

03088

3  
2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS  
PROFESIONAL Y DE POSGRADO**

**COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

**"CARACTERIZACION Y MANIPULACION DEL GEN *ompC*  
DE *Salmonella typhi***

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA**

presenta

**M. en B. JOSE LUIS PUENTE GARCIA**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1991

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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

- Español..... 1
- Ingles..... 1

INTRODUCCION..... 2

OBJETIVOS..... 6

MATERIALES Y METODOS..... 7

RESULTADOS.....11

DISCUSION Y CONCLUSION.....26

BIBLIOGRAFIA.....33

ANEXOS.....39

- 1.- Puente, J.L., Alvarez-Scherer, V., Gosset, G. and Calva, E. (1989) Comparative analysis of the *Salmonella typhi* and *Escherichia coli ompC* genes. *Gene* 83:197-206.
- 2.- Puente, J.L., Verdugo-Rodríguez, A. and Calva, E. (1991) Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* OmpC is influenced differently by medium osmolarity; dependence on *Escherichia coli* OmpR. *Mol. Microbiol.* 5:1205-1210.

## RESUMEN

En este trabajo, hemos caracterizado la secuencia nucleotídica (sn) del gen que codifica para la proteína de membrana externa OmpC de *Salmonella typhi* y deducido su secuencia de aminoácidos (aa). El gen *ompC* consiste de una fase abierta de lectura de 1134 nucleótidos (nt), la cual corresponde a una proteína de 378 aa, con un péptido señal de 21 aa. Esta proteína es 11 aa mayor que OmpC en *Escherichia coli*, pero su péptido señal es idéntico. Entre ambas bacterias, la secuencia de la proteína madura muestra 79% de similitud a nivel de aa, y 77% de similitud a nivel de sn. A partir de la comparación de la secuencia de aa, se identificaron siete regiones variables en OmpC; cinco de ellas corresponden a regiones hidrofílicas y contienen aa que frecuentemente se presentan en configuraciones en vuelta. Esto sugiere que estos segmentos de aa pueden estar orientados hacia el exterior de la membrana externa.

OmpC es altamente expresada cuando *S. typhi* se crece en caldo nutritivo (CN) de baja (CN + 0% sacarosa) o alta (CN + 20% sacarosa) osmolaridad. Esto contrasta con la expresión de OmpC en *E. coli*, la cual es reprimida en baja osmolaridad e inducida en alta, como ha sido descrito anteriormente. Sin embargo, la expresión de OmpC en *S. typhi* es dependiente del activador transcripcional OmpR de *E. coli*. Estos resultados sugieren que existen diferencias entre los mecanismos de osmoregulación de la expresión genética en ambas bacterias, aunque algunos efectores parecen ser compartidos.

Con el propósito de entender mejor las relaciones estructura-función de esta proteína, hemos introducido, mediante mutagénesis dirigida, entre los codones 160-161 del gen *ompC*, la sn que corresponde a un determinante antigénico de la proteína VP4 de rotavirus. El área alrededor de estos codones, corresponde a una región de OmpC que tiene la probabilidad de estar expuesta. La proteína híbrida se expresa en cantidades similares a las de la proteína original y es incorporada en la membrana externa. El epítipo de VP4 parece ser expuesto en la superficie celular, ya que células intactas son reconocidas por un anticuerpo monoclonal específico para rotavirus. Este resultado apoya la idea de que la región de los codones 160-161 está expuesta y puede ser modificada sin producir un efecto letal para la célula. Este ensayo puede ser útil en el diseño de vacunas vivas presentadoras de epítopes heterólogos.

## ABSTRACT

Throughout this work, we have characterized the nucleotide (nt) sequence of the gene encoding the *Salmonella typhi* OmpC outer membrane protein and its deduced amino acid (aa) sequence. The *S. typhi* *ompC* gene consists of an open reading frame of 1134 nt, corresponding to a protein of 378 aa; with a 21-aa signal peptide. This protein is 11 aa longer than *E. coli* OmpC, but it has an identical leader peptide. The mature OmpC sequence shows 79% similarity for both bacteria at the aa level, and 77% similarity at the nt level. Seven main variable regions in the OmpC protein were identified. Five of them correspond to hydrophilic regions and contain aa observed most frequently in turn configurations in soluble proteins. This suggests that these aa stretches could be located on the exterior of the outer membrane.

The OmpC protein is highly expressed when *S. typhi* is grown in nutrient broth (NB) of low (NB + 0% sucrose) or high (NB + 20% sucrose) osmolarity. This contrasts with the expression of *E. coli* OmpC, which is inhibited in low osmolarity and enhanced in high osmolarity, as has been described previously. Nevertheless, expression of *S. typhi* OmpC is dependent on the *E. coli* OmpR transcriptional activator. These findings suggest differences between the mechanisms of osmoregulation of gene expression in both bacteria, although common effectors appear to be shared.

In an effort to probe into structure-function relationships, we have introduced, by site-directed mutagenesis, between codons 160-161 of the *ompC* gene, the nucleotide sequence corresponding to an antigenic determinant of the VP4 rotavirus protein. The area around these codons, corresponds to a putative surface-exposed region of the OmpC protein. The hybrid protein was expressed at its original level, and was incorporated into the outer membrane. The VP4-epitope appeared to be exposed at the cell surface, since intact cells were recognized by a monoclonal antibody specific for rotavirus. This result renders support to the postulate that the region between codons 160-161 is indeed exposed and can be altered without deleterious effect to the cell. This approach might be useful in the design of live vaccines carrying heterologous epitopes.

## INTRODUCCION

El estudio de diferentes aspectos de la fiebre tifoidea (FT), que van de la biología molecular a la epidemiología, ofrece, además de la oportunidad de incidir en el área de la Biotecnología en salud, a través del desarrollo de nuevas vacunas y métodos de diagnóstico, también la de generar conocimiento relacionado con procesos biológicos básicos, tales como la expresión genética (Calva *et al.*, 1988).

*Salmonella typhi* es el agente causal de la FT en el humano. Se estima que más de 12 millones de personas (excluyendo China) son afectadas anualmente por esta enfermedad, y que la mortalidad puede comprender el 1% de los casos (Edelman y Levine, 1986). *S. typhi* es usualmente adquirida por la ingestión de agua o alimentos contaminados con heces fecales. La bacteria se adhiere y penetra al epitelio intestinal, a través de las células M e invadiendo las placas de Peyer; aquí es ingerida por los macrófagos y transportada al sistema retículo endotelial, donde se multiplica y propaga por todo el organismo, invadiendo principalmente los nódulos linfáticos, el bazo, y el hígado, y produciendo una bacteremia (Finlay y Falkow, 1989).

Al igual que todas las bacterias Gram-negativas, *S. typhi* posee una membrana externa (ME) (Nikaido y Vaara, 1985; Nakae, 1986). En diversos estudios, se ha observado que preparaciones de proteínas de la membrana externa (PME) generan inmunidad activa en contra de *S. typhimurium* y *S. typhi* (Udhayakumar y Muthukkaruppan, 1987a,b; Isibasi *et al.*, 1988; Matsui y Arai, 1989); y que la presencia de anticuerpos anti-PME específicos en el suero de pacientes, puede tener valor diagnóstico (Calderón *et al.*, 1986; Verdugo-Rodríguez *et al.*, 1989 y datos no publicados).

En nuestro laboratorio nos hemos enfocado en el estudio de la relación

7

estructura-función de las PME de *S. typhi* y de sus genes respectivos. Así, hemos clonado los genes *ompC* (Puentes *et al.*, 1987), *ompF* (Fernández, Puentes y Calva, 1991, datos no publicados) y *phoE* (Puentes, 1987) de *S. typhi*.

*ompC* y *ompF* codifican para las porinas OmpC y OmpF, respectivamente; están presentes en la célula en, aproximadamente,  $10^5$  copias, forman poros no selectivos de difusión pasiva, a través de los cuales atraviesan la ME pequeñas moléculas hidrofílicas (Nikaido y Vaara, 1985). A pesar de que la proporción relativa de ambas proteínas varía dependiendo de las condiciones de crecimiento, la suma de las dos tiende a permanecer constante (Kawaji *et al.*, 1979); esto se debe a la regulación recíproca ejercida por variaciones en algunas condiciones del ambiente, como la osmolaridad (Kawaji *et al.*, 1979), la fuente de carbono (Scott y Harwood, 1980), la temperatura (Lundrigan y Earhart, 1984) o la disponibilidad de oxígeno (Ni Bhriain *et al.*, 1989). En los últimos años, se han realizado diversos trabajos que tratan de aportar conocimiento, el cual ayude a definir un modelo que describa como funciona a nivel molecular la osmoregulación de estos genes (Para revisión vease Forst y Inouye., 1988; Csonka, 1989; Stock *et al.*, 1989; Mizuno y Mizushima, 1990).

En general, OmpF es sintetizada preferencialmente en medios de baja osmolaridad, mientras que OmpC es inducida preferencialmente en medios de alta osmolaridad. La síntesis de estas proteínas en *E. coli* y *S. typhimurium*, está regulada positivamente por las proteínas OmpR y EnvZ, las cuales son codificadas por el operón *ompB* (Hall y Silhavy, 1981a,b; Liljestrom *et al.*, 1988). OmpR es un activador transcripcional esencial para la expresión de los genes *ompC* y *ompF*, el cual se une a secuencias localizadas hacia arriba de los promotores de estos genes (Mizuno *et al.*, 1988; Jo *et al.*, 1986; Norioka *et al.*, 1986). EnvZ es una proteína de membrana interna, la cual parece actuar como

un osmosensor, modulando la función de OmpR (Slauch *et al.*, 1988). Estudios bioquímicos han mostrado que EnvZ puede funcionar como cinasa (Igo *et al.*, 1989a; Aiba *et al.*, 1989) o como fosfatasa (Igo *et al.*, 1989b; Aiba *et al.*, 1989) para OmpR. Asimismo, ha sido demostrado que la fosforilación de OmpR *in vitro* estimula su función como activador transcripcional de los promotores de *ompC* u *ompF* (Igo *et al.*, 1989b; Aiba y Mizuno, 1990).

Se ha propuesto, como modelo, que EnvZ está embebida en la membrana citoplásmica y sensa, por algún mecanismo aún no definido, el estado osmótico del medio. De este modo, sus propiedades de cinasa y/o fosfatasa cambian, canalizando la señal hacia OmpR, a través de su fosforilación o defosforilación. Consecuentemente, la cantidad relativa de la forma fosforilada de OmpR en las células varía en respuesta a la osmolaridad del medio, siendo constante la cantidad total de OmpR, independientemente de la osmolaridad. Cuando la osmolaridad del medio es relativamente baja, la forma fosforilada de OmpR es baja. En esta situación, *ompF* es activado preferencialmente. Conforme la osmolaridad se incrementa, la forma fosforilada de OmpR se incrementa, lo cual resulta en la activación preferencial de *ompC* (Mizuno y Mizushima, 1990). EnvZ y OmpR pertenecen a la familia de proteínas que forman un sistema sensor/regulador en bacterias (Stock *et al.*, 1989; Gross *et al.*, 1989).

OmpC, OmpF y PhoE de *E. coli* conservan, en promedio, tanto a nivel de secuencia nucleotídica como de aminoácidos (aa), 60% de similitud, por lo que se ha sugerido derivan de un ancestro común (Mizuno *et al.*, 1983). El análisis predictivo de la secuencia primaria de estas proteínas, sugiere que las proteínas presentan regiones que pueden estar expuestas hacia cualquier lado de la ME, fuera de la zona transmembranal hidrofóbica (Paul y Rosenbusch, 1985; Vogel y Jahnig, 1986; van der Ley *et al.*, 1987; Klebba *et al.*, 1990). Adicionalmente,



7

otros estudios en *E. coli* (Misra y Benson, 1988; Agterberg *et al.*, 1989), sugieren que la función de poro y la biogénesis están determinadas por segmentos específicos de aa, diferentes a los correspondientes a las probables regiones expuestas.

## OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo incluyeron la caracterización de la secuencia nucleotídica del gen *ompC* de *S. typhi*, así como la realización de un estudio comparativo con el gen *ompC* de *E. coli*, incluyendo algunos aspectos de su regulación. Finalmente, se probó la utilización de la proteína OmpC como presentadora de epítopes heterólogos, utilizando como modelo un determinante antigénico de la proteína VP4 de rotavirus.

## MATERIALES Y METODOS

Los materiales y métodos de la primera parte de este trabajo se describen en los anexos 1 y 2.

### a) Contrucción de plásmidos

La formación del plásmido pVF51 (Fig.1) se realizó como se describe a continuación: el fragmento *EcoRI-EcoRV* del plásmido pVF271 (Puentes *et al.*, 1987), el cual contiene el gen *ompC* completo y 1.1 kb de la región 5', fue subclonado en el plásmido pMT21 (Huang, H.V. comunicación personal), el cual es un derivado del pBR322 (Balbas *et al.*, 1988). Este plásmido está formado por los nucleótidos 2521 al 4361 del pBR322, incluye la secuencia que codifica para la resistencia a ampicilina, con la característica de no presentar el sitio de restricción para *PstI*. Además, contiene una región de clonación múltiple (polienlazador) después del nucleótido 4361 (ver Fig. 1).

El pMT21 fue digerido con *BglII* y tratado con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, para rasurar los extremos y, finalmente, fue digerido con *EcoRI*. Lo anterior, permitió la subclonación del fragmento proveniente del pVF271 y, al mismo tiempo, eliminar del vector los sitios de *PstI* y *BamHI*. La eliminación del sitio de *PstI* tuvo el propósito de que el sitio presente en *ompC*, fuera único en la construcción generada y permitiera la fácil manipulación de la región contenida entre este sitio y el de *PvuII* del gen. El sitio para *BamHI* fue removido por ser la enzima elegida para insertar las secuencias heterólogas en *ompC* (vease más adelante).

El M13PPs (ver fig. 1) fue generado mediante la clonación del fragmento *PvuII-PstI* de 0.7 kb del pVF271, el cual contiene la secuencia que codifica para los aa 50 a 285 de *OmpC*, entre los sitios para *HincII* y *PstI* del fago M13mp18 (Messing, 1983; Yanish-Perron *et al.*, 1985).

Todas las preparaciones de DNA se realizaron siguiendo el método de lisis alcalina (Maniatis *et al.*, 1982). Para la subclonación de fragmentos de DNA y transformación en *E. coli* HB101 (Boyer y Roulland-Dussoix, 1969) y JM101 (Yanish-Perron *et al.*, 1985) se siguieron procedimientos previamente descritos (Maniatis *et al.*, 1982).

Todas las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo (*Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hinc*II, *Mlu*I, *Pst*I y *Pvu*II), así como las otras enzimas modificadoras de DNA (fragmento Klenow de la polimerasa I, polinucleótido cinasa de T4 y la DNA ligasa de T4) fueron obtenidas de Promega Biotec y utilizadas como lo recomienda el proveedor. La secuenasa, DNA polimerasa de T7 modificada (Tabor y Richardson, 1987), se obtuvo de United States Biochemicals Corporation.

#### **b) Producción del gen híbrido.**

Dos oligonucleótidos sintéticos de 30 y 100 bases fueron sintetizados mediante el método de los fosforamiditos usando un sintetizador automático de DNA Microsyn 1450 (Systec) y purificados por electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida (Maniatis *et al.*, 1982). La secuencia de los oligos BH160 (30mero) y RV160 (100mero), así como sus características se muestran en la figura 2. Ambos oligos contienen regiones homólogas a las secuencias que flanquean los codones 160 y 161 del gen *ompC* de *S. typhi*. Entre estas secuencias flanqueadoras, denominadas brazos *ompC*, está la secuencia reconocida por la enzima *Bam*HI (para ambos oligos) y la secuencia que codifica para el péptido de rotavirus (para el RV160) (ver resultados y fig.2). Los codones incluídos en las secuencias heterólogas, fueron elegidos con base en el uso de codones que presenta *OmpC* (Puente *et al.*, 1989).

Los oligos fueron fosforilados con polinucleótido cinasa de T4 (Maniatis *et al.*, 1982), usando, además del ATP frío, trazas de [ $\text{p-}^{32}\text{P}$ ]ATP para monitorear la reacción de cinasa. El ATP no incorporado se removió precipitando los oligos con 3 volúmenes de etanol frío al 100%.

El fago recombinante M13PPs fue utilizado para infectar células de *E. coli* JM101. A partir de este cultivo se purificó DNA de cadena sencilla (Messing, 1983), el cual fue utilizado como templado para llevar a cabo la mutagénesis dirigida.

La mutagénesis dirigida se realizó mediante el método reportado por Su y El-Gewely (1988). Este se basa en la utilización de una DNA polimerasa de T7 modificada, conocida comercialmente como "secuenasa", de los oligos mutagénicos BH160 y RV160 y, como templado, del DNA de cadena sencilla del M13PPs, el cual contiene la secuencia del gen *ompC* que se quiere alterar. Una fracción de la reacción de mutagénesis fue utilizada para transformar células competentes de la cepa *E. coli* JM101.

Las clonas que incorporaron la inserción producida por los oligos fueron detectadas mediante las técnicas descritas por Wei y Surzycki (1986), o por hibridación tipo "slot blot", utilizando como sonda el oligo BH160 (para las mutantes producidas con este mismo oligo), o el oligo RV2, el cual contiene únicamente la secuencia de la inserción heteróloga (para las mutantes producidas con el RV160).

Cinco clonas positivas por hibridación fueron analizadas para cada reacción de mutagénesis. El DNA de cada una de ellas fue digerido con *Bam*HI y analizado mediante electroforesis en poliacrilamida al 6%. La secuencia nucleotídica de las clonas que revelaron el patrón de restricción esperado con *Bam*HI, esto es, que presentaron la generación de nuevos sitios para esta

enzima (como se ejemplifica en la fig. 3), fue confirmada siguiendo el método de los dideoxinucleótidos, descrito por Sanger (1977).

El DNA de la clona M13PPs-RV160, la cual se confirmó contenía el inserto de rotavirus como se muestra en la Fig. 2, fue utilizado para purificar el fragmento *MluI-PstI* de la región mutagenizada. Este fue usado para sustituir el mismo fragmento del gen silvestre en el plásmido pVF51, y así dar lugar a la creación del plásmido pVF51-RV160 (Fig.1).

### **c) Detección del epítotope heterólogo fusionado a OmpC.**

La fracción insoluble en Tritón X-100, conteniendo las preparaciones de PME, fue obtenida siguiendo el método descrito por Matsuyama *et al* (1984).

El perfil electroforético de las PME de las células conteniendo los plásmidos pMY111, el cual porta el gen *ompC* de *E. coli* (Mizuno *et al.*, 1983), pVF27 (Puente *et al.*, 1987) y pVF51 (este estudio), los cuales portan el gen *ompC* de *S. typhi*, y pVF51-RV160 (este estudio), el cual porta el gen híbrido, fue analizado mediante electroforesis en poliacrilamida-SDS (Puente *et al.*, 1991) (Fig. 4).

Ensayos de ELISA (Verdugo *et al.*, en preparación) utilizando PME, fueron realizados para mostrar si, a diferencia de la proteína OmpC, la proteína OmpC-rotavirus reaccionaba con el anticuerpo monoclonal (AMc) YO-2C2 específico para el epítotope de rotavirus (Taniguchi *et al.*, 1988). Asimismo, para determinar si el epítotope heterólogo de rotavirus era expuesto en la superficie celular, se llevaron a cabo ELISAs utilizando células enteras como antígeno inmovilizado (Charbit *et al.*, 1988).

## **RESULTADOS**

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de la primera parte de este trabajo, se describen en los artículos que a continuación se presentan. Posteriormente, se incluye la descripción del desarrollo de la segunda parte del trabajo y los resultados obtenidos.

