desempeñan un papel importante en la interacción con el medio ambiente y en la formación de biopelículas estructuradas (Miller y Lam, 2008). Las biopelículas representan una comunidad bacteriana inmersa en una matriz extracelular conformada por proteínas, DNA y exopolisacáridos, proporcionando notable protección a las bacterias contra antibióticos, puesto que disminuyen su penetración (Høiby y col. 2010; Colvin y col. 2011). Se sabe que las bacterias han evolucionado sus mecanismos para la producción de biopelículas, asegurando así, una adhesión exitosa a superficies sólidas. Las biopelículas bacterianas poseen una arquitectura especializada que asegura el bienestar de las células que lo conforman (Mena y Gerba, 2009), y su producción depende de moléculas señalizadoras involucradas en la comunicación celular o quórum sensing. Se sabe que la habilidad de *P. aeruginosa* para formar biopelículas es un factor importante para asegurar el éxito de este organismo en las infecciones a humanos (Khan y col. 2010).

La Biología sintética o Ingeniería biológica es un área de la ciencia que trata de aplicar la tecnología, los procesos y herramientas de la ingeniería a la biología para facilitar la creación de nuevos sistemas biológicos benéficos para el ser humano (Barboza, 2016). La Biología sintética tiene aplicaciones en diversas áreas y la alimentaria no es la excepción, destacando que, *Bacillus subtilis* ha sido usado como chasis para detectar carne en descomposición. Dicha bacteria fue transformada con un promotor que se activa con los volátiles liberados por la carne en descomposición, el cual induce la síntesis de una cromoproteína que provoca que la bacteria se ponga amarilla (Daszczuk y col. 2014). Otra de las aplicaciones es en el área biomédica, donde precisamente se tiene el reporte de dos biosensores para detectar y aniquilar a *P. aeruginosa*, utilizando como chasis *E. coli*, como proteína sensora LasR, una piocina como péptido antimicrobiano y enzimas como la DNasaI y la proteína 7 para destruir las biopelículas formadas por la bacteria (Saedi y col. 2011; Hwang y col. 2014). Asimismo, dentro de la competencia iGEM (“International Genetically Engineered Machine”) se han desarrollado biosensores usando como chasis *Lactococcus lactis* NZ9800 para detectar *P. aeruginosa* mediante la proteína LasR y *Staphylococcus aureus*, mediante la proteína AgrA. Además, incluyeron la dispersina para destruir las biopelículas, la lactonasa para evitar la proliferación de *P. aeruginosa* y la nisina como antimicrobiano de *S. aureus* (<http://2014.igem.org/Team:Groningen>).

El enfoque del presente proyecto es desarrollar un sensor bacteriano que permita detectar e indicar la presencia del patógeno *P. aeruginosa* en alimentos, mediante un cambio en la fluorescencia, utilizando un promotor de *Bacillus thuringiensis* que permita la expresión constitutiva de *lasR* y a su vez, regule la activación del promotor *lasI* fusionado a *gfp*, que se activará cuando la proteína LasR se una a una homoserin lactona (HsL) producida por *P. aeruginosa*. Puede observarse que hay una necesidad

