

MODELADO Y OBTENCIÓN DE BIOSENSORES DE UN BIOPARCHÉ INTELIGENTE COMO POSIBLE TRATAMIENTO A INFECCIONES EN QUEMADURAS

Aguilar Venegas Jessica Montserrat¹, Rincón Pérez Ana Cristina², Gaytán Esparza, Laura Gabriela¹, Torres Mendoza Mijael Alejandro³, Casados Vázquez Luz Edith⁴, Barboza Corona José Eleazar⁴

¹Licenciatura en Ciencias agrogenómicas, ENES-UNAM León, Direcciones de correos electrónicos: mavenegas@comunidad.unam.mx, laugabge01@gmail.com

²Licenciatura en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato, Dirección de correo electrónico: acristina.rincon.perez@gmail.com

³Licenciatura en Ingeniería Biotecnológica, IPN-UPIIG, Dirección de correo electrónico: mijtorm@gmail.com

⁴Posgrado en Biociencias, Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, Direcciones de correos electrónicos: edith.casados@gmail.com, josebar@ugto.mx*

Resumen

El desarrollo de la biología sintética ha permitido el lanzamiento de nuevas tecnologías que han sido de gran ayuda en la medicina. Las quemaduras son un problema importante y el desarrollo de un parche que detecta y combate infecciones ocasionados por bacterias patógenas con ayuda de la biología sintética será de gran utilidad. En este trabajo, nuestro objetivo fue desarrollar un biosensor para detectar *Pseudomonas aeruginosa*. Primeramente demostramos que la Nisina inhibe el crecimiento de *S. aureus* y *E. faecalis* y logramos amplificar el gen de la alginato liasa, que codifica una proteína para destruir las bipelículas de la bacteria. Aun cuando no logramos desarrollar completamente los módulos genéticos, se lograron amplificar algunas piezas que servirán para armar el circuito genético. Adicionalmente ya tenemos a partir del iGEM el módulo que contiene un promotor constitutivo en *E. coli* y *L. lactis*, el sitio de unión al ribosoma y el gen *lasR*, éste último codifica la proteína reguladora que activa positivamente al gen promotor *lasI*. Nos falta amplificar este último promotor para que regule la expresión de la alginato liasa o de la Nisina. Asimismo, nos hará falta demostrar que el biosensor efectivamente detecta a *P. aeruginosa* y es capaz de aniquilarlo para posteriormente desarrollar un parche inteligente.

Abstract

The development of Synthetic Biology has allowed the release of new technologies that are important in medicine. Skin burns are a problem and the development of an intelligent patch that detects and annihilates infections caused by pathogenic bacteria with the aid of Synthetic Biology would be very useful. In this work, our objective was to develop a biosensor to detect *Pseudomonas aeruginosa*. We demonstrate that the Nisin is able to inhibit the growth of *S. aureus* and *E. faecalis*. Also, we amplified the alginate lyase gene, which encode a protein that destroys the *P. aeruginosa* biofilms. In spite of we did not develop the modules to get the biosensor, we were able to amplify some devices that will be used to get the genetic circuit. For example, we got from iGEM the module formed by a constitutive promoter functional in *E. coli* and *L. lactis*, the ribosome binding site and the *lasR*, which synthesize a protein that regulate positively the *lasI* promoter. In a future work, we will amplify the *lasI* promoter in order to be use to regulate the expression of alginate liase or nisin. In addition, it will be necessary to demonstrate that the biosensor works detecting and killing *P. aeruginosa*, which will give us the guidelines to develop an intelligent patch.

Palabras Clave

Biología sintética; Organismo genéticamente modificado; Quórum sensing; Biofilm; *Lactococcus lactis*; *E. coli*; Biosensor.

INTRODUCCIÓN

El estado de Guanajuato se ubica entre las 15 entidades con mayor incidencia de quemaduras graves y sorpresivamente las defunciones son debidas a sepsis causadas por microorganismos patógenos (Moctezuma-Paz *et al.*, 2015). Entre éstos se encuentran *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, los cuales tradicionalmente son tratados con esquemas variables y de gran intensidad con resultados no tan favorables. Por lo anterior hay la necesidad de ofrecer una alternativa terapéutica. Una alternativa ante estos tratamientos es el uso de parches transdérmicos de liberación prolongada, los cuales tienen como objetivo suministrar un medicamento o metabolito de interés a una velocidad necesaria. Estos parches tienen aplicaciones en el área terapéutica, cosmética, de cuidado personal y son de venta libre (Allevato, 2007; Mann *et al.*, 2001).

