

① 2ej.

RECIBO
EL 20 DE JULIO DE 1989

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

CENTRO DE INVESTIGACIÓN SOBRE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

VARIABILIDAD GENÉTICA DE OMPc DE SALMONELLA TYPHI

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA EL ALUMNO

VERÓNICA ALVAREZ SCHERER

Cuernavaca, Mor., julio de 1989.

TEMA CON
FALSA DE 0807



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

INTRODUCCION.....	1
Epidemiología.....	2
Cuadro clínico.....	2
Métodos de diagnóstico para la fiebre tifoidea.....	4
Intereses de nuestro grupo de investigación.....	5
La membrana externa.....	7
Proteínas de la membrana externa.....	9
El gen <i>ompC</i> de <i>S. typhi</i>	12
OBJETIVOS.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
RESULTADOS.....	24
DISCUSION.....	41
CONCLUSIONES.....	50
BIBLIOGRAFIA.....	52
APENDICE I.....	55

INTRODUCCION

La investigación en los países en vías de desarrollo ha sido enfocada en forma sustancial al estudio de problemas en salud. Por otro lado, los avances tecnológicos han sido sorprendentes en los países desarrollados. Actualmente, se cuenta con una gran variedad de metodologías que permiten abordar, de forma precisa, problemas de investigación desde diferentes puntos de vista. Algunos de estos avances tecnológicos están siendo aplicados en los países en vías de desarrollo. En México, las enfermedades infecciosas son una de las principales causas de morbi-mortalidad de la población, afectando principalmente a la población infantil. Es por ello que resulta de gran importancia que las nuevas metodologías, como las utilizadas en biología molecular, sean aplicadas para obtener un mejor conocimiento de este tipo de enfermedades y así generar mecanismos de control y prevención a corto y mediano plazo.

En nuestro laboratorio nos hemos enfocado al estudio del agente causal de la fiebre tifoidea (FT), ya que es un problema de salud pública en nuestro país. La FT se conoce como una enfermedad desde 1829 cuando el Dr. P. Ch. A. Louis, en París, la describió y separó de otras enfermedades febriles (Edelman y Levin, 1986). Desde esa época se le asoció un cuadro clínico característico, que consistía principalmente en lesiones en el intestino, nódulos linfáticos mesentéricos y bazo. Recientemente,

se ha descrito la roseola, y se agregaron la perforación y la hemorragia intestinal y la hepatitis salmonelósica como posibles complicaciones.

Epidemiología

Actualmente, la FT afecta principalmente a los países en desarrollo. Se calcula que hay 12.5 millones de casos anualmente (excluyendo a China); lo que representa una incidencia de 365 casos por cada 100,000 habitantes del total de la población mundial y 540 por cada 100,000 en los países del tercer mundo. La tasa de muerte mundial es del 1% de los casos reportados (Calva et al. 1988; Edelman et al. 1986).

Cuadro clínico de la FT

S. typhi es el microorganismo responsable de la FT. Es una enterobacteria gram-negativa que pertenece al serotipo 9,12,d,Vi. Esta clasificación está basada en: 1) la unidad repetitiva del azúcar del antígeno somático, también conocido como antígeno O (9,12), el cual forma parte del lipopolisacárido de la membrana externa; 2) el antígeno flagelar H (d); y 3) el antígeno capsular K (Vi) (Davis, B.D. et al. 1980).

S. typhi penetra al humano por vía oral, la infección tiene un periodo de incubación de 10 a 14 días, pero se han reportado casos de 3 hasta 60 días. Uno de los grandes inconvenientes para el estudio de la FT es la carencia de un modelo animal. El modelo más cercano y aceptado para el estudio de los mecanismos de patogenia de *S. typhi*, es el del ratón, huésped natural de

Salmonella typhimurium. Esta enterobacteria produce salmonelosis murina: una enfermedad que se asemeja a la del hombre. Se ha demostrado que S. typhimurium invade las placas de Peyer a través de las células "membranosas" ("M"). Posteriormente alcanza el sistema reticuloendotelial, se replica en el interior de los macrófagos, e invade los nódulos linfáticos mesentéricos, el bazo, y el hígado. Los mecanismos por los cuales la bacteria lleva a cabo estos procesos invasivos aún se desconocen.

Dentro de las manifestaciones clínicas, la fiebre es la más importante, la cual oscila entre 39 y 40 °C durante la primera semana de la enfermedad y se acompaña generalmente de bradicardia. Otras manifestaciones son la cefalea, malestar general y, en ocasiones, náuseas, diarrea, vómito, pérdida del apetito, dolor abdominal, mialgias y escalofrío (Harrisson et al, 1983). Ocasionalmente, se presentan tos y signos de bronquitis, roseola de corta duración en el tronco; la esplenomegalia y la leucopenia son bastante comunes (Davis, et al, 1980). Las complicaciones que se han observado son hemorragia intestinal, hepatitis y, en la tercera semana, perforación intestinal, la cual es una de las principales causas de muerte. El tratamiento antimicrobiano se hace a base de cloramfenicol a una dosis de 50mg/kg/día, que es el de primera elección; o bien ampicilina 100mg/kg/día o sulfametoxazol con trimetoprim 320mg/kg/día (Calva et al, 1988). Sin embargo, a pesar del uso de medicamentos durante la enfermedad, los pacientes presentan

malestar general, dejando su actividad cotidiana durante tres semanas, lo que representa una pérdida significativa en su productividad.

En México existen otras especies de Salmonella que causan gastroenteritis en humanos. Estas presentan periodos de incubación menores al de la FT y son infecciones autolimitadas; generalmente no necesitan tratamiento antimicrobiano. Durante 1978, en Estados Unidos, el 34.8% de los aislamientos de Salmonella efectuados correspondieron a Salmonella typhimurium (Davis et al, 1980).

Cabe mencionar que uno de los factores fundamentales que intervienen en el tipo de relación huésped-parásito es el estado inmune del huésped. Por otro lado, los factores ambientales, las exposiciones previas al antígeno, el estado nutricional y las infecciones simultáneas, pueden jugar un papel importante en el grado de severidad de la enfermedad. Evidentemente, es necesario un mayor conocimiento básico sobre la biología de Salmonella typhi para el mejor entendimiento de los mecanismos de patogenia de esta enterobacteria.

Métodos de diagnóstico para la FT

Actualmente, en los países en vías de desarrollo existe la necesidad de desarrollar un método de diagnóstico barato, sencillo, rápido, altamente sensible y específico, que pueda distinguir la FT en etapas tempranas de otras enfermedades infecciosas causadas por otros organismos. La búsqueda de anticuerpos aglutinantes y el cultivo de la sangre son los

métodos de primera elección para el diagnóstico de Salmonella typhi. La prueba de Widal, mejor conocida como "reacciones febriles", es la de mayor uso y se basa en la detección de anticuerpos contra los antígenos H y O. Es una prueba rápida, sencilla y tiene una especificidad aproximada del 95% y sensibilidad entre el 60 y 90% en áreas no endémicas (Leong, L.P., 1986). Sin embargo, tiene el gran inconveniente de no ser específica ni sensible en áreas endémicas. El método diagnóstico con el que mejores resultados se han obtenido, es el aislamiento de Salmonella typhi en cultivo con muestras de aspirado de médula ósea; el gran inconveniente es lo agresivo que resulta para el paciente la toma de la muestra. Como ya se mencionó, el hemocultivo es más común, pero su especificidad no es mayor al 90% y la identificación de la bacteria tarda más de 48 horas. Por todo lo anterior, la FT se diagnostica fundamentalmente con base en el cuadro clínico y pocas veces se puede complementar el diagnóstico con pruebas de laboratorio confiables, en etapas tempranas de la enfermedad, en hospitales con pocos recursos.

Intereses de nuestro grupo de investigación

Existen múltiples áreas en el estudio de la FT, que no han tenido suficiente atención, como por ejemplo: la relación huésped-parásito; los mecanismos de resistencia al suero y a la fagocitosis; los factores necesarios para la invasión y la adherencia; y los mecanismos de inmunidad celular y humoral que operan durante la infección. Los conocimientos obtenidos con el

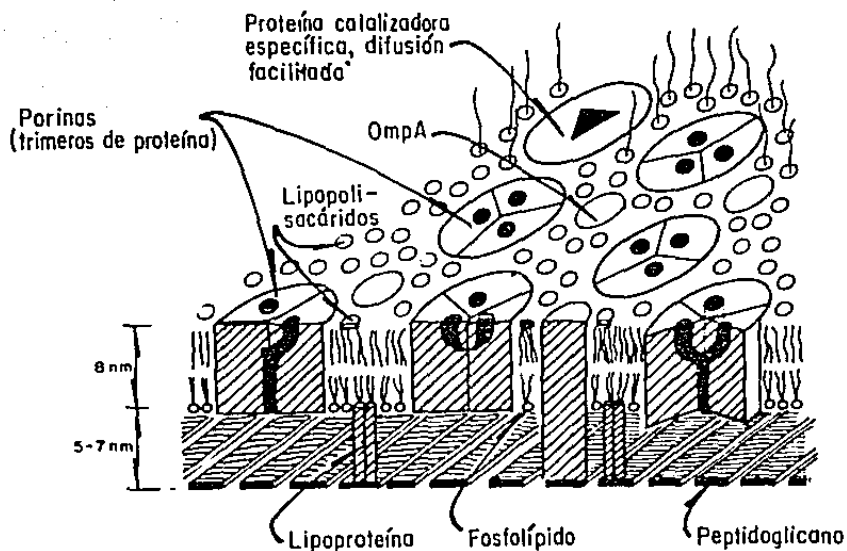
estudio de estas áreas pudieran marcar la pauta para el desarrollo de medidas adecuadas de control y prevención de esta enfermedad, aun más eficientes que con las que se cuenta actualmente. Es importante subrayar, asimismo que el estudio de la FT, como el de otras enfermedades infecciosas, permite explorar áreas desconocidas de las ciencias biológicas, dándonos la oportunidad de generar conocimientos básicos en diferentes áreas como son: regulación genética, contacto intercelular, regulación del sistema inmune, entre otras.

Nuestro grupo ha estado interesado en el estudio de los antígenos de superficie de *S. typhi*, no sólo con el propósito de generar conocimiento básico en biología molecular, sino también con el de aplicarlo en el campo del diagnóstico y/o profilaxis de la enfermedad. Hasta el momento, en el laboratorio, se han clonado los genes para las proteínas de membrana externa (PsME) OmpC, OmpF y PhoE y se ha caracterizado y secuenciado el gene para la PME OmpC (Puente et al, 1987). Así mismo, se ha clonado y se está caracterizando el gene para la enterotoxina (SE) (Fernández et al, 1988).

Por otro lado, se ha demostrado mediante experimentos con ELISA, que pacientes con FT generan anticuerpos específicos en contra de preparaciones de PsME (Verdugo et al Abstr. ASM 1989, #C319). Por otro lado, se le ha atribuido a una porina de 36 kDa de *Salmonella typhimurium* la capacidad de inducir el desarrollo de hipersensibilidad retardada, reflejo de la inmunidad celular (Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V.R., 1987b).

La membrana externa

Salmonella typhi es una bacteria gram-negativa. Este grupo de enterobacterias tienen una cubierta celular que esta compuesta por tres capas: una membrana externa (ME), una capa de peptidoglucano y la membrana citoplasmica (Fig.1).



Modelo esquemático de la membrana externa de Escherichia coli y Salmonella typhimurium

Se sabe que la membrana externa juega un papel muy importante en la fisiología de las bacterias gram-negativas, puesto que forma una barrera muy efectiva, que protege a las células de la acción detergente de las sales biliares y de la degradación de enzimas digestivas. Así mismo, es una barrera impermeable a muchos antibióticos, que son letales para otras bacterias. Se ha descrito que el lipopolisacárido (LPS), componente característico de la membrana externa, puede conferir resistencia a complemento, a fagocitosis y otros fenómenos de la respuesta inmune (Seifert et al, 1989, Jann et al, 1987). En este contexto, a las porinas de *S. typhi*, se les ha atribuido un efecto hemolítico (Calderón et al, 1984).

Desde el punto de vista inmunológico, la ME de las enterobacterias desempeña un papel fundamental en la respuesta inmune del huésped, ya que porta antígenos de superficie que pudieran interactuar con las células de defensa. Entre los principales antígenos de superficie con los que cuenta la Salmonella y de los que más información se tiene, están el antígeno (Ag) flagelar H, el antígeno somático O, el cual está representado principalmente por el LPS, y el antígeno Vi o capsular K (Davis et al, 1980).

Con lo que respecta al antígeno H, se postula que es poco inmunogénico, y cuando induce anticuerpos éstos no son protectores (Isibasi et al 1986). Se ha comprobado que el Ag Vi no es un buen inmunógeno en células intactas. Esto difiere cuando se utiliza en forma purificada, probablemente porque se elimina la competencia inmunogénica (Tsang et al, 1987). Por otro

lado, en cuanto al Ag O ó LPS, existen muchas controversias desde hace años en relación a la naturaleza protectora de los anticuerpos (Acs) inducidos. Se ha visto que estos Acs correlacionan bien con infecciones previas, pero no son protectores contra Salmonella tanto en humanos como en ratones (Isibasi et al, 1988).

