



03072
26
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA 28
DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA.

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE
POSGRADO DEL
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES.

GENÉTICA MOLECULAR DEL GENE *phuI*
DE *Salmonella typhi*.

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA.

P R E S E N T A :

ASCENCION (TORRES ESCOBAR)

DIRECTOR DE LA TESIS: DOCTOR EDMUNDO CALVA MERCADO.

CUERNAVACA, MORELOS

1995



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.

I N D I C E.

GENETICA MOLECULAR DEL GENE *phoE* DE *Salmonella typhi*.

I.- INTRODUCCION.....	1
II.- ANTECEDENTES.....	18
III.- OBJETIVO ESPECIFICO.....	20
IV.- OBJETIVOS GENERALES.....	20
V.- MATERIALES Y METODOS.....	21
VI.- RESULTADOS.....	28
VII.- DISCUSION.....	43
VIII.- CONCLUSIONES.....	47
IX.- BIBLIOGRAFIA.....	48

GENETICA MOLECULAR DEL GENE *phoE* DE *Salmonella typhi*.

I.- INTRODUCCION.

- 1).- *Salmonella typhi*: AGENTE CAUSAL DE LA FIEBRE TIFOIDEA.
- 2).- LA MEMBRANA EXTERNA.
- 3).- REGULON DE FOSFATO EN *E. coli*.
 - A).- La porina de membrana externa PhoE, permite la entrada del fosfato orgánico.
 - B).- La fosfatasa alcalina (PhoA), hidroliza el enlace éster P-O presente en los organofosfatos.
 - C).- El sistema de transporte del Pi "Pst", es activo en condiciones limitadas de fosfato.
 - D).- La hidrólisis de *sn*-glicerol-3-fosfato, como vía alterna para la aportación de fosfato.
 - E).- La hidrólisis de fosfonatos (enlace P-C), una fuente alternativa de fosfato.
 - F).- La activación de los genes del regulón *pho*, es regulada por las proteínas PhoB y PhoR.
- 4).- REGION PROMOTORA DE LOS GENES Y OPERONES DEL REGULON *pho* EN *E. coli*.
- 5).- REGULON DE FOSFATO EN EL GENERO *Salmonella*.

II.- ANTECEDENTES.

III.- OBJETIVO ESPECIFICO.

IV.- OBJETIVOS GENERALES.

I.- INTRODUCCION.

En los últimos años se han manifestado avances notables en el área de investigación biomédica, debido al surgimiento de la ingeniería genética. Con el uso de las enzimas denominadas endonucleasas de restricción, se inició la manipulación enzimática de la molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN), permitiendo introducir fragmentos específicos de ADN a vectores moleculares, como son los fagos, los plásmidos y los cósmidos, facilitando así el estudio del genoma de los organismos. Con ello, cualquier fragmento de ADN puede ser analizado por separado, ya que la manipulación de ADN permite generar copias idénticas de material genético, por medio de clonación molecular (Primrose, 1991; García, et al., 1991; Guizar et al., 1991).

El desarrollo de estas herramientas moleculares está siendo utilizado para comprender la patogenia de las enfermedades infecciosas, las cuales continúan siendo la causa principal de muerte en países en vías de desarrollo. Algunos factores que repercuten en el incremento de las enfermedades infecciosas son:

- a).- Mecanismos sanitarios ineficientes en el transporte de agua.
- b).- Surgimiento de cepas resistentes al uso indiscriminado de antibióticos.
- c).- Pocos conocimientos con respecto a vehículos y portadores de enfermedades.
- d).- Mecanismos de patogenidad y virulencia aún no muy bien definidos.
- e).- Técnicas de diagnóstico poco eficientes y confiables.
- f).- Vacunas con baja actividad inmunológica y costos elevados en tecnología y producción de éstas.
- g).- Poca información por los medios de comunicación en política sanitaria.

Algunos de estos problemas se han ido resolviendo paulatinamente por investigaciones en epidemiología, bioquímica, inmunología, biología celular, biología molecular y fisiología molecular en diferentes microorganismos (Adey et al., 1994).