**a) Construcción del plásmido pVF51 (*ompC*) y del fago M13PPs (*ompC* parcial).**

Durante el desarrollo del primer objetivo de este trabajo, se definió que el gen *ompC* de *S. typhi* consiste de una fase abierta de lectura de 1134 nucleótidos (nt), los cuales codifican para una proteína de 378 aminoácidos (aa), con un péptido señal de 21 aa. Esta proteína es 11 aa más grande que la de *E. coli*, pero tienen el péptido señal idéntico. La secuencia de aa de la proteína madura muestra 79% de similitud entre ambas bacterias y 77% a nivel de secuencia nucleotídica. A partir de la comparación de las secuencias primarias de la proteína OmpC de *S. typhi* y de *E. coli* (referidas de aquí en adelante como OmpCs y OmpCe, respectivamente), fueron identificadas siete regiones variables principales. Cinco de ellas corresponden a regiones hidrofílicas, lo cual sugiere que podrían estar localizadas hacia el exterior de la ME (Puente *et al.*, 1989). Con base en esta información, se seleccionó una región que, dadas sus características, tuviera el potencial de aceptar la inclusión de un péptido heterólogo y exponerlo en la superficie de la célula. El sitio seleccionado para llevar a cabo la inserción se localiza entre los aa 160 y 161 y está en una región variable e hidrofílica (ver figura 4 en Puente *et al.*, 1989). Estudios realizados en *E. coli*, sugieren que esta región presenta una alta probabilidad de estar expuesta hacia el exterior de la célula, y el potencial de ser permisiva para la inserción de secuencias heterólogas. Por un lado, se han obtenido en *E. coli* mutaciones puntuales en esta región que afectan la función de receptor de fagos y no la de poro (Misra y Benson, 1988). Por otro lado, esta región corresponde a un segmento de aa en OmpCe que contiene 6 aa más con respecto a OmpCs; asimismo, contiene 14 y 15 aa de más, con respecto a las proteínas OmpF y PhoE de *E. coli*, las cuales junto con OmpC, parecen derivarse de un ancestro



común (Mizuno *et al.*, 1983). Lo anterior, sugiere que evolutivamente esta región ha aceptado inserciones o deleciones de segmentos de aa, sin alterar la configuración general de estas proteínas y su función particular como poros de difusión pasiva.

Más recientemente, en un estudio que define epítopes antigénicos de OmpF, se generaron diferentes anticuerpos monoclonales que reconocen la región equivalente a la de los aa 160-161 de OmpC aún en la bacteria completa, lo cual sugiere fuertemente que se expone en la superficie celular y que es accesible a los anticuerpos (Klebba *et al.*, 1990). De este modo, la inclusión de una secuencia heteróloga en esta región pudiera no alterar de manera significativa la estructura y función de la proteína en la ME, además de darle la posibilidad de estructurar correctamente al péptido heterólogo.

Para probar la capacidad de la proteína OmpCs como acarreadora y presentadora de epítopes heterólogos, se seleccionó como modelo un péptido de la proteína VP4 de la capa externa de rotavirus (agente causal de diarreas en niños), la cual está codificada por el segmento cuatro del genoma del virus. Se ha observado que esta proteína es el blanco del corte con tripsina, generando los fragmentos VP5 (de 60 kDa) y VP8 (de 28 kDa), lo cual promueve la infección. VP4 actúa como hemaglutinina para varias cepas del virus; experimentos *in vitro* demuestran que anticuerpos dirigidos contra esta proteína son capaces de neutralizar al virus. Además, se ha sugerido que VP4 está involucrada en inmunidad heterotípica o protección cruzada, que induce inmunidad protectora en animales, y que es inmunogénica en niños y animales (para revisión ver Estes y Cohen, 1989).

El péptido elegido comprende los aa 296 a 313 del fragmento VP5 y está conformado por la secuencia KAANYQYNYLRDGEQVTA. El monoclonal YO-

2C2 reconoce el epítipo sintético y neutraliza al virus, lo cual sugiere que es lineal o secuencial. Esta región se localiza en una porción altamente hidrofílica de la proteína viral (Taniguchi *et al*, 1988). Además, es reconocido aún cuando esté fusionado a la subunidad B de la toxina CT de *V. cholerae* (González *et al*, 1991).

Para llevar a cabo la inserción de la secuencia codificadora del péptido heterólogo, se diseñó una estrategia por medio de la cual se contruyeron los vectores que fueron utilizados para introducir, mediante mutagénesis dirigida, la secuencia que codifica para el péptido de rotavirus (ver materiales y métodos). Como se muestra en la Fig. 1, se obtuvo un fago M13 recombinante (M13PPs) que porta el fragmento de la región central del gen estructural *ompC*, conteniendo la región 160-161, así como sitios de restricción únicos para *PstI* y *MluI*, los cuales permiten la movilización del fragmento, en forma de "cassette", al plásmido pVF51. Este, a su vez, está formado por el fragmento *EcoRI-EcoRV* de 2.0 kb, proveniente del pVF271 (Puente *et al.*, 1987), conteniendo el gen nativo *ompC* completo y por un derivado del pBR322 de 1.9 kb denominado pMT21, el cual conserva el gen de la resistencia a ampicilina, pero no el sitio de *PstI* que originalmente se presenta en el pBR322 (Balbas *et al.*, 1988) (Fig.1).

**b) Inserción de la secuencia nucleotídica heteróloga que codifica para un péptido neutralizante de la proteína de capa externa VP4 de rotavirus en la proteína OmpC de *S. typhi*, mediante mutagénesis dirigida.**

Una vez obtenidas las construcciones anteriores, se plantearon dos estrategias para realizar la inserción de la secuencia heteróloga. La primera

7

consistió en crear, mediante mutagénesis sitio-dirigida (ver mat. y met.), un sitio de restricción para la enzima *Bam*HI, que estuviera en fase entre los codones 160 y 161 de *ompC*. Para esto, se sintetizó un oligonucleótido (30mero), denominado BH160, el cual contiene las secuencias necesarias para aparearse con su región homóloga en el templado M13PPs, denominadas brazos *ompC* (de 12 nucleótidos cada uno), y la secuencia de reconocimiento para *Bam*HI de 6 nucleótidos (Fig. 2). El oligo BH160 permitió obtener una eficiencia de mutagénesis mayor del 50%, con respecto al número de transformantes obtenidas (datos no mostrados).

Algunos de los criterios para elegir este sitio de restricción fueron los siguientes: que no existiera en el vector, ni en el gen; que fuera una enzima de uso generalizado; que su secuencia codificara para aa que se encuentran frecuentemente en regiones hidrofílicas; y que produjera extremos cohesivos. De esta forma se podría, posteriormente, insertar la secuencia heteróloga en forma de oligonucleótidos complementarios, los cuales presentarían extremos para *Bam*HI.

La otra estrategia se basó en la posibilidad de sintetizar un oligo que incluyera tres partes: las secuencias de los brazos *ompC* (de 18 y 16 nucleótidos, respectivamente), la secuencia para *Bam*HI por duplicado hacia el centro del oligo (12 nucleótidos en total) y la secuencia que codifica para el epítipo de rotavirus (54 nucleótidos) entre las secuencias de *Bam*HI. Este 100mero, denominado RV160, permitió la inserción, en un solo paso, de la secuencia heteróloga (Fig. 2).

Sin embargo, la eficiencia de mutagénesis obtenida utilizando este oligo fue de aproximadamente el 5%. Este resultado no es sorprendente, si tomamos en cuenta la complejidad del oligo RV160 el cual representa una inserción de 66

nucleótidos, con respecto a la del BH160, el cual inserta solo 6 nucleótidos extras. Sin embargo, aún con esta desventaja, la posibilidad de contar con oligos de mayor tamaño simplifica los pasos a seguir en la producción de proteínas híbridas, sobre todo tomando en cuenta que existe la metodología para hacer la búsqueda de mutantes entre un gran número de clonas, utilizando técnicas de hibridación (ver mat. y met.). Además, refleja la versatilidad del método en cuanto a la capacidad de generar inserciones relativamente grandes.

Las clonas que hibridaron positivamente con el oligo BH160 (de la mutagénesis con el 30mero) y con un oligo que contiene únicamente la secuencia de rotavirus (de la mutagénesis con el 100mero), fueron analizadas por patrón de restricción con *Bam*HI, como se muestra en la fig. 3, donde se puede observar el análisis del perfil electroforético de tres clonas diferentes, M13PPs, M13-BH160 y M13-RV160. Se determinó, también, la secuencia nucleotídica de estas clonas, para comprobar que la inserción de los sitios de restricción o de la secuencia de rotavirus se realizó en la fase correcta y sin alteraciones a la secuencia original (datos no mostrados).

Utilizando DNA de la clona M13-RV160, se obtuvo el fragmento *Mlu*I-*Pst*I de 750 pb, el cual fue posteriormente utilizado para sustituir el mismo fragmento en el plásmido pVF51, lo cual genera el plásmido pVF51-RV160, que contiene el gen para la proteína OmpC híbrida (Fig. 1). Una vez producido este plásmido, se introdujo en *E. coli* HB101 para analizar la expresión del producto híbrido. El análisis del perfil electroforético de preparaciones de PME, de células conteniendo ya sea el gen *ompCe*, *ompCs* u *ompC-RV160*, genera el resultado que se muestra en la fig. 4. Obsérvese que la migración es dependiente del tamaño esperado para cada proteína; así, para *OmpCe* se observa una banda de 38.3 kDa, para *OmpCs* de 39.2 kDa y para *OmpCs*-

RV160 de 41.7 kDa, aproximadamente.

Este resultado nos sugiere que la proteína híbrida es producida en niveles equivalentes a los de las proteínas originales, ya que no parece haber diferencias significativas en cuanto a la concentración del producto del plásmido original. Además, aparentemente, la proteína es exportada e integrada en la ME de manera adecuada.

### **c) Detección del epítoto heterólogo fusionado a OmpC.**

Sabiendo que el plásmido pVF51-RV160 codifica para una proteína híbrida que se integra en la ME, se procedió a evaluar, mediante dos diferentes ensayos de ELISA (ver mat. y met.), si dicha proteína era reconocida por el AMc YO-2C2 específico para el péptido de rotavirus.

El primero consistió en la utilización de preparaciones de PME, para evaluar si la proteína híbrida presentaba el epítoto de manera que el anticuerpo lo reconociera, aún considerando la posibilidad de que el epítoto se presentara en la región de la ME orientada hacia el espacio periplásmico de la célula. En este experimento fueron utilizadas cuatro diluciones diferentes del AMc YO-2C2 (1:1,500; 1:5,000; 1:15,000 y 1:50,000), en combinación con tres concentraciones diferentes del antígeno (5, 10 y 15 µg/ml), para determinar en que punto se obtenía la mejor sensibilidad del ensayo, si es que el AMc interactuaba con el péptido fusionado a OmpC. La fig. 5., muestra la gráfica donde se determina que el epítoto heterólogo es reconocido específicamente en OmpC-RV160 por su AMc y que una buena diferenciación se obtiene con la dilución de 1:15,000 del anticuerpo, utilizando la concentración de 5 µg/ml de cada preparación de PME (Tabla 1).

El segundo ensayo se basó en la utilización de células completas para

7

evaluar si el epítoto se expone en la superficie celular. Al igual que para PME, este ensayo se estandarizó utilizando diferentes concentraciones de células ( $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$  y  $5 \times 10^8$  células/ml) y las mismas diluciones del AMc señaladas en el experimento anterior. El reconocimiento diferencial del AMc hacia células que portan el plásmido pVF51-RV160, se dio de manera clara utilizando una concentración de células de  $5 \times 10^7$  por ml y una dilución del AMc de 1:15,000 (datos no mostrados).

En resumen, los resultados presentados en la Tabla 1, muestran la factibilidad de usar a OmpCs como acarreadora de epítotoes heterólogos para presentarlos en la superficie celular, utilizando como sitio de inserción los aa 160-161 (ver discusión).

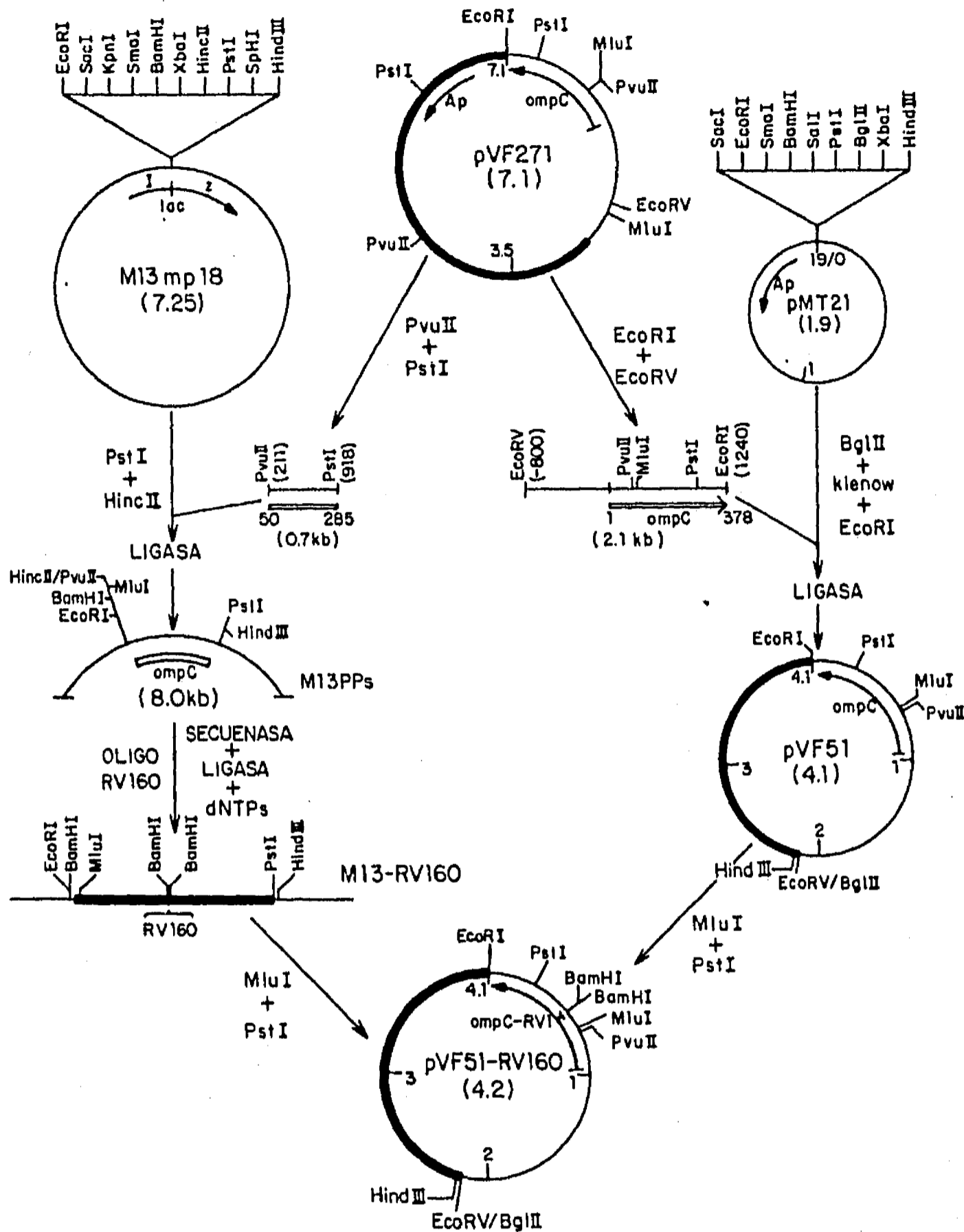


Fig. 1.- Construcción del plásmido pVF51-RV160. La figura muestra los pasos que se siguieron en la producción del vector que contiene el gen *ompC* híbrido al que se le fusionó una secuencia de rotavirus. Primeramente, se esquematiza la construcción de los vectores M13PPs y pVF51 a partir del plásmido pVF271, y posteriormente, como a partir del vector M13-RV160 derivado de un ensayo de mutagénesis dirigida, se contruyó el pVF51-RV160 (ver sección de mat. y met. y de resultados.)

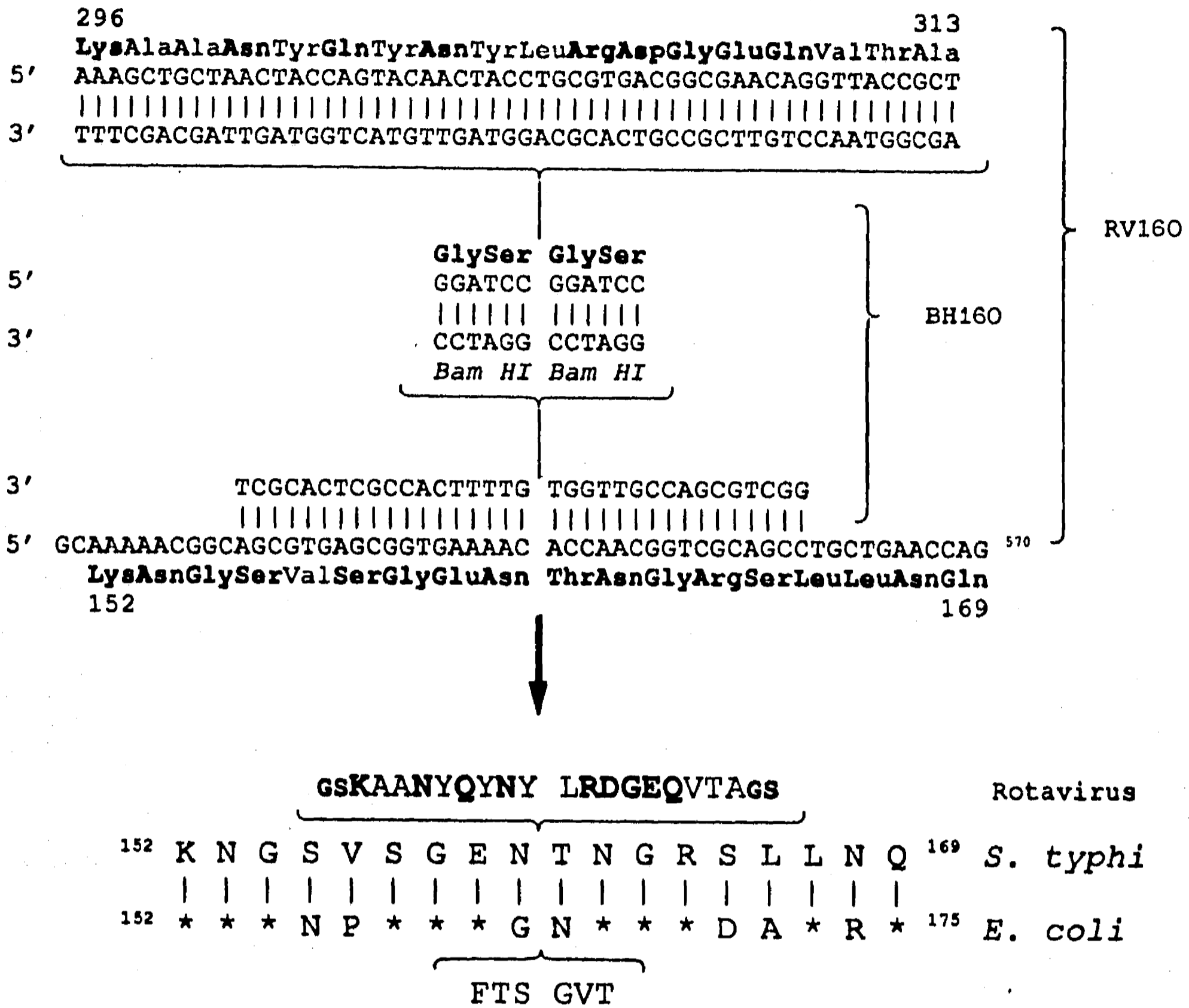


Fig. 2.- Secuencia nucleotídica de los oligos BH160 y RV160. El esquema muestra el diseño del oligo RV160, el cual está formado por tres regiones: las secuencias denominadas "brazos *ompC*" (de 18 y 16 bases) que sirven para aparear el oligo en la vecindad de la región de los codones 160-161 del gen, la secuencia que reconoce *Bam*HI por duplicado (de 12 bases) hacia el centro del oligo, flanqueando la secuencia que codifica para el péptido de rotavirus (de 54 bases). El oligo BH160 contiene los primeros 12 nucleótidos de cada brazo y la secuencia para *Bam*HI. En la parte inferior de la figura, se representa la secuencia de aa de *OmpC*s y *OmpCe*, alrededor de la región donde se realizó la inserción. Los asteriscos representan homología.



7

Fig. 3.- Electroforesis en poliacrilamida al 6%, del DNA de las clonas M13-BH160 (carril 1), M13-PPs (carril 2) y M13-RV160, digerido con *Bam*HI. La figura muestra como se modifica el patrón de restricción de las clonas producidas por mutagénesis, con respecto a la clona original. Así, para la clona BH160 la presencia de un sitio de restricción en la región 160-161 del gen, produce la banda de 350 pb y para RV160, además de esta banda, presenta el fragmento de la secuencia de rotavirus de 60 pb, aproximadamente.