Proteínas de la membrana externa (PsME)

Ultimamente se ha dado mucha importancia a las proteínas de membrana externa (PsME) de las bacterias, no sólo por sus posibles implicaciones en la patogenia (Isberg et al. 1987; Cornelis et al, 1987; Roth, 1988; Yuan et al, 1989), sino como antígenos de superficie (Calderón et al, 1986). Se ha descrito, en un estudio comparativo sobre la inducción de Acs por los Ag H.O y por las porinas de Salmonella typhi, que los títulos de estos últimos durante la infección son significativamente más altos, tanto en la fase aguda como en la convalesciente. También se ha comprobado, que además de ser inmunogénicas (Isibasi et al, 1988), las porinas son capaces de conferir protección duradera y de inducir el desarrollo de hipersensibilidad retardada, una manifestación de la inmunidad celular (Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V.R. 1987a; Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V.R., 1987b).

Algunas de las PsME, como es el caso de OmpA, son estructurales y confieren integridad a la ME. Otras denominadas porinas por su capacidad de formar poros en la ME, permiten el paso inespecífico a moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular

y exclusión de moléculas más grandes que pueden ser potencialmente dañinas. Las porinas que más se han estudiado son el producto de los genes *ompC*, *ompF* y *phoE* de *Escherichia coli* K-12. *OmpC* y *OmpF* son proteínas que se osmorregulan; *PhoE* se expresa en condiciones de limitación de fosfatos (Nikaido et al, 1985). Las porinas tienen una estructura trimérica (Nakae et al, 1979), que por estudios de microscopía electrónica y reconstrucción de imagen, se ha observado que presentan tres orificios separados en la superficie externa, que forman un canal único cerca de la mitad de la membrana (Engel et al, 1985).

Actualmente existe un modelo por lo cual se propone como cada monómero de una PME se integra en la ME, de tal forma que la cruce varias veces. Se sabe que las proteínas de membrana externa cuentan con regiones hidrofóbicas cortas, que son las partes fundamentales para que la proteína pueda atravesar la membrana. Las porinas están formadas predominantemente de hojas beta, y conforman dos terceras partes del esqueleto de la proteína (Fig.2) las cuales corren en sentido antiparalelo en el eje transversal al plano de la membrana.

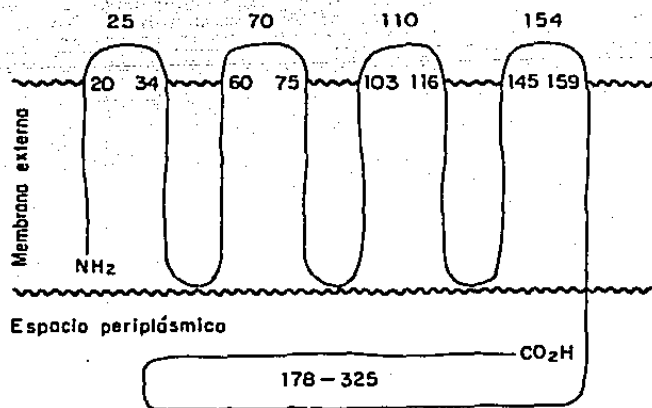


Fig. 2 Distribución hipotética de la proteína OmpA en la membrana externa y sus sitios de inserción (obtenida de Freudl et al, 1986)

Este modelo se ha apoyado en estudios de microscopía electrónica y de cristalografía de rayos X, además de las predicciones de estructura secundaria (Chou et al, 1978) y de los perfiles de hidrofiliidad. Este modelo se ha aplicado para la porina OmpF de *E. coli* (Paul et al, 1985).

En cuanto a OmpA, la proteína estructural de *Escherichia coli*, se ha podido demostrar que algunas de las regiones hidrofílicas están expuestas en la superficie externa de la bacteria (Freudl et al, 1985). Estas demostraciones se han logrado principalmente con estudio de sensibilidad a fagos, ya que las PsME sirven como receptores de bacteriofagos y colicinas. Comparando la secuencia de la proteína OmpA de *Escherichia coli* con OmpA de otras tres diferentes bacterias (Freudl et al, 1983), se ha podido observar, que además de tener el mismo peso molecular, tienen regiones conservadas y regiones variables. Estas últimas son regiones hidrofílicas, algunas de las cuales confieren especificidad para ciertos fagos y colicinas. Se ha comprobado que OmpA de *Shigella dysenteriae* comparte con OmpA de *Escherichia coli* los mismos receptores para los fagos K-3, TuII y O_{x2}; a diferencia de OmpA de *Salmonella typhimurium*, que tiene receptores para O_{x2}, pero no para K-3 o TuII. OmpA de *Salmonella typhimurium* cuenta con un receptor para el bacteriofago 4-59, que no está en las otras dos bacterias. Con este trabajo, Freudl et al pudieron demostrar que los cambios en las especificidades de los fagos estaban dadas por cambios a nivel de la secuencia

nucleotídica que codifica para el receptor. Entre diferentes enterobacterias se han reportado homologías de OmpA hasta del 90% (Nikaido et al, 1985).

Siguiendo este mismo modelo de la distribución de las PsME a través de la membrana, recientemente se ha estado estudiando una de las principales PsME de *Chlamydia trachomatis*, que parece estar involucrada en la adherencia a las células HeLa. Se ha demostrado que esta proteína de 40 kDa está expuesta hacia la superficie externa. Esto se ha podido demostrar tanto con estudios de sensibilidad a tripsina como con Acs monoclonales (Acsm). Con base en la secuencia nucleotídica de esta proteína proveniente de cepas de diferentes serotipos, se ha observado que la proteína está muy conservada. Sin embargo, se han reconocido cuatro regiones variables que pueden ser especie-específicas, subespecie-específicas o subgrupo-específicas (Yuan et al, 1989). Por otro lado, se ha podido demostrar que estos Acsm son protectores (Baehr et al, 1988).

Este modelo de la estructura y conformación de las porinas también se ha demostrado para PhoE. Con Acsm (Van der Ley et al, 1985), se pudo demostrar que esta PME tenía regiones hidrofílicas expuestas, las cuales no estaban en OmpC ni en OmpF, a pesar de la gran homología que existe entre ellas (Mizuno et al, 1983). Además, uno de los anticuerpos monoclonales reconocía y bloqueaba al receptor del fago TC45, específico para PhoE. Uno de los hallazgos interesantes reportado, en este trabajo es que las

regiones expuestas de PhoE se encuentran muy conservadas entre distintas enterobacterias, ya que cinco de los seis Acsm, reconocieron a la PhoE de otras enterobacterias.

Finalmente, sabiendo que las PME son muy similares entre sí, tanto a nivel nucleotídico como a nivel de aminoácidos, se ha sugerido un origen evolutivo común (Mizuno et al, 1983).

El gene OmpC de Salmonella typhi

Se ha observado (Puente et al, 1987) a diferencia de lo que sucede en E. coli, que la porina OmpC de S. typhi, además de ser la proteína más abundante, aparentemente se expresa constitutivamente. Actualmente se cuenta con la secuencia nucleotídica del gene ompC de S. typhi. La comparación con la secuencia equivalente de E. coli ha permitido identificar regiones muy variables entre ellas, las cuales corresponden a regiones hidrofílicas que pudieran estar expuestas en la superficie de la célula (Ver APENDICE I). Se ha propuesto previamente la utilización de oligonucleótidos específicos para el estudio de la variabilidad de OmpC y su gene (Calva et al, 1988). Por esta razón nos hemos planteado las siguientes preguntas: 1) ¿son las regiones hidrofílicas en OmpC características de especie?; 2) ¿son características de género? y 3) ¿si son especie-específicas, podrían ser utilizadas para fines diagnósticos?

El análisis multienzimático ha demostrado ser de gran utilidad para la obtención de información sobre genética de poblaciones, en eucariotes y procariotes (Selander, et al, 1986 y referencias dentro de ésta). Esta herramienta metodológica se ha aplicado para la clasificación de diferentes grupos de bacterias y para establecer las relaciones filogenéticas que guardan entre sí (Selander et al, 1986). En este contexto, recientemente Reeves et al (1989), realizaron un análisis multienzimático para el género *Salmonella*. En este estudio se demostró que las 26 cepas de *S. typhi* probadas, provenientes de distintas partes del mundo, mostraban un tipo electroforético idéntico, lo cual sugiere un origen clonal de estas cepas (Reeves et al, 1989).

Genes de *S. typhi*, que han sido aislados, pueden ser utilizados como detectores en estudios moleculares, aplicándolos a genética de poblaciones. Un acercamiento, es el uso de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PLFR), los cuales podrían permitir la clasificación de diferentes cepas de acuerdo a su origen geográfico o probablemente, al cuadro clínico que inducen. Oligonucleótidos complementarios a regiones de un gene que varían entre género o especie, como sucede en el gene *ompC* de *S. typhi*, pueden ser utilizados para estudiar la variabilidad de ese gene entre diferentes poblaciones (Calva et al, 1988).

OBJETIVOS GENERALES

Analizar la variabilidad genética de *ompC* y su producto en *Salmonella typhi*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Reconocer las regiones no compartidas entre los genes de *ompC* de *S. typhi* y de *E. coli*.
- 2.- Diseñar oligonucleótidos a partir de estas regiones.
- 3.- Analizar si las regiones variables entre *ompC* de *S. typhi* y de *E. coli* se encuentran conservadas en los aislados clínicos de *S. typhi*.
- 4.- Analizar si estas regiones se encuentran conservadas en diferentes aislados clínicos del género *Salmonella*.
- 5.- Mediante la utilización de estos oligonucleótidos, observar si hay polimorfismos en *ompC* tanto dentro de las cepas de *S. typhi* como en diferentes cepas de otras especies.

MATERIALES Y METODOS

CEPAS BACTERIANAS

- *Salmonella typhi*:

a) La cepa IMSS 1 de serotipo 9,12,d,V₁, fue aislada de un paciente con fiebre tifoidea en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

b) La cepa Ty2 de serotipo 9,12,d,V₁ es una cepa de referencia del American Type Culture Collection (ATCC), Núm. 19430.

c) Las cepas MK01, MK12, MK20, MK28 y MK29 fueron aisladas de pacientes con diferentes cuadros clínicos de (FT) incluyendo: (1) el cuadro clínico clásico con fiebre, (2) hepatitis, (3) diarrea y (4) portador asintomático. El aislamiento y la identificación de la especie fue hecha en el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" (INNSZ), a cargo del Dr. Guillermo M. Ruiz-Palacios.

- *Salmonella tychimurium*: cepa de referencia ATCC Núm. CDC6516

- *Salmonella enteritidis*: aislada de un paciente del INNSZ.

- *Salmonella* sp: aislada de un paciente del INNSZ, perteneciente al grupo C, dentro del cual se encuentran *S. choleraesuis*, *S. newport*, *S. hadar*; Reeves, M. W. et al. 1989.

- *Salmonella gallinarum*: serotipo 9,12, de tipo rugosa.

- *Escherichia coli*: Q359 (hsdR-, hsdM-, supE, 080, P2), derivada de K-12, descrita por Karn et al, 1980.

- *Citrobacter freundii* (2 cepas), *Enterobacter cloacae* (1 cepa), *Klebsiella pneumoniae* (2 cepas), *Morganella morganii* (2 cepas), *Proteus mirabilis* (1 cepa), *Proteus vulgaris* (1 cepa), *Pseudomonas aeruginosa* (1 cepa). Todas estas cepas fueron aisladas de pacientes con diarrea en el INNSZ.

EXTRACCION DE DNA

Todas las cepas fueron crecidas inicialmente en cajas de Luria (medio rico), descrito por Maniatis et al (1982). Posteriormente, una de las colonias fue crecida en 2ml del mismo medio y de ahí se tomaron 50 microl para inocular un matraz con 50ml del mismo medio. Las cepas fueron crecidas a 37 gra C durante 8 a 12 horas.

La extracción de DNA fue realizada de acuerdo a la técnica de reportada por Betlach y col., 1976.

PURIFICACION DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA (PsME)

Las cepas fueron crecidas en 2ml de medio "A", descrito por Maniatis et al (1982) previa identificación. Posteriormente 100 microl fueron inoculados en un matraz con 100ml de medio "A". Las temperaturas que se utilizaron en el crecimiento fueron

generalmente de 37 gra C, pero también fueron probadas las condiciones a 5 gra C, 20 gra C y a 40 gra C. Posteriormente se utilizó la técnica para la purificación de las PsME descrita por Matsuyama et al, 1984). Esta consiste brevemente en lavar las células dos veces en Na_2HPO_4 10mM, con una centrifugación intermedia. El rompimiento celular se lleva a cabo por medio de sonicación (siete pulsos de 30 seg con intervalos de 45 seg). Posteriormente se centrifuga a baja velocidad, para después tratar el sobrenadante. Este se centrifuga a 40,000 rpm durante media hora y posteriormente la pastilla se trata con 2% de tritón X-100, se incuba 30min a 37 gra C y se centrifuga a alta velocidad. Finalmente, la pastilla se resuspende en Na_2HPO_4 , se centrifuga a 40,000 rpm. La pastilla se resuspende en una solución amortiguadora con una concentración final de 1% SDS, 1% β -mercapto-etanol y 5% de urea. Las proteínas fueron separadas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 15%/0.1%SDS y en geles de poliacrilamida al 10%/7M urea.

