

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
División de Ciencias Biológicas y de la Salud



**CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL CANDIDATO A
PORINA OmpF DE *Salmonella typhi* 9,12 Vi:d**



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL
PRESENTA:
MARIA TERESA MATA GONZÁLEZ

TUTOR: DR. VIANNEY FRANCISCO ORTÍZ NAVARRETE

México, D.F., 1999

225712

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), y el Departamento de Biomedicina Molecular. CINVESTAV, bajo la tutoría del Dr. Vianney F. Ortiz Navarrete y la asesoría del Dr. César Raúl González Bonilla y el M. en B.E. Joaquín F. Herrera Muñoz.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana cuenta con el apoyo del CONACyT No. de registro 309-0 por considerársele con nivel de excelencia.

Mi reconocimiento al CONACyT por el apoyo económico brindado con la beca 115041, durante el período de Febrero de 1997- Febrero de 1999, con la cual se llevó a término la presente tesis.

CONTENIDO

Índice de figuras	i
Índice de tablas	ii
Principales Abreviaturas	iii
INTRODUCCIÓN	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
OBJETIVOS	10
DESARROLLO EXPERIMENTAL	
A. Cepas bacterianas	11
B. Plásmidos	11
C. Preparación de bacterias competentes	12
D. Amplificación del gen candidato a la porina OmpF	13
D.1 Diseño de los cebadores	13
D.2 Obtención del DNAc de <i>S. typhi</i> 9,12 Vi:d	13
D.3 PCR para la amplificación del probable gen OmpF	14
E. Purificación del producto de PCR	15
F. Clonación del producto de PCR	16
G. Detección del probable gen OmpF	16
G.1 Aislamiento y transferencia de colonias	16
G.2 Hibridación con sondas radiactivas	17
G.3 Detección de las colonias portadoras del candidato OmpF	17

H. Caracterización molecular del probable gen OmpF	17
I. Secuenciación del gen	18
J. Extracción de porinas mediante el método de Nikaido	18
K. Purificación de la proteína recombinante	19
L. Caracterización del producto del gen OmpF	19
L.1 Bioquímica	19
L.2 Inmunoquímica	20
L.3 Topológica	20
M. Análisis comparativo de la estructura primaria	21

RESULTADOS

1. Obtención del gen candidato a porina OmpF de <i>S. typhi</i> 9,12 Vi:d	22
2. Clonación del candidato OmpF	24
3. Identificación del probable gen OmpF	27
4. Análisis del producto del probable gen OmpF	31
5. Análisis comparativo de la estructura primaria	37

DISCUSION	40
-----------	----

BIBLIOGRAFÍA	42
--------------	----

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Organización de la envoltura de las bacterias gram-negativas
- Figura 2. Estructura del monómero de la porina OmpF de *Escherichia coli*
- Figura 3. Regulación de la porina OmpF en *E. coli*
- Figura 4. Mapa del plásmido pUC19
- Figura 5. DNA cromosomal de *S. typhi* 9,12 Vi:d
- Figura 6. Gen OmpC y candidato a gen OmpF
- Figura 7. Plásmido pUC19 digerido con Sma I
- Figura 8. Hibridación de colonias acarreadoras del gen candidato OmpF de *S. typhi*
- Figura 9. Clonación del gen probable OmpF en pUC 19
- Figura 10. Secuencia del gen probable OmpF
- Figura 11. Homología y patrón de restricción del probable OmpF y OmpC
- Figura 12. Proteína recombinante
- Figura 13. Expresión de la proteína recombinante OmpF de *S. typhi* en *E. coli* UH302
- Figura 14. Caracterización de la proteína recombinante
- Figura 15. El producto del gen OmpF de *S. typhi* se exporta a membrana y es reconocido por IgG's antiporinas de *S. typhi*
-

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Homología entre la probable porina OmpF de *S. typhi* y la porina OmpF de *S. typhimurium*.
- Tabla 2. Homología entre la probable porina OmpF y OmpC de *S. typhi*.
-

PRINCIPALES ABREVIATURAS

Ab's	Anticuerpos
BSA	Albúmina Sérica Bovina
DL ₅₀	Dosis letal al 50%
Kda	Kilodaltons
LPS	Lipopolisacárido
M.E.	Membrana externa
NIH	Cepa abierta de ratones
rOmpC	Proteína OmpC recombinante
rOmpF	Proteína probable OmpF recombinante
pb	pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfatos-salina
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
P.G.	Péptido glicana
PhoE	Proteína de membrana externa, inducible a concentraciones bajas de fosfatos
PME	Proteínas de membrana externa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforésis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
Y.P.	Yoduro de propidio

INTRODUCCION

Las fiebres entéricas continúan causando considerables morbilidad y mortalidad en naciones en las que existe una relación inversa entre el incremento de sus poblaciones y urbanización, y la vigilancia microbiológica del agua potable¹. En estos países la causa más frecuente y seria de fiebres entéricas es *Salmonella typhi*, agente etiológico de la fiebre tifoidea². El control epidemiológico de la enfermedad depende del mejoramiento de la infraestructura sanitaria, del saneamiento básico y de la inspección de portadores tifoídicos³, para lo cual es necesario no solo mejorar el nivel económico de la población, sino también elevar el grado educacional en salud. Debido al tiempo y dificultades que implica el logro de estos objetivos, y a pesar de sus imperfecciones técnicas, las vacunas continúan siendo una buena alternativa para su prevención⁴.

Para la profilaxis de la fiebre tifoidea en nuestro país se cuenta con una vacuna elaborada con bacterias muertas por calor, cuyas principales limitaciones son: que la protección conferida está en función de la dosis infectante a la que el individuo esté expuesto, que la inmunidad es de corta duración y que presenta efectos colaterales adversos dados por la toxicidad del lipopolisacárido bacteriano⁵.

En los últimos años, han sido estudiados diversos antígenos de la superficie de *Salmonella typhi* como probables candidatos a vacunas contra la fiebre tifoidea. Entre ellos se encuentra el antígeno somático "O", el cual induce altos títulos de anticuerpos

tanto en animales de experimentación como en personas con fiebre tifoidea, sin embargo éstos no correlacionan con un estado de inmunidad⁶.

Por otra parte Robbins y Robbins⁷ desarrollaron una vacuna a partir del antígeno Vi de *Salmonella*, la cual, fue evaluada en estudios de campo en Nepal y Africa del Sur^{8,9}, con resultados de protección parcial, muy probablemente por la naturaleza T-independiente del antígeno polisacárido, lo que hace suponer que no se genere respuesta inmune celular ni se desarrollen efectivamente células de memoria para inmunizaciones o retos posteriores.

El estudio de las proteínas de membrana externa (PME's) de las bacterias gram-negativas como inmunógenos ha cobrado mucha importancia, ya que por su naturaleza proteica y su localización habitualmente inducen anticuerpos de alta afinidad y favorecen una respuesta celular, la que genera una inmunidad prolongada que es crucial en la defensa contra patógenos intracelulares como *S. typhi*^{10,11,12,13}.

En 1988 fue demostrada la importancia de las PME de *S. typhi*. en la inducción de inmunidad protectora al reto con la bacteria viva virulenta en un modelo murino de fiebre tifoidea. La inmunización de ratones NIH con una dosis de 30µg de PME confirió sobrevivencia al 100% de los ratones al reto hasta con 500 DL50 tanto de *S. typhi* 9,12 Vi:d aislada de un paciente con fiebre tifoidea, como de la cepa Ty2, que es empleada para la producción de la vacuna tifoídica parenteral; mientras que la inmunización con PME de *S. typhimurium* confirió protección del 60% y 30% respectivamente. Además, suero de conejo anti-PME fue capaz de transferir pasivamente al ratón un estado

protector al reto con *S. typhi*, efecto que desapareció cuando el suero fue absorbido con PME¹⁴. Mediante ensayos de inmunoelectrotransferencia demostraron que este suero reacciona principalmente con un par de PME de P.M. entre 38 y 41 Kda, correspondientes a las porinas¹⁵.

Por otro lado, la observación de que los pacientes con fiebre tifoidea y en fase de convalecencia generan anticuerpos de clase IgG que reconocen principalmente porinas de *S. typhi*, sugiere que también en la infección natural por *S. typhi* las porinas son blanco importante de la respuesta inmune e indica que la inmunidad por anticuerpos contra porinas juega un papel esencial en el control de la infección, aunque, ello no descarta la participación de otros mecanismos de la respuesta inmune¹⁶.

Estudios posteriores evaluaron en el modelo murino la participación de las porinas de *S. typhi* 9,12 Vi:d en la inducción de una respuesta inmune protectora: la inmunización de ratones NIH con la mezcla de 2 porinas extraídas de la membrana externa de la bacteria, y purificadas por métodos bioquímicos tradicionales, indujo protección hasta del 80% al reto de 500 DL50 de *S. typhi*, en ratones que recibieron dos inmunizaciones con 5µg de proteína¹⁷.

Finalmente, mediante ensayos *in vitro* se ha evidenciado que las porinas aisladas tanto de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* son capaces de inducir una respuesta proliferativa de linfocitos T provenientes de ratones, inmunizados con PME o con porinas¹⁸. Datos similares se han obtenido en linfocitos provenientes de individuos con fiebre tifoidea o inmunizados con la vacuna de Germanier¹⁹.

Todos estos resultados han permitido proponer a las porinas de *S. typhi* como las proteínas candidatos en la elaboración de una vacuna contra la fiebre tifoidea.

Las porinas, corresponden al grupo de las proteínas matrices de membrana externa de las bacterias gram-negativas y por sus niveles de expresión en la membrana pertenecen al grupo de proteínas principales. Sus nombres fueron acuñados por su característica asociación a la peptidoglicana mediante enlaces iónicos (figura 1) y por su capacidad de formar poros que participan en permeabilidad de moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular como aminoácidos, iones inorgánicos y sacáridos con un límite de exclusión de 600 Da²⁰, con características particulares cada una. Algunos miembros de la familia de porinas (lamB) funcionan como receptores para fagos²¹. Estudios bioquímicos y moleculares indican que hay una extensa homología entre las porinas de bacterias gram-negativas, aunque de hecho existen secuencias de aminoácidos específicas de especie.

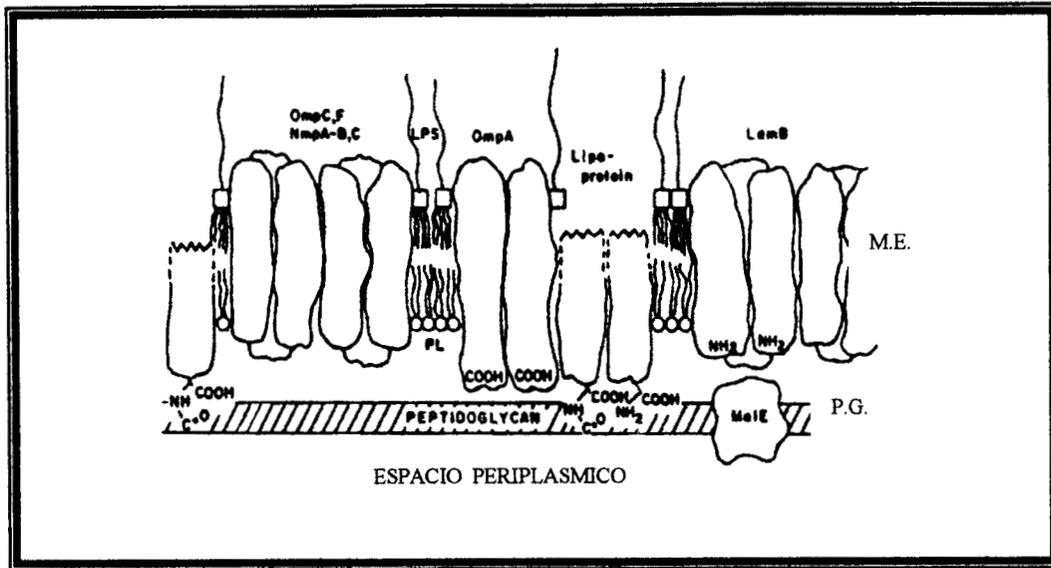


Fig 1. Organización de la envoltura de las bacterias gram-negativas²².
La membrana externa (M.E.), contiene lipopolisacárido (LPS) y a las porinas OmpC, OmpF, OmpA, LamB, que se asocian a la peptidoglicana (P.G.)

