

03072
reje.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO

IDENTIFICACION EN *Salmonella typhi* SECUENCIAS SIMILARES AL GEN *ompF* de *Escherichia coli*.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A L A A L U M N A

MARIA DE LA LUZ GUTIERREZ NAVA

CUERNAVACA MOR. JUNIO 1994

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.



Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado

Insurgentes Sur y Circuito Escolar, Ciudad Universitaria, México, D.F., Código Postal: 04510

UNAM-CCH

PROYECTO ACADEMICO DE ESPECIALIZACION, MAESTRIA Y DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

IBT

OF. ALMC/80/94

Mtro. Pablo Ruiz Nápoles
Director de la UACPyP del CCH.
P r e s e n t e .

Por este conducto me permito informar a usted que en la reunión de Comisión Académica, que se llevó a cabo el 12 de mayo de 1994, se acordó poner a su consideración el siguiente Jurado para el examen de Maestría de la Bióloga, MARIA DE LA LUZ GUTIERREZ NAVA, con número de cuenta 8121141-2, y número de expediente 30921087, con la tesis titulada " Identificación en Salmonella typhi de secuencias similares al gen ompF de Escherichia coli " , dirigida por el Dr. Edmundo Calva Mercado.

PRESIDENTE: Dr. Mario Soberón Chávez
VOCAL: Dr. Luis Servín González
SECRETARIO: Dr. Edmundo Calva Mercado
SUPLENTE: Dra. Patricia León Mejía
SUPLENTE: Dra. María Alejandra Bravo de la Parra

Sin otro particular aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor., 9 de junio de 1994.

Agustín López-Munguía
Dr. Agustín López-Munguía Canales
Coordinador del Proyecto

Mtro. Pablo Ruiz Nápoles

c.c.p. Dr. Francisco Bolívar Zapata Director del IBT
c.c.p. Biólogo Francisco Incera Ugalde Secretario de Asuntos
Escolares de la UACPyP del CCH.

ALMC/GSD/gp.

INTRODUCCION

Salmonella typhi y la fiebre tifoidea

La fiebre tifoidea (FT) es el resultado de una bacteremia producida por *Salmonella typhi*, enterobacteria Gram-negativa cuyo hospedero único es el hombre (Calva et al., 1988). La FT representa un problema de salud; se ha estimado que se presentan aproximadamente 12.5 millones de casos al año en el mundo (excluyendo China), con una incidencia de 365 casos por cada 100,000 habitantes del total de la población y 590 casos por 100,000 (0.6%) de la población de los países en desarrollo (Edelman and Levine, 1986).

S. typhi pertenece al serotipo 9,12,d, Vi. Este es definido por las unidades repetidas de azúcar (9,12) del antígeno "O", el cual forma parte del lipopolisacárido (LPS) mas abundante de la membrana externa; por el antígeno "H", constituido por la proteína flagelar; y por el antígeno capsular o de virulencia "Vi", compuesto por polisacáridos (Hook, 1990).

Debido a que no existe un modelo experimental animal, poco se sabe acerca de la patogenia de esta bacteria. Estudios epidemiológicos muestran que *Salmonella* penetra al organismo mediante la ingestión de agua o alimentos contaminados con heces. Por extrapolación a partir de investigaciones en ratones infectados con *S. typhimurim*, se piensa que la bacteria pasa a través del lumen intestinal para llegar al ileon distal, que es el sitio donde se inicia la infección. La bacteria se asocia con la línea

epitelial y las placas adyacentes de Peyer. *Salmonella* causa degeneración de las microvellosidades de la superficie epitelial para penetrar a la superficie apical de los enterocitos, mediante un proceso de fagocitosis, la bacteria permanece intracelularmente dentro de una vacuola. Posteriormente, las bacterias son transportadas al sistema retículoendotelial, para multiplicarse y propagarse por todo el organismo, colonizando principalmente los nódulos linfáticos, el bazo y el hígado (Finlay y Falkow, 1989).

La envoltura celular

La plasticidad de la envoltura celular de las bacterias patógenas juega un papel crucial en la adhesión y colonización del tejido del huésped, en la resistencia a las defensas del mismo y en la adquisición de nutrimentos esenciales. Así, la estructura de la envoltura celular de una bacteria, replicándose en el tejido del huésped, debe ser diferente al de una bacteria creciendo en un medio de laboratorio estándar (Williams, 1985).

El proceso de infección bacteriana puede ser visto como la adaptación del patógeno a una serie de microambientes, tales como bajo pH, incremento de la temperatura, baja tensión de O₂, alta osmolaridad y privación de nutrimentos. Las bacterias responden a estos cambios ambientales mediante la modulación de la expresión de diferentes genes coordinadamente regulados, además disponen de una serie de genes específicos que regulan su entrada a la célula eucarionte (Dorman, 1991; Mekalanos, 1992).

El citoplasma de las bacterias Gram-negativas, como *S. typhi*, está rodeado por una estructura muy compleja, que consiste en una

membrana interna, otra externa, y un compartimento acuoso conocido como periplasma, en el cual se encuentra una capa de peptidoglicanos que separa estas dos membranas. La membrana externa (ME) actúa como una barrera que excluye moléculas tóxicas del medio externo. La presencia de LPS en la ME aparentemente contribuye a la baja permeabilidad de solutos lipofílicos. Se ha sugerido que mas de la mitad de la masa de la ME esta compuesta por proteínas, entra ellas se encuentran las lipoproteínas que son proteínas muy pequeñas unidas covalentemente a la capa de peptidoglicanos, y las proteínas OmpA que son proteínas estructurales monomérica. (Fig. 1, Nikaido y Vaara, 1985).

Así mismo, se han observado más de veinte proteínas menores, de las cuales algunas se sobreexpresan bajo condiciones ambientales específicas, tales como limitación de fosfato en el medio de crecimiento o la deficiencia de magnesio (Nakae 1986).

El intercambio de nutrimentos y productos de desecho con el ambiente se lleva a cabo por medio de proteínas formadoras de poros y canales presentes en la membra externa. Estas proteínas se dividen en tres clases: porinas, las cuales permiten la difusión inespecífica y espontánea de pequeños solutos hidrofílicos excluyendo muchos antibióticos e inhibidores como sales biliares; canales específicos, los cuales contienen sitios de unión a ligandos específicos; y canales receptores de alta afinidad dependientes de energía, que permiten la entrada de moléculas nutritivas que existen en muy baja concentración fuera de la célula (Nikaido, 1992).

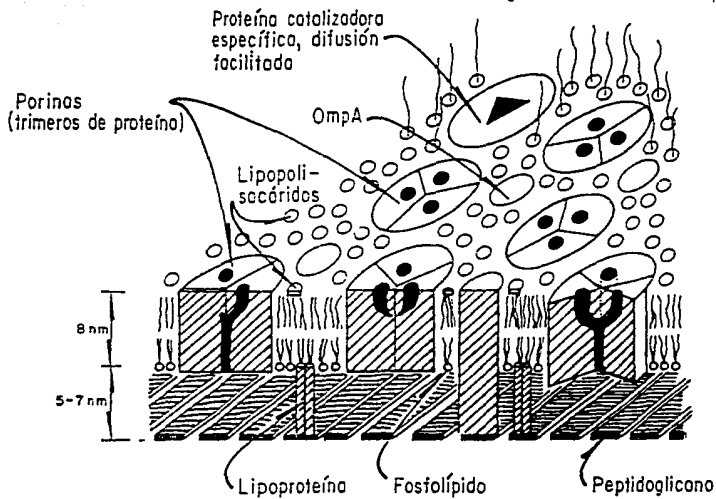


Figura 1.- Representación esquemática de la membrana externa de una bacteria Gram-negativa.

Las porinas

Las porinas clásicas descritas originalmente en *E. coli* incluyen OmpC (Inocuchi et al., 1982), OmpF (Tonmassen et al., 1982), y PhoE (Mutoh et el.,1981) las cuales se conforman triméricamente. Estas proteínas no son funcionales como monómeros sino sólo como trímeros y en asociación con moléculas de LPS (Russo et al., 1993). Se ha reportado que los monómeros de la proteína OmpF son secretados dentro del periplasma y, posteriormente espontáneamente insertados en la ME. El sitio de trimerización no es claro, sin embargo, la información que dirige a una proteína a la ME se encuentra en la secuencia madura (Misra, 1993)

Las porinas están ampliamente distribuidas en las bacterias Gram-negativas y parecen haber aparecido muy temprano en la evolución, pues se encuentran en la eubacteria *Thermotoga maritima*. La cubierta de esta bacteria tiene como componente principal un trímero de una proteína de 42 kDa, cuya estructura tridimensional, revelada por microscopía y procesamiento de imágenes, es claramente reminiscente de las porinas clásicas de la ME como OmpC u OmpF de *E. coli* (Rachel et al., 1990, Nikaido, 1994).

En *Escherichia coli* estas porinas y la proteína OmpA, son las más abundantes en la ME, presentándose cada una en aproximadamente 10^5 - 10^6 moléculas por célula por lo que se les a llamado proteínas principales. La proteína OmpC tiene un peso molecular de 38 kDa, OmpF de 37 kDa y PhoE 36 kDa (Mizuno and Mizushima, 1990).

El trímero de OmpF, con 1.2 nm de diámetro, y el de OmpC, con 1.1 nm de diámetro, muestran preferencia por moléculas neutrales y

caciones, en contraste con el trímero de PhoE de 1.1 nm, que tiene preferencia por aniones (Nikaido, 1992, Tommassen et al., 1993).

Las secuencias de aminoácidos de las porinas son muy similares. Del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de 14 porinas de diferentes bacterias Gram-negativas, se dedujo que existen 16 estructuras β -plegadas atravesando la membrana, las cuales forman una estructura de barril bordeando un gran canal. Las asas que conectan estructuras β -plegadas son muy cortas (1-4 residuos) sobre el lado periplásmico, del lado contrario a éstas, son más largas (Fig. 2).

Se ha postulado que las secuencias de aminoácidos expuestas sobre la superficie externa de la bacteria sufren un cambio evolutivo rápido, debido a que son blanco de reconocimiento de componentes del sistema inmunológico del hospedero, así como de fagos y bacteriocinas encontradas en el ambiente; al contrario las secuencias que se encuentran ocultas en la membrana son muy conservadas (Nikaido 1992). En cada una de estas porinas, los poros son reducidos por el doblamiento hacia adentro de la tercera asa externa, dentro del barril β (Jeanteur et al, 1991).