HIBRIDACION TIPO SOUTHERN

Los DNAs de las diferentes enterobacterias fueron digeridos con enzimas de restricción de la casa comercial Promega Biotec, (Madison WI, USA). Para las digestiones se utilizaron 5 unidades de EcoRV o de IagI por microg de DNA. Los fragmentos de DNA fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa

al 1% o 1.5%, con amortiguador Tris-boratos al 1%, a 80 volts por 10 hrs. Se utilizaron 5 microg de DNA por carril. Posterior a esto, los fragmentos de DNA fueron transferidos y fijados a filtros de nitrocelulosa. La fijación del DNA se llevó a cabo mediante la exposición del filtro durante 2 min a luz UV (Khandjian, 1987) o mediante el secado del filtro en un horno a 80 gra C con vacío.

Se utilizaron 10 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos para el marcaje radioactivo. Se utilizaron 75 a 150 microCi de gamma ATP-32P, 10 unidades de polinucleótido cinasa (New England Biolabs, Beverly MA, USA) en cada reacción 20 microl (Maniatis et al, 1982). La marca no incorporada se separó por medio de una columna de 800 microl de Bio-Gel P30, contenida en un Eppendorf, utilizando una centrifuga clinica (Maniatis et al, 1982). Se cuantificó la radioactividad en un contador de Centelleo: la actividad específica estuvo en rangos de 10×10^6 a 10×10^9 cpm/microg.

El filtro de nitrocelulosa fue prehibridado durante 3 hrs con una solución de 6 x NET (0.9M NaCl, 6mM EDTA y 90mM Tris-HCl pH 7.5), 5 x Denhardt (0.1% de ficol polivinipirrolidona y albúmina de suero bovino), 0.05% de SDS, 10% de sulfato de dextrán y 0.1mg/ml de DNA de timo de ternera. La solución de hibridación fue la misma que se utiliza en la prehibridación, excepto por el DNA de timo de ternera. La hibridación se llevó a cabo con 0.5×10^6 cpm del oligo marcado por carril. La temperatura de hibridación fue generalmente de 65 C durante 20 hrs, excepto para el 19mero, cuya temperatura de hibridación fue

a temperatura ambiente. El lavado de los filtros se llevó a cabo en una solución de SSC desde 2X hasta 6X y desde temperatura ambiente hasta 42 gra C. Posteriormente los filtros fueron introducidos en un cassette junto con una placa de rayos X, para obtener un autorradiograma. Estos procedimientos están descritos en el manual de Maniatis et al (1982).

DISEÑO DE OLIGONUCLEOTIDOS

Los oligonucleótidos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis de Macromoléculas del Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, a cargo del Dr. Xavier Soberón. Para esto se utilizaron fosforoamiditas en un soporte sólido (Nielsen et al, 1982). Los oligos fueron diseñados a partir de las regiones variables entre los genes *ompC* de *S. typhi* y *E. coli* y son 100% homólogos a la secuencia de *S. typhi*.

El oligo Núm 1 es un 18amero, con la secuencia GACGACAAAGGCAGCGAC, en dirección 5'-3', que abarca la región del nucleótido +136 al +153 del gene estructural y del aminoácido 25 al 30 de la proteína madura.

El oligo Núm 2 es un 20amero, con la secuencia GCGCGTAGCCGTTGCTGAT, en dirección 5'-3', correspondiente a la región estructural del nucleótido +937 al +956. En cuanto a la proteína madura, abarca del aminoácido 292 al 298.

El oligo Núm 3 es un 19amero, que no abarca la región estructural. Inicia cinco nucleótidos después del codón de término: desde el nucleótido +1140 al +1158 y tiene la siguiente secuencia: TTTAGCAACATCTTTTGCT, en dirección 5'-3'.

El oligo Núm 4 es un 20amero, corresponde a una inserción en el gene de *S. typhi* que no está en el gene de *Escherichia coli*. Abarca la región del nucleótido +802 al +821 del gene estructural: su secuencia es GGATTGCTGCCGTTAGAGGT, en dirección 5' a 3'. La región de aminoácidos que le corresponde va del 246 al 253.

El oligo Núm 5, con la secuencia CTGGTCGCCATAGCTGGCGC, en dirección 5' a 3' también es un 20amero que corresponde parcialmente a una inserción presente en el gene de *S. typhi*. Incluye los nucleótidos +953 al +972 y los aminoácidos 297 al 303 de la proteína madura.

Las tablas 1 y 2 resumen las principales características de los oligos diseñados.

TABLA 1. Oligonucleótidos diseñados a partir del gene *gmgC* de *Salmonella typhi*.

oligo#	secuencia ^a	bases del gene ^b	aa codificados ^c
1 (18)	GACGACAAAGGCAGCGAC	+136 al +156	25 al 30
2 (20)	GCGCCGTAGCCGTTGCTGAT	+937 al +956	292 al 298
3 (19)	TTTAGCAACATCTTTTGCT	+1140 al +1158	ninguno
4 (20)	GGGTTGCTGCCGTTAGAGGT	+802 al +821	246 al 253
5 (20)	CTGGTCGCCATAGCTGGCGC	+953 al +972	297 al 303

los números entre paréntesis indican el número de bases del oligo

a: la dirección de la secuencia es 5'-3'

b: la región del gene a partir del cual fue diseñado el oligo

c: los aminoácidos codificados por la región que abarca el oligo

En el caso del oligo Núm 3, no codifica para ningún aa, porque corresponde a la región extragénica 3' terminal del gene

TABLA 2. Características Principales de los oligonucleótidos diseñados a partir de ompC de *Salmonella typhi*.

Oligonucleótido	# de nucleótidos	Núm de dispari- dades con <i>E. coli</i>	Tm
Oligo #1	18	7	58
Oligo #2	20	10	72
Oligo #3	19	15	50
Oligo #4	20	20	70
Oligo #5	20	15	68

Tm: temperatura media de fusión.

BUSQUEDA EN EL "GENE BANK" DE SECUENCIAS SIMILARES A LOS OLIGONUCLEOTIDOS

Se hizo una búsqueda de las 40 secuencias más similares a los cinco oligonucleótidos en la base de datos "GeneBank". La búsqueda del oligonucleótido se realizó siempre en dirección 5'-3' tanto en la cadena codificadora como en la cadena complementaria. Se eligió la sección de bacterias en el banco de datos para la realización de esta búsqueda.

RESULTADOS

1: Estudio y comparación de la proteína OmpC de diferentes aislados clínicos de *S. typhi*.

Por medio de electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida/SDS, hemos determinado que la proteína OmpC de *S. typhi* tiene un peso molecular de 38.5-kDa, se expresa constitutivamente en los siete aislados clínicos analizados hasta el momento y es la proteína de membrana externa más abundante (Fig.3). El peso molecular de la proteína parece ser muy similar en las diferentes cepas estudiadas. Se ha observado que, independientemente de las condiciones de crecimiento de las salmonelas, la expresión de OmpC parece ser constitutiva. Para lo anterior se han probado diferentes medios de cultivo, como el medio mínimo y algunos medios ricos (Luria, YT, Medio A y suero); temperaturas de 5 gra C, 20 gra C, 37 gra C y 40 gra C (Fig.3); diferentes osmolaridades, es decir, sin sacarosa y con 10 y 20% de sacarosa; altas y bajas concentraciones de hierro libre. Esto último se logró adicionándole al medio de cultivo transferrina humana como quelante, a una concentración de 2.5mg/ml (A. Verdugo-Rodríguez, comunicación personal).

El análisis de la preparación de PsME, mediante geles de poliacrilamida/SDS, reveló que, a diferencia de la porina OmpC que se encontró en todas las salmonellas, otra de las PsME, denominada OmpF, no se encontró en una de las cepas estudiadas (cepa MK29) (Fig.3, carriles 3 y 4).

kDa

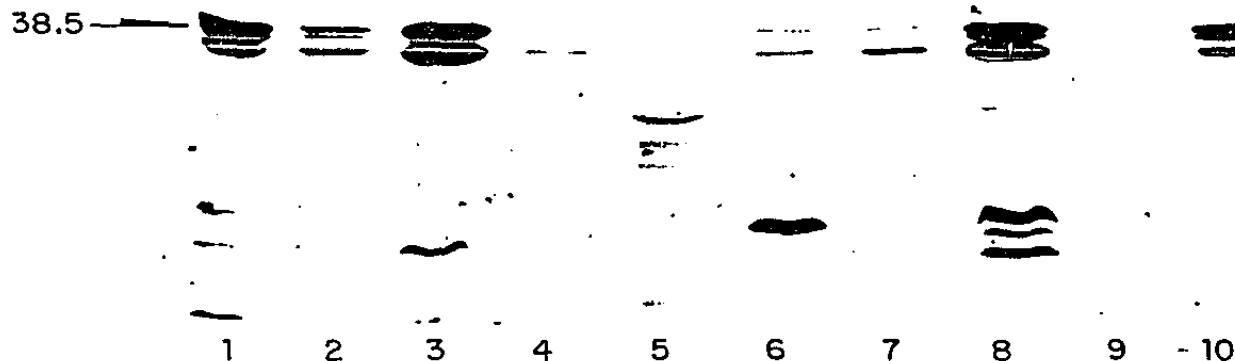


Fig. 3 Perfil electroforético de preparaciones de proteínas de membrana externa teñido con azul de coomassie, separadas en poliacrilamida 15%/0.1%SDS. Carriles 1 y 2: *S. typhi* MK20; carriles 3 y 4: *S. typhi* MK29; carril 5: marcadores de peso molecular; carriles 6 y 7: *S. typhi* MK12; carriles 8 y 9: *S. typhi* MK28; carril 10: *S. typhi* IMMS-1. Las preparaciones fueron de bacterias crecidas a 41 gra C (1, 3, 6 y 8), a 5 gra C (2, 4, 7 y 9) y a 37 gra C (10). La migración de OmpC, con peso molecular aparente de 38.5 kDa, se indica en el margen. Inmediatamente abajo migran OmpF y OmpA, respectivamente.

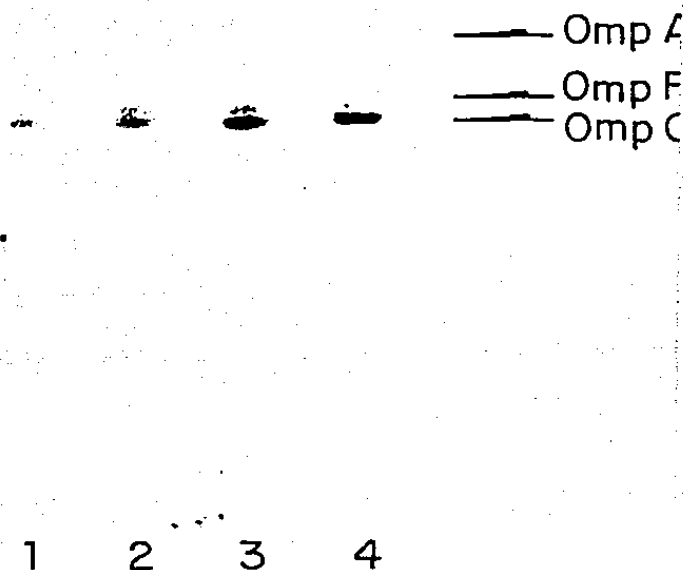
Ya que no observamos cambios notables en cuanto al peso molecular de OmpC, decidimos utilizar la propiedad de carga de la proteína para distinguir si OmpC variaba. La separación de las proteínas se realizó mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de acrilamida/urea. Los resultados revelaron una gran similitud en la carga de OmpC de las distintas cepas (Fig. 4). De hecho, con excepción del caso de la cepa que no contenía OmpF, no se observaron variaciones en los patrones electroforéticos de las principales PsME.

II: Búsqueda de secuencias nucleotídicas similares a la de los oligonucleótidos diseñados a partir de regiones específicas del gene *ompC* de *Salmonella typhi*.

Todos los oligonucleótidos se buscaron en la base de datos "Gene Bank". Se obtuvieron las cuarenta secuencias génicas más similares a la de los oligos. El objetivo de esta búsqueda fue saber si la secuencia elegida no se encontraba al azar en los genes hasta la fecha descritos, lo que pudiera generar en los experimentos falsos positivos. Asimismo, esta información nos serviría para diseñar las temperaturas a las que se podría llevar a cabo los experimentos de hibridación con el fin de eliminar la hibridación inespecífica con otros genes.

En la Tabla 3 se resumen los cinco oligonucleótidos que se analizaron y las enterobacterias con las que se encontró similitud.

A



B

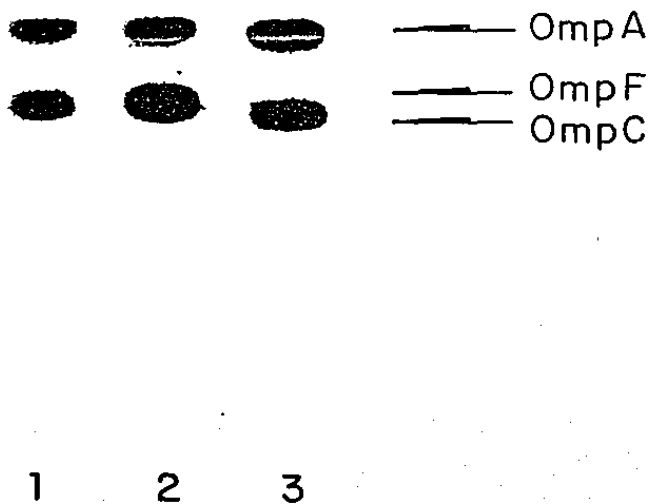


Fig. 4. Perfil electroforético de preparaciones de proteínas de membrana externa teñido con azul de coomassie, separadas en poliacrilamida 10%/8M urea. (A): Carril 1: *S. typhi* IMMS-1; carril 2: *S. typhi* Ty2; carril 3: *S. typhi* MK12 y carril 4: MK20. (B): Carril 1: *S. typhi* IMMS-1; carril 2: *S. typhi* Ty2; carril 3: *S. typhi* MK29. Todas las bacterias fueron crecidas a 37 gra C.