Una enfermedad infecciosa en humanos que continúa siendo un problema de salud a nivel mundial es la fiebre tifoidea (FT). Es por esto que diferentes grupos de investigadores en todo el mundo, se han interesado en estudiar, generar y aportar conocimientos a la patogenia,

diagnóstico, tratamiento y prevención de la FT (Isibasi et al., 1988; Pang et al., 1992a; Pang et al., 1992b; Blanco et al., 1993; Verdugo et al., 1993).

1).- *Salmonella typhi*: AGENTE CAUSAL DE LA FIEBRE TIFOIDEA.

Salmonella typhi (*S. typhi*), es un bacilo patógeno Gram-negativo, pertenece a la familia de las enterobacterias, las cuales fermentan la glucosa, reducen los nitratos y producen catalasa. Fenotípicamente se diferencian dentro de su género por la producción de ácido sulfhídrico (Edwin, 1986). Serológicamente se han agrupado en cuatro serotipos: 9, 12, d y Vi, con base a la presencia de diferentes determinantes antigénicos: así los serotipos 9 y 12, están definidos por la unidad repetitiva del antígeno somático o antígeno O, el serotipo H por el antígeno flagelar (d) y el serotipo Vi por el antígeno capsular (Bergey, 1984).

A nivel mundial el número de casos por año de la FT sobrepasa los 30 millones, con una incidencia de mortalidad de 500 mil muertes anuales. La incidencia de esta enfermedad es mayor en la población entre los 5-15 años (Edelman y Levine, 1986; Cryz et al., 1989). En México se reportaron 14,963 casos de FT en 1991 (S.N.S. 1991).

Salmonella typhi usualmente penetra al huésped por vía oral, a través de alimentos o aguas contaminadas (Calva et al., 1988). Se ha propuesto que una vez que las bacterias alcanzan al organismo por el tracto gastrointestinal, penetran la capa submucosa del yeyuno e ileum, a través de la invasión de las células M de las placas de Peyer's, pasando al sistema sanguíneo. Una vez allí son fagocitadas por macrófagos en donde se multiplican (Groisman et al., 1990; Miller et al., 1990; Miller et al., 1991), e invaden así los nódulos linfáticos del mesenterio, el bazo, el hígado y eventualmente la vesícula biliar, para producir finalmente una bacteremia (Huckstep, 1962, Calva et al., 1988, Finlay y Falkow 1989). Una vez que se ha establecido la *S. typhi*, el período de incubación varía de una semana hasta un mes.

El establecimiento de la patogenia de la *S. typhi* y los mecanismos moleculares involucrados en la interacción con el huésped, aún no están completamente dilucidados, esto se debe principalmente a la falta de un buen modelo animal. Por eso, la mayoría de las investigaciones se han centrado en la patogenia de la *S. typhimurium* en el ratón, para comprender de una manera indirecta la patogenia de la *S. typhi*.

Entre los avances que se han logrado recientemente están:

- 1).- Se ha determinado que las proteínas de membrana externa (PME) inducen protección, ya que al inocular ratones con/sin preparaciones de PME de *S. typhi* y posteriormente retarlos con la *S. typhi*, se observó que el porcentaje de sobrevivencia aumentó en los ratones infectados con la *S. typhi* previamente inmunizados más no así los ratones controles (Isibasi et al., 1994).
- 2).- Se ha reportado por ELISA, que los sueros de pacientes con FT reaccionan positivamente con las PME de *S. typhi* y los sueros de pacientes con otras enfermedades no reconocen las PME de *S. typhi* (Verdugo et al., 1993).
- 3).- Se ha observado que la cepa de *S typhi* Ty2, incrementa su capacidad de invadir las células Hela y Henle-407, cuando se encuentran en la fase logarítmica tardía de crecimiento, condiciones de alta osmolaridad y concentraciones bajas de oxígeno en el medio de cultivo (Tartera et al., 1993).
- 4).- Se ha demostrado que la porina OmpC de *Shigella flexneri* (la cual es una proteína de la membrana externa), análoga a la porina OmpC de *S. typhi*, participa en el proceso invasivo de *S. flexneri*, pues se ha observado que una cepa de *S. flexneri* OmpC⁻ puede invadir las células epiteliales, pero pierde la capacidad de diseminarse a las células epiteliales adyacentes (Bernardini et al., 1993).