Los análisis por espectrofotometría en la región de infrarojo y por dicroísmo circular de las porinas de *E. coli*, muestran que las formas funcionales son trímeros compuestos de subunidades monoméricas idénticas cuya estructura secundaria está conformada por 16 hojas β -plegadas antiparalelas y largas asas con algunas α -hélices intercaladas (figura 2). Cada monómero expone 8 asas ("loops") cortas hacia el espacio periplásmico y 8 asas largas situadas hacia el exterior de la membrana externa. Estos monómeros, forman un cilindro, al unirse mediante un enlace iónico el extremo carboxilo de la hoja β -16 y el extremo amino de la hoja β -1²³.

El mayor número de modificaciones en la secuencia proteica entre una y otra porina se localiza en las asas externas²⁴ y por lo tanto son éstas las responsables de la diferencia en el tamaño de la entrada de los poros. La estructura del trimero se forma mediante el entrecruzamiento de las regiones hidrofóbicas de las vueltas β -15 y β -1, donde los diez residuos carboxilo de la región β -16, en particular el último (una Phe) y la hoja β 1, son esenciales para el correcto ensamblaje del monómero de la porina. En el centro del barril se forma un canal inclinado con respecto al eje longitudinal, que está rodeado por dos cinturones de aminoácidos aromáticos que por su interacción con la membrana le permite anclarse a la misma.

Las porinas de la membrana externa de *E. coli* han sido las más caracterizadas; a la fecha se han clonado y secuenciado los genes de las 3 porinas principales: OmpC, OmpF y PhoE, cuyos productos proteicos representan arriba del 2% de la masa total de la bacteria. En *Salmonella typhimurium*²⁵, además se expresa la porina OmpD.

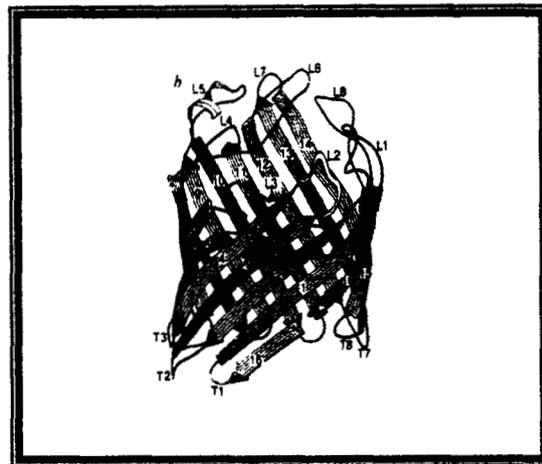


Fig. 2. Estructura del monómero de la porina OmpF de *E. coli*²⁶
T= asas cortas, L= asas largas, β = hojas β -plegadas.

La regulación transcripcional y traduccional de las porinas de bacterias Gram-negativas es multifactorial (figura 3).

PhoE es inducida a bajas concentraciones de fosfato, sus poros son particularmente eficientes en el transporte de fosfato inorgánico, compuestos fosforilados y algunos otros solutos cargados negativamente. OmpF es catión selectivo, y su expresión decrece en cultivos bacterianos en fase estacionaria de crecimiento, debido a un gen que codifica para la proteína rpoS, la cual compite con la subunidad sigma (σ) de la RNA polimerasa e impide la transcripción de OmpF.

OmpF se expresa preferencialmente en medio de baja osmolaridad, mientras que la expresión de OmpC se incrementa en medio de alta osmolaridad. Dicha regulación es mediada por un sistema de dos componentes OmpR y Env Z, cuyos genes se encuentran en el locus OmpB. OmpR es una proteína citoplasmática que se une a los promotores de las porinas OmpC y OmpF, mientras que EnvZ es una proteína de la membrana interna, de la que se propone que modula la función de OmpR a través de fosforilaciones y desfosforilaciones.

Otro factor bien definido en la regulación de porinas es el efecto de la temperatura de crecimiento, en donde participa una secuencia de RNA antisentido denominada MicF, regulando negativamente a la porina OmpF a nivel post transcripcional. El gen de MicF se localiza río arriba de la secuencia de OmpC y se transcribe en dirección opuesta, codifica para dos distintos RNA, uno de 93 nucleótidos que se une al ribosoma en el sitio de unión al RNAm de la OmpF y otra de 174 nucleótidos que contiene secuencias complementarias al sitio Shine-Dalgarno y a las

secuencias iniciales del RNAm de la OmpF. La transcripción del gen *MicF* es estimulada a temperaturas de 37°C o mayores, y juega también un papel importante en la respuesta a agentes tóxicos como el etanol, ácidos y antibióticos, así como el estrés oxidativo. Además se han descrito proteínas que se unen al promotor de *MicF* capaces de regular positivamente su expresión, como: *MarA*, *SoxS*, cuyos extremos carboxilo presentan homología con la familia de reguladores transcripcionales *XylS-AraC*. El incremento en la síntesis de *MicF* resulta en un decremento en la producción de *OmpF*²⁷. Por otro lado, las propiedades del transporte fisiológico mediado por porinas en *S. typhi* se desconocen.

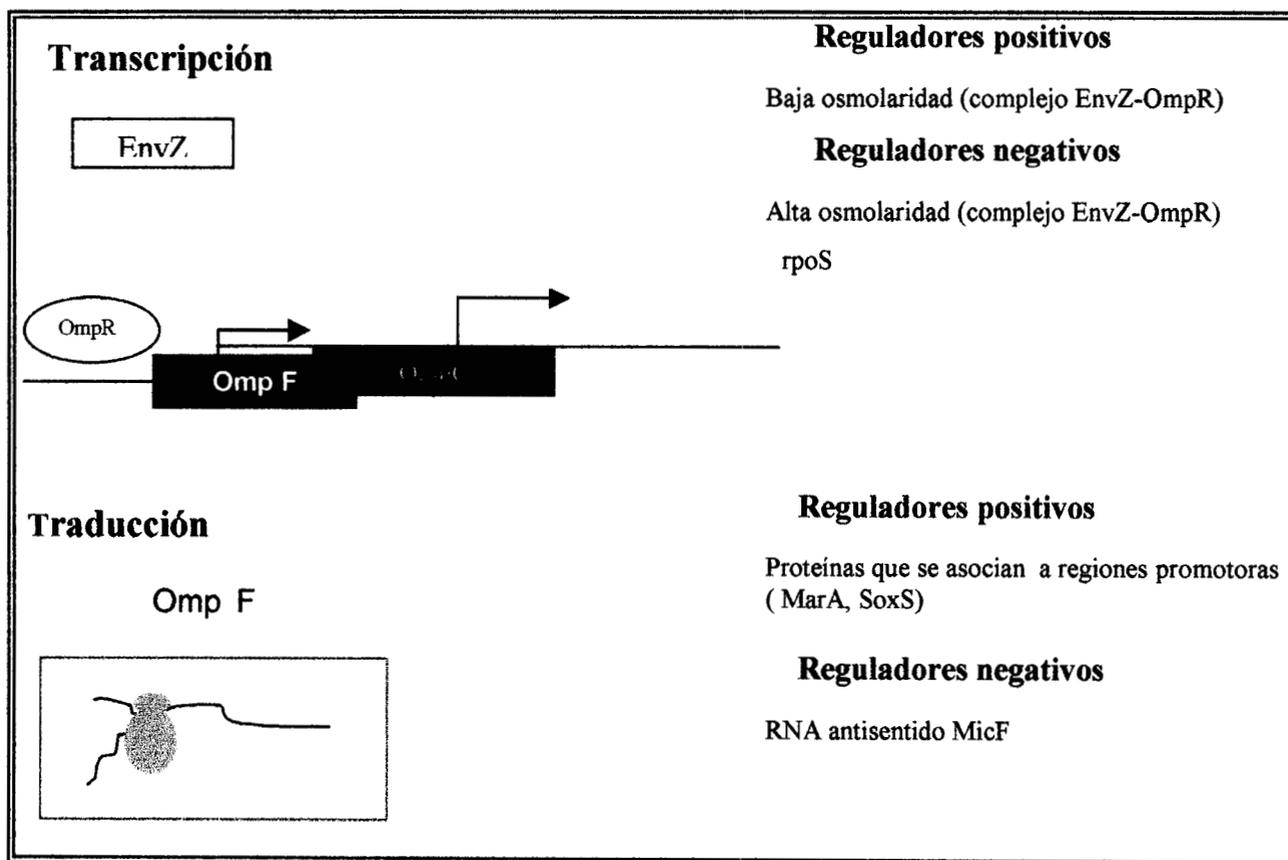


Figura 3. Regulación de la transcripción y traducción de *ompF* de *Escherichia coli* (modificado de ²⁷).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como fue descrito en las propiedades inmunogénicas de las PME , se han aislado de la membrana dos proteínas de 38-41 Kda. que se expresan simultáneamente en cultivos bacterianos a 37°C y condiciones de osmolaridad específicas. Sólo una de ellas ha sido identificada y corresponde a la porina OmpC²⁸. Considerando:

1. Que las porinas son proteínas conservadas filogenéticamente entre las bacterias²⁹.
2. Que presentan unas homologías hasta de un 90% a nivel de DNA entre ellas, y hasta de un 70% a nivel de aminoácidos.
3. Que la porina OmpC caracterizada en: *E. coli* (38 Kda³⁰) *Salmonella typhimurium* (36 Kda³¹) y *Salmonella typhi* (36 Kda²⁸) presentan un peso semejante.
4. Que el polipéptido maduro de la porina OmpC de *Salmonella typhi*, presenta una homología de un 79% a nivel de aminoácidos con su análoga en *E. Coli*³⁰
5. Que en corrimiento electroforético las porinas de *Salmonella typhimurium* presentan un patrón electroforético muy parecido al de las porinas de *Salmonella typhi*.

Por lo tanto la proteína no identificada de la mezcla inmunizada pudiera ser la **OmpF** de *S. typhi*.

OBJETIVO GENERAL

- A.1 Obtención y caracterización de la porina OmpF de *Salmonella typhi*.

OBJETIVO PARTICULARES.

- B.1 Aislamiento y secuenciación del gen de la porina OmpF de *Salmonella typhi*.
- B.2 Producción de la proteína recombinante.
- B.3 Determinación del peso molecular de la porina OmpF.
- B.4 Identificación inmunoquímica de la porina OmpF.
-

DESARROLLO EXPERIMENTAL

225712

A. CEPAS BACTERIANAS

- A.1 *Salmonella typhi* 9,12 Vi:d, aislada de un paciente con fiebre tifoidea y conservada en la U.I.M. en Inmunoquímica del CMN desde 1985.
- A.2 *E. coli* DH5 α (GIBCO BRL), cepa derivada de la DH51; caracterizada por una deleción en el operón lac y en un profago θ 80 que controla la síntesis del fragmento omega de la β -galactosidasa, gyrA (Nal^r), lo que le confiere resistencia al ácido nalidíxico.
- A.3 *E. coli* UH302 derivada de la cadena p400 mediante selección de resistencia a los fagos Tulb, Tula, TuII, y carente de las proteínas de membrana externa OmpC, OmpF y OmpA³².