TABLA 3

Número de disparidades encontradas en diferentes genes de las
siguientes enterobacterias:

Oligonucleótido	Núm 1	Núm 2	Núm 3	Núm 4	Núm 5
<i>E. coli</i>	4 ^b (46) ^c	4(50)	4(40)	5(52)	5(50)
<i>S. typhimurium</i>	3(46)	5(54)	- ^d	5(50)	5(56)
<i>K. pneumoniae</i>	4(48)	5(50)	5(40)	6(48)	7(48)
<i>E. aeruginosa</i>	-	6(46)	-	-	5(54)

a) Los genes encontrados no tuvieron relación alguna con genes para proteínas de membrana externa.

b) El número que se encuentra en la tabla indica el menor número de disparidades que se encontró en un gene de esa enterobacteria; el número representa a un solo gene.

c) El número que se encuentra entre paréntesis es la temperatura media de fusión (T_m) para esa secuencia.

d) -: no se obtuvo ninguna secuencia

III: Estudio de la variabilidad genética de *ompC* en diferentes cepas de *S. typhi*.

Ya que el análisis grueso de la proteína no reveló diferencias notables, se hizo un estudio más detallado del gene *ompC* mediante la utilización de oligonucleótidos. Decidimos realizar hibridaciones con oligonucleótidos 100% homólogos al gene *ompC* de la cepa IMSS-1. Como se dijo anteriormente, los oligos fueron diseñados a partir de las regiones variables entre los genes *ompC* de *Escherichia coli* y de *Salmonella typhi* (Ver MATERIALES Y METODOS tabla 1 y APENDICE 1 Fig. 2).

Las condiciones de hibridación se definieron con base en el estudio de disparidades presentado en la sección anterior (II). Para todos los oligonucleótidos se utilizaron controles. Estos consistieron en un exceso de los plásmidos que contenían los genes de *ompC* de *E. coli* (pMY111) y *ompC* de *S. typhi* (pVF27). Ninguno de los oligonucleótidos detectó la banda que correspondía al fragmento con *ompC* de *E. coli* (Fig. 5A y 5B).

El oligonucleótido Num. 1 detectó una banda, con un tamaño de 2 kb en todas las cepas de los aislados clínicos, que habían sido identificadas como *S. typhi*; lo mismo ocurrió para *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. sp* y en *S. gallinarum* (Figs. 6, 7, 8). Este oligo no detectó a las otras enterobacterias analizadas (Fig. 8) por lo que se definió como un detector género-específico.

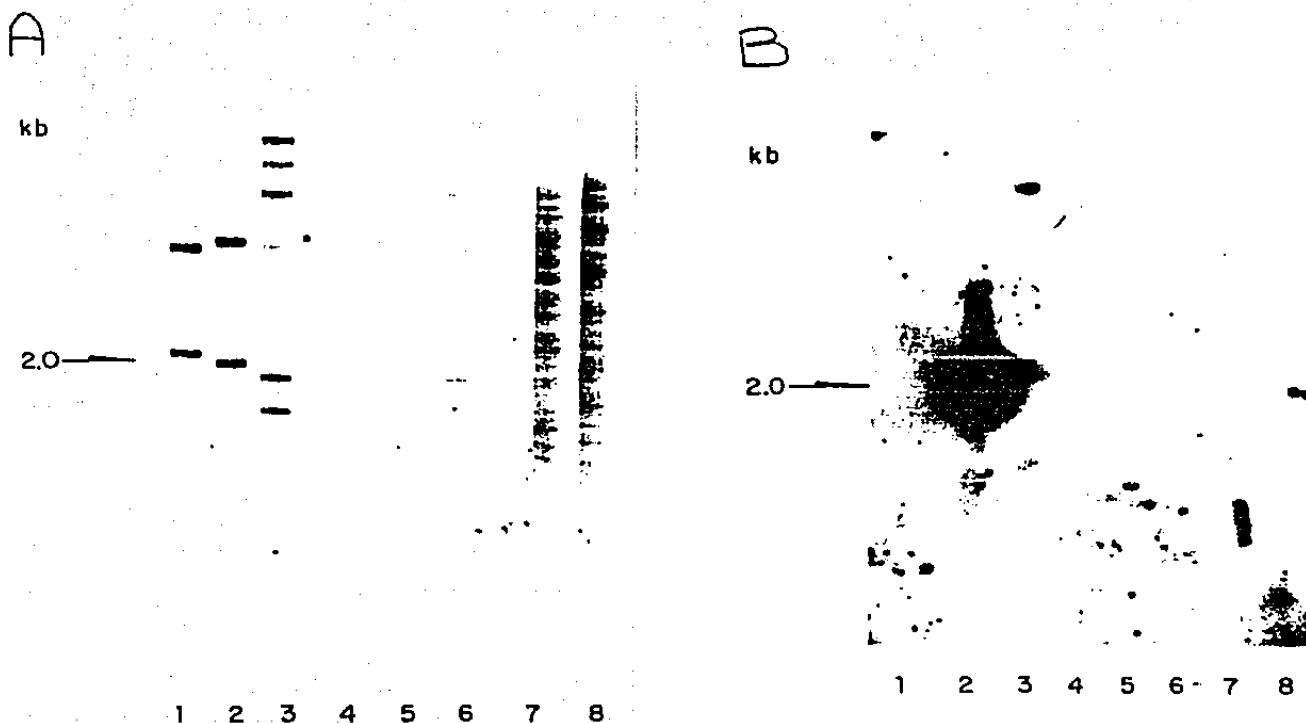


Fig. 5 (A) Patrón electroforético de DNA separado en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio. Carril 1: 500ng del plásmido pMY111; carril 2: 500ng del plásmido pVF27; carril 3: 600ng de λ /HindIII; carril 4: 10ng pMY111; carril 5: 10ng pVF27; carril 6: 60ng λ /HindIII; carril 7: *Sac* *E. coli*/EcoRV y carril 8: *Sac* *S. typhi* IMSS-1/EcoRV. (B) Autorradiograma obtenido de la hibridación tipo Southern mostrado en (A) con el oligonucleótido Nqm.1 marcado radioactivamente con 32 -P (ver MATERIALES Y METODOS).

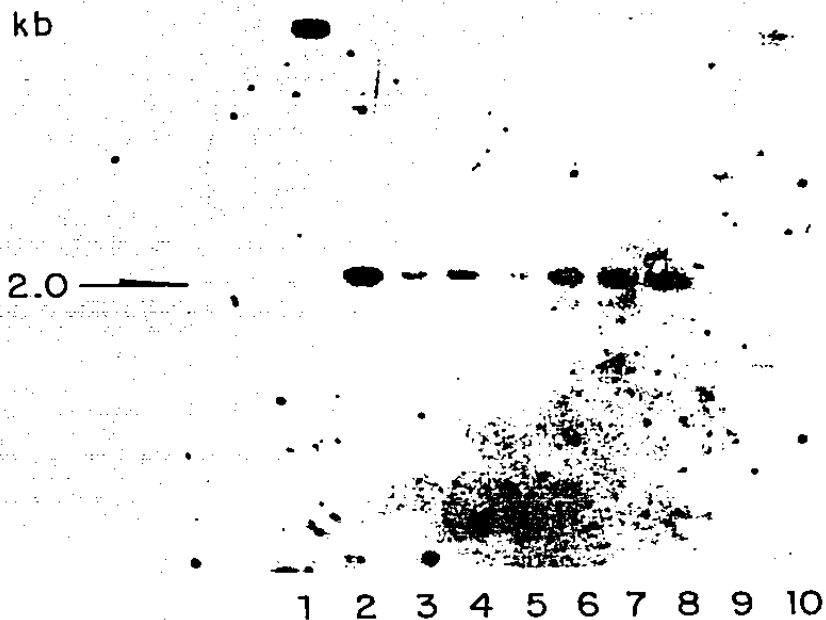
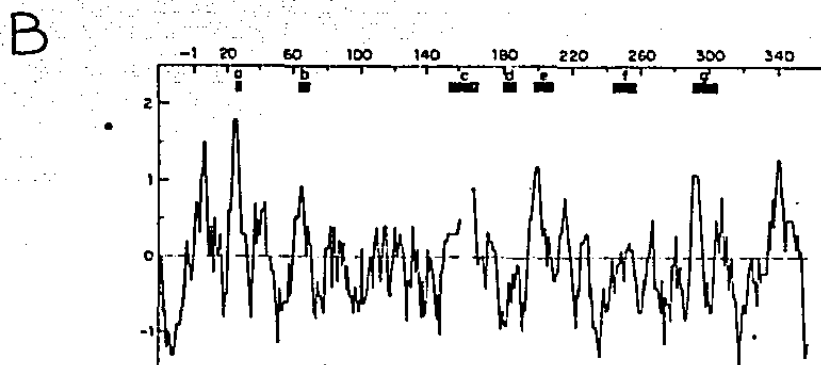
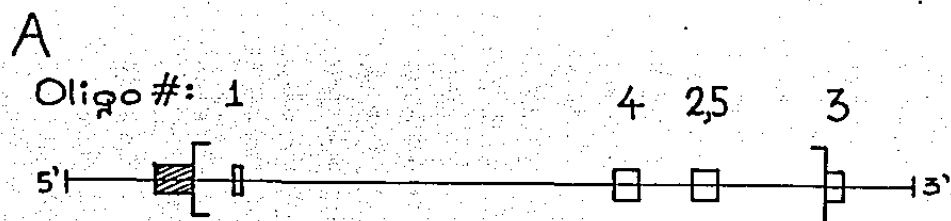


Fig. 7 Autorradiograma de la hibridación tipo Southern con el oligonucleótido Núm.1 (ver materiales y métodos tabla 1) marcado radioactivamente con ^{32}P . Los carriles corresponden a los de la Fig. 6



C

Oligo #	1	4	2, 5	3
<i>S. typhi</i>	+	+	+	+
<i>S. typhimurium</i>	+	+	+	+
<i>S. enteritidis</i>	+	+	+	+
<i>S. sp</i>	+	-	+	+
<i>S. gallinarum</i>	+	-	+	+
Enterobacterias	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	***	-	-

Fig. 8 Diagrama esquemático de los oligonucleótidos (oligo) de *gmpC* y resultados de hibridación. (A) El gene *gmpC* de *S. typhi*. Se indican los extremos 5' y 3'; entre los corchetes esta la región estructural; la barra con diagonales representa la región codificadora del péptido señal; las barras vacías representan las regiones correspondientes a los oligos, cuyo número se encuentra en la parte superior. Los oligos 1, 4, 2 y 5 corresponden a las regiones hidrofílicas a, f y g (ver B). Las coordenadas de cada oligo están indicadas en la Tabla 1 (ver MATERIALES Y METODOS). (B) Perfil hidropático de la proteína *gmpC* de *S. typhi*. Los números corresponden a los aminoácidos; las barras llenas (a-g) corresponden a regiones variables entre *S. typhi* y *E. coli* (ver APENDICE I Fig. 4). (C) Hibridación de los oligonucleótidos con diferentes enterobacterias. Los signos indican la presencia (+) o ausencia (-) de hibridación; *ninguna de las hibridaciones presentó polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PLFR); *** la hibridación de este oligo con *E. coli* no corresponde al gene *gmpC*. Los detalles de las cepas se encuentran en MATERIALES Y METODOS.

El oligonucleótido NÚM 2 también detectó a todo el género Salmonella y no detectó a ninguna de las otras enterobacterias (Fig. 8).

El oligo NÚM 3 detectó a todo el género Salmonella y no detectó a ninguna enterobacteria (Fig. 8).

El oligo NÚM 4 identificó a todos los aislados clínicos de S. typhi (Fig. 9), S. typhimurium y S. enteritidis, pero no a la Salmonella sp y S. gallinarum (Fig. 10 y 11). No detectó a las demás enterobacterias, (Fig. 12 y 13), excepto a E. coli. La hibridación no fue con gmGC, ya que el oligo no hibridó con el control negativo, el plásmido PMY111 (datos no mostrados).

Con el oligo NÚM 5 obtuvimos señal con todo el género Salmonella, excepto con S. gallinarum (Fig. 8). No se detectó a ninguna bacteria y se pudo corroborar que la cepa MK01 no era en realidad una S. typhi (ver abajo en la sección IV).

La Fig. 8 resume la detección de las diferentes Salmonellas y enterobacterias con los cinco oligonucleótidos.