Las porinas de *E. coli* presentan dos configuraciones de canales abiertos: un canal de tamaño pequeño estable en pH ácido y uno de tamaño grande estable en pH básico. Al parecer, el aminoácido His21 esta involucrado en el cambio de tamaño del canal del poro. El mecanismo inducido por el pH ácido en el tamaño del canal puede involucrar el movimiento de la histidina protonada hacia un carboxilo vecino, induciendo una reducción del canal del

poro (Todt y Mc Groarty, 1992).

La estructura cristalográfica de la proteína OmpF (Cowan et al., 1992) mostró básicamente la estructura ya predicha por la secuencia de aminoácidos. El canal formado por OmpF tiene forma de embudo con su diámetro mas ancho hacia el interior de la célula, estrechándose hacia el centro del canal.

Expresión de las porinas

Con respecto a la expresión de algunas proteínas de membrana externa (PME), ha sido descrito que en *E. coli*, OmpF es sintetizada preferentemente bajo condiciones de baja osmolaridad, pH alto, baja temperatura o cuando las células son crecidas con una fuente de carbono pobre, mientras que OmpC es preferentemente sintetizada bajo condiciones de alta osmolaridad, pH bajo, alta temperatura o cuando las células están creciendo con una buena fuente de carbono (Sharif and Igo, 1993).

En cuanto a la regulación de OmpC, se sabe que a diferencia de *E. coli*, en *S. typhi* y en *Shigella flexneri* esta proteína se expresa tanto en alta como en baja osmolaridad (Puente et al., 1991; Bernardini et al., 1993). Así mismo, en *Serratia marcescens* se aisló un gen que codifica para una proteína de 40 kDa similar a la porina OmpC de *E. coli* y en la cual no se observa osmorregulación o termorregulación como en OmpC de *E. coli* (Hutsul y Worobec, 1994)

En *E. coli*, *S. typhymurium*, *S. typhi* y otras bacterias Gram-negativas, la expresión de OmpF y OmpC a nivel transcripcional esta

regulada por las proteínas OmpR y EnvZ, estas proteínas pertenecen al sistema regulatorio de dos componentes, el cual responde a estímulos ambientales. Entre otros sistemas similares se han descrito los de las proteínas NtrB/NtrC (metabolismo del nitrógeno de Enterobacteriaceae), CheA/CheY (quimiotaxis de *E. coli*), PhoR/PhoB (regulón de fosfato de *E. coli*) VirA/VirG (mecanismos de infección de *Agrobacterium tumefaciens*) etc. En este sistema el primer componente es una proteína integrada a la membrana citoplásmica que detecta los estímulos ambientales y transmite la señal al segundo componente, la proteína reguladora, la cual se encuentra en el citoplasma, ésta recibe la señal y modifica su dominio carboxi-terminal para interactuar con el DNA y modular su transcripción. A sido reportado que en la transducción de la señal esta involucrado la transferencia de un grupo fosforilo entre los dos componentes.

EnvZ es una proteína de la membrana interna capaz de autofosforilarse, existen dos dominios, un dominio periplásmico involucrado en sensar los cambios de osmolaridad, y un dominio citoplásmico involucrado en la fosforilación y desfosforilación de la proteína OmpR. OmpR fosforilada se une a dos diferentes motivos en las regiones reguladoras de *ompF* y *ompC*, los sitios de alta y baja afinidad, en condiciones de baja osmolaridad la cantidad de OmpR fosforilada disminuye y se une a los sitios de alta afinidad en la región regulatoria de *ompF*, activando su transcripción, en alta osmolaridad la cantidad de OmpR fosforilada aumenta y se une a sitios de menor afinidad en la región promotora

de *ompF* y *ompC*, reprimiendo la transcripción de *ompF* y activando la de *ompC*. (Tsong 1989) (Fig. 3)

Con respecto a otros factores que regulan la expresión de estas proteínas, se sabe que las cepas de *E. coli* K12 que carecen de IHF (Factor de Integración del hospedero) tienen alterada la osmoregulación de estas proteínas. IHF se une a las regiones promotoras de *ompF* y *ompC*, e inhibe fuertemente la transcripción de estos genes. Se ha sugerido que IHF puede tener una interacción directa con OmpR ocasionando la curvatura del DNA del promotor (Freundlich., 1992).

Se ha demostrado que la expresión de porinas es sensible a la topología del DNA, el superenrollamiento de éste inducido ambientalmente, provee un mecanismo para la regulación coordinada de la expresión de un número de genes inducidos por estrés. La transcripción de *ompF* y *ompC* es alterada cuando existen mutaciones en los genes *topA*, *gyr*, o inhibidores de girasas del DNA. Aunque las regiones promotoras de *ompF* y *ompC* son sensibles al grado de superenrollamiento del DNA hasta ahora solo se conoce la proteína reguladora OmpR necesaria para la transcripción de estos genes (Durman., 1991, Graeme-Cook et al., 1989).

Recientemente, se ha demostrado que la síntesis de OmpF disminuye en condiciones de estrés oxidativo. La regulación de OmpF en estas condiciones parece ser dependiente del regulón SoxRS. En este sistema, la proteína SoxR induce el gene *soxS* en respuesta al estrés redox. Evidencias bioquímicas han demostrado que SoxS se une a la región promotora del gen *micF*. *micF* es un RNA pequeño, que se

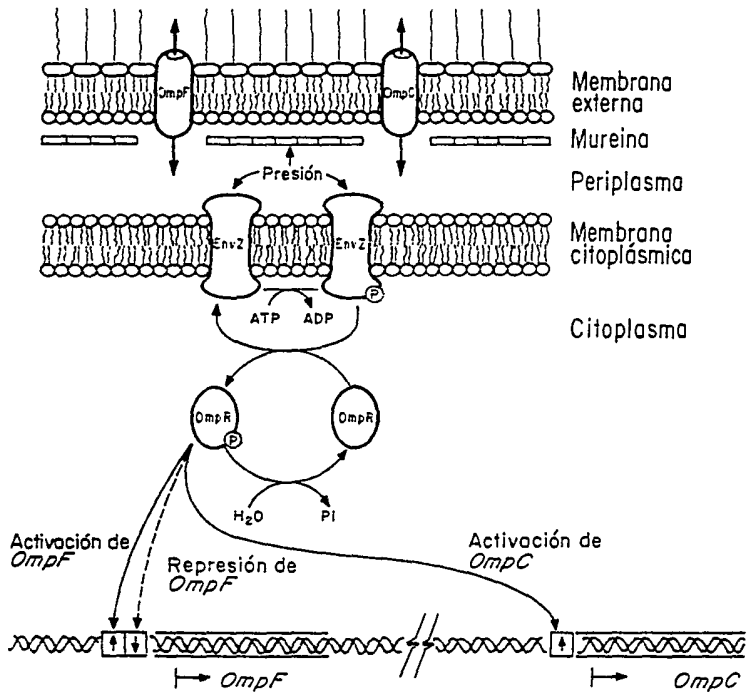


Figura 1. Mecanismo de regulación de la expresión de las porinas OmpF y OmpC. EnvZ, sensor de la presión en el periplasma, activa a OmpR mediante la fosforilación de este en un sitio de alta afinidad por el grupo fosfato.

transcribe en dirección opuesta a *ompF*, e hibrida con el extremo 5' del RNA mensajero de *ompF* de *E. coli* inhibiendo así la traducción de este (Choue et al 1993).

Las porinas como antígenos

El estudio de las porinas también resulta atractivo por el papel que tienen en la respuesta inmune humoral. Se ha observado que las PME de *S. typhi* y *S.typhimurium* son capaces de inducir una respuesta inmune protectora en ratón y que los anticuerpos séricos de pacientes con FT son capaces de reconocer dichas proteínas (Isibasi et al., 1988, Blanco et al., 1993). Así mismo, se ha reportado que preparaciones de PME de *S.typhi*, usadas como antígeno de captura, son útiles en un inmunoensayo enzimático (FT-Elisa) para la detección de anticuerpos séricos específicos en pacientes con FT (Verdugo et al., 1993a, 1993b, y 1993c).

Por otro lado, en el perfil electroforético de PME de *S. typhi*, expresadas en bacterias en presencia de suero de humano, se observa la síntesis de proteínas de alto peso molecular (mayores de 38 kDa), las cuales pueden estar implicadas en la patogenicidad de las bacterias (Perez-Valle, 1994).

Antecedentes

El objetivo principal de nuestro laboratorio, ha sido el estudio de la relación estructura-función de las PME de *S. typhi*, así como de los mecanismos, que regulan la expresión de sus respectivos genes. A la fecha se han clonado y secuenciado los genes que codifican para algunas PME como son: *ompC*, cuya proteína

es 11 aminoácidos mas grande que la proteína OmpC de *E. coli*, la similitud entre ellos es 79% en la secuencia de aminoácidos; (Puente et al., 1987; Puente et al., 1989); y *phoE*, cuya similitud con el gen de *E. coli* es de 87% a nivel de aminoácidos (Puente, 1987; Torres, 1993 y datos no publicados). Por otro lado también se ha aislado el operón *ompB*, el cual tiene 86% de similitud en la secuencia de aminoácidos con el de *E. coli*, y está también constituido por los genes *ompR* y *envZ*, cuyos productos, las proteínas OmpR y EnvZ, intervienen en la regulación de las proteínas principales OmpC y OmpF (Martínez, 1994 y datos no publicados).