B. PLASMIDOS

- B.1 Plásmido de clonación pUC 19, que contiene el sitio de clonación múltiple en la región α del gen lac Z (figura 4).
-

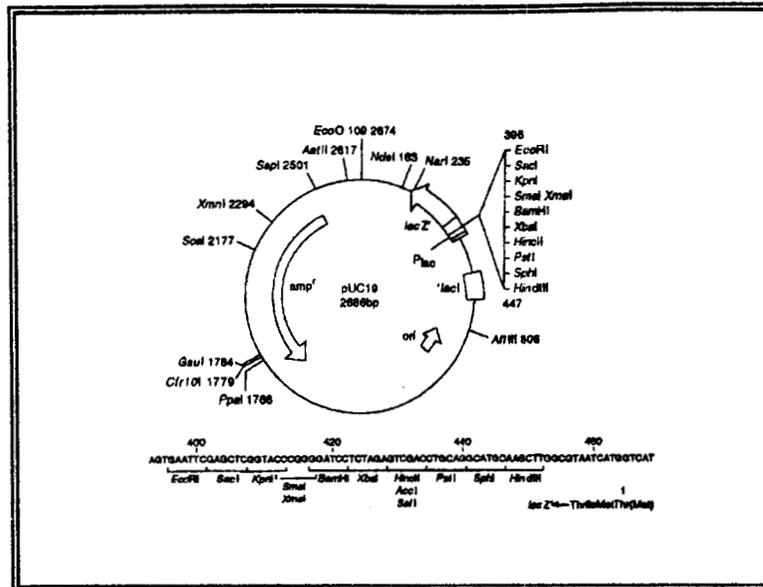


Figura 4. pUC19³³, 2686 pb

C. PREPARACION DE BACTERIAS COMPETENTES.

Una colonia de *E. coli* DH5 α (o UH302) se cultivó durante toda la noche a 37°C con agitación constante a 200 r.p.m. en 30 ml de medio LB (Luria Bertani, 1%, triptona, 0.5% de extracto de levadura y 1% de NaCl pH 7.5). Posteriormente se hizo una dilución 1:200 del cultivo y se continuó hasta alcanzar una D.O. A 600 nm de 0.6, después de la cual se le añadieron 600 ml de medio LB y se continuó el cultivo por 15 min más. La bacteria se cosechó por centrifugación a 6000 r.p.m. durante 10 minutos. La pastilla se resuspendió en 0.01 M de CaCl₂ frío y se incubó en hielo durante dos horas. Al término la bacteria se cosechó por centrifugación, se resuspendió en 10 ml de CaCl₂-glicerol y se almacenó -70°C en alícuotas de 1 ml hasta su uso³⁴.

D. AMPLIFICACION DEL GEN DE LA PORINA OmpF

D.1 Diseño de los cebadores.

Los cebadores sintetizados para la amplificación del gen OmpF de *S. typhi* corresponden a los extremos 5' y 3' de la secuencia publicada de la porina OmpF de *Salmonella typhimurium*³⁵ y fueron denominados 2474 (posición 48-64 pb) y 2475 (posición 1285-1301 pb).

2474

5' GCG AAT TCA CGG TAG CGA AAC G 3'

2475

5' TTC TAG AGG TGT GCT ATT AGA AGT GG 3'

D.2 Obtención del DNA cromosomal de *S. typhi* 9,12 Vi:d

EL DNA cromosomal se obtuvo mediante Isotiocianato de Guanidina³⁶ (TRIZOL GIBCO-BRL), para lo cual 1×10^7 bacterias se resuspendieron en 1 ml de trizol y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se le añadieron 200 μ l de cloroformo, se homogenizó e incubó 3 minutos a temperatura ambiente; al término la solución se centrifugó a 6000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C y se recuperó la fase orgánica, de donde se precipitó el DNA con 300 μ l de etanol absoluto.

El DNA se recuperó centrifugando a 6000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. y se lavó con una solución 0.1 M de Citrato de Sodio en etanol al 10%. Se dio un último lavado con etanol al 75% y se secó por centrifugación al vacío (Speed vacuum) [Hetovac Modelo VR-1 Heto Lab Equipment].

D.3 Reacción de Polimerización en cadena (PCR) para amplificación del gen candidato a porina OmpF

El DNA genómico obtenido se utilizó como templado para amplificar por PCR el gen de la porina OmpF de *S. typhi*, empleando el aparato Robocycler 40 (Stratagene) y la enzima Pwo polimerasa (Lakeside).

Condiciones de la reacción.-

	T1	t1	T2	t2	T3	t3	Num. Ciclos
VENTANA 1	90°C	3'	45°C	2'	72°C	2'	1
VENTANA 2	90°C	1'10"	45°C	1'10"	72°C	1'	20
VENTANA 3	90°C	1'	45°C	1'	72°C	4'	1

Concentraciones de los reactivos.-

COMPONENTE	CONCENTRACION FINAL
Amortiguador de la enzima	20 mM Tris-HCl, pH 8.4 con 50 mM de KCl, 20 mM MgSO ₄
Mezcla de dNTP's	100 μM de cada nucleótido
Oligonucleótidos iniciadores	20.8 pM
Polimerasa Pwo	2 U
Dimetil sulfóxido (DMSO)	3%

E. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR (CANDIDATO AL GEN OmpF)

El producto obtenido de la PCR se sometió a corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1%. La banda de 1200 pb se cortó y se incubó con NaI a 56°C hasta licuar completamente el gel. El DNA se adsorbió a perlas de vidrio por 30 min en agitación constante y se recuperó mediante centrifugación, se lavó con una solución de (50 ml de etanol por cada 100 ml. que contenía 20mM de Tris pH 7.4, 1mM EDTA y 0.1 M de NaCl). Finalmente el DNA se eluyó de las perlas a 56°C y se disolvió en agua inyectable.

F. CLONACION DEL PRODUCTO DE PCR.

El candidato a gen OmpF purificado (inserto) se ligó en el plásmido pUC19³³, que previamente se había digerido con la enzima SmaI, en relación molar 3:1 inserto:vector mediante la catálisis con la enzima T4 DNA ligasa. El producto de la ligación se utilizó para transformar bacterias competentes mediante un choque térmico a 42°C durante 1 min, después de lo cual se sembraron las bacterias en medio LB-Ampicilina (50 µg/ml) y se incubaron 16 H a 37°C. Se analizaron las colonias resultantes (resistentes a Ampicilina) para identificar a aquéllas que portaban el inserto (OmpF)³⁷.

G. DETECCION DEL GEN OmpF

G.1 Aislamiento y transferencia de colonias.

Las colonias probables positivas (seleccionadas mediante corrimiento electroforético en gel de agarosa por presentar un peso molecular de 3.8 Kb, correspondiente al plásmido + el inserto) se aislaron en placas de LB-agar y se transfirieron por contacto a papel de nitrocelulosa. Las bacterias se lisaron mediante el contacto del papel con NaOH 0.5 M y NaCl 1.5 M por 2 min, seguido del tratamiento con (Tris-HCl 0.5 M a pH 8.0 y NaCl 1.5 M) y lavado con SSC (Citrato de sodio, Cloruro de sodio) 2 veces por 45 segundos cada uno. Se secaron brevemente en papel Whatman 3 MM y se entrecruzaron para fijar el DNA bacteriano a los papeles de nitrocelulosa.

G.2 Hibridación con sondas radiactivas

Los papeles de nitrocelulosa (que contenían las colonias) fueron previamente bloqueados con leche al 5% en PBS y se hibridaron con una sonda de DNA de OmpF marcada con citocina [α - 32 P] durante 24 hrs. a 68°C. El marcaje radiativo de la sonda de DNA se realizó añadiendo dCTP 32 p y dGTP, dTTP y dATP no marcados en una reacción de polimerización catalizada por la fracción Klenow de la DNA polimerasa, la sonda fue purificada por filtración en gel (Dupont's Random Primers Extension kit)³⁸

G.3 Detección de las colonias portadoras del candidato OmpF

Los papeles de nitrocelulosa se lavaron a una astringencia de (0.1 [Na⁺]) y la señal positiva de hibridación se reveló a través de la exposición a una placa para rayos X.

H. CARACTERIZACION MOLECULAR DEL PROBABLE GEN OmpF

El DNA de los genes OmpF y el gen de OmpC, los cuales previamente se habían sometido a digestión con diversas enzimas (Alu I, Cla I, Nco I, Nru I, Taq I y Dde I) se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1%, durante 45 min. a 60 volts. El DNA se transfirió a papel de nitrocelulosa mediante capilaridad con Buffer SSC 10X durante 12 Hrs. El papel de nitrocelulosa previamente entrecruzado y bloqueado con PBS-Leche 5% se hibridó con la sonda de OmpC marcada con citocina 32 p por 24 Hrs. a 68°C. El papel se lavó y se reveló empleando una placa para rayos X.

I. SECUENCIACION DEL GEN

El plásmido pUC19 que contenía el inserto candidato al gen OmpF se purificó mediante lisis alcalina y se sometió a una amplificación por PCR en las siguientes condiciones, empleando un secuenciador automático (Perkin-Elmer), y los cebadores 2474 y 2475.

	T1	t1	T2	t2	T3	t3	No. de ciclos
VENTANA 1	96	30''	50	20''	60	4'	30

La secuenciación del producto de PCR se realizó por el método de Fan y cols³⁹ (Perkin Elmer)

J. EXTRACCION DE PORINAS MEDIANTE EL METODO DE NIKAIDO

Las colonias que demostraron contener el plásmido con el probable gen OmpF se expandieron en cultivo para de ellas extraer y caracterizar las proteínas (método de Nikaido⁴⁰). Para ello se transformaron bacterias UH302³² lo que garantiza la expresión de la proteína recombinante. Los cultivos bacterianos se crecieron en un medio mínimo de sales (Medio mínimo A) conteniendo 5% de extracto de levadura, sulfato de magnesio al 25% y 12.5% de glucosa. Se incubaron a 37°C en agitación hasta alcanzar su fase de crecimiento logarítmico (6 Hrs). Se cosechó y resuspendió la bacteria en una solución amortiguadora 10 mM Tris-HCl pH 7.7. La bacteria se rompió mediante

sonicación y se centrifugó a 7000 r.p.m. por 15 min. a 4°C para remover las células intactas y detritus. El sobrenadante se centrifugó a 40,000 r.p.m. por 45 min a 4°C para obtener las membranas celulares. La cubierta de peptidoglicana se disoció mediante una solución de Tris-HCl 10mM pH 7.7, SDS al 2% incubándose 45 min a 32°C y centrifugándose a 40,000 r.p.m. a 20°C. Las proteínas insolubles se resuspendieron en Buffer de Nikaido (Tris 50 mM pH 7.7, SDS al 1%, NaCl 0.4 M, EDTA 5 mM, β -mercaptoetanol al 0.05%) incubándose 2 horas a 37°C. La suspensión se centrifugó a 40,000 r.p.m. durante 45 min a 20°C y las porinas se recuperaron del sobrenadante.

K. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Se llevó a cabo en una columna de exclusión molecular en gel de Sephacryl S-200 (Pharmacia Chemical Co.), la cual se estabilizó previamente con 3 veces su volumen total con Buffer de Nikaido pH 7.7. La muestra se inyectó en la columna con una velocidad de flujo de 0.65 ml/min y se recolectaron fracciones de 3 ml en un colector automático (LKB Instruments) determinando su absorbancia a 280 nm.

L. CARACTERIZACION DEL PRODUCTO DEL GEN *OmpF*

L.1. Bioquímica (Electroforésis)

Las muestras de porinas se precipitaron con acetona, se resuspendieron en buffer muestra y se sometieron a electroforésis en geles de poliacrilamida en cámaras

verticales y sistema de amortiguador discontinuo, según la técnica descrita por Laemmli⁴¹. El gel introductor contenía 4% de acrilamida/bis acrilamida y el gel separador 12.5% acrilamida/ bis acrilamida.

El corrimiento se llevó a cabo a 30 mA por placa. Concluido esto, los geles se tiñeron 1hr con colorante azul de Coomassie R-250 y se decoloraron (Metanol 30% y Ác. Acético 7%) hasta apreciar las bandas proteicas.

L. 2. Inmunoquímica (Western Blot)

La transferencia electroforética de las porinas contenidas en el gel de poliacrilamida al papel de nitrocelulosa se realizó en una unidad de transferencia (BIORAD). Las proteínas se transfirieron al papel a un voltaje constante de 75 V/1.5 h a 4°C, empleando el buffer Towbin⁴². Los papeles se bloquearon con PBS-leche al 5% durante toda la noche, se lavaron con PBS-tween 0.02% y se incubaron 1 hora a 25°C con suero antiporinas hecho en conejo e IgG's purificadas del suero antiporinas.