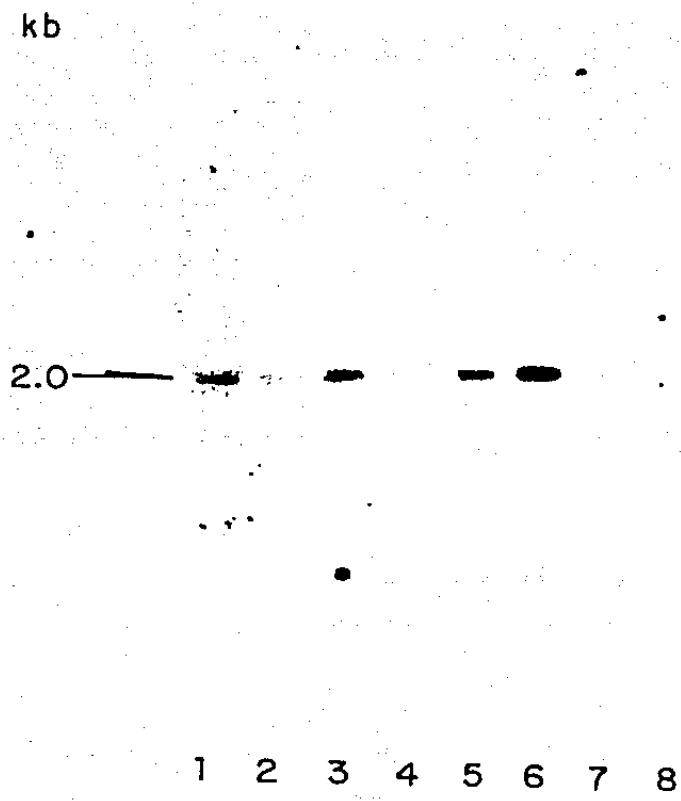


Fig. 9 Autorradiograma de la hibridación tipo Southern con el oligonucleótido Num.4 (ver MATERIALES Y METODOS Tabla 1) marcado radioactivamente con 32 -P. Los carriles corresponden a los de la Fig. 8 Fig. 8 Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los carriles corresponden a los de la Fig. 6

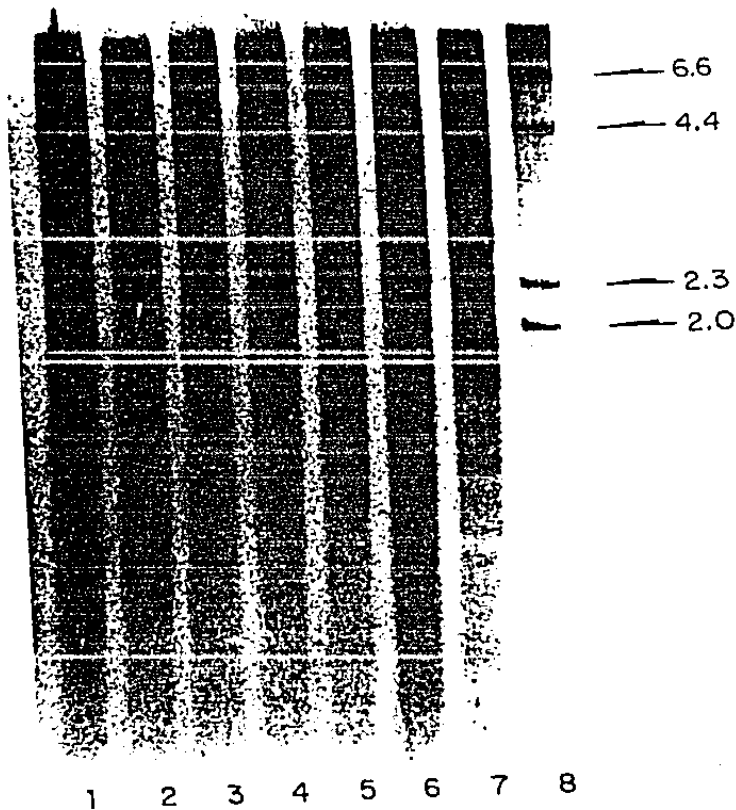


Fig. 10 Patrón electroforético de DNA separado en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio. Carril 1: *S. typhi* IMSS-1; carril 2: *S. typhi* Ty2; carril 3: *S. typhimurium*; carril 4: *S. enteritidis*; carril 5: *S. sp*; carril 6: *S. gallinarum*; carril 8: *E. coli*. El DNA de todas las bacterias fue digerido con *EcoRV*.

A

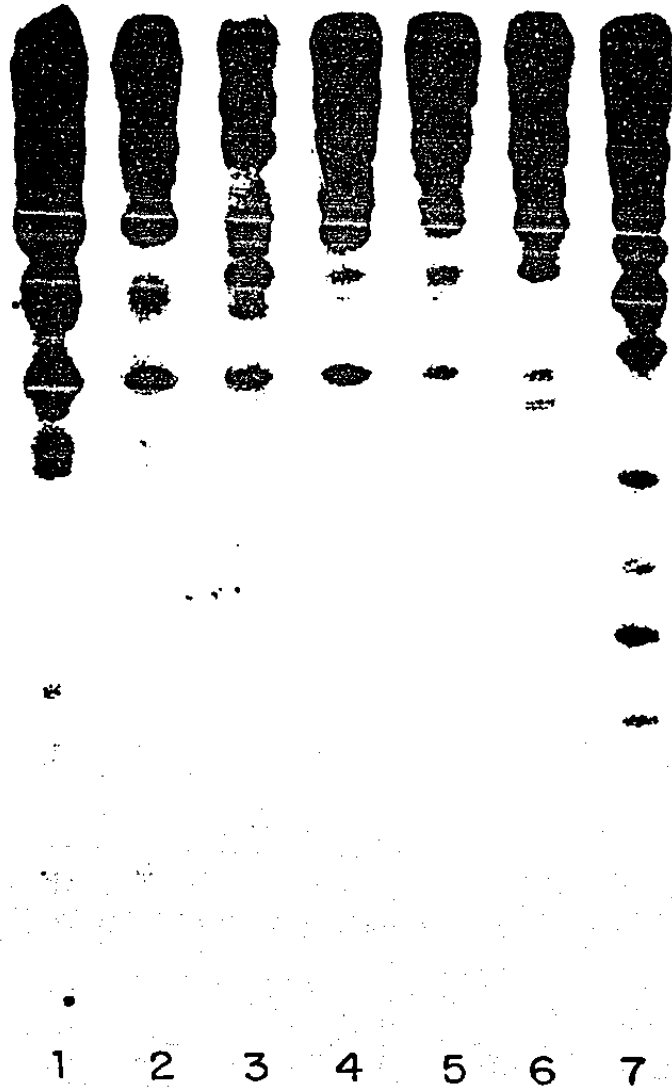


Fig. 11 Autorradiograma de la hibridación tipo Southern, del DNA mostrado en la Fig 10, con el oligonucleótido Núm.4 marcado con 32-P (ver MATERIALES Y METODOS Tabla 1). (A) El autorradiograma corresponde a un filtro lavado en condiciones relajadas y (B) corresponde a un filtro lavado en condiciones estrictas (ver MATERIALES Y METODOS).

B

2.0



1 2 3 4 5 6 7

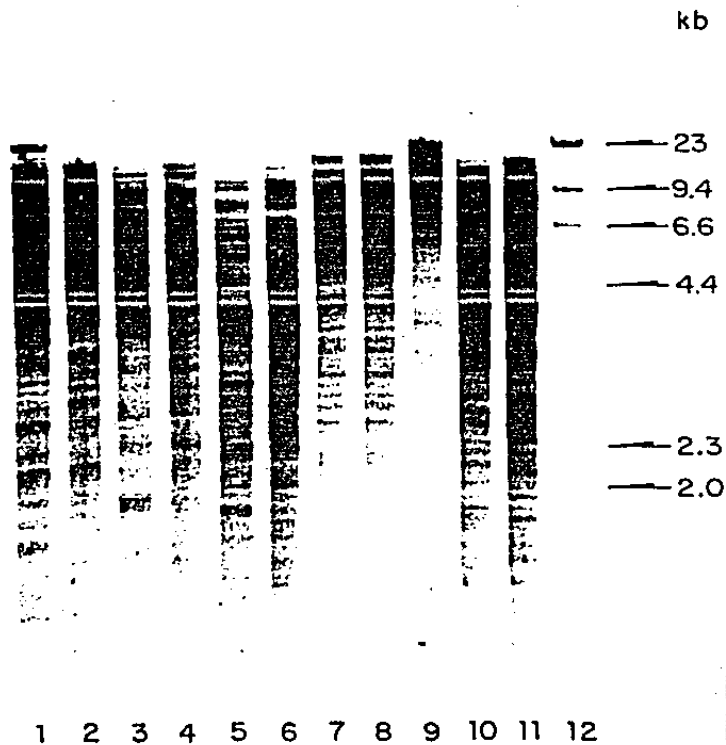


Fig. 12 Patrón electroforético de DNA separado en gel de agarosa al 1%. Carril 1: *Citrobacter freundii* 1; carril 2: *Citrobacter freundii* 1455; carril 3: *Klebsiella pneumoniae* 1; carril 4: *Klebsiella pneumoniae* 1466; carril 5: *Morganella morgani* 1; carril 6: *Morganella morgani* 1446; carril 7: *Proteus mirabilis*; carril 8: *Proteus vulgaris*; carril 9: *Pseudomonas aeruginosa*; carril 10: *Salmonella* sp; carril 11: *S. typhi* IMSS-1 y carril 12: marcador de peso molecular λ /HindIII. El DNA de todas las bacterias fue digerido con EcoRV.

kb

2.0

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Fig. 13. Autorradiograma de la hibridación tipo Southern con el oligonucleótido NÚM.4 marcado con ^{32}P (ver MATERIALES Y METODOS Tabla 1). Los carriles corresponden a los de la Fig. 12

DISCUSION

Es importante recalcar que las PsME de las enterobacterias se expresan abundantemente, aproximadamente 10×5 copias por célula (Nakas et al, 1979). Los resultados que hemos observado, hasta el momento, indican que la proteína OmpC de *Salmonella typhi* es una de las que más se expresa. Si comparamos la expresión de OmpC de *Escherichia coli* con su equivalente en *Salmonella typhi*, es interesante la observación que mientras en *E. coli* la expresión de OmpC y de OmpF es osmoregulable, en *Salmonella typhi* la expresión de OmpC es aparentemente constitutiva; lo que no sucede con OmpF, que presenta un comportamiento similar al descrito para *E. coli*. Queda por contestar si esta característica pudiera ser relevante para la viabilidad de la bacteria, independientemente de las condiciones en las que se encuentre (Puente et al, 1988); incluyendo diversas temperaturas que van desde 5 a 42 gra C; alta y baja osmolaridad; presencia y limitación de Fe libre.

Nikaido y Vaara (1987) han propuesto que la relación de OmpC/OmpF varía como un probable mecanismo de adaptación de *E. coli* y de *S. typhimurium*, a la vida libre o dentro de un huésped. Por ejemplo: los poros formados por OmpF permiten el paso de moléculas más grandes, lo cual podría jugar un papel importante en condiciones de vida libre donde la bacteria tuviera que adaptarse a la limitación de algunos nutrientes. En contraste, OmpC, por su menor tamaño de poro pudiera dar una

ventaja selectiva a la bacteria, al limitar la difusión de moléculas dañinas. Por otro lado, se ha reportado que la temperatura también juega un papel importante en la regulación de estas dos proteínas de *E. coli*, donde OmpC se expresa preferencialmente a mayor temperatura. En *Salmonella typhi*, la expresión de estas proteínas parece no regularse por la temperatura (Fig.3).

Las cepas de *S. typhi* fueron crecidas en condiciones lo más similares posibles a las presentes en el suero humano, es decir, en un medio rico, con alta osmolaridad, fierro libre limitado y temperatura de 37 o 41 gra C. Los resultados demuestran que, independientemente de las condiciones utilizadas, OmpC es la proteína de membrana externa más abundante, lo cual sugiere que ésta se expresa constitutivamente en *S. typhi*. El análisis de la proteína OmpC de diferentes aislados de *S. typhi* en geles de poliacrilamida/urea, sugieren que está muy conservada, ya que no hubo cambios apreciables en la movilidad de la proteína. Como se puede observar en la Fig.4B la cepa MK29 la cual previamente se caracterizó por carecer de la proteína OmpF, sirvió de marcador para identificar a la proteína OmpC en este tipo de geles. Mucho más trabajo queda por realizar para definir, si la presencia de estas proteínas en *S. typhi* bajo diferentes condiciones tienen algún papel relevante en los procesos de virulencia o en adaptación al huésped.

Existen antecedentes interesantes acerca de la especificidad que confiere una de las proteínas principales de membrana externa en *Clamidia trachomatis*, la cual se encuentra dividida en 15 serotipos. Esta clasificación se ha hecho con base en esta proteína, ya que aún siendo tan conservada en los 15 serotipos, se han reconocido 4 regiones muy variables, que son las que le confieren especificidad a serotipo, a serogrupo y a especie (Yuan et al, 1989 y Baehr et al, 1989).

Creemos que es importante analizar si *S. typhi*, que es una bacteria, cuya clasificación se ha hecho con base en el LPS, pudiera tener una proteína de membrana externa que también le confiriera especie-especificidad.

Se ha propuesto, que genes aislados de *S. typhi* puedan ser aplicados como sondas en el estudio de genética molecular de poblaciones utilizando los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción. Esto probablemente nos podría permitir clasificar a las diferentes cepas de acuerdo a su origen geográfico o bien, a los síntomas clínicos que inducen (Calva et al, 1988).