Por otro lado, la biología sintética trata de aplicar conocimientos de ingeniería al área biológica. En este sentido el equipo iGEM de la Universidad de Groningen en 2015 realizó un diseño teórico ("LactoAid") de una "venda" compuesta por tres capas, bajo la propuesta de ser un detector de moléculas quorum sensing de las bacterias *S. aureus* y *P. aeruginosa* (iGEM Groningen, 2014). En la presente investigación nuestro objetivo fue diseñar un biosensor usando un organismo no patógeno (*Escherichia coli* K12) obtenido por medio de la Biología Sintética, capaz de detectar por quorum sensing a *P. aeruginosa*, y sentar las bases para un futuro desarrollo de biosensores contra *S. aureus* y *E. faecalis*. Así mismo se trabajó en el diseño de una matriz polimérica biocompatible con acción antiséptica, antimicrobiana y analgésica para su aplicación en quemaduras, la cual será presentada en la competencia iGEM 2016, por el equipo iGEM Guanajuato Mx.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelado del circuito genético

Un circuito genético para la detección de *P. aeruginosa* requiere diversos componentes para poder llevar a cabo dicha función. En la Fig. 1 y 2 se muestran los correspondientes a *L. lactis* (Figura 1) y *E. coli* (Figura 2). Este diseño se determinó con base a funciones conocidas de cada uno de las partes que lo conforman, las cuales se ensamblan hasta ser una alternativa viable, esperando sea capaz de expresarse en el organismo deseado.

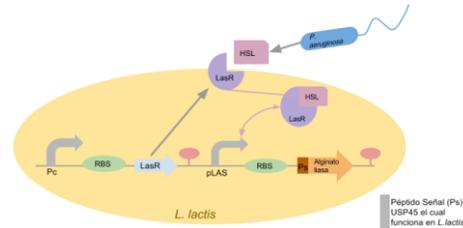


Fig. 1. Circuito genético para la detección de *P. aeruginosa* por quorum sensing, usando como chasis *L. lactis*. Se observa el RBS (Ribosome Binding Site), gen para la proteína LasR que se expresa constitutivamente y detecta a las moléculas HSL (homoserina lactona), el promotor inducible pLAS, el Ps que permite la secreción de la proteína de alginato liasa, la cual tiene actividad sobre el peptidoglicano presente en los biofilms y su terminador.

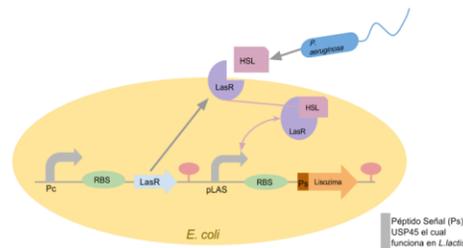


Fig. 2. Circuito genético para la detección de *P. aeruginosa* por quorum sensing, usando como chasis *E. coli*. Se observa gen para la proteína LasR que se expresa constitutivamente y detecta a las moléculas HSL (homoserina lactona), el promotor inducible pLAS, el Ps que permite la secreción de la proteína de lisozima y es derivado de la enzima *chiA74*. La lisozima tiene actividad sobre el péptido glicano de bacterias y de glicoproteínas presentes en las biopelículas de *P. aeruginosa*. La estructura tallo-asa indica que es un terminador de la transcripción.

Diseño de oligonucleótidos iniciadores

Para amplificar los genes de interés (quitinasa ChiA, alginato liasa y lisozima humana) se diseñaron oligonucleótidos iniciadores específicos para cada secuencia poniéndoles sitios de restricción que no estaban presentes en las

secuencias de los genes. Las secuencias fueron tomadas de la base de datos NCBI y se utilizó el programa OligoCalculator.

Pruebas de actividad in vitro con nisina y lisozima

Se realizaron pruebas de pozos para *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* y *L. lactis* (Barboza-Corona *et al.*, 2007). Se realizaron 8 diluciones de 1:1 con ácido cítrico 50 mM con etanol al 50% para nisina, las cuales se colocaron en los pozos, donde la concentración más alta fue de 250 U/mL (50 mg/2 mL). Como control negativo se utilizó ácido cítrico 50 mM. Para el caso de la lisozima se utilizó un stock de 1 mg/mL, y se hicieron 8 diluciones con agua destilada.