L.3. Topológica (Citometría de Flujo)

Los cultivos bacterianos (UH302 *Salmonella typhi*, y Bacterias UH302 transformadas con el plásmido pST13 que contiene a la porina OmpC y con el plásmido pUC19 que contiene a la porinas OmpF) se crecieron en medio LB (con o sin antibiótico) y se incubaron a 37°C en agitación hasta alcanzar su fase de crecimiento logarítmico (6 Hrs). Cosechándose mediante centrifugación a 3,000 r.p.m. y resuspendiéndose en PBS para efectuar dos lavados. Posteriormente la bacteria se ajustó mediante espectrofotometría

(540 nm) a 1×10^8 por tubo eppendorf. Se cosecharon las bacterias mediante centrifugación a 14,000 r.p.m por 5 minutos y la pastilla se resuspendió en 100 μ l del primer anticuerpo (suero antiporinas o IgG's anti porinas) y se incubaron en agitación por 45 minutos a T.A. Posteriormente se lavaron las bacterias y se incubaron 100 μ l del segundo anticuerpo (anti-conejo conjugado a isotiocianato de fluoresceína FITC.) durante 45 minutos en agitación a T.A., se lavaron con PBS y se les añadió yoduro de propido (Y.P 4 mg/L). Después de agregar el Y.P. las muestras de inmediato fueron analizadas en el citómetro de flujo FACSort (BECTON-DICKINSON). Los anticuerpos fueron diluïdos en PBS con BSA al (0.1% w/v)⁴³.

M. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA

Utilizando el programa Blast National center Biotechnology (www.ncbi.nlm.nih.gov), se alinearon las secuencias de nucleótidos correspondientes a la regiones 5' y 3' del candidato a porina OmpF con la porina OmpF de *Salmonella typhimurium*³⁵ y la porina OmpC de *S.typhi*²⁸ para determinar la posible existencia de homologías

RESULTADOS

1. OBTENCION DEL GEN CANDIDATO A PORINA OmpF DE *S.typhi* 9,12

Vi:d

El DNA cromosomal de *S. typhi* 9,12 Vi:d que fue purificado por la técnica de Isotiocianato de Guanidina mostró un patrón de alta calidad (integridad y pureza) (Fig 5a), se sometió a una digestión enzimática con Eco RV (Fig 5b) y fue utilizado como templado en la Reacción de Polimerización en Cadena (PCR), que utilizando a los cebadores 2474 (extremo 5') y 2475 (extremo 3'), se llevó a cabo con el fin de amplificar un probable candidato a porina OmpF en *S. typhi* 9,12 Vi:d.

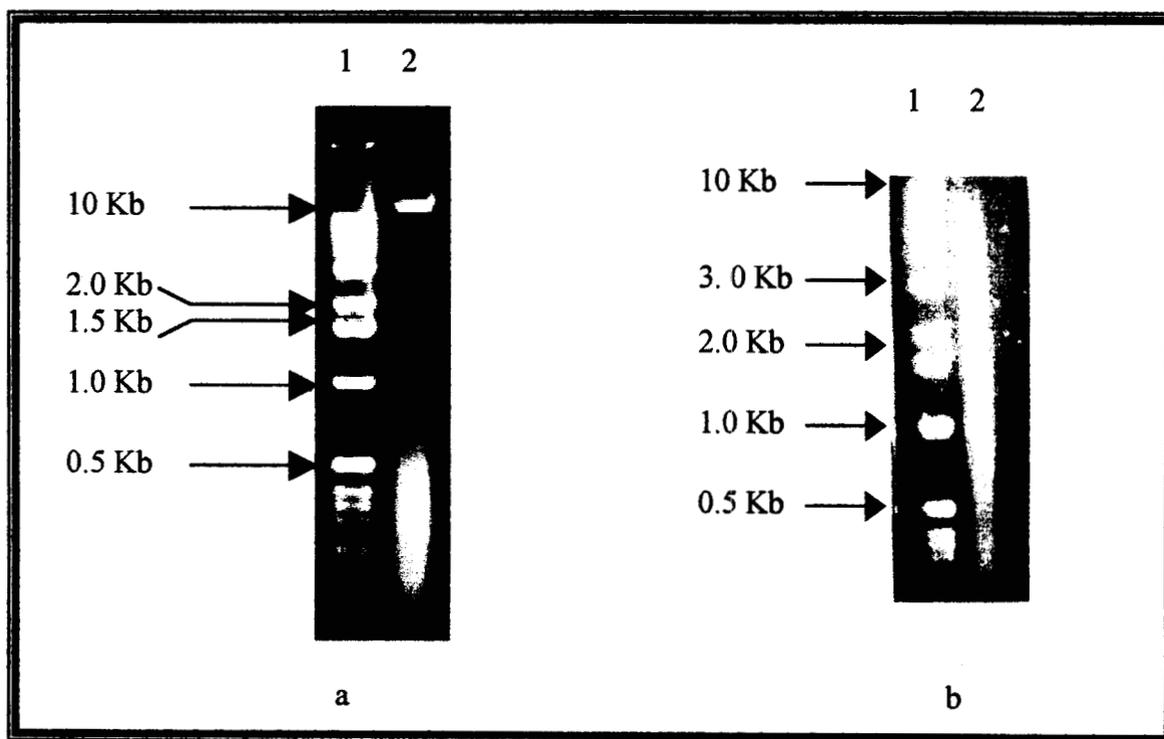


Fig 5 DNA cromosomal de *S. typhi* 9,12 Vi:d íntegro (a) y digerido con Eco RV (b).
Cromatografía en agarosa al 1%.

El producto de la reacción (PCR) corresponde a un segmento de DNA de aproximadamente 1,200 pb, y como se observa en la Fig 6, tiene un peso mayor peso al gen OmpC (1,040 pb) de *S. typhi*

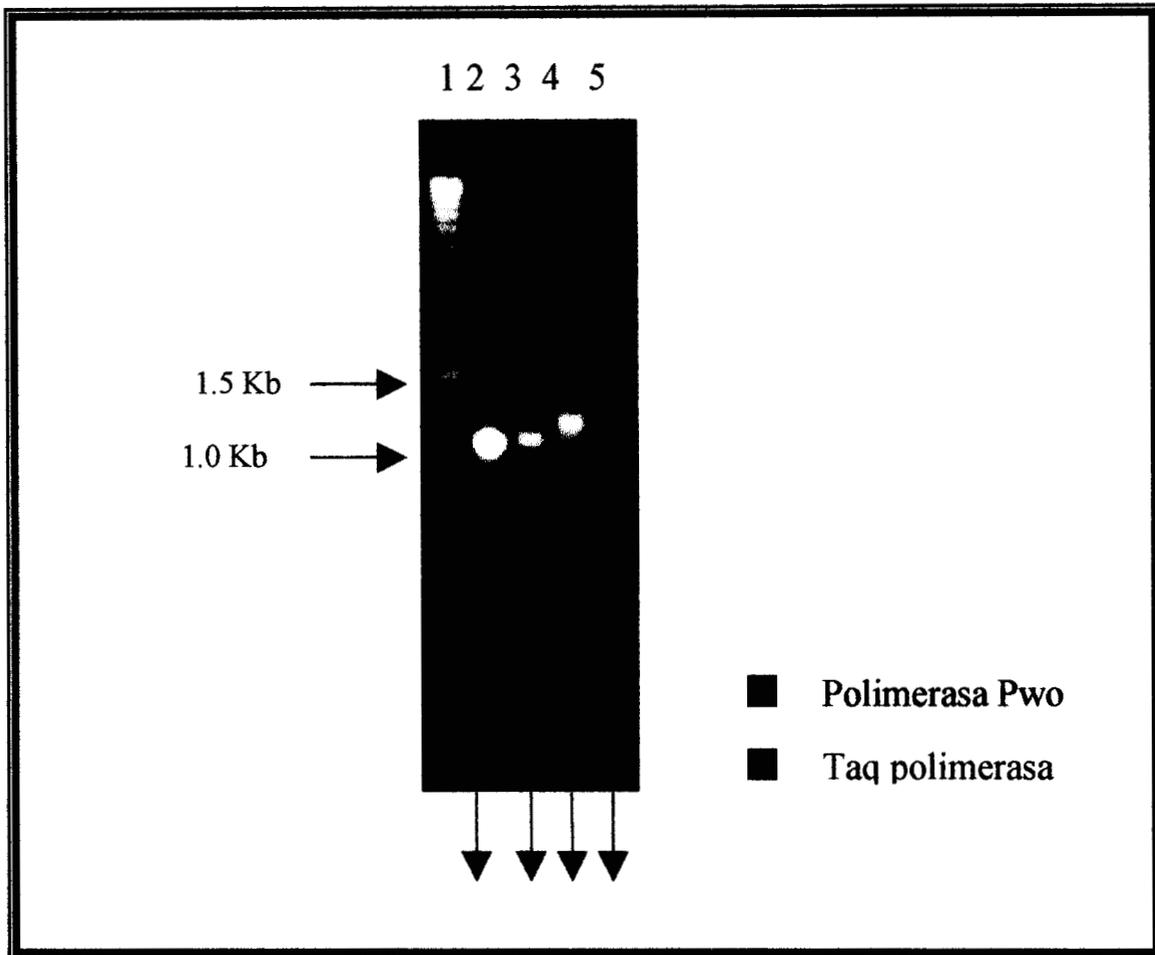


Fig 6. Gen OmpC (4,5) y candidato a gen OmpF (2,3) de *S. typhi* amplificados con Taq polimerasa (3,5) o polimerasa Pwo (2,4).

2. CLONACION DEL CANDIDATO OmpF

Una vez purificado el producto de PCR (candidato OmpF) fue clonado en el plásmido pUC19, previamente purificado y digerido (Fig 7)

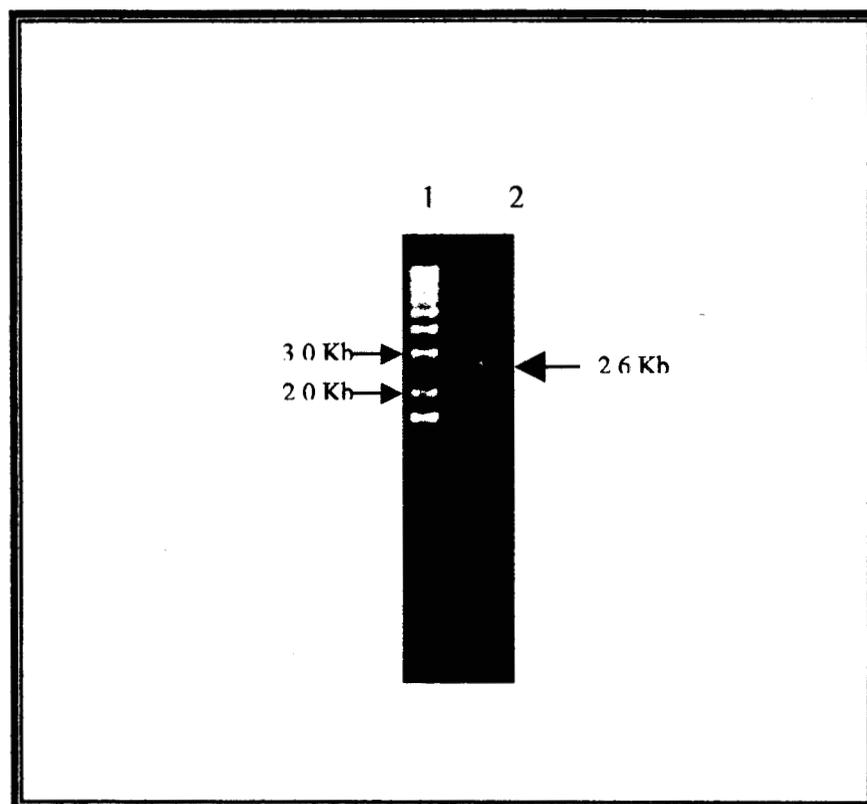


Fig 7. Plásmido pUC19 digerido con Sma I, peso molecular 2.6 Kb.