También se han hecho estudios de la expresión de OmpC, los cuales revelaron que ésta es elevada tanto en baja como en alta osmolaridad, a diferencia de su contraparte de *E. coli*, cuya expresión es inhibida en baja osmolaridad e incrementada en alta osmolaridad (Fig. 4). La expresión de OmpC en *S. typhi* también es dependiente del activador transcripcional OmpR (Puente et al., 1991),

Uno de los objetivos particulares de este laboratorio es la clonación y secuenciación del gen *ompF* de *S. typhi*. Este gen tiene la peculiaridad de que se expresa en forma similar al de *E. coli*, al menos en lo que respecta a respuesta a osmolaridad (Fig. 4). Así, a partir de un banco de genes de *S. typhi* construido en el vector lambda 1059, y utilizando como sonda heteróloga el gen *ompF* de *E. coli*, se aisló un gen que se pensó codificaba para la PME de *S. typhi* con un peso molecular aparente de 37 kDa y cuya

regulación es semejante a *ompF* en *E. coli*. Sin embargo, datos de su secuencia nucleotídica y de su expresión en mini-células, señalaron que el producto proteico no corresponde a la proteína *OmpF*, sino a una PME de 42 kDa que no es expresada en la misma cantidad que las porinas principales en los cultivos de laboratorio, a menos de que la región estructural del gen esté bajo el control de un promotor fuerte e inducible. Este gen al cual se denominó *ompF1*, tiene 56% de similitud en la secuencia de aminoácidos con el gene *ompF* de *E. coli*; no se sabe nada acerca de su regulación ni de su función. La proteína para la cual codifica, *OmpF1*, tiene características de una PME pues en su extremo amino terminal presenta un péptido líder y cuando es expresada, tanto en *E. coli* como en *S. typhi*, se inserta en la membrana externa. (Calva et al., 1992; Fernández-Mora et al., 1993)

Cuando el gen *ompF1* es usado como sonda, en hibridaciones tipo Southern, contra DNA genómico de *S. typhi* cortado con la enzima de restricción *SalI*, se observan cuando menos dos señales de hibridación: la que corresponde al gen *ompF1* de 5.6 kb y otra menos intensa, de alrededor de 2.3 kb a la cual para fines prácticos llamamos *ompF2*. Una posibilidad era que en este fragmento se encontrara el gen que codifica para la PME de 37 kDa.

Existen contradicciones en cuanto al número de posibles genes similares al gene *ompF*, preguntas importantes a responder son ¿cuántos genes similares a *ompF* realmente existen?, ¿cuáles son las diferencias entre ellos?, ¿todos se expresan?, ¿podrían tener

regulación es semejante a *ompF* en *E. coli*. Sin embargo, datos de su secuencia nucleotídica y de su expresión en mini-células, señalaron que el producto proteico no corresponde a la proteína OmpF, sino a una PME de 42 kDa que no es expresada en la misma cantidad que las porinas principales en los cultivos de laboratorio, a menos de que la región estructural del gen esté bajo el control de un promotor fuerte e inducible. Este gen al cual se denominó *ompF1*, tiene 56% de similitud en la secuencia de aminoácidos con el gene *ompF* de *E. coli*; no se sabe nada acerca de su regulación ni de su función. La proteína para la cual codifica, OmpF1, tiene características de una PME pues en su extremo amino terminal presenta un péptido líder y cuando es expresada, tanto en *E. coli* como en *S. typhi*, se inserta en la membrana externa. (Calva et al., 1992; Fernández-Mora et al., 1993)

Cuando el gen *ompF1* es usado como sonda, en hibridaciones tipo Southern, contra DNA genómico de *S. typhi* cortado con la enzima de restricción *SalI*, se observan cuando menos dos señales de hibridación: la que corresponde al gen *ompF1* de 5.6 kb y otra menos intensa, de alrededor de 2.3 kb a la cual para fines prácticos llamamos *ompF2*. Una posibilidad era que en este fragmento se encontrara el gen que codifica para la PME de 37 kDa.

Existen contradicciones en cuanto al número de posibles genes similares al gene *ompF*, preguntas importantes a responder son ¿cuántos genes similares a *ompF* realmente existen?, ¿cuáles son las diferencias entre ellos?, ¿todos se expresan?, ¿podrían tener

MATERIALES y METODOS

1. Cepas Bacterianas

- a) *Salmonella typhi* serotipo (9, 12, d, Vi): IMSS-1. Aislado clínico de México D.F.
- b) *Escherichia coli* HB101. F- Δ (*gpt-proA*)62 *leu supE44 ara14 galK2 lacY1*, Δ (*mcrC-mrr*) *rpsL20(St^r)xyl-5 mtl-1 recA13*
- c) *Escherichia coli* Q359 F- *hsdR(r_k'm_k') supE, fhuA (p80r) P2*
- d) *Escherichia coli* CMK
- e) *Escherichia coli* DH5 α IQ F'/*endA1 hsdR17(rk'mk')supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR(p80dlac Δ (lacZ)M15)*

2. Plásmidos

- a) pAT161 (Torres, 1993). Plásmido recombinante que contiene un fragmento del gen *phoE* de *S. typhi* IMSS-1.
- b) pF2 (Fernández-Mora et al., 1993). Plásmido recombinante que contiene el gen estructural *ompF1* de *S. typhi* IMSS-1.
- c) pJP33 (Tomassen, 1982). Plásmido recombinante que contiene el gen *ompF* de *E. coli*.
- f) pLF9 (Inokuchi et al., 1982). Plásmido recombinante que contiene un fragmento del extremo carboxilo terminal del gene *ompF* de *E. coli*.
- e) pLF11 (Inokuchi et al., 1982). Plásmido recombinante que contiene un fragmento del extremo amino terminal del gene *ompF* de *E. coli*.
- d) pVF27 (Puente et al., 1987). Plásmido recombinante que

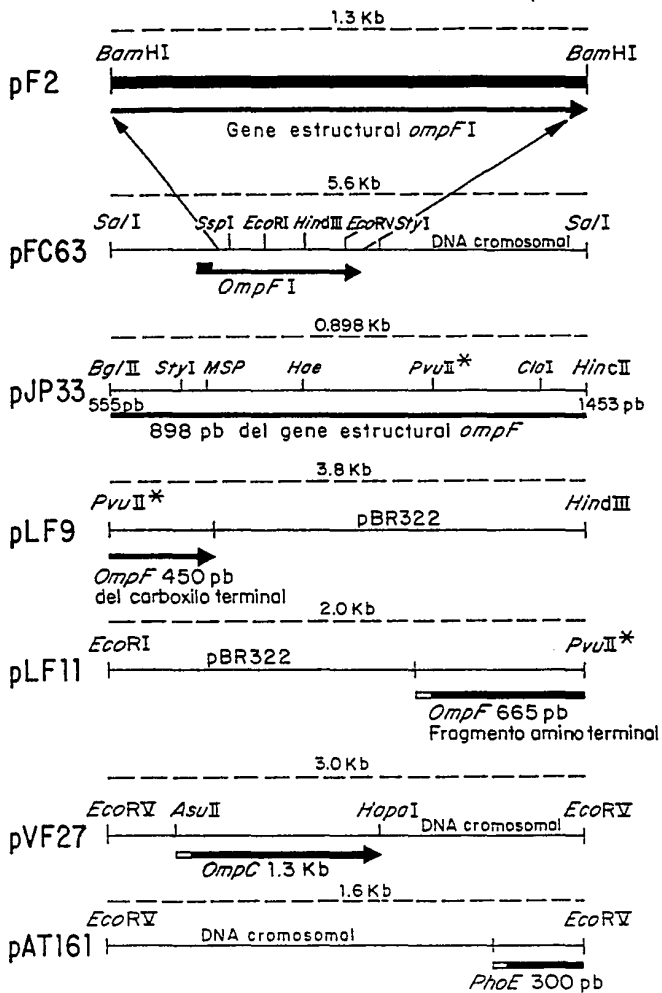
MATERIALES y METODOS

1. Cepas Bacterianas

- a) *Salmonella typhi* serotipo (9, 12, d, Vi): IMSS-1. Aislado clínico de México D.F.
- b) *Escherichia coli* HB101. F- Δ (*gpt-proA*)62 *leu supE44 ara14 galK2 lacY1*, Δ (*mcrC-mrr*) *rpsL20*(St^r)*xy1-5 mtl-1 recA13*
- c) *Escherichia coli* Q359 F- *hsdR*(r_k⁻m_k⁻), *supE*, *fhuA* (P80r) P2
- d) *Escherichia coli* CMK
- e) *Escherichia coli* DH5 α IQ F'/*endA1 hsdR17*(rk⁻mk⁻)*supE44 thi-1 recA1 gyrA* (Nal^r) *relA1* Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR*(P80*dlac* Δ (*lacZ*)M15)

2. Plásmidos

- a) pAT161 (Torres, 1993). Plásmido recombinante que contiene un fragmento del gen *phoE* de *S. typhi* IMSS-1.
- b) pF2 (Fernández-Mora et al., 1993). Plásmido recombinante que contiene el gen estructural *ompF1* de *S. typhi* IMSS-1.
- c) pJP33 (Tomassen, 1982). Plásmido recombinante que contiene el gen *ompF* de *E. coli*.
- f) pLF9 (Inokuchi et al., 1982). Plásmido recombinante que contiene un fragmento del extremo carboxilo terminal del gene *ompF* de *E. coli*.
- e) pLF11 (Inokuchi et al., 1982). Plásmido recombinante que contiene un fragmento del extremo amino terminal del gene *ompF* de *E. coli*.
- d) pVF27 (Puente et al., 1987). Plásmido recombinante que



4. Medios de cultivo.

- a) LB, Descrito por Maniatis et al., 1982.
- b) NZCYM, Descrito por Blattner et al., 1977.
- c) CY, Descrito por Karn et al., 1980.

5. Soluciones

Se siguieron básicamente los protocolos de Ausubel, et al., 1992; Maniatis, et al., 1982.

- a) Solución para saturar el fenol para la extracción de RNA.

-NaOAc 20 mM

-EDTA 1 mM pH 5.5 (ajustar pH con ac. acético).

- b) Solución de lisis para la extracción del RNA.

-NaOAc 20 mM

-EDTA 1 mM pH 5.5.

-SDS 0.5%.

Agregar DPC y esterilizar

- c) Solución amortiguadora para electroforesis del RNA 10X.

- N_2HPO_4 12.75 gr.

- $N_2H_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.35 gr.

-Aforar a 500 ml con agua.

-Agregar DPC y esterilizar

- d) Solución amortiguadora de dilución 10X.

- N_2HPO_4 5.11 gr.

- $N_2H_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.55 gr.

-Aforar a 100 ml con agua.

-Agregar DPC y esterilizar.

6. Enzimas de restricción.

Las enzimas de restricción utilizadas fueron de las siguientes compañías:Boehringer Mannheim GmbH (Alemania), Gibco BRL (EUA) y Promega (EUA).

7. Isótopos Radioactivos.

Ó³²P-dCTP Amersham International plc.

METODOS

1 Preparación de DNA bacteriano

La preparación del DNA cromosomal de alto peso molecular, tanto de *S. typhi* como de *E. coli*, se hizo por el método de tiocianato de guanidina reportado por Pitcher et al., 1989.

