

61
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"AISLAMIENTO DEL GENE PARA LA
PROTEINA DE MEMBRANA EXTERNA
Omp C DE Salmonella typhi"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
VALIA FLORES RAMIREZ

MEXICO, D. F.,

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

-RESUMEN.....	2
-OBJETIVO.....	3
-INTRODUCCION.....	4
-Constitución de la Membrana Externa.....	4
-Proteínas de Membrana Externa.....	6
-Proteínas matrices o porinas.....	7
-Proteína OmpA.....	9
-Lipoproteína.....	9
-Otras proteínas.....	10
-Proteína OmpC.....	10
-Construcción de un banco de genes.....	16
-El colifago lambda como vector de clonación.....	16
-El bacteriofago lambda.....	17
-El fago lambda 1059.....	18
-El plásmido pBR322.....	22
-MATERIALES.....	25
-METODOS.....	26
-RESULTADOS.....	32
- Localización del gene <u>ompC</u> de <u>Salmonella typhi</u>	32
- Aislamiento del gene <u>ompC</u> de <u>Salmonella typhi</u>	38
- Subclonación del gene <u>ompC</u> de <u>Salmonella typhi</u>	54
-DISCUSION Y CONCLUSION.....	61
-BIBLIOGRAFIA.....	66
-LISTA DE ABREVIATURAS.....	72
-APENDICE I.- Estrategia experimental.....	73
-APENDICE II.- Publicación.....	

RESUMEN

Localizamos en el genoma de Salmonella typhi un fragmento de restricción que contiene el gene ompC, mediante hibridización heteróloga con el gene de Escherichia coli. A partir de un banco de DNA de Salmonella typhi, construido en el vector de clonación lambda 1059, aislamos el fago recombinante que porta esta secuencia. Posteriormente, subclonamos en el plásmido vector pBR322 un fragmento de 3.0 kpb que contiene el gene estructural. Analizamos la expresión del gene en maxicélulas (a partir del fago recombinante) y en minicélulas (a partir del plásmido construido). El gene ompC de S.typhi codifica para una proteína de 38.5 kilodaltones (kd).

OBJETIVO

Es de gran interés en nuestros días el estudio de la estructura de antígenos de superficie en diferentes organismos patógenos, tanto procariontes como eucariontes, así como del papel que juegan en los procesos de inmunidad contra la enfermedad que estos organismos producen. Así, este laboratorio inició la tarea de aislar y caracterizar los genes para proteínas de membrana externa (PME) de S. typhi y de determinar su importancia como inmunógenos durante el proceso infeccioso de la fiebre tifoidea. Lo anterior no solo permitirá generar conocimientos sobre la biología molecular de esta bacteria, sino abordar aspectos que ayuden al desarrollo de posibles sistemas de diagnóstico rápidos y específicos y, tal vez, en un futuro, a la utilización de estos antígenos como componentes de una vacuna que pueda prevenir esta enfermedad. La fiebre tifoidea, aún en nuestros días, representa un grave problema de salud para los países en desarrollo como México; en donde su incidencia se estima en 0.3% anual (29). Ello produce grandes pérdidas al año en horas-hombre de trabajo y en gastos de hospitalización y medicamentos. Por otra parte, S. typhi es, en sí, un modelo interesante de estudio por su carácter invasivo y por su resistencia a la fagocitosis.

El presente trabajo describe el aislamiento del gene para la proteína de membrana externa Omp C de S. typhi a partir de un banco de genes de la cepa IMSS-1 (27). El banco fue construido en nuestro laboratorio, utilizando el vector de clonación lambda 1059.

INTRODUCCION

La tinción de Gram divide a las bacterias en dos clases: gram-positivas y gram-negativas, las cuales difieren en su capacidad de retener un colorante básico debido a diferencias en la estructura de su pared celular. En un corte transversal, la envoltura celular de las bacterias gram-positivas está formada por una pared celular de peptidoglicana (20-80nm) que rodea a la membrana citoplásmica (7.5nm). En la envoltura celular de las gram-negativas (fig. 1), la membrana citoplásmica está rodeada por dos capas concéntricas: una pared celular muy delgada de peptidoglicana (1-2nm) y una membrana externa (ME) la cual, aunque es morfológicamente similar a la membrana citoplásmica, contiene menos fosfolípidos, poca variedad de proteínas y un lipopolisacárido (16).

Funcionalmente la ME actúa como una barrera entre el medio externo y la célula y, como tal, controla simultáneamente la exclusión o introducción selectiva de compuestos tóxicos y nutrientes. Además contiene los receptores para bacteriófagos y colicinas; juega un papel importante en los procesos de conjugación, división celular, transporte de sustancias al interior de la célula, adhesión de la bacteria al hospedero; y, junto con la peptidoglicana, mantiene la integridad estructural de la célula (52,24).

CONSTITUCION DE LA MEMBRANA EXTERNA

La ME presenta las características fundamentales de una membrana biológica: está formada por una bicapa de moléculas anfipáticas (lípidos) con moléculas proteicas intercaladas.

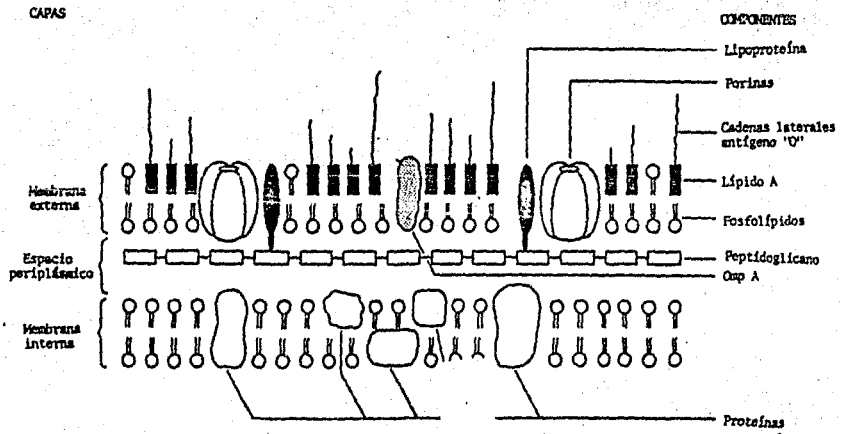


FIG.1.- Diagrama de la envoltura celular de una bacteria gram-negativa.

La ME contiene pocas especies de proteínas. Sin embargo, estas proteínas parecen conferirle muchas de las funciones señaladas. Son las proteínas más abundantes de la célula. La ME está firmemente unida a la peptidoglicana por dos clases de proteínas. Una lipoproteína (PM 7.2 Kd) que tiene una parte proteica embebida en la ME y otra formando una unión covalente con la peptidoglicana (Fig. 1); y por las proteínas de la ME que se encuentran fuertemente ancladas en ella.

Otro componente importante es el lipopolisacárido (LPS) que se encuentra exclusivamente en la ME, ocupando un 45% de su superficie y que constituye la endotoxina (24). El LPS está formado por tres partes: el lípido A, el oligosacárido central y el antígeno "O". El lípido A que es la parte tóxica y el cual es virtualmente constante, consiste de un dímero de glucosamina sustituido con ácidos grasos, principalmente el ácido beta-hidroximiriístico. El oligosacárido central está unido covalentemente al lípido A, contiene fundamentalmente azúcares de los cuales una heptosa y el ácido cetodeoxioctanato (KDO) son prácticamente específicos del LPS. El antígeno "O" está compuesto por un número variable de unidades repetidas que van de 3 a 6 residuos de azúcares; esta diversidad determina los diferentes serotipos del antígeno "O". Estos son de gran importancia diagnóstica.

La parte interna de la bicapa de la ME contiene fosfolípidos, al igual que otras membranas (52, 38).

PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA

Schnaitman fue el primero en reportar que la ME de Escherichia coli contenía una proteína principal. Poco después, varios investigadores demostraron que la preparación que Schnaitman había considerado tenía una sola proteína estaba constituida por cuatro proteínas.

Posteriormente Schmitges y Henning demostraron que una de ellas podía ser separada electroforéticamente en dos proteínas. Actualmente, el número de PME conocido es variable y está determinado por el medio de crecimiento, temperatura, mutaciones, así como por la información genética de la bacteria (24).

Las PME más estudiadas son las de E.coli y Salmonella typhimurium (17,53) y se han dividido en proteínas menores y principales. Se han identificado de 10 a 20 especies diferentes de proteínas menores y aunque algunas se han implicado en el transporte de hierro, vitamina B12 y nucleósidos, en la mayoría de los casos no se conoce su función principal ni los genes responsables de su producción.

Las proteínas principales pueden ser o estar expresadas en más de cien mil copias por célula y comprenden el 80% del contenido proteico de la membrana. Se han identificado alrededor de diez proteínas principales de membrana externa (PPME) aunque generalmente sólo se encuentran cinco de ellas en una bacteria, ya que su expresión en algunos casos es mutuamente excluyente o requiere de ciertas condiciones definidas (17, 24). Las PPME están constituidas por: a) Proteínas matrices o porinas; b) la proteína OmpA; c) la lipoproteína; y d) otras proteínas.

PROTEINAS MATRICES O PORINAS

Las proteínas matrices Omp C, Omp F y Pho E forman homotrimeros que constituyen poros de difusión pasiva que permiten el paso de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de la membrana (38,49). En E. coli estas proteínas están codificadas por tres genes independientes y completamente separados en su cromosoma: ompC (minuto 47), ompF (minuto 21) y phoE (minuto 6), (49). Estos genes ya han sido aislados y

secuenciados (46,30,56). La comparación de estas secuencias de DNA revelan una gran homología, encontrándose conservados el 69% de los nucleótidos entre ompC y ompF, 60% entre ompC y phoE y 67% entre phoE y ompF (45, 64, 56), lo que sugiere un probable ancestro común.

Estas proteínas comparten varias características: a) tienen una composición de aminoácidos y peso molecular similar, el cual fluctúa entre 35,000 y 45,000 daltones; b) son sintetizadas con un péptido señal de 15 a 30 aminoácidos; c) en su estructura secundaria tienen un alto contenido de hojas beta-plegadas antiparalelas (34); d) cruzan inmunológicamente (54); e) la unidad funcional formadora de los poros es un trimero; f) funcionan como receptores específicos de bacteriófagos y colicinas; y g) su interacción tanto con la peptidoglicana como con bacteriófagos indica que estas proteínas atraviesan la membrana (37-38).

La biosíntesis de las proteínas Omp F y Omp C está regulada por la osmolaridad del medio de cultivo: conforme se incrementa la osmolaridad del medio la producción de Omp F disminuye, mientras que la producción de Omp C se incrementa de tal modo que la cantidad total de estas proteínas se mantiene constante (33,66). Esta osmorregulación está controlada por los productos del operón ompB, localizado en el minuto 74 en el cromosoma de E.coli (43). Cuando las células son crecidas bajo condiciones limitantes de fosfato, se induce la síntesis de otra porina, Pho E (55). Esta proteína es parte del regulón pho (62) y su gene estructural está localizado en el minuto 6 del cromosoma de E.coli (63).

PROTEINA Omp A

La proteína Omp A, un polipéptido que presenta una migración modificable por el calor en geles de poliacrilamida-SDS, está presente en una concentración de docientas a trecientas mil copias por célula (24). Se encuentra extendida en la membrana (19); actúa como receptor para los fagos K3 o TuII (15, 67); participa en la incorporación de una colicina (9); es requerida, en combinación con la lipoproteína (7), para mantener la morfología celular y la integridad de la ME (59); interviene en la conjugación F dependiente (67); y junto con la lipoproteína es la que se asocia más fuertemente al LPS.

La proteína Omp A está codificada por el gene ompA, mapeado en el minuto 21 del cromosoma de E. coli, el cual se expresa constitutivamente (24). Tanto la proteína Omp A como el gene ompA han sido aislados y caracterizados (1,26,48); así como el de otras bacterias gramnegativas (13,22).

LIPOPROTEINA

La lipoproteína (LPP) de la ME de E. coli, es considerada como la proteína más abundante, encontrándose 750,000 copias por célula. Consiste de 58 aminoácidos y tiene un PM aproximado de 7 Kd (6). Se encuentra en forma unida y libre: la forma unida está ligada covalentemente a la peptidoglicana mientras que la forma libre, aunque puede estar conectada a ella, no está ligada covalentemente. (24, 7). Hasta ahora no hay evidencias sólidas que indiquen que la proteína atraviese la ME; no se ha reportado que sirva como receptor para algún bacteriófago o colicina conocida (24, 7).

La producción de la LPP parece ser de manera constitutiva. Se ha demostrado que para esta proteína existe un sólo gene estructural

(lpo), mapeado en el minuto 36.5, el cual parece ser expresado muy eficientemente tanto a nivel de transcripción como de traducción. Este gene ha sido clonado y secuenciado (50).

OTRAS PROTEINAS

En la ME están presentes alrededor de 10 a 20 proteínas menores. Muchas de estas proteínas también se han identificado como receptores para fagos y colicinas. La mayoría de ellas, así como otras de las que no se conoce alguna función receptora, tienen papeles importantes en el crecimiento de la célula, como el permitir la entrada de nutrientes a través de la ME.

Dentro de estas proteínas se encuentran Lam B, receptora del bacteriófago lambda, la cual es requerida en el transporte de maltosa y facilita la difusión de otros azúcares como glucosa o lactosa; la proteína G que aparentemente participa en los procesos de división celular y duplicación del DNA; Fhu(Ton A), Fep, Fec asociadas a la entrada de fierro acomplejado a ferricromo, enteroquelina y citrato respectivamente; Omp T que se expresa en altas temperaturas; entre otras (17, 24).

PROTEINA Omp C

La proteína Omp C es una proteína principal de la membrana externa, presente en E. coli en más de cien mil moléculas por célula. Los monómeros de Omp C, de un peso molecular de 38,306 (45), se oligomerizan para formar trimeros que actúan como poros de difusión. Los poros que forma esta proteína permiten el paso de solutos hidrofílicos, a través de la ME (49). El análisis de la estructura tridimensional de estos poros, por microscopía electrónica, sugiere la

existencia de tres conductos abiertos en la superficie de la membrana, los cuales se fusionan en un solo canal hacia el espacio periplásmico (20). Esta estructura se encuentra formada fundamentalmente por hojas beta-plegadas antiparalelas, lo cual favorece su disposición en la membrana así como la exposición de ciertas regiones hacia el exterior de la misma, figura 2 (34, 57). Además de este papel como porina, Omp C participa en el mantenimiento de la estructura de la superficie celular y como receptor de los bacteriófagos T1b y T4 (53). Como ya se mencionó, el gene que codifica esta proteína se encuentra en el minuto 47 del cromosoma de E. coli (49). Este gene ha sido clonado y su secuencia nucleotídica y de aminoácidos ha sido determinada. El análisis de la secuencia indica que es una proteína formada por 348 aminoácidos, de los cuales los primeros 21 conforman el péptido señal. La proteína madura, formada por 327 aminoácidos, tiene un PM calculado de 38,306 d (45).

La síntesis de Omp C es regulada en respuesta a condiciones ambientales. El medio de crecimiento puede influenciar el nivel de su transcripción relativa a otra porina, Omp F. Así, mientras la síntesis de Omp F es favorecida en baja osmolaridad, Omp C es preferencialmente producida en alta osmolaridad (33,66). Además, alta temperatura (40 C) también causa la síntesis preferencial de Omp C (66, 36, 40).

La regulación de la expresión de Omp C en respuesta a la osmolaridad del medio está ligada a un control transcripcional por los productos del operon ompB (minuto 74) (43). Este operón ha sido clonado y la secuencia nucleotídica completa ha sido determinada (44, 69). Aunque el mecanismo de osmorregulación, incluyendo el papel del operón ompB, no es del todo claro, se ha propuesto un modelo para explicarlo, figura 3.

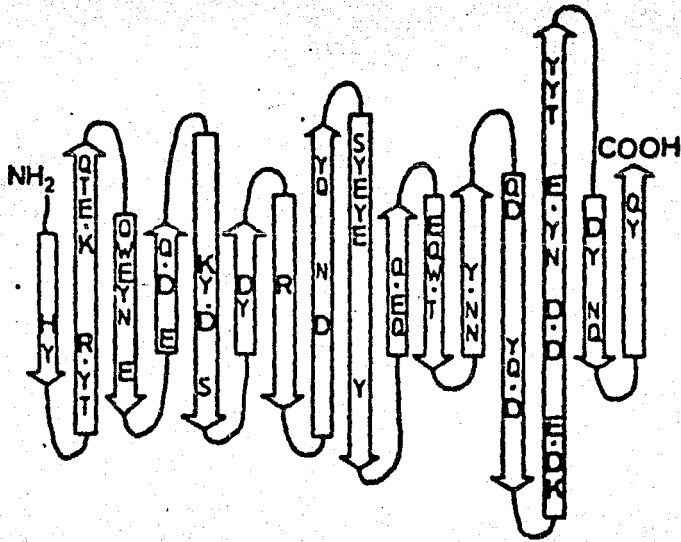


FIG.2.- Esquema de la estructura del monómero de una porina, el cual está constituido principalmente por hojas beta-plegadas antiparalelas, lo que favorece su disposición en la membrana y permite la exposición de regiones hacia el exterior de la bacteria.

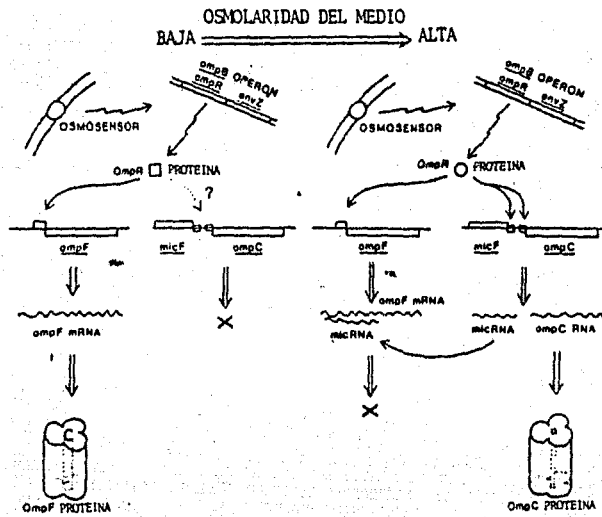


FIG.3.- Modelo propuesto para la regulación de la expresión en *E. coli* de las porinas OmpC y OmpF por la osmolaridad y otras condiciones del medio.

El locus ompB de E.coli es un operon que contiene al menos dos genes: ompR y envZ; los cuales han sido secuenciados y se han determinado sus productos génicos (44, 69). Se propone que Env Z actúa como una proteína receptora de membrana que sirve como un osmosensor, el cual transmite la señal del medio a la proteína Omp R, modulando su estado funcional. De esta forma, se permite la expresión preferencial de una u otra proteína; es decir, ompR actúa como un regulador positivo para la expresión ya sea de ompC o de ompF, uniéndose a una región del DNA que precede a sus promotores (14, 31).

Recientemente, Mizuno et al (47), encontraron un tercer gene regulatorio, micF, proponiendo que interviene en la regulación de ompF a nivel traduccional, el cual codifica para una pequeña molécula de RNA (174 bases). Este gene está localizado inmediatamente hacia arriba del gene ompC, pero se transcribe en dirección opuesta. La expresión de micF está bajo el control del operon ompB de igual manera que la del gene ompC. La estructura primaria del RNA mensajero (mRNA) del gene micF es complementaria a la región 5' del mRNA del gene ompF. Cuando el gene micF es clonado en un plásmido de alto número de copias parece bloquear la traducción del mRNA de ompF al hibridizar con él; esto pudiera estar ocasionando la terminación prematura del transcrito de ompF, la desestabilización del mRNA de ompF, o ambas cosas (Fig. 3).