Una réplica de las colonias obtenidas tras la transformación de *E. coli* DH5 α fue hibridada con una sonda correspondiente al producto de PCR marcado con ^{32}P . Las colonias positivas (Fig 8) se sometieron a expansión, extracción y digestión del DNA plasmídico, lo que permitió corroborar la inserción del gen candidato en el vector, tanto por el aumento del P.M. (3.8 Kb) de la construcción (Fig 9a), como por la liberación de un segmento de DNA de 1,200 pb, correspondiente al gen candidato a OmpF (Fig 9b).

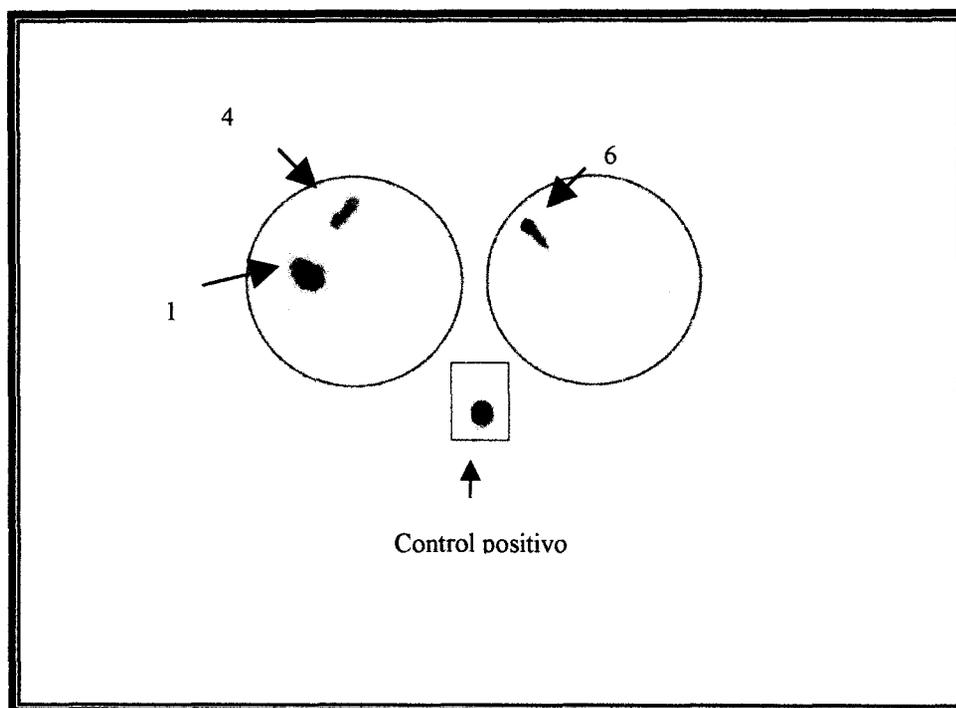


Fig 8. Hibridación de colonias acarreadoras del gen candidato OmpF de *S. typhi*. Utilizando como sonda el producto de PCR.

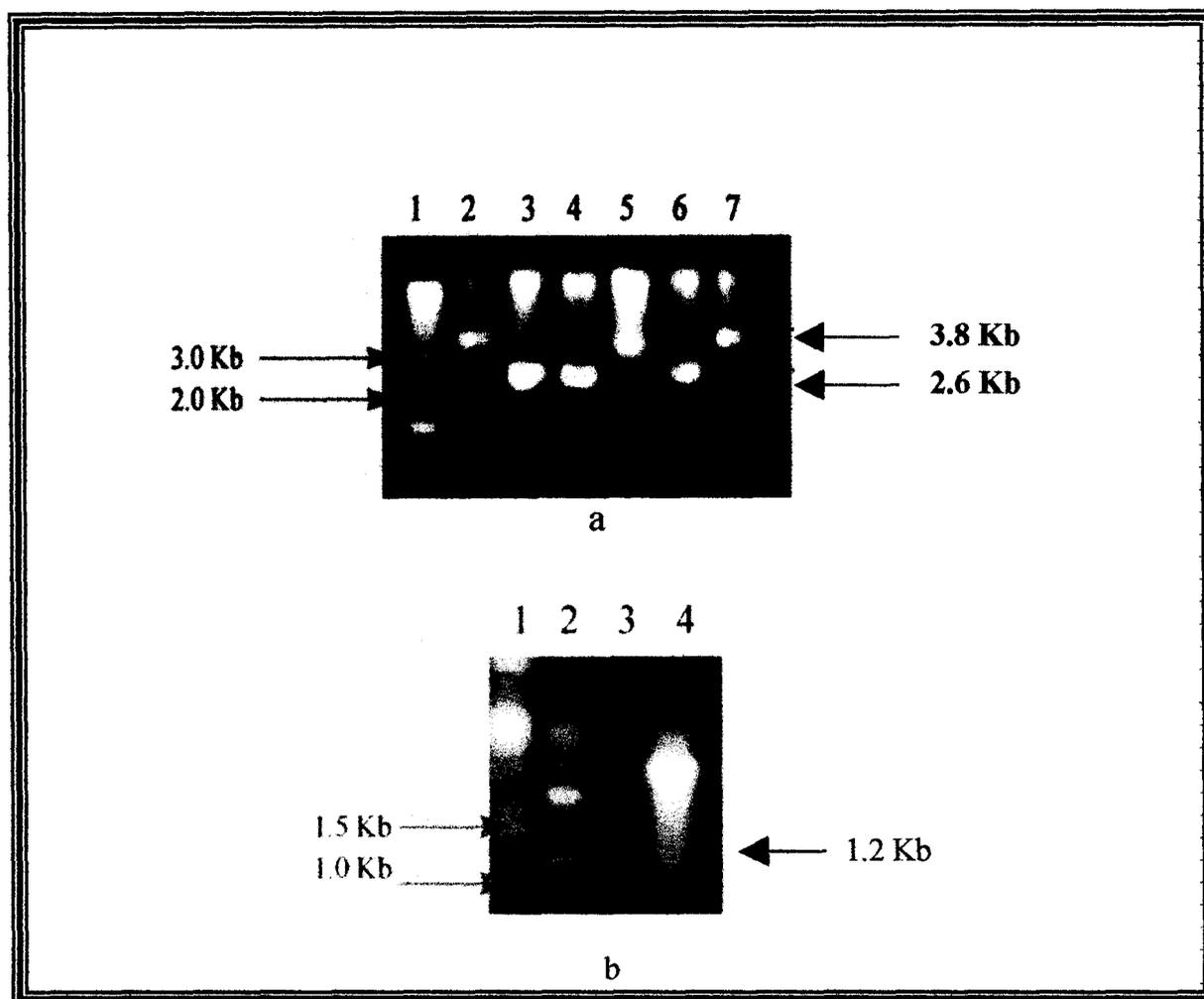


FIG. 9. Clonación del probable gen *OmpF* en pUC19.

- (a) Corrimiento electroforético de DNA plasmídico digerido con *Kpn* I proveniente de las colonias 1,4,6 (carriles 2,5,7 respectivamente), y DNA del plásmido pUC19 digerido con *Kpn* I, carriles 3,4, y 6.
- (b) Liberación del inserto de 1,200 pb, mediante digestión con *Sac* II/ *Hind* III. Carriles 2,3 y 4, colonias 1,4 y 6, respectivamente.

3. IDENTIFICACIÓN DEL GEN PROBABLE OmpF

La secuencia de los extremos terminales 5' y 3' del gen clonado se determinó automáticamente a través del espectro de fluorescencia emitidas por los nucleótidos marcados e incorporados en una reacción de polimerización del gen probable OmpF, con la enzima Amplitaq (Perkin-Elmer), lográndose secuenciar 450 pb de cada extremo. Del extremo 5' terminal 430pb de las 450 pb secuenciadas (Fig 10a) mostraron una homología de secuencia del 97% con el correspondiente extremo en el gen OmpF de *S. typhimurium* . y sólo 45 pb presentaron homología con OmpC, mientras que 439 pb del extremo 3' terminal (Fig 10b) mostraron una homología del 99% con el 3' del gen análogo y sólo 114 pb mostraron homología significativa con OmpC. Las homologías se determinaron con el programa (Blast. National Center Biotecnology).

El patrón de restricción enzimática (utilizando las enzimas Taq I, Alu I, Dde I, Nru I, Nco I y Cla I) permitió establecer diferencias entre el candidato OmpF y OmpC, como se observa en la (Fig 11a), la porina OmpC sólo fue digerida con la enzima Cla I, mientras que el candidato OmpF fue digerido con las enzimas: Taq I, Nru I, Nco I y Cla I Sin embargo la similitud entre ambos genes, se puso de manifiesto por la hibridación cruzada que se observó al utilizar como sonda el gen OmpC-³²P (Fig 11 b).

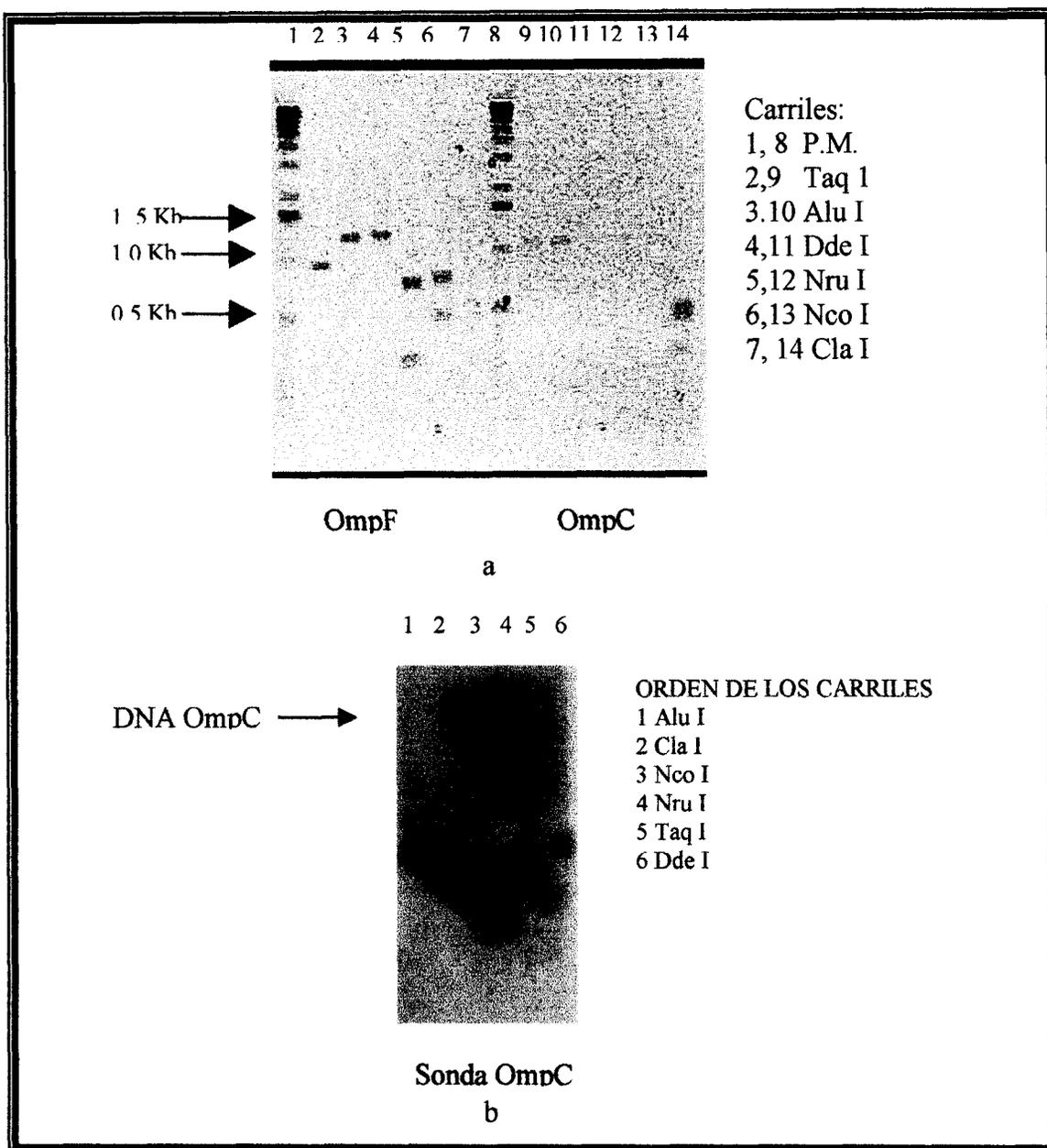


Fig 11 Patrón de restricción del probable OmpF y OmpC de *S. typhi* 11a: 2-7 OmpF, 9-14 OmpC. 11b: Hibridación cruzada tipo Southern con OmpC^{32p} carriles 2-6