2. Preparación de RNA bacteriano.

La extracción del RNA se hizo por el método reportado por Aiba et. al.,1981 con algunas modificaciones.

Se inoculó una colonia en 30 ml de LB, se dejó crecer por un periodo de 6-8 hr hasta que alcanzo a una densidad óptica de 0.6, se centrifugó a 8 krpm por 2 min a 4°C en un rotor JA20, la pastilla se congeló inmediatamente en hielo seco y se agregó 1/10 del volumen original de la solución amortiguadora de lisis calentada a 65 °C, se dejó lisando por 10 min minutos (resuspender con una pipeta), se agrego 3 ml de fenol caliente, y se agitó durante 15 min a 65 °C, se centrifugó a 8 krpm por 10 min a 4 °C, se extrajo la fase superior y se agregó otra vez 3 ml de fenol

caliente. Se hicieron 3 extracciones en total el sobrenadante se precipito con 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M estéril. Se dejo precipitando media hora en hielo seco y centrifugó a 12 krpm por 20 min se tiro el sobrenadante y lavo con etanol al 70%, posteriormente se resuspendió en 500 µl de agua estéril, tratada con dietil pirocarbonato (DPC), se tomarón 5 µl y se cuantifico.

Nota. Todas las soluciones deben ser tratadas con 0.1% DPC por al menos 12 horas; para después autoclavear por 15 min. Es importante que, después de adicionar DPC, las soluciones se esterilicen para inactivarlo, pues es carcinogénico.

3. Tratamiento del RNA con DNasaI.

El RNA a tratar se incubo con 25 unidades de DNasaI (25 U/µl) en precencia de 2 µl Tris 1 M pH 7.5 y 5 µl CaCl₂ 10 mM en 100 µl totales durante 30 min a 37 °C. La DNasa se inactivo con 3 µl 0.4 M EDTA y 5 µl SDS 20% por 15 min a 37 °C, el RNA se extrajo con fenol-cloroformo 1:1 y se precipito con 1/10 de CH₃COONa 7 M, más 2.5 volúmenes de etanol absoluto, se centrifugo a 12 krpm en un rotor JA20 por 20 min, se resuspendio en 100 µl de agua tratada con DPC.

4. Preparación de DNA de plásmido

Para purificar el DNA de los plásmidos, se utilizo el método de lisis alcalina descrito por Maniatis, et al., 1982.

5. Purificación de fragmentos de DNA a partir de agarosa.

En este caso se utilizaron dos métodos, el descrito por Maniatis et al., 1982; o bien el procedimiento que involucra el uso

del estuche de "Gene Clean", de la compañía B10 101

6. Electroforésis en geles de agarosa.

La electroforésis en geles de agarosa es un método simple y muy efectivo para separar, identificar y purificar fragmentos de DNA, de 0.5 hasta de 25 kb. La concentración del gel de agarosa varía de acuerdo a los tamaños de los fragmentos de DNA, pudiendo ser desde 0.8 hasta 1.5%. Una vez que las muestras fueron puestas en el gel, se hizo la electroforésis a 100 volts, utilizando TAE (Solución amortiguadora Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.002 M). Los geles se tiñeron con una solución de 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, el DNA se visualizó por transiluminación con luz ultravioleta de onda corta (Fotodyne).

7. Gel de agarosa para RNA.

El RNA se corrió en un gel de agarosa al 2%. Se funde 1.8 gr. de agarosa en 70 ml de agua tratada con DPC, a 65 °C, y se agrego 16 ml de formaldehído (trabajando en la campana), mas 4.5% de solución amortiguadora de dilución (ver soluciones).

8. Digestión de DNA con endonucleasas de restricción.

La digestión del DNA con las endonucleasas de restricción se hizo incubando el DNA con la enzimas a 37 °C (cuando no había ninguna recomendación específica por parte de la compañía vendedora) en las condiciones adecuadas y el tiempo conveniente de acuerdo a la concentración de DNA y enzima empleada.

9. transferencia de los fragmentos de DNA filtros de nitrocelulosa.

La transferencia de los fragmentos de DNA, del gel de agarosa

a filtros de nitrocelulosa, se hizo por medio de la técnica descrita por Southern, 1975, y reportada por Maniatis et al., 1982, la cual consiste en desnaturalizar el DNA y transferirlo a la membrana de nitrocelulosa e inmovilizarlo.

10. Hibridación de ácidos nucleicos.

La hibridización de los ácidos nucleicos se hizo de acuerdo a la técnica de Maniatis et al., 1982. En este trabajo las condiciones de hibridización se estandarizaron, de tal forma que cuando la sonda fue homóloga se utilizó 50% formamida, y cuando la sonda fue heteróloga se realizó en 30% formamida.

11. Hibridación en placas.

La hibridización en placas se hizo por medio de la técnica Benton and Davis, reportada en Maniatis et al., 1982. Esta consiste en la transferencia del DNA, de las placas de lisis de la superficie de las cajas de agar, a filtros de nitrocelulosa, para posteriormente ser hibridados con la sonda deseada.

12. Crecimiento de fagos recombinantes y purificación de DNA.

El crecimiento de los fagos recombinantes y la purificación del DNA se hizo como lo reporta Puentes 1987.

13. Marcaje de DNA in vitro con ³²P

El DNA se marcó radioactivamente por el método de "Random Primer" de la compañía Amersham; este consiste en desnaturalizar la molécula de DNA a marcar, para después incubarla con oligodeoxinucleótidos, que en este caso son secuencias al azar de seis bases de largo, más los dNTPs, en presencia del fragmento grande de la DNA polimerasa (Klenow). De esta manera, los

hexanucleótidos se unen al DNA de interés en varias posiciones a lo largo del templado y son extendidos para generar moléculas de DNA de doble cadena que están uniformemente marcadas sobre ambas cadenas.

14. Amplificación diferencial de cDNA.

Para la amplificación diferencial de cDNA se siguió el protocolo reportado por Chuang et al., 1993 con algunas modificaciones.

El RNA total de las bacterias se aislo en las condiciones en donde se estimo que los genes de interés eran expresados diferencialmente. El RNA se trato con DNasa por 1 h a temperatura ambiente, en presencia de inhibidores de RNasas (RNasina), posteriormenteel RNA se extrajo con fenol-cloroformo 1:1 y se precipito. Por último se estimo la concentración de RNA.

Para la síntesis del cDNA se incuban 10 µg de RNA a 65 °C por 5 minutos a este RNA se añade:

- 25 µl agua
- 5.0 µl de solución amortiguadora RT10X
- 2.5 µl dNTPs 10 mM
- 2.0 µl DTT 0.1 mM
- 3.0 oligo primer 100 pM/ml
- 2.0 µl Transcriptasa reversa (MLV_RT) 20 µ/ul
- 0.5 µl RNAsin 20 µ/ul.

Se transfieren 10 µl de la reacción anterior a un tubo separado y se añade 1 µl Ó-³²PdCTP radioactivo para monitorear la síntesis de cDNA, incubar los dos tubos a 37 °C por dos horas. La

transcriptasa reversa se inactiva a 65 °C por 10 min, se añade agua a un volumen final de 100 µl.

15. Reaccion en cadena de la polimerasa (PCR).

La mezcla para la PCR fué la siguiente:

- solución amortiguadora de PCR 10X
- dNTPs 2.5 mM
- oligo iniciador 5' 30 pmol
- oligo iniciador 3' 30 pmol
- 5 U Taq DNA polimerasa, Boehringer.
- 100 ng de DNA (molde).

Aforar a un volumen de 100 µl.

Condiciones en las cuales se llevaron a cabo las PCRs.

- 1 ciclo de 3 min a 95 °C.
- 30 ciclos de 1.5 min a 92 °C.
- 30 ciclos de 1.4 min a 50 °C, (esta temperatura fue variable desde 50 °C a 60 °C).
- 30 ciclos de 3 min a 72 °C.
- 1 ciclo de 15 min a 72 °C.

Digestión del DNA genómico con la enzima *Sa*/I



Electroforesis del DNA genómico digerido



Purificación del DNA que se encuentra en el intervalo de 4300 a 6500 pb y de 1000 a 2500pb



Clonación del DNA purificado, en los plásmidos pUC18 y pUC19



Identificación del gene de interés con el gene homólogo, por hibridación en colonia



Subagrupación de plásmidos y purificación de éstos



Hibridación con el gene homólogo

PCR Reverso

Crecimiento de las bacterias en alta
y baja osmolaridad



Extracción del RNA

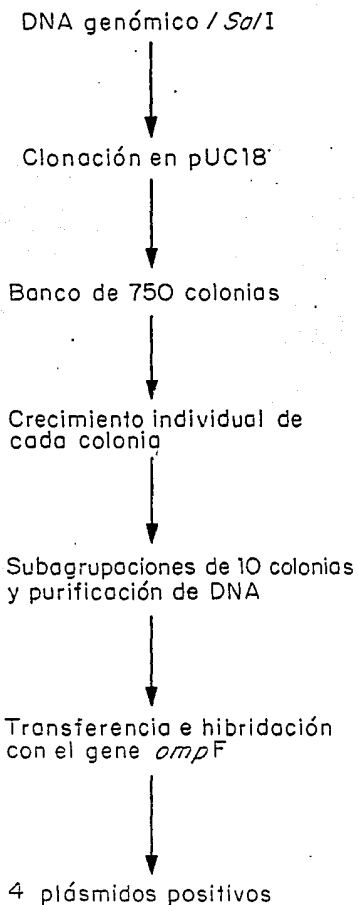


Reacción con Transcriptasa Reversa
(oligos A, CyD)



PCR
(oligos A, CyD)

Estrategia seguida para obtener el plásmido pL15



Características de los oligonucleótidos utilizados

	Secuencia (5'-3')	L	% G+C	T _m
1A	CGA-TTA-CGG-CCG-TAA-CTA-CGG	21	57.0%	66°C
2A	CGA-AAT-CGA-ACT-GGT-ATT-GCG	21	47.6%	66°C
1C	TCT-TTC-GAT-TAC-GGC-CG	17	52.95	2°C
2C	CGA-AAT-CGA-ACT-GGT-ATT-GC	20	45.0%	58°C
1D	CGG-CGT-TGC-TAC-CTA-TCG-TAA-C	22	29.0%	68°C
2D	CCG-ATG-GAC-GGA-CGC-AGA-CC	20	75.0%	68°C

L = Longitud (No. de nucleótidos)

GC = % guanina + citocina

T_m = Temperatura de disociación

Los oligonucleótidos son idénticos a la secuencia del gen *ompF* de *E. coli*, la localización de cada uno de ellos en el alineamiento de las secuencias de las porinas se señala en la figura 3.