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la variabilidad genética de *ompC* de *S. typhi*, con lo cual podríamos obtener mayor información acerca de su especificidad como sonda diagnóstica. Para esto, utilizamos oligonucleótidos diseñados a partir del gene. Como se pretendía conocer si las regiones

variables entre los genes *ompC* de *E. coli* y *S. typhi* eran género y/o especie específicas, los oligonucleótidos también se probaron con otras enterobacterias patógenas.

En cuanto a la búsqueda que se realizó en el "Gene Bank", tuvo el objeto de conocer si los oligonucleótidos que se habían diseñado a partir del gene *ompC* de *S. typhi*, compartían algún grado de similitud con otras enterobacterias. Cabe señalar que los genes de las enterobacterias que se localizaron con cierta homología (4 ó 5 disparidades) no tuvieron relación alguna con proteínas de membrana externa; por esta razón no específico de qué gene se trata.

Con base en lo anterior, el grado de homología nos indicó las temperaturas a las cuales se tenía que llevar a cabo los experimentos de hibridaciones. Por ejemplo: en la tabla Núm.3 observamos que con el oligonucleótido Núm.5 se encontró una secuencia muy parecida en *Pseudomona aeruginosa*, cuya T_m era de 54 gra C. Sin embargo, este oligo no hibridó con ninguna de las enterobacterias analizadas (incluyendo *P. aeruginosa*), aun cuando los experimentos de hibridación fueron realizados a temperatura ambiente (TA).

Los resultados anteriores sugieren que las cepas con las que se obtuvo señal de hibridación con los oligos, pudieran tener pocas disparidades o ninguna en la región correspondiente al oligo. Esto es probable ya que al aumentar ligera y gradualmente las condiciones de severidad la señal de hibridación se va perdiendo dependiendo del grado de similitud. De este modo, si hubiera habido diferencias en el número de disparidades en el DNA

de las cepas estudiadas, las variaciones en severidad probadas, deberían de haberse reflejado como diferentes señales y no como un efecto de "todo o nada". Es decir, que a mayor número de disparidades, la señal se debería de perder más rápidamente. Este tipo de resultados nunca se obtuvieron, a pesar de haber probado diferentes condiciones tanto de hibridación como de lavados. En contraste, las cepas de *Salmonella* sp y *S. gallinarum*, no fueron detectadas por el oligo Núm.4 (Fig. 11B). Cabe señalar que el oligo Núm.5 no detectó únicamente al *S. gallinarum*; no sabemos si en condiciones relajadas se hubiera obtenido alguna señal.

Es interesante señalar que bajo ciertas condiciones experimentales el oligo Núm.4 hibrida con la banda esperada (Fig. 11A) en todas las salmonellas; sin embargo, cuando se aumenta el tiempo del lavado, la señal en *Salmonella* sp y en *S. gallinarum* desaparece completamente (Fig. 11B). En contraste, el oligo Núm.2, en condiciones relajadas hibrida con varias bandas en todas las salmonellas (datos no mostrados), aún y cuando se aumenta el tiempo de lavado (la banda de 2.0-Kb de *ompC* se observa en todas las hibridaciones). Estos resultados sugieren que estas dos cepas contienen menos disparidades en la región correspondiente al oligo Núm.2 que en la correspondiente al oligo Núm.4.

Es importante mencionar que los oligos 2 y 5 se diseñaron a partir de la misma región variable (Ver APENDICE I Fig. 4), es decir que el oligo Núm. 5 sobrelapa tres nucleótidos de la región del oligo Núm.2. Esto es interesante, ya que el oligo Núm.2 si

hibrida con *S. gallinarum* a diferencia del oligo Núm.5. Probablemente se deba a que el oligo Núm. 5 corresponde a una región de inserción en *S. typhi*.

Cabe señalar que los oligos Núm.4 y Núm.5 corresponden a una región de *S. typhi* que no existe en el gene de *E. coli*. Debido a esto, pensamos que estos oligos, serían los mejores candidatos para probarlos como sondas género o especie específicas, que pudieran servir para diagnóstico.

Sin embargo, además de generar señal con otras salmonellas, el oligonucleótido Núm. 4 detectó a *E. coli*. Esta señal se obtuvo probablemente por la homología que presenta el oligo con la secuencia encontrada en el "Gene Bank", la cual tiene cinco disparidades y una Tm de 52 gra C (ver Tabla 1); o bien se deba a una gran homología con algún gene de *E. coli* que aún no ha sido reportado.

Los resultados obtenidos con los oligos demuestran que el gene *gmpC* está muy conservado en algunas especies del género *Salmonella*. Ya que las proteínas de membrana externa de las enterobacterias están en contacto con el medio ambiente, éste posiblemente ejerce una gran presión selectiva para la conservación de la proteína a través de la evolución. Sin embargo, *Salmonella* sp y *S. gallinarum* presentan algunos cambios en estas regiones. Esto podría dar como consecuencia cambios de uno o más aminoácidos en estas regiones hidrofílicas que probablemente están expuestas. No sabemos si estos cambios

podrían determinar una diferente característica funcional de la proteína en estas bacterias, como por ejemplo, servir de receptor para diferentes bacteriofagos o para otras células.

Con respecto al patrón de restricción del DNA digerido con EcoRV, se observó que para cada especie analizada en este trabajo, hay un patrón específico. Es decir, que todos los aislados clínicos de *S. typhi* mostraron un patrón de restricción idéntico, pero diferente al de las otras especies. Una de las cepas (MK 01), que había sido identificada como *S. typhi* por pruebas bioquímicas, presentó un patrón de restricción muy diferente al que habían presentado todas las demás *Salmonellas* (Fig.14). Incluso por estudios de hibridación con los oligos se pudo confirmar que esta cepa no era *S. typhi*. Posteriormente se repitieron las pruebas bioquímicas, y la cepa MK01 se identificó como *Enterobacter agglomerans*, lo cual confirmaba los resultados anteriores.

Lo mismo sucedió para todas las demás cepas; lo interesante es que se pudieron observar dentro de las enterobacterias, patrones de restricción distintos en cepas de una misma especie y también patrones de restricción idénticos en cepas pertenecientes a diferente subespecie (Fig.12). Por ejemplo: se observaron patrones idénticos en las dos cepas de *Citrobacter freundii* y en las dos cepas de *Proteus*, no obstante una pertenecía a la subespecie *vulgaris* y la otra a la subespecie *mirabilis*. Las

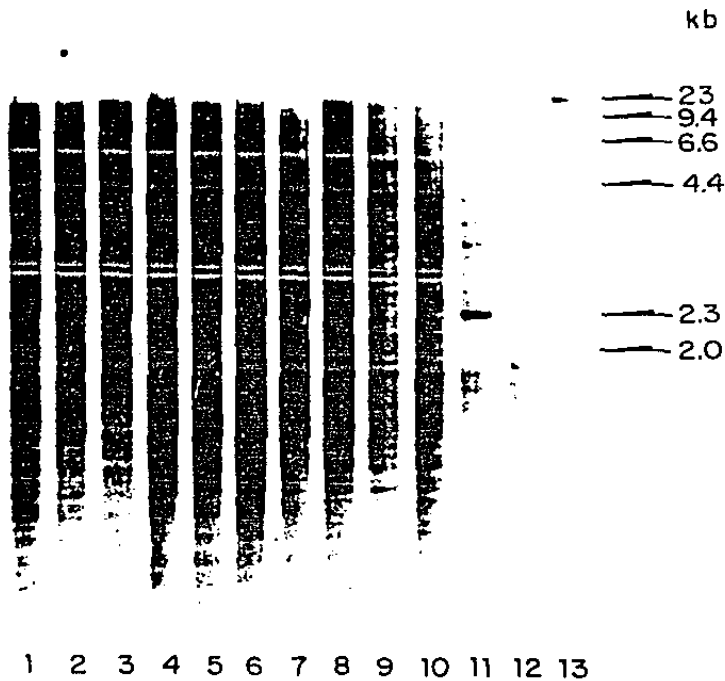


Fig. 14 Patrón electroforético de DNA separado en gel de agarosa al 1%. Carril 1: *S. typhi* IMMS-1; carril 2: *S. typhi* Ty2; carril 3: *Enterobacter agglomerans*; carril 4: MK12; carril 5: MK20; carril 6: MK28; carril 7: MK29; carril 8: *S. typhimurium*; carril 9: *S. enteritidis*; carril 10: *S. sp.*; carril 11: *S. gallinarum*; carril 12: *E. coli* y carril 13: marcador de peso molecular λ /HindIII.

dos cepas de Klebsiella pneumoniae y las dos de Morganella morganii presentaron patrones de restricción diferentes, aunque si compartían algunas bandas.

En cuanto a la utilización de genes de S. typhi como sondas moleculares específicas para la obtención de PLFR y el uso de éstos para la posible clasificación de diferentes cepas es necesario realizar estudios que generen más información básica. Esto nos podría ayudar a discernir sobre los genes que pudieran ser aplicados como sondas para la identificación y clasificación de las Salmonellas.

Comparando los estudios de isoenzimas (electroforesis multienzimáticas) con el estudio de los patrones de DNA obtenidos con enzimas de restricción, sugerimos que este último puede ser de gran utilidad en estudios de epidemiología molecular, principalmente porque tiene la ventaja de no ser un proceso tan elaborado como el primero y porque ahora se cuenta con la posibilidad de marcar el oligonucleótido con procedimientos no radioactivos, lo cual facilita y abarata el proceso. Actualmente se sabe que los estudios de biología molecular han revolucionado a la microbiología y de forma fundamental a la clasificación microbiológica basada en el fenotipo. Este trabajo con resultados preliminares sugiere, que el estudio con patrones de restricción podría ser utilizado como una herramienta adicional a las ya establecidas para el estudio de genética de poblaciones, epidemiología molecular y clasificación de ceparios.

CONCLUSIONES

1) A diferencia de lo que sucede en *Escherichia coli*, todos los aislados clínicos de *Salmonella typhi* parecen expresar constitutivamente la proteína OmpC, mientras que la proteína OmpF presenta un comportamiento similar al de su análoga en *E. coli*.

2) Los resultados obtenidos con los diferentes oligonucleótidos sugieren que el gen *ompC* se encuentra muy conservado en todos los aislados de *Salmonella typhi* analizados y en *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis*.

3) La proteína OmpC de *Salmonella* sp. no comparte una gran similitud con la región que comprende del aminoácido 246 al aminoácido 253 (nucleótido +802 al +821) en *Salmonella typhi* (Oligo Núm.4).

4) OmpC de *Salmonella gallinarum* no comparte con *Salmonella typhi* las regiones que comprenden del aminoácido 246 al aminoácido 253 (nucleótido +802 al +821) ni del aminoácido 297 al aminoácido 303 (nucleótidos +953 al +972) (Oligos Núm.4 y Núm.5).

5) No se encontraron polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción para *ompC* del género *Salmonella* con las enzimas de restricción *EcoRV*, *Sau3A* o *TagI*.

6) El estudio realizado con las diferentes cepas de Salmonella, y otras enterobacterias, sugiere que los patrones de restricción generados por EcoRV pueden ser de gran utilidad para distinguir otras cepas de Salmonella de Salmonella typhi.

7) Actualmente contamos con tres detectores género-específico para Salmonella.

BIBLIOGRAFIA

- Baehr, W., Zhang, Y., Joseph, T., Su, H., Nano, E., Everett, K.D.E. and Caldwell, H.D. Mapping antigenic domains expressed by *Calymdia trachomatis* major outer membrane protein genes. Proc. Natl. Acad. Sci. (1988) 85: 4000-4004.
- Calderón, I., Lobos, S.R. and Mora, G.C. The hemolytic effect of *Salmonella typhi* Ty2 porins. Eur. J. Biochem. (1984) 141:579-583.
- Calderón, I., Lobos, S.R., Rojas, H.A., Palomino, C., Rodríguez, L.H. and Mora, G.C. Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid infection in humans. Infect. Immun. (1986) 52:209-212.
- Calva, E., Puente, J.L. and Calva, J.J.: Research opportunities in typhoid fever: epidemiology and molecular biology. Bioessays (1988) 9:173-177.
- Chou, P.Y. and Fasman, G.D. Empirical prediction of protein conformation. Ann. Rev. Biochem. (1978) 47:251-276.
- Cornelis, G., Laroche, Y., Balligand, G., Sory, M.P. and Wauters, G. *Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness. Rev. Infect. Dis. (1987) 9:64-86.
- Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N. and Ginsberg, H.S. Microbiology, Third Edition, Harper International Edition, 1980, Hagerstown, Maryland.
- Edelman, R. and Levin, M.M.: Summary of an International Workshop on typhoid fever. Rev. Infect. Dis. (1986) 8:329-349.
- Engel, A., Massalski, A., Schindler, H., Dorset, D.L. and Rosenbusch, J.P. Nature (1985) 317:643-645.
- 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. (1988) 6:821-825.
- Freudl, R. and Cole, S. Cloning and molecular characterization of the *ompA* gene from *Salmonella typhimurium*. Eur. J. Biochem. (1983) 134:497-502.
- Freudl, R., McIntyre, S., Degen, M. and Henning, U. Cell surface exposure of the outer membrane protein OmpA of *Escherichia coli* K-12. J. Mol. Biol. (1986) 188:491-494.
- Harrison Principles of Internal Medicine, Tenth Edition, Mc Grow Hill, 1983, New York, USA.