225712

4. ANALISIS DEL PRODUCTO DEL GEN OmpF

Las clonas acarreadoras del probable gen OmpF se utilizaron para transformar *E.coli* UH302 (deficiente de las porinas OmpA, OmpC y OmpF), y los cultivos masivos de estas bacterias transformadas para obtener porinas de las membranas mediante la técnica Nikaido⁴⁰. Las proteínas se purificaron por cromatografía de exclusión molecular en una resina de Sephacril S-200 (Fig 12). Las fracciones con mayor D.O. a 280 nm fueron colectadas y sometidas a electroforesis vertical en condiciones reductoras (Fig 13), observándose que el producto del probable gen OmpF clonado, corresponde a una proteína de un PM similar al grupo de porinas, ligeramente más alto que el de OmpC de *S. typhi* (Fig 13b, carriles 3 y 2, respectivamente). Cuando se hace una mezcla de OmpC recombinante (rOmpC) y la probable OmpF recombinante (rOmpF), el comportamiento electroforético corresponde al de las porinas expresadas naturalmente en *S. typhi* (carriles 5 y 2 de 13a, respectivamente), lo que sugiere fuertemente que la identidad del producto del gen clonado es OmpF.

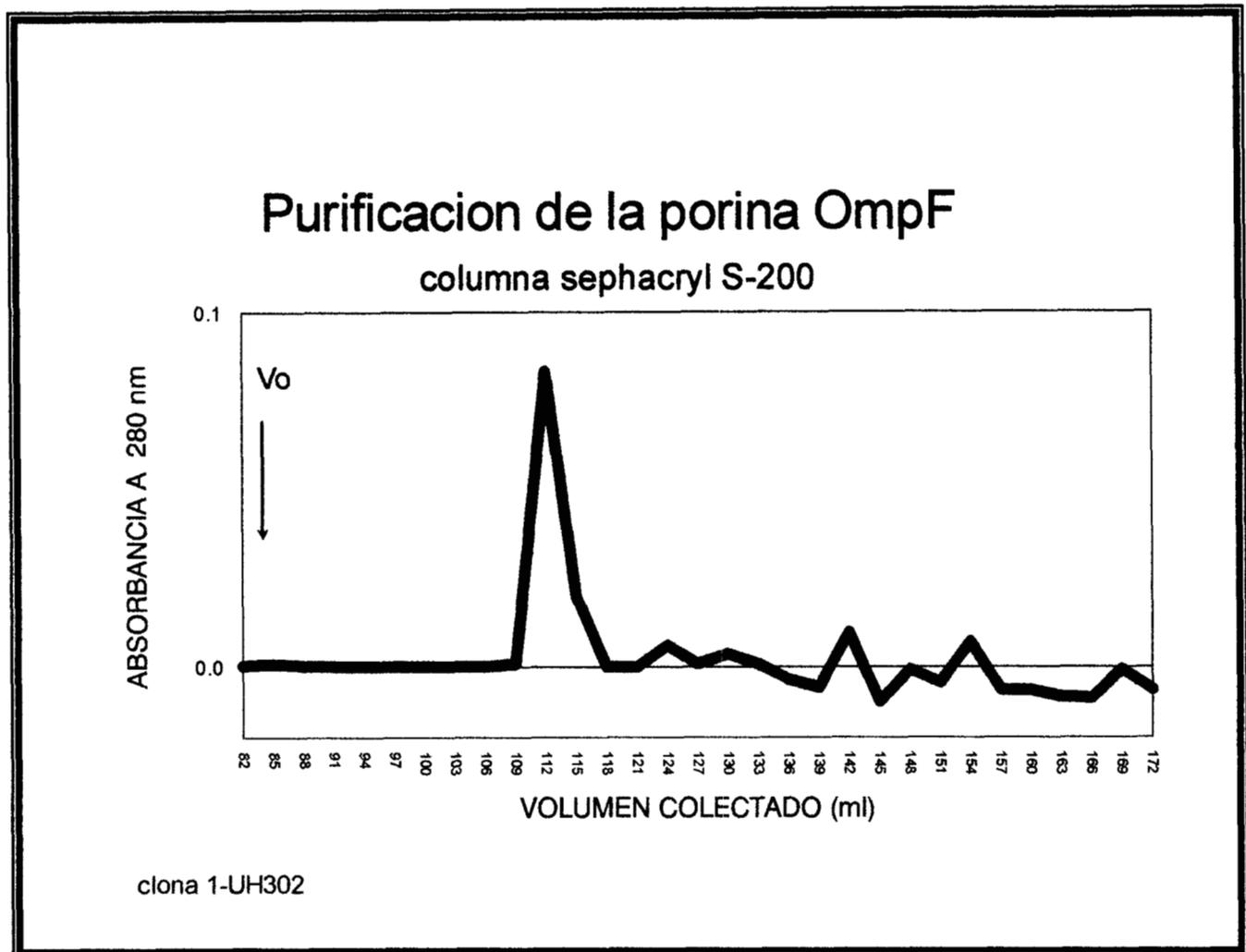


Fig 12 Proteína recombinante (candidato OmpF de *S. typhi*) purificada por exclusión molecular. Columna de Sephacryl S-200. Velocidad de flujo de 0.65 ml/min

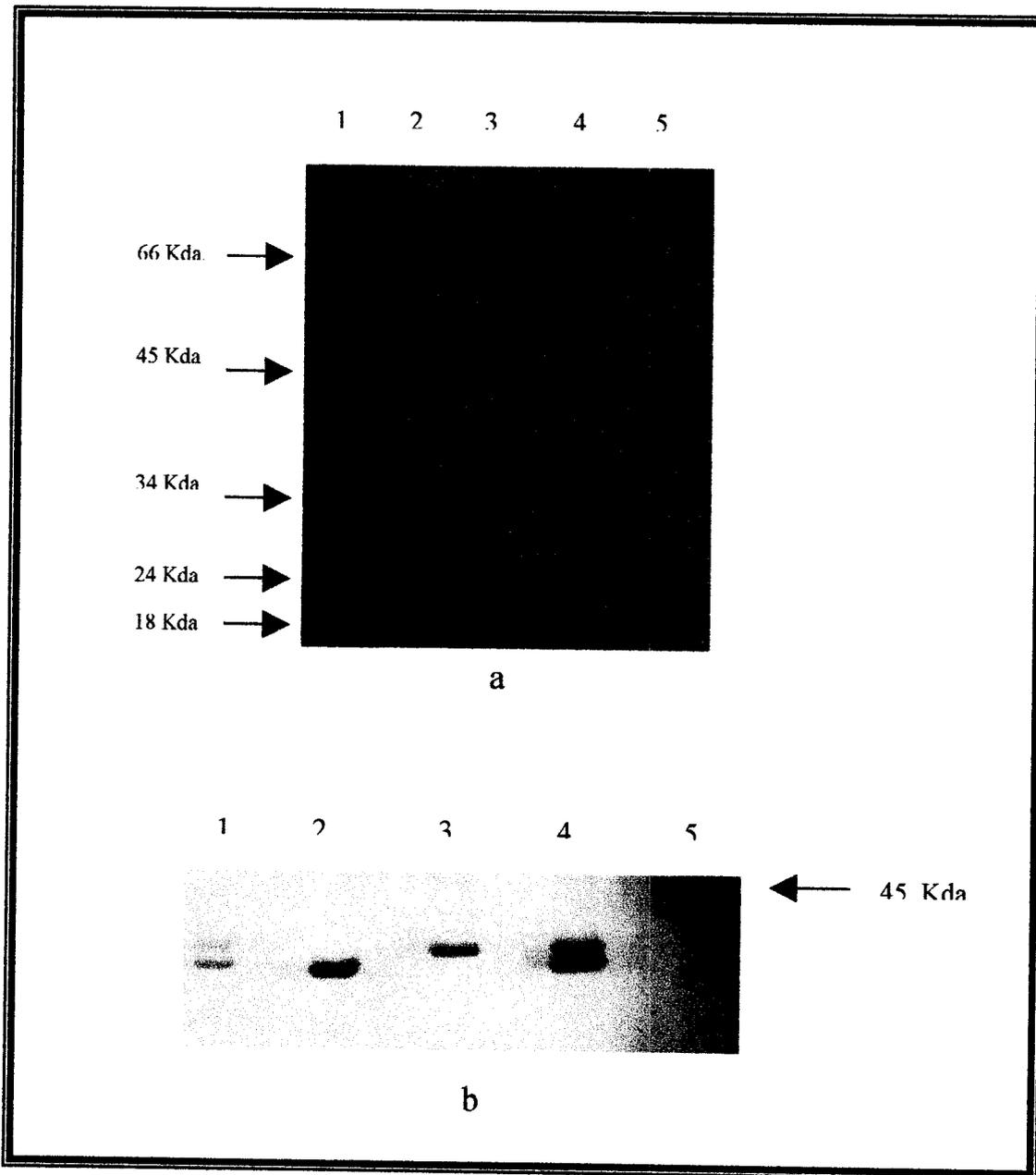


Fig 13 Expresión de la proteína OmpF recombinante de *S. typhi* en *E. coli* UH302. Carril 1y 5 PM SW-70, carril 2 porinas de *S. typhi* 9.12 Vi:d. 2,1, carril 3 rOmpC 3,2. Carril 4 rOmpF 4,3, carril 5 Mezcla de rOmpC y rOmpF 5,4. 13a: Tinción de Coomassie, 13b: Tinción de plata⁴⁴.

La proteína recombinante OmpF purificada de *E. coli* UH302 y desnaturalizada fue reconocida en un ensayo tipo Western por las IgG's de un conejo inmunizado con la mezcla de porinas de *S. typhi* expresadas naturalmente, las cuales reconocen con la misma intensidad a ambas proteínas recombinantes (Fig 14a, 14b).