Sin embargo, Matsuyama y Mizushima (42) demostraron que el gene micF no inhibía la síntesis de ompF cuando era clonado en un plásmido de bajo número de copias. Por ello consideran que, aunque el gene micF tiene el potencial para reprimir la expresión de ompF, una sola copia en el cromosoma es insuficiente para tener una papel crítico en la osmorregulación.

Con base en experimentos realizados con cinco diferentes mutantes del gene ompR, se ha visto que la proteína Omp R, puede tomar dos estructuras opcionales dependiendo de la osmolaridad del medio; cada una de las cuales regula positivamente la síntesis, ya sea de Omp C u Omp F. Estas mutantes han sido caracterizadas: ompR1 genera un fenotipo Omp F- Omp C-; ompR2 genera un fenotipo Omp F+ Omp C- independientemente de la osmolaridad del medio (25). En ompR20, Omp F es regulada de manera opuesta. En ompR3, se observa un fenotipo Omp F- Omp C+ constitutivo, mientras que en ompR4 la osmoregulación se efectúa de manera casi normal, ya que Omp C se puede apreciar aún en baja osmolaridad (51).

Estas cinco mutantes han sido secuenciadas para determinar las alteraciones a nivel de aminoácidos. ompR1 es producida por una delección de 19 aminoácidos cercanos al extremo carboxilo-terminal; ompR2 y ompR20 son producidas por conversiones en el aminoácido 207 (Val a Met) y el 150 (Arg a Cys), respectivamente, cercanos al extremo carboxilo terminal; mientras que ompR3 y ompR4 resultan de las sustituciones en el aminoácido 15 (Arg a Cys) y en el aminoácido 71 (Arg a Thr), respectivamente, correspondientes al amino-terminal (51).

Considerando que las mutaciones, ya sea en amino o en carboxilo terminal, determinen únicamente modificaciones a nivel de estas regiones, sin producir cambios conformacionales drásticos en toda la estructura terciaria de la proteína, esta información sugiere que Omp R puede tomar dos estructuras alternativas dependiendo de la osmolaridad del medio y de este modo regular positivamente ya sea a Omp F o a Omp C. Por otra parte, se plantea que la proteína presenta dos dominios: uno en el carboxilo-terminal, basados en que ompR2 y ompR20 son mutantes donde la expresión de Omp F es considerable aún

en alta osmolaridad; y otro en el amino-terminal, ya que ompR3 y ompR4 presentan una significativa expresión de Omp C aun en baja osmolaridad (51).

En este último estudio también fueron corregidas dos posiciones de la secuencia de ompR con respecto a lo reportado anteriormente.

CONSTRUCCION DE UN BANCO DE GENES

Un banco o biblioteca de genes es una colección de moléculas recombinantes de DNA en las que se encuentra representado el genoma de un organismo. Ello permite el aislamiento de genes particulares con el fin de analizar su estructura y función. Al construir un banco, se busca tener múltiples copias idénticas o clonas de segmentos diversos de DNA del organismo de interés. Para ello se forman moléculas recombinantes con vectores de clonación. Estas son moléculas de DNA con replicación independiente a la del cromosoma del huésped. Por lo general, el DNA del organismo a estudiar (DNA pasajero) y el vector de clonación se cortan en sitios específicos con una misma endonucleasa de restricción; se generan moléculas recombinantes mediante la unión de fragmentos de vector y pasajero con ligasa del fago T4. Los dos vehículos procariontes comúnmente usados son los plásmidos de E. coli y los derivados del colifago lambda; cada colonia o placa de lisis, respectivamente, contiene múltiples copias de un segmento particular del genoma. El número de moléculas recombinantes que se requieran para tener un genoma completamente representado depende del tamaño del inserto en el vehículo y del tamaño de dicho genoma (11). El tener clonado el equivalente a cinco veces la extensión del genoma implica una probabilidad de 0.99 de que se encuentren representados todos los genes.

EL COLIFAGO LAMBDA COMO VECTOR DE CLONACIÓN

El bacteriófago lambda infecta E.coli y puede crecer como lisógeno, incorporándose al cromosoma del huésped y duplicándose junto con él. También puede lisar a la célula después de haber producido varias decenas de copias; es decir, entra en fase lítica. Un fago en fase lítica puede funcionar como vector de clonación. Se han construido derivados del fago lambda cuyo DNA, al ser digerido con enzimas de restricción, genera fragmentos dispensables e indispensables para su crecimiento lítico. Los derivados de lambda adaptados específicamente para la clonación de DNA están contruidos de tal manera que las endonucleasas de restricción sólo tengan sitios de reconocimiento en la región dispensable, de modo que permitan la adición o reemplazamiento de DNA exógeno pasajero.

Las moléculas recombinantes son encapsuladas in vitro; los fagos recombinantes son amplificados mediante su propagación sobre un césped de E.coli. Los derivados de lambda que tienen un sólo sitio blanco en el DNA se conocen como vectores de inserción. Los que tienen sitios de reconocimiento pares que permiten remover un segmento y reemplazarlo con DNA heterólogo son conocidos como vectores de reemplazamiento.

EL BACTERIOFAGO LAMBDA

El colifago lambda (23) consta de una molécula de DNA de doble cadena de 48,502 pares de bases (pb). En cada extremo de su genoma hay proyecciones de cadena sencilla complementarias; estos extremos cohesivos de 12 pb son llamados m y m' y forman el sitio cos. El DNA de lambda puede ser dividido en tres regiones: la región del extremo izquierdo contiene los genes A-J que codifican para proteínas de la cápsula y cola del fago, así como para proteínas involucradas en el

ensamble de proteínas virales maduras. La región central entre los genes J y N contiene el gene cIII; y genes cuyos productos intervienen en procesos generales de recombinación y de estructuración de la forma tardía de replicación del fago. Estos últimos genes (función Red), determinan que el fago lambda sea sensible a inhibición por lisógenos del fago P2 y son dispensables para su crecimiento lítico. La región del extremo derecho incluye: la región principal regulatoria de la expresión genética, es decir los genes N, cI, cro y cII; los genes O y P necesarios para la replicación del fago; y los genes S y R cuyos productos son requeridos para la lisis de la membrana y pared celular del huésped, respectivamente (Fig. 4). De las aproximadamente 50 proteínas que codifica lambda, seis son regulatorias: cI, cII, cIII, cro, N y Q; y su expresión da lugar a un circuito de expresión genética con el fin de dar una respuesta lítica o lisogénica (23,28).

Un fago lambda que funcione como vehiculo molecular puede prescindir de aproximadamente más del 40% (20 000 pb) de su genoma, el cual puede ser sustituido por DNA pasajero. Para poder ser encapsuladas, las moléculas de DNA de lambda deben tener un tamaño entre el 80 y el 108% del tamaño de lambda silvestre, así como la secuencia cos (21).

El uso del colifago lambda como vector de clonación de DNA genómico es un método atractivo, ya que pueden generarse rápidamente un gran número de placas de lisis de fagos recombinantes, utilizando pequeñas cantidades de DNA pasajero (68).

EL FAGO LAMBDA 1059

En 1980, Karn et al (32) reportaron la construcción del fago vector lambda 1059, el cual presenta un sistema de selección positiva para los fagos recombinantes.

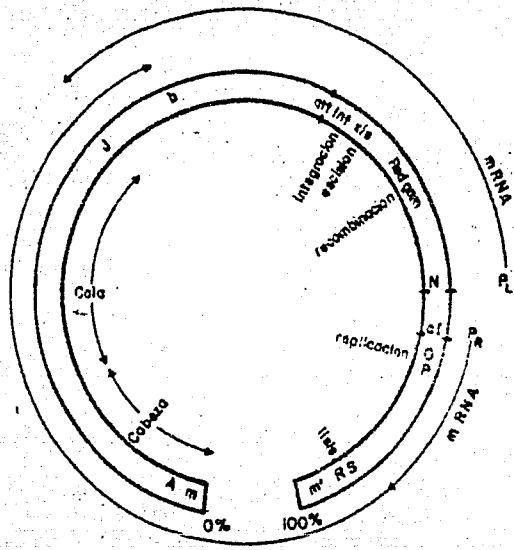


FIG.4.- Mapa funcional de lambda.

El fago lambda 1059 está formado por tres fragmentos generados por cortes con la endonucleasa de restricción BamHI: uno de 19.6 kilopares de bases (Kpb) que corresponde al brazo izquierdo y que lleva todos los genes para las proteínas de la cabeza y la cola; un segmento interno de 17 Kpb que corresponde a la región dispensable para el crecimiento lítico del fago; y uno de 9.4 Kpb, el brazo derecho, que lleva los genes de replicación y lisis. Los dos brazos del vector contienen los genes necesarios para la replicación y maduración de lambda 1059 y corresponden a 58.2% del genoma del tipo silvestre. La producción de fagos viables se lleva a cabo cuando se reemplaza el segmento interno con fragmentos de DNA que representen del 12.8 al 49.8% del tamaño del fago silvestre (6.3-24.4 Kpb). Los dos brazos por sí solos no producen fagos viables ya que para la encapsulación se requieren genomas con un tamaño entre 70 y 108% de la longitud total del lambda silvestre. El sistema de selección para recombinantes está basado en el fenotipo Spi de lambda: este fenotipo le confiere sensibilidad a inhibición por P2. El segmento interno contiene los genes red y gamma, responsables de Spi+. Por tanto, cuando los brazos del vector cortados con BamHI son ligados con DNA exógeno, se producen fagos padres y recombinantes. Los recombinantes tienen sustituido el fragmento interno y serán Spi-; se distinguirán de los padres al crecer sobre un césped de células de E. coli lisogénicas para el fago P2 (Fig. 5).

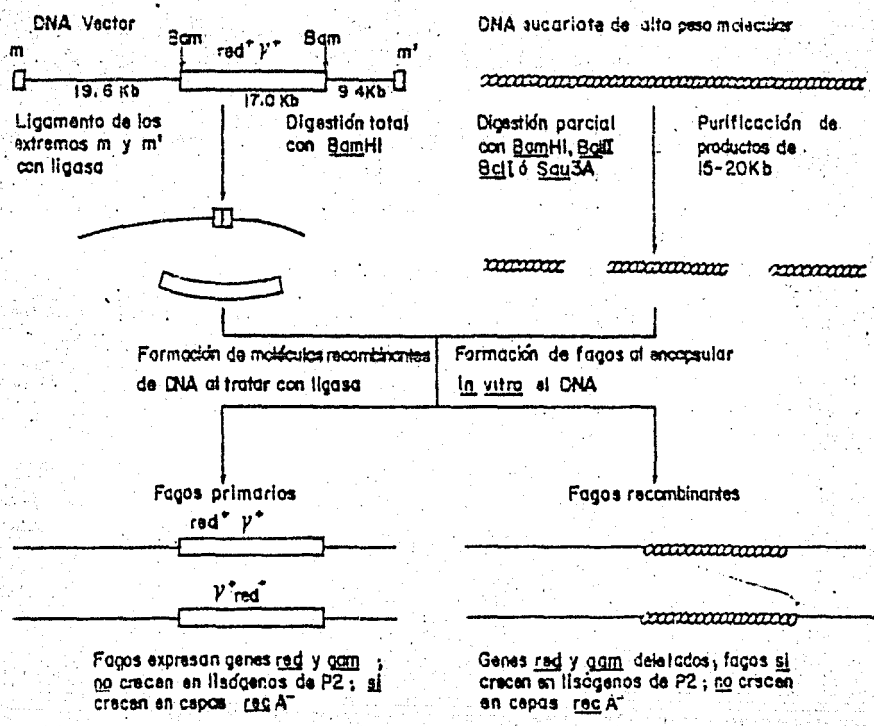


FIG.5.- Clonación en lambda 1059.

PLASMIDO pBR322

Uno de los elementos más utilizados como vector de clonación en técnicas de DNA recombinante, es el plásmido pBR322, el cual desde su diseño, prevalece entre los de más amplio uso. Fue uno de los primeros vectores de clonación en ser diseñados y construidos, para la selección y clonación eficiente de moléculas de DNA recombinante en E.coli.

El extendido uso del pBR322 ha impulsado diversos estudios sobre su función y estructura molecular. Estos estudios, entre otras cosas, han proporcionado la secuencia nucleotídica completa de la molécula e información acerca de algunas particularidades prácticas que disminuyen su eficiencia como vector de clonación, como la inestabilidad del plásmido en ausencia de presión selectiva y la falta de un sistema de selección directo para moléculas recombinantes. Por esta razón, una gran variedad de vectores basados en el pBR322 han sido desarrollados para superar estas limitaciones y extender la versatilidad de los vectores para propósitos especiales y diversos en la clonación de algo específico (0).

El pBR322 es una molécula de DNA de 4363 pb, con un mecanismo de replicación relajada, que ha diferencia de la replicación estricta que requiere de la síntesis de proteínas y de la acción de la polimerasa III, para dar entre 1-5 copias por célula, su síntesis es dependiente de la polimerasa I sin necesidad de síntesis de proteínas, dando entre 30-50 copias por célula. Esta particularidad permite que, bajo inhibición de la síntesis de proteínas, el plásmido continúe replicándose mientras que la replicación del cromosoma se detiene; a este fenómeno se le conoce con el nombre de amplificación y da como resultado un incremento hasta de 100 veces en la cantidad de moléculas de plásmido por célula.

Su diseño se inició con un aislado clínico que porta el plásmido productor de colicina pMB1, a partir del cual se obtuvo el origen de replicación relajada. El gene de la resistencia a Tc del plásmido pSC101 y el de resistencia a Ap del transposon Tn3 (contenido en el plásmido pRSF2124) se incorporaron al pBR312, un intermediario en la construcción del pBR322. A partir de estos elementos, diversas manipulaciones fueron realizadas con el propósito de maximizar el número de sitios únicos de restricción y para minimizar el tamaño del vector (fig. 5b).

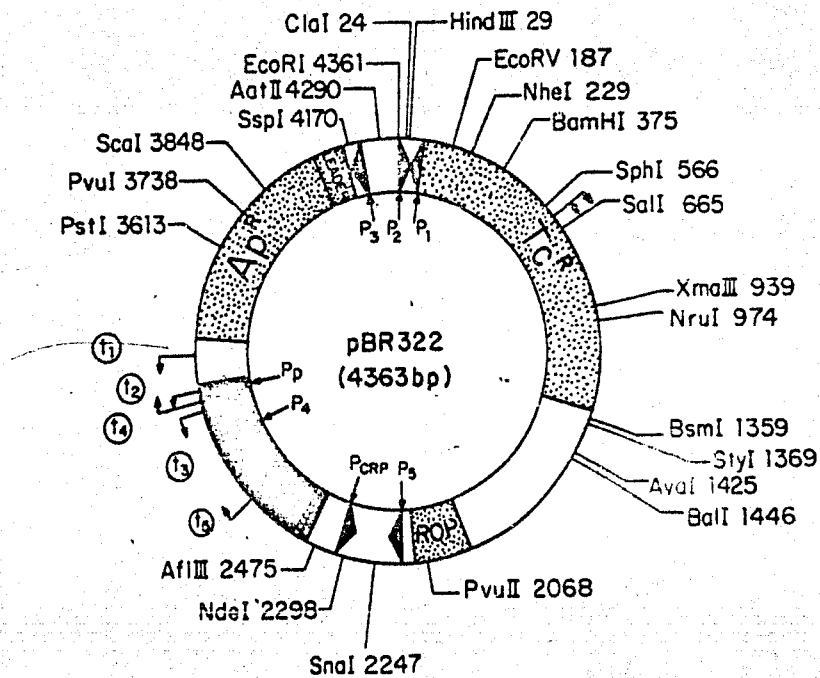


FIG.5b.- Plásmido pBR322

MATERIALES

1) CEPAS BACTERIANAS

Salmonella typhi IMSS-1 (serotipo 9,12,d,Vi) (27).

Escherichia coli Q359 (hsdR-, hsdM-, supE, phi80, P2) (32).

Escherichia coli T19 recA (F- tsx-354 ompB) (45).

Escherichia coli M159 recA-(uvrA) (8).

Escherichia coli HB101 (F- hsd S20 (rB-, mB-), recA1 3, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (Sm r), xyl-5, mtl-1, supE 44.) (41)

Escherichia coli P678-54 (thr, ara, leu, azi, tonA, lacY, T6-, minA, gal, minB, Strr-, malA, xyl, mtl, thi, sup). (18).

2) PLASMIDOS

pMY111, usado como detector heterólogo de hibridización (45).

pBR322, usado como vector para la clonación de DNA (4).

3) BACTERIOFAGO

Lambda 1059, usado en la construcción del banco de genes de Salmonella typhi (32).

4) MEDIOS DE CULTIVO

M9, LB, SM, descritos por Maniatis (41).

NZCYM, descrito por Blattner et al (3).

CY, descrito por Karn et al (32).

CM, descrito por Clarke et al (10).

5) ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

BamHI, EcoRI, SalI (Amersham International plc. Inglaterra).

HindIII (Promega Biotec, Madison, WI.EUA).

BglII, PstI (Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología UNAM, Mor. MEXICO).

ClaI (New England Biolabs, Beverly, MA. EUA).

6) ANTIBIOTICOS

Cloranfenicol, Tetraciclina y Ampicilina, (SIGMA, Saint Louis, Missouri, EUA).

7) OTRAS ENZIMAS

RNasa y DNasa, (SIGMA, Saint Louis, MO. EUA).
Ligasa Fago T4, (Promega Biotec, Madison, WI. EUA).
Fosfatasa Alcalina Bacteriana, (Bethesda Research Laboratories, Rockville Maryland, EUA).

8) FILTROS PARA SOUTHERN

Gene Screen (New England Nuclear, Boston, MA. EUA).

9) ISOTOPOS RADIOACTIVOS

Metionina/Azufre 35 ca. 800 Ci/mmol (Amersham International plc, Inglaterra).
Alfa-fósforo³²-desoxiCTP/ ca. 3000 Ci/mmol (Amersham International plc, Inglaterra).

10) OTROS MATERIALES

Agarosa bajo punto de fusión SeaPlaque (FMC Bioproducts, Rockland, ME. EUA).
Agarosa normal (BIO-RAD Laboratories, Richmond, California, EUA).

METODOS

1) PREPARACION DE DNA BACTERIANO

La extracción y purificación del DNA de las bacterias E. coli O359 y S. typhi IMSS-1 (serotipo 9,12,d,V1) se realizó siguiendo la técnica de lisado claro reportada por Betlach et al (2).

2) PREPARACION DE DNA DE PLASMIDO

El método utilizado para la purificación del plásmido pMY11, es el de lisis alcalina descrito por Maniatis et al (41). El DNA del plásmido se preparó por amplificación del número de copias en cultivo creciendo en fase logarítmica, por adición de cloramfenicol (12).

3) MINIPURIFICACION DE DNA DE PLASMIDO

El método utilizado es descrito por Maniatis et al (41), y consiste en la semipurificación del plásmido en pequeñas cantidades con el fin de caracterizar o identificar el plásmido rápidamente.

4) ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

El método usado para separar, identificar y purificar fragmentos de DNA es por medio de electroforesis en geles de agarosa. Las preparaciones de DNA, tanto de bacterias como de plásmido, fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa al 1% (Bio-Rad), utilizando una solución amortiguadora TAE (Tris, EDTA, Acetato de Potasio), a 100 volts como reportan Bolivar et al (4). Se tiñen con una solución de 0.5 µg/ml Bromuro de etidio (Sigma) durante 5 minutos. El DNA se visualiza con luz ultravioleta de onda corta con un transluminador (Ultraviolet Products Inc, San Gabriel, California, EUA).