Isberg, R.R., Voorhis, D.L. and Falkow, S. Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* (1987) 50:769-778.

Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., Gonzalez, C., Moreno, J. and Kumate, J. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane protein isolated from *Salmonella typhi* 9.12.d.Vi. *Infect. Immun.* (1988) 56:2953-2959.

Jann, K and Jann, B. Polysaccharide antigens of *Escherichia coli* *Rev. Infect. Dis.* (1987) 9:(Supl.5) S517-S526

Khandjian, E.W. Optimized hybridization of DNA blotted and fixed to nitrocellulose and nylon membranes. *Biotechnology*, Vol.5, Feb.1987.

Leong, L.P., Diagnostic uses of monoclonal antibodies to *Salmonella* in Monoclonal antibodies against bacteria. Vol.III Ed. by Macario, J.L.A. and de Macario, E.C. Academic Press, Inc. NY,1986.

Levine, M.M., Herrington, D., Murphy, J.R., Morris, J.G., Losonsky, G., Tall, B., Lindberg, A.A., Svenson, S., Baqar, S., Edwards, M.F. and Stocker, B. Safety, infectivity, immunogenicity, and in vivo stability of two attenuated auxotrophic mutant strains of *Salmonella typhi*, 541Ty and 543Ty, as live oral vaccines in humans. *J. Clin. Invest.* (1987) 79:888-902.

Maniatis, T., Fritsch, E. and Sambrook, J.: Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY, 1982.

Matsuyama, S., Inokuchi, K. and Mizushima, S.: Promoter exchange between *ompF* and *ompC* genes for osmoregulated major outer membrane proteins of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* (1984) 158: 1041-1047.

Mizuno, T., Chou, M.Y. and Inouye, M. A comparative study on the genes for three porins of the *Escherichia coli* outer membrane. *J. Biol. Chem.* (1983) 258:6932-6940.

Nakae, T., Ishii, J. and Tokunaga, M. Subunit structure of functional porin oligomers that form permeability channels in the outer membrane of *Escherichia coli* *J. Biol. Chem.* (1979) 254:1457-1461.

Nielsen, J., Taagaard, M., Marugg, J.E., van Boom, J.H. and Dahl, O.: Application of 2-cyanoethyl N,N,N',N' tetraisopropylphosphorodiamidite for *in situ* preparation of deoxyribonucleoside phosphoramidites and their use in polymer-supported synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* (1986) 14:7391-7403.

Nikaido, H. and Vaara, M.: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* (1985) 49:1-32.

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* (1987) 61:75-83.

Puente, J.L. Caracterización del gene para la proteína de membrana externa *OmpC* de *Salmonella typhi*. UACPYP (1988), tesis de Maestría.

Reeves, M.W., Evins, G.M., Heiba, A.A., Plikaytis, B.D. and Farmer, J.J.: Clonal Nature of *Salmonella typhi* and Its Genetic Relatedness to Other *Salmonellae* as Shown by Multilocus Enzyme Electrophoresis, and Proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J. Clin. Microbiol.* (1989) 27:313-320.

Roth, J.A. Virulence mechanisms of bacterial pathogens. (1988) American Society for Microbiology, Washington, DC.

Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N. and Whitman, T.S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* (1986) 51:873-884.

Seifert, H.S. and So, M. Genetic Mechanisms of Bacterial Antigenic Variation. *Microbiol. Rev.* (1988) 52:327-336.

Tsang, R.S.W. and Chau, P.Y. Production of V1 monoclonal antibodies and their application as diagnostic reagents. *J. Clin. Microbiol.* (1987) 25:531-535.

Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V.R. Protective immunity induced by outer membrane protein of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect. Immun.* (1987a) 55:816-821.

Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V.R. An outer membrane protein (porin) as an eliciting antigen for delayed-type hypersensitivity in murine salmonellosis. (1987b) 55:822-824.

Van Der Ley, P., Amesz, H., Tommassen, J. and Lugtenberg, B. Monoclonal antibodies directed against the cell-surface-exposed part of PhoE pore protein of the *Escherichia coli* K-12 outer membrane. *Eur. J. Biochem.* (1985) 147:401-407.

Yuan, Y., Zhang, Y., Watkins, N.G. and Caldwell, H.D. Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* serovars. *Infect. Immun.* (1989) 57:1040-1049.

APENDICE I

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, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62271 (México)

Correspondence to: Dr. E. Calva, CEIINGEBI/UNAM, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62271 (México) Tel. (52) (73) 172799; Fax (52) (73) 172388.

Abbreviations: aa, amino acid(s); bp, base pair(s); kb, kilobase(s) or 1000 bp; NET, 0.15 M NaCl/1mM EDTA/15mM Tris HCl/pH 7.5; nt, nucleotide(s); oligo, oligodeoxyribonucleotide; ompC, gene encoding OmpC; OmpC, outer membrane protein (porin); ORF, open reading frame; RFLP, restriction fragment length polymorphism; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, 0.15 M NaCl/0.015 M Na₃•citrate/pH 7.6; TBE, Tris-borate-EDTA electrophoresis buffer; tRNA, transfer RNA.

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 (ORF) 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 hydrophylic regions and contain aa observed most frequently in turn configurations in soluble proteins. This suggests that these aa stretches could be on the exterior of the outer membrane. In order to probe into the genus and species specificity of the main variable regions, we have constructed complementary oligodeoxyribonucleotides (oligos). The use of one of them, with a small number of DNA samples is illustrated here; no restriction fragment length polymorphism (RFLP) nor nt sequence heterogeneity could be found between S. typhi and S. typhimurium.

INTRODUCTION

The Escherichia coli outer membrane proteins OmpC, OmpF, and PhoE, have been well characterized. They are preferentially synthesized at high osmolarity, 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 sequence level, 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 Salmonella typhi, the causal agent of typhoid fever (Puentes 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., 1984; Udhayakumar and Mathukkaruppan, 1987a, 1987b; Isibasi et al., 1988). We have especial 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 (Puentes et al., 1987). This result suggests that it might be present on the outer membrane not only during free-living conditions, but also during infection, since osmolarity of human serum is equivalent to the high conditions used 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 seventeen different clinical isolates that we tested; showing no RFLP with restriction endonuclease BglII. In addition, it hybridized with *E. coli* ompC only under non-stringent conditions; which indicates that both genes are similar but must differ in some regions (Puente et al., 1987).

Our interest is to characterize genus- and species-specific nt and aa sequences, by a comparative analysis with data from other enterobacteria. In order to probe into the structure and variability of the *S. typhi* ompC-like gene, we determined its nt sequence; which is reported here. In addition, 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 for studying 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 Salmonella typhi (serotype 9, 12, d, Vi) strains were used. IMSS-1, a Mexican reference strain kindly provided by Dr. Jesús Kumate and collaborators 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 Ruiz-Palacios and coworkers 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).

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

Plasmid pVF27 (Puente et al., 1987) contains the S. typhi ompC-like gene in a 3 kb BglII 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, USA).

c) Nucleotide and protein 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). Hydrophylicity and hydrophobicity profiles of the protein sequence were done as reported by Hopp and Woods (1981), using a window size of seven amino acids.

d) Oligo synthesis, purification and hybridization

The oligo used in this study was synthesized on solid support using automated phosphoramidite chemistry (Nielsen et al., 1986). It was purified by preparative gel electrophoresis, ^{32}P -labelled at the 5' end with polynucleotide kinase and [γ - ^{32}P] ATP to a specific activity of 10^8 - 10^9 cpm/ μg , 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 Betlach et al. (1976). It was digested for 18 h at 37°C with 5 units per μg of restriction endonuclease EcoRV (Promega Biotech, Madison WI, USA). The resulting fragments were separated by electrophoresis at 80V for 8 h through 1% 6-mm thick, 20 cm long, 15 cm wide, 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 $0.5-1 \times 10^6$ cpm per lane of radiolabeled oligo at 65°C for 20 h, in 6X NET (0.9M NaCl, 6mM EDTA, 90 mM Tris-HCl pH 7.5), 5X 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°C in the same solution plus 0.1 mg/ml calf thymus DNA, and in the absence of radioactive probe. Post-hybridization washes were twice in 2X SSC, for 5 min at 42°C. The blots were subjected to autoradiography at -70°C for 2 to 7 d, using Kodak X-OmatK 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 derived 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-AeuII 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 non-similarities 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 two-base discrepancies in 28 codons, thus resulting in as many aa differences. Three-base pair discrepancies are found in 14 codons; 13 of them result in a different aa.

There are also differences in the DNA 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 additional one, three, nine, and four codons, at nt 610, 685, 802 and 955, respectively (Figs. 2, 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 39,215), 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 a 63 and a 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 non-conserved) between *S. typhi* and *E. coli* OmpC. They range between 4 and 18 residues. With the exception of the boxes comprising aa 181-188 (box d) and 245-259 (box f), these variable regions have a high hydrophylic 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 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 -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 termination 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). 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 termination codon and the putative terminator lies a non-conserved 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 et al., 1981).

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 non-conserved (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 strains. As can be seen in Fig. 5,

the oligo hybridized with the expected EcoRV 2.1 kb DNA 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 (ATCC 14028). 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 (see 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 EcoRV 2.1 kb fragment containing S.typhi ompC (Puente et al., 1987), or of the HindIII 2.7 kb 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.

(f) Conclusions

We have identified seven variable, or non-conserved, regions between S.typhi and E.coli outer membrane protein OmpC (see Figs. 4 and 2). Most of them, however, have retained a hydrophylic profile (Fig. 3; boxes a,b,c,e,g); and all contain aa that favor alpha helical turns in proteins (Paul and Rosenbusch, 1985). It

is tempting, thus, to propose that some of them might be surface exposed. Interestingly, these regions correspond to segments that also vary between E.coli outer membrane porin proteins OmpC, OmpF, and PhoE (Mizuno et al., 1983).

Several authors, using phage-resistant and pore-function mutants, as well as in vivo-constructed chimeric genes, have identified some E.coli OmpC domains. 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 hydrophylic value); consistent with the notion that the porin amino terminal third portion is involved in pore function (Misra and Benson, 1988; Benson et al., 1988). Aa encompassing the first third of the protein (+1 to +120) show an 88% similarity.

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 (Tomassen et al., 1985; Mizuno et al., 1987). In S.typhi both gly residues are conserved, but a leu residue substitutes the tyr at position +257.

E.coli OmpC residues +155 to +169 have been implicated in the formation of an OmpC-specific structure (Tomassen et al., 1985). Nevertheless, the equivalent region in S.typhi lacks six aa, which otherwise would be located between residues +160 and

+161 (Fig. 4); This observation suggests that such specific structure is not shared by both bacteria. 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).

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 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.

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 (see 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 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 collaborators; 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 typescript.

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 K12. *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. *BioEssays* 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., Ruíz-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., Ortíz, 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 Mkel P.H.: Immunization with major outer membrane protein (porin) preparations in experimental murine salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. Infect. Immun. 34 (1981) 328-332.

Maniatis, T., Fritsch, E. and Sambrook, J.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY, 1982.

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.

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., Grundstrm, 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

complementary 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-ompE 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 ompE 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.

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.

Communicated by F. Bolívar

Fig. 1. Sequencing strategy of the *S. typhi* *ompC* gene. The figure shows a map of the restriction endonuclease sites in the 1.6 kb MspI-AsuII fragment from plasmid pVF27 (Puente et al., 1987), used for subcloning into M13mp18 or M13mp19 phage cloning vectors. Each arrow represents the direction and extent of each sequencing reaction. The horizontal solid bar indicates the location of the entire coding region for *OmpC*; the dashed bar corresponds to the putative leader peptide.

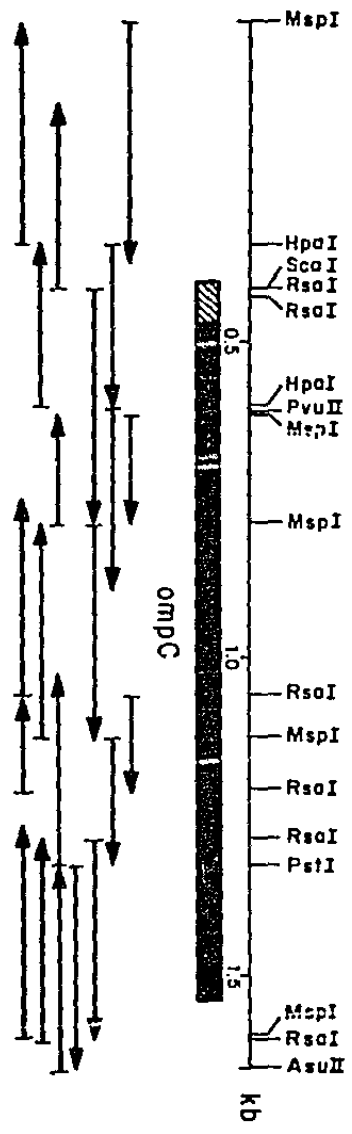
Fig. 2. Complete nucleotide sequence of the *S. typhi* *ompC* gene. Nt number 1 denotes the beginning of the ORF; nt 5'upstream are indicated by negative numbers. The deduced aa sequence for the *OmpC* protein is shown immediately above the nt sequence. Aa number -21 to -1 correspond to the leader peptide. Aa number 1 corresponds to the N-terminus of the mature protein. 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*, in order 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 arrows, corresponds to an *OmpR*-binding site. Two promoters for *micF* RNA are also boxed. At the 3' end of the gene, the inverted repeats corresponding to a rho-independent transcriptional terminator are depicted by two arrows, downstream

of 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* (Inouye 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 hydrophobicity values are plotted versus position along the amino acid sequence. Gaps are included for a best fit alignment. Solid bars correspond to the seven variable regions boxed in Fig. 4.