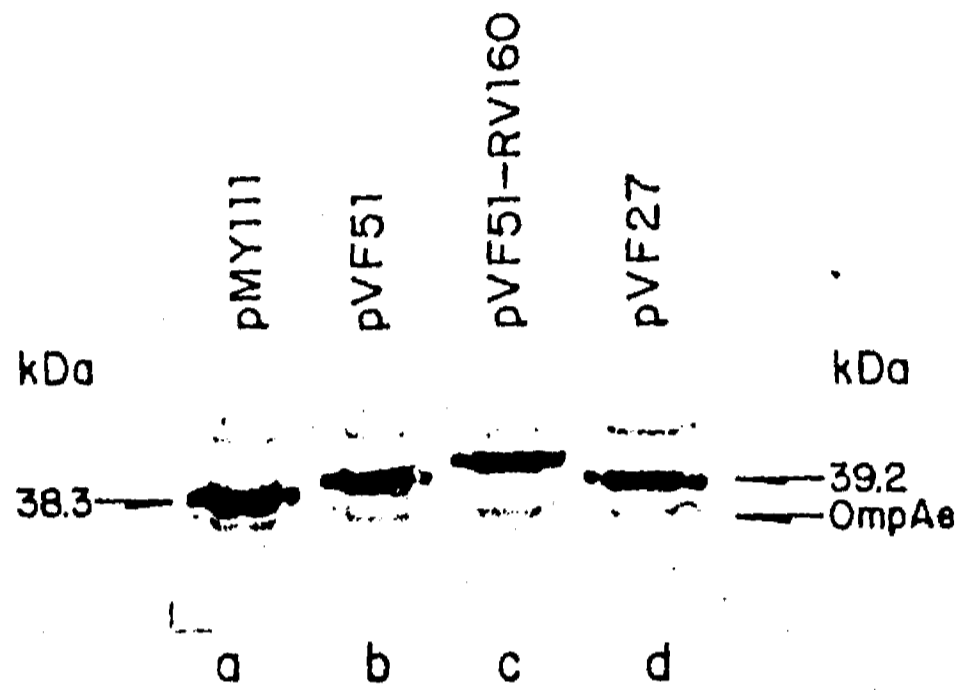


Fig. 4.- Electroforesis en poliacrilamida-SDS de preparaciones de PME de *E. coli* HB101, conteniendo los plásmidos: a) pMY111 (*ompC* de *E. coli*); b) pVF51 (*ompC* de *S. typhi*); c) pVF51-RV160 (*ompC*-rota) y; d) pVF27 (*ompC* de *S. typhi*).

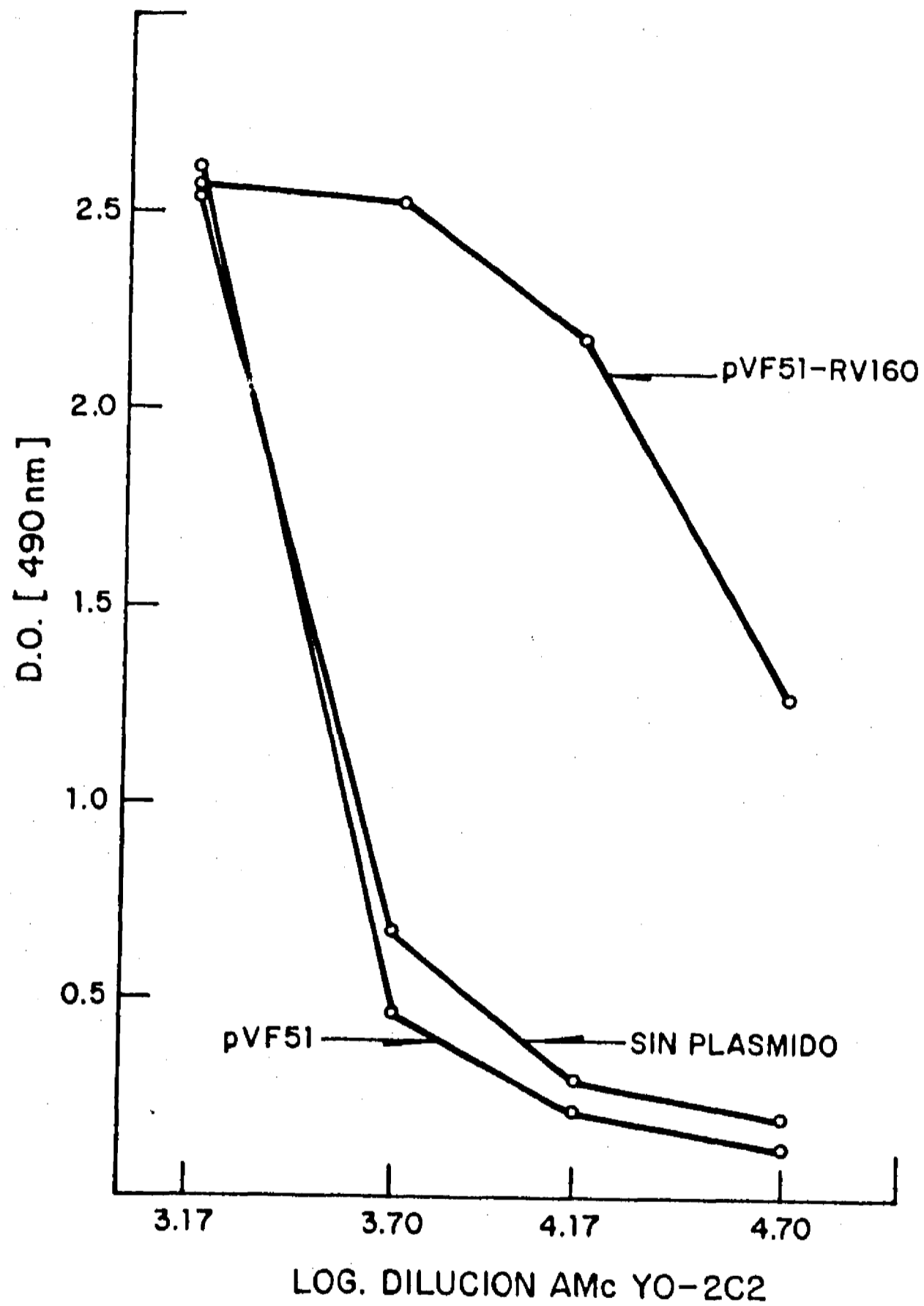


Fig. 5.- Gráfica de los resultados obtenidos por ELISA, utilizando el anticuerpo monoclonal YO-2C2 y PME de *E. coli* HB101 sin, y con los plásmidos pVF51 y pVF51-RV160.

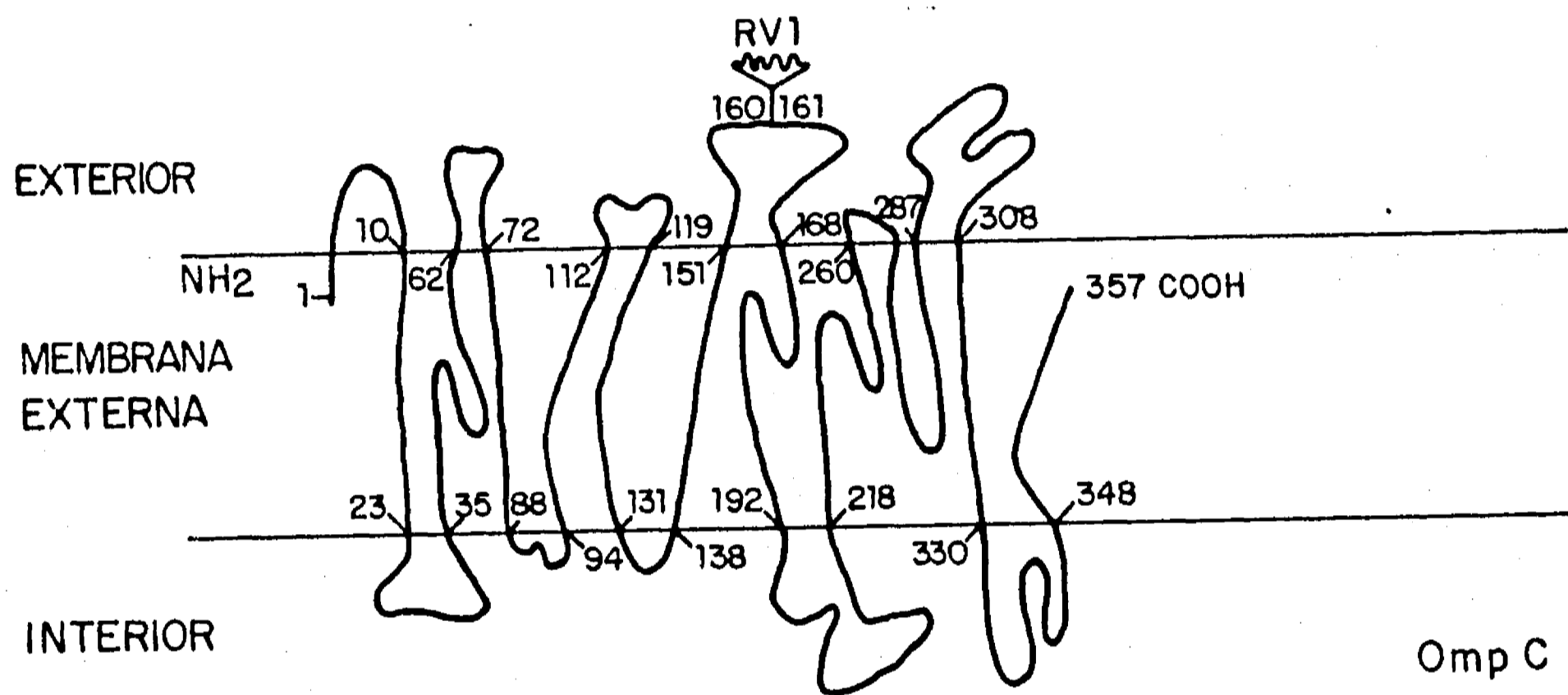


Fig. 6.- Esquema de OmpC *S. typhi* integrada a la ME. En el dibujo se señala la región donde se realizó la inserción del péptido heterólogo de rotavirus.

TABLA II.-

LECTURAS DE ELISA<sup>a</sup>

HB101	PME <sup>b</sup>	Cels.comp. <sup>c</sup>
s/plásmido	0.30	0.05
pVF51 (OmpC+)	0.22	0.06
pVF51-RV160 (OmpC-Rota)	2.31	1.48

a) Se utilizó una dilución 1:15,000 del anticuerpo monoclonal YO-2C2. La lectura se realizó a 490nm. Los resultados mostrados son el promedio de diferentes experimentos.

b) Las preparaciones de proteínas de membrana externa (PME) se utilizaron a una concentración de 5µg/ml en PBS.

c) Las células completas se utilizaron a una concentración aproximada de  $5 \times 10^7$  cels/ml, equivalente a una  $DO_{600}=0.1$  en PBS.

## DISCUSION Y CONCLUSION

En este trabajo hemos caracterizado la secuencia nucleotídica del gen *ompC* de *S. typhi* y definido algunas características estructurales, en comparación con la secuencia reportada para este mismo gen en *E. coli* (Puente *et al.*, 1989; ver anexo 1). Asimismo, hemos observado que la expresión de OmpCs es influenciada de manera distinta por la osmolaridad del medio, con respecto a lo reportado para OmpCe; sin embargo, en ambos casos, la expresión depende del efector positivo OmpR de *E. coli* (Puente *et al.*, 1991; ver anexo 2).

A este respecto, quedan por definir muchos aspectos acerca de la expresión de OmpC en *S. typhi* y de lo que lo observado en este trabajo implica en la biología de esta bacteria.

Estamos interesados en definir, por ejemplo, que secuencias actúan en cis o cuales efectores actúan en trans, determinando la expresión del gen *ompC* de *S. typhi* y, particularmente, la expresión diferencial con respecto a *E. coli*; así como, la similitud que existe entre los efectores que actúan en trans con otros sistemas conocidos formados por una proteína sensora y una reguladora (Mizuno y Mizushima, 1990).

Para *E. coli* existen diversos reportes en los que se han señalado las secuencias de los genes *ompC* y *ompF*, con las que interactúa OmpR (Jo *et al.*, 1986; Norioka *et al.*, 1986; Mizuno *et al.*, 1988; Maeda and Mizuno, 1990; Tsung *et al.*, 1990; Rampersaud *et al.*, 1989). Se han descrito, también, cambios puntuales en la secuencia de estas regiones regulatorias o de los promotores (secuencias que actúan en cis) (Dairi *et al.*, 1985; Ozawa *et al.*, 1987), así como modificaciones que implican alterar la topología del DNA en estas regiones (Maeda *et al.*, 1988; Maeda y Mizuno, 1988; Ozawa *et al.*, 1990), que resultan en la alteración del patrón de la regulación de estos genes.

7

Se han caracterizado, además, diversas mutantes en las proteínas reguladoras OmpR y EnvZ (factores que actúan en trans) que generan una gran variedad de fenotipos en cuanto a la expresión de OmpC y OmpF. Estos fenotipos van desde la expresión constitutiva de ambas proteínas, hasta la ausencia total de ellas. Basados en esto, se han sugerido dominios importantes, en ambas proteínas, que intervienen en el procesamiento y la transducción de la señal (Tate *et al.*, 1988; Forst *et al.*, 1989; Kanamuro *et al.*, 1989, 1990; Slauch y Silhavy, 1989; Mizuno *et al.*, 1990; Brissette *et al.*, 1991; Tokishita *et al.*, 1991).

La comparación de las características regulatorias que se definen para *S. typhi*, con toda la información acumulada para *E. coli*, podrían definir si la expresión diferencial de *ompC* depende de cambios puntuales a nivel de los elementos regulatorios conocidos que forman parte de este sistema de regulación, o si existen otros elementos, hasta ahora no identificados en *E. coli*, involucrados en como responde *S. typhi* a los estímulos ambientales. .

Por otro lado, parece interesante analizar si mutantes de *S. typhi* en estos elementos regulatorios presentan alteraciones importantes en su virulencia. Al respecto, se ha reportado que mutaciones en *ompR* de *S. typhimurium* resultan en atenuación de la virulencia (Dorman *et al.*, 1989; Chatfield *et al.*, 1991), y que mutantes avirulentas sensibles a defensinas mapean en el sistema sensor/regulador PhoP/PhoQ (Miller *et al.*, 1989). Además, se ha observado que el gen *invA* de *S. typhimurium*, que permite la penetración de células en cultivo y juega un papel en la invasión de las placas de Peyer y de la pared celular del intestino delgado, se expresa en niveles ocho veces más altos cuando se incrementa la osmolaridad del medio, un fenómeno que es influenciado por el superenrollamiento del DNA (Galán y Curtiss, 1990), el cual también ha sido

7

involucrado en la regulación de la expresión de OmpC en *E. coli* y *S. typhimurium* (Graeme-cook *et al.*, 1989; Ni Bhriain *et al.*, 1989). Más aún, el fenotipo invasivo de otra bacteria, *Shigella flexneri*, es favorecido en alta osmolaridad a través del sistema *ompR-envZ* (Bernardini *et al.*, 1990).

A partir de la secuencia de aa de la proteína OmpCs, deducida de la sn del gen, se puede inferir un modelo de la estructuración que ésta adopta al ser integrada a la ME. Lo anterior, se realiza con la ayuda de algoritmos computacionales que permiten hacer predicciones estructurales (e.g. Paul y Rosenbusch, 1985; Vogel y jahnig, 1986; Hopp y Woods, 1981) y de estudios genéticos e inmunológicos que pueden aportar datos sobre la estructura y función de una proteína membranal.

Por ejemplo, la generación de anticuerpos monoclonales contra las PME de *E. coli* LamB (Gabay *et al.*, 1983; Schenkman *et al.*, 1983), PhoE (van der Ley *et al.*, 1986) y OmpF (Klebba *et al.*, 1990; Vordermeier *et al.*, 1990), o la producción de anticuerpos policlonales dirigidos contra péptidos sintéticos que corresponden a secuencias de la proteína (Molla *et al.*, 1989), ha permitido identificar dominios antigénicos, presentes en la superficie celular. Asimismo, el análisis de mutantes en residuos que afectan la interacción con bacteriófagos o con anticuerpos monoclonales, dirigidos contra la proteína nativa, ha permitido definir cuales regiones tienen mayor probabilidad de estar orientadas hacia afuera de la célula (Desaymard *et al.*, 1986; Misra y Benson, 1988a,b; Benson *et al.*, 1988; Klebba *et al.*, 1990). Por otra parte, el análisis de proteínas híbridas producidas por recombinación *in vitro*, también ha aportado datos que señalan dominios funcionales (Nogami *et al.*, 1985; Tommassen *et al.*, 1985; Mizuno *et al.*, 1987; van der Ley *et al.*, 1987; Hikita *et al.*, 1989; Fourel *et al.*, 1990)

Basados en este tipo de aproximaciones, Misra y Benson (1988) generaron



un modelo de la topología de la proteína OmpC de *E. coli*. Sin embargo, a diferencia de los modelos propuestos para, por ejemplo, las proteínas LamB (Charbit *et al.*, 1988) y OmpF de *E. coli* (Klebba *et al.*, 1990), el modelo generado para esta proteína está, aún, muy poco sustentado. Esto se debe, principalmente, a que el modelo está basado, como ya se mencionó, en la extrapolación de predicciones estructurales (Mizuno *et al.*, 1983; Paul y Rosenbusch, 1985) y en la evidencia indirecta dada por el análisis de proteínas OmpC mutantes (Misra y Benson, 1988a,b); además, de que no se ha presentado un estudio que involucre AMcs específicos para OmpC.

Una de las estrategias utilizadas en los últimos años, para definir regiones de las PME que se exponen hacia el exterior celular, consiste en insertar secuencias heterólogas en segmentos que tienen la probabilidad de salir y evaluar el reconocimiento del epítoto heterólogo por anticuerpos específicos contra esta secuencia (Charbit *et al.*, 1988; Freudl, 1989; Agterberg *et al.*, 1990).

De este modo, aún cuando las estrategias mencionadas nos permitieron imaginar un modelo de trabajo de la estructura de OmpCs (Fig. 6), su validación requiere de mucho trabajo.

Aquí hemos definido, mediante el uso de un epítoto heterólogo de rotavirus, una región de la proteína OmpCs que probablemente se expone en la superficie celular, y que es capaz de presentarlo de manera adecuada.

Este resultado sugiere, como en otros estudios, que la utilización de secuencias heterólogas insertadas en diferentes regiones de la proteína, podría ayudar a definir con más detalle la topología de OmpCs. Así, este primer ensayo con la región 160-161, que por diferentes criterios se consideró tenía una alta probabilidad de exponerse hacia dentro o fuera de la célula (Puente *et al.*, 1989; ver resultados), junto con la metodología para manipular y modificar el gen en

cualquier otra región o regiones que se quieran evaluar, provee una alternativa para sustentar un modelo más aproximado de la estructura de OmpCs. Los resultados obtenidos por esta metodología, no descartan la posibilidad de que la inserción de una secuencia heteróloga altere la biogénesis de la proteína. Sin embargo, existen antecedentes para otras proteínas que indican que la inserción en, o la delección o sustitución de regiones expuestas, no afecta la translocación o la incorporación de la proteína en la ME (Charbit *et al.*, 1988; Agterberg *et al.*, 1989; Klebba *et al.*, 1990), a diferencia de lo que sucede si se alteran secuencias relacionadas con la función de poro (Misra y Benson, 1988a,b; Bosch *et al.*, 1989a,b).

Cabe señalar, además, que este sistema no solo permite obtener mayor conocimiento sobre la estructura y función de la proteína, sino que está siendo explotado como modelo para realizar estudios en el campo de la generación de nuevas vacunas. El desarrollo de vacunas para la prevención de enfermedades virales, bacterianas y parasitarias, es el centro de muchos esfuerzos de investigación actualmente. Uno de estos esfuerzos está enfocado en la obtención de organismos atenuados, los cuales son mutantes que han perdido virulencia, pero son aún capaces de inducir respuesta inmune. A este respecto, se ha demostrado que cepas vivas del género *Salmonella* pueden estimular una respuesta inmune protectora en contra de la cepa homóloga virulenta (Curtis III *et al.*, 1989), siendo a su vez, más efectivas que vacunas muertas o formadas por subunidades.

*Salmonella* es una bacteria invasiva, capaz de inducir inmunidad humoral y celular (Finlay y Falkow, 1989; Hsu, 1989). Uno de los planteamientos genéticos generales más recientes en el uso de bacterias atenuadas vivas como vacunas, es el acoplamiento de un determinante antigénico heterólogo a una

7

proteína bacteriana acarreadora.