5) DIGESTIONES DE DNA BACTERIANO, PLASMIDOS Y FAGOS CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Las condiciones para digerir con endonucleasas de restricción se han estandarizado para usar únicamente 3 soluciones distintas:

Solución:	Bajo	Medio	Alto
-NaCl	-	50mM	100mM
-Tris-HCl (pH 7.5)	10mM	10mM	50mM
-MgCl ₂	10mM	10mM	10mM
-Ditiotreitol	1mM	1mM	1mM
-Enzima		HindIII	BamHI
		EcoRI	SalI
		BglI	

A cada reacción se le adicionó betamercaptoetanol al 1% (1ul/20ul de reacción) y 4mM Espermidina. Las cantidades utilizadas de DNA para cada reacción fueron entre 1-3 µg. Se incubaron a 37° C toda la noche y las reacciones se detuvieron calentando a 65° C y agregando 1X de solución de parar, (0.25% azul de bromofenol, 0.25% de xilencianol y 15% ficol tipo 400 en agua).

6) HIBRIDIZACION DE ACIDOS NUCLEICOS

La hibridización de fragmentos de DNA, separados por electroforesis y transferidos a filtros de nylon, se hizo de acuerdo a la técnica de Southern (60). El horneado, prehibridización, hibridización y lavado, se hizo de acuerdo a Maniatis et al (41), y la autorradiografía de los filtros se realizó de acuerdo a Swanstrom y Shank (61).

7) MARCAJE DE DNA "IN VITRO" CON 32P

El marcaje interno radioactivo con 32P, en las moléculas del plásmido que se usó como detector de hibridización, se hizo de acuerdo a la técnica "Nick Translation" ("traslado del corte") descrita por Rigby et al (58).

8) CRECIMIENTO DE LOS FAGOS RECOMBINANTES Y PURIFICACION DE DNA

El crecimiento de los fagos recombinantes se hizo como describen Karn et al (32). La purificación de DNA en gradiente de CsCl se efectuó de acuerdo a la técnica que describe Maniatis et al (41).

9) MINIPURIFICACION DE FAGOS RECOMBINANTES SIN CsCl

Se inoculan 42ml de NZCYM con una solución que contiene 0.1ml de fagos recombinantes en SM, 0.1ml de un cultivo de toda la noche de la cepa receptora O359, crecida en CY más 0.2% maltosa, y 0.1ml de 1M Ca y Mg previamente incubada a 37° C por 20 minutos. El cultivo de 42ml se incuba a 37° C durante toda la noche. Se agrega 0.5ml de CHCl₃ y se dejan 15' con agitación a 37° C. Se adiciona 2µg/ml de DNasa y 4.5µg/ml de RNasa incubándose 30' a temperatura ambiente. Se agrega 1M NaCl y se centrifuga 30' a 7 000 rpm a 4° C. El sobrenadante se centrifuga a 25 000 rpm durante 1 hora 30' a temperatura ambiente en el rotor SW28. La pastilla se resuspende en 0.4ml de 0.1M Tris-HCl pH 7.5 y 0.3M NaCl. Se trata con 50µg/ml proteinasa K, 0.1% SDS y 1mM EDTA 1 hora a 65° C. Se extrae una vez con fenol 1:1 (V/V), dos veces con fenol-CHCl₃-alcohol isoamilico y una con CHCl₃-alcohol isoamilico. La fase acuosa se precipita con dos y medio volúmenes de etanol frío; se centrifuga durante 15' en una microfuga Eppendorf, se decanta el sobrenadante y se seca la pastilla al vacío. Se resuspende en 100 µl de agua bidestilada estéril y se determina la concentración del DNA en un gel de agarosa al 1%.

10) ANALISIS DE PROTEINAS EN MAXICELULAS DE E. coli

Se analizó la expresión selectiva de las proteínas producidas por los fagos recombinantes derivados de lambda 1059, en la cepa M159. Esta cepa es una mutante uvrA, recA, de E. coli K12, donde puede suprimirse la síntesis de proteínas endógenas y expresar únicamente las proteínas codificadas por los genes del fago, después de irradiación con luz ultravioleta. Estas proteínas pueden ser detectadas mediante su marcaje selectivo in vivo, usando aminoácidos radioactivos. Esta técnica es descrita por Calhoun y Gray (8).

11) ELECTROFORESIS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA PARA ANALISIS DE PROTEINAS

Las preparaciones de proteínas fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida al 11.5% preparados de acuerdo al método descrito por Laemmli (35). La electroforesis se llevó a cabo en una solución amortiguadora de Tris-Glicina y SDS, a 20mA para el gel superior y 40mA para el gel inferior. La tinción se realiza con una solución de azul de Coomassie al 0.01% (en ácido acético al 10%) a 80° C durante 15' y se destiñe a la misma temperatura con 10% ácido acético. Se seca con vacío y se expone a una película de autorradiografía.

12) SUBCLONACION DEL GENE AISLADO

Las condiciones para desfosforilar con fosfatasa alcalina el vector pBR322, cortado con BamHI, y su subsecuente ligada con ligasa del fago T4 al fragmento de 3Kb de S.typhi, proveniente del fago recombinante lambda VFC1 por digestión con EgII, son básicamente las descritas por Bolívar et al (5).

13) TRANSFORMACION DE *E. coli* CON DNA DE PLASMIDO

La preparación de células competentes para transformación, tanto de la cepa HB101 como de la cepa P678-54, se llevo a cabo mediante el método de cloruro de calcio descrito por Maniatis et al (41).

14) ANALISIS DE LAS PROTEINAS CODIFICADAS POR PLASMIDOS RECOMBINANTES EN MINICELULAS

Se analizó la expresión selectiva de las proteínas producidas por los plásmidos recombinantes derivados de pBR322 en minicélulas de la cepa P678-54. Esta cepa tiene la característica de producir minicelulas carentes de DNA cromosomal que conservan la capacidad de sintetizar proteínas a partir de plásmidos; éstas pueden ser detectadas mediante su marcaje con aminoácidos radioactivos seguido de electroforesis en gel y autorradiografía, tal como lo describen Dougan y Kahoe (18).

15) MAPEO DE RESTRICCION DEL PLASMIDO pVF27

El mapeo con diferentes enzimas de restricción, del plásmido construido, se realizó mediante digestiones dobles y sencillas seguidas de electroforesis en gel de agarosa.

RESULTADOS

LOCALIZACION DEL GENE ompC DE Salmonella typhi.

Para localizar el gene ompC de S. typhi, se utilizó como detector heterólogo de hibridización el plásmido pMY111 contenido en la cepa T19 de E. coli (45), la cual fue proporcionada por el grupo del Dr. M. Inouye de la Universidad Estatal de Nueva York, Stony Brook, N.Y. E.U.A. El plásmido pMY111 tiene un tamaño de 7,060 pares de bases (pb) y está constituido por el plásmido vector pBR322 y por un fragmento de 2,700 pb del genoma de E. coli, que contiene el gene ompC clonado en el sitio de HindIII.

La proteína Omp C de E. coli consta de 346 aminoácidos, lo que corresponde a una secuencia de DNA de 1,038pb. Por tanto, en el fragmento de 2,700pb del pMY111 cabe completo el gene ompC de E. coli. (Fig. 6).

Después de purificar DNA del plásmido pMY111, mediante el método de lisis alcalina descrito por Maniatis (41), se comprobaron los sitios de restricción reportados. El plásmido fue digerido con la endonucleasa de restricción BglII. En la Fig. 7 se muestra la separación por electroforesis en gel de agarosa de DNA digerido con BglII. En el carril a se ven las tres bandas que corresponden al pMY111, las cuales tienen un tamaño aproximado de 7.0 (que corresponde al plásmido lineal digerido parcialmente), 6.0 y 1.0 Kpb, respectivamente.

Conjuntamente, se aisló DNA de la cepa S. typhi IMSS-1 (serotipo 9,12,d,Vi), la cual fue proporcionada por el grupo del Dr. Jesús Kumate del IMSS. Esta cepa es altamente virulenta y fue aislada de pacientes con fiebre tifoidea en estado agudo (27). Esta extracción dió como resultado ácidos nucleicos de alto peso molecular y de gran pureza.

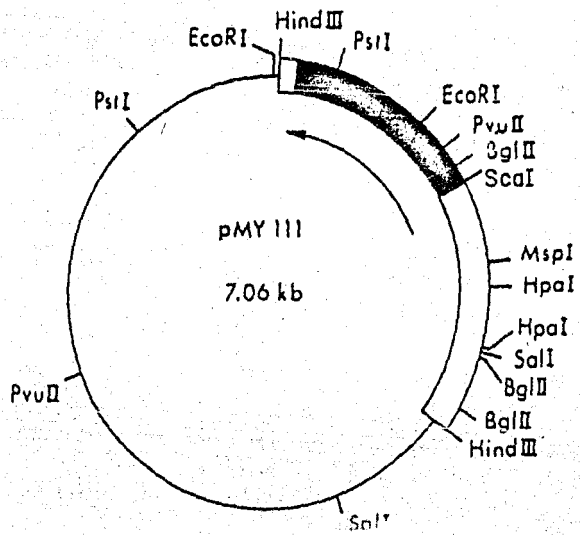


FIG.6.- Plásmido pMY111, en el cual se encuentra clonado el gene *ompC* de *E. coli*.

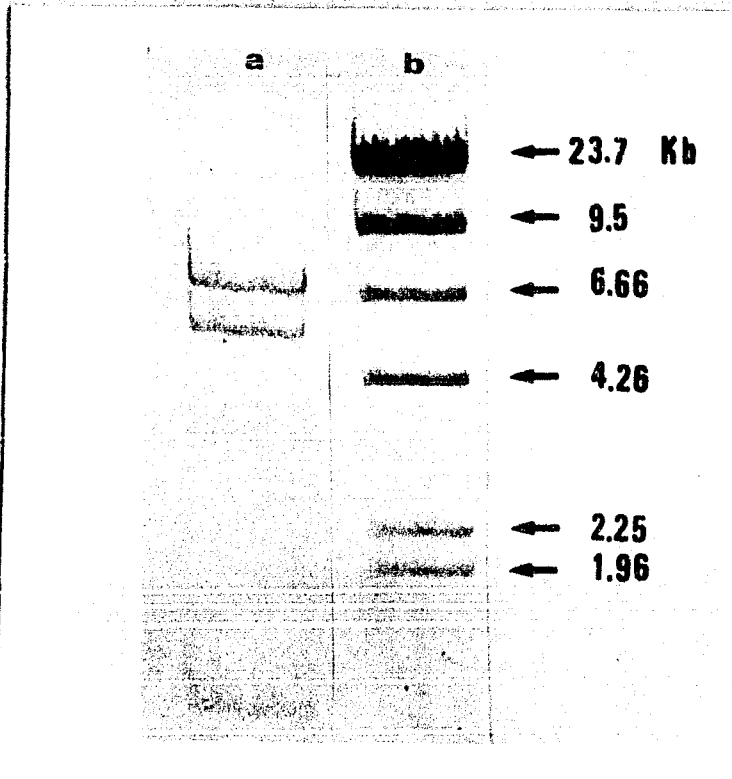


FIG.7.- Electroforesis en gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio: carril a) DNA del plásmido pMY111 digerido con EgII: la banda superior corresponde al plásmido linearizado: banda central 6.0 Kpb; banda inferior 1.0 Kpb; carril. b) DNA de lambda cortado con HindIII como marcador de peso molecular.

También se aisló DNA de E. coli cepa Q359, la cual se usó como control positivo de hibridización. Estos DNA fueron digeridos con tres endonucleasas de restricción en diferentes combinaciones: EcoRI-HindIII, BglII-HindIII, EcoRI y BglII; separados electroforéticamente en geles de agarosa de acuerdo a su tamaño; transferidos a filtros de nylon; e hibridizados de acuerdo al método de Southern (60), utilizando como detector heterólogo el plásmido pMY111 marcado radioactivamente con fósforo-32.

Suponiendo la existencia de un buen porcentaje de homología entre ambos genes, por pertenecer ambas bacterias a la familia Enterobacteriaceae, esta hibridización se llevó a cabo a 42° C y 50% formamida. En la Fig. 8 puede observarse el resultado de esta hibridización. Como se esperaba, y tomando en cuenta la intensidad de la hibridización con la cepa de E. coli, si existe una secuencia en S. typhi que corresponde a la del gene ompC de E. coli. Con la digestión de BglII se obtuvo una sola banda de hibridización intensa de aproximadamente 3.0 Kpb y una de mayor tamaño menos intensa que pudiera deberse a una digestión parcial. Para comprobar esto, se digirió el DNA de S. typhi con BglII y BglII-BamHI, hibridizándolo en condiciones más relajadas; 40% formamida a 42° C. En la Fig. 9 se muestra el resultado de esta hibridización. El carril a representa el DNA del plásmido pMY111 digerido con BglII como control positivo de hibridización; el carril b y c muestran la hibridización del genoma de S. typhi digerido totalmente con BglII y BglII-BamHI respectivamente. Con esto se comprobó que la secuencia que corresponde al gene ompC de E. coli está flanqueada, en el cromosoma de S. typhi, por sitios de BglII y, dado el tamaño del gene en E. coli, en esta banda de aproximadamente 3.0 Kpb debe encontrarse completo el gene ompC de S. typhi.

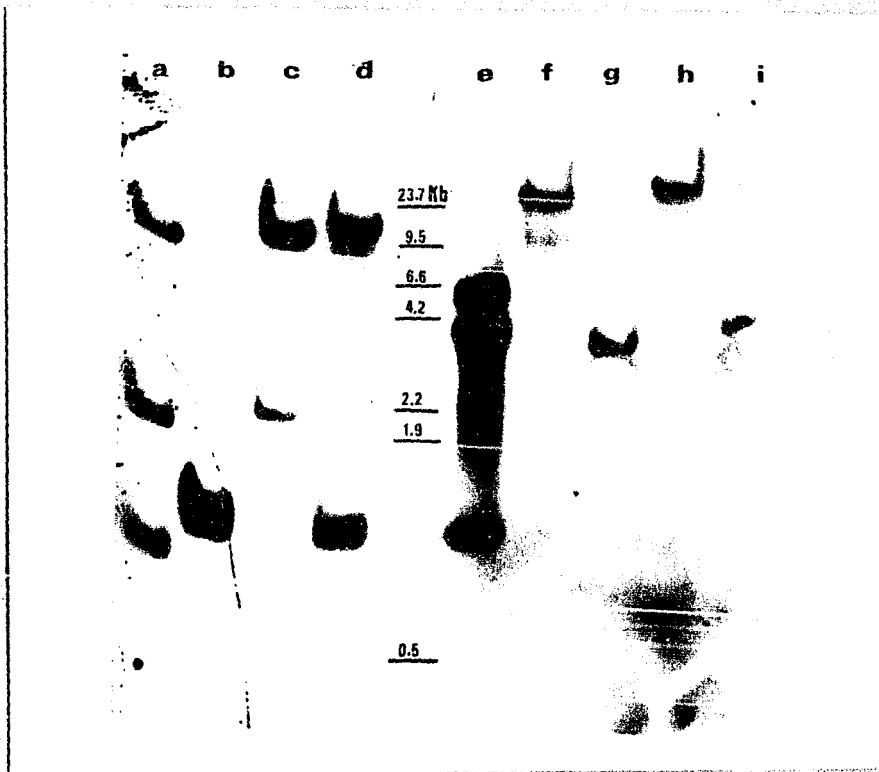


FIG.8.- Hibridización tipo Southern de DNA total de *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* contra el plásmido pMY111 marcado radioactivamente. DNA de *E. coli* cortado con: a) EcoRI-HindIII, b) BglII-HindIII, c) EcoRI y d) BglII; DNA de *S. typhi* cortado con: f) EcoRI-HindIII, g) BglII-HindIII, h) EcoRI e i) BglII; e) pMY111 cortado con BglII como control positivo de hibridización. El carril central muestra las posiciones de las bandas de DNA de lambda cortado con HindIII como marcadores de peso molecular.

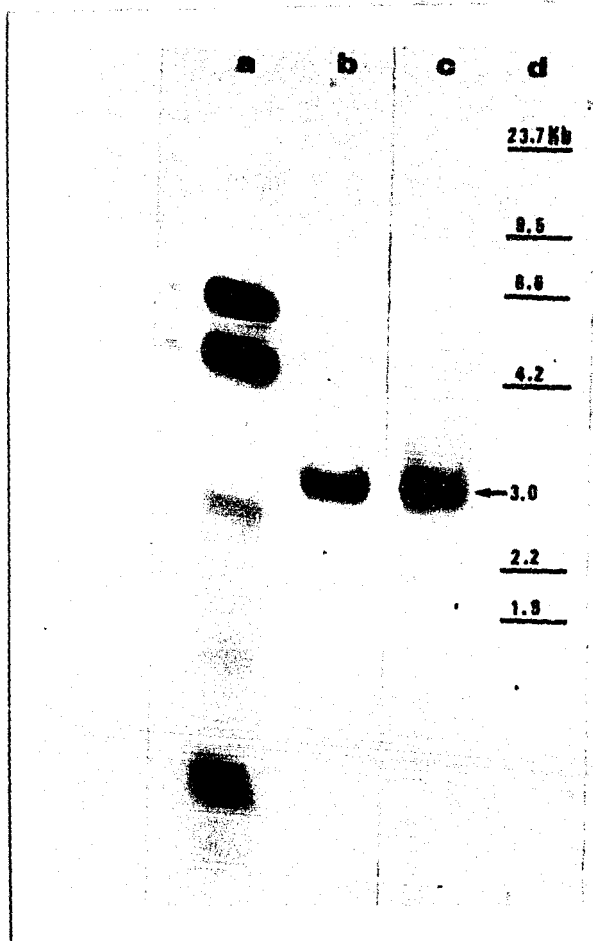


FIG.9.- Hibridización tipo Southern de DNA total de *S. typhi* contra el plásmido pMY111 marcado radioactivamente: a) pMY111 cortado con EglIII; DNA de *S. typhi* cortado con b) EglIII y c) EglIII-BamHI; d) muestra la posición de las bandas de DNA de lambda cortado con HindIII, como marcadores de peso molecular.