Amplificación de lisozima humana

Se tomaron 5ml de sangre utilizando EDTA como anticoagulante. La muestra se centrifugo y se colectó la interfase correspondiente a las células mononucleares, entre ellas los leucocitos. Se extrajo RNA para obtener cDNA. Para lograr lo anterior se utilizó el protocolo de extracción de RNA con TRIzol® (Ambion RNA Life technologies). Para eliminar el DNA se usó la Dnasa. Para obtener el cDNA se usó el protocolo para iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR de Bio-Rad y un control negativo usando 2 µL de buffer iScript -RT con 8 µL de RNA tratado. Se realizó una PCR convencional con gradiente de temperatura de 50-60 °C con ambas muestras usando los oligonucleótidos iniciadores para el gen de la lisozima humana y un volumen final de 10 µL. Los amplicones fueron analizados en electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Amplificación, purificación y digestión de alginato liasa

Las diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* (4Q7, HD73, HD1, Cry-B) y *B. cereus* fueron cultivadas en medio TSB. Para la extracción de DNA total se usó el protocolo descrito en Barboza-Corona *et al.*, 2007. 10 µL del DNA total fueron usados como molde para amplificar el gen de la alginato liasa usando oligonucleótidos específicos.

EL amplicón fue analizado en geles de agarosa al 1%. El amplicón fue purificado con el “Kit PCR Purification” (Jena Bioscience) y clonado en el plásmido pCOLD previamente digerido con PstI y KpnI.

Amplificación, purificación y digestión del péptido señal (ps)

La secuencia correspondiente al péptido señal del gen *chiA7* fue amplificada a partir de *B. thuringiensis* 4Q7-*pEH* usando oligonucleótidos específicos. Se obtuvo un amplicón de aproximadamente 100 pb, el cual fue posteriormente purificado (Jena Bioscience). Este amplicón fue cuantificado en el Nanodrop (Desjardins 2010), y ligado en el vector pCOLD previamente digerido con BamHI y KpnI.

Transformación de alginato liasa y péptido señal en *E. coli* TOP10

Tanto la alginato liasa como el péptido señal fueron clonados de manera independiente en el pCOLD. Posteriormente fueron transformados en células electrocompetentes de *E. coli* a 2.5 KV y cultivados en LB con ampicilina (100 mg/mL). Se seleccionaron varias transformantes y el DNA plasmídico fue obtenido como se describió previamente (Del Sal *et al.*, 1998). La comprobación de los plásmidos recombinantes fue realizada mediante digestiones con enzimas de restricción y visualizados en geles de agarosa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas de actividad in vitro con nisina y lisozima

En las pruebas de pozos observamos una inhibición mayormente marcada en *S. aureus* y *E. faecalis* con nisina en su concentración más alta. La lisozima no mostró actividad de inhibición en ninguna de las cinco bacterias. *L. lactis* tuvo inhibición con la dilución más grande de nisina únicamente, y *P. aeruginosa* no mostró ninguna actividad en ninguna de las diluciones. *E. coli* no tuvo un crecimiento ni actividad marcada (Figuras 3 a 6).

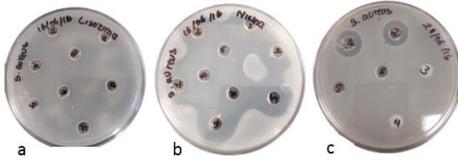


Fig. 3. Pruebas de pozos de *S.aureus* con lisozima (a) y nisina disuelta en ácido cítrico 50 mM con etanol (placa b). Para las placas a y b las concentraciones van en orden ascendente, siendo el 9 el control negativo en el caso de la nisina (placa b). Para la placa c, se utilizaron diluciones de nisina 20 mg/ml disuelta en ácido clorhídrico 0.2 N (pozo 1), nisina disuelta en agua destilada (pozo 2), ácido clorhídrico (pozo 3 y 4) y agua destilada (pozo 5 y 6). Se siguió este procedimiento para esta figura y las 3 siguientes: Dejar crecer la bacteria en el medio correspondiente (*S. aureus* en TSB) durante toda la noche, resembrar (50 uL de bacteria en 5 mL de medio fresco), dejar crecer durante 2 horas. Agregar 140 uL de la bacteria resembrada en 20 ml de agar de pozos (agar suave, 0.7 g TSB con 6 g de agar) y verter en cajas de Petri, dejar solidificar. Una vez sólido, realizar pozos de 5mm de diámetro, incubar a 37°C durante 2 horas, para después agregarle 100 uL de las diluciones de lisozima y nisina correspondientes. Incubar a 4°C durante 12 horas y posteriormente a 28°C durante 24 horas.

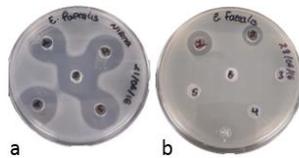


Fig. 4. Pruebas de pozos de *E. faecalis* con nisina. Para la placa a, las concentraciones fueron de nisina disuelta en ácido cítrico 50 mM con etanol, y van en orden ascendente, siendo el 5 el control negativo. Para la placa b, se utilizaron diluciones de nisina (25mg/ml) en ácido clorhídrico 0.2 N (pozo 1), nisina disuelta en agua destilada (pozo 2), ácido clorhídrico (pozo 3 y 4) y agua destilada (pozo 5 y 6).