En esta línea, sistemas como los anteriormente mencionados, han sido recientemente evaluados para presentar epítopes heterólogos en la superficie de bacterias atenuadas y para generar respuesta inmune hacia diferentes patógenos. De este modo, PhoE ha sido usada para presentar determinantes antigénicos del virus de la fiebre aftosa (Agterberg *et al.*, 1990b) y LamB de la región preS2 del virus de la hepatitis B (Charbit *et al.*, 1987) o de la proteína VP1 del poliovirus tipo 1 (Van der Werf *et al.*, 1990).

Por otro lado, aunque existen varios otros sistemas para producir proteínas fusionadas en bacterias, tales como: proteínas citoplásmicas como la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* (Jacob *et al.*, 1985) o la glutatión-transferasa de *Schistosoma japonicum* (Johnson *et al.*, 1989); proteínas periplásmicas como MalE de *E. coli* (Leclerc *et al.*, 1990); proteínas que se exportan como la proteína A de *Staphylococcus aureus* (Lowenadler *et al.*, 1986); la subunidad B de la toxina diftérica (Phalipon *et al.*, 1989); la subunidad B de la toxina del colera (Sánchez y Holmgren, 1989); u otras proteínas membranales como la flagelina de *Salmonella* (Wu *et al.*, 1989); la información sobre la inmunogenicidad de epítopes heterólogos presentados por proteínas acarreadoras en células intactas usadas como inmunógeno, es muy limitada.

Más aún, el uso de estas proteínas acarreadoras como vehículos, para el diseño de vacunas, está siendo ampliamente potenciado con la selección y producción apropiada de péptidos que contienen epítopes inmunodominantes de células T. Este tipo de epítopes juegan un importante papel en la respuesta inmune protectora contra agentes infecciosos, como ha sido descrito para algunos organismos (Killar y Eisenstein, 1986; Kauffman, 1983; North, 1974). Existe también evidencia de que la protección contra patógenos intracelulares, puede

7

en parte estar mediada por células T CD8+ (Kauffman 1988; Aggarwal *et al.*, 1990). De este modo, un patógeno intracelular como *Salmonella* puede ser usado para llevar epítopes de células T de otros patógenos y puede ser útil para inducir respuesta de linfocitos T tipo CD4+ y CD8+.

Debido a lo anterior, diferentes esfuerzos se han enfocado en la identificación de regiones en los antígenos que son reconocidas por los receptores de células T. Existen diferentes requerimientos para poder predecir la estructura de proteínas y péptidos que son centrales en la respuesta inmune (Vajda *et al.*, 1990); sin embargo, algunos modelos han sido elaborados para predecir epítopes de células T (Margalit *et al.*, 1987; Rothbard, 1986; Sette *et al.*, 1989).

Así, la manipulación de OmpCs nos puede permitir, además de generar conocimiento básico sobre su estructura y función, utilizarla como modelo para definir las cualidades inmunogénicas de regiones que corresponden a proteínas de organismos sobre los que se tiene un interés particular, como es el caso de rotavirus. A su vez, este mismo modelo, puede permitir el estudio *in vitro* de diferentes aspectos involucrados en el procesamiento antigénico y la presentación de epítopes inmunogénicos, principalmente aquellos capaces de generar inmunidad celular, cuando son presentados por cepas atenuadas que son usadas como vectores vacunales.

## BIBLIOGRAFIA

- Aggarwal, A., Kumar, S., Jaffe, R., Hone, D., Gross, M. and Sadoff, J. (1990) Oral *Salmonella*: malaria circumsporozoite recombinants induce specific CD8+ cytotoxic T cells. *J. Exp. Med.* **172:1083-1090**.
- Agterberg, M., Adriaanse, H., Tijhaar, E., Resink, A. and Tommassen, J. (1989) Role of the cell surface-exposed regions of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* K-12 in the biogenesis of the protein. *Eur. J. Biochem.* **185:365-370**.
- Agterberg, M., Adriaanse, H., van Bruggen, A., Karperien, M. and Tommassen, J. (1990a) Outer-membrane PhoE protein of *Escherichia coli* K-12 as an exposure vector: possibilities and limitations. *Gene.* **88:37-45**.
- Agterberg, M., Adriaanse, H., Lankhof, H., Meloen, R. and Tommassen, J. (1990b) Outer-membrane PhoE protein of *Escherichia coli* as a carrier for foreign antigenic determinants: immunogenicity of epitopes of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* **8:85-91**.
- Aiba, H., Nakasa, F., Mizushima, S. and Mizuno, T. (1989). Evidence for the physiological importance of the phosphotransfer between the two regulatory components, EnvZ and OmpR, in osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264:14090-14094**.
- Aiba, H. and Mizuno, T. (1990). Phosphorylation of a bacterial activator, OmpR, by a protein kinase, EnvZ, stimulates the transcription of the *ompF* and *ompC* genes in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **261:19-22**.
- Balbás, P., Soberón, 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**.
- Benson, S.A., Occi, J.L. and Sampson, B.A. (1988) Mutations that alter the pore function of the OmpF porin of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* **203:961-970**.
- Bernardini, M.L., Fontaine, A. and Sansonetti, P.J. (1990) The two-component regulatory system OmpR-EnvZ controls the virulence of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* **172:6274-6281**.
- Bosch, D., Scholten, M., Verhagen, C. and Tommassen, J. (1989a). The role of the C-terminal membrane spanning fragment in the biogenesis of *E. coli* K-12 outer membrane protein PhoE. *Mol. Gen. Genet.* **216:144-148**.
- Bosch, D., De Boer, P., Bitter, W. and Tommassen, J. (1989b). Role of the positively charged N-terminus of the signal sequence of *E. coli* K-12 outer membrane protein PhoE in export. *Biochim. Biophys. Acta* **979:69-76**.
- Boyer, H.W. and Rolland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41:459-472**.
- Brissette, R.E., Tsung, K.L. and Inouye, M. (1991). Suppression of a mutation in OmpR at the putative phosphorylation center by a mutant EnvZ protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173:601-608**.
- Calderón, I., Lobos, S.R., Rojas, H.A., Palomino, C., Rodríguez, L.H. and Mora, G.C. (1986) Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid fever in humans. *Infect. Immun.* **52:209-212**.
- Calva, E., Puente, J.L. and Calva, J.J. (1988) Research opportunities in typhoid fever: epidemiology and molecular biology. *BioEssays* **9:173-177**.

- Charbit, A., Sobczak, E., Michel, M.L., Molla, A., Tiollais, P. and Hofnung, M. (1987) Presentation of two epitopes of the PreS2 region of hepatitis B virus on live recombinant bacteria. Immunization studies. *J. Immunol.* **139:1658-1654.**
- Charbit, A., Molla, A., Saurin, W. and Hofnung, M. (1988) Versatility of a vector for expressing foreign polypeptides at the surface of Gram-negative bacteria. *Gene.* **70:181-189.**
- Chatfield, S., Dorman, C.J., Hayward, C. and Dougan, G. (1991) Role of *ompR* dependent genes in *Salmonella typhimurium* virulence: mutants deficient in both OmpC and OmpF are attenuated in vivo. *Infect. Immun.* **59:449-452.**
- Csonka, L.N. (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53:121-147.**
- Curtiss III, R., Kelly, S.M., Gulig, P.A. and Nakayama, K. (1989) Selective delivery of antigens by recombinant bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immun.* **146:35-49.**
- Desaynard, C., Débarbouillé, M., Jolit, M. and Schwartz, M. (1986). Mutations affecting antigenic determinants of an outer membrane protein of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **5:1383-1388.**
- Dorman, C.J., Chatfield, S., Higgins, C.F., Hayward, C. and Dougan, G. (1989) Characterization of porin and *ompR* mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*: *ompR* mutants are attenuated in vivo. *Infect. Immun.* **57:2136-2140.**
- Edelman, R. and Levine, M.M. (1986) Summary of an international workshop on typhoid fever. *Rev. Infect. Dis.* **8:329-349.**
- Estes, M.K. and Cohen, J. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* **53:410-449.**
- Finlay, B.B. and Falkow, S. (1989) *Salmonella* as an intracellular parasite. *Mol. Microbiol.* **3:1833-1841.**
- Forst, S. and Inouye, M. (1988) Environmentally regulated gene expression for membrane proteins in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **4:21-42.**
- Forst, S., Delgado, J. and Inouye, M. (1989). DNA-binding properties of the transcription activator (OmpR) for the upstream sequences of the *ompF* in *Escherichia coli* are altered by *envZ* mutations and medium osmolarity. *J. Bacteriol.* **171:2949-2955.**
- Fourel, D., Hikita, C., Bolla, J.M., Mizushima, S. and Pages, J.M. (1990). Characterization of *ompF* domains involved in *Escherichia coli* K-12 sensitivity to colicins A and N. *J. Bacteriol.* **172:3675-3680.**
- Gaby, J., Benson, S.A. and Schwartz, M. (1983). Genetic mapping of antigenic determinants in a membrane protein. *J. Biol. Chem.* **258:2410-2414.**
- Galán, J. and Curtiss, R.III. (1990) Expression of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. *Infect. Immun.* **58:1879-1885.**
- González, R., Sánchez, J. and Arias, C. (1991). Comunicación personal.
- Graeme-Cook, K.A., May, G., Bremer, E. and Higgins, C.F. (1989). Osmotic regulation of porin expression: a role for DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* **3:1287-1294.**
- Gross, R., Aricò, B. and Rappuoli, R. (1989) Families of bacterial signal-transducing proteins. *Mol. Microbiol.* **3:1661-1667.**
- Hall, M.N. and Silhavy, T.J. (1981a). The *ompB* locus and the regulation of the major outer membrane protein porin proteins of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* **146:23-43.**

- Hall, M.N. and Silhavy, T.J. (1981b). Genetic analysis of the *ompB* locus in *Escherichia coli* K-12. **J. Mol. Biol.** *151:1-15.*
- Hikita, C., Satake, Y., Yamada, H., Mizuno, T. and Mizushima, S. (1989). Structural and functional characterization of the OmpF and OmpC porins of the *Escherichia coli* outer membrane: studies involving chimeric proteins. **Res. Microbiol.** *140:177-190*
- Hsu, H.S. (1989) Pathogenesis and immunity in murine salmonellosis. **Microbiol. Rev.** *53:390-409.*
- Igo, M.M., Ninfa, A.J. and Silhavy, T.J. (1989a). A bacterial environmental sensor that functions as a protein kinase and stimulates transcriptional activation. **Genes Dev.** *3:598-605.*
- Igo, M.M., Ninfa, A.J., Stock, J.B. and Silhavy, T.J. (1989b). Phosphorylation and dephosphorylation of a bacterial activator by a transmembrane receptor. **Genes Dev.** *3:1725-1734.*
- Isibasi A., Ortíz, V., Vargas, M., Paniagua, J., González, C., Moreno, J. and Kumate, J. (1988) Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins from *Salmonella typhi* 9, 12, d, Vi. **Infect. Immun.** *56:2953-2959.*
- Jacob, C.O., Leitner, M., Zamir, A., Salomon, D. and Arnon, R. (1985). Priming immunization against cholera toxin and *E. coli* heat-labile toxin by a cholera toxin short peptide- $\beta$ -galactosidase hybrid synthesized in *E. coli*. **EMBO J.** *4:3339-*
- Jo, Y.L., Mara, F., Ichihara, S., Mizuno, T. and Mizushima, S. (1986). Purification and characterization of the OmpR protein, a positive regulator involved in osmoregulatory expression of the *ompF* and *ompC* genes in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** *261:15252-15256.*
- Johnson, K.S., Harrison, G.B.L., Lightowers, M.W., O'Hoy, K.L., Cogle, W.G., Dempster, R.P., Lawrence, S.B., Vinton, J.G., Heath, D.D. and Richard, M.D. (1989). Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. **Nature** *338:585*
- Kanamuro, K., Aiba, H., Mizushima, S. and Mizuno, T. (1989). Signal transduction and osmoregulation in *Escherichia coli*. A single amino acid change in the protein kinase, EnvZ, results in loss of its phosphorylation and dephosphorylation abilities with respect to the activator protein, OmpR. **J. Biol. Chem.** *264:21633-21637.*
- Kanamuro, K., Aiba, H. and Mizuno, T. (1990). Transmembrane signal transduction and osmoregulation in *Escherichia coli*: Analysis by site-directed mutagenesis of the amino acid residues involved in phosphotransfer between the two regulatory components, OmpR and EnvZ. **J. Biochem. Tokyo** *108:483-487.*
- Kawaji, H., Mizuno, T., and Mizushima, S. (1979) Influence of molecular size and osmolarity of sugars and dextrans on the synthesis of outer membrane proteins O-8 and O-9 of *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.** *140: 843-847.*
- Kauffman, S.H.E. (1983) Effective antibacterial protection induced by a *Lysteria monocytogenes*-specific T cell clone and its lymphokines. **Infect. Immun.** *39:1265-1270.*
- Kauffman, S.H.E. (1988) CD8+ T lymphocytes in intracellular microbial infections. **Immunol. Today** *9:168-174.*
- Killar, L.M. and Eisenstein, T.K. (1986) Delayed-type hypersensitivity and immunity to *Salmonella typhimurium*. **Infect. Immun.** *52:504-508.*



- Klebba, P.E., Benson, S.A., Bala, S., Abdullah, T., Reid, J., Singh, S. P. and Nikaido, H. et al. (1990) Determinants of OmpF porin antigenicity and structure. *J. Biol. Chem.* **265**: 6800-6810.
- Leclerc, C., Martineau, P., van der Werf, S., Deriaud, E., Duplay, P. and Hofnung, M. (1990). Induction of virus -neutralizing antibodies by bacteria expressing de C3 polivirus epitope in the periplasm. *J. Immunol.* **144**:3174-3182.
- Liljestrom, P., Laamanen, I. and Palva, E.T. (1988). Structure and expression of the *ompB* operon, the regulatory locus for the outer membrane porin regulon in *Salmonella typhimurium* LT-2. *J. Mol. Biol.* **201**:663-673.
- Lowenadler, B., Nilsson, B., Abrahmsén, L., Moks, T., Ljungqvist, L., Holmgren, E., Paleus, S., Josephson, S., Philpson, L. and Uhlén, M. (1986). Production of specific antibodies against protein A fusion proteins. *EMBO J.* **5**:2393.
- Lundrigan, M.D. and Earhart, C.F. (1984). Gene *envY* of *Escherichia coli* K-12 affects thermoregulation of major porin expression. *J. Bacteriol.* **157**:262-268.
- Maeda, S., Ozawa, Y., Mizuno, T. and Mizushima, S. (1988). Stereospecific positioning of the *cis*-acting sequence with respect to the canonical promoter is required for activation of the *ompC* gene by a positive regulator, OmpR, in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **202**:433-441.
- Maeda, S. and Mizuno, T. (1988). Activation of the *ompC* gene by the OmpR protein in *Escherichia coli*: The *cis*-acting upstream sequence can function in both orientations with respect to the canonical promoter. *J. Biol. Chem.* **263**:14629-14633.
- Maeda, S. and Mizuno, T. (1990). Evidence for multiple OmpR-binding sites in the upstream activation sequence of the *ompC* promoter in *Escherichia coli*: a single OmpR binding site is capable of activating the promoter. *J. Bacteriol.* **172**:501-503.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Margalit, H., Spouge, J.L., Cornette, J.L., Cease, K.B., DeLisi, C. and Berzofsky, J.A. (1987) Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence. *J. Immunol.* **138**:2213-2229.
- Matsui, K. and Arai, T. (1989) Protective immunity induced by porin in experimental mouse salmonellosis. *Microbiol. Immunol.* **33**:699-708
- Matsuyama, S.-I., Inokuchi, K. and Mizushima, S. (1984). Promoter exchange between *ompF* and *ompC*, genes for osmoregulated major outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **158**:1041-1047.
- Messing, J. (1983). M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* **100**:20-78.
- Miller, S.I., Kukral, A.M. and Mekalanos, J.J. (1989) A two-component regulatory system (*phoP/phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:5054-5058.
- Misra, R. and Benson, S.A. (1988a) Isolation and Characterization of OmpC porin mutants with altered pore properties. *J. Bacteriol.* **170**:528-533.
- Misra, R. and Benson, S.A. (1988b) Genetic identification of the pore domain of the OmpC porin of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **170**:3611-3617.
- Mizuno, T., Chou, M.Y. and Inouye, M. (1983) A comparative study on the genes for three porins of the *Escherichia coli* outer membrane. *J. Biol. Chem.* **258**:6932-6940.



- Mizuno, T., Kasai, H. and Mizushima, S. (1987). Construction of a series of *ompC-ompF* chimeric genes by in vivo homologous recombination in *Escherichia coli* and characterization of the translational products. *Mol. Gen. Genet.* **207:217-223**.
- Mizuno, T., Kato, M., Jo, Y.L. and Mizushima, S. (1988). Interaction of OmpR, a positive regulator, with the osmoregulated *ompC* and *ompF* genes of *Escherichia coli*. Studies with wild type and mutant OmpR proteins. *J. Biol. Chem.* **263:1008-1012**.
- Mizuno, T., Shinkai, A., Matsui, K. and Mizushima, S. (1990). Osmoregulatory expression of porin genes in *Escherichia coli*: a comparative study on starins B and K-12. *FEMS. Microbiol. Lett.* **56:289-293**.
- Mizuno, T. and Mizushima, S. (1990). Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. *Mol. Microbiol.* **4:1077-1082**.
- Molla, A., Charbit, A., Le Guern, A., Ryter, A. and Hofnung, M. (1989). Antibodies against synthetic peptides and the topology of LamB, an outer membrane protein from *Escherichia coli* K12. *Biochem.* **28:8234-8241**.
- Nakae, T. (1986) Outer membrane permeability of bacteria. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **13:1-62**.
- Ni Bhriain, N., Dorman, C.J. and Higgins, C.F. (1989) An overlap between osmotic and anaerobic stress responses: a potential role for DNA supercoiling in the coordinate regulation of gene expression. *Mol. Microbiol.* **3:933-942**.
- Nikaido, H., Vaara, M. (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49: 1-32**.
- Nogami, T., Mizuno, T. and Mizushima, S. (1985) Construction of a series of *ompF-ompC* chimeric genes by in vivo homologous recombination in *Escherichia coli* and characterization of the translational products. *J. Bacteriol.* **164:797-801**.
- Norioka, S., Ramakrishnan, G., Ikenaka, K. and Inouye, M. (1986). Interaction of a transcriptional activator OmpR, with reciprocally osmoregulated genes, *ompF* and *ompC*, of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **261:17113-17119**.
- North, R.J. (1974) T cell dependence of macrophage activation and mobilization during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **10:66-71**.
- Ozawa, Y., Mizushima, S. and Mizuno, T. (1990). Osmoregulatory expression of the *ompC* gene in *Escherichia coli* K-12; IS1 insertion in the upstream regulatory region results in constitutive activation of the promoter. *FEMS Microbiol. Lett.* **56:295-299**.
- Phalipon, A., Crainic, R. and Kaczorek, M. (1989). Expression of a poliovirus type 1 neutralization epitope on a diphtheria toxin fusion protein. *Vaccine* **7:132-**
- Paul, C. and Rosenbusch, J.P. (1985) Folding patterns of porin and bacteriorhodopsin. *EMBO J.* **4:1593-1597**.
- Puente, J.L. (1987) Aislamiento de los genes *phoE* y *gltB* de *Salmonella typhi*. Tesis de licenciatura, Fac. de Ciencias, UNAM.
- Puente, J.L., Flores, V., Fernández, M., Fuchs, Y. and Calva, E. (1987) Isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. *Gene* **61:75-83**.
- Puente, J.L., Alvarez-Scherer, V., Gosset, G. and Calva, E. (1989) Comparative analysis of the *Salmonella typhi* and *Escherichia coli ompC* genes. *Gene* **83:197-206**.