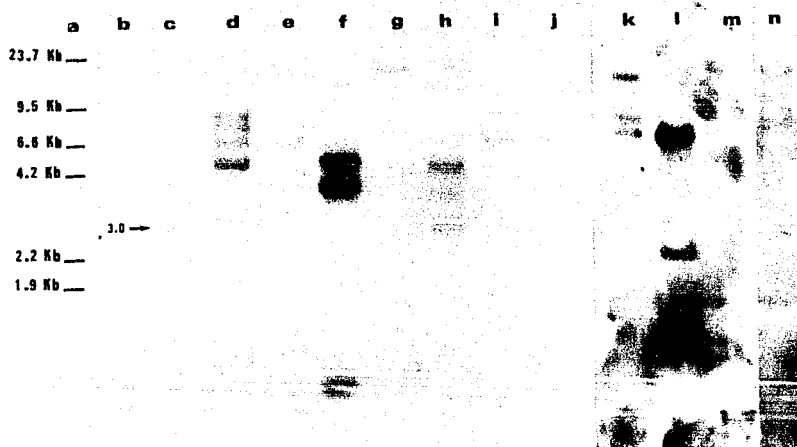
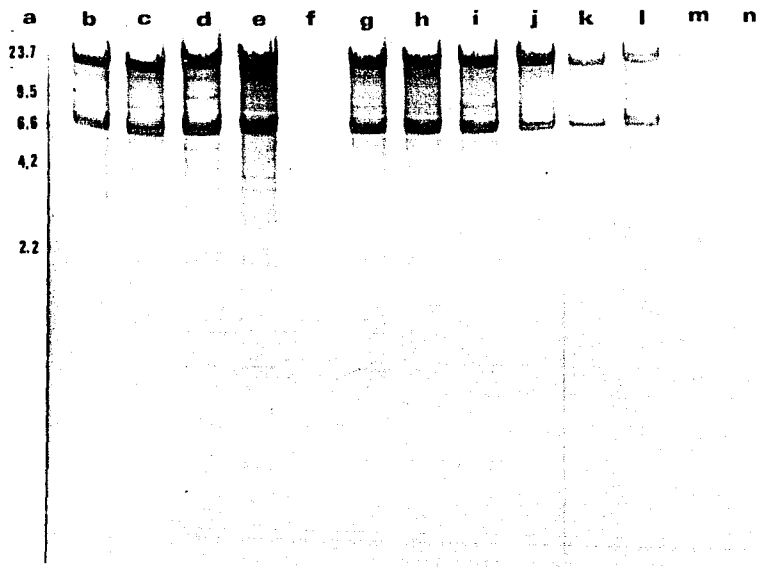


FIG.10.- A) Hibridización tipo Southern del DNA de doce grupos, de cien fagos cada uno, digerido con BglII-BamHI, contra el plásmido pMY111 marcado radioactivamente.



B) Patrón de restricción generado por las enzimas BglIII-BamHI en el DNA de los doce grupos, con cien fagos cada uno.

agrupamientos contra el plásmido pBR322 (Datos no mostrados). La razón para usar esta estrategia metodológica es la de evitarse la presencia de DNA del huésped E. coli, que interferiría con la detección; y la de poder discernir los falsos positivos de las clonas de interés. Al amplificar la agrupación 2 y analizar 180 fagos diferentes, divididos en seis grupos con treinta cada uno, ya no encontramos hibridización (datos no mostrados). Esto nos hizo pensar que se trataba de un fago poco competitivo, que al amplificarlo y diluirlo se perdía. Por ello, con el propósito de delimitar el fago y hacerlo más competitivo para evitar que se perdiera al hacer diluciones, la estrategia que se siguió fue propagar en medio sólido 1,056 fagos independientes partiendo de la agrupación 2 antes seleccionada. Esta contiene aproximadamente cien fagos diferentes. Los fagos se sembraron sobre un césped de E. coli Q359 por duplicado, de uno en uno, en 44 cajas petri. Cada caja contenía veinticuatro fagos provenientes de diferentes placas de lisis. Las placas de lisis de las 44 cajas fueron eluidas con SM y guardadas por separado en tubos de ensayo (cada tubo conteniendo veinticuatro fagos diferentes). Se hicieron seis agrupaciones, conteniendo cada una 144 fagos distintos, esto es, una alícuota de seis grupos de veinticuatro. Con ello se analizaron en total 864 fagos independientes.

Después de crecer los fagos en líquido, se purificó DNA y se hibridizó con el plásmido pMY111. Las condiciones de hibridización para los siguientes experimentos fueron 42° C en 40% formamida lavando hasta 0.1% SSC a 50° C. Esta hibridización (Fig.11) permitió localizar el fago de interés entre los seis grupos. La banda de hibridización se aprecia en la agrupación 2 (carril b). Las seis agrupaciones de veinticuatro fagos que formaban este grupo 2, con 144 fagos diferentes, fueron analizados similarmente, pero ahora por separado (Fig. 12).

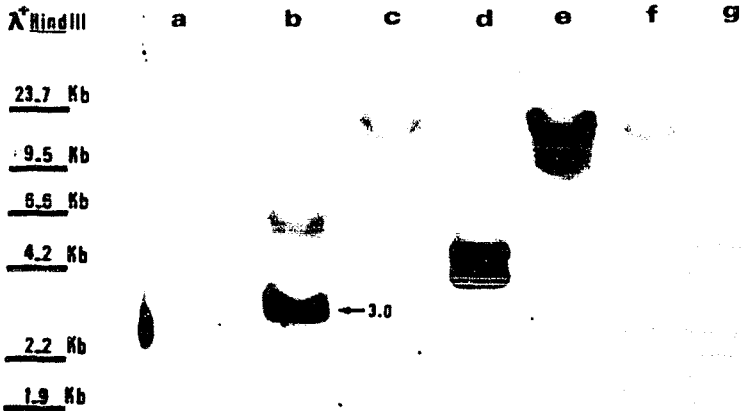
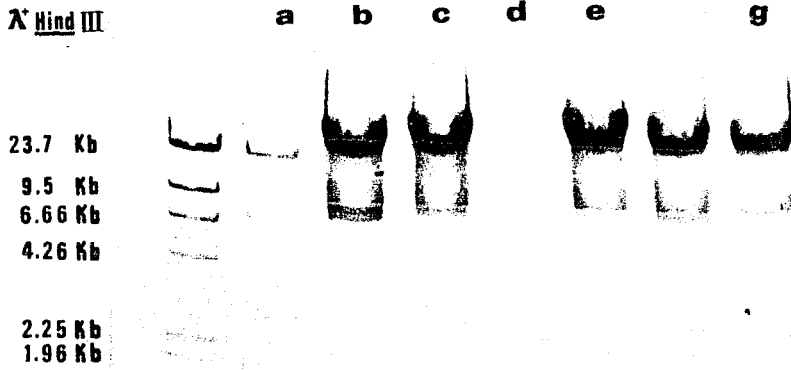


FIG.11.- A) Hibridización tipo Southern del DNA de seis agrupaciones (carriles a-c y e-g), con 144 fagos cada una, contra el plasmido pMY111. carril d, pMY111 cortado con EglII como control positivo de hibridización. Lambda HindIII como marcador de peso molecular.

λ Hind III



B) Análisis electroforético en gel de agarosa, teñido con Bromuro de Etidio, del patrón de restricción del DNA de la seis agrupaciones digerido con BglII-BamHI.

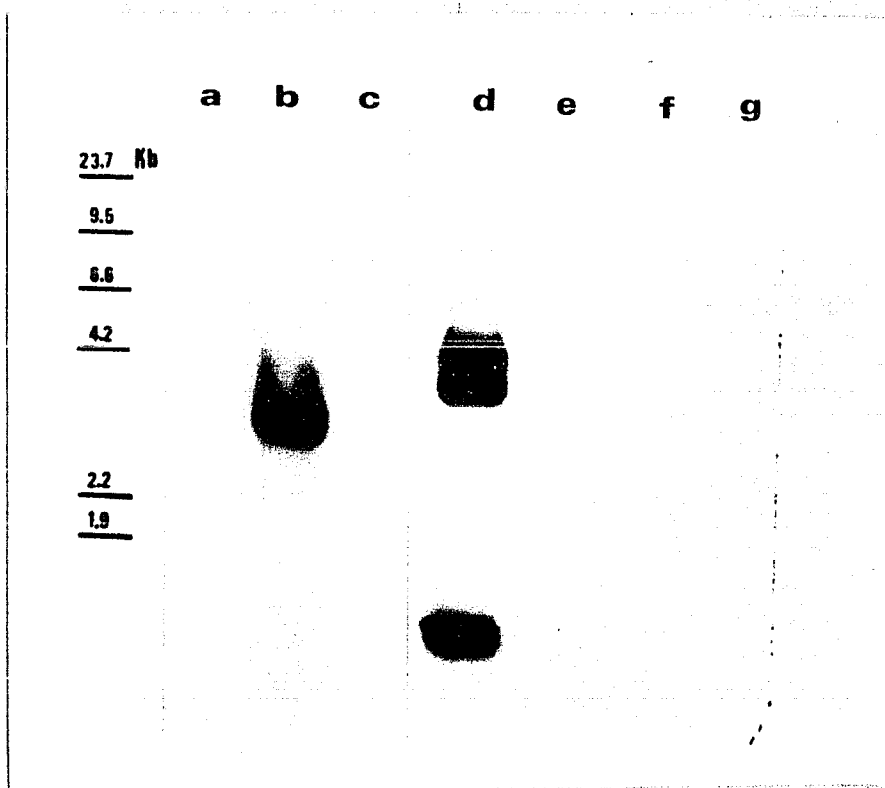
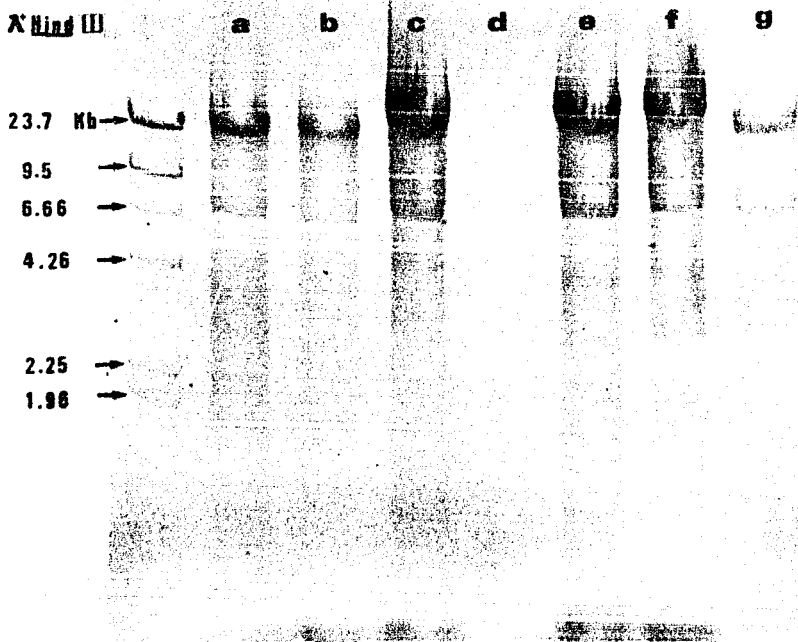


FIG.12.- A) Hibridización tipo Southern del DNA de seis grupos, con veinticuatro fagos cada uno, contra el plásmido pMY111.



B) Patrón de restricción del DNA de los seis grupos con veinticuatro fagos cada uno, digeridos con BglII-BamHI.

Se encontró hibridización positiva en el grupo 2 (carril b), con lo cual se tenía ya el fago de interés dentro de veinticuatro fagos independientes. Esto permitió separar los veinticuatro fagos de manera independiente a partir de la caja duplicado de este grupo. Estos se pusieron en tubos Eppendorf y se eluyeron con iml de SM. Se analizaron estos fagos, dividiéndolos en seis grupos de cuatro, localizándolo en los grupos 3 y 4 (Fig. 13 carriles c y d). Se tomaron ahora los cuatro fagos del grupo 3 más dos fagos del grupo 4; y en la figura 14 B se muestra el patrón de restricción de los seis fagos independientes donde puede observarse que en los carriles e y f hay una banda de 3.0 Kpb. El autorradiograma de la Fig. 14 A muestra que el gene ompC está contenido en los fagos E y F.

A partir del análisis de los veinticuatro fagos independientes, las hibridizaciones se llevaron a cabo con un fragmento del pMY111 que va de HindIII a ScaI (ver fig. 6), purificado de un gel de agarosa de bajo punto de fusión (ver métodos) y que comprende casi en su totalidad el gene ompC de E. coli. Las hibridizaciones en los últimos fagos corresponden a fragmentos perfectamente visibles en un gel teñido con bromuro de etidio. Con ello se puede apreciar el enriquecimiento progresivo de los genes, ya que cuando éstos están muy diluidos no pueden discernirse bandas específicas, correspondientes a la hibridización, usando cantidades totales de DNA similares a las mostradas en la Fig. 14 B.

Una vez que se aislaron dos fagos independientes, lambda VFC1 y lambda VFC2, que contienen el gene ompC, se comprobó que no estuviera contaminado con algún otro. Para esto se creció el fago lambdaVFC1 a baja densidad en medio sólido y se tomaron seis placas de lisis al azar. El DNA de ellas se semipurificó y se digirió con BglII-BamHI.

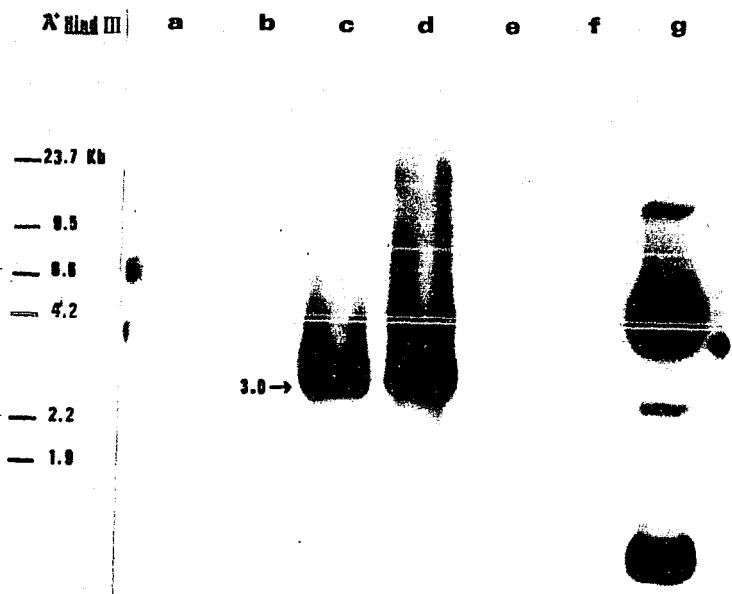
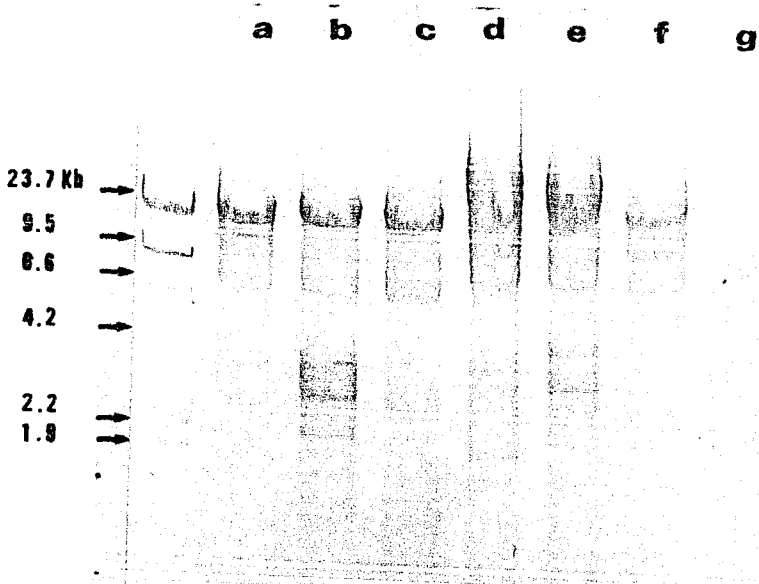


FIG.13.- A) Hibridización tipo Southern del DNA de veinticuatro fagos diferentes contra el fragmento de 1.0 Kpb (HindIII-ScaI) del pMY111 que porta casi completo el gene ompC de E.coli (ver texto). Cada carril (a-f) representa cuatro fagos independientes. Carril g) pMY111 cortado con EgII como control positivo de hibridización.



B) Patrón de restricción del DNA de los seis grupos con cuatro fagos diferentes cada uno digeridos con EgII-BamHI.

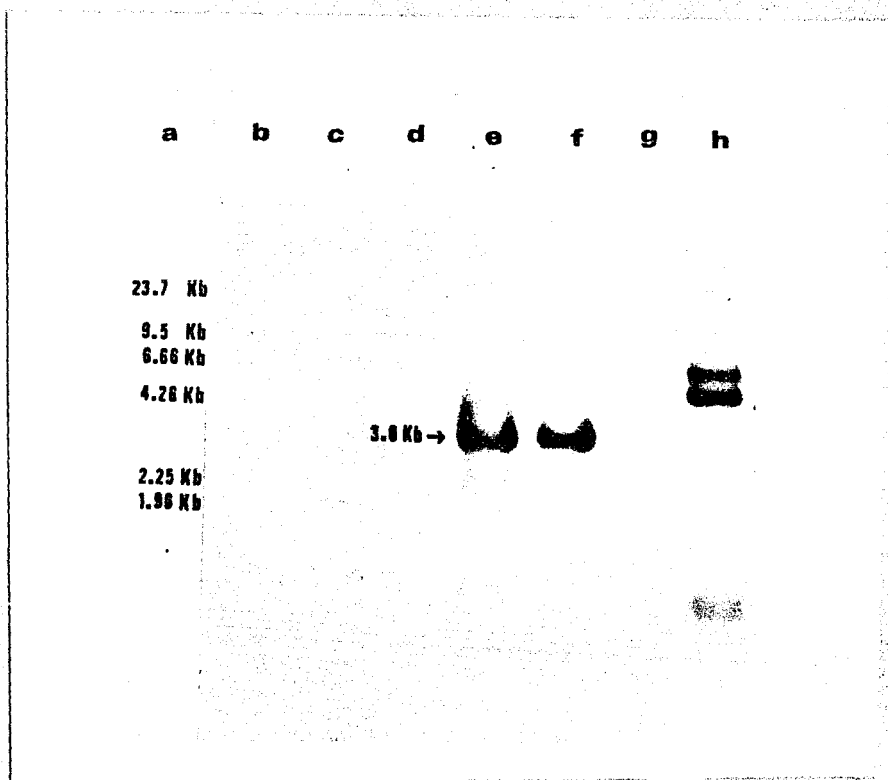


FIG.14.- A) Hibridización tipo Southern del DNA de seis fagos independientes contra el fragmento de 1.0 Kpb del pMY111 (ScaI-HindIII); cada carril representa un fago. Carril e) lambda VFC1 y f) lambda VFC2; carril a) lambda HindIII como marcador de peso molecular; carril h) pMY111 cortado con BglIII como control positivo de hibridización.



Patrón de restricción generado por las enzimas BglIII-BamHI en el DNA de los seis fagos independientes aislados; el análisis es por electroforesis en gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio. Carril e) lambda VFC1 y f) lambda VFC2.

encontrándose el patrón de restricción conocido en todas las placas. Esto nos aseguraba que se trataba de un solo fago (Datos no mostrados).

Se tomó una de estas placas y se creció en líquido para purificar el fago por medio de un gradiente de CsCl. Se extrajo DNA de una parte de estos fagos y se digirió con BglII-BamHI, así como con otras endonucleasas (BglII, HindIII, EcoRI, SalI y PstI en diferentes combinaciones) para tratar de determinar algunos otros sitios de restricción cerca de este gene. Este DNA fue hibridizado con el fragmento de 1.0 Kpb del plásmido pMY111 para comprobar que este fago puro contuviera el gene ompC de S.typhi y también para localizar algún otro posible sitio dentro o más cerca del gene. El resultado de esta hibridización se muestran en la Fig. 15. Como puede observarse, ompC se encuentra flanqueado por, sitios de BglII y no tiene sitios de restricción más cercanos al gene para las enzimas probadas.

Con el propósito de identificar las proteínas codificadas por el fago lambda VFC1, se transfectó una cepa productora de maxicélulas, E.coli M159, con el fago de interés y se analizaron las proteínas radioactivas producidas, previa inactivación de los ácidos nucleicos de la cepa huésped con luz ultravioleta. Estas proteínas se compararon con las producidas por el fago lambda 1059, así como por otros fagos recombinantes. Al analizar el patrón de proteínas totales presentes en los extractos de maxicélulas de cada uno de los fagos mencionados (Fig 16), se detectó la presencia de una proteína que migra a la altura del peso molecular reportado para la proteína Omp C de E.coli (carril b y c) (45), la cual no se encuentra en el fago parental lambda 1059 (carril d), ni en los fagos recombinantes utilizados como control (carriles e y f). Estos experimentos apoyan la conclusión de que efectivamente la secuencia aislada corresponde al gene ompC de S.typhi.