inminente por desarrollar tratamientos novedosos y efectivos que destruyan las biopelículas bacterianas, por ello se propone la destrucción de la biopelícula mediante la producción de una alginato liasa obtenida de *B. thuringiensis*. Finalmente, la aniquilación de la misma bacteria utilizando un péptido antimicrobiano, tal como la microcina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Algunas construcciones fueron estandarizadas según el iGEM (http://parts.igem.org/Main_Page), así como también, ciertas piezas fueron o serán tomadas de los “Biobricks” del iGEM, entre ellas, BBa_K1365997, BBa_K6490001 y BBa_K565004. Se utilizó como chasis (célula huésped) la bacteria *E. coli* TOP10. Los plásmidos utilizados con un *ori* funcional en el chasis fueron pSB1C3 (iGEM) y pColdI (TAKARA BIO INC.). Para la detección de *P. aeruginosa* (modulo A), el chasis fue transformado con *lasR*, el cual actúa como sensor y regulador (Saedi y col. 2011) expresado de manera constitutiva bajo el promotor *pcytA*. Este promotor fue obtenido de *B. thuringiensis* subs. israeliensis 4Q5 a partir de amplificación por PCR, siguiendo las reglas de estandarización del iGEM. En el módulo B, los genes *lasI* y el reportero *gfp* que codifica la proteína verde fluorescente, estarán bajo el control de LasR. El péptido señal de la quitinasa ChiA (*pschiA*) y el gen de la alginato liasa (*algL*) fueron amplificados de *B. thuringiensis* subs. *kenyae* LBIT 404 y *B. thuringiensis* subs. israeliensis 4Q7, respectivamente, mediante PCR. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en termocicladores C1000 Touch, de BioRad, usando Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos diseñados fueron sintetizados en T4 Oligo® Irapuato, Gto. México. La digestión de fragmentos y vectores, así como los análisis de restricción, estuvieron sujetos por las enzimas EcoRI, XbaI, PstI, KpnI (New England Biolabs, Inc), BamHI, SpeI (Invitrogen). Las ligaciones inserto-vector fueron obtenidas mediante la T4 DNA Ligasa (New England Biolabs, Inc.). La transformación de células *E. coli* TOP10 con los genes de interés fue llevada a cabo por electroporación mediante un equipo *E. coli* Pulser de BioRad. La extracción de ADN plasmídico y purificación de PCR fue realizada con kits comerciales (Jena Bioscience), siguiendo las instrucciones del proveedor. La visualización de ácidos nucleicos fue realizada en un fotodocumentador (ChemiDoc™ MP, BioRad). La secuenciación de genes fue realizada en los servicios de secuenciación genómica del Langebio (Cinvestav, Irapuato, Gto.). El análisis de electroferogramas fue realizado mediante el programa FinchTV (v.1.4 Geospiza). La efectividad de la alginato liasa para hidrolizar el alginato y destruir biopelículas de *P. aeruginosa* será previamente demostrado antes de ensamblar el gen de *algL* en el módulo B del biosensor, para ello, la alginato liasa será sobreexpresada en *E. coli* BL21 y purificada mediante una columna de Ni²⁺, posteriormente la enzima será caracterizada. Por otro lado, el gen de la microcina será obtenida de uno de los biobricks reportados en el iGEM, o mediante el diseño de oligonucleótidos específicos. Esta se expresará en *E. coli* y su funcionalidad contra *P. aeruginosa* será analizada mediante la prueba de pozos. Una vez corroborado, el gen de la microcina será ensamblado en el módulo B río abajo de la *algL*. Finalmente, la efectividad del biosensor *E. coli/pcytA-lasR, plasI-gfp-pschiA-algL-bacteriocina* para detectar y destruir *P. aeruginosa* será demostrado *in vitro* al confrontarlo con la bacteria patógena.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En relación a nuestra meta principal, la cual consiste en la generación de un biosensor que no solo detecte e indique la presencia de *P. aeruginosa*, sino que también destruya la biopelícula y a la misma bacteria, se describen los avances siguientes. La construcción del biosensor estará conformada por dos bloques, denominados módulo A y módulo B, los cuales estarán contenidos en *E. coli*, bacteria

hospedera designada como chasis.

Conformación del biosensor (módulo A). El biobrick BBa_K1365997 que contiene el sensor AHL fue transformado en células *E. coli* TOP10 y las transformantes fueron analizadas. En la Fig. 1 se muestra la transformante seleccionada digerida con las enzimas EcoRI/PstI donde se liberan dos fragmentos, uno de ellos corresponde al vector pSB1C3 (2.07 Kb) y el otro al sensor conformado por un promotor (K1033222), un RBS (B0034), el gen *lasR* (C0079) y un doble terminador (B0010, B0012). A partir de esta construcción será seleccionado el gen *lasR* y el doble terminador, y río arriba será insertado el promotor constitutivo *pcytA* de 724 pb que controla la síntesis de *B. thuringiensis* con su propio sitio RBS, el cual ya fue amplificado (Fig. 2), clonado en pSB1C3 y transformado en *E. coli* TOP10. De esta manera, la expresión de LasR estará controlada de manera constitutiva por este promotor, el cual es funcional en *E. coli* y *B. thuringiensis*. Así, el módulo A del biosensor está conformado de la siguiente manera, *E. coli/pcytA-lasR*.