- Puente, J.L., Verdugo-Rodríguez, A. and Calva, E. (1991) Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* OmpC is influenced differently by medium osmolarity; dependence on *Escherichia coli* OmpR. *Mol. Microbiol.* **5:1205-1210.**
- Rampersaud, A., Norioka, S. and Inouye, M. (1989). Characterization of OmpR binding sequences in the upstream region of the *ompF* promoter essential for transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* **264:18693-18700.**
- Rothbard, J.B. and Taylor, W.R. (1988) A sequence pattern common to T cell epitopes. *EMBO J.* **7:93-100.**
- Sánchez, J. and Holmgren, J. (1989) Recombinant system for overexpression of cholera toxin B-subunit as a basis for vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86:481-485.**
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74:5463-5467.**
- Schenkman, S., Tsugita, A., Schwartz, M. and Rosenbusch, J.P. (1984). Topology of phage lambda receptor protein: mapping targets of proteolytic cleavage in relation to the binding sites for phage or monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* **259:7570-7576.**
- Scott, N. and Harwood, C. (1980). Studies on the influence of the cyclic AMP system on major outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol. Lett.* **9:95-98.**
- Sette, A., Buus, S., Appella, E., Smith, J.A., Chesnut, C., Miles, S., Colon, S.M. and Grey, H.M. (1989) Prediction of major histocompatibility complex binding regions of protein antigens by sequence pattern analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86:3296-3300.**
- Slauch, J.M., Garret, S., Jackson, D.E. and Silhavy, T.J. (1988). EnvZ functions through OmpR to control porin gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **170:439-441.**
- Slauch, J.M. and Silhavy, T.J. (1989). Genetic analysis of the switch that controls porin gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* **210:281-292.**
- Stock, J.B., Ninfa, A.J. and Stock, A.M. (1989). Protein phosphorylation and regulation of adaptative response in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53:450-490.**
- Su, T-Z. and El-Gewely, M.R. (1988). A multisite-directed mutagenesis using T7 DNA polymerase: application for reconstructing a mamalian gene. *Gene* **69:81-89.**
- Tabor, S. and Richardson, C.C. (1987). DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84:4767-4771.**
- Taniguchi, K., Maloy, W.L., Nishikawa, K., Green, K.Y., Hoshino, Y., Urasawa, S., Kapikian, A.Z., Chanock, R.M. and Gorziglia, M. (1988) Identification of cross-reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus. *J. Virol.* **62:2421-2426.**
- Tate, S.-i., Kato, M., Nishimura, Y., Arata, Y. and Mizuno, T. (1988). Location of DNA-binding segment of a positive regulator, OmpR, involved in activation of the *ompC* and *ompF* genes of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **242:27-30.**
- Tommassen, J., van de Lay, P., van Zeiji, M. and Agterberg, M. (1985) Localization of functional domains in *E. coli* K-12 outer membrane porins. *EMBO J.* **4:1583-1587.**

- Tokishita, S-i., Kojima, A., Aiba, H. and Mizuno, T. (1991). Transmembrane signal transduction and osmoregulation in *Escherichia coli*. Functional importance of the periplasmic domain of the membrane-located protein kinase, EnvZ. **J. Biol. Chem.** **266:6780-6785.**
- Tsung, K., Brissette, R.E. and Inouye, M. (1990). Enhancement of RNA polymerase binding to promoters by a transcriptional activator, OmpR, in *Escherichia coli*: Its positive and negative effects on transcription. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **87:5940-5944.**
- Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V.R. (1987a) Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. **Infect. Immun.** **55:816-821.**
- Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V.R. (1987b) An outer membrane protein (porin) as an eliciting antigen for delayed-type hypersensitivity in murine salmonellosis. **Infect. Immun.** **55:822-824.**
- Vajda, S., Kataoka, R., DeLisi, C., Margalit, H., Berzofsky, J.A. and Cornette, J.L. (1990) Molecular structure and vaccine design. **Annu. Rev. Biophys. Chem.** **19:69-82**
- van der Ley, P., Struyvé, M. and Tommassen, J. (1986) Topology of K-12 outer membrane pore protein of *Escherichia coli*. **Mol. Gen. Genet.** **209:585-591.**
- van der Ley, P., Brum, P., Agterberg, M., van Meersbergen, J. and Tommassen, J. (1987) Analysis of structure-function relationships in *Escherichia coli* K-12 outer membrane porins with the aid of *ompC-phoE* and *phoE-ompC* hybrid genes. **Mol. Gen. Genet.** **209:585-591.**
- van der Warf, S., Charbit, A., Leclerc, C., Mimic, V., Ronco, J. Girard, M. and Hofnung, M. (1990). Critical role of the neighbouring sequences on the immunogenicity of the C3 poliovirus neutralization epitope expressed at the surface of recombinant bacteria. **Vaccine** **8:269-277.**
- Verdugo-Rodríguez, A., Sierra, J., Ruíz-Palacios, G.M. and Calva, E. (1989) Early diagnosis of typhoid fever (TF) by detection of specific serum antibodies to *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. Abstr. Annu. Meet. ASM C-139.
- Vogel, H. and Jahnig, F. (1986) Models for the structure of outer-membrane proteins of *Escherichia coli* derived from Raman spectroscopy and prediction methods. **J. Mol. Biol.** **190: 191-199.**
- Vordermeier, H.M., Hoffmann, P., Gombert, F.O., Jung, G. and Bessler, W.G. (1990). Synthetic peptide segments from the *Escherichia coli* porin OmpF constitute leukocyte activators. **Infect. Immun.** **58:2719-2724.**
- Wei, Y-G. and Surzycki, J.S. (1986). Screening recombinant clones containing sequences homologous to *Escherichia coli* genes using single-stranded bacteriophage vector. **Gene** **48:251-256.**
- Wu, J.Y., Newton, S., Judd, A., Stocker, B.A.D. and Robinson, W.S. (1989). Expression as immunogenic epitopes of hepatitis B surface antigen with hybrid flagellin proteins by a vaccine strain of *Salmonella*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **86:4726-4730.**
- Yanish-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. **Gene** **33:103-119.**

**ANEXO 1**

## Comparative analysis of the *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* ompC genes

(Recombinant DNA; amino acid and nucleotide sequence analysis; oligodeoxyribonucleotide hybridization; typhoid fever)

José Luis Puente, Verónica Alvarez-Scherer, Guillermo Gosset and Edmundo Calva

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

Received by F. Bolívar: 14 March 1989

Revised: 24 March 1989

Accepted: 1 June 1989

---

### SUMMARY

The nucleotide (nt) sequence of the gene encoding the *Salmonella typhi* OmpC outer membrane protein, and its deduced amino acid (aa) sequence are presented here. The *S. typhi* ompC gene consists of an open reading frame of 1134 nt, corresponding to a protein of 378 aa; with a 21-aa signal peptide. This protein is 11 aa longer than *Escherichia coli* OmpC, but it has an identical leader peptide. The mature OmpC sequence shows 79% similarity for both bacteria at the aa level, and 77% similarity at the nt level. Seven main variable regions in the OmpC protein were identified. Five of them correspond to hydrophilic regions and contain aa observed most frequently in turn configurations in soluble proteins. This suggests that these aa stretches could be located on the exterior of the outer membrane. To probe into the genus and species specificity of the main variable regions, we have constructed complementary oligodeoxyribonucleotides. The use of one of them with a small number of DNA samples is illustrated here; no restriction fragment length polymorphism or nt sequence heterogeneity could be found between *S. typhi* and *Salmonella typhimurium*.

---

### INTRODUCTION

The *E. coli* outer membrane proteins OmpC, OmpF and PhoE, have been well characterized. They are preferentially synthesized at high-osmo-

larity, low-osmolarity, and low-phosphate laboratory conditions, respectively. They form trimeric structures that constitute pore channels (Nikaido and Vaara, 1985). Their respective genes have been isolated and sequenced. Both at the aa and nt

---

Correspondence to: Dr. E. Calva, CEIINGEBI/UNAM, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62271 (México)  
Tel. (52)(73) 17-2799; Fax (52)(73) 17-2388.

Abbreviations: aa, amino acid(s); bp, base pair(s); kb, kilobase(s) or 1000 bp; NET, 0.15 M NaCl/1 mM EDTA/15 mM Tris·HCl pH 7.5; nt, nucleotide(s); oligo, oligodeoxyribonucle-

otide; OmpC, outer membrane protein C (porin); ompC, gene encoding OmpC; ORF, open reading frame; RFLP, restriction fragment length polymorphism; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, 0.15 M NaCl/0.015 M Na<sub>3</sub> citrate pH 7.6; TBE, Tris-borate-EDTA electrophoresis buffer (see MATERIALS AND METHODS, section d); tRNA, transfer RNA.

sequence levels, these three proteins and their genes share an approximate 60% similarity (Mizuno et al., 1983).

We have previously reported the isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *S. typhi*, the causal agent of typhoid fever (Puente et al., 1987). Interest in outer membrane proteins is partly because of their potential role as immunogens in diagnostic assays and vaccination (Kuusi et al., 1981; Calderón et al., 1986; Udhayakumar and Muthukkaruppan, 1987a,b; Isibasi et al., 1988). We have a special interest in the *S. typhi* outer membrane protein, OmpC, because it is synthesized and incorporated into the bacterial envelope both at low- and high-osmolarity laboratory conditions (Puente et al., 1987). This result suggests that OmpC might be present on the outer membrane not only under free-living conditions, but also during infection, since osmolarity of human serum is equivalent to the high standards maintained in the laboratory (Nikaido and Vaara, 1985). If indeed this is the case, OmpC appears as a candidate antigen for diagnostics and vaccination.

We have reported that the *S. typhi ompC*-like gene is present in all of 17 different clinical isolates that we tested, showing no RFLP with restriction endonuclease *Bgl*II. In addition, it hybridized with *E. coli ompC* only under nonstringent conditions, which indicates that these genes must be similar, yet differ in some regions (Puente et al., 1987). Our interest is to characterize genus- and species-specific nt and aa sequences by comparative analysis with data from other enterobacteria. To probe into the structure and variability of the *S. typhi ompC*-like gene, we determined its nt sequence, which is reported here. Moreover, we show the comparison of this nt sequence with that of the *E. coli ompC* gene, as well as the comparison between the deduced OmpC protein aa sequences (Mizuno et al., 1983).

We have previously proposed the use of specific oligos to study the variability of OmpC and its gene (Calva et al., 1988). An example of this approach on a small number of different clinical isolates is illustrated here.

## MATERIALS AND METHODS

### (a) Strains and plasmids

The following *S. typhi* (serotype 9, 12, d, Vi) strains were used. IMSS-1, a Mexican reference strain kindly provided by Dr. Jesús Kumate and co-workers from the Instituto Mexicano del Seguro Social (Mexico City, Mexico), isolated from a patient with typhoid fever (Isibasi et al., 1988). Several clinical isolates from the MK series, kindly provided by Dr. Guillermo Ruíz-Palacios and co-workers from the Instituto Nacional de la Nutrición (Mexico City, Mexico), isolated from patients with typhoid fever presenting a variety of clinical symptoms (Puente et al., 1987; Fernández et al., 1988). Reference strain Ty2, obtained from the American Type Culture Collection (No. 19430).

*S. typhimurium* reference strain CDC6516-60 was from the American Type Culture Collection (No. 14028). *E. coli* JM101 was described by Messing et al. (1981); *E. coli* Q359 was described by Karn et al. (1980).

Plasmid pVF27 (Puente et al., 1987) contains the *S. typhi ompC*-like gene in a 3-kb *Bgl*II fragment cloned in pBR322 (Bolívar et al., 1977).

### (b) DNA sequencing

Several restriction fragments from plasmid pVF27 were cloned into vectors M13mp18 and M13mp19. Dideoxy chain-termination reactions were carried out according to the method reported by Messing et al. (1981), using a commercially available kit (Sequenase; USB, Cleveland, OH).

### (c) Nucleotide and amino acid sequence analysis

Nucleotide sequence analysis was done using standard Pascal programs for an Apple II computer, described by Fristensky et al. (1982) and De Banzie et al. (1984). Hydrophilicity and hydrophobicity profiles of the aa sequence were done as reported by Hopp and Woods (1981), using a window size of 7 aa.

### (d) Oligo synthesis, purification and hybridization

The oligo used in this study was synthesized on a solid support using automated phosphoramidite

chemistry (Nielsen et al., 1986). It was purified by preparative gel electrophoresis,  $^{32}\text{P}$ -labelled at the 5' end with polynucleotide kinase and  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  to a specific activity of  $10^8\text{--}10^9$  cpm/ $\mu\text{g}$ , and separated from unincorporated substrate with Sephadex G-50, following standard procedures (Matthes et al., 1984; Maniatis et al., 1982).

Bacterial DNA was isolated according to the procedure reported by Bellach et al. (1976). It was digested for 18 h at  $37^\circ\text{C}$  with 5 units of *EcoRV* per  $\mu\text{g}$  (Promega Biotec, Madison, WI). The resulting fragments were separated by electrophoresis at 80 V for 8 h through 6-mm thick, 20-cm long, 15-cm wide, 1% agarose slab gels in TBE buffer (89 mM Tris-borate/89 mM boric acid/0.2 mM EDTA pH 8). Southern blots were prepared by transferring the fragments to nitrocellulose membranes following established procedures (Maniatis et al., 1982).

The Southern blots of *S. typhi* total DNA were hybridized with  $0.5\text{--}1 \times 10^6$  cpm per lane of radio-labelled oligo at  $65^\circ\text{C}$  for 20 h, in  $6 \times \text{NET}$ ,  $5 \times \text{Denhardt's}$  solution (0.1% each of Ficoll, polyvinylpyrrolidone, and bovine serum albumin), 0.5% SDS, and 10% dextran sulfate. Pre-hybridization of the Southern blots was for 3 h at  $65^\circ\text{C}$  in the same solution plus 0.1 mg/ml calf thymus DNA, in the absence of radioactive probe. Post-hybridization washes were done twice in  $2 \times \text{SSC}$ , for 5 min at  $42^\circ\text{C}$ . The blots were subjected to autoradiography at  $-70^\circ\text{C}$  for two to seven days, using Kodak X-Omat K film and enhancing screens.

## RESULTS AND DISCUSSION

### (a) The coding region

The *S. typhi ompC*-like gene, from now on referred to as *ompC*, was sequenced following the strategy shown in Fig. 1. The nt and the deduced aa sequences of *ompC* are shown in Fig. 2. Numbering adopted for the *S. typhi* nt and aa residues is according to Figs. 2 and 4 of this study; the numbering in *E. coli* is according to Mizuno et al. (1983).

The sequenced *MspI-AsuII* DNA fragment contains a single ORF, the *ompC* gene, of 1134 nt corresponding to a protein (OmpC) of 378 aa. These results are consistent with our deletion mapping data presented before (Puente et al., 1987). The *E. coli* OmpC coding region is slightly smaller, containing 1101 nt, which correspond to 367 aa (Mizuno et al., 1983). The nt and aa numbering systems presented here are based on *S. typhi ompC*.

At the nt level, the leader region (starting at nt + 1) is 92% similar in both bacteria. The nt sequence corresponding to mature OmpC shows a 77% similarity with its *E. coli* counterpart (Fig. 2). There are different types of nonsimilarities at the nt level. There are 86 single nt changes that result in a conserved aa; whereas 17 such changes result in a different aa. There are 2-nt discrepancies in 28 codons, thus resulting in as many aa differences. Discrepancies of 3 nt are found in 14 codons; 13 of them result in a different aa.

There are also differences in the nt sequences that are the result of either deletions or insertions. In comparison with the *E. coli* gene, *S. typhi ompC* lacks six codons between nt 543 and 544, and has an

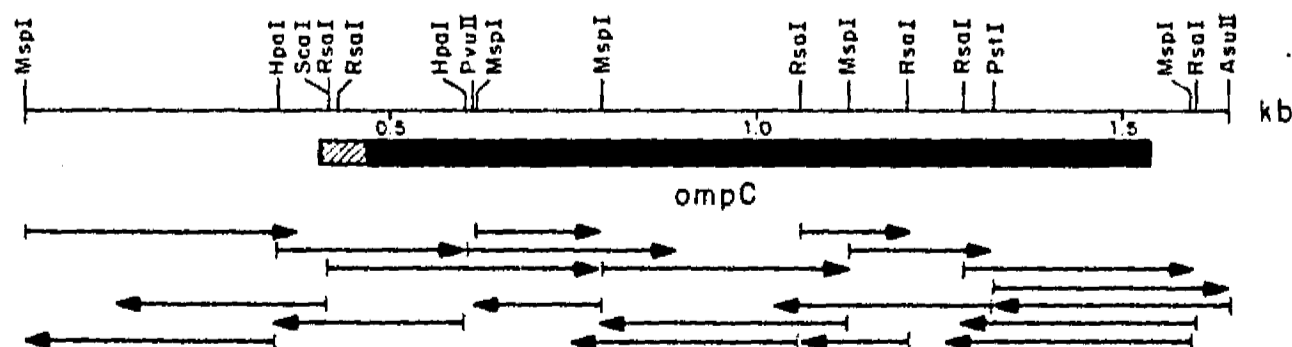


Fig. 1. Sequencing strategy of the *S. typhi ompC* gene. A restriction map is shown of the 1.6-kb *MspI-AsuII* fragment from plasmid pVF27 (Puente et al., 1987), used for subcloning into M13mp18 or M13mp19 phage vectors. The arrows represent the direction and extent of each sequencing reaction. The blackened portion of the bar indicates the location of the entire coding region for OmpC; the hatched portion of the bar corresponds to the putative leader peptide.



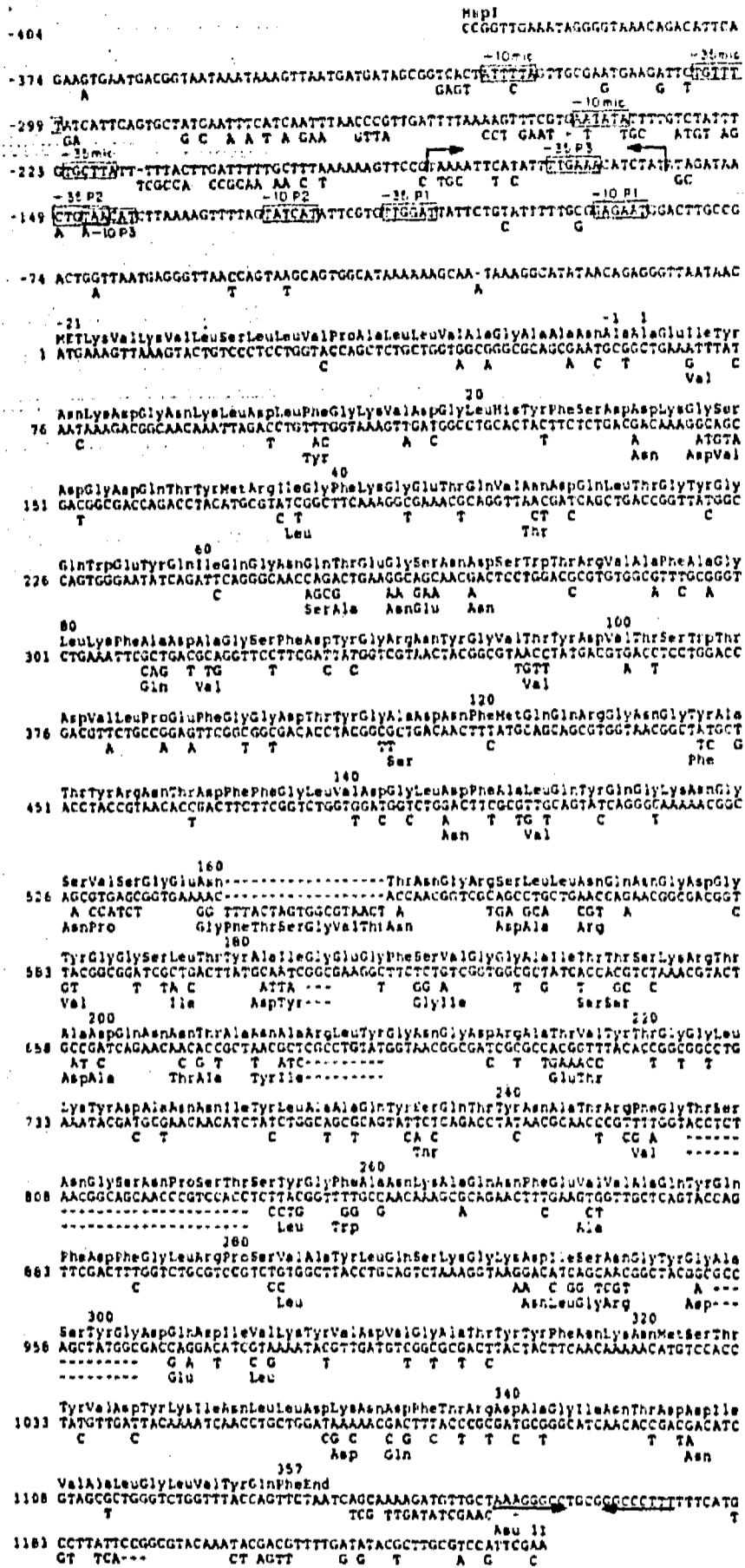


Fig. 2. Complete nt sequence of the *S. typhi* *ompC* gene. Nt 1 denotes the beginning of the ORF; nt 5' upstream are indicated by negative numbers. The deduced aa sequence for the OmpC protein is shown immediately above the nt sequence. The aa -21 to -1 correspond to the leader peptide, with aa 1 being the N terminus of the mature protein. Those nt and aa that differ in *E. coli* are shown below the nt sequence. Gaps, indicated by dashes, are included in both *S. typhi* and *E. coli* *ompC*, to obtain the best-fit comparison between both genes. At the 5' upstream region, *P1*, *P2*, and *P3* are tandem putative *ompC* promoters; boxes correspond to their respective -10 and -35 regions. The region between nt -158 and -183, bracketed by two bent arrows, corresponds to an OmpR-binding site. Two promoters for *micF* RNA are also boxed. At the 3' end of the gene, the inverted

additional one, three, nine, and four codons, at nt 610, 685, 802 and 955, respectively (Figs. 2 and 4).