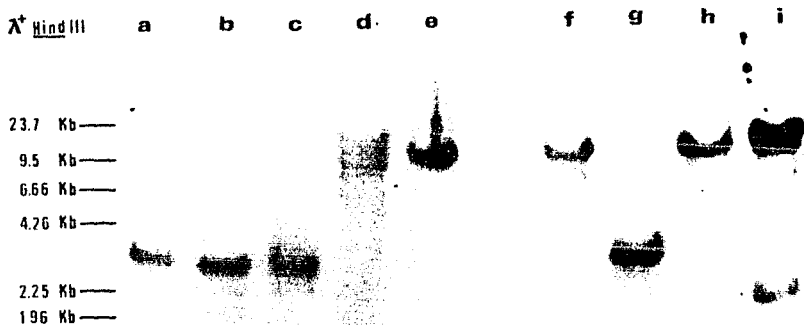


FIG.15.- Hibridización tipo Southern del DNA del fago lambda VFC1 cortado con: a) BglII; b) HindIII-BglII; c) EcoRI-BglII; d) EcoRI; e) HindIII; f) HindIII-EcoRI; g) SalI-BglII; h) HindIII-SalI; y i) EcoRI-PstI. El experimento muestra como los sitios más cercanos que flanquean la gene son los de BglII.

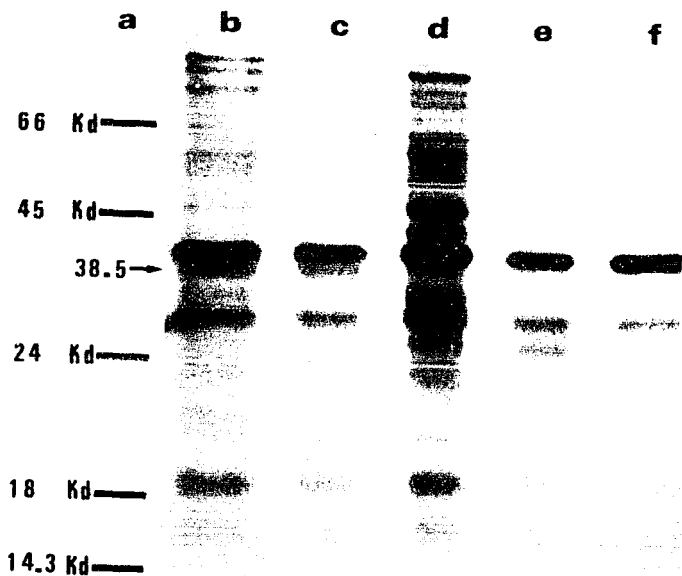


FIG.16.- Análisis de la expresión, en maxicélulas, de las proteínas marcadas con azufre-35 de los fagos lambda VFC1 y VFC2. Autorradiografía de la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 15%: a) marcadores de peso molecular; b) fago lambda VFC1; c) fago lambda VFC2; d) fago vector lambda 1059; e) y f) otros fagos recombinantes como control.

SUBCLONACION DEL GENE ompC DE Salmonella typhi.

A partir del DNA del fago lambda VFC1 se purificó el fragmento de 3.0 Kpb que se genera en una digestión con BglII y que, por hibridización, se observó que contiene completo al gene ompC de S. typhi. Este fragmento se purificó a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión (ver métodos). El inserto se subclonó en el plásmido pBR322 (5), el cual confiere resistencia a tetraciclina (Tc) y ampicilina (Ap) a la cepa de E. coli que lo contenga. La estrategia de clonación consistió en ligar, mediante la enzima ligasa del fago T4, el fragmento de 3.0 Kpb de S. typhi al vector previamente linearizado con BamHI (enzima que genera extremos cohesivos compatibles con los de BglII) y desfosforilado en este sitio con la enzima fosfatasa alcalina (BAP).

La desfosforilación evita que el plásmido se ligue sobre si mismo al remover los grupos fosfato ubicados en posición 5'; de tal forma que la recircularización del plásmido sólo se logra mediante la incorporación de un fragmento de DNA que no haya sido tratado con esta enzima. El sitio de BamHI en el pBR322 es único y se encuentra dentro del gene que confiere la resistencia a Tc (ver figura 5'), por tanto los plásmidos recombinantes confieren resistencia a Ap y sensibilidad a Tc, al interrumpirse el gene de esta resistencia por la clonación en BamHI. Esta característica permitió que, cuando la mezcla de la reacción de ligasa fue utilizada para transformar células competentes, de la cepa de E. coli HB101, las células transformadas con plásmidos recombinantes pudieran ser seleccionadas. Esto se hizo mediante la resiembra de las clonas que adquirieron la resistencia a Ap, aproximadamente 200, en medio con Tc. De este modo se pudo diferenciar

aquellas clonas sensibles a Tc (lo que indicaba que posiblemente tenían el inserto de interés) de aquéllas que a pesar de ser resistentes lo eran debido a que contenían pBR322 que no se digirió; o bien que no se desfosforiló y que al religarse transformó células competentes.

Simultáneamente, el inserto de 3.0 Kpb fue digerido con las enzimas de restricción ClaI y PstI para determinar si existían sitios para estas enzimas dentro del fragmento. El resultado indicó la presencia de dos sitios para ClaI y uno para PstI. Con esto se pudo contar con dos enzimas que podían corroborar la existencia del inserto en los plásmidos que resultaran posibles clonas positivas. De esta transformación se obtuvieron cuatro clonas sensibles a Tc, las cuales fueron amplificadas en LB más Ap para purificación rápida de plásmido (ver métodos). Los cuatro plásmidos fueron digeridos con ClaI y PstI; esperando que en aquel plásmido que tuviera el inserto correcto ClaI generara tres bandas de restricción: una de un tamaño aproximado de 7.0 Kpb (4,363 pb del vector más 3.0 Kpb del inserto) y dos fragmentos muy pequeños. Similarmente con PstI se esperaban dos bandas de restricción, ya que tanto el vector como el inserto contienen un sitio cada uno. En la Fig. 17 se puede ver que solamente una de las cuatro clonas contenía el plásmido deseado ya que las otras tres tienen un tamaño similar al del pBR322 (los fragmentos pequeños generados con ClaI no se alcanzan a apreciar). Esto hace pensar que la sensibilidad a Tc haya sido efecto de alguna deleción originada por exonucleasas en el plásmido lineal antes de circularizarse sobre sí mismo, lo que interrumpió la fase en el gene que confiere la resistencia a Tc.

Con el propósito de comprobar que el plásmido de 7.4 Kpb portaba el gene parcialmente homólogo al gene ompC de E.coli, se cortó DNA de este plásmido y se hibridizó contra el fragmento de 1.0 Kpb del pMY111

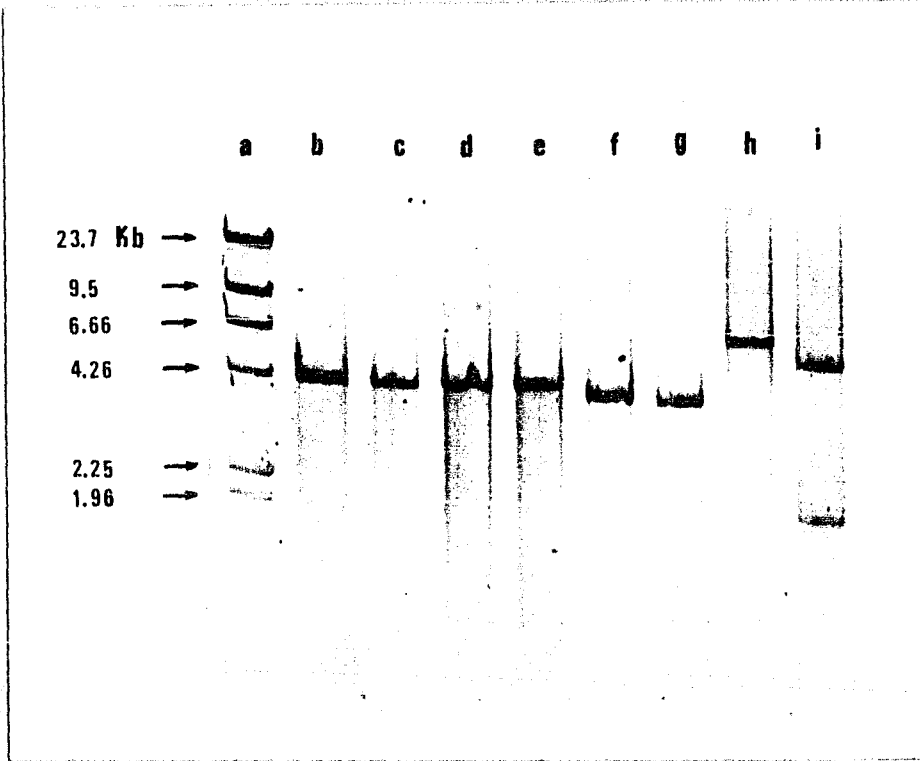


FIG.17.- Patrón de restricción del DNA de los cuatro plásmidos aislados a partir de los transformantes sensibles a tetraciclina; analizados por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Carriles b,d,f y h) *Cla*I y c,e,g e i) *Pst*I; plásmido 1 (b-c); 2 (d-e); 3 (f-g); y 4 (h-i). Obsérvese que sólo el plásmido 4 es de mayor tamaño. a) lambda *Hind*III como marcador de peso molecular.

que va de HindIII a ScaI y que contiene únicamente la secuencia que codifica para este gene en E.coli. La hibridización se hizo en condiciones severas; 50% formamida a 42° C y lavados hasta 0.1XSSC a 65° C. El resultado de este experimento, Fig. 18, indicó que efectivamente el plásmido creado contiene el gene ompC de S. typhi. Este plásmido se denominó pVF27.

El pVF27 se utilizó para transformar la cepa de E.coli P678-54 productora de minicélulas. Este sistema permite observar únicamente la expresión de proteínas codificadas por el plásmido (ver métodos). La Fig. 19 muestra el resultado de este ensayo, donde podemos observar que además de los productos del gene para la resistencia a Ap (diferentes formas de la β -lactamasa con un PMA alrededor de 28 Kd) se producen dos bandas más, una de aproximadamente 38.5 Kd y otra un poco menos abundante de aproximadamente 39.5 Kd. Estas dos proteínas migran dentro del rango del peso molecular aparente en el que lo hacen las porinas de E.coli. El hecho de que se produzcan dos bandas puede deberse a la presencia de gran cantidad del péptido precursor que no se alcanza a procesar debido a la sobreexpresión del gene.

Finalmente, en estudios posteriores en nuestro laboratorio, se generó el mapa de restricción para una serie de enzimas que se muestra en la Fig. 20.

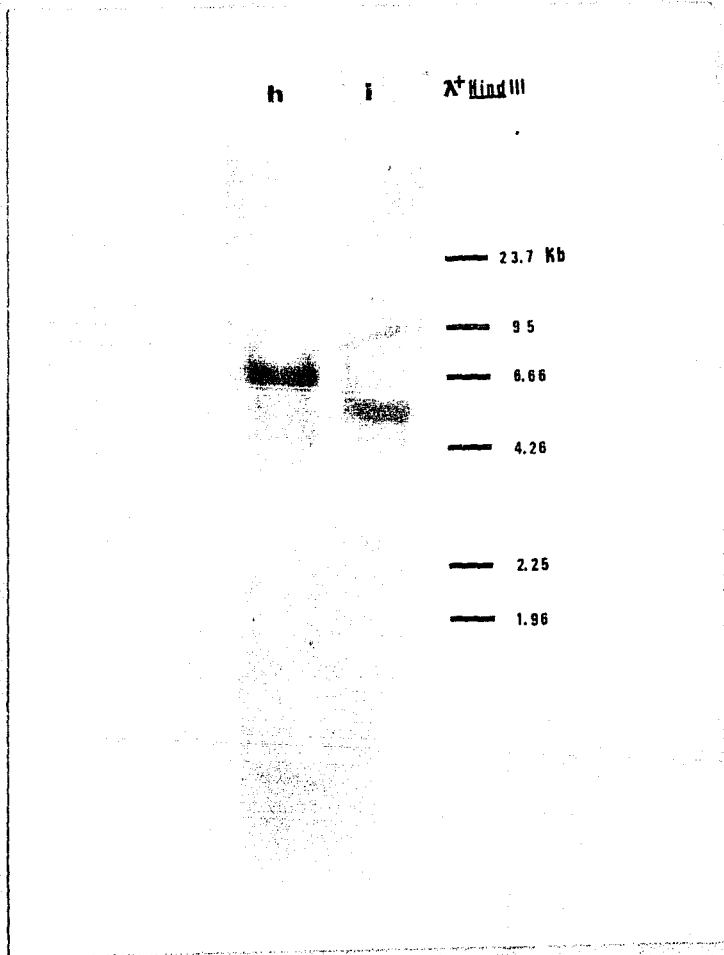


FIG. 18.- Hibridización del DNA del plásmido cuatro digerido con ClaI (carril h) y PstI (carril i) contra el fragmento de 1.0 Kpb del pMY111. Carriles h e i de la figura 17.

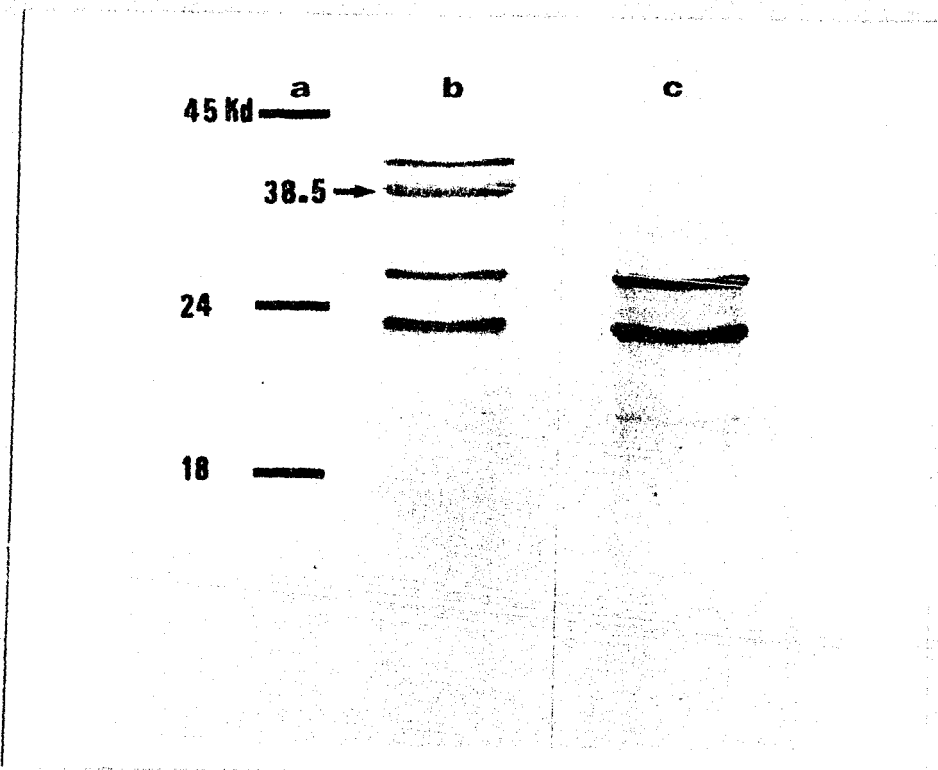


FIG. 19.- Análisis de las proteínas, marcadas con azufre-35, codificadas por el plásmido pVF27 (antes plásmido 4) en minicélulas. La figura muestra la autorradiografía de la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 15%. Carril a) marcadores de peso molecular; b) plásmido pVF27; y c) plásmido vector pBR322.

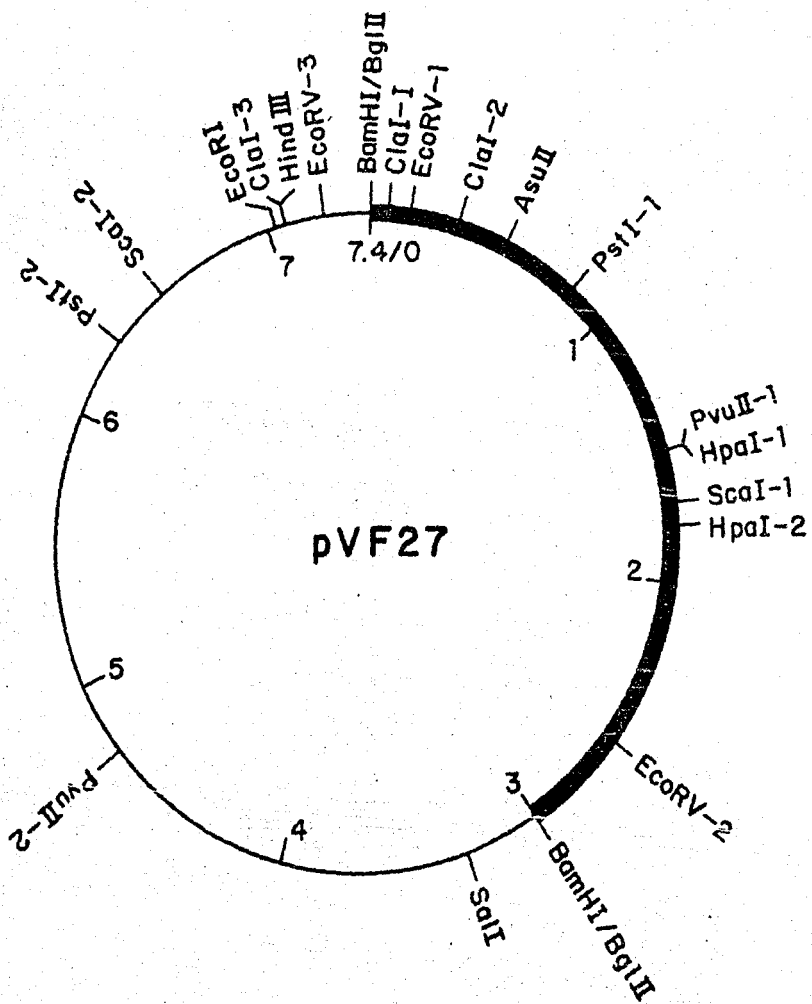


FIG. 20.- Mapa de restricción del plásmido pVF27.

CONCLUSION Y DISCUSION

Basados en que los genes ompC, ompF, ompA y phoE de E. coli han sido aislados y caracterizados, y en el parentesco entre esta bacteria y S. typhi, ambas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, en este trabajo fue utilizado el gene ompC de E. coli como detector heterólogo de hibridización. Se asumió que entre el gene de ambas bacterias existirían regiones de la secuencia nucleotídica conservadas y variables, lo cual se ha observado para el gene ompA de cuatro enterobacterias diferentes (22).

El gene ompC de S. typhi fue localizado en DNA total digerido con EgII, enzima que genera una banda de aproximadamente 3.0 kpb como se muestra en la figura 9. Este experimento muestra de manera clara la existencia de una secuencia muy parecida a la que porta el detector, ya que las condiciones de hibridización y lavado no permiten fácilmente la formación de híbridos inespecíficos o que no conserven un buen porcentaje de homología. Además, la presencia de una banda única, de fuerte señal radioactiva, indica que no existen otras secuencias parecidas y que el fragmento identificado contiene la contraparte del gene de E. coli.