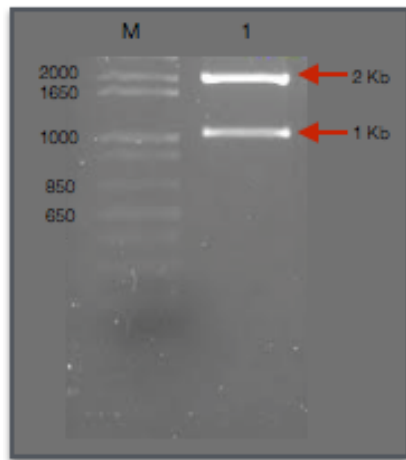


Fig. 1. Biobrick BBa_K1365997 digerido con EcoRI/PstI. M, marcador DNA 1 Kb (pb); carril 1 vector pSB1C3 (2.07 Kb) y sensor AHL (~1 Kb).

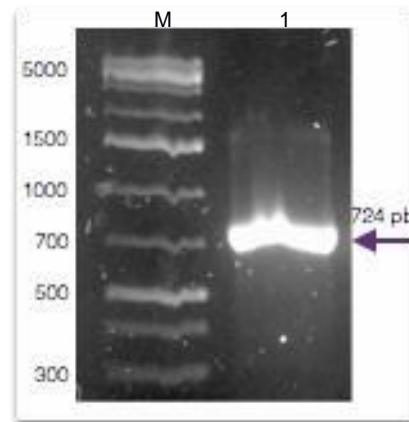


Fig. 2. Amplificación del promotor *pcytA* *B. thuringiensis*. M, marcador DNA 1 Kb (pb); carril 1 amplicón *pcytA* (724 pb).

Río abajo de este módulo será introducida la construcción *plasI-gfp*, donde *lasI* es un promotor que se activa cuando LasR se une a la homoseril lactona (HsL) producida por *P. aeruginosa*, mientras que *gfp* codifica para la proteína verde fluorescente. En la Fig. 3 puede observarse el análisis de restricción de las transformantes *pSB1C3-lasI-gfp*, donde todas las colonias analizadas son positivas, liberándose los fragmentos correspondientes a 2.07 Kb para el vector y de 1018 pb para el promotor *lasI* con el reportero *gfp* (fue seleccionada la colonia 11). De esta manera, el módulo A del biosensor contendrá la parte inicial del módulo B, con la finalidad de corroborar que la detección de *P. aeruginosa* sea exitosa y que a su vez, sea indicado mediante un cambio en la fluorescencia, por lo que el sensor hasta este punto se conforma como *E. coli/pcytA-lasR, plasI-gfp*. Una vez ensamblado el módulo que contenga la proteína reportera, queda pendiente la confrontación del biosensor con la bacteria patógena para demostrar su efectividad en la detección de *P. aeruginosa*.

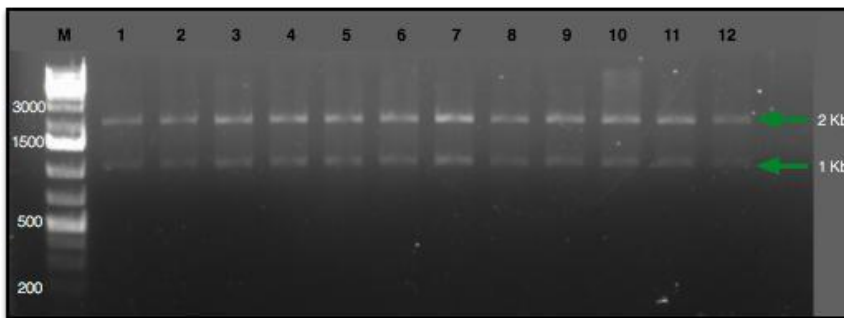


Fig. 3. Análisis de restricción de transformantes *pSB1C3-plasI-gfp*. M, marcador DNA 1 Kb (pb); carril 1-12, restricción de plásmidos con enzimas *EcoRI-PstI*, liberando vector *pSB1C3* (2.07 Kb) e inserto *plasI-gfp* (1.018 Kb).