(b) Predicted amino acid sequence and predicted secondary structure

The 357 aa of the deduced sequence of the *S. typhi* mature OmpC protein (calculated  $M_r$  of 39215), revealed a 79% (282/357) similarity with *E. coli* mature OmpC. The leader portion consists of 21 aa (starting at aa -21) and is identical in both microorganisms. In contrast, the leader aa sequences of *E. coli* OmpF and PhoE share 63% and 29% similarity, respectively, with that from OmpC (Mizuno et al., 1983).

The hydropathy profile of OmpC (Hopp and Woods, 1981) (Fig. 3) is similar in both bacteria.

In Fig. 4 we have boxed seven segments, a to g, that vary (are nonconserved) between *S. typhi* and *E. coli* OmpC. They range between 4 and 18 aa residues. With the exception of the boxes comprising aa 181-188 (box d) and 245-259 (box f), these variable regions have a highly hydrophilic profile and contain aa (Gly, Pro, Asn, Asp, Ser) that are observed most frequently in turn configurations in soluble proteins. Thus, they correspond to regions that might protrude on either side of the outer membrane layer, away from a hydrophobic transmembrane zone (Paul and Rosenbusch, 1985).

Interestingly, aa 331 to 349, which correspond to a highly variable segment between *E. coli* porins OmpF, OmpC, and PhoE (Mizuno et al., 1983), are conserved between *S. typhi* OmpC and *E. coli* OmpC. Whether this region participates in determining particular properties of OmpC, is unknown.

(c) The 5' and 3' end regions

The nt sequence of the 5' upstream region shows differences between *E. coli* and *S. typhi*. The 194 nt

repeats corresponding to a Rho-independent transcriptional terminator are depicted by two facing arrows, downstream from the End codon. The assignment of the leader sequence, the N terminus of the mature protein, the promoters, the OmpR-binding site, and the transcriptional terminator was done by comparing with *E. coli* *ompC* (Mizuno et al., 1983; Ikenaka et al., 1986; Andersen et al., 1987; Maeda et al., 1988). Whether these features are functionally equivalent in *S. typhi* remains to be elucidated.



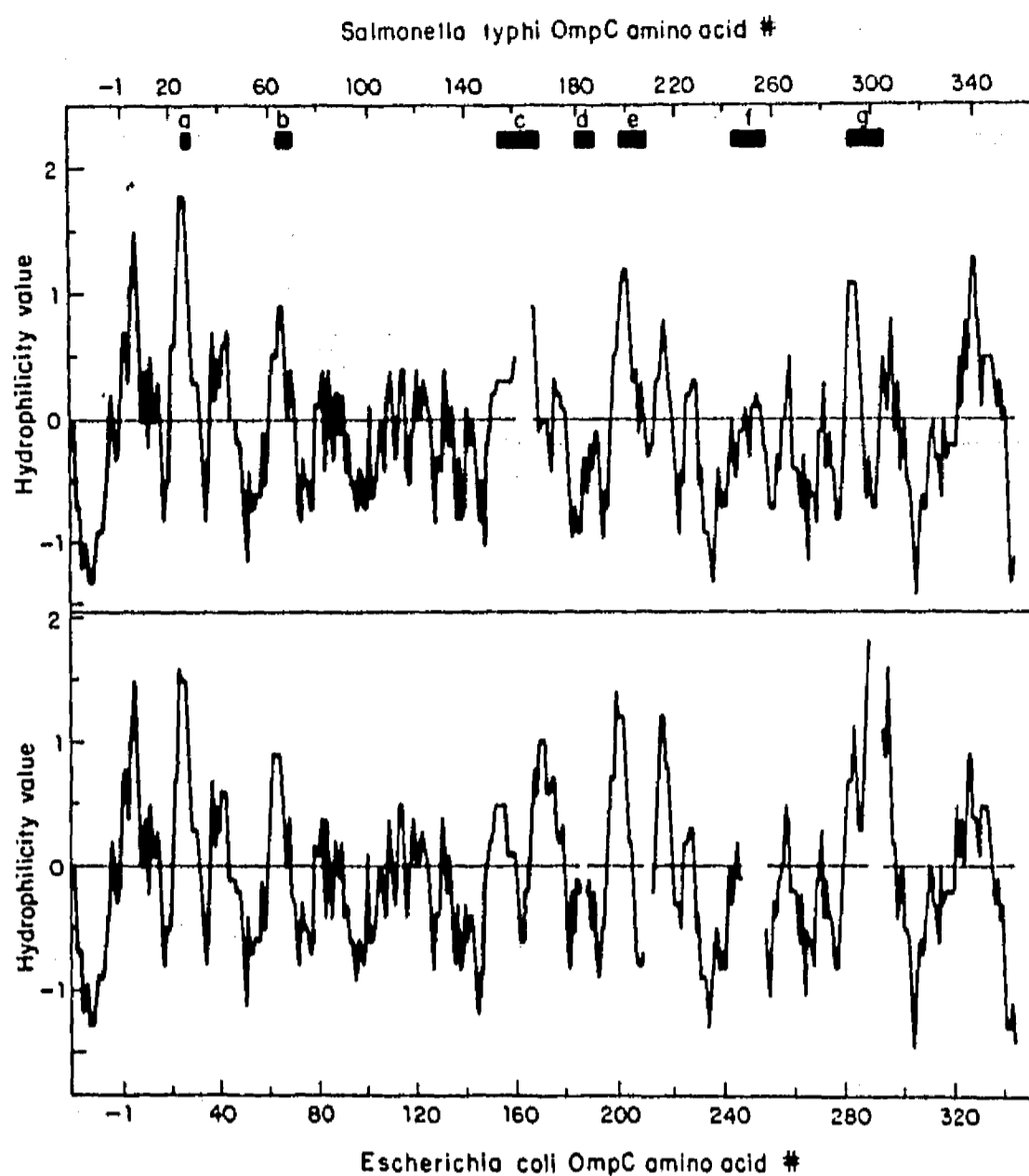


Fig. 3. Hydropathy profiles of the *S. typhi* and *E. coli* OmpC proteins. The heptapeptide profile was done according to Hopp and Woods (1981); the hydrophilicity values are plotted vs. position along the aa sequence. Numbering of aa is as described in Fig. 2 legend, i.e., the leader peptide is to the left of -1. Gaps in the curves are included for a best-fit alignment, as in Figs. 2 and 4. Blackened bars correspond to the seven variable regions boxed in Fig. 4.

at positions -1 to -194 (Fig. 2), upstream of the putative N-terminal ATG, share 91% similarity with the corresponding region in *E. coli*. These nt encompass three putative tandem promoters, equivalent to those described for the *E. coli ompC* regulatory region (Ikenaka et al., 1986); and part of the binding site for the *E. coli* OmpR transcriptional activator (Norioka et al., 1986; Maeda et al., 1988; Mizuno et al., 1988). Slight differences around the *P2* promoter -10 and -35 sequences are observed. In contrast, the next 139 nt, immediately upstream at positions -195 to -333, show only a 61% similarity with the equivalent *E. coli* region. They correspond to the region containing the promoters and 5' end coding portion of the *E. coli micF* RNA (Mizuno et al., 1984; Andersen et al., 1987). It remains to be seen if these differences have any relevance in gene expression.

The sequenced 3' end region, encompassing 99 bp downstream from the stop codon, shows a 64% similarity between both bacteria. A conserved portion corresponds to a possible *E. coli* Rho-independent transcriptional terminator (Mizuno et al., 1983). The nt +1156 to +1163 and +1168 to +1175 correspond to inverted repeats that could form a stem, with a loop comprised by nt +1164 to +1167 (Fig. 2). In between the stop codon and the putative terminator lies a nonconserved segment between *S. typhi* and *E. coli*.

#### (d) Codon usage and amino acid composition

Codon preference is very similar between *S. typhi* and *E. coli ompC* (Table I, A). This presumably reflects the availability of the corresponding tRNA molecules required for the synthesis of an abundant protein, such as OmpC (Ikemura, 1981).

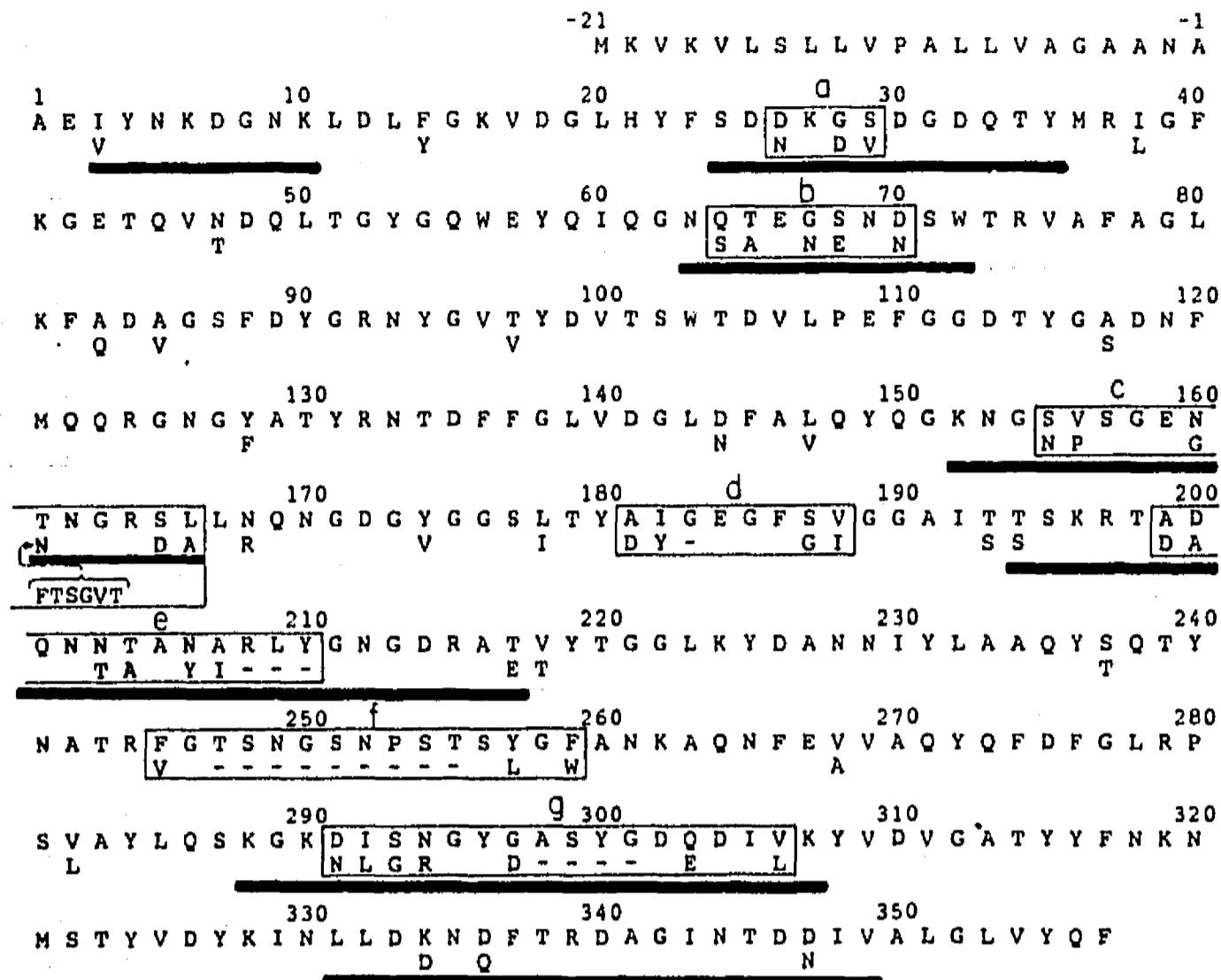


Fig. 4. Amino acid sequence of *S. typhi* OmpC. The conventional one-letter aa code is used. Numbering of aa is as described in Fig. 2 legend. The aa that differ in *E. coli* are marked below the sequence. Dashes, indicating gaps, and extra sequences are included in the *E. coli* protein to obtain the best-fit alignment. Boxes mark the seven regions, a to g, that vary between *S. typhi* and *E. coli*. The sequences with a high hydrophilic profile are underlined with blackened bars.

In addition, for most aa, codon preference in *S. typhi ompC* resembles more the *E. coli* than the *S. typhimurium* overall use of codons (Table I, A,B).

#### (e) Oligo hybridization analysis

A 20-mer oligo, 5'-GCGCCGTAGCCGTTGCTGAT-3', complementary to the nt sequence located between bp +937 and +956 of the coding region (aa +292 to +298), was synthesized (see MATERIALS AND METHODS, section d). This nt sequence is variable, or nonconserved (10 out of 20 bp), between *S. typhi* and *E. coli ompC*; and it codes for a putatively exposed OmpC region.

The oligo was radioactively labeled and incubated with Southern blots containing DNA from five *S. typhi*, one *S. typhimurium*, and one *E. coli* strain. As can be seen in Fig. 5, the oligo hybridized with the expected 2.1-kb *EcoRV* fragment from *S. typhi* IMSS-1. The same hybridizing band was observed in three *S. typhi* isolates (MK12, MK20, MK28), in

a reference strain (Ty2), and in one reference *S. typhimurium* strain (ATCC14028). No hybridization was seen with *E. coli* (Q359) DNA.

In this experiment, the intensity of the hybridizing bands was roughly proportional to the amount of *S. typhi* DNA present in each lane (Fig. 5). The intensity of the *S. typhimurium* band was less than expected for a perfect match, considering the amounts of DNA per lane. Therefore, the *Salmonella* strains used in this experiment appear to have a few, if any, bp mismatches in this region. No RFLP was apparent. This preliminary result requires further studies using a much larger number of clinical isolates from diverse geographical locations.

Control experiments (not shown) using 3 to 200 ng of either the 2.1-kb *EcoRV* fragment containing *S. typhi ompC* (Puente et al., 1987), or the 2.7-kb *HindIII* band comprising *E. coli ompC* (Mizuno et al., 1983), revealed hybridization of the oligo to the *S. typhi*, but not to the *E. coli* gene.

TABLE I

Codon usage and aa composition for *Salmonella typhi* OmpC<sup>a</sup>

Amino acid	Codon	A		B		C		Amino acid	Codon	A		B		C	
		St	Ec	Stm	Ec	St	Ec			St	Ec	Stm	Ec	St	Ec
Gly	GGG	0	0	*		50	48	Trp	TGG	3	4			3	4
	GGA	1	0	*				End	TGA	0	0			1	1
	GGT	18	29		*			Cys	TGT	0	0			0	0
	GGC	31	19	*					TGC	0	0				
Glu	GAG	2	0	*		8	11	End	TAG	0	0				
	GAA	7	11		*				TAA	1	1				
Asp	GAT	12	9	*		33	32	Tyr	TAT	14	5	*		31	29
	GAC	22	23		*				TAC	17	24				
Val	GTG	7	2			23	25	Leu	TTG	1	0				
	GTA	5	9		*				TTA	1	1				
	GTT	9	12		*			Phe	TTT	8	2	*		20	19
	GTC	2	2	*					TTC	12	17		*		
Ala	GCG	12	3	*		31	29	Ser	TCG	1	0			23	17
	GCA	5	8		*				TCA	0	0				
	GCT	9	18		*				TCT	8	6		*		
	GCC	4	0	*					TCC	6	8				
Arg	AGG	0	0					Arg	CGG	0	0	*		12	13
	AGA	0	0						CGA	0	0				
Ser	AGT	0	1						CGT	8	12		*		
	AGC	8	2						CGC	4	1				
Lys	AAG	2	0		*	18	17	Gln	CAG	20	20			21	21
	AAA	17	17		*				CAA	0	1				
Asn	AAT	2	0	*		32	32	His	CAT	0	0	*		1	1
	AAC	29	32		*				CAC	1	1				
Met Ile	ATG	4	4			4	4	Leu	CTG	23	24		*	26	27
	ATA	0	0			11	10		CTA	0	0				
	ATT	2	0	*					CTT	0	1				
	ATC	9	10		*				CTC	1	1				
Thr	ACG	4	0	*		27	24	Pro	CCG	3	1			4	4
	ACA	0	0						CCA	1	3				
	ACT	4	12		*				CCT	0	0				
	ACC	19	12	*					CCC	0	0	*			

<sup>a</sup> Column A, codon usage comparison for *S. typhi* (this study) and *E. coli* (Mizuno et al., 1983) *ompC*. Column B, overall codon preference for *S. typhimurium* and *E. coli*, based on the compiled average reported by Aota et al. (1988). Asterisks indicate the preferred codon(s). No asterisk: no clear preference. Column C, aa composition of OmpC of *S. typhi* (this study) and *E. coli* (Mizuno et al., 1983). Abbreviations: Ec, *E. coli*; St, *S. typhi*; Stm, *S. typhimurium*.

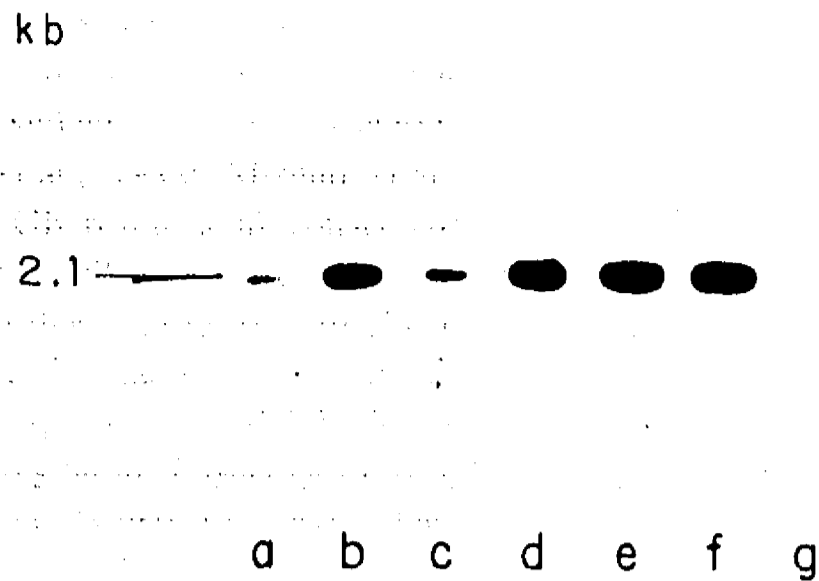


Fig. 5. Autoradiogram of Southern-blotted DNA. Lanes: a, *S. typhimurium* ATCC 14028, 5  $\mu$ g; b, *S. typhi* MK12, 4  $\mu$ g; c, MK20, 2  $\mu$ g; d, MK28, 5  $\mu$ g; e, Ty2, 5  $\mu$ g; f, IMSS-1, 5  $\mu$ g; g, *E. coli* Q359, 5  $\mu$ g; all are cut with *EcoRV* and hybridized against a radioactive 20-mer oligo, which is complementary to nt +937 to +956 (see Fig. 2) of the *S. typhi ompC* gene. This nt sequence encompasses one of the variable (or nonconserved) regions boxed in Fig. 4 (box g; aa +292 to +298). All experimental details are described in MATERIALS AND METHODS, section d.

#### (f) Conclusions

(1) We have identified seven variable, or non-conserved, regions between *S. typhi* and *E. coli* outer membrane protein OmpC (Figs. 2 and 4). Most of them, however, have retained a hydrophilic profile (Fig. 3; boxes a, b, c, e, g); and all contain aa that favour  $\alpha$ -helical turns in proteins (Paul and Rosenbusch, 1985). It is tempting, therefore, to presume that some of them might be surface-exposed. Interestingly, these regions correspond to segments that also vary between *E. coli* OmpC, OmpF, and PhoE (Mizuno et al., 1983).