Contando con un patrón a seguir, se emprendió la búsqueda de este fragmento dentro del banco de fagos, iniciando con doce agrupaciones de cien fagos diferentes cada una. El total de fagos utilizados representa poco más de cuatro veces el genoma completo de S. typhi, asumiendo que éste es de un tamaño similar al de E. coli, lo cual da una probabilidad del 99% de encontrar casi cualquier gene clonable dentro del banco (11). El DNA de las agrupaciones fue analizado por electroforesis y Southern. De este experimento se generaron varias bandas de hibridización las

cuales en su mayoría fueron caracterizadas como producto de falsos positivos (datos no mostrados). Este fenómeno se produce a causa de la hibridación de una región que conserva homología entre el vector pBR322 (el cual contiene la sonda utilizada) y fagos que presentan rearrreglos en el fragmento dispensable y que por tanto escapan del sistema de selección positiva de recombinantes en la cepa Q359 (ver introducción). La banda no correspondiente a un falso positivo tenía tamaño similar a la observada en el genoma, por lo que esta agrupación fue seleccionada para continuar el trabajo.

Al hacer nuevas subdivisiones de menor número de fagos, con la idea de ir enriqueciendo la clona de interés, la hibridación no generó la señal buscada. Este resultado inesperado nos llevo a plantear la posibilidad de que los fagos recombinantes que portaran genes que tuvieran niveles altos de expresión, como lambda VFC1, resultarían poco viables. Esto debido a la muerte del huésped (por sobreacumulación del producto, acaparamiento de ribosomas para síntesis de proteínas, etc.) antes de que se cumpliera totalmente el ciclo lítico del fago en cuestión. Por lo tanto, ante la competencia de fagos que se multiplicaran más favorablemente, lambda VFC1 se diluiría entre la población total y su señal en la hibridación sería casi nula. Este fenómeno también pudo haber sido la razón para la presencia de una señal tan débil en el primer experimento (fig. 10 A).

Basados en lo anterior, se diseñó la estrategia descrita en los resultados, con la cual cada fago crecería de manera independiente sin competir con otros fagos. Esto además permitió hacer un uso mucho más eficiente del banco, de tal manera que ahora resulta más rápido localizar las clonas que porten alguna secuencia de interés.

A partir de aquí la señal producida por el fragmento de 3.0 kpb se fue haciendo más intensa hasta que dos clonas fueron aisladas (Fig. 14 A). Ambas contienen esta secuencia, la cual durante los últimos experimentos fue detectada utilizando como sonda el fragmento del pMY111 (ScaI-HindIII) que contiene únicamente el gene estructural de la proteína Omp C de *E. coli*. Esto apoyaba nuevamente que las clonas aisladas contenían el gene correspondiente de *S. typhi*. Es importante recalcar que los datos generados por hibridización no concluyen de manera contundente que uno obtiene lo que espera, pero, en el caso de estos experimentos, la ausencia otras señales y la intensidad de la señal obtenida permiten pensar que no se trata de un gene lejanamente parecido, sino uno que conserva regiones muy homólogas. A nivel de aminoácidos su función también pudiera ser similar; pero también cabe la posibilidad de que la parte variable les confiera funciones diferentes.

Los estudios posteriores se enfocaron en caracterizar el producto codificado por *ompC* de *S. typhi* (fig.16 y 19). En un estudio se observó la expresión de todas las proteínas codificadas por el fago lambda VFC1, en comparación a las del fago vector; y en otro se analizaron las proteínas codificadas por el plásmido pVF27, el cual se construyó subclonando el fragmento de BglII de 3.0Kb en el pBR322. En ambos casos se pudo observar la expresión de una proteína de aproximadamente 38.5kd, la cual migra con un peso molecular aparente similar al de la proteína Omp C de *E. coli* en un gel de poliacrilamida. Lo anterior fundamentó más la posibilidad de contar con un gene de *S. typhi* para una proteína de membrana externa, en este caso Omp C.

Es interesante comentar, basados en estos resultados, que es posible expresar genes de *S. typhi* en *E. coli* y, por otro lado, que los niveles de expresión de la proteína Omp C de *S. typhi* en este huésped

son muy altos (hecho que no concuerda con lo esperado para una proteína que en E. coli se osmoregula). Ello nos sugiere que las señales de regulación del huésped no son reconocidas por el gene clonado; o que en S. typhi la proteína no se regula bajo las condiciones de osmolaridad. Esto resulta altamente especulativo aunque sería de gran interés; ya que si la proteína se encuentra presente en la bacteria en cualquier condición de crecimiento, esto la postula como un buen candidato para ser un antígeno importante, ya que pudiera tener alguna función indispensable para la célula. Además, ello muy probablemente nos indicaría la existencia de una variabilidad importante entre los genes de estas dos bacterias.

Estos postulados, junto con estudios posteriores como la caracterización de la secuencia del gene y de la estructura de su producto, sin duda aportarán información importante para atacar esta enfermedad. Esto permitirá, mediante la identificación de zonas variables con respecto a otras enterobacterias, diseñar sistemas de diagnóstico que puedan reconocer el agente causal de la fiebre tifoidea de manera específica y rápida. Esto se lograría a partir de DNA utilizando oligonucleótidos que correspondan a las regiones variables del gene, como detectores en pruebas fluorescentes o colorimétricas; o mediante la utilización de los anticuerpos monoclonales para reconocer el antígeno en suero o en heces fecales, por ejemplo. La justificación a todo esto es que actualmente no se cuenta con sistemas de diagnóstico que no generen respuestas inespecíficas, como las reacciones febriles; o que no sean tan agresivas como el muestreo de médula ósea, que además es muy lento.

Por último, hablar de vacunas es un tema muy delicado y pretencioso, ya que es difícil pensar que un solo antígeno pueda

conferir protección contra una enfermedad. Sin embargo, si se puede discutir la posibilidad de que una proteína que muestra ser un antígeno importante, ya sea por su abundancia (como es el caso de una PME como Omp C) o por la respuesta inmune que genera (lo que también ha sido observado para las PME), pueda llegar a formar parte de un conjunto de antígenos que confieran protección. De tal manera podría constituir parte de una vacuna acelular.

Los estudios para este gen y su producto se están iniciando, y habrán de canalizarse en la secuenciación del gen y de la proteína, y en el estudio de sus características inmunogénicas.

BIBLIOGRAFIA

- 0.- BALBAS, P., SOBERON, X., MERINO, E., ZURITA, M., LOMELI, H., VALLE, F., FLORES, N. and BOLIVAR, F. 1986. "Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives -- a review. GENE. 50:3-40.
- 1.- BECK, E. y E. BREMER. 1980. "Nucleotide sequence of the gene ompA coding the outer membrane protein II of *Escherichia coli* K12". NUCLEIC. ACID. RESEARCH. 8:3011-3024.
- 2.- BETLACH, M.C., V. HERSHFIELD, L. CHOW, W. BROWN, H.M. GOODMAN y H.W. BOYER. 1976. "A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the *EcoRI* restriction modification of DNA" FED. PROC. 35:2037-2043.
- 3.- BLATTNER, F.R., S.G. WILLIAMS, A.E. BLECHL, K. DENNISTON-THOMPSON, H.E. FABER, L.A. FURLONG, D.J. GRUNWALD, D.O. KIEFER, D.D. MOORE, E.L. SHELDON y O. SMITHIES. 1977. "Charon phages: safer derivatives of bacteriophage lambda for DNA cloning". 196: 161-169.
- 4.- BOLIVAR, F., R.L. RODRIGUEZ, P.J. GREENE, M.C. BETLACH, H.L. HEYNECKER, H.W. BOYER, J. CROSA y S. FALKOW. 1977. "Construction and characterization of new cloning system. GENE. 2: 95-113.
- 5.- BOLIVAR, F. 1978. "Construction and characterization of new cloning vehicles III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique *EcoRI* sites for selection of *EcoRI* generated recombinant DNA molecules. GENE. 4: 121-136.
- 6.- BRAUN, V. y V. BOSCH. 1972. "Repetitive sequence in the murein lipoprotein of the cell wall of *Escherichia coli*". PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 69: 970-974.
- 7.- BRAUN, V. 1975. "Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*". BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA. 415: 335-337.
- 8.- CALHOUN, D.H. y J.E. GRAY. 1981. "Detection of proteins coded by cloned DNA segments". FOCUS. (BRL) 3: 1-12.
- 9.- CHAI, T. y J. FOULDS. 1974. "Demonstration of missing outer membrane proteins in TolG mutants in *Escherichia coli*". J. MOL. BIOL. 85: 465-474.
- 10.- CLARKE, D.J. y O. MAALE. 1967. "DNA replication and the division cycle of *Escherichia coli*". J. MOL. BIOL. 23: 99-112.
- 11.- CLARKE, L. y J. CARBON. 1978. "A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *Escherichia coli* genome". CELL. 9: 91-99.
- 12.- CLEWELL, D. 1972. "Nature of ColE1 plasmid recombination in the presence of chloramphenicol" J. BACTERIOL. 110: 667-676.

- 13.- COLE, S.T., I. SONNTAG y U. HENNING. 1982. "Cloning and expression in Escherichia coli K12 of the genes for major outer membrane protein Omp A from Shigella dysenteriae, Enterobacter aerogenes and Serratia marcescens". J. BACTERIOL. 149: 145-150.
- 14.- DAIRI, T., K. INOKUCHI, T. MIZUNO y S. MIZUSHIMA. 1985. "Positive control of transcription initiation in Escherichia coli. A base substitution at the Pribnow box renders ompF expression independent of a positive regulator". J. MOL. BIOL. 184: 1-16.
- 15.- DATTA, D.B., B. ARDEN y U. HENNING. 1977. "Major proteins of the Escherichia coli outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors". J. BACTERIOL. 131: 821-829.
- 16.- DAVIS, D.B., R. DULBECCO, H.N. EISEN y H.S. GINSBERG. 1980. "Microbiology" 3era. Ed. Harper International Ed. 1355 pp.
- 17.- Di RIENZO, J.M., K. NAKAMURA y M. INOUE. 1978. "The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly and functions. ANN. REV. BIOCHEM. 47: 481-533.
- 18.- DOUGAN, G. y M. KEHOE. 1984. "The minicell system as a method for studying expression from plasmid DNA". METHODS IN MICROBIOLOGY. 17: 233-256B.
- 19.- ENDERMAN, R., C. KRAMER y U. HENNING. 1978. "Major outer membrane proteins of Escherichia coli K12: evidence for protein II being a transmembrane protein". FEBS LETT. 86: 21-24.
- 20.- ENGEL, A., A. MASSALSKI, H. SCHINDLER, D.L. DORSET y J.P. ROSENBUSCH. 1985 "Porin channel triplets merge into single outlets in Escherichia coli outer membranes". NATURE. 317: 643-645.
- 21.- FEISS, M., R.A. FISHER, M.A. CRAYTON y C. EGNER. 1977. "Packaging of the bacteriophage lambda chromosome: effect of the chromosome length". VIROLOGY. 77: 281-285.
- 22.- FREUDL, R. y S.T. COLE. 1983. "Cloning and molecular characterization of the ompA gene from Salmonella typhimurium". EUR. J. BIOCHEM. 134: 497-502.
- 23.- FRIEDMAN, D. y M. GOTTESMAN. 1983. "En: Lambda II". (Ed. Hendrix, R.W., Roberts, J.W., F.W. Sthal y R.A. Weisberg). COLD SPRING HARBOR LAB.
- 24.- HALL, M.N. y T.J. SILHAVY. 1981. "Genetic analysis of the major outer membrane proteins of Escherichia coli" ANN. REV. GENET. 15: 91-142.
- 25.- HALL, M.N. y T.J. SILHAVY. 1981. "Genetic analysis of the ompB locus in Escherichia coli K12". J. MOL. BIOL. 151: 1-15.

- 26.- HENNING, U., H.D. ROYER, R.M. TEATHER, I. HINDENNACH y C.P. HOLLENBERG. 1979. "Cloning of the structural gene *ompA* for an integral outer membrane protein of *Escherichia coli* K12" PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 76: 4360-4364.
- 27.- HERNANDEZ, R., A. ISIBASI, V. ORTIZ y J. FUMATE. 1985. "Protection with *Salmonella typhi* outer membrane protein in mice". INFECT. IMM. (En prensa).
- 28.- HERSKOWITZ, I. y D. HEGEN. 1980. "Lysis-lisogeny decision of phage lambda: explicit programming and responsiveness". ANN. REV. GENET 14: 399-445.
- 29.- INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL. 1983. Boletin Epidemiologico Anual. Jefatura de Servicios de Medicina Preventiva, Mexico.
- 30.- INOKUCHI, K., N. MUTOH, S. MATSUYAMA y S. MIZUSHIMA. 1982. "Primary structure of the *ompF* gene that codes for a major outer membrane protein of *Escherichia coli* K12". NUCLEIC ACID RESEARCH. 10: 6957-6968.
- 31.- INOKUCHI, K., H. FURUKAWA, K. NAKAMURA y S. MIZUSHIMA. 1984. "Characterization by deletion mutagenesis *in vitro* of the promoter region of *ompF* a positively regulated gene of *Escherichia coli*". J. MOL. BIOL. 178: 653-668.
- 32.- KARN, J., S. BRENNER, L. BARNETT y G. CESARENI. 1980. "Novel bacteriophage lambda cloning vector" PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 77: 5173-5178.
- 33.- KAWAJI, H., T. MIZUNO y S. MIZUSHIMA. 1977. "Influence of molecular size and osmolarity of sugars and dextrans on the synthesis of outer membrane proteins O-3 and O-9 of *Escherichia coli* K12". J. BACTERIOL. 140: 843-847.
- 34.- KLEFFEL, B., R.M. GARAVITO, W. BAUMEISTER y J.P. ROSENBUSCH. 1985. "Secondary structure of a channel-forming protein: porin from *Escherichia coli* outer membranes". EMBO. JOURNAL. 14: 1589-1592.
- 35.- LAEMMLI, U.K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". NATURE (London) 227: 680-685.
- 36.- LUGTENBERG, B., R. PETERS, H. BERNHEIMER y W. BERENDSEN. 1976. "Influence of cultural conditions and mutations on the composition of the outer membrane proteins of *Escherichia coli*" MOL. GEN. GENET. 147: 251-252.
- 37.- LUGTENBERG, B., H. BRONSTEIN, N. van SELM y R. PETERS. 1977. "Peptidoglycan-associated outer membrane in Gram-negative bacterial" BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA. 465: 571-578.
- 38.- LUGTENBERG, B. y L. vanALPHEN. 1983. "Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria" BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA. 737: 510-515.

- 39.- LUGTENBERG, B. y L. vanALPHEN. 1983. "Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria" *BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA.* 737: 51-115.
- 40.- LUNDRIGAN, M.D. y C.F. EARHART. 1984. "Gene *envY* of *Escherichia coli* K12 affect thermoregulation of major porin expression". *J. BACTERIOL.* 157: 262-268.
- 41.- MANIATIS, T., E.F. FRITSCH y J. SAMBROOK. 1982. "Molecular cloning". A laboratory manual. COLD SPRING HARBOR LAB.
- 42.- MATSUYAMA, S. y S. MIZUSHIMA. 1985. "Construction and characterization of a deletion mutant lacking *micF*, a proposed regulatory gene for OmpF synthesis in *Escherichia coli*". *J. BACTERIOL.* 162: 1196-1202.
- 43.- MIZUNO, T., E.T. WURTZEL y M. INOUE. 1982. "Cloning of the regulatory genes (*ompR* and *envZ*) for the matrix proteins of the *Escherichia coli* outer membrane". *J. BACTERIOL.* 150: 1462-1466.
- 44.- MIZUNO, T., E.T. WURTZEL y M. INOUE. 1982. "Osmoregulation of gene expression. II. DNA sequence of the *envZ* gene of the *ompB* operon of *Escherichia coli* and characterization of its gene product". *J. BIOL. CHEM.* 257: 13692-13698.
- 45.- MIZUNO, T., K-Y. CHOU y M. INOUE. 1983. "A comparative study on the genes for three porins of the *Escherichia coli* outer membrane: DNA sequence of the osmoregulated *ompC* gene". *J. BIOL. CHEM.* 258: 6932-6940.
- 46.- MIZUNO, T., K-Y. CHOU y M. INOUE. 1983. "DNA sequence of the promoter of the *ompC* gene and the amino acid sequence of the signal peptide of the pro-*ompC* protein of *Escherichia coli*". *FEBS LETT.* 151: 159-164.
- 47.- MIZUNO, T., M-Y. CHOU y M. INOUE. 1984. "A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (*micRNA*). *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA.* 81: 1966-1970.
- 48.- MOVVA, R.K. NAKAMURA y M. INOUE. 1980. "Gene structure of the OmpA protein, a major surface protein of *Escherichia coli* required for cell-cell interaction". *J. MOL. BIOL.* 142: 317-328.
- 49.- NAKAE, T. 1986. "Outer membrane permeability of bacteria". *CRC. CRIT. REV. MICROBIOL.* 13: 1-62.
- 50.- NAKAMURA, K. y M. INOUE. 1979. "DNA sequence of the gene for the outer membrane lipoprotein of *Escherichia coli*: an extremely AT rich promoter". *CELL.* 18: 1109-1117.

- 51.- NARA, F., S.C. MATSUYAMA, T. MIZUNO y S. MIZUSHIMA. 1986. "Molecular analysis of mutant ompR genes exhibiting different phenotypes as to osmoregulation of the ompF and ompC genes of Escherichia coli". MOL. GEN. GENET. 202: 194-199.
- 52.- NIKAIDO, H. y T. NAKAE. 1979. "The outer membrane of gram-negative bacteria". ADV. MICROBIOL. PHYSIOL. 20: 163-250.
- 53.- OSBORN, M.J. y H.C.P. WU. 1980. "Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria". ANN. REV. MICROBIOL. 34: 369-422.
- 54.- OVERBEEKE, N., G. vanSCHAARENBURG Y B. LUGTENBERG. 1980. "Antigenic relationships between por α proteins of Escherichia coli K12". EUR. J. BIOCHEM. 110: 247-254.
- 55.- OVERBEEKE, N., y B. LUGTENBERG. 1980. "Expression of outer membrane protein e of Escherichia coli K12 by fosfate limitation". FEBS. LETT. 112: 229-232.
- 56.- OVERBEEKE, N., H. BERGMANS, F. vanMANSFELD Y B. LUGTENBERG. 1983. "Complete nucleotide sequence of phoE, the structural gene for the phosphate limitation inducible outer membrane pore protein of Escherichia coli K12". J. MOL. BIOL. 163: 513-532.
- 57.- PAUL, C. y J.P. ROSENBUSCH. 1985. "Folding patterns of porin and bacteriorhodopsin". EMBO. JOURNAL. 4: 1593-1598.
- 58.- RIGBY, P.W.J., M. DIECKMANN, C. RHODES y P. BERG. 1977. "Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerasa I" J. MOL. BIOL. 113: 237-251.
- 59.- SONNTAG, I., H. SCHWARZ, Y. HIROTA y U. HENNING. 1978. "Cell envelope and shape of Escherichia coli: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins". J. BACTERIOL. 136: 280-285.
- 60.- SOUTHERN, E.M. 1975. "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". J. MOL. BIOL. 98: 503-517.
- 61.- SWANSTROM, R. Y P.R. SHANK. 1978. "X-ray intensifying screens grathy enhance the detection by autoradiography of the radioactive isotopes ^{32}P and ^{125}I ". ANAL. BIOCHEM. 86: 184.
- 62.- TOMMASSEN, J. Y B. LUGTENBERG. 1980. "Outer membrane protein e of Escherichia coli K12 is co-regulated with alkaline phosphatase". J. BACTERIOL. 143: 151-157.
- 63.- TOMMASSEN, J. Y B. LUGTENBERG. 1981. "Localization of phoE, the structural gene for outer membrane protein e in Escherichia coli K12". J. BACTERIOL. 147: 118-123.