RESULTADOS

En experimentos previos observamos que cuando los genes de *E. coli* son utilizados como sondas para aislar genes homólogos o similares en *S. typhi* uno de los principales problemas es el sistema de selección de los plásmidos o fagos recombinantes, pues una de las bacterias mejor caracterizada y por ende mas utilizada como hospedero de estos véctores de clonación es *E. coli*. Por lo tanto cuando se quieren aislar clonas de esta bacteria conteniendo plásmidos en donde se han insertado secuencias de DNA de *S. typhi*, se originan una gran cantidad de falsos positivos debido a la hibridación de la sonda con las secuencias de *E. coli*, haciendo difícil el aislamiento de la clona deseada.

Como se menciono antes, en hibridaciones del DNA genómico de *S. typhi* digerido con *Sal I* contra *ompF1* se observó que éste reconoce además de la banda de 5.6 kb otra de 2.3 kb, en la que pensamos podría existir una secuencia o un gen similar u homólogo al gen *ompF*, con base en esto y en lo arriba mencionado utilizamos como sonda el gen *ompF1*.

Dado que existe alta similitud entre los genes de las diferentes porinas, era necesario descartar la posibilidad de que la banda de 2.3 kb fuera el gen *ompC* o *phoE*. Mediante hibridación tipo Southern y utilizando como sonda estos genes, se observó que los patrones de hibridación eran distintos, lo que indicaba que en la banda de 2.3 kb que denominamos *ompF2* podría contener una

secuencia diferente a la de estos genes.

En la literatura se ha reportado que *Sal I* es una enzima que bajo ciertas condiciones presenta actividad estrella, con el proposito de identificar otras enzimas que pudieran ser utilizadas para la clonación de secuencias similares a *ompF*, el DNA genómico de *S. typhi* se digirió con 16 enzimas diferentes y se hibrido contra los genes *ompF* y *ompF1* para identificar secuencias similares a *ompF* pero que no pertenecieran al gen *ompF1*. Con la mayoría de ellas se observaron señales de hibridación múltiples de bajo peso por lo que *Sal I* fue la única enzima que generaba fragmentos que no contenían sitios internos de ésta.

Experimentos de hibridación posteriores, demostraron que el patrón del DNA genómico de *S. typhi*, cortado con la enzima de restricción *Sal I* contra el gen *ompF1* no era constante, además de las bandas de 5.6 kb y de 2.3 kb, a veces se detecta una nueva señal de hibridación muy fuerte cuyo peso corresponde a 3.5 kb aproximadamente, (Fig. 5)

Cuando el DNA genómico fue digerido con la enzima *Ssp I*, además de la señal de 2.0 kb observada en experimentos anteriores se detecto otra señal de peso molecular diferente (1.2 kb), de igual intensidad y en algunos casos mas intensa. Sin embargo, este patrón no siempre se repetía, por lo que se pensó que los diferentes patrones de hibridación observados podrían ser el producto de una actividad anómala de la enzima utilizada (actividad "estrella", baja eficiencia de la enzima o actividad parcial). Para descartar que las enzimas de restricción tuvieran un comportamiento

errático, se hicieron digestiones con diferentes lotes de *Sal I* y *Ssp I*, incluyendo como control el DNA del plásmido pFC63, el cual contiene el inserto de 5.6 kb de *Sal I* y el de 2.0 kb de *Ssp I*.

De las hibridaciones de estas nuevas digestiones contra el gen *ompF1*, se obtuvieron los siguientes resultados: con todos los lotes de *Sal I* (8 lotes distintos) se observa la banda de 5.6 kb, pero sólo con algunos de ellos la de 2.3 kb, la banda de 3.5 no se observó (datos no mostrados). Cuando el DNA fue cortado con dos lotes distintos de *Ssp I*, fue claro que con sólo uno de ellos existen dos señales, la banda esperada de 2.0 kb y otra de 1.2 kb; con el otro lote sólo se observa la hibridación correspondiente a *ompF1* (Fig.6).

Estos resultados sugieren fuertemente que las diferentes señales de hibridación generadas se deben efectivamente a una actividad anómala de las enzimas, pudiera ser actividad estrella, actividad parcial o que la eficiencia de corte de la enzima no fuera la misma para todos los lotes. Otra posible explicación es que la enzima no tuviera la misma accesibilidad a todos los sitios de corte, lo cual ha sido reportado para la enzima *Eco RV*.

Con el propósito de comprobar si la generación de diferentes bandas de hibridación por la enzima *Sal I*, al utilizar el gen *ompF1* como sonda, eran el producto de una actividad parcial, el DNA genómico de *S. typhi* fue digerido por diferentes periodos de tiempo con *Sal I*. La hibridación del filtro conteniendo estas digestiones

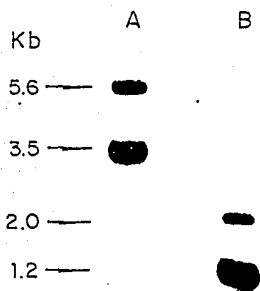


Figura 5.-Autoradiograma en donde se muestra la hibridación del DNA genómico de *S. typhi* IMSS1 digerido con la enzima *Sal* I carril A, y con la enzima *Ssp* I carril B, utilizando como sonda el gene *ompF1*

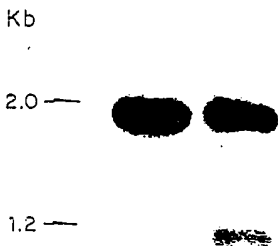


Figura 6.-Autoradiograma en donde se muestra la hibridación del DNA genómico digerido con dos lotes distintos de la enzima *Ssp* I e hibridado con el gene *ompF1*.

contra el gen *ompF* de *E. coli*, mostraron dos señales de hibridación de igual intensidad, en la zona en donde *ompF1* reconoce solo la banda de *Sal I* de 5.6 kb la otra señal de aproximadamente 5.4 kb, no es detectada por *ompF1*. Así mismo en este experimento se observó una hibridación débil en la región de 2.3 kb, y generó una serie de hibridaciones bien definidas de peso molecular más alto. Los datos de hibridación de este experimento, muestran que las bandas observadas son reproducibles, independientemente del tiempo y concentración de la enzima para este lote de enzimas (Fig. 7).

De estos resultados surgió, como nueva alternativa, que las diferentes bandas de hibridación, mostradas en la figura 7, representaban la presencia en *S. typhi* de un repertorio de secuencias relacionados al gen *ompF*, aún más amplio del que consideramos originalmente. Con el propósito de identificar si alguna de estas señales correspondía a los genes *ompC* o *phoE*, se hibridó el DNA contenido en el filtro contra estos genes. La banda de peso molecular más alto corresponde al gene *ompC* y *phoE* (Fig. 8). Por lo tanto las secuencias contenidas en las bandas de 2.3 kb, de 5.4 kb o en alguna de las de alto peso molecular eran distintas a la de estos genes, pudiendo estar *ompF2* contenida en cualquiera de ellas. Es por esto que nos propusimos clonar estas secuencias para su caracterización.

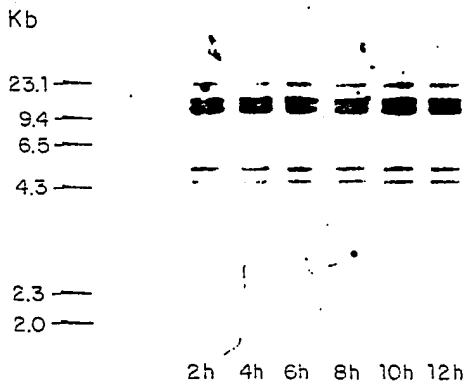


Figura 7.-Autoradiograma en donde se muestra la hibridación del DNA genómico de *S. typhi* digerido por periodos diferentes de tiempo con la enzima *Sall* e hibridado contra el gene *ompF* de *E. coli*.

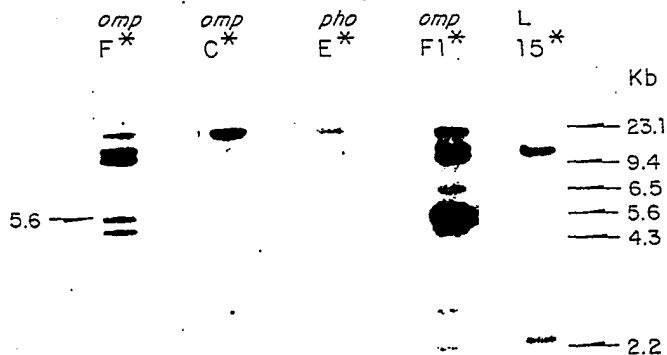


Figura 3.-Autoradiograma en donde se muestra la hibridación del DNA genómico digerido con la enzima *Sall* he hibridado con los genes *ompF*, *ompC*, *phoE*, *ompF1* y con el inserto del plásmido pL15.

AISLAMIENTO DE SECUENCIAS SIMILARES A *ompF*

Con el propósito de identificar secuencias similares u homólogos al gene *ompF* se diseñaron dos estrategias distintas que se describen a continuación:

Análisis de productos de amplificación genómica por medio de PCR

La primera de ellas fue diseñar oligonucleótidos sintéticos para PCR, a partir de secuencias muy conservadas entre los genes para porinas hasta ahora descritos y que corresponden a las regiones que están embebidas en la membrana externa. Las regiones muy variables corresponden a regiones expuestas en la superficie de la célula (ver fig. 3) y algunos autores consideran la posibilidad de que algunos de los segmentos de DNA que codifican para dichas regiones puedan ser especie-específicos.

Las secuencias de los oligonucleótidos se basaron en la secuencia del gen *ompF* de *E. coli* (ver Materiales y Métodos y la figura 2). Con esta estrategia se esperaba amplificar en PCR fragmentos que correspondieran a los diferentes genes de las porinas *ompC*, *ompF1* o *phoE* además de fragmentos de secuencias similares u homólogas en los que podría encontrarse la secuencia que denominamos *ompF2*. Estos fragmentos podrían servir posteriormente como sondas homólogas para encontrar los genes completos en un banco de genes de *S. typhi*. En la **tabla 1** se comparan los resultados esperados y los obtenidos de estos experimento y en la (**Fig. 9**) se muestran los productos de la PCR.