Por otro lado, mediante Inmunofluorescencia Indirecta utilizando los anticuerpos policlonales antiporinas, se demostró que la proteína probable OmpF se expresa en la superficie de la *E. coli* UH302 transformadas con el plásmido que acarrea el gen, lo que demuestra que su exporte y plegamiento es análogo al que sufren las porinas nativas en *S. typhi* (Fig 15). El nivel de expresión es similar al de OmpC, como se pudo observar por la intensidad de fluorescencia que se obtuvo con la UH302 transformada con el plásmido pST13 (que acarrea el gen OmpC de *S. typhi*)

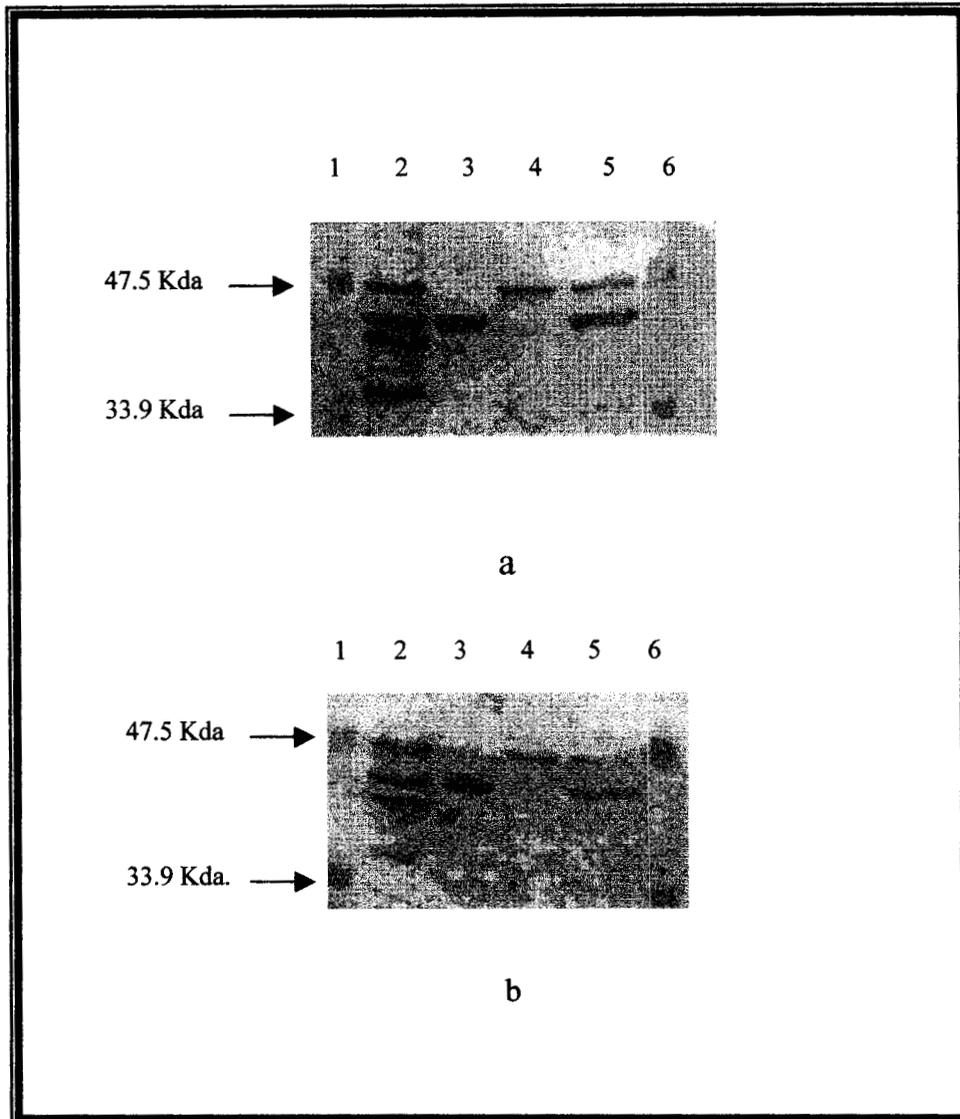


Fig. 14. Proteína recombinante OmpF reconocida por IgG's (a) y Suero (b) de conejo inmunizado con la mezcla de porinas de *S. typhi* expresadas naturalmente. Carriles: 1. P.M. preteñidos (Biorad), 2 porinas de *S. typhi*, 3 rOmpC, 4 rOmpF, 5 mezcla de rOmpC y r OmpF.

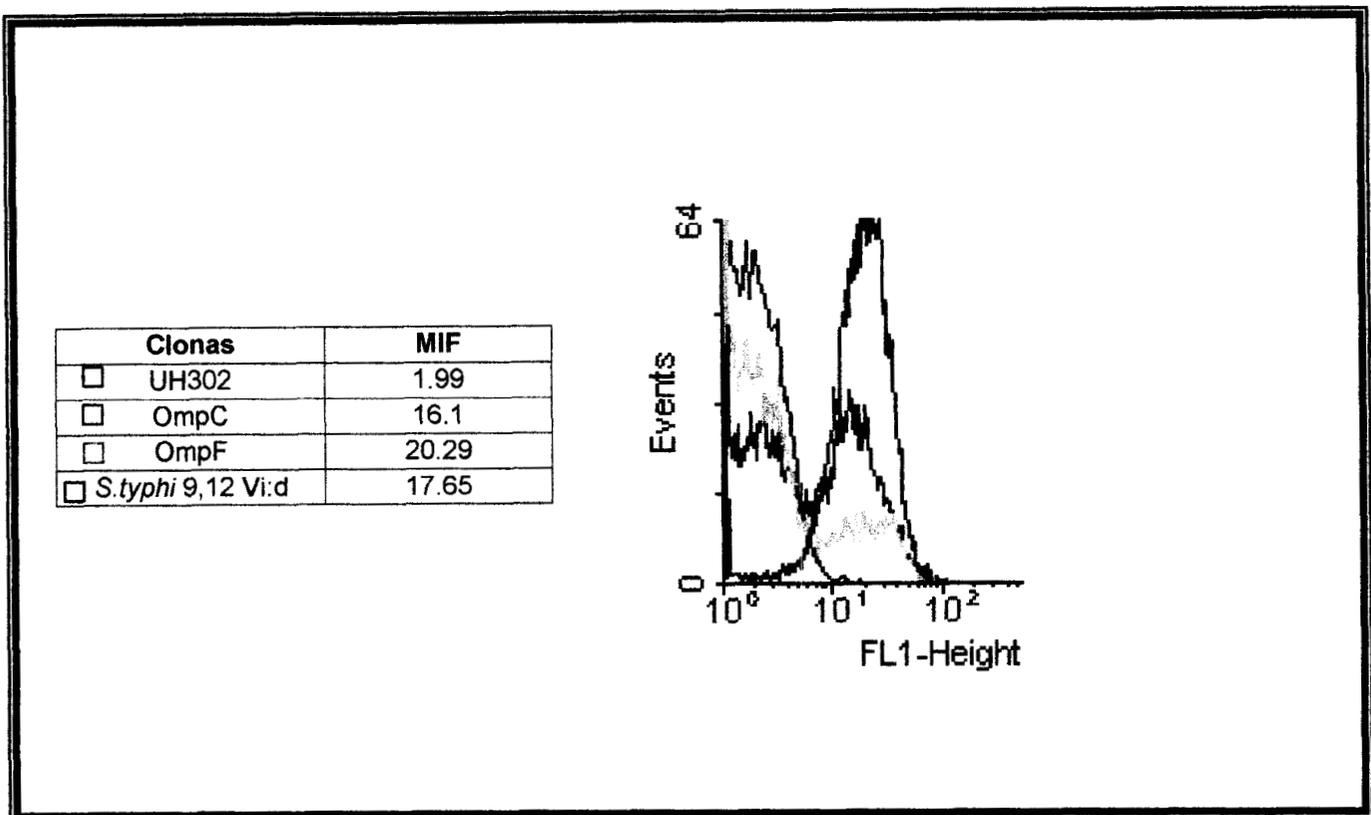


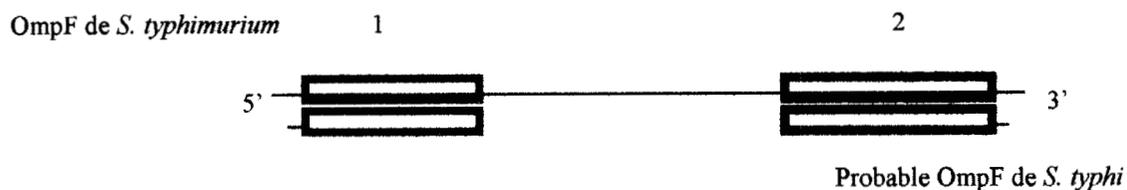
Fig 15 El producto del gen OmpF de *S. typhi* se exporta a membrana externa de *E.coli* UH302.

5 ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA PROBABLE OmpF DE *S.typhi*

El análisis comparativo de la probable OmpF de *S. typhi* con otras porinas descritas, se hizo utilizando el programa Blast National Center Biotechnology (www.ncbi.nlm.nih.gov), alineando las secuencias de nucleótidos de las regiones 5' y 3'.

Se demostró una identidad en 5' y 3' del 97% y 99%, respectivamente, con la secuencia OmpF de *Salmonella typhimurium*³⁵, de acuerdo al modelo estructural de la porina OmpF de *E. coli*²⁶. La región 5', aquí alineada codifica para el codón de inicio, el péptido líder, la hoja β plegada (β) 16, el asa corta (T) T1, la β 1, el asa largas (L) L1, la β 2, el T2, la β 3, el L2 y la β 4. La 3' alineada codifica para la hoja β 9, el α hélice, L5, β 10, T6, β 11, L6, β 12, T7, β 13, L7, β 14, T8, β 15, L8 y β 16. En la tabla 1 se muestra la identidad entre la estructura primaria de la probable porina OmpF de *S. typhi* y la porina OmpF de *S. typhimurium*.

En la tabla 2 se muestra la identidad entre la probable porina OmpF y OmpC de *S. typhi*, en las que la homología sustancialmente se encuentra en 3 regiones: la primera que comprende β 2, T2 y β 3 del extremo 5', la segunda situada en el extremo 3' y que abarca del L6 a β 13, y la tercera, adyacente a la región 2 en 3', comprende del β 14 al L8; de acuerdo al modelo topológico de la porina OmpC de *S. typhi* (Martín O. Manuscrito en Preparación)



	Secuencia	Regiones	Homología	Sustituciones
1	MMKRKILAAVIPALLAAATANAA ¹ E IYNKDGNK ¹⁰ LDLYGKAVGR ²⁰ HVWTTT GDSK ³⁰ NADQTYAQIG ⁴⁰ FKGETQINTD ⁵⁰ LTGFGQWEYR ⁶⁰ TKADRAEGEQ ⁷⁰ QNSN LVRLAF ⁸⁰ AGL	C.Inicio, Péptido Lider, β 16 T 1, β 1, L 1, β 2, T 2, β 3 L 2, β 4	430/440 (97%)	
2	SNSKRTNDQ ²⁰⁰ QDRDGNGDRAASWA VGAKYDANNVYLAAVYAETRNMS IV ²⁴⁰ ENTVTDTVEMANKTQNLEVVAQ YQFFDFGLRPAISYVQSK ²⁸⁰ GQLNGAG ²⁸⁷ GSADLAKYIQAGATYYFNKNMNV WVDYRFNLLD ³²⁰ ENDYSSSYV ³²⁹	β 9, α -hélice, L 5, β 10, T 6, β 11, L 6, β 12, T 7, β 13, L 7, β 14, T 8, β 15, L 8, β 16	439/443 (99%)	G \rightarrow D ²⁸⁷

Tabla 1. Homología entre la porina OmpF de *Salmonella typhimurium* y el candidato a porina OmpF de *Salmonella typhi*. Hojas β -plegadas (β), asas largas "loops" (L), asas cortas "Turns" (T).



	Secuencia	Región	Identidad	Sustituciones
1	KGETQV ⁴⁶ ND ⁴⁸ Q ⁴⁹ LTGY ⁵³ GQ WEY	β 2 T 2 β 3	43/53 (81%)	V \rightarrow I ⁴⁶ D \rightarrow T ⁴⁸ Y \rightarrow F ⁵³
2	N KA ²⁶³ QNF ²⁶⁵ EWVAQYQDF G LRP	L 6 β 12 T 7 β 13	52/60 (88%)	A \rightarrow T ²⁶³ F \rightarrow L ²⁶⁵
3	GATYY FNKNMS ³²¹ T ³²² Y ³²³ VDYK ^{327,328} I ³²⁸ N LDK ³³³ ND	β 14 T 8 β 15 L 8	62/76 (81%)	S \rightarrow N ³²¹ , T \rightarrow V ³²² Y \rightarrow W ³²³ , K \rightarrow R ³²⁷ I \rightarrow F ³²⁸ , K \rightarrow E ³³³

Tabla 2. Homología entre el probable gen OmpF y el gen OmpC de *S. typhi*. Hojas β -plegadas (β), asas largas "loops" (L), asas corta "Turns" (T).

DISCUSION

Por su localización^{22 y 45} y naturaleza, las PME han sido consideradas como antígenos importantes en la inducción de una respuesta inmune protectora contra infecciones por bacterias gram-negativas^{10,11,12 y 13}. Desde 1988, fue demostrada la importancia de las mismas en un modelo murino de fiebre tifoidea, donde las porinas de *Salmonella typhi* son el principal blanco de la respuesta inmune humoral¹⁴ y celular¹⁸, lo que ha permitido proponerlas como proteínas candidatas vacunales contra la fiebre tifoidea.