(2) *E. coli* residues Arg (+37), Arg (+74), Asp (+105), and Arg (+124) have been proposed to be involved in pore function (Misra and Benson, 1988). In *S. typhi*, these residues are conserved at the same positions (in segments with a low hydrophilic value), consistent with the notion that the porin N-terminal third portion is involved in pore function (Misra and Benson, 1988; Benson et al., 1988). Amino acids encompassing the first third of the protein (aa +1 to +120) show 88% similarity.

(3) *E. coli* OmpC residues Gly (+62), Gly (+154), and Leu (+250), are thought to be part of bacteriophage receptors (Misra and Benson, 1988).

They lie within regions comprising aa +142 to +267, and +229 to +268, which have been suggested to determine specificity for OmpC bacteriophages (Tommasen et al., 1985; Mizuno et al., 1987). In *S. typhi* both Gly residues are conserved, but a Leu replaces Tyr +257.

(4) *E. coli* OmpC residues +155 to +169 have been implicated in the formation of an OmpC-specific structure (Tommasen et al., 1985). Nevertheless, the equivalent region in *S. typhi* lacks 6 aa, which otherwise would be located between residues +160 and +161 (Fig. 4). This observation suggests that such a specific structure is not shared by the two bacteria.

(5) A region that appears to code for a common OmpC-specific structure is that conformed by *S. typhi* aa residues +330 to +351; since they are highly conserved with respect to *E. coli* OmpC, but not with respect to OmpF nor PhoE (Mizuno et al., 1983).

(6) Zaror et al. (1988) isolated an *S. typhi* Ty2 gene encoding a 36-kDa porin. Venegas et al. (1988) reported the nt sequence of the corresponding ORF, which appears to be almost identical to the one shown here. Their sequence is different in several respects: it contains a codon for Gln instead of Leu at aa -16 in the leader sequence; it has a silent third-base nt substitution (A for T) at nt +788, resulting in the conservation of Ala +242; and lacks codon +341 (Ala). The fact that both nt sequences are very similar suggests a high degree of conservation in *ompC*. Whether the differences observed are relevant to gene evolution, should be a matter of future study.

(7) Further investigation should shed some light on the significance of the variable and conserved regions between OmpC proteins. One approach to this study is by hybridization with oligos that correspond to such variable regions, against Southern blots of different enterobacteria. Lack of hybridization would indicate sufficient mismatch in base pairing, reflecting divergence in a confined sequence. Furthermore, positive hybridization could reveal RFLP (Calva et al., 1988). The oligo hybridization experiment presented here (Fig. 5) suggests close similarity between *S. typhi* and *S. typhimurium ompC*, at a region that codes for a variable (non-conserved) portion between *S. typhi* and *E. coli* OmpC (aa +292 to +298). It remains to be seen if

such an approach will be useful in molecular epidemiology.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The oligo used in this study was synthesized at the Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología by Dr. Xavier Soberón and co-workers, whom we thank for these reagents and for their constant technical advice. This project was supported in part by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (PCSBNA-030735 and P219CCOL-880390); and from the United Nations Program for Latin American Biotechnology Development (UNESCO contract No. 249.824.7). We thank Drs. Xavier Soberón and Gloria Soberón for critically reviewing the type-script.

#### REFERENCES

- Andersen, J., Delihias, N., Ikenaka, K., Green, P.J., Pines, O., Ilercil, O. and Inouye, M.: The isolation and characterization of RNA coded by the *micF* gene in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 2089-2101.
- Aota, S.-i., Gojobori, T., Ishibashi, F., Maruyama, T. and Ikemura, T.: Codon usage tabulated from the GenBank Genetic Sequence Data. *Nucleic Acids Res.* 16 Suppl. (1988) r315-r400.
- Benson, S.A., Occi, J.L.L. and Sampson, B.A.: Mutations that alter the pore function of the OmpF porin of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* 203 (1988) 961-970.
- Betlach, M.C., Hershfield, 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.
- Bolívar, F., Rodríguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. and Falkow, S.: Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2 (1977) 95-113.
- 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 fever in humans. *Infect. Immun.* 52 (1986) 209-212.
- Calva, E., Puente, J.L. and Calva, J.J.: Research opportunities in typhoid fever: epidemiology and molecular biology. *Bio-Essays* 9 (1988) 173-177.
- De Banzie, J.S., Steeg, E.W. and Lis, J.T.: Update for users of the Cornell sequence analysis package. *Nucleic Acids Res.* 12 (1984) 619-625.
- Fernández, M., Sierra-Madero, J., de la Vega, H., Vázquez, M., López-Vidal, Y., Ruiz-Palacios, G.M. and Calva, E.: Molecular cloning of a *Salmonella typhi* LT-like enterotoxin gene. *Mol. Microbiol.* 6 (1988) 821-825.
- Fristensky, B., Lis, J.T. and Wu, R.: Portable microcomputer software for nucleotide sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 10 (1982) 6451-6463.
- Hopp, T.P. and Woods, K.R.: Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 3824-3828.
- Ikemura, T.: Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal of a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system. *J. Mol. Biol.* 151 (1981) 389-409.
- Ikenaka, K., Ramakrishnan, G., Inouye, M., Tsung, K. and Inouye M.: Regulation of the *ompC* gene of *Escherichia coli*. Involvement of three tandem promoters. *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 9316-9320.
- Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., González, C., Moreno, J. and Kumate, J.: Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins from *Salmonella typhi* 9, 12, d, Vi. *Infect. Immun.* 56 (1988) 2953-2959.
- Karn, J., Brenner, S., Barnett, L. and Cesareni, G.: Novel bacteriophage lambda cloning vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 5172-5176.
- Kuusi, N., Nurminen, M., Saxen, H. and Mäkela, P.H.: Immunization with major outer membrane protein (porin) preparations in experimental murine salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 34 (1981) 328-332.
- Maeda, S., Ozawa, Y., Mizuno, T. and Mizushima, S.: Stereospecific position of the *cis*-acting sequence with respect to the canonical promoter is required for activation of the *ompC* gene by a positive regulator, OmpR, in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 202 (1988) 433-441.
- Maniatis, T., Fritsch, E. 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.
- Matthes, H.W.D., Zenke, W.M., Grundström, T., Staub, A., Winzerith, M. and Chambon, P.: Simultaneous rapid chemical synthesis of over one hundred oligonucleotides on a microscale. *EMBO J.* 3 (1984) 801-805.
- Messing, J., Crea, R. and Seeburg, P.H.: A system for shotgun DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 309-321.
- Misra, R. and Benson, S.A.: Genetic identification of the pore domain of the OmpC porin of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 170 (1988) 3611-3617.
- 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.
- Mizuno, T., Chou, M.-Y. and Inouye, M.: A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a com-

- plementary RNA transcript (mic RNA). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 1966-1970.
- Mizuno, T., Kasai, H. and Mizushima, S.: Construction of a series of *ompC-ompF* chimeric genes by in vivo homologous recombination in *Escherichia coli* and characterization of their translational products. Mol. Gen. Genet. 207 (1987) 217-223.
- Mizuno, T., Kato, M., Jo, Y.-L. and Mizushima, S.: Interaction of OmpR, a positive regulator, with the osmoregulated *ompC* and *ompF* genes of *Escherichia coli*. Studies with wild-type and mutant OmpR proteins. J. Biol. Chem. 263 (1988) 1008-1012.
- Nielsen, J., Taagaard, M., Marugg, J.E., Van Boom, J.H. and Dahl, O.: Application of 2-cyanoethyl *N,N,N',N'*-tetraisopropyl-phosphorodiamidite for in situ preparation of deoxyribonucleoside phosphoramidites and their use in polymer-supported synthesis of oligodeoxyribonucleotides. Nucleic Acids Res. 14 (1986) 7391-7403.
- Nikaido, H. and Vaara, M.: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol. Rev. 49 (1985) 1-32.
- Norioka, S., Ramakrishnan, G., Ikenaka, K. and Inouye, M.: Interaction of a transcriptional activator, OmpR, with recip-

- roccally osmoregulated genes, *ompF* and *ompC*, of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 261 (1986) 17113-17119.
- Paul, C. and Rosenbusch, J.P.: Folding patterns of porin and bacteriorhodopsin. EMBO J. 4 (1985) 1593-1597.
- Puente, J.L., Flores, V., Fernández, M., Fuchs, Y. and Calva, E.: Isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. Gene 61 (1987) 75-83.
- Tommassen, J., Van der Ley, P., Van Zeijl, M. and Agterberg, M.: Localization of functional domains in *E. coli* K-12 outer membrane porins. EMBO J. 4 (1985) 1583-1587.
- 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.
- Venegas, A., Gómez, I., Zaror, I. and Yudelevich, A.: The nucleotide sequence of the *Salmonella typhi ompC* porin gene. Nucleic Acids Res. 16 (1988) 1721.
- Zaror, I., Gómez, I., Castillo, G., Yudelevich, A. and Venegas, A.: Molecular cloning and expression in *E. coli* of a *Salmonella typhi* porin gene. FEBS Lett. 299 (1988) 77-81.

**ANEXO 2**

Galley proofs received April 10; corrections sent back immediately

Molecular Microbiology (1991) 5(5), 000-000

ADONIS 0950382X91000000

## Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* OmpC influenced differently by medium osmolarity; dependence on *Escherichia coli* OmpR

is

J. L. Puente, A. Verdugo-Rodríguez and E. Calva\*  
Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y  
Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de  
México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos  
62271, México.

\*Max-Planck-Institut für Systemphysiologie, Rhein-  
landdamm 201, D-4600 Dortmund 1, Germany

### Summary

OmpC, a major outer-membrane protein, is highly expressed when *Salmonella typhi* is grown in nutrient broth (NB) of either low (NB + 0% sucrose) or high (NB + 20% sucrose) osmolarity. This contrasts with the expression of *Escherichia coli* OmpC, which is inhibited in low osmolarity and enhanced in high osmolarity, as has been described previously (van Alphen and Lugtenberg, 1977; Verhoef et al., 1979; Kawaji et al., 1979). Nevertheless, expression of *S. typhi* OmpC is dependent on the *E. coli* OmpR transcriptional activator. These findings suggest differences between the mechanisms of osmoregulation of gene expression in both bacteria, although common effects appear to be shared.

or

### Introduction

*Salmonella typhi* is the casual agent of typhoid fever (TF) in humans. It is estimated that more than 12 million human beings (excluding China) are affected annually by this disease. The case-fatality rate is 1% (Edelman and Levine, 1986). *S. typhi* is usually acquired by oral infection of contaminated food or beverages. The bacteria adhere to and penetrate the intestinal epithelium; they are then ingested by macrophages and transported to the reticuloendothelial system, where they multiply and propagate throughout the organism (Finlay and Falkow, 1989). The study of different aspects of TF, ranging from molecular biology to epidemiology, offers not only the opportunity of making an impact on health biotechnology, through the development of new vaccines and diagnostic methods,

but also of acquiring an insight into basic biological processes, such as the genetic expression of pathogenic determinants (Calva et al., 1988).

Outer-membrane protein (OMP) preparations have elicited active immunity in mice against *Salmonella typhimurium* and *S. typhi* (Udhayakumar and Muthukkaruppan, 1987a,b; Isibasi et al., 1988); and the presence of specific anti-OMP antibodies in the sera of patients might be of diagnostic value (Calderón et al., 1986; A. Verdugo-Rodríguez et al., unpublished). These observations have led us to study the molecular structure and function of *S. typhi* OMPs and of their respective genes. Thus, we have previously reported the isolation and characterization of the *ompC* gene which codes for OmpC, a major outer-membrane protein (Puente et al., 1987; 1989).

in press?  
yes?  
no

*Escherichia coli ompC* has been extensively studied by other authors, who have reported that it is expressed preferentially in media of high osmolarity and is repressed in low osmolarity. In contrast, *E. coli ompF* is highly expressed in low osmolarity and is repressed in high osmolarity (Forst and Inouye, 1988).

*ompC* and *ompF* code for *E. coli* porins OmpC and OmpF, respectively; there are approximately  $10^5$  porin molecules per cell, forming non-selective pores through which small hydrophilic molecules traverse the outer membrane. Even though the relative proportions of both proteins vary depending on growth conditions, the sum of their quantities tends to remain constant (Nikaido and Vaara, 1985). The synthesis of these porins is regulated by the products of the genes *envZ* and *ompR*. protein EnvZ acts as an osmosensor, transmitting information to the OmpR protein, which in turn acts as receptor of the information, regulating (activating) transcription of *ompC* or *ompF* (Gross et al., 1989).

≡

It has been observed recently that expression of *E. coli ompC* is repressed in low osmolarity only when the cultures are well aerated, i.e. it is strongly induced in anaerobiosis. Conversely, expression of *ompF* was relatively unaffected by low availability of oxygen. Anaerobic induction of *S. typhimurium* OmpC was similar to that observed for *E. coli ompC* (Ni Bhriain et al., 1989).

We have previously described the *S. typhi ompC* gene and found that it is 77% homologous to its *E. coli* counterpart at nucleotide level. The respective derived

the

Received 6 October, 1990; revised 27 December, 1990. \*For correspondence. Tel. (73) ; Fax (73)

138811

172388



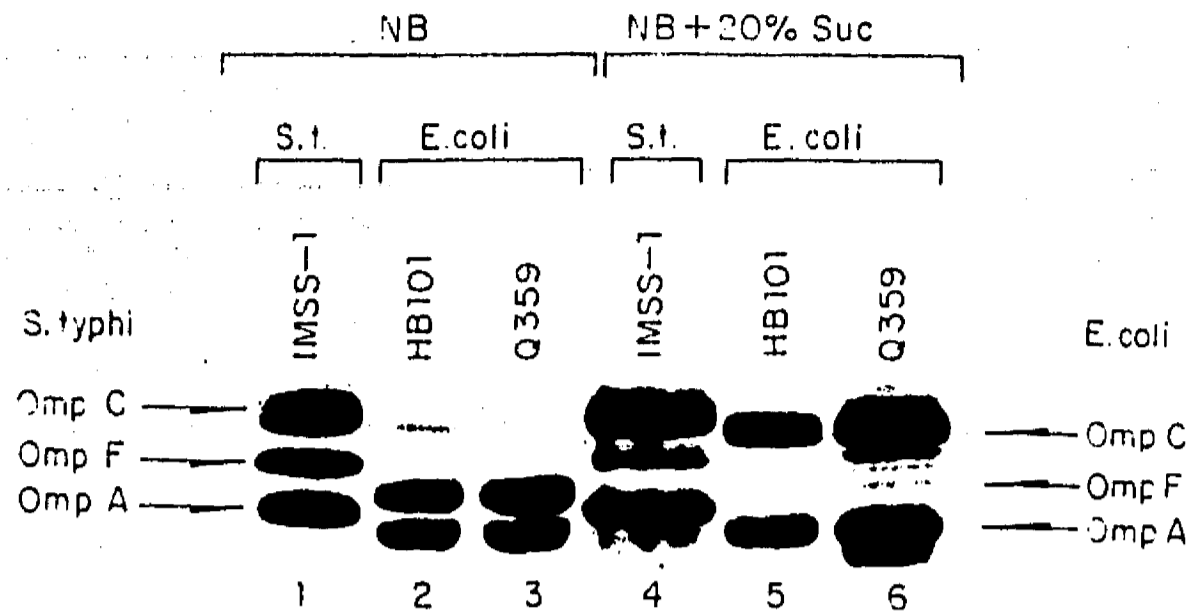


Fig. 1. Electrophoretic pattern of OMP preparations from *S. typhi* IMSS-1 (lanes 1 and 4), from *E. coli* HB101 (lanes 2 and 5), and from *E. coli* Q359 (lanes 3 and 6); grown in low osmolarity (NB; lanes 1-3) or high osmolarity (NB + 20% sucrose; lanes 4-6). The positions of the *S. typhi* and *E. coli* OMPs are shown in the left and right margins, respectively.

added text OK?  
YES

OmpC amino acid sequences are predicted to be 79% similar. The nucleotides at positions -1 to -194, upstream of the putative N-terminal ATG of *S. typhi* ompC, share 91% similarity with the corresponding region in *E. coli*. This region contains three putative promoters and part of a possible binding site for OmpR. In contrast, the region from nucleotides -195 to -333 shows only 61% similarity between both bacteria (Puente *et al.*, 1987; 1989). Here we report the expression of OmpC in *S. typhi* under low and high osmolarity conditions. We also observed the lack of expression of the *S. typhi* ompC gene in an *E. coli* strain mutated for the OmpR transcriptional activator.

**Results**

*Synthesis of S. typhi OmpC in low and high osmolarity*

During analysis of the electrophoretic patterns of outer-membrane protein (OMP) preparations, *S. typhi* OmpC, encoded by its corresponding gene cloned in *E. coli* plasmid pVF27, comigrated with an endogenous *S. typhi* OMP both in low (NB + 0% sucrose) and high osmolarity culture conditions (NB + 20% sucrose) (Puente *et al.*, 1987).

The expression of major OMPs from *S. typhi* reference strains IMSS-1 and Ty2, and from MK clinical isolates, was compared with that of *E. coli* HB101 and Q359 (two laboratory strains derived from K12). This was done in order to eliminate the possibility that the initial observation on *S. typhi* OmpC expression was due to some peculiarity of the culture conditions or of the strains used. Expression of *E. coli* OmpC was used as control since its osmoregulation is extensively documented (Forst and Inouye, 1988).

Figure 1, depicting electrophoretic patterns of major OMPs, is a representative example of the analysis performed on the various *S. typhi* strains. *S. typhi* OmpC, from strain IMSS-1, was expressed at the same level both at

low (lane 1; NB) and high (lane 4; NB + 20% or 0.57M sucrose) osmolarity. This phenomenon was also observed in strain Ty2 and in eight independent MK clinical isolates. In contrast, expression of *E. coli* OmpC was repressed in low osmolarity (lanes 2 and 3; NB) and favoured in high osmolarity (lanes 5 and 6; NB + 20% sucrose), in accord with previous observations (van Alphen and Lugtenberg, 1977; Verhoef *et al.*, 1979; Kawaji *et al.*, 1979). Furthermore, the same results were obtained regardless of whether the growth temperature was 4, 20, 37 or 42°C (not shown).

The osmolarity of NB was 176 mOsm. In comparison, the osmolarity of a low-osmolar K medium (Kennedy, 1982) of M9 salt plus casamino acids (Maniatis *et al.*, 1982), and of LB-rich medium (Maniatis *et al.*, 1982) was 125, 270, and 448 mOsm, respectively. The identity of the other OMP bands in Fig. 1, in both *S. typhi* and *E. coli*, was assigned as follows: OmpF was assigned because its synthesis was repressed in high osmolarity; OmpA because it showed, as in *E. coli* (Schnaitman, 1974), heat-modifiable electrophoretic migration and constitutive synthesis (not shown); and *E. coli* OmpC because of the expression of plasmid pMY111 (Mizuno *et al.*, 1983) harbouring *E. coli* ompC.

The apparent molecular weights of the three main *S. typhi* OMPs appeared greater than the corresponding ones in *E. coli*. In fact, *S. typhi* OmpC is 11 amino acids longer than *E. coli* OmpC, by comparison with the amino acid sequences derived from the corresponding ompC nucleotide sequences (Puente *et al.*, 1989). It is interesting to note that the *S. typhi* OMP profiles did not seem to contain a fourth major band, in the 35-45kDa range, equivalent to *S. typhimurium* OmpD (Bennet and Rothfield, 1976; Nurminen *et al.*, 1976), an OMP that has been recently reported to be associated with virulence (Dorman *et al.*, 1989).