Tamaño esperado del producto (pb) en las PCR

Para el gen	Oligo		
	A	C	D
Stp <i>ompI</i>	596	<u>601</u>	<u>498</u>
Stp <i>ompC</i>	566	571	471
Eco <i>ompF</i>	515	<u>520</u>	<u>420</u>
Eco <i>ompC</i>	545	520	450
Stp <i>phoE</i>		511	490

Tamaño obtenido de la amplificación genómica (pb)

DNA de <i>E. coli</i>	<u>520</u>	<u>420</u>
DNA de <i>S. typhi</i>	<u>600</u>	<u>490</u>
Fragmentos de DNA de <i>S. typhi</i> de 3.5 Kb de <i>StyI</i>		<u>510</u>



Figura 9.-Productos de las PCR, en los carriles 1 y 2 se muestran los obtenidos utilizando como molde el DNA genómico de *E. coli*, con los oligos C y D respectivamente, en los carriles 4 y 5 los obtenidos utilizando como molde el DNA genómico de *S. typhi* con los oligos C y D respectivamente.

En este contexto, se diseñaron dos pares de oligonucleótidos; los pares "C" y "D", cuyas características se describen en Materiales y Métodos. Cada par de oligonucleótidos se utilizó en reacciones de PCR, en donde el molde fue DNA genómico de *S. typhi* y de *E. coli*, y como control negativo se hacían las mismas reacciones sin agregar DNA. En las reacciones en donde se utilizó como templado el DNA de *E. coli* se amplificó un producto de aproximadamente 520 pb con los oligos "C", y de aproximadamente 420 pb, con los oligos "D", por el tamaño estos fragmentos podrían corresponder al gen *ompF*. Para *S. typhi* se obtuvieron los siguientes productos: con el par de oligos "C", un fragmento de 600 pb y con el par de oligos "D" uno de 490 pb que podrían ser fragmentos de los genes *ompF1* o *phoE* (ver tabla 1).

Cada uno de los productos de PCR, obtenidos apartir del DNA genómico de *S. typhi* fueron utilizados como sondas de hibridación contra DNA digerido con *Sal I* para confirmar su identidad, esperando obtener hibridación con alguna de las bandas que podrían corresponder a genes nuevos. Estos experimentos demostraron que todos los productos obtenidos hibridaron con la banda que reconoce el gene *ompF1* (datos no mostrados), inclusive cuando se utilizó como molde el fragmento de DNA de 3.5 kb que se obtenia de las digestiones con *Sty I* que supuestamente es el que contiene la secuencia del gen *ompF2*.

Identificación de los mensajeros

Una estrategia que nos pareció interesante fue analizar los

RNA mensajeros. Se propuso que podría ser posible amplificar el gen homólogo al gen *ompF* de *E. coli* mediante experimentos de PCR reverso. Esto sería factible si de algún modo la cantidad de transcritos de este gen se enriquecía con respecto a los de otros genes de porinas. Para realizar este experimento, se crecieron bacterias de *S. typhi*, cepa IMSS-1, tanto en alta como en baja osmolaridad, ya que la expresión del gen *ompF* aumenta en baja osmolaridad y disminuye en alta, esta sería la condición que permitiría aumentar el mensajero. Se extrajo RNA de las bacterias crecidas en ambas condiciones y se utilizó en reacciones de transcriptasa reversa, utilizando como iniciadores los pares de oligos "C" o "D" 3' para después amplificar el cDNA en PCR (ver Materiales y Métodos).

Para saber que gen o genes se amplificaron, se hicieron dos cosas: por un lado, como sabíamos que segmentos de las secuencias de los genes *ompC* y *ompF* eran factibles de ser amplificados con los oligonucleótidos utilizados, se buscaron sitios de restricción únicos, tanto en la secuencia de *ompF1*, como en el gen *ompC*. El análisis de las digestiones correspondientes, sugirió que sólo se había amplificado un fragmento correspondiente al gen *ompC* en ambas condiciones. Por otro lado, al hibridar, este producto de PCR, contra DNA genómico, sólo se observó la señal de hibridación correspondiente al gen *ompC*.

Clonación del DNA genómico

Paralelamente a los experimentos de PCR y PCR reverso, la segunda estrategia utilizada consistió en la construcción de un

banco de genes DNA de *S. typhi*, en el vector pUC18 utilizando DNA genómico digerido con *Sal I*. En un principio se trato de purificar los fragmentos de DNA de 2.3 kb y de 5.6 kb a partir del gel, sin obtener resultados positivos, por lo que se describe unicamente la clonación de los fragmentos de DNA sin purificar. Una vez hecho el tamizaje del sub-banco, se obtuvieron cuatro plásmidos recombinantes que dieron señal positiva en las hibridaciones; todas con un inserto de peso molecular aproximado de 2.3 kb. En Materiales y Métodos se describe la estrategia utilizada para tamizar dicho sub-banco. El análisis detallado de las cuatro clonas mostró que todas contenían el mismo inserto, por lo que se decidió seguir trabajando con sólo una de ellas, a la cual se le denominó pL15.

Cuando este fragmento se hibrido contra el DNA genómico de *S. typhi* el patrón de hibridación fue diferente que el que se origina con los genes *ompC*, *phoE* u *ompF1*, con lo que quedaba descartado que el fragmento clonado fuera uno de estos genes. La siguiente pregunta era saber a cual de ellos se parece más. Para ello, se digirieron con las enzimas adecuadas, cada una de las clonas que contienen estos genes : pVF27, que contiene el gen *ompC*; pAT51, que contiene el gen *phoE*; y pF2, que contiene el gen *ompF1*. Como control negativo, se utilizó la clona pIM18, que contiene el gene *ompR*. Se separaron en un gel de agarosa, cantidades iguales de DNA digerido de cada una de las clonas, teniendo cuidado que hubiera menos DNA de la clona homóloga pL15; se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se hibridaron con el fragmento de 2.3

kb de la clona pL15. En estos experimentos, se observó mayor intensidad de hibridación heteróloga con el gen *ompC* (Fig 10).

En experimentos en donde se transformó una cepa de *E. coli* MC4100 y de *S. typhi* IMSSI, con el plásmido pL15, de las que posteriormente se hicieron preparaciones de PME, no se observó ningún producto proteico que se aloje en la ME de estas bacterias proveniente del pL15. Una posible explicación es que el gen no se encuentre completo o que su expresión sea basal de tal forma que la proteína no se observa en las preparaciones de PME.

Sin embargo la secuencia nucleotídica del inserto del plásmido pL15, muestran una posible fase abierta de lectura, que se aloja hacia el centro del inserto, y muestra alrededor del 50% de identidad con *ompF* de *E. coli*, lo que apoya la presencia de un nuevo gen para una OMP de *S. typhi* (Fig 11), que al igual que *ompF1* se expresa a niveles mucho menores que las porinas principales, en condiciones de laboratorio, ocurriendo lo mismo cuando se encuentra en un plásmido multicopia. Las implicaciones y algunas especulaciones de los resultados obtenidos se discuten a continuación.

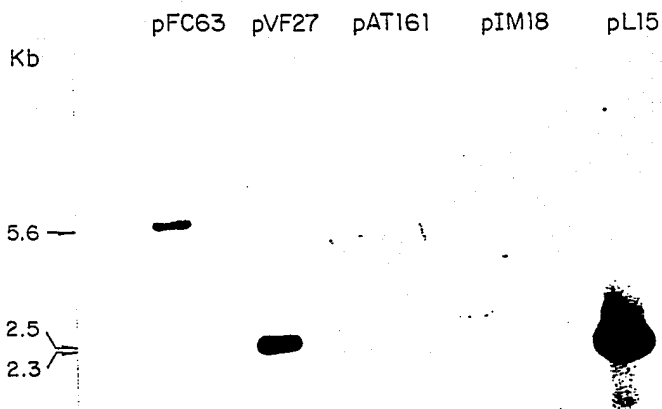
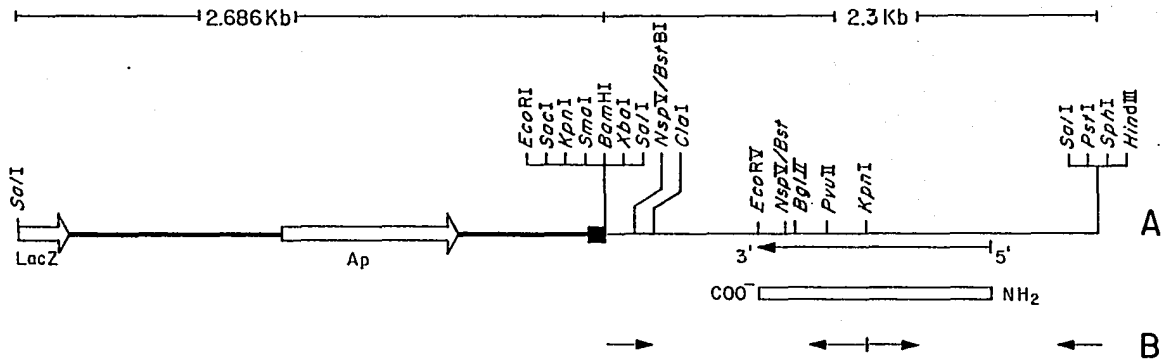


Figura 10.-Autorradiograma en donde se muestran las hibridaciones del fragmento clonado en el pL15 con los plásmidos pFC63 (*ompF1*), pVF27 (*ompC*) pAT161 (*phoE*), pIM18 (*ompR* y *envZ*) y con el plásmido pL15.



A) Mapa parcial de pM15

B) Estrategia inicial de secuenciación

DISCUSION

En esta trabajo se siguieron diferentes estrategias para la identificación de secuencias similares u homólogas a el gen *ompF* de *E. coli*. La actividad anómala de la enzima *Sal I* hizo difícil la identificación de estas secuencias, los resultados de este experimento sugieren que la señal de hibridación de 3.5 kb efectivamente se debe a una actividad estrella de la enzima, sin embargo la señal de 2.3 kb parece deberse mas bien a la eficiencia de ésta, así en los lotes en donde la eficiencia es alta, la señal de 2.3 kb se observa perfectamente y en los lotes en donde la actividad es baja esta señal no se observa. Otra posible explicación es que la enzima no tenga la misma accesibilidad a estos sitios. En las hibridaciones del DNA genómico de *S. typhi* digerido con *Sal I* por diferentes períodos de tiempo contra el gen *ompF*, se observó que las señales de hibridación fueron constantes independientemente del tiempo y de la concentración de la enzima para ese lote de enzimas, los resultados de este experimento sugieren que en *S. typhi* existen secuencias similares al gen *ompF*.