Con estas investigaciones, es claro que las PME de *S. typhi*, tienen un papel potencial en el desarrollo de pruebas de inmunodiagnóstico para la FT así como la generación de nuevas vacunas (Agterberg et al., 1990; Tommassen, et al., 1993). Aunado a esto, gracias a la tecnología del ADN recombinante, será posible expresar en vectores de alto número de copias los genes de las PME en suficientes cantidades como para evaluar su papel inmunogénico.

Debido a la importancia de las PME de *S. typhi*, el interés de este trabajo se enfocó en la caracterización del gene que codifica para la porina PhoE de *S. typhi*. Se ha observado que esta porina en *E. coli* se expresa principalmente en condiciones de crecimiento limitantes de fosfato (Tommassen y Lugtenberg, 1980), siendo su expresión dependiente del sistema de dos componentes PhoB-PhoR. Esto ha hecho interesante el estudio del gene no sólo en *E. coli* sino también en otras bacterias (Shinagawa et al., 1983), con la finalidad de contrastar sus propiedades biológicas.

El objetivo principal de este trabajo fué el de estudiar la expresión del gene *phoE* de *S. typhi*, crecida en condiciones de alto y bajo fosfato, con el fin de establecer posteriormente la función de la porina PhoE de *S. typhi* en la asimilación de diferentes fuentes de fosfato y de esta manera determinar qué mecanismo(s) molecular(es) regulan la expresión del gene *phoE* en el metabolismo del fosfato en *S. typhi*.

Los conocimientos derivados de este trabajo, podrían ser la base de estudios posteriores encaminados a conocer las características biológicas de *S. typhi* como patógeno. Es decir, la importancia de la expresión del gene *phoE* durante el proceso de infección o invasión de *S. typhi*, así como el de la interacción de esta porina con el sistema inmune del huésped.

2).- LA MEMBRANA EXTERNA.

Las bacterias Gram-negativas como *S. typhi* están constituida por dos membranas:

i).- La **membrana interna** o citoplasmática (MI) y ii).- La **membrana externa** (ME). Estas membranas están separadas por una **pared de peptidoglicanos**, la cual confiere la rigidez y morfología celular (Verhoef et al., 1979), y por un compartimiento celular denominado **periplasma**, constituido por polipéptidos y azúcares, así como ciertas enzimas, algunas de las cuales funcionan como transportadoras o enzimas procesadoras para la conversión de metabolitos no transportables a sustratos que sí lo son (Figura 1).

La MI es una bicapa fosfolipídica, la cual contiene una gran variedad de polipéptidos. Estas actúa como una barrera semipermeable permitiendo sólo el paso de aminoácidos y azúcares, para los cuales existen mecanismos de transportes específicos (Buechner et al., 1990). Asimismo, permite la exclusión de productos tóxicos del citoplasma hacia el exterior.

La ME constituye una barrera física y funcional entre las células y el ambiente que la rodea, la cual debe discriminar entre los nutrimentos y compuestos tóxicos y mediar selectiva y simultáneamente su exclusión o su incorporación. (Nikaído y Vaara, 1985). La ME consiste en una bicapa de moléculas anfipáticas y proteínas, las cuales son muy abundantes ya que cubren la cara interna y externa de ésta aproximadamente en un 50% (Hancock, 1991).

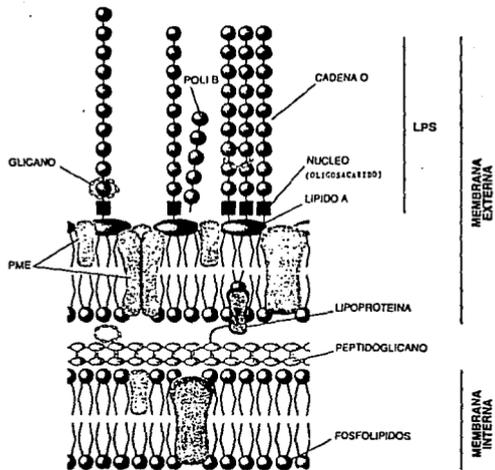


FIGURA 1.- Esquema de los componentes de la membrana interna y membrana externa de una bacteria Gram-negativa.

El alto contenido proteico de la ME está representado sólo por unas cuantas clases de proteínas, dentro de las cuales se encuentran las conocidas como proteínas principales, que son las más abundantes en toda la célula (Hall y Silhavy, 1981).

