

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

Expresión en *Escherichia coli* del gen *gspD*, del sistema de secreción tipo II de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad hardjo*

Dr. Ernesto Armando Rodríguez Reyes,¹ Dr. Paul Cullen,² Dr. Dieter Bulach,² Dr. Ben Adler,³ Dr. David Haake⁴ y Dr. Alejandro de la Peña-Moctezuma⁵

RESUMEN

Se clonó un fragmento de 1,539 pb del gen homólogo a *gspD* de hardjobovis en el vector pET28a y fue transformado en *E. coli* cepas C43 y Rosetta. La secuencia de GspD_L mostró 46 % de similitud con la secretina GspD de *E. coli*. La expresión de GspD_L recombinante fue lograda en la cepa Rosetta.

Palabras clave: *Leptospira*, sistema de secreción, *E. coli*.

Leptospira borgpetersenii hardjo (Hardjobovis) produce infertilidad, agalactia y aborto en bovinos así como infección en humanos.^{1,2} El proteoma de la membrana externa de *L. interrogans* Lai sugirió 8 proteínas nuevas.³⁻⁷ La secuencia parcial de aminoácidos de una (pL18) mostró homología con GspG, una proteína del sistema de secreción tipo II (GSP) en *E. coli*.^{3,8}

A partir del gen homólogo a *gspD* de Hardjobovis (3 marcos de lectura arriba de *gspG*) se amplificaron 1,539 pb. El fragmento, clonado en el vector pET28a, fue transformado en *E. coli* DE3 cepas: C43 y Rosetta. El plásmido recombinante pAL208 fue secuenciado para confirmación del constructo. *E. coli* recombinante fue cultivada con kanamicina (50 mg/mL) y glucosa

(0,1 a 2 %) a 37 °C durante 1 h en agitación y entonces inducida con IPTG (0,5 a 10 mM) durante 3,5 h a 37 °C o temperatura ambiente. Los cultivos fueron sonicados y sus proteínas separadas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (12 %). Se realizó inmunodetección tipo Western con anticuerpos monoclonales anti-T7 y anti-histidina.

La secuencia de GspD_L mostró 46 % de similitud con la secretina GspD de *E. coli*. Analizando la secuencia nucleotídica, se observó que el uso de codones para arginina en *L. borgpetersenii* es: AGA-45,45 %; AGG-18,18 % y CGA-18,18 %; mientras que en *E. coli* es: AGA-3,9 %; AGG-2,2 % y CGA-3,9 %. La inmunodetección de GspD_L fue

* Proyecto financiado por la U.N.A.M. (PAPIIT IN205202) y UC-MEXUS-CONACYT (CN-02-54).

¹ Máster en Ciencias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M., México.

² Doctor en Medicina. Departamento de Microbiología Universidad de Monash, Clayton, Victoria, Australia.

³ Doctor en Medicina. Profesor. Departamento de Microbiología. Universidad de Monash, Clayton, Victoria, Australia.

⁴ Doctor en Medicina. Profesor. División de Enfermedades Infecciosas, Universidad de California, Los Ángeles, EE. UU.

⁵ Médico veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M., México.

negativa en la cepa C43. Se utilizó entonces la cepa Rosetta codon plus cultivada con 0,2 % de glucosa a 37 °C durante 50 min e inducida con 10 mM de IPTG durante 3,5 h en agitación, para lograr la expresión de GspD_L recombinante (66,7 kDa).

A los autores de este trabajo les interesaba entender el papel que desempeñan en *Leptospira* las proteínas del GSP, en particular su potencial como inmunógenos y maquinaria de secreción. La purificación de GspD_L recombinante permitirá producir anticuerpos para ensayos de opsonofagocitosis de *L. borgpetersenii* y para corroborar la localización de GspD_L sobre la superficie de *Leptospira*.

Expression in *Escherichia coli* of the *gspd* gene of the type II secretion system in *Leptospira borgpetersenii* serovariety hardjo

SUMMARY

A fragment of 1.539 pb of the gene homologous to *gspd* of *Hardjovovis* was cloned in the pET28a vector and it was transformed into *E. coli* C43 and Rosetta strains. The sequence of GspD_L showed 46 % of similitude with *E. coli* GspD secretin. The expression of recombinant GspD_L was obtained in Rosetta strain.

Key words: *Leptospira*, secretion system, *E. coli*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ellis WA, Songer JG, Montgomery J, Cassells JA. Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in the genital and urinary tracts of non-pregnant cattle. *Vet Rec* 1986;118:11-3.
2. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and Leptospirosis. 2nd. ed.. Melbourne:MediSci; 1999.
3. Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect Immun* 2002;70:2311-8.
4. Cullen PA, Haake DA, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun* 2003;71:2414-21.
5. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Galvão Reis, et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun* 2001;69:4958-68.
6. Haake D, Mazel A, McCoy F, Milward G, Chao J, Matsunaga J, et al. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. International Leptospirosis Society, Second Meeting. Marysville, Victoria, Australia. Australia: Intervet, CLS Veterinary, Pan Bio, Bio Scientific; 1999. p. 22.
7. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 2000;68:2276-85.
8. Tauschek M, Gorrell RJ, Strugnell RA, Robins-Browne RM. Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Proc Nat Acad Sci USA* 2002;99:7066-71.

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.