Como se mencionó anteriormente, en nuestro laboratorio se aisló un gen a partir de un banco de genes contenido en un fragmento de 5.6 kb de *Sal I* el cual se secuenció y se caracterizó como *ompF1* pensando en que era el homólogo del gen *ompF* de *E. coli*, sin embargo este gen no codifica para la proteína del mismo peso molecular que la que se observa en un perfil electroforético de preparaciones de PME de *S. typhi* a la cual se le ha llamado *OmpF* debido a que su tamaño y regulación es similar al de *E. coli*. Por

lo tanto el gen que codifica para OmpF de *S. typhi* no se ha aislado ni estudiado pudiendo estar contenido en cualquiera de los fragmentos de *Sal I* ya sea el de 2.3 kb, el 5.4 kb o en un fragmento de peso molecular mas alto. El objetivo de este trabajo fue analizar estos fragmentos con el propósito de identificar secuencias similares al gene *ompF* en donde posiblemente estén contenidos nuevos genes relacionados a porinas, sin embargo no podemos descartar que podrían tratarse de pseudogenes.

Como se mencionó se siguieron dos vías distintas llevadas acabo paralelamente. Por la estrategia de las PCR no se logró amplificar estas secuencias con los oligos diseñados, sin embargo creemos que por medio de estos experimentos es posible amplificar secuencias relacionadas a genes de porinas además de la secuencia de *ompF*, modificando las condiciones de las reacciones, combinando los pares de oligos, diseñando oligos de regiones conservadas en donde se encuentren aminoácidos que siempre están presentes entre las porinas por ejemplo el aminoácido arginina que se encuentra en la región conservada cuatro (ver fig. 2).

En cuanto a los experimentos de PCR reverso existen varias posibilidades que pudieran explicar porque no se identificó el transcrito del gen *ompF* de *S. typhi* una de ellas es que *ompF* no se este transcribiendo en la fase de crecimiento en que las bacterias fueron cosechadas, que las condiciones de crecimiento no sean las adecuados para que el gen se transcriba o que el transcrito este degradado. No se insistió en estas metodología puesto que en el sub-banco de genes de *S. typhi* construido paralelamente a estos

experimentos se identificaron plásmidos recombinantes que contenían secuencias similares a *ompF*. Esta parte del trabajo sin embargo también tuvo ciertas dificultades metodológicas, como se mencionó en los resultados, el sistema de selección de plásmidos recombinantes fue difícil, debido a que la sonda utilizada fue un gen de *E. coli*, en las hibridaciones en colonia se observó mucho fondo debido a la hibridación de la sonda con el genoma de *E. coli*, por otro lado por la gran similitud que existe entre los genes de las diferentes porinas la hibridación de la sonda con otros genes tanto de *S. typhi* como de *E. coli* hacía mas difícil la identificación de los plásmidos recombinantes que contenían las secuencias de *S. typhi* en las cuales estamos interesados. Debido a la estrategia que se siguió para aislar los plásmidos recombinantes no fue posible aislar alguna de las otras secuencias similares de peso molecular alto, pues el crecer cada una de las 750 clonas fue un paso que nos limitó en poder analizar un mayor número de éstas, por el tiempo que esto implicaba.

Los datos de la secuencia parcial del fragmento de 2.3 kb aislado revelan la existencia de un posible marco de lectura abierto, en el cual existen secuencias altamente conservadas entre los genes de las porinas lo que sugeriría la presencia de un gen no reportado anteriormente para una PME. Esto resulta muy interesante desde el punto de vista de las ventajas que le confiere a la bacteria.

La capacidad de un organismo para adaptarse al ambiente, es la clave de su sobrevivencia. Organismos patógenos como *S. typhi* deben

adaptarse a cambios ambientales que acompañan la transición de un estado de vida libre a un nicho asociado al hospedero (tracto digestivo, torrente sanguíneo etc). Estas fluctuaciones ambientales ejercen en la bacteria una gama muy variada de condiciones que causan estrés, tales como temperatura, osmolaridad, disponibilidad de oxígeno, pH, disponibilidad de nutrientes, mecanismos de defensa del hospedero y las actividades de otros miembros de la microflora (Dorman y Ni Bhriain, 1993).

Para sobrevivir y proliferar en un nicho ecológico, las bacterias patógenas han desarrollado estrategias para evadir los mecanismos de defensa específicos y no específicos del hospedero. Estos mecanismos comprenden mimetismo con antígenos del hospedero, sobrevivencia en fagocitos y variación en los antígenos de superficie, pudiendo estar entre éstos las PME (Nassif et al., 1993). En la ME de *E. coli* y *S. typhi* uno de los componentes mas abundantes son las porinas, ha sido ampliamente estudiado que éstas son antígenos de superficie.

El hecho de que las porinas se encuentren ampliamente distribuidas en eubacterias termófilas, sugiere que éstas aparecieron muy temprano en la evolución ya que proteínas que faciliten el transporte de solutos, son una característica indispensable en un sistema de doble membrana. (Rachel et al., 1993).

Esto nos permite postular que el "set" de porinas necesarias para la sobrevivencia puede ser medianamente grande y por lo tanto pueden existir porinas no caracterizadas con funciones específicas

desconocidas. Un ejemplo de una porina, con función desconocida, es la codificada por el gen *ompF1*, que parece no estar presente en *E. coli* y cuya expresión en *S. typhi* parece ser mucho menor que las proteínas principales (Fernandez-Mora 1993). En este trabajo se aislo una gene para una nueva porina, con similitud al gen *ompF* de *E. coli*, y cuya función también es desconocida.

En conclusión, las bacterias para contender con diferentes situaciones ambientales, que van desde la vida libre hasta los diferentes microhabitats con los que se enfrenta a través de la infección, probablemente evolucionaron hasta tener un juego polifacético de porinas.

Con respecto a los mecanismos evolutivos de formación de familias de proteínas, pueden especularse varios aspectos. Quizá a partir de una porina primigenia, cuyas características pudieron haber sido una permeabilidad general, con poca especificidad pero muy versátil, haya sufrido cambios evolutivos como duplicación génica. De esta manera, un gen mantendría la función, y por lo tanto la viabilidad de la célula, mientras que el duplicado o los duplicados podrían mutar (por deriva génica) y poseer diferentes funciones. También podría mutar el promotor y ocasionar un cambio en el patrón de expresión.

Así, las regiones altamente conservadas, flanqueando regiones variables, promoverían la recombinación intragénica entre copias silenciosas, pseudogenes y genes usualmente expresados.

Las regiones variantes y los genes silenciosos pudieran representar el repertorio genético que una cepa usaria para variar

sus PME, creando genes mosaico compuestos de segmentos de dos o más genes donadores. La recombinación se puede primero llevar a cabo entre dos loci del mismo cromosoma; o bien entre dos cromosomas en contacto mediante un proceso de conjugación o transformación, lo que involucraría la transferencia horizontal de genes incluso de otra especie aumentando aun mas la variabilidad.

Un ejemplo de diversidad antigénica es el caso de algunos protozoarios como los tripanosomas africanos que durante su ciclo de vida, habita en la mosca tsetse y en el torrente sanguíneo de mamíferos. En el torrente sanguíneo, cada parásito se cubre con cerca de 1×10^7 moléculas de proteínas, ancladas a glicolípidos llamadas glicoproteínas variantes de la superficie (VSG). El parásito evade la respuesta inmune del huésped, al interrumpir periódicamente la expresión de una VSG y expresar una diferente VSG, en un proceso llamado variación antigénica. El genoma del tripanosoma, tiene algunos cientos de genes de VSG, disponibles para la expresión en el torrente sanguíneo, de los cuales solamente uno es expresado a la vez permitiendo así escapar del sistema inmune del huésped (Lu et al., 1993).

La variación antigénica, como una ventaja de la bacteria para escapar del sistema inmune del huésped, ha sido ampliamente estudiado en *Neisseria*, y en *Borrelia* (Girons et al., 1991; Nassif et al., 1993; Hass et al., 1992; Suker et al., 1994)

El proceso de variación antigénica pudiera conferir a las bacterias varias ventajas, como la formación de pseudogenes no funcionales que permitieran una mayor variabilidad, ya que al ser

silenciosos no tendrían expresión fenotípica y por lo tanto no habría efectos deletereos. Por otro lado, al existir múltiples copias con secuencias homólogas, favorecería la recombinación homóloga espontánea, lo que permitiría la formación de genes quiméricos con epítopes nuevos de manera que al expresarse éstos alternativamente, la bacteria escaparía al sistema inmune.

Las ventajas de tener familias de porinas serían: reducción del gasto metabólico al solo expresar las porinas importantes en el momento adecuado; una mayor eficiencia de la porina para transportar a su soluto (cinéticas mas rápidas), una mayor selectividad y una permeabilidad que favoreciera la entrada de moléculas benignas y evitar la de las dañinas, una mayor flexibilidad ante medios cambiantes y diversidad de antígenos de superficie permitiendo a la bacteria escapar del sistema inmune. Así, al aumentar la selectividad y la permeabilidad a tipos de moléculas específicas, se permitiría que la bacteria utilizara recursos en concentraciones muy bajas cuando fuese necesario. En conclusión el estudio de la estructura y función de las porinas bacterianas y sus genes ofrece la oportunidad de profundizar en conceptos de evolución, regulación genética y ecología bacteriana, existiendo todavía un área de investigación muy amplia.