Además de estas proteínas, la ME está constituida por lipopolisacáridos (45% de la superficie celular) y proteínas menores, las cuales no son tan abundantes. Las proteínas de la ME más ampliamente estudiadas han sido las de las enterobacterias (Bauer et al., 1988; Van der Ley et al., 1987a; Jeanteur et al., 1991).

El lipopolisacárido (LPS), es un componente único de la ME y está en la parte exterior de ésta (Old, 1987). Es una molécula anfifílica que contiene una región hidrofóbica, la cual determina gran parte de la fase lipídica del lado interno de la membrana. El LPS consiste de tres partes:

- i).- El lípido A es la región que conserva el principio endotóxico del LPS (Marshall y Ziegler, 1991).
- ii).- El oligosacárido central está unido covalentemente al lípido A y contiene fundamentalmente azúcares.
- iii).- El antígeno O, se compone de un número variable de unidades repetidas de 3 a 6 residuos de azúcares, esta diversidad determina los diferentes serotipos existentes en una misma especie (Hancock, 1991).

Una de las características del LPS es que se encuentra anclado en la membrana, mediante la unión a proteínas de la ME, posiblemente a través de interacciones hidrofóbicas con el lípido A. El lipopolisacárido confiere a las bacterias Gram-negativas importantes propiedades, como la resistencia a antibióticos hidrofóbicos, sales biliares, detergentes, proteasas, lipasas y lisozima (Nikaido y Vaara, 1985).

Alrededor de 10-20 proteínas menores están presentes en la ME, muchas de ellas se han identificado como receptoras de fagos y colicinas. Se sabe que realizan funciones vitales para el crecimiento de la célula.

Se han descrito alrededor de diez proteínas principales, las cuales se pueden encontrar más de 100,000 copias por célula aunque por lo general sólo se expresan en condiciones de laboratorio cinco de ellas. Entre las proteínas principales se encuentran:

- a).- Lipoproteína de Brown (LPP), esta es una de las proteínas principales de la ME en *E. coli* y está presente en 7.2×10^5 moléculas por célula (Hancock, 1991).
- b).- La proteína OmpA es un polipéptido de 35 kDa en *E. coli*, la cual se localiza en la ME. Se ha observado que posee varias funciones biológicas, como la estabilización de los agregados formados durante la conjugación F-dependientes y junto con la LPP, mantienen la integridad estructural de la ME (Hall y Silhavy, 1981).
- c).- Las porinas son las más abundantes en la ME de *E. coli* y de otras bacterias Gram-negativas (Nikaido, 1992). Su función principal es la de formar poros de difusión pasiva, conformándose en trimeros que permiten el paso de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de esta membrana (De Cock et al., 1990a; De Cock et al., 1990b; Jap et al., 1990; Walian y Jap, 1990).

Se ha observado además, que la estructura de las porinas está fundamentalmente formada por hojas beta-plegadas antiparalelas, que atraviesan en varias ocasiones la ME lo que permite la exposición de ciertas regiones hacia la superficie celular de la bacteria (Van der Ley et al., 1985; Van der Ley et al., 1986). La exposición de regiones en la superficie se ha comprobado por el hecho de que algunas de ellas funcionan como receptoras a fagos (Overbeeke et al., 1983), y por la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra epitopes heterólogos insertados en estas regiones expuestas (Agterberg et al., 1987b; Hogervorst et al., 1990) (Figura 2).

Los genes que codifican para las porinas OmpC (Mizuno et al., 1983), OmpF (Inokuchi et al., 1982; Tommassen et al., 1982a; Osawa y Mizushima, 1983) y PhoE (Tommassen et al., 1982b; Overbeeke y Lugtenberg, 1980; Overbeeke et al., 1983) de *E. coli* ya han sido aislados, secuenciados y ampliamente estudiados. También se han aislado los genes *ompC*, *ompS1* y *phoE* de *S. typhi* (Puente et al., 1987; Fernández et al., manuscrito en preparación; Puente, 1987; Torres, 1993, respectivamente).

El gene que codifica para la proteína PhoE, está localizado en el minuto 6 del mapa cromosomal de *E. coli*. El análisis de la secuencia nucleotídica indica que es una proteína formada por 351 aminoácidos de los cuales los primeros 21 conforman el péptido señal. La proteína madura está formada por 330 aminoácidos (990 pb) con un peso molecular de 36,782 (Overbeeke et al., 1983).