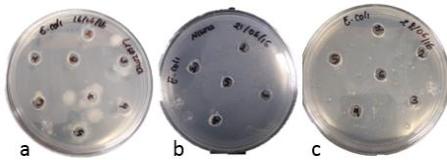


Fig. 5. Pruebas de pozos de *E. coli* con lisozima (a) y nisina disuelta en ácido cítrico 50 mM con etanol (placa b). Para la placa c, se utilizaron diluciones de nisina 20 mg/ml en ácido clorhídrico 0.2 N (pozo 1), nisina disuelta en agua destilada (pozo 2), ácido clorhídrico (pozo 3 y 4) y agua destilada (pozo 5 y 6).

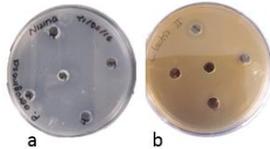


Fig. 6. Pruebas de pozos de *P. aeruginosa* (a) y *L. lactis* (b) con nisina disuelta en ácido cítrico 50 mM con etanol. En ambas placas

las diluciones van en orden ascendente, siendo el 5 el control negativo.

Amplificación de lisozima humana

Al extraer el RNA se observan 3 bandas correspondientes a DNA genómico, RNA 18S y 28S (Fig. 7). Cuando se trato de amplificar el gen de la lisozima usando como molde cDNA, no logró obtenerse ninguna banda de aproximadamente 740 pb, lo cual indica que no se pudo amplificar el gen de la lisozima humana.

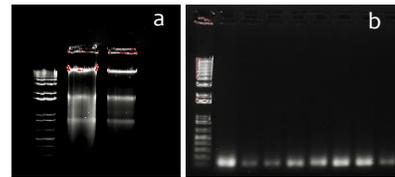


Fig. 7. Amplificación del gen de la lisozima. (a) Se observan las extracciones de RNA de sangre (pozos 2 y 3). Se observan 3 bandas, la primera correspondiente a DNA genómico, la segunda al rRNA 28S y la tercera al rRNA 18S. El primer pozo corresponde al marcador de peso molecular de 1kb. (b) Se observan las amplificaciones obtenidas al utilizar los oligonucleótidos iniciadores para lisozima y un gradiente de temperaturas de 50-60 °C, donde el segundo pozo corresponde a la más alta y el noveno a la menor. Los pozos 2, 4, 6 y 8 corresponden a la RT PCR +iScript, mientras que el 3, 5, 7 y 9 a la RT PCR -iScript. Todos los pozos presentan una amplificación inespecífica de 200pb, el primer pozo corresponde al marcador de peso molecular de 1kb.

Amplificación, purificación y digestión de alginato liasa

Se obtuvo un amplicón de la alginato liasa en *B. thuringiensis* 4Q7 y *B. cereus* (Fig. 8a, 8b). Este amplicón fue digerido, ligado en el pCOLD y transformado en *E. coli* (Figura 9).

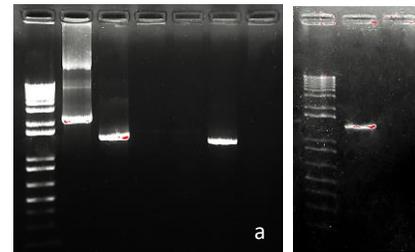


Fig. 8. Amplificación del gen de alginato liasa. a) Hubo amplificación en *B. thuringiensis* 4Q7 (pozo 3) y *B.cereus* (pozo 6). b) Se observa la amplificación obtenida al utilizar los oligonucleótidos iniciadores para alginato liasa para una reacción de 50µL con el DNA genómico de *B. thuringiensis* 4Q7, el primer pozo corresponde al marcador de peso molecular de 1kb.

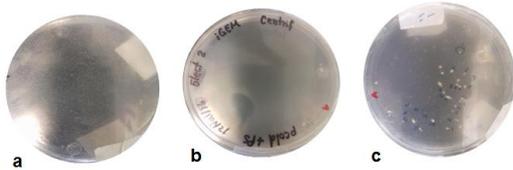


Fig. 9. Transformantes obtenidas durante el desarrollo experimental, de acuerdo a la metodología realizada, (a) pCOLD, (b) pCOLD+PS, (c) pCOLD+Alginato liasa.