Conformación del biosensor (módulo B). El módulo B fue designado como *plasI-gfp-pschiA-algL-bacteriocina*. A partir de *E. coli/pcytA-lasR*, *plasI-gfp*, se pretende ampliar el sensor introduciendo los genes que codifican para una alginato liasa y un péptido antimicrobiano que destruyan la biopelícula y a la bacteria, respectivamente. Ambos genes estarán bajo el control del promotor *lasI* que se activará únicamente cuando la proteína LasR se una a la homoseril lactona (HsL) producida por *P. aeruginosa*. Róo arriba de la *algL* se insertará el péptido señal (*pschiA*) de la quitinasa ChiA de *B. thuringiensis*, para permitir la exportación de la proteína al medio de cultivo. En este sentido, mediante oligonucleótidos específicos y PCR se obtuvo un amplicón de 82 pb (Fig. 4), el cual fue digerido con las enzimas BamHI-KpnI, clonado en el vector pColdI y transformado por electroporación en células *E. coli* TOP10. Diez transformantes fueron seleccionadas para la extracción de ADN plasmídico y luego de ser sometidas a PCR se eligieron 4 posibles clonas, las cuales fueron analizadas mediante restricción de plásmido con las enzimas BamHI-KpnI (Fig. 5), apreciándose en todas ellas la correcta liberación del fragmento de 102 pb y del vector pColdI de 4.4 Kb. La construcción del carril 3 fue secuenciada, corroborando que se trata de *pschiA* de *B. thuringiensis*. Así mismo, se logró la amplificación de un probable gen de *algL* obtenido a partir de *B.*

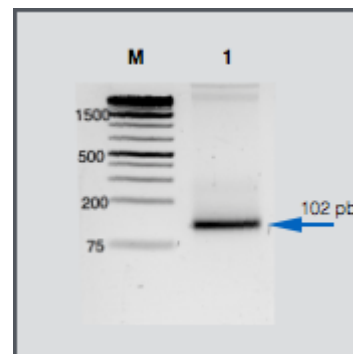


Fig. 4. Amplificación *pschiA*. M, marcador DNA 1 Kb (pb); carril 1, amplicón *pschiA* (102 pb).

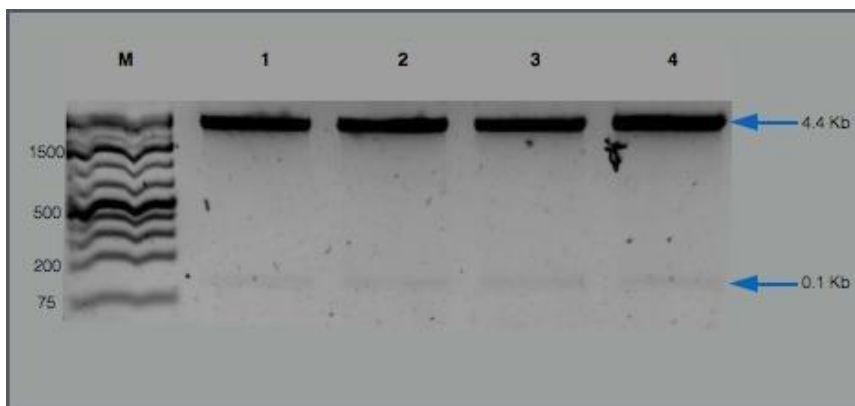


Fig. 5. Análisis de restricción BamHI/KpnI de transformantes pColdI-*pschiA*. M, marcador DNA 1 Kb (pb); carril 1-4, vector pColdI (4.4 Kb) e inserto *pschiA* (0.1 Kb).