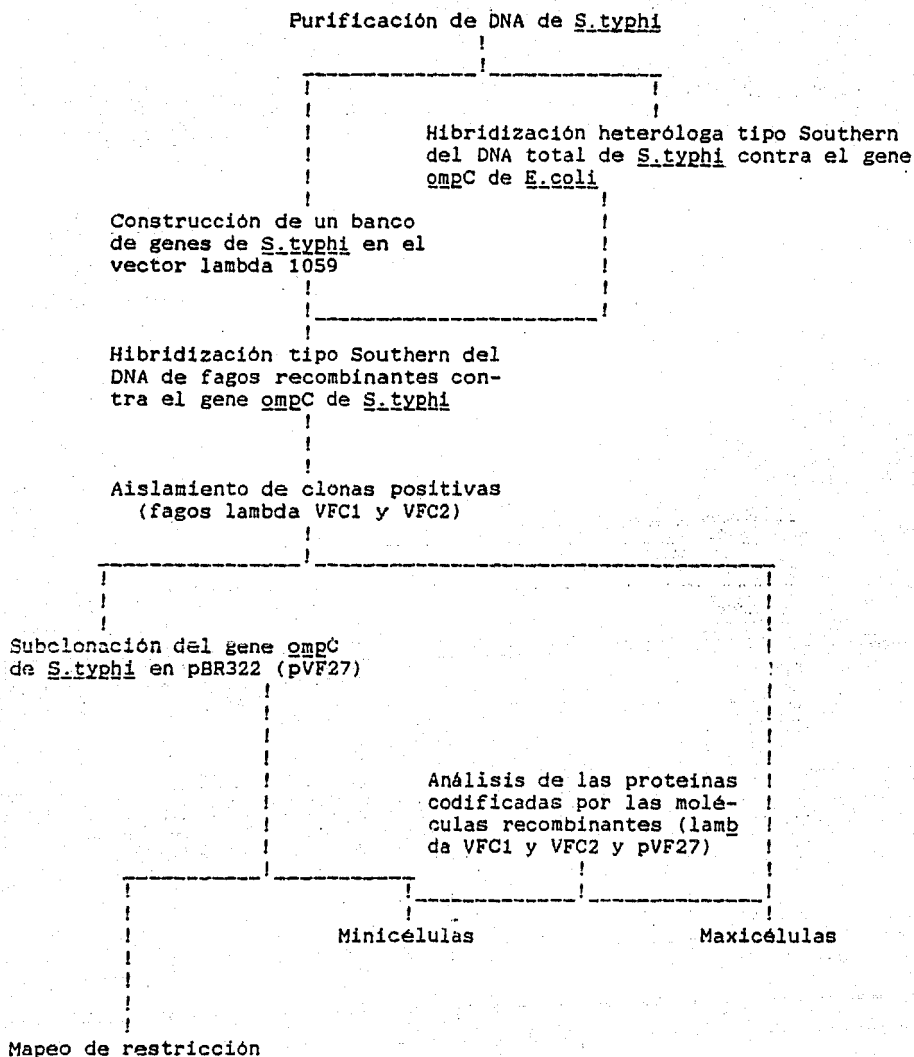
- 64.- TOMMASSEN, J., P. vanderLEY, A. vanderENDE, H. BERGMANS Y B. LUGTENBERG. 1982. "Cloning of ompF, the structural gene for an outer membrane pore protein of Escherichia coli K12: physical localization and homology with the phoE gene". MOL. GEN. GENET. 185:105-110.
- 65.- TOMMASSEN, J., P. OVERDUIN, B. LUGTENBERG Y H. BERGMANS. 1982. "Cloning of phoE, the structural gene for the Escherichia coli phosphate limitation-inducible outer membrane pore protein". J. BACTERIOL. 149:668-672.
- 66.- VanALPHEN, W. Y B. LUGTENBERG. 1977. "Influence of osmolarity of the growth medium on the outer membrane protein pattern of Escherichia coli". J. BACTERIOL. 131:623-630.
- 67.- VanALPHEN, W., L. HAVEKES Y B. LUGTENBERG. 1977. "Major proteins of Escherichia coli K12. Purification and in vitro activity of bacteriophage K3 and F plus mediated conjugation". FEBS. LETT. 75:285-290.
- 68.- WOO, S.L.C. 1979. "En: methods in Enzimology". (Ed. Wu, R.). ACADEMIC PRESS. New York. 68:389-395.
- 69.- WURTZEL, E.T., M.Y. CHOU Y M. INOUE. 1982. "Osmoregulation of gene expression. I. DNA sequence of the ompR gene of the ompB operon of Escherichia coli and characterization of its gene product". J. BIOL. CHEM. 257:13685-13691.

LISTA DE ABREVIATURAS

-Ap	Ampicilina
-d	dalton(es)
-DNA	Acido desoxirribonucleico
-D.O	Densidad óptica
-EDTA	Etilen-diamino tetracetato de sodio
-kd	Kilodaltones
-kpb	Kilopares de bases
-LPS	Lipopolisacarido
-mA	Miliamperes
-mM	Milimolar
-ME	Membrana externa
-ug	Microgramo(s)
-ul	Microlitro(s)
-nm	Nanometro(s)
-pb	Par(es) de bases
-PM	Peso molecular
-PME	Proteinas de membrana externa
32	
- P	Isótopo radiactivo de fósforo
-rpm	Revoluciones por minuto
-SDS	Dodecil sulfato de sodio
-TAE	Tris-acetato-EDTA
-Tc	Tetraciclina

A P E N D I C E I

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



A P E N D I C E I I

GEN 02223

Isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*

(Recombinant DNA; phage λ vector; pBR322 plasmid; *E. coli* probe; porin; osmolarity; minicell analysis)

José Luis Puente, Valia Flores, Marcos Fernández, Yolanda Fuchs and Edmundo Calva

Departamento de Biología Molecular, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62271 (México)

Received 30 June 1987

Revised 13 August 1987

Accepted 24 August 1987

SUMMARY

We have isolated the structural gene for an outer membrane protein of *Salmonella typhi*, from a genomic library constructed in bacteriophage λ 1059, using the *Escherichia coli ompC* gene as a heterologous probe. *E. coli ompC* codes for an outer membrane pore protein (porin) that is induced preferentially at high osmolarity and high temperature. The *S. typhi ompC*-like gene was subcloned in pBR322 and introduced into *E. coli* HB101 and into P678-54, a minicell-producing strain. In both strains it expressed a 38.5-kDa protein, which was incorporated into the outer membrane envelope and comigrated with an *S. typhi* outer membrane protein which was expressed both at low and high osmolarity in vivo.

INTRODUCTION

The epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, bacteriology, pathogenesis, pharmacology and immunology of typhoid fever in man have been

Correspondence to: Dr. E. Calva, CEIINGEBI/UNAM, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271 (México) Tel. (52)(73)17-27-99.

Abbreviations: bp, base pair(s); kb, 1000 bp; *ompA*, gene coding for OmpA; OmpA, outer membrane structure protein; *ompC*, gene coding for OmpC; OmpC, outer membrane pore protein (porin); *ompF*, gene coding for OmpF; OmpF, outer membrane pore protein (porin); PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; SDS, sodium dodecyl sulfate; *phoE*, gene coding for PhoE; PhoE, outer membrane pore protein (porin); SM, stabilizing medium, see MATERIALS AND METHODS, section d; SSC, 0.15 M NaCl-0.015 M Na₂ citrate pH 7.6. TAE, Tris-acetate-EDTA electrophoresis buffer.

the subject of a recent review (Edelman and Levine, 1986). Due to its significant incidence in developing countries and to the invasive character of *S. typhi*, the causal agent of typhoid fever, it is important to develop a vaccine to protect against this disease. It also would be of value to have a very specific and sensitive test for the detection of antigen in body fluids. Currently available killed whole-cell vaccines afford only limited protection and cause adverse side effects (Tapa and Cvjetanović, 1975). An attenuated live cell vaccine, consisting of strain Ty21a, although without side-effects, provides variable protection. Also, present diagnostic methods are not sufficiently fast and reliable (Edelman and Levine, 1986).

It has been shown that outer membrane protein preparations from *S. typhimurium* protect mice against salmonellosis (Kuusi et al., 1981; Udhayakumar and Muthukaruppan, 1987a); also a purified

porin elicits delayed-type hypersensitivity (Udhayakumar and Muthukkarupam, 1987b). In addition, patients with typhoid fever generate antibodies that recognize *S. typhi* outer membrane proteins (Calderón et al., 1986). Thus, outer membrane proteins could serve as protein antigens in a cellular or acellular vaccine, or in a rapid diagnostic assay.

E. coli outer membrane proteins have been well characterized. Genes for the major porin proteins OmpC, OmpF and PhoE, which allow membrane permeability, have been cloned and sequenced. These porins are very abundant, form diffusion pores for small solutes (less than 400 to 600 Da), and serve as receptors for phages and colicins. OmpF and OmpC are regulated by the osmolarity and temperature of the growth medium. OmpC is preferentially expressed at high osmolarity (100–300 mM NaCl), where OmpF levels are very low. PhoE is induced at low phosphate concentrations; it shows selectivity for anions over cations and is proposed to participate in the scavenging and passage of phosphorylated compounds across the outer membrane. In contrast, OmpF is cation-selective; the permeability properties of OmpC are similar to those of OmpF, except that it forms the smallest pores of all three proteins. In addition to an OmpD protein, *S. typhimurium* contains OmpF, OmpC, and PhoE proteins similar to those found in *E. coli*; although their corresponding pore sizes appear to be larger (reviewed by Nakae, 1986). So far, the gene for the *S. typhimurium* structural (non-porin) outer membrane protein, OmpA, has been the only *omp* gene characterized from the *Salmonella* genus (Freudl and Cole, 1983).

No characterization of the physiological transport properties of the *S. typhi* outer membrane proteins has been reported so far. A purification scheme, some physicochemical properties, and a hemolytic effect have been described (Calderón et al., 1984).

Based on the fact that Gram-negative bacteria contain porins with similar characteristics to those found in *E. coli* (Nikaido and Vaara, 1985), we have undertaken the task of identifying, isolating and characterizing the genes for *S. typhi* outer membrane proteins using *E. coli* porin genes as heterologous probes. In this paper we describe the isolation and initial characterization of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *S. typhi*.

MATERIALS AND METHODS

(a) Strains and plasmids

S. typhi IMSS-1, a 9, 12, d, Vi serotype clinical strain isolated from a patient with typhoid fever, was kindly provided by Dr. J. Kumate and coworkers from the Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City. *S. typhi* strains Ty2 and Rawlings (both of serotype 9, 12, d, Vi), and *S. typhimurium* strains NCTC74 (Mutton) and CDC6516-60 were all obtained from the American Type Culture Collection (Nos. 19430, 167, 13311 and 14028, respectively). Seventeen *S. typhi* clinical isolates of the MK series were kindly provided by Dr. G.M. Ruiz-Palacios and coworkers from the Instituto Nacional de la Nutrición, Mexico City. *E. coli* HB101, Q358, Q359, P678-54 and bacteriophage cloning vector λ 1059 have been described (Bolívar and Backman, 1979; Karn et al., 1980; Dougan and Kehoe, 1984). Plasmid pMY111 (Mizuno et al., 1983), carrying *E. coli ompC* was kindly supplied by Dr. M. Inouye; plasmid pBR322 (Bolívar et al., 1977; Balbás et al., 1986) was a gift from Dr. F. Bolívar.

(b) Construction of a *Salmonella typhi* gene library

S. typhi total DNA from strain IMSS-1 was isolated as described by Betlach et al. (1976). Fragments of 10–20 kb from a partial *Sau3A* digest were introduced into the *Bam*HI sites of bacteriophage λ 1059 as described by Karn et al. (1980). Recombinant phages were generated by in vitro encapsulation, using commercially available packaging extracts (Packagene, Promega Biotec, Madison, WI) and plated onto *E. coli* Q359.

(c) DNA hybridization

Plasmid pMY111 was used as a heterologous probe. It was purified following standard procedures (Bolívar and Backman, 1979), and labeled with [α - 32 P]dCTP (> 3000 Ci/mmol; Amersham International, Amersham, U.K.) to 10^8 cpm/ μ g using a commercially available nick-translation kit (Amersham International, Amersham, U.K.). Total genomic *S. typhi* or recombinant bacteriophage λ DNA was digested using restriction endonucleases (Promega Biotec; Madison, WI). The resulting fragments

were separated by agarose gel electrophoresis and Southern-blotted onto nitrocellulose filters (Schleicher & Schuell, Keene, NH) (Southern, 1975). Unless otherwise stated, the filters were pre-hybridized for 1 h at 42°C in 6 × SSC, 10 × Denhardt's solution (0.2% each of Ficoll, polyvinyl pyrrolidone and bovine serum albumin), 0.1 mg/ml of sonicated calf thymus DNA and 40% formamide. They were hybridized with 1 ml/lane of the same solution plus 0.1% SDS, 1.0 mM EDTA and 10⁶ cpm/ml of labeled plasmid at 42°C for 18 h. Subsequently, the filters were washed four times, 15 min each, with 1 × SSC at 65°C, dried, and exposed for autoradiography to Kodak X-OmatK film using enhancing screens.

(d) Screening of the bacteriophage gene library

Two thousand recombinant bacteriophage plaques were seeded onto lawns of *E. coli* Q359. Per petri dish 24 phages were inoculated; this was done in duplicate. One copy of each pool of 24 phages was eluted with SM (0.1 M Tris · HCl pH 7.9, 0.15 M NaCl, 0.01 M MgCl₂, and 0.1% gelatin). Aliquots from six pools were used for infecting 200 ml cultures by the preabsorption-dilution-shaking method described by Blattner et al. (1977). Bacteriophage DNA was prepared from these cultures, restricted with *Bgl*II, Southern-blotted, and hybridized with a ³²P-labeled pMY111 fragment carrying only the *E. coli ompC* gene. One group of bacteriophages, containing the appropriate hybridization signal, was further analyzed in the same manner by preparing, successively, DNA from individual pools and from individual bacteriophage.

This screening strategy allowed for the adequate representation of slow-growing bacteriophages and the probing of *S. typhi* cloned DNA without interference from hybridizing *E. coli* DNA. As control, the bacteriophage Southern blots were probed with ³²P-labeled pBR322, to discard any false-positive signals from rearranged λ1059 DNA (Schoenberg, 1984).

(e) Plasmid subcloning and minicell analysis

Standard procedures (Maniatis et al., 1982) were followed for subcloning DNA fragments from recombinant bacteriophage λ1059 into pBR322; and for subsequent transformation into *E. coli* HB101 or

the minicell-producing *E. coli* P678-54. Minicells were purified, pulse-chased with [³⁵S]methionine, and analyzed by 0.1% SDS-15% PAGE as described (Dougan and Kehoe, 1984).

(f) Preparation of outer membrane envelopes

Cells were cultured in nutrient broth (Bactonutrient broth; Difco, Detroit, MI) according to Nara et al. (1984). Triton X-100 insoluble envelope fractions were obtained as described by Matsuyama et al. (1984).

RESULTS AND DISCUSSION

(a) Isolation of the *Salmonella typhi ompC*-like gene

Plasmid pMY111 hybridized to a 3.0-kb band of *S. typhi* genomic DNA cleaved with *Bgl*II (Fig. 1). This was not observed when pBR322 vector or other *E. coli* outer membrane protein genes (*ompF*, *ompA* and *phoE*), were used as probes (not shown).

Screening of the *S. typhi* genomic library gave two recombinant bacteriophages which carried the 3.0-kb *Bgl*II band (Fig. 1). They gave lower titers with respect to the bulk recombinant bacteriophage population; this could be due to a deleterious effect on the host *E. coli* cells caused by the overexpression of a cloned outer membrane protein gene (see below, section c).

One phage, λVFC1, was chosen for further analysis. The 3.0-kb band was subcloned into the *Bam*HI site of pBR322 to construct plasmid pVF27. This subclone has the structure shown in Fig. 2.

(b) Expression and mapping

Derivatives pVF271, pVF274 and pVF275, containing smaller fragments of the insert as shown in Fig. 3A, were used to transform an *E. coli* minicell-producing strain. The proteins expressed by these plasmids in minicells were labeled with [³⁵S]methionine, subjected to SDS-PAGE, and analyzed by autoradiography (Fig. 3B). Plasmids pVF27 and pVF271 produced a very intense 38.5-kDa protein and a less intense 39.5-kDa protein. The

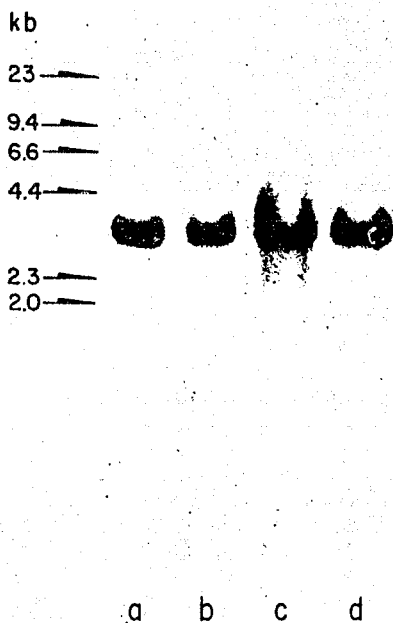


Fig. 1. Autoradiograph of the hybridization of (a, b) ^{32}P -labeled plasmid pMY111 (carrying *E. coli ompC*) to Southern blots of total genomic *S. typhi* DNA (3 μg) cut with *Bgl*II (lane a) or *Bgl*II + *Bam*HI (lane b); and (c, d) of the *Hind*III-*Sca*I ^{32}P -labeled fragment from pMY111 to purified recombinant phage λVFC1 (lane c) and λVFC2 (lane d) blotted DNA (1 μg) cut with *Bgl*II. DNA M_r markers are indicated in kb, and correspond to wild-type λ DNA digested with *Hind*III. Electrophoresis was done at 100 V for 2 h through 1% 1.5-mm thick agarose gels in TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA, pH 8). The DNA was transferred in $6 \times \text{SSC}$ to nitrocellulose membranes; and then hybridized as described in MATERIALS AND METHODS, section c. The radioactive probes had a specific activity of 10^6 cpm/ μg of DNA.

other two constructs, pVF274 and pVF275, did not express these proteins nor truncated forms. All the plasmids generated the β -lactamase (BL) vector gene product in its different forms of around 28 kDa.