LITERATURA CITADA

- * **Aiba, H., Adhya, S. y Crombrugghes.** 1981. Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* **256**(22):11905-11910
- * **Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. eds.** 1992. *Current protocols in Molecular Biology.* Greene Publishing Associates and Willey Interscience. N.Y.
- * **Bernardini, M. L., Sanna, M. G., Fontaine, A. y Sansonetti, P. J.** 1993. OmpC is involved in invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **61**:3625-3635.
- * **Blanco, F., Isibasi, A., González C. R., Ortiz, V., Paniagua, J., Arreguín, C. y Kumate, J.** 1993. Human cell mediated Immunity to porins from *Salmonella typhi*. *Scand. J. Infect. Dis.* **25**:73-80.
- * **Blattner, F.R., B. G. Williams, A. E. Blechl, K. Denniston-Thomson H.E., Faber, D. A. Furlong, D. J. Grunwald, D. O. Kiefer, D. D. Moore, E. L., Sheldon y O. Smithies.** 1977. Charon phages: safer derivatives of bacteriophage lambda for DNA cloning *Science* **196**: 161-169.
- * **Calva, E., J. L. Puente and J. J. Calva.** 1988. Research opportunities in typhoid fever: epidemiology and molecular biology. *BioEssays.* **9**:173-177.
- * **Calva, E., M. Fernández and J. L. Puente.** 1992. Molecular biology of *Salmonella typhi* outer membrane porins. In: Pang, T., C. L. Koh and S. D. Puthuchearry (eds). *TYPHOID FEVER: Strategies for the 90's.* World Scientific, Singapore. pp:24-29.
- * **Chuang, E., Daniels, D. L. y Blattner, F. R.** 1993 Global regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**(7):2026-2036.
- * **Chou, J. H., Greenberg, J. T. y Demple, B.** 1993. Posttranscriptional repression of *Escherichia coli* OmpF protein in response to redox stress: positive control of the *micF* antisense RNA by *soxRS* locus. *J. Bacteriol.* **175**(4):1026-1031.
- * **Cowan, S. W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R. A., Jansonius, J. N. y Rosenbusch, J. P.** 1992. Crystal structures explain functional properties of two *E. Coli* porins. *Nature.* **358**:727-733.

- * **Dorman, C.** 1991. DNA supercoiling and enviromental regulation of gene expression in pathogenic bacteria. *Infection and Immunity* 59(3):745-749.
- * **Dorman, C. y Ní Bhriain, N.** 1993. DNA topology and bacterial virulence gene regulation. *Trends in Microbiology* 1(3):98-99.
- * **Edelman, R. and M. M. Levine.** 1986. Summary of an international workshop on typhoid fever. *Rev. Infect. Dis.* 8:329-349.
- * **Fernández-Mora, M., R. Oropeza, J. L. y E. Calva.** 1993. Characterization of an *ompF*-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. Abstract D-59 in: 93rd General Meeting from the American Society for Microbiology. pp:105.
- * **Finlay, B. B. and S. Falkow.** 1989. *Salmonella* as an intracellular parasite. *Mol. Microbiol.* 3:1833-1841.
- * **Freundlich, M., Ramani, N., Mathew, E., Sirko, A. y Tsui, P.** 1992. The role of integration host factor in gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 6(18):2557-2563.
- * **Girons, S., y Barbour, A. G.** 1991 Antigenic variation in *Borrelia*. *Res. Microbiol* 142:711717.
- * **Graeme-Cook, K. A., May, G., Bremer, E. y Higgins, C. F.** 1989. Osmotic regulation of porin expression: a role for DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* 3(9):1287-1294.
- * **Hass, R., Veit S. y Meyer T. F.** 1992. Silent pilin genes of *Neisseria gonorrhoeae* MS11 and occurrence of related hypervariant sequences among other gonococcal isolates. *Mol. Microbiol.* 6(2):197:208.
- * **Hook, E.** 1990. *Salmonella* species (including Typhoid Fever). In *Principles and practice of infectious diseases*. Pp 1700-1715.
- * **Hutsul, J. y Worobec, E.** 1994. Molecular Characterization of a 40 kDa *OmpC*-like porin from *Serratia marcescens*. *Microbiology* 140: 379-387.
- * **Inocuchi, K., Mutoh, N., Matsuyama, S. y Mizushima, S.** 1982. Primary structure *ompF* gene that codes for a mayor outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 10(21):6957-6968.
- * **Isibasi, A., V. Ortiz, M. Vargas, J. Paniagua, C. González, J. Moreno and J.**

- Kumate.** 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d,Vi. *Infect. Immun.* **56**:2953-2959.
- * **Jeanteur, D., Lakey, J. H. y Pattus, F.** 1991. The Bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction. *Mol. Microbiol.* **5**(9):2153-2164.
 - * **Karn, J., S. Brenner, L. Barnett y G. Cesareni.** 1980. Novel Bacteriophage lambda cloning vector *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**:5172-5176.
 - * **Lu, Y., Hall, T., Gay, L. S. y Donelson, J. E.** 1993. Point mutations are associated with a gene duplication leading to the bloodstream reexpression of a tripanosome metacyclic VSG. *Cell* **72**:397-406.
 - * **Maniatis, T. Fritsch, E. F. and Sambrook, J.** 1992. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.
 - * **Mekalanos, J. J.** Enviromental signal contolling expression of virulence determinantes in bacteria. *J. Bacteriol.* **174**(1):1-7.
 - * **Misra, R.** 1993. OmpF assembly mutants of *Escherichia coli* K-12: isolation, characterization and suppressor analysis. *J. Bacteriol.* **175**(16):5049-5056.
 - * **Mizuno, T. y 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**(7):1077-1082.
 - * **Mutoh, N, Nagasawa, T. y Mizushima, S.** 1981. Specialized transduction bacteriophage lambda carrying the structural gene for a major outer membrane matrix protein of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* **145**(2): 1085-1090.
 - * **Nakae, T.** 1986. Outer membrane permeability of bacteria. *Crc. Crit. rev. Microbiol.* **13**:1-62.
 - * **Nassif, N., Lowy, J., Stenberg, P., O'Gaora, P., Ganji, A., y So., M.** 1993. Antigenic variation of pilin regulates adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells. *Mol. Microbiol* **8**(4):719-725.
 - * **Nikaido, H. and M. Vaara.** 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**:1-32.
 - * **Nikaido, H.** 1992. Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Mol.*

Microbiol. 6:435-442.

- * **Nikaido, H.** 1994. Porin and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J. Biol. Chem.* **269**(6):3905-3908.
- * **Perez Valle Edelmira.** 1994. Efecto del suero de humano sobre la expresión de las proteínas de la membrana externa de *S. typhi*. *Tesis de licenciatura en biología. Universidad Autonoma del Estado de Morelos.*
- * **Pitcher, D. G., Saunders, N. A., Owen, R. J.** 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* **8** 151-156.
- * **Puente, J. L.** 1987. Aislamiento de los genes *phoE* y *gltB* de *Salmonella typhi*. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., México.
- * **Puente, J. L., V. Flores, M. Fernández, Y. Fuchs and E. Calva.** 1987. Isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. *Gene.* **61**:75-83.
- * **Puente, J.L., V. Alvarez-Scherer, G. Gosset and E. Calva.** 1989. Comparative analysis of the *Salmonella typhi* and *Escherichia coli ompC* genes. *Gene.* **83**:197-206.
- * **Puente, J.L., A. Verdugo-Rodríguez and E. Calva.** 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.
- * **Rachel, R., Engel, A. M., Huber, R., Stetter, K. y Baumeister, W.** 1990. A porin-type protein is the main constituent of the cell envelope of the ancestral eubacterium *Thermotoga maritima* **262**(1):64-68
- * **Russo, F. D., Saluch, J. M. y Silhavy, T.** 1993 Mutations that affect separate functions of *OmpR* the phosphorylated regulator of porin transcription in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **231**: 261-273.
- * **Southern, E. M.** 1988 Detection of specific sequences among DNA fragments separate by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98** (1975) 503-507.
Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol.* **170** 439-441.
- * **Sharif, T. R. e Igo, M. M.** 1993. Mutations in the alpha subunit of RNA polymerase that affect the regulation of porin gene transcription in *Escherichia coli* K-

12. 175(17):5460-5468.

- * **Suker, J., Feavers, I. M., Achtman, M., Morelli, G., Wang, J-F. y Maiden, M. C. J.** 1994. The *porA* gene in serogroup A meningococci: evolutionary stability and mechanism of genetic variation. *Mol. Microbiol.* 12(2):253-265.
- * **Todt, J. C. y McGroarty, E. J.** 1992. Involvement of histidine-21 in the pH-induced switch in channel size. 31:10479-10482.
- * **Tommassen, J., van der Ley P., van der Ende, A., Bergmans, H. y Lugtenberg, B.** 1982. Cloning of *ompF*, Structural gene for an outer membrane pore protein of *E. coli* physical localization and homology with *phoE* gene. *Mol. Gen. Genet.* 185:105-110.
- * **Tommassen, J., Agterberg, M. Janssen, R. y Spiering, G.** 1993. Use of the enterobacterial outer membrane protein PhoE in the development of new vaccines and DNA probes. *Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.* 278(2-3):396-409.
- * **Torres, E. A.** 1993. Caracterización parcial del gene que codifica para la proteína de membrana externa PhoE, de *Salmonella typhi*. Tesis de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Puebla. Tecamachalco, Pue., México.
- * **Tsang, R. S. W., P. Y. Chau, S. K. Lam, J. T. La Brooy and D. Rowley.** 1981. Antibody response to the lipopolysaccharide and protein antigens of *Salmonella typhi* during typhoid infection. *Clin. Exp. Immunol.* 46:508-514.
- * **Tsung, K., Brissette, R. E. y Inouye, M.** 1989. Identification of the DNA-binding of the OmpR protein required for transcriptional activation of the *ompF* and *ompC* genes of *Escherichia coli* by in vivo DNA footprinting. *J. Biol. Chem.* 264(17):10104-10109.
- * **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.
- * **Verdugo - Rogdríguez, A. and Calva, E.** 1993a. Denaturing treatment of *S. typhi* outer membrane protein preparations for improved immuno diagnosis of typhoid fever.

AsPac. J. Mol. Biol. Biotechnol. I: 113-116

- * **Verdugo - Rodríguez, A., Gaus, L - H., Devi, S., Koh, C. L., Puthucheary, S. D., Calva, E. and Pang, T.** 1993 b. Detection of antibodies against *Salmonella typhi* outer membrane protein (OMP) preparations. Asian Pacific J. Allergy Immunology 11: 45-52.
- * **Verdugo - Rodríguez, A., López - Vidal, Y., Puente, J. L., Ruíz - Palacios, G. M. and Calva, E.** 1993 c. Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12 248-254.
- * **Williams, P.** 1987. Phenotypic plasticity, the bacterial cell envelope and infection. Commemorating memories the centenary symposium of the Pasteur. University of Nottingham.