

## COMUNICACIONES BREVES

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, U.N.A.M., MÉXICO

### Evaluación de la transcripción del locus *rfb* para la biosíntesis de LPS en *Leptospira interrogans* subtipo hardjoprajitno

Dra. Erika Margarita Carrillo Casas,<sup>1</sup> Téc. Raquel Rojano Ríos,<sup>2</sup> Dr. Dieter Bulach,<sup>3</sup> Prof. Ben Adler<sup>4</sup> y Dr. Alejandro de la Peña-Moctezuma<sup>5</sup>

#### RESUMEN

Se construyó el plásmido pGL4W15-96 a partir del vector sin promotor para kanamicina pGL4W74 y una secuencia de 480pb que contenía al supuesto promotor J15, con el objetivo de confirmar el papel de la secuencia J15 como promotor para *Leptospira*; el cual restauró la transcripción del gen de resistencia a kanamicina en *Escherichia coli* y *Leptospira biflexa*, confirmando así la función del inserto como promotor para ambos organismos.

**Palabras clave:** *Leptospira*, LPS, promotor, plásmido.

Además de ser antigénicamente indistinguibles, los 2 subtipos de la serovariedad hardjo: hardjobovis y hardjoprajitno tienen una organización genética similar en sus loci *rfb*.<sup>1-9</sup> La presencia de transposasas similares a la familia *IS5* entre los marcos de lectura abiertos *H14* (polimerasa del antígeno O) y *H15* (flipasa) en hardjobovis, anticipaba la transcripción del locus *rfb* en 2 unidades. Esto fue confirmado por RT-PCR.<sup>2</sup> En contraste, hardjoprajitno tiene una región intergénica *J14* - *J15* de longitud similar a su homólogo en hardjobovis pero sin transposasas. Análisis de transcripción por RT-PCR revelaron una sola unidad de transcripción en hardjoprajitno desde *J1* hasta *J31*. Análisis más detallados mediante extensión del iniciador (PE) demostraron

un sitio de inicio de la transcripción asociado con secuencias similares a promotores *s*<sup>70</sup> de *E. coli* arriba de *J15* en hardjoprajitno.<sup>1,8</sup>

Para confirmar el papel de esas secuencias como promotores para *Leptospira*, se construyó un vector sin promotor para kanamicina, pGL4W74 utilizando como base el vector pGKLep4.<sup>7</sup> Un fragmento doble *Sau3AI* de 480 bp que contenía el supuesto promotor arriba de *J15*, fue clonado en pGL4W74. La *E. coli* que contenía el plásmido recombinante, pGL4W15-96, fue cultivada en caldo LB con 0, 5, 10, 25, 50, 100 y 250 mg/mL de kanamicina en agitación a temperaturas de 25, 30, 37 y 42 °C. Se midió la OD<sub>600</sub> por triplicado a las 0, 1, 2, 3 y 24 h y cada ensayo fue también repetido por triplicado.

<sup>1</sup> Médico Veterinario Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M., México.

<sup>2</sup> Técnico. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M., México.

<sup>3</sup> Doctor en Medicina. Departamento de Microbiología, Universidad de Monash, Clayton, Victoria, Australia.

<sup>4</sup> Doctor en Medicina. Departamento de Microbiología, Universidad de Monash, Clayton, Victoria, Australia.

<sup>5</sup> Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M., México.

El constructo, pGL4W15-96, restauró la transcripción del gen de resistencia a kanamicina, lo que resultó en colonias  $Ka^R$  de *E. coli* y *Leptospira biflexa*, confirmando así, la función del inserto como promotor para ambos organismos. *E. coli* recombinantes mostraron una absorvancia de hasta 1,7 en todas las concentraciones de kanamicina a 30 y 37 °C; pero absorvancias tan bajas como 0 a 25 y 42 °C en concentraciones de 50 mg/mL de kanamicina.

La transcripción de los loci *rfb* de ambos subtipos de la serovariedad hardjo en 2 unidades está conservada a pesar de las diferencias estructurales en sus regiones intergénicas *orf14-orf15*. La transcripción regulada por el fragmento de 480 bp de esta región intergénica en hardjoprajitno, es dependiente de temperatura, siendo activa a 30 y 37 °C, pero no activa a 25 ni 42 °C.

### Evaluation of the transcription of locus *rfb* for the biosynthesis of LPS in *Leptospira interrogans* subtype hardjoprajitno

#### SUMMARY

Plasmid pGL4W15-96 was constructed from the pGL4W74 vector without promoter for kanamycin and a sequence of 480pb containing the supposed J15 promoter with the objective of confirming the role of J15 sequence as a promoter for *Leptospira*, which restored the transcription of the gene of resistance to kanamycin in *Escherichia coli* and *Leptospira biflexa*, corroborating this way the function of the insertion as a promoter for both organisms.

**Key words:** Leptospira, LPS, promoter, plasmid.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De la Peña-Moctezuma A, Bulach DM, Kalambaheti T, Adler B. Comparative analysis of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis. FEMS Microbiol Lett 1999;177:319-26.
2. Kalambaheti T, Bulach DM, Rajakumar K, Adler B. Genetic organization of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthetic locus of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjobovis. Microbial Pathogen 1999;27(2):105-17.
3. LeFebvre RB, Thiermann AB, Foley J. Genetic and antigenic differences of serologically indistinguishable leptospire of serovar hardjo. J Clin Microbiol 1987;25: 2094-7.
4. Merino E, Babitzke P, Yanofsky C. trp RNA-binding attenuation protein (TRAP)-trp leader RNA interactions mediate translational as well as transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* trp operon. J Bacteriol 1995;177(22):6362-70.
5. Nally JE, Timoney JF, Stevenson B. Temperature-regulated protein synthesis by *Leptospira interrogans*. Infect Immun 2001;69(1):400-4.
6. Ramadass P, Marshall RB. Species differentiation of *Leptospira interrogans* serovar hardjo strain hardjobovis from strain hardjoprajitno by DNA slot blot hybridisation. Res Vet Sci 1990;49(2):194-7.
7. Saint Girons I, Bourhy P, Ottone C, Picardeau M., Yelton D, Hendrix RW, et al. The LE1 bacteriophage replicates as a plasmid within *Leptospira biflexa*: Construction of an *L. biflexa-Escherichia coli* shuttle vector. J Bacteriol 2000;182(20):5700-5.
8. Sudershana S, Du H, Mahalanabis M, Babitzke P. A 5' RNA stem-loop participates in the transcription attenuation mechanism that controls expression of the *Bacillus subtilis* *trpEDCFBA* operon. J Bacteriol 1999;181(18):5742-9.
9. Vinh T, Shi MH, Adler B, Faine S. Characterization and taxonomic significance of lipopolysaccharides of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. J Gen Microbiol 1989;135(10):2663-73.

Recibido: 27 de diciembre de 2004. Aprobado: 10 de marzo de 2005.

Dr. Alejandro de la Peña-Moctezuma. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M., México.