Las porinas que confieren protección son una mezcla de dos proteínas, de las que una de ellas ha sido caracterizada como la porina OmpC y la identidad de la segunda permanecía sin establecer, sin embargo por las semejanzas bioquímicas existentes entre las porinas, se podía tratar de OmpF, lo que nos llevó a diseñar cebadores correspondientes a los extremos 5' y 3' del gen probable OmpF de *Salmonella typhimurium*³⁵, para poder clonar al correspondiente gen de *S. typhi*: que hasta la fecha no había sido identificado.

El gen amplificado de *S.typhi* presentó un peso aproximado de 1,200 pb, el cual es ligeramente mayor que el gen OmpC de *S.typhi* de aproximadamente 1,040 pb, y presenta un patrón de digestión enzimática diferente a OmpC. El gen OmpF de *S. typhi* fue clonado en el plásmido pUC19³³, y una vez caracterizadas las construcciones se procedió a transformar *E. coli* UH302³² (deficientes de porinas OmpC, OmpF y OmpA) con la finalidad de expresarla como proteína recombinante. La purificación de la proteína recombinante por el método de Nikaido⁴⁰, permite establecer que la OmpF se ensambla, transporta adecuadamente a la membrana externa e interacciona mediante

enlaces iónicos a la peptidoglicana. La purificación por cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-200 permite establecer que se asocia en forma de homotrímeros, ya que eluye en la fracción en la cual se obtienen las porinas de *S. typhi*, es decir con un peso molecular mayor de 110 Kda.

La electroforesis en poliacrilamida-SDS determinó que se trata de la porina con mayor peso molecular presente en la mezcla nativa, y su similitud antigénica quedó de manifiesto por los ensayos de Western-blot, en los que se observó la reactividad con anticuerpos policlonales dirigidos contra las porinas nativas de *S. typhi*. La adecuada expresión de la proteína sobre la superficie de la bacteria se corroboró con los ensayos de Citometría de Flujo, donde los anticuerpos policlonales contra las porinas nativas identificaron una población de UH302 que expresa la proteína en la superficie de manera semejante a la porina OmpC.

La secuenciación parcial del gen y el análisis de la homología con la porina OmpF de *S. typhimurium* y OmpC de *S. typhi* permite corroborar que el gen amplificado del genoma de *S. typhi* y expresado como proteína recombinante se identifica como el de la porina OmpF de *S. typhi*. Estudios posteriores permitirán evaluar la participación de esta proteína en la inducción de inmunidad protectora en la fiebre tifoidea.

BIBLIOGRAFIA

1. Christie, A.B. 1987. Typhoid and Paratyphoid fever in: "Infection diseases", A.B. Christie 4th de. De. Churchill Livingstone. New York p. 100.
 2. Jones B.D. 1996. Salmonellosis: Host Immune Responses and Bacterial Virulence Determinants. *Annu. Rev. Immunol.* 14:533-61.
 3. Nastasi A., Mammina C., Villafrate N.R. 1993. Epidemiology of *Salmonella typhimurium* Ribosomal DNA. Analysis of strains from Human and Animal source *Epidemiol. Infect.* 110:553-565.
 4. Pegues David A. and S.I. Miller. 1994. Salmonellosis, including typhoid fever. *Current Opinion in Infectious Diseases.* 7:616-623.
 5. Joó I. 1970. International conference on the application of vaccines against viral, rickettsial and bacterial disease of man. Washington D.C. p 339-341. PAHO/WHO Scientific publication 226. Pan American Health Organization. Washington D.C:
 6. Hornick, R.B., S.E. Greisman, T.E. Woodward H.L. Dupont, A.T. Dawkins, and M.J. Snyder. 1970. Typhoid fever., pathogenesis and immunological control. Parts I and II *N. Engl. J. Med.* 283:686-691. 739-746.
 7. Robbins, J.D., Robbins, J.B. 1984. Re-examination of the immunopathogenic role of the capsular polysaccharide (vi antigen) of *Salmonella typhi*. *J. Infect. Dis.* 150:436-449
-

8. Acharya IL, Love, C.L., Thapa,R., et al. 1987. Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*. N. Eng. J. Med. 317:1101-1104.
 9. Klugman, K.P., Koornhof. H. J., Gilbertson, Y.T, et al. 1987. Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever *Lacet.* 2:1165-1169.
 10. Wang, L. Y. y Frash, C. E. 1984. Development of a *Neisseria meningitidis* group B serotype 2b protein vaccine and evaluation in a mouse model. *Infect. Immun.* 46: 408-414.
 11. Buchanan, T. M. Pearce, G. K. y Arko, R. J. 1977. Protection against infections with *Neisseria gonorrhoeae* by immunization with outer membrane proteins complex and purified pili. *J Infect Dis.* 136: 1342-1347.
 12. Guling, P. A. , McCracken, G. H. , Frich, C. F. , Johnston, K. H. y Hansen, E. J. 1982. Antibody response of infants to cell surface exposed outer membrane proteins of *Haemophilus* disease. *Infect. Immun.* 37: 82-88.
 13. Kussi, N. J. ; Nurmien, M. ; Saxén, H. y Mäkela, P. H. 1981. Immunization with major membrane protein F (porin). Preparation in experimental murine Salmonellosis; effect of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 34: 328-332.
 14. Isibasi, A. , Ortíz, V., Vargas, M., Paniagua, J., González, C., Moreno, J., y Kumate, J. 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9, 12 d, Vi. *Infect. Immun.* 56: 2953-2959.
 15. Isibasi, A., Paniagua, J., Rojo, M. P., Martín, N., Ramírez, G., González, C., López-Macias, C., Kumate, J. & Ortíz, V. 1994. Role of porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity. *Ann. Ac. Sc. N. Y.* 730: 350-353.
-

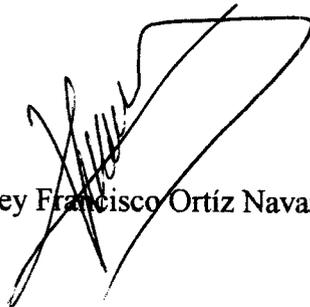
16. Ortíz, V., A. Isibasi, E. García-Ortigoza and Jesus Kumate. 1989. Immunoblot Detection of class-specific Humoral Immune Response to Outer Membrane Proteins isolated from *Salmonella typhi* in Human with typhoid fever. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1640-1645.
 17. Isibasi, A., Ortíz-Navarrete, V., Paniagua, J., Pelayo, Rosana., González, C. R., García, J. A., & J. Kumate. 1992. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine.* 10: 811-813.
 18. González C., Isibasi A., Ortíz-Navarrete, V., Paniagua J., García J.A., Blanco F & Kumate J. 1993. Lymphocitic proliferative response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi*. *Microbiology & Immunology* 37:793-799.
 19. Blanco, F., A. Isibasi, C.R. González, V. Ortíz, J. Paniagua, C. Arreguín and J. Kumate. 1993. Human cell mediated Immunity to porins from *Salmonella typhi*. *Scand J. Infect. Dis.* 25: 73-80
 20. Jap B.K. & Walian P.J. 1996. Structure and Functional Mechanism of Porins. *Physiol. Review.* 76 (4): 1073-1088.
 21. Nikaido, H. & Vaara, M. 1985. Molecular Basic of bacterial outer membrane permeability. *Microbial. Rev.* 49: 1-32.
 22. Osborn, M. J. y Wu, H. C. 1980. Proteins of the outer membrane of gram negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 34: 369-422.
 23. Schulz, G. E. 1993. Bacterial Porins. Structure and function. *Current Opinion in Structure Biology.* 5: 701-707.
 24. Nikaido H. 1994. Porins and Specific Difussion Channels in Bacterial Outer Membranes. *J.of Biol. Chem.* 269 (6): 3905-3908.
-

25. Nikaido, H. and Vaara M. 1987. Outer Membrane. En "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology" (Ingraham, J.L., Low, K.B., Magassanik, B., Schrechter, M. y Umbarger., H.E. Eds). Vol 1. American Society for Microbiology. p.p. 7-22.
26. Cowan, S. W., T. Schringer., G. Rummel., M. Steiert., R. Ghosh., R.A. Pauptit., J.N. Jansonius & J. P. Rosenbusch. 1992. Crystal Structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature*. 358: 727-733.
27. Pratt L.A., W. Hsing, K. E. Gibson and T. J. Silhavy. 1996. From acids to osmZ: multiple factors influences synthesis of the OmpF and OmpF porins in *Escherichia coli*.
28. Agüero J., G. Mora.M.J. Mroczenski-Wildey, M.E. Fernández-Beros. L. Aron and F.C. Cabello. 1987. Cloning, expression and characterization of the 36 Kdal. *Salmonella typhi* porin gene in *Escherichia coli*. *Microbial. Pathogenesis*. 3:399-407.
29. Mizuno T., M.Y Chou and M. Inouye. 1983. A comparative Study on the Genes for Three Porins of the *Escherichia coli* Outer Membrane. *J. Biol. Chem*. 258 (11): 6932-6940.
30. Puente J.L. et al. 1995. The *Salmonella* OmpC gene: structure and use as a carrier for heterologous sequences. *Gene* 156 1-9.
31. Meyer P. et al. 1998. Virulence of a *Salmonella typhimurium* OmpD Mutant. *Infection and Immunity*. 66:1 387-390
32. Cole S.T., Sonntag I. Henning U. 1982. Cloning and Expression in *Escherichia coli* K-12 of the genes for major outer membrane protein OmpA from *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter aerogenes* and *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol*. 149:145-

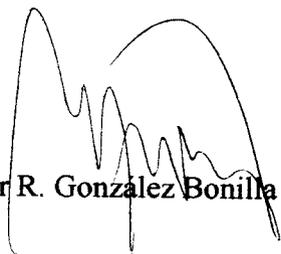
33. Yanisch-Perron, C., Viera J., and Messing J. 1985. *Gene* 33 103
 34. J. Sambrook., E.F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning a laboratory Manual*. Second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 35. Venegas A., Gomez, I., Bruce E. and Martinez, M. PCR amplification and cloning of the *Salmonella typhimurium* *OmpF* porin gene. DNA sequencing and expression in *Escherichia coli*. Unpublished. Acces. Z31594
 36. Chomczynski P., and Sacchi N. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidium tyocianate phenol chloroform extraction. *Annal. Biochem* 162: 156-159.
 37. Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, G.C., and Richardson, C.C. 1968. *J. Biol. Chem.* 2434543
 38. Feinberg, A.P. and Volgelstein, B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonucleases fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, 132, 6-13.
 39. Fan J., R.S. Ranu, C. Smith., C. Ruan, C.W. Fuller. 1996. DNA Sequencing with [α p³³]-labeled ddNTP terminators: a new approach to DNA Sequencing with Thermo-Sequencace DNA polimerase. *Biotechniques* 21 (6): 1132-7.
 40. Nikaido H. 1983. Proteins Forming Large Channels form Bacterial and mitochondrial Outer membranes: Porins and Phage Lambda Receptor Proteins. *Methods in Enzymology* 97: 85-101
 41. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
 42. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins form polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:4350
-

43. Van der Waaij L.A. G. Mesander, P.C. Limburg, and D. van der Waaij. 1994. Direct Flow Cytometry of Anaerobic Bacteria in Human Feces. *Cytometry* 16: 270-279
 44. Gottlieb, M. and Chavko, M. 1987. *Analytical Biochemistry*, 165:33-37
 45. Lugtenberg, B. and Van Alpen, L. 1983. Molecular architecture and functioning of the membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacterias. *Biochem. Biophys. Acta* 743:51
-

Los integrantes del jurado designados por la división de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa aprobaron la presente tesis el día 22 de Noviembre de 1999.



Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete



Dr. César R. González Bonilla



M. en B.E. Joaquín F. Herrera Muñoz