24) mediante PCR y restricción de plásmido con las enzimas KpnI-PstI (Fig. 7), observándose una correcta amplificación y liberación del fragmento en ambas colonias. La colonia c-23 fue secuenciada y los resultados del alineamiento en la base del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sugieren que se trata de una nueva alginato liasa.

Por otro lado, previo al ensamble del gen *algL* en el módulo del biosensor, es prioritaria la caracterización y realización de ensayos que indiquen la efectividad de la alginato liasa recombinante para hidrolizar el alginato y destruir biopelículas de *P. aeruginosa*. Para ello, la alginato liasa será sobreexpresada en *E. coli* BL21 y purificada mediante una columna de Ni²⁺, posteriormente la enzima será caracterizada. Así mismo, el péptido antimicrobiano será una proteína capaz de expresarse en *E. coli* y de tener efecto inhibitorio contra *P. aeruginosa*, tal como la microcina, la cual será obtenida de uno de los biobricks reportados en el iGEM (http://parts.igem.org/Main_Page), o bien a través del diseño de oligonucleótidos específicos. Esta se expresará en *E. coli* y su funcionalidad contra *P. aeruginosa* será analizada mediante la prueba de pozos. Una vez demostrado lo anterior, el gen de la bacteriocina será ensamblada en el módulo B. Finalmente, la efectividad del biosensor *E. coli*/pcytA-lasR, plasI-gfp-pschiA-*algL*-microcina para detectar y destruir *P. aeruginosa* será demostrado *in vitro* al confrontarlo con la bacteria patógena.

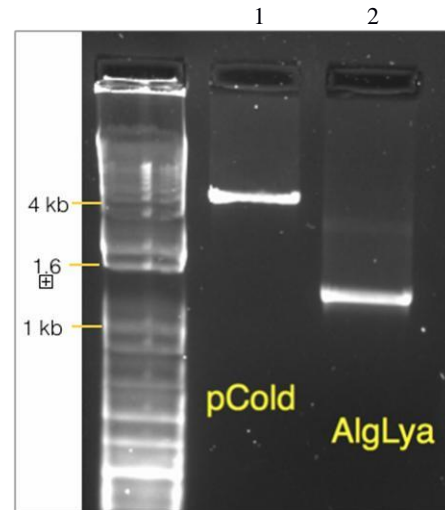


Fig. 6. Digestión de pColdI y Alginato liasa. A la izquierda marcador DNA 1 Kb plus. Carril 1 vector pColdI 4.4 Kb digerido con KpnI-PstI. Carril 2 amplicón correspondiente al gen *algL* de 1347 pb digerido con KpnI-PstI.

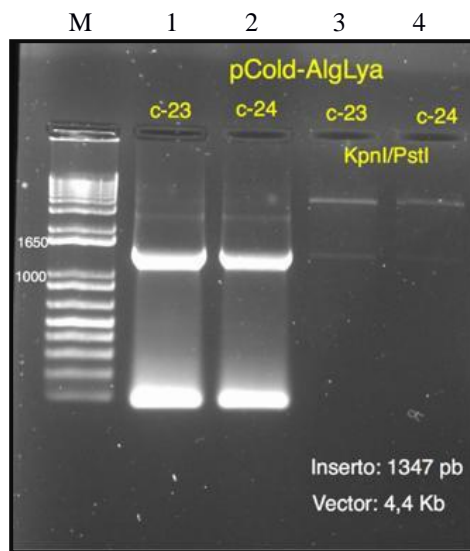


Fig. 7. Análisis de las transformantes c-23 y c-24 con la construcción pColdI-*algL*. M, marcador ADN 1 Kb (pb). Carril 1 y 2, amplificación del gen *algL* (1347 pb); carril 3 y 4, digestión de transformantes con enzimas KpnI-PstI, liberando el vector pColdI 4.4 Kb y el fragmento correspondiente al gen alginato liasa (1347 pb).