Digestión del DNA plasmídico (pCOLD y PS) y alginato liasa

De las 24 colonias que contenían el probable péptido señal de *chiA74* (pCOLD y PS), se encontraron 4 colonias como candidatos positivos (colonias 15,16, 17, 22) (Figura 10). La colonia 22 presenta un solo amplicón correspondiente al tamaño del péptido señal de aproximadamente 100 pb. Por otro lado, de las transformantes analizadas con el probable gen de la alginato liasa, no se detectó ninguna colonia con el fragmento esperado (1700 pb); sin embargo, es necesario seguir analizando mas colonias.

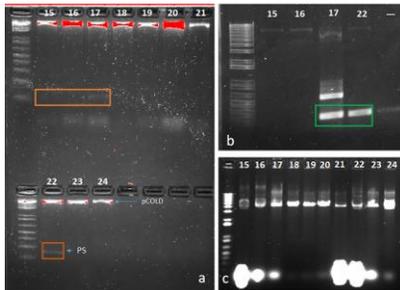


Fig. 10. (a) digestión de ps+pCOLD de las colonias 15-24 con 4 posibles candidatos. (b) PCR de ADNp de ps+pCOLD. (c) digestión de ADNp alginato liasa de las colonias 15-24.

CONCLUSIONES

Mediante ensayos *in vitro* demostramos que la Nisina es capaz de inhibir tanto a bacterias Gram positivas como Gram negativas. No encontramos ningún efecto de la lizosima contra las bacterias analizadas bajo las condiciones usadas de ensayo. Esto nos sugiere que uno de los sensores en *L. lactis* debe llevar el gen de la Nisina en lugar de la lizosima. Así mismo nos falta caracterizar que la alginato liasa produzca una proteína que actúe sobre las biopelículas de *P. aeruginosa*. Aún cuando no logramos armar el circuito genético del biosensor, se obtuvieron resultados alentadores en

casi un mes de trabajo. Por ejemplo, se logró amplificar el péptido señal de *chiA74* y el gen de la alginato liasa en el vector pCOLD, necesitamos obtener una construcción donde el gen de la alginato liasa tenga el péptido señal y este bajo la regulación del promotor *lasI*. Además del kit del iGEM ya tenemos el módulo que contiene un promotor constitutivo en *E. coli* y *L. lactis*, el sitio de unión al ribosoma y el gen *lasR*. Este último codifica la proteína que al unirse a la homoserilactona activará positivamente al gen promotor *lasI*. Nos falta amplificar este último promotor para que regule la expresión de la alginato liasa o de la Nisina.

Finalmente, como parte de las perspectivas se plantea el desarrollo de pruebas *in vitro* con biofilms de *P. aeruginosa* con lizosima a diferentes concentraciones para demostrar la actividad inhibitoria, así como la realización del prototipo del parche con el biosensor acoplado y las pruebas de factibilidad pertinentes.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guanajuato, por el apoyo para realizar los Veranos de investigación científica. A Flor Gutiérrez, y a cada uno de los miembros del laboratorio de Biotecnología y Microbiología Molecular de la DICIVA, y a los miembros del equipo iGEM Guanajuato_Mx.

REFERENCIAS

[1] Moctezuma-Paz, L. E., Franco, I. P., Jiménez-González, J., Miguel-Jaimes, K. D., Foncerrada-Ortega, G., Sánchez-Flores, A. Y., González-Contreras, N. A., Albores-de la Riva, N. X & Nuñez-Luna, V. Epidemiología de las quemaduras en México, *Rev Esp Méd Quir* 2015; 20:78-82.
 [2] Allevato, M. A. (2007) SISTEMAS TERAPÉUTICOS TRANSDÉRMICOS, Educación Continua, *Act Therap Dermatol* 2007; 30: 154
 [3] Mann, T. J., Orlikowski, C. E., Gurrin, L. C., & Keil, A. D. (2001). The effect of the biopatch, a chlorhexidine impregnated dressing, on bacterial colonization of epidural catheter exit sites. *Anaesthesia and intensive care*, 29(6), 600.
 [4] iGEM Groningen (2014). LactoAid. Recuperado de <http://2014.igem.org/Team:Groningen> Marzo 2016.
 [5] Barboza-Corona, J. E., Vázquez-Acosta, H., Bideshi, D. K., Salcedo-Hernández, R. (2007) Bacteriocin-like substances produced

by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. Arch Microbiol (2007) 187:117-126.

[6] Del Sal, G., Manfioletti, G., & Schneider, C. (1988). A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. Nucleic acids research, 16(20), 9878.

[7] Desjardins, P., Conklin, D. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. J. Vis. Exp. (45), e2565, doi:10.3791/2565 (2010).