Fig. 4. Amino acid sequence of *S.typhi* OmpC. The conventional one letter aa code is used. Aa number -21 to -1 correspond to the leader sequence. The putative N-terminal aa of the mature protein is numbered as 1. 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 in order to obtain the best fit alignment. Boxes show seven regions, a to g, that vary between *S.typhi* and *E.coli*. The sequences with a high hydrophobic profile are underlined.

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



MspI
CCGGTTGAAATAGGGGTAAACAGACATTCA

-404

-374 GAAGTGAATGACGGTAATAAATAAAGTTAATGATGATAGCGGTCACATTTTAGTTGCGAATGAAGATTCTGTTT
A GAGT C G T

-299 TATCATTCAGTGCATGAATTTTCATCAATTTAACCCGTTGATTTTAAAGTTTCGTGAATATATTTGTCTATTT
GA G C A A T A GAA GTTA CCT GAAT - T TGC ATGT AG
-35 mic -10 mic

-223 GTGCTTAAT-TTTACTTGATTTTTGCTTTAAAAAAGTTCCGTAAAATTCATATTTGAAACATCTATATAGATAA
-35 mic TCGCCA CCGCAA AA C T C TGC T C -35 P3
-35 P2 -10 P2 -35 P1 -10 P1

-149 CTGTAACATCTTAAAAGTTTTAGTATCATATTTCGTGTTGGATTATTCTGTATTTTGCGAGAATGGACTTGCCG
A A-10 P3 C G

-74 ACTGGTTAATGAGGGTTAACCCAGTAAGCAGTGGCATAAAAAAGCAA-TAAAGGCATATAACAGAGGGTTAATAAC
A T T A

-21 -1 1
METLysValLysValLeuSerLeuLeuValProAlaLeuLeuValAlaGlyAlaAlaAsnAlaAlaGluIleTyr
1 ATGAAAGTTAAAGTACTGTCCCTCCTGGTACCAGCTCTGCTGGTGGCGGGCGCAGCGAATGCGGCTGAAATTTAT
C A A A C T G C
Val

20
AsnLysAspGlyAsnLysLeuAspLeuPheGlyLysValAspGlyLeuHisTyrPheSerAspAspLysGlySer
76 AATAAAGACGGCAACAAATTAGACCTGTTTGGTAAAGTTGATGGCCTGCACTACTTCTCTGACGACAAAGGCAGC
C T AC A C T A ATGTA
Tyr Asn AspVal

40
AspGlyAspGlnThrTyrMetArgIleGlyPheLysGlyGluThrGlnValAsnAspGlnLeuThrGlyTyrGly
151 GACGGCGACCAGACCTACATGCGTATCGGCTTCAAAGGCGAAMCGCAGGTTAACGATCAGCTGACCGGTTATGGC
T C T T T CT C C
Leu Thr

60
GlnTrpGluTyrGlnIleGlnGlyAsnGlnThrGluGlySerAsnAspSerTrpThrArgValAlaPheAlaGly
226 CAGTGGGAATATCAGATTACAGGGCAACCAGACTGAAGGCAGCAACGACTCCTGGACCGGTGTGGCGTTTGGCGGGT
C AGCG AA GAA A C A C A
SerAla AsnGlu Asn

80 100
LeuLysPheAlaAspAlaGlySerPheAspTyrGlyArgAsnTyrGlyValThrTyrAspValThrSerTrpThr
301 CTGAAATTCGCTGACGCAGGTTTCCTTCGATTATGGTCGTAACACTACGGGCTAACCTATGACGTGACCTCCTGGACC
CAG T TG T C C TGTT A T
Gln Val Val

120
AspValLeuProGluPheGlyGlyAspThrTyrGlyAlaAspAsnPheMetGlnGlnArgGlyAsnGlyTyrAla
376 GACGTTCTGCCGGAGTTCGGCGGCGACACCTACGGCGCTGACAACTTTATGCAGCAGCGTGGTAACGGCTATGCT
A A A T T T C
Ser TC G
Phe

140
ThrTyrArgAsnThrAspPhePheGlyLeuValAspGlyLeuAspPheAlaLeuGlnTyrGlnGlyLysAsnGly
451 ACCTACCGTAACACCGACTTCTTCGGTCTGGTGGATGGCTCGGACTTCGGCTGCAGTATCAGGGCAAAAACGGC
T T C C A T TG T C T
Asn Val

160
 526 SerValSerGlyGluAsn-----ThrAsnGlyArgSerLeuLeuAsnGlnAsnGlyAspGly
 AGCGTGAGCGGTGAAAAC-----ACCAACGGTCGCAGCCTGCTGAACCAGAACGGCGACGGT
 A CCATCT GG TTTACTAGTGGCGTAACT A TGA GCA CGT A C
 AsnPro GlyPheThrSerGlyValThrAsn AspAla Arg

180
 583 TyrGlyGlySerLeuThrTyrAlaIleGlyGluGlyPheSerValGlyGlyAlaIleThrThrSerLysArgThr
 TACGGCGGATCGCTGACTTATGCAATCGGCCAAGGCTTCTCTGTCGGTGGCGCTATCACCACGTCTAAACGTA
 GT T TA C ATTA --- T GG A T G T GC C
 Val Ile AspTyr--- GlyIle SerSer

200 220
 658 AlaAspGlnAsnAsnThrAlaAsnAlaArgLeuTyrGlyAsnGlyAspArgAlaThrValTyrThrGlyGlyLeu
 GCCGATCAGAACAACACCGCTAACGCTCGCCTGTATGGTAACGGCGATCGCGCCACGGTTTACACCGGCGGCCTG
 AT C C G T T ATC----- C T TGAAACC T T T
 AspAla ThrAla TyrIle----- GluThr

240
 733 LysTyrAspAlaAsnAsnIleTyrLeuAlaAlaGlnTyrSerGlnThrTyrAsnAlaThrArgPheGlyThrSer
 AAATACGATGCGAACAAACATCTATCTGGCAGCGCAGTATTCTCAGACCTATAACGCAACCCGTTTTGGTACCTCT
 C T C T T CA C C T CG A -----
 Thr Val -----

260
 808 AsnGlySerAsnProSerThrSerTyrGlyPheAlaAsnLysAlaGlnAsnPheGluValValAlaGlnTyrGln
 AACGGCAGCAACCCGCTCCACCTCTTACGGTTTGGCCAACAAAGCGCAGAAGTTTGAAGTGGTTGCTCAGTACCAG
 ----- CCTG GG G A C CT
 Leu Trp Ala

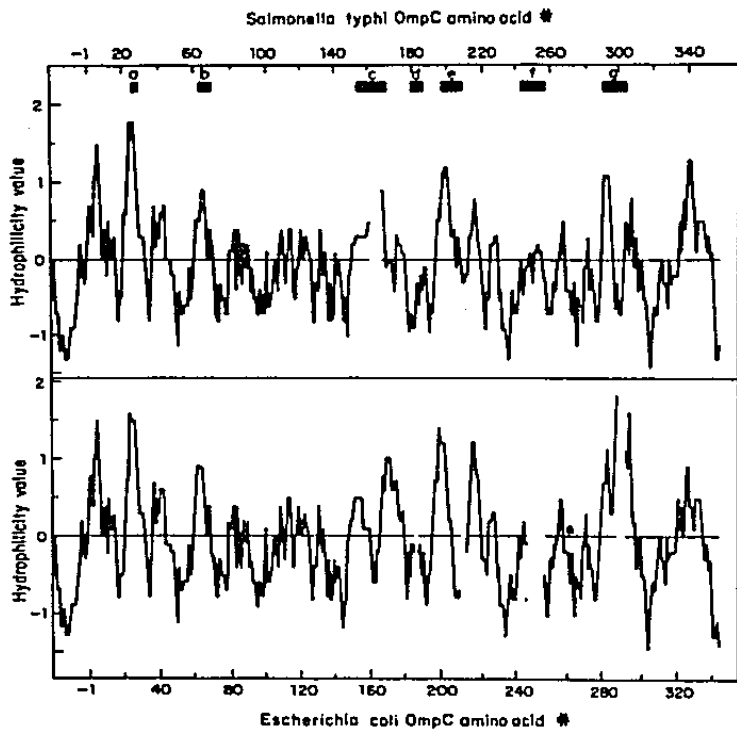
280
 883 PheAspPheGlyLeuArgProSerValAlaTyrLeuGlnSerLysGlyLysAspIleSerAsnGlyTyrGlyAla
 TTCGACTTTGGTCTGCGTCCGCTCTGTGGCTTACCTGCAGTCTAAAGGTAAGGACATCAGCAACGGCTACGGCGCC
 C CC AA C GG TCGT A ---
 Leu AsnLeuGlyArg Asp---

300 320
 958 SerTyrGlyAspGlnAspIleValLysTyrValAspValGlyAlaThrTyrTyrPheAsnLysAsnMetSerThr
 AGCTATGGCGACCAGGACATCGTAAAATACGTTGATGTGGCGCGGACTTACTACTTCAACAAAAACATGTCCACC
 ----- G A T C G T T T T C
 Glu Leu

340
 1033 TyrValAspTyrLysIleAsnLeuLeuAspLysAsnAspPheThrArgAspAlaGlyIleAsnThrAspAspIle
 TATGTTGATTACAAAATCAACCTGCTGGATAAAAACGACTTTACCCGCGATGCGGGCATCAACACCGACGACATC
 C C CG C C G C T T C T T TA
 Asp Gln Asn

357
 1108 ValAlaLeuGlyLeuValTyrGlnPheEnd
 GTAGCGCTGGGTCTGGTTTACCAGTTCTAATCAGCAAAAGATGTTGCTAAAGGGCTCGCGGCCCTTTTTCATG
 T TCG TTGATATCGAAC - T
 Asu II

1183 CCTTATTCCGGCGTACAAAATACGACGTTTTGATATACGCTTGGCTCCATCGAA
 GT TCA--- CT AGTT GG T A G C



-21 -1

HKVKVLSLLVPALLVAGAANA

1 AEIYNKDGKLDLDFGKVDGLHYFS ^{0 30} DKGS DGGDOTYMRIGF ⁴⁰
V Y N DV L

KGETQVNDQLTGYGOWEYOIQCN ^{b 70} TEGSND SMTRVAFAGL ⁸⁰
T SA ME N

KFADAGSFDYGRNHYGVTYDVTSWTDVLPFCGGDTYGADNF ¹¹⁰
Q V V S 120

MQQRGNGYATYRNTDFPGLVDGLDFALQYQCKNG ^{C 160} SVRGEN
F N V NF G

TNCRSL ¹⁷⁰ LNQNGDGYGGS ¹⁸⁰ ^d YAI ¹⁹⁰ CEGFSV ²⁰⁰ CGGAIITTSKRRT ^{AD}
DA R V I DY GI SS DA

FTSGVT ²¹⁰ ^c QNMTANARLY ²²⁰ CNGDRATVY ²³⁰ TGCLKYDANNIY ²⁴⁰ LAAQYSQTY
TA YI --- ET T

NATR ²⁵⁰ ^f FGTSNGSNPSTSYGF ²⁶⁰ ANKAQNFEVVAQYQFDPLRP ²⁸⁰
V --- --- --- L M A

SVAYLQSKK ²⁹⁰ ^g DISNGYGASYGDQDIV ³⁰⁰ KRYVDVGATYYFNKN ³²⁰
L NLGR D --- P L

METVVDYKINLLDKNDFTRDAGINTDDIVALGLVYQF ³³⁰
D Q N 340 350

kd

9.4

6.6

4.4

2.3

2.0

a

b

c

d

e

f

g

h



TABLE I. Codon usage and amino acid composition for *S.typhi* OmpC

aa	cod.	A		B		C		aa	cod.	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	ATG	4	4			4	4	Leu	CTG	23	24		*	26	27
Ile	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	*			

A) Codon usage comparison for *S.typhi* (this study) and *E.coli* (Mizuno et al., 1983) ompC.

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 indicates no clear preference.

C) Amino acid composition of *S.typhi* (this study) and *E.coli* (Mizuno et al., 1983) OmpC.

ACKNOWLEDGEMENTS

The oligo used in this study was synthesized at the Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología by Dr. Xavier Soberón and collaborators; 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 typescript.

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.

Benson, S.A., Occi, J.L.L. and Sampson, B.A.: Mutations that alter the pore function of the OmpF porin of Escherichia coli K12. 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. Bioessays 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., Ruíz-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 of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 78 (1981) 3824-3828.

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., Ortíz, 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 Mkel P.H.: Immunization with major outer membrane protein (porin) preparations in experimental murine salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 34 (1981) 328-332.

Maniatis, T., Fritsch, E. and Sambrook, J.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY, 1982.

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.

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., Grundstrm, 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 complementary 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.

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.