Conclusiones. En este trabajo hemos logrado construir parte del biosensor el cual estará conformado por dos módulos, el módulo A formado por *pcytA-lasR* y el módulo B por *plasI-gfp-pschiA-*algL*-bacteriocina*. En la siguiente etapa serán ensamblados ambos módulos y la efectividad del biosensor será analizada. La detección de *P. aeruginosa* mediante un biosensor que indique la presencia de éste patógeno a través de un aumento en la fluorescencia, permitirá una oportuna localización de fuentes contaminantes. Desde el punto de vista clínico, la ruptura de la biopelícula bacteriana formada es de vital importancia para el tratamiento clínico de enfermedades infecciosas, así como para evitar la proliferación de la bacteria en equipos médicos e industriales relacionados con el procesamiento de alimentos. El biosensor final será capaz de detectar e indicar la presencia de *P. aeruginosa* y de producir la alginato liasa y el péptido

antimicrobiano bajo el control de un promotor inducible LasR-HsL, que destruya la biopelícula producida por el patógeno y a su vez, aniquile a *P. aeruginosa*.

AGRADECIMIENTOS

A todos los integrantes del equipo Guanajuato_Mx conformado por estudiantes de la Universidad de Guanajuato, Politécnico Nacional (Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Guanajuato), UNAM (Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León), Instituto Tecnológico de Estudios Superior Campus Querétaro e Irapuato y Universidad Autónoma de Querétaro, quienes participaron en la competencia iGEM en el 2016, y que parte de sus ideas han quedado plasmadas en el trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Barboza, P.U.E (2016). Ingeniería biológica. ¿cómo véis? *Revista de Divulgación de la Ciencia de la Universidad Nacional Autónoma de México* (208), 39.
- Colvin, K. M., Gordon, V. D., Murakami, K., Borlee, B. R., Wozniak, D. J., Wong, G. C., & Parsek, M. R. (2011). The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens*, 7(1), e1001264.
- Daszczuk, A., Dessalegne, Y., Drenth, I., Hendriks, E., Jo, E., van Lente, T., ... & van Raaphorst, R. (2014). *Bacillus subtilis* biosensor engineered to assess meat spoilage. *ACS Synthetic Biology*, 3(12), 999-1002.
- Franzetti, L., & Scarpellini, M. (2007). Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of microbiology*, 57(1), 39-47.
- Højby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, 35(4), 322-332.
- Hwang, I. Y., Tan, M. H., Koh, E., Ho, C. L., Poh, C. L., & Chang, M. W. (2014). Reprogramming microbes to be pathogen-seeking killers. *ACS synthetic biology*, 3(4), 228-237.
- Kerr, K. G., & Snelling, A. M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection*, 73(4), 338-344.
- Khan, W., Bernier, S. P., Kuchma, S. L., Hammond, J. H., Hasan, F., & O'Toole, G. A. (2010). Aminoglycoside resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms modulated by extracellular polysaccharide. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 13(4), 207.
- Lequette, Y., Boels, G., Clarisse, M., & Faille, C. (2010). Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling*, 26(4), 421-431.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L., & Pier, G. B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*, 2(9), 1051-1060.
- Mena, K. D., & Gerba, C. P. (2009). Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. En *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 201, Editado por D.M. Whitacre. Springer US, pp. 71-115.
- Miller, W. L., & Lam, J. S. (2008). Molecular Biology of Cell-surface Polysaccharides En *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Editado por Pierre Cornelis. UK: Caister Academic Press, pp. 87-128.
- Obritsch, M. D., Fish, D. N., MacLaren, R., & Jung, R. (2005). Nosocomial infections due to multidrug-resistant

Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Pseudomonas aeruginosa: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 25(10), 1353-1364.

- Palleroni, N.J. (1992). Human and animal pathogenic pseudomonads. En *The prokaryotes*. A handbook on the biology of Bacteria: Ecophysiology, isolation, identification, applications. Editado por A. Balows, H. Springer Verlag, New York, pp. 3086-3103.
- Saeidi, N., Wong, C. K., Lo, T. M., Nguyen, H. X., Ling, H., Leong, S. S. J., ... & Chang, M. W. (2011). Engineering microbes to sense and eradicate *Pseudomonas aeruginosa*, a human pathogen. *Molecular systems biology*, 7(1), 521.