To find a smaller fragment containing the whole *ompC*-like gene, Southern blots of different restriction fragments of the 3.0-kb *Bgl*II band were hybridized to the purified *Hind*III-*Sca*I fragment of pMY111 encompassing only *E. coli ompC* (Mizuno et al., 1983). Results of these experiments are shown

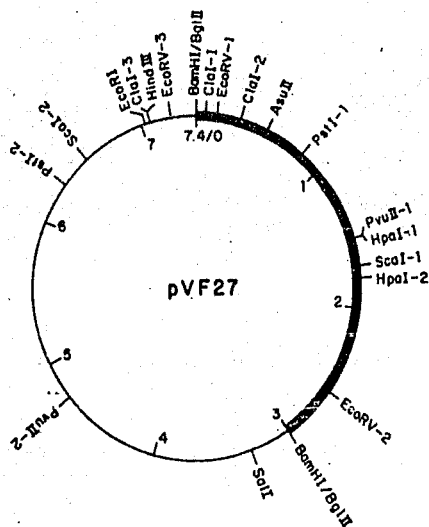


Fig. 2. Circular restriction map of plasmid pVF27, which carries the *S. typhi ompC*-like gene. The insert DNA is shown as a heavy line; the thin line represents pBR322 vector DNA. When the 3.0-kb *Bgl*II fragment from λVFC1 is ligated to the pBR322 digested with *Bam*III, both restriction sites are lost in the recombinant plasmid pVF27. The scale is in kb.

in Fig. 4. It can be inferred that the 1.3-kb fragment that spans the region from the *Asu*II to the *Hpa*I-2 site contains the entire *ompC*-like gene since there were no hybridization signals observed in fragments pictured to the left of the *Asu*II site or to the right of the *Hpa*I-2 site. Therefore, considering that the *ompC*-like gene is located towards the left side of the 3.0-kb *Bgl*II fragment (Fig. 4), and since no protein is generated by pVF274 plasmid (Fig. 3), we deduce that the start of transcription lies to the right of the *Pvu*II site, possibly in the 0.25-kb *Hpa*I-*Hpa*I fragment. This implies that the direction of transcription proceeds to the left, from the *Hpa*I-2 to *Asu*II restriction sites. Based on the apparent M_r of the protein product, the structural gene should fit between these two sites.

Comparison of the *S. typhi ompC*-like gene with its counterpart in *E. coli* (Mizuno et al., 1983) reveals the conservation of the *Pst*I, *Pvu*II, and *Sca*I restriction sites in the structural gene. In contrast, there are two *Hpa*I sites in *S. typhi* that are absent in *E. coli*. Sites for *Eco*RI and *Bgl*II in *E. coli* are missing in *S. typhi*.

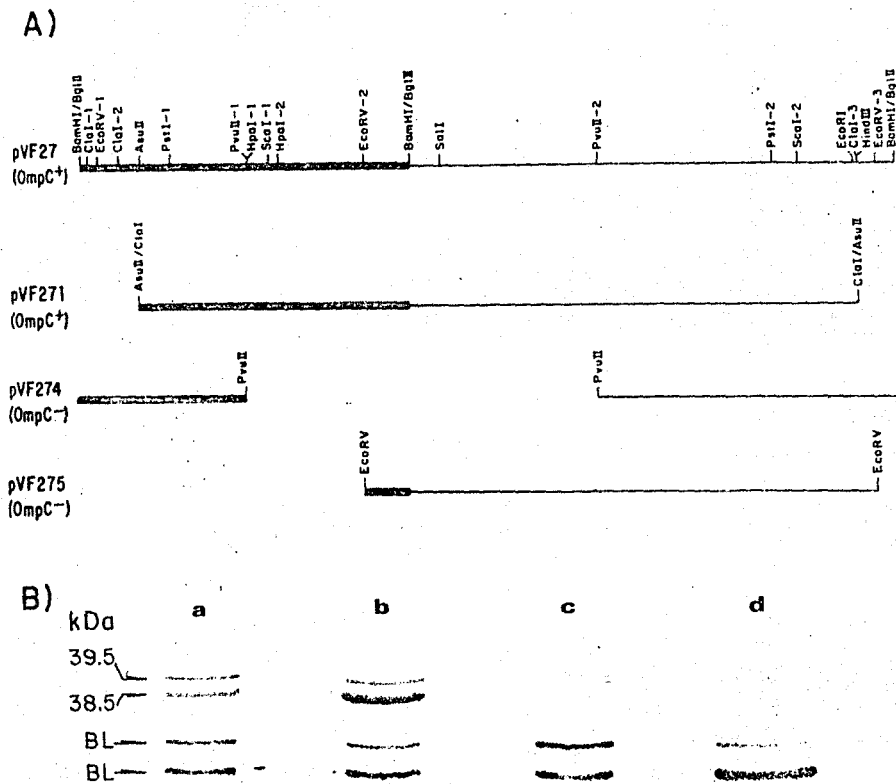


Fig. 3. Analysis of plasmid pVF27 and its products. (A) Diagrams of plasmids pVF27 and its derivatives, pVF271, pVF274, and pVF275. The *S. typhi* DNA inserts are shown as thick lines; thin lines represent pBR322 DNA. DNA that is missing in each plasmid is shown as gaps. Plasmids coding for the OmpC-like protein are indicated with an OmpC⁺ symbol. Deletion mutant plasmids of pVF27 were constructed digesting purified pVF27 DNA with *Asu*II + *Cla*I, *Pvu*II, or *Eco*RV. After subsequent ligation of the largest purified fragment of each restriction pattern, the DNA preparations were transformed into strain HB101, selecting for ampicillin-resistant colonies. Plasmids pVF271, pVF274 and pVF275 were selected for further characterization in minicell-producing *E. coli* P678-54. Sites for *Asu*II and *Cla*I are lost in pVF271. *Pvu*II and *Eco*RV sites are regenerated in pVF274 and pVF275, respectively. (B) Autoradiograph of ³⁵S-labeled proteins produced in minicells containing plasmids pVF27 (lane a), pVF271 (lane b), pVF274 (lane c), and pVF275 (lane d). The apparent protein *M*_s are indicated in kDa; BL represents the β-lactamase plasmid products. Experimental details were as described in MATERIALS AND METHODS, section e. Briefly, minicells carrying each plasmid were purified by centrifugation through 20% sucrose gradients; then, plasmid-specific products were pulse-labeled with 2.0 μCi of [³⁵S]methionine (> 800 Ci/mmol; Amersham International, Amersham, U.K.) for 30 min at 37°C, and resuspended in 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 3% SDS, 0.125 M Tris (pH 6.8), 0.1% bromophenol blue; boiled (95°–100°C) for 5 min and then analysed by 0.1% SDS-15%. PAGE at 40 mA for 4 h; the gel was dried and exposed to x-ray film.

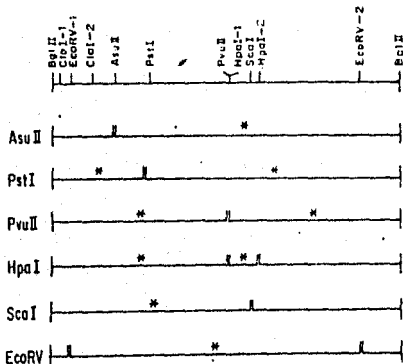


Fig. 4. Restriction map of the 3.0-kb *Bgl*II insert of *S. typhi* DNA contained in pVF27. The segments that hybridize with the *Hind*III-*Sca*I fragment of pMY111 (*E. coli ompC*) are indicated with asterisks.

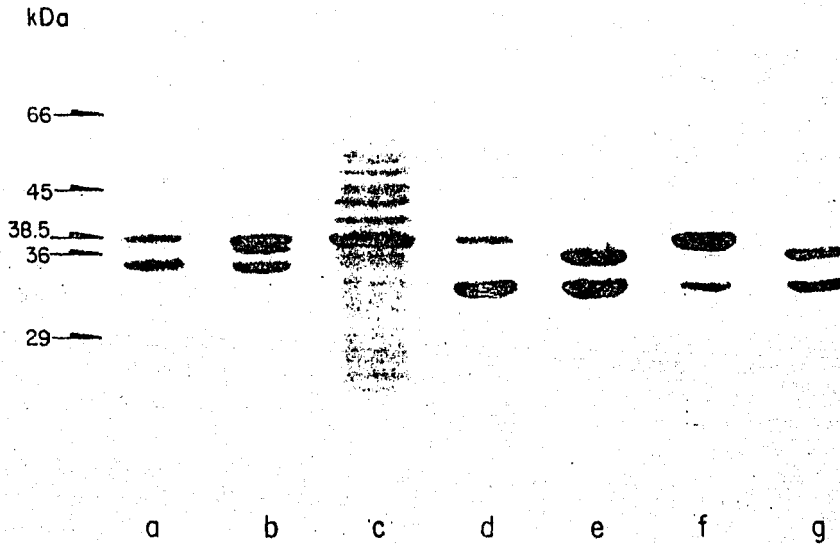


Fig. 5. Electrophoretic pattern of Coomassie brilliant blue-stained outer membrane protein preparations, separated by 0.1% SDS-15% PAGE, from: *S. typhi* IMSS-1 grown in nutrient medium in the presence (lane a) or absence (lane b) of 20% sucrose; *E. coli* HB101 (lanes d, e) and P678-54 (lanes f, g) grown in nutrient medium in the absence of sucrose carrying (lanes d, f) or not (lanes e, g) plasmid pVF27. Lane c corresponds to a total cell extract of *E. coli* P678-54 minicells harboring pVF27. The outer membrane protein preparations were obtained as follows: cells were grown to late logarithmic phase at 37°C in the appropriate culture medium. Cells were washed, resuspended in 10 mM Na_2HPO_4 (pH 7.2) and disrupted by sonication. The membrane fraction was recovered by centrifugation at 40000 rev./min in the Beckman Ti70 rotor for 30 min and then resuspended in 2% Triton X-100, 10 mM Na_2HPO_4 (pH 7.2). After incubation at 37°C for 15 min, the Triton X-100-insoluble fraction was recovered by centrifugation at 40000 rev./min for 30 min. This pellet was finally washed in 10 mM Na_2HPO_4 (pH 7.2) and resuspended in 1% SDS, 1% β -mercaptoethanol, 10 M urea, and 0.005% bromophenol blue. It was boiled for 5 min and analysed by 0.1% SDS-15% PAGE at 40 mA for 4 h. Protein molecular weight markers are indicated in kDa; they correspond in descending order to plasma bovine albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), and carbonic anhydrase (29 kDa). The arrow at 38.5 kDa indicates the apparent M_r obtained for the OmpC-like protein.

(c) Analysis of outer membrane envelopes

Analyzing the proteins that constitute the outer membrane envelope of *S. typhi* (Fig. 5, lanes a and b), it can be observed that the *ompC*-like gene product (lane c) comigrates with a 38.5-kDa protein, which is expressed under low and high osmolarity conditions. This may indicate that regulation of the OmpC-like protein in *S. typhi* differs from that in *E. coli* since the latter is preferentially expressed at high osmolarity (Hancock, 1985). In contrast, the presence of a 37-kDa protein in the outer membrane of *S. typhi* is almost completely repressed at high osmolarity (Fig. 5, lane a), behaving in an *E. coli* OmpF-like manner.

SDS-PAGE analysis of the outer membrane proteins, purified from the two *E. coli* strains containing pVF27 (Fig. 5, lanes d and f), showed that the cloned 38.5-kDa OmpC-like protein is incorporated into the outer membrane of its host. The absence of the 39.5-kDa band (Fig. 3B) in outer membrane preparations suggests that it may correspond to an unprocessed precursor of the OmpC-like *S. typhi* protein, still carrying the uncleaved leader sequence. In *E. coli*, the *S. typhi* OmpC-like protein appears as one of the most abundant outer membrane proteins (Fig. 5, lanes d and f); interestingly, the presence of some endogenous proteins is lowered as compared with Fig. 5, lanes c and g. This might be due to the fact that the cloned gene is highly expressed, as evidenced by the predominant presence of its protein product in a total cell extract (Fig. 5, lane c). Thus, the multi-

copy gene and its product could possibly be competing favorably for expression or processing and membrane transport factors, respectively.

(d) Presence of the gene in different strains

The fact that the 38.5-kDa protein is expressed in *S. typhi* under both osmolarity conditions may be relevant to the bacteria in the environment provided by their natural host. We believe that this protein is a suitable candidate to be expressed in the serum of patients with typhoid fever, since the osmolarity of human serum is high (0.9%, or 150 mM, NaCl is nearly equivalent to 10% sucrose; Nikaido and Vaara, 1985). In this respect the *S. typhi ompC*-like gene is present in all 17 clinical isolates tested and also in *S. typhi* and *S. typhimurium* reference strains

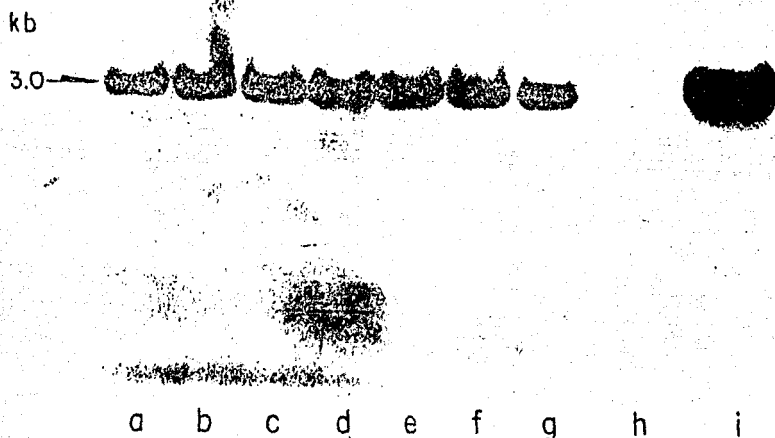


Fig. 6. Autoradiograph of the hybridization of the *S. typhi* ³²P-labeled *Sci*I-*Asu*II fragment from pVF27 to Southern blots of *Bgl*II-cut DNA from: *S. typhimurium* strain CDC6516-60 (lane a); *S. typhi* clinical isolates MK20 (lane b), MK24 (lane c), MK27 (lane d), strains IM35-1 (lane e), Ty2 (lanes f, i) and Rawlings (lane g); and *E. coli* Q359 (lane h). Lanes a-g contain 3 μg and lanes h-i 6 μg of DNA. Experimental details were as described in RESULTS AND DISCUSSION, section d. Electrophoresis and transfer of the gel were done as described in the legend to Fig. 1. Hybridization was done with 5 × 10⁵ cpm/lane in a solution containing 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH 7.5), 5 × SSC, 10 × Denhardt's solution (see MATERIALS AND METHODS, section c) and 100 μg/ml of sonicated calf thymus DNA, at 65°C for 18 h; then washed down to 0.1 × SSC, 0.1% SDS at 65°C and exposed for autoradiography to Kodak X-OmatK film using enhancing screens.

(see MATERIALS AND METHODS, section a). Representative hybridizations, to illustrate this point, are shown in Fig. 6. Hybridization of the *S. typhi ompC*-like gene probe was done under stringent conditions (0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 7.5, 5 × SSC, 10 × Denhardt's solution, 100 µg/ml sonicated calf thymus DNA, 65°C, 18 h; with washes down to 0.1 × SSC, 0.1% SDS, at 65°C); interestingly, no signal is obtained with *E. coli* DNA (Fig. 6, lane h). It remains to be seen if the regions corresponding to exposed epitopes are conserved among the various *S. typhi* clinical isolates.

(e) Conclusions

Comparison of the N termini of the cloned *OmpC*-like protein and of the 38.5-kDa protein expressed by *S. typhi* in vivo should unequivocally establish their identity. Knowledge of the nucleotide sequence of the structural *ompC*-like gene should confirm the gene-product relationship.

Learning about outer membrane protein gene structure and function should allow the identification of exposed epitopes in the protein products (Freudl and Cole, 1983; Freudl et al., 1986), and in determining if any of them are species-specific. The possibility of overexpressing the outer membrane proteins, perhaps in a minicell system, should prove useful in protection experiments; large amounts of the protein of interest should aid in generating monoclonal antibodies that could be used in immunodiagnosis. Aside from possible biotechnological applications, we are interested in exploring the role of *S. typhi* *OmpC* protein in the humoral and cellular immunity events, of typhoid fever.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Jesús Kumate and his collaborators, from the Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, for introducing us into the area of research on typhoid fever. We thank Drs. Luis Servín and Baltazar Becerril for critically reviewing the manuscript. This work was partially supported by grant PCSABNA-030735 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

REFERENCES

- Balbás, P., Soberón, X., Merino, E., Zurita, M., Lomeli, H., Valle, F., Flores, N. and Bolívar, F.: Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives — a review. *Gene* 50 (1986) 3–40.
- Bellach, M.C., Hershsfeld, V., Chow, L., Brown, W., Goodman, H.M. and Boyer, H.W.: A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the *EcoRI* restriction modification of DNA. *Fed. Proc.* 35 (1976) 2037–2043.
- Blattner, F.R., Williams, D.G., Blechl, A.E., Denniston-Thompson, K., Faber, H.E., Furlong, L.-A., Grunwald, D.J., Kiefer, D.O., Moore, D.D., Schumm, J.W., Sheldon, E.L. and Smithies, O.: Charon phages: safer derivatives of bacteriophage λ for DNA cloning. *Science* 196 (1977) 161–169.
- Bolívar, F., Rodríguez, R.L., Greene, P.J., Bellach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J. and Falkow, S.: Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2 (1977) 95–113.
- Bolívar, F. and Backman, K.: Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol.* 68 (1979) 245–267.
- Calderón, I., Lobos, S.R., Rojas, H.A., Palomino, C., Rodríguez, L.H. and Mora, G.C.: Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid infection in humans. *Infect. Immun.* 52 (1986) 209–212.
- Calderón, I., Lobos, S.R. and Mora, G.C.: The hemolytic effect of *Salmonella typhi* Ty2 porins. *Eur. J. Biochem.* 141 (1984) 579–583.
- Dougan, G. and Kehoe, M.: The minicell system as a method for studying expression from plasmid DNA. *Methods Microbiol.* 17 (1984) 233–258.
- Edelman, R. and Levine, M.M.: Summary of an international workshop on typhoid fever. *Rev. Infect. Dis.* 8 (1986) 329–349.
- Freudl, R. and Cole, S.T.: Cloning and molecular characterization of the *ompA* gene from *Salmonella typhimurium*. *Eur. J. Biochem.* 134 (1983) 497–502.
- Freudl, R., MacIntyre, S., Degen, M. and Henning, U.: Cell surface exposure of the outer membrane protein *OmpA* of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* 188 (1986) 491–494.
- Karn, J., Brenner, S., Barnett, L. and Cezareni, G.: Novel bacteriophage λ cloning vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 5172–5176.
- Kuusi, N., Nurminen, M., Saxen, H. and Mäkelä, P.H.: Immunization with major outer membrane protein (porin) preparations in experimental murine salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 34 (1981) 328–332.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.
- Matsuyama, S.-I., Inokuchi, K. and Mizushima, S.: Promoter exchange between *ompF* and *ompC* genes for osmoregulated major outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 158 (1984) 1041–1047.
- Mizuno, T., Chou, M.-Y. and Inouye, M.: A comparative study on the genes for three porins of the *Escherichia coli* outer membrane. *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 6932–6940.

- Nakae, T.: Outer membrane permeability of bacteria. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 13 (1986) 1-62.
- Nara, F., Inokuchi, K., Matsuyama, S.-I., and Mizushima, S.: Mutation causing reverse osmoregulation of synthesis of OmpF, a major outer membrane protein of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 159 (1984) 688-692.
- Nikaido, H. and Vaara, M.: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49 (1985) 1-32.
- Schoenberg, D.R.: Interference with the screening of genomic libraries by rearrangements of λ 1059. *Gene Anal. Technol.* 1 (1984) 8-12.
- Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 (1975) 503-517.
- Tapa, S. and Cyjetanović, B.: Controlled field trial on the effectiveness of one and two doses of acetone-inactivated and dried typhoid vaccine. *Bull. World Health Org.* 52 (1975) 75-80.
- Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V.R.: Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect. Immun.* 55 (1987a) 816-821.
- Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V.R.: An outer membrane protein (porin) as an eliciting antigen for delayed-type hypersensitivity in murine salmonellosis. *Infect. Immun.* 55 (1987b) 822-824.

Communicated by F. Bolivar.