Figure 2 shows a quantitative densitometric analysis of OMP expression taken from Fig. 1. A clear assessment

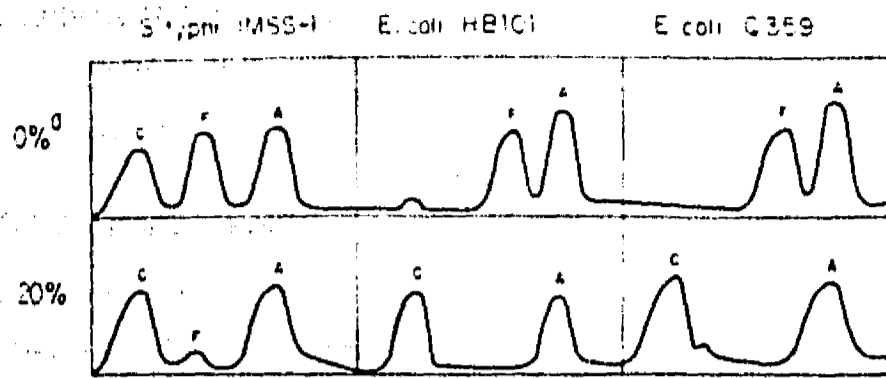
sk Not in list Added

#

ref. OK now? YES

5

#



	<i>S. typhi</i> IMSS-1		<i>E. coli</i> HB101		<i>E. coli</i> Q359	
	0% <sup>a</sup>	20%	0%	20%	0%	20%
OmpC	0.86 <sup>b</sup>	0.82	0.08	1.10	—	0.97
OmpF	0.84	0.14	0.91	—	0.91	—
OmpA <sup>c</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Fig. 2. Densitometric scan of the OMP electrophoretic patterns from *S. typhi* IMSS-1, and *E. coli* HB101 and Q359 grown in low (NB + 0% sucrose) (a) or high (NB + 20% sucrose) osmolarity. The upper portion shows the graphs obtained from the scans. The lower portion shows the relative areas of the absorbance peaks (b), corresponding to OmpC (C), OmpF (F), and OmpA (A), taking OmpA in each lane as unit (c). The data are the representative averages of at least three different experiments.

can be made of the constitutive synthesis of *S. typhi* OmpC in low (NB + 0% sucrose) and high (NB + 20% sucrose) osmolarity, as well as of the repression of *E. coli* OmpC synthesis in low osmolarity relative to high osmolarity. The synthesis of OmpF in both bacteria was regulated in a similar manner. In addition, the total amount of OmpC plus OmpF in both conditions was almost constant for *E. coli*, in contrast with what is observed in *S. typhi* where this amount was higher in low osmolarity.

The data depicted in the figure did not exclude the possibility that the band that we had identified as OmpC, when synthesized in *S. typhi* at low osmolarity, was not in fact OmpC, but another protein with the same electrophoretic mobility. This was examined by comparing the peptide map of this protein (Fig. 3, lane 4) with that from the *S. typhi* OmpC protein, synthesized from the cloned gene in *E. coli* (Fig. 3, lane 5). The electrophoretic profiles of the peptides obtained upon partial digestion with *Staphylococcus aureus* protease V8 was identical for both proteins; in contrast ~~to~~ different profiles ~~were~~ obtained for *E. coli* OmpC, synthesized from the cloned multicopy gene (Fig. 3, lane 3), or for *S. typhi* OmpF (Fig. 3, lane 2), both being synthesized in low osmolarity. Furthermore, the profile in lane 4 (Fig. 3) seems to correspond only to OmpC, which eliminates the possibility that two major proteins are superimposed in the same band.

The profile in lane 5 (Fig. 3) shows no major contamination with *E. coli* OmpC, reflecting inhibition of the synthesis of endogenous OMPs when cloned multicopy *omp* genes are expressed, as has been observed previously (Glick *et al.*, 1988). Furthermore, the profiles of

OmpC synthesized in high osmolarity by *S. typhi* and by *E. coli* are identical to those shown in lanes 5 and 3 (Fig. 3), respectively (not shown).

#### Synthesis of *S. typhi* OmpC is OmpR-dependent

In order to determine if synthesis of *S. typhi* OmpC in *E. coli* required the OmpR transcriptional activator, the *S. typhi* and the *E. coli ompC* genes, contained in plasmids pVF27 and pMY111, respectively, were introduced into *E. coli* KY2562. This strain lacks a functional OmpR, because of a 19-amino-acid deletion, which confers on the bacteria an OmpC-minus, OmpF-minus phenotype (Nara *et al.*, 1986).

Figure 4 shows that both *S. typhi* (KY2562/pVF27) and *E. coli* (KY2562/pMY111) OmpC were not expressed in an OmpR-minus background. In contrast, overexpression of the multicopy cloned *ompC* genes in strain HB101 (OmpR-plus), used as a positive control, resulted in the inhibition of endogenous OMP synthesis, as has been described previously (Glick *et al.*, 1988). The identity of the *S. typhi* OmpC protein, in the pattern corresponding to HB101/pVF27, was determined by analysis of peptide maps, as in the experiment described in Fig. 3. These results indicate that some features of the mechanism of *ompC* expression such as dependence on OmpR, appear to be shared by both bacteria.

#### Discussion

We show here that there is a different effect of medium osmolarity on the expression of *S. typhi ompC* relative to *E. coli ompC*. Since expression of *E. coli ompC* is favoured at higher osmolarity and growth temperatures (van Alphen and Lugtenberg, 1977; Verhoef *et al.*, 1979; Kawaji *et al.*,

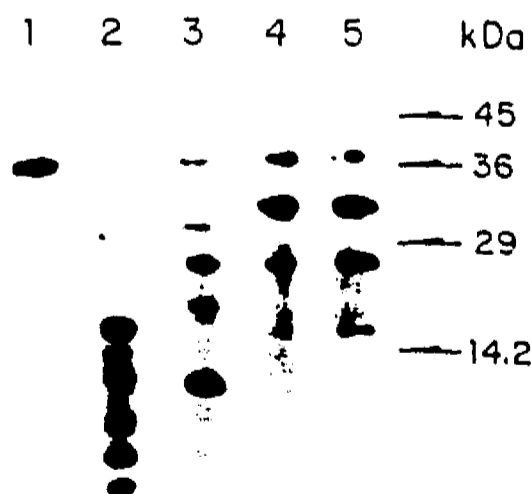
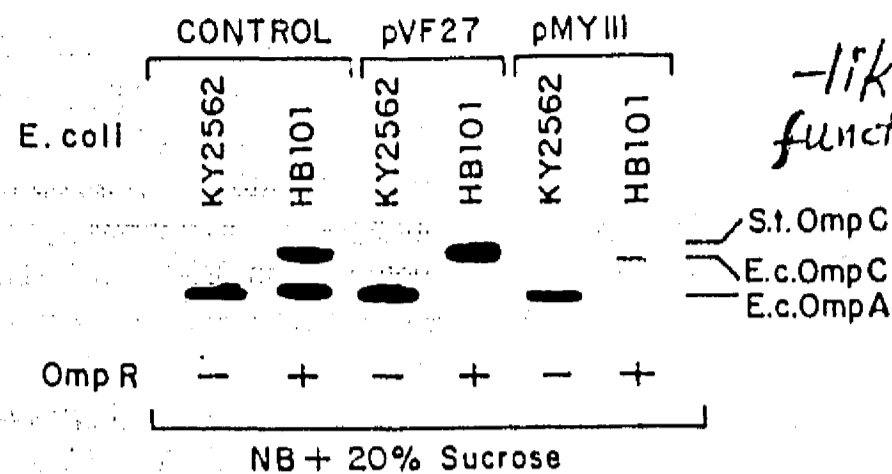


Fig. 3. Electrophoretic pattern of the peptide maps obtained by partial digestion with *S. aureus* V8 protease of *S. typhi* OmpF synthesized in low osmolarity (lane 2), *E. coli* OmpC synthesized in low osmolarity from the cloned gene in pMY111 (lane 3); *S. typhi* OmpC synthesized in low osmolarity (lane 4), and *S. typhi* OmpC synthesized under low osmolarity in *E. coli* from the cloned gene in pVF27 (lane 5). *E. coli* OmpC was included as an undigested control (lane 1).



**Fig. 4.** Electrophoretic pattern of OMP preparations from *E. coli* KY2562 (OmpR-minus) and HB101 (OmpR-plus), without a plasmid (controls), or containing either plasmid pVF27 (harbouring *S. typhi* *ompC*) or pMY111 harbouring *E. coli* *ompC*). The bacteria were grown in NB + 20% sucrose.

in *E. coli* is OmpR-dependent. Whether *S. typhi* possesses an EnvZ/OmpR signal-transducing sensor/regulator system that ~~senses osmolarity~~ in a different manner as the corresponding *E. coli* system does, is an open question. Interestingly, in *S. typhimurium*, mutations in *ompR* result in attenuated virulence (Dorman *et al.*, 1989), and avirulent mutants sensitive to macrophage defensins map in the PhoP/PhoQ sensor/regulator system (Miller *et al.*, 1989). Furthermore, it has been observed that *S. typhimurium* *invA*, which allows penetration of tissue-culture cells and has a role in the invasion of Peyer's patches and small-intestine cell wall, is expressed at an eight-fold higher level upon shift from low to high osmolarity: this phenomenon is influenced by changes in DNA supercoiling (Galán and Curtiss, 1990). However, further study will be required to determine if our observations indicate the existence of a specialized global genetic regulatory circuit and to determine its role in the pathogenicity of *S. typhi*.

#### Experimental procedures

##### Bacterial strains and plasmids

The *S. typhi* strains (serotypes 9, 12, d and Vi) were the following: IMSS-1, isolated from a patient with TF, generously donated by Dr Jesús Kumate and collaborators (Instituto Mexicano del Seguro Social, México DF) (Isibasi *et al.*, 1988); Ty2, obtained from the American Type Culture Collection (ATCC No. 19430); and eight clinical isolates of the MK series, isolated from TF patients with different clinical symptoms, generously made available by Dr Guillermo Ruiz-Palacios and collaborators (Instituto Nacional de la Nutrición 'Salvador Zubirán', México DF). The *E. coli* strains were HB101, obtained from and described by Boyer and Roulland-Dussoix (1969); Q359, obtained from and described by Karn *et al.* (1980); and KY2562, obtained from and described by Nara *et al.* (1986).

Plasmid pVF27, containing *S. typhi* *ompC* (Puente *et al.*, 1987) was constructed in our laboratory. Plasmid pMY111, containing *E. coli* *ompC* (Mizuno *et al.*, 1983) was kindly made available by Dr M. Inouye from The University of Medicine and Dentistry of New Jersey, USA.

##### Bacterial growth

Bacteria were grown in Nutrient Broth (Bacto Nutrient broth; NB; Difco) at 37°C with vigorous agitation (250 r.p.m.) in flasks at least 10 times the size of the culture, up to late logarithmic phase. Low and high osmolarity growth was when the media were prepared without (0%) or with (20%) added sucrose, respectively.

##### Osmolarity determinations

The osmolarity of the various culture media was determined in an Osmette precision Osmometer (model no. 2007; Precision Systems, Inc.). The values reported were the averages of two readings, which varied by less than 3%.

1979; Lugtenberg *et al.*, 1986), it has been speculated that this could be significant when the bacterium is growing inside a host organism, in contrast to when it is growing in an external environmental niche, usually of lower osmolarity and temperature (Nikaido and Vaara, 1985). This concept contrasts with our findings, where we could not observe lowering of the expression of *S. typhi* *ompC* at low osmolarity.

Studies with *E. coli* *ompC-lac* fusions have shown that there is a transient 3.4-fold increase in the rate of expression for *ompC*, after a 10 min lag, upon shift from low to high osmolarity (Jovanovich *et al.*, 1988). In addition, it has been shown that expression of *E. coli* and *S. typhimurium* *ompC* is increased in anaerobiosis, with an overlap between the responses to anaerobic and osmotic stress, where DNA supercoiling may play an important role (Ni Bhriain *et al.*, 1989; Graeme-Cook *et al.*, 1989). Similar experiments with *S. typhi* *ompC* should shed more information on the role of these and other factors, including the carbon source (Scott and Harwood, 1980), on gene expression.

Most of the nucleotide sequence differences in the 5' upstream regulatory region, between *S. typhi* and *E. coli* *ompC*, are contained in the more distal -195 to -333 portion (Puente *et al.*, 1989), and such nucleotides could be responsible for the differential expression of both genes. In particular, a putative OmpR-binding site differs in five out of twenty six residues. In the -1 to -333 portion, there are three putative Pribnow boxes which are identical in both bacteria, so they appear not to be involved in the different responses of the *ompC* genes to osmolarity. It has been shown that a single-base mutation in the most proximal Pribnow box of the *E. coli* gene results in a high OmpR-dependent constitutive level of expression (Ozawa *et al.*, 1987).

We have reported here that expression of *S. typhi* *ompC*

-like functions

ambiguous - rewrite please ✓

R/

to/

**OMP preparations**

The Triton X-100 insoluble membrane fractions were obtained according to Matsuyama *et al.* (1984).

**Polyacrylamide gel electrophoresis of OMP preparations**

OMP preparations were subjected to electrophoresis (5h at 20mA) in polyacrylamide slab (14 cm x 10cm x 1.5mm-thick) gels prepared with 11% acrylamide, 0.3% bis-acrylamide, 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS), 8M urea, and the discontinuous buffer system of Laemmli (1970). The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue.

**Densitometric analysis of OMP electrophoretic patterns**

Scans were performed on picture negatives of Coomassie Brilliant Blue-stained OMP electrophoretic patterns with a laser beam densitometer from Biomed Instruments, Inc.

**Peptide maps**

The procedure for obtaining peptide maps was based on that described by Cleveland *et al.* (1977). Briefly, the bands of interest from an OMP electrophoretic profile were cut out of a dry gel previously stained with Coomassie Brilliant Blue. They were incubated with 0.1 units of *S. aureus* V8 protease (Sigma Chemical Co.) per µg of protein, for 30 min at 25°C. The resulting peptides were separated by electrophoresis (20mA, 4h) in polyacrylamide (15% acrylamide, 0.4% bis-acrylamide, 0.1% SDS) slab (14 cm x 10 cm x 1.5 mm-thick) gels in the discontinuous buffer system (Laemmli, 1970). They were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue.

**Acknowledgements**

This project was partially supported by grants P219CCOL-880390 from the National Council for Science and Technology, Mexico (CONACYT); UNESCO No. 249.824.7 from the United Nations Programme for Latin American Biotechnology Development; and RF 87049 no. 26 from The Rockefeller Foundation (USA). The osmolarity determinations were performed at the Departamento de Alimentos y Biotecnología de la División de Posgrado de la Facultad de Química, UNAM, Mexico City; we thank Amanda Gálvez and Gabriela Isunza for valuable discussion and technical assistance. We thank Guillermo Gosset and Baltazar Becerril for critically reviewing the typescript.

**References**

Bennett, R.L., and Rothfield, L.I. (1976) Genetic and physiological regulation of intrinsic proteins of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **127**: 498-504.  
 Boyer, H.W., and Roulland-Dussoix, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **41**: 459-472.  
 Calderón, I., Lobos, S.R., Rojas, H.A., Palomino, C., Rodríguez, L.H., and Mora, G.C. (1986) Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid fever in humans. *Infect Immun* **52**: 209-212.  
 Calva, E., Puente, J.L., and Calva, J.J. (1988) Research oppor-

tunities in typhoid fever: epidemiology and molecular biology. *BioEssays* **9**: 173-177.  
 Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W., and Laemmli, U.K. (1977) Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem* **252**: 1102-1106.  
 Click, E.M., McDonald, G.A., and Schnaitman, C.A. (1988) Translational control of exported proteins that result from OmpC porin overexpression. *J Bacteriol* **170**: 2005-2011.  
 Dorman, C.J., Chatfield, S., Higgins, C.F., Hayward, C., and Dougan, G. (1989) Characterization of porin and *ompR* mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*: *ompR* mutants are attenuated in vivo. *Infect Immun* **57**: 2136-2140.  
 Edelman, R., and Levine, M.M. (1986) Summary of an international workshop on typhoid fever. *Rev Inf Dis* **8**: 329-349.  
~~Fields, P.I., Swanson, R.V., Haidaris, G.G., and Heffron, F. (1986) Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 5189-5193.~~  
 Finlay, B.B., and Falkow, S. (1989) *Salmonella* as an intracellular parasite. *Mol Microbiol* **3**: 1833-1841.  
 Forst, S., and Inouye, M. (1988) Environmentally regulated gene expression for membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Cell Biol* **4**: 21-42.  
 Galán, J.E., and Curtiss, III, R. (1990) Expression of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. *Infect Immun* **58**: 1879-1885.  
 Graeme-Cook, K.A., May, G., Bremer, E., and Higgins, C.F. (1989) Osmotic regulation of porin expression: a role for DNA supercoiling. *Mol Microbiol* **3**: 1287-1294.  
 Gross, R., Aricò, B., and Rappuoli, R. (1989) Families of bacterial signal-transducing proteins. *Mol Microbiol* **3**: 1661-1667.  
 Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., González, C., Moreno, J., and Kumate, J. (1988) Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins from *Salmonella typhi* 9, 12, d, Vi. *Infect Immun* **56**: 2953-2959.  
 Jovanovich, S.B., Martinell, M., Record, Jr, M.T. and Burgess, R.R. (1988) Rapid response to osmotic upshift by osmoregulated genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **170**: 534-539.  
 Karn, J., Brenner, S., Barnett, L., and Cesareni, G. (1980) Novel bacteriophage lambda cloning vector. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 5172-5176.  
 Kawaji, H., Mizuno, T., and Mizushima, S. (1979) Influence of molecular size and osmolarity of sugars and dextrans on the synthesis of outer membrane proteins O-8 and O-9 of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **140**: 843-847.  
 Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.  
 Lugtenberg, B., Peters, R., Bernheimer, H., and Berendsen, W. (1976) Influence of cultural conditions and mutations on the composition of the outer membrane proteins of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **147**: 251-262.  
 Matsuyama, S.-I., Inokuchi, K., and Mizushima, S. (1984) Promoter exchange between *ompF* and *ompC*, genes for osmoregulated major outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **158**: 1041-1047.  
 Miller, S.I., Kukral, A.M., and Mekalanos, J.J. (1989) A two-component regulatory system (*phoP/phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5054-5058.  
 Mizuno, T., Chou, M.-Y., and Inouye, M. (1983) A comparative study on the genes for three porins of the *Escherichia coli* outer membrane. *J Biol Chem* **258**: 6932-6940.

Maniatis, T., Fritsch, E., and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*.

coli. Proc Natl Acad Sci USA 79: 1092-1095

Where  
\*  
Delete

1#

Cold Spring Harbor, N.Y.

Kennedy, E. P. (1982) Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived

- Nara, F., Matsuyama, S., Mizuno, T., and Mizushima, S. (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.
- Ni Bhriain, N., Dorman, C.J., and Higgins, C.F. (1989) An overlap between osmotic and anaerobic stress responses: a potential role for DNA supercoiling in the coordinate regulation of gene expression. *Mol Microbiol* 3: 933-942.
- Nikaido, H., and Vaara, M. (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 49: 1-32.
- Nurminen, M., Lounatmaa, K., Sarvas, M., Mäkelä, P.H., and Nakae, T. (1976) Bacteriophage-resistant mutants of *Salmonella typhimurium* deficient in two major outer membrane proteins. *J Bacteriol* 127: 941-955.
- Ozawa, Y., Mizuno, T., and Mizushima, S. (1987) Roles of the Pribnow box in positive regulation of the *ompC* and *ompF* genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169: 1331-1334.
- Puente, J.L., Flores, V., Fernández, M., Fuchs, Y., and Calva, E. (1987) Isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. *Gene* 61: 75-83.
- Puente, J.L., Alvarez-Scherer, V., Gosset, G., and Calva, E. (1989) Comparative analysis of the *Salmonella typhi* and *Escherichia coli ompC* genes. *Gene* 83: 197-206.
- Schnaitman, C.A. (1974) Outer membrane proteins of *Escherichia coli*. IV. Differences in outer membrane proteins due to strain and cultural differences. *J Bacteriol* 118: 454-464.
- Scott, N., and Harwood, C. (1980) Studies on the influence of the cyclic AMP system on major outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett* 9: 95-98.
- ~~Stock, J.B., Ninta, A.J., and Stock, A.M. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* 53: 450-490.~~
- Udhayakumar, V., and Muthukkaruppan, V.R. (1987a) Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect Immun* 55: 816-821.
- Udhayakumar, V., and Muthukkaruppan, V.R. (1987b) An outer membrane protein (porin) as an eliciting antigen for delayed-type hypersensitivity in murine salmonellosis. *Infect Immun* 55: 822-824.
- van Alphen, W., and Lugtenberg, B. (1977) Influence of osmolarity of the growth medium on the outer membrane protein pattern of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 131: 623-630.
- Verhoef, C., Lugtenberg, B., van Boxtel, R., de Graaff, P., and Verheij, H. (1979) Genetics and Biochemistry of the peptidoglycan-associated proteins b and c of *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* 169: 137-146.

where  
in  
text

delete

/b