Con respecto a la expresión de la proteína PhoE de *E. coli* (Lugtenberg et al., 1978), se ha observado que es inducida con niveles bajos de fosfato en el medio de cultivo (Tomassen y Lugtenberg, 1980). La expresión de proteínas análogas ha sido demostrada en otras enterobacterias (Bauer et al., 1985; Van der Ley et al., 1987a). Esta porina es regulada por el sistema de dos componentes PhoB (activador transcripcional) PhoR (sensor de las concentraciones de fosfato) (Shinagua et al., 1983). También se ha observado que la síntesis de esta porina se reduce con condiciones de alta osmolaridad en el medio de cultivo. Esta osmoregulación de PhoE es independiente de la proteína PhoR y de la proteína osmosensora EnvZ (Meyer et al., 1990).

Al igual que las porinas OmpF y OmpC, PhoE forma poros de difusión pasiva a través de los cuales pequeñas moléculas hidrofílicas atraviesan la membrana. Sin embargo, se ha comprobado que a diferencia de las otras porinas, PhoE forma poros con preferencia para solutos cargados negativamente (Van der Ley et al., 1987b; Benz et al., 1989; Bauer et al., 1989).

3).- REGULON DE FOSFATO EN *E. coli*

Todos los nutrientes inorgánicos presentes en el medio de crecimiento, existen como cationes o aniones, que son transportados por sistemas membranales altamente específicos (Silver y Walderhaug, 1992).

Se ha observado que cuando *E. coli* crece en medios con bajos niveles de fosfato (en condiciones de laboratorio), activa la síntesis de varias proteínas las cuales permiten la entrada, transporte y regulación de fosfato del medio externo hacia el citoplasma de la bacteria. El fosfato es un componente integral del metabolismo celular general, ya que es indispensable para el aporte de energía, síntesis de ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico) así como para la regulación genética (señales transduccionales entre proteínas sensoras de estímulos y proteínas activadoras transcripcionales) (Rao and Torriani, 1990; Wanner, 1993).

Las proteínas sintetizadas en condiciones de bajo fosfato PhoE, PhoA, PiBP-PstACB-PhoU, UgpBACQ, PhnCDEFGHIJKLMNPO, PhoB-PhoR, son codificadas por genes estructurales que están distribuidos en diferentes partes del cromosoma de *E. coli* (*phoE*, *phoA*, *pstACB-phoU*, *ugpBACQ*, *phnCDEFGHIJKLMNPO*, *phoB-phoR*) y este sistema es llamado

regulón *pho* (phosphate, "regulón de fosfato") (Figura 3B) (Rao y Torriani, 1990; Wanner, 1993).

A).- La porina de membrana externa PhoE, permite la entrada del fosfato orgánico.

Cuando *E. coli* crece en condiciones de bajo fosfato, la síntesis de la porina de ME, denominada PhoE, es inducida, la cual permite la entrada de fosfato orgánico del medio externo hacia el periplasma de la bacteria (Tommasen y Lugtenberg, 1980).

B).- La fosfatasa alcalina (PhoA), hidroliza el enlace éster P-O presente en los organofosfatos.

En el espacio periplásmico se localiza la fosfatasa alcalina (PhoA), esta enzima hidroliza el enlace éster P-O presente en los organofosfatos, liberando así el Pi (Pi, "fosfato inorgánico"), el cual es la molécula metabolizable por la bacteria (Agrawal et al., 1990). También existen otras fosfatasas que pueden hidrolizar organofosfatos pero no pertenecen al regulón *pho* (Wanner, 1993).

C).- El sistema de transporte del Pi "Pst", es activo en condiciones limitantes de fosfato.

En *E. coli*, el transporte de fosfato inorgánico se realiza por dos sistemas de transporte:

a).- En concentraciones de alto fosfato, el mecanismo por el cual el fosfato es transportado del exterior de la bacteria hacia su interior, es a través del sistema constitutivo de baja afinidad, Pit (Pit, "phosphate inorganic transport": transporte de fosfato inorgánico), posiblemente el fosfato pasa a través de las porinas OmpC, OmpF u otra(s) porina(s) hacia el periplasma y después es transportado al citoplasma por la proteína Pit, localizada en la MI. Este sistema no forma parte del regulón *pho* (Rosenberg et al., 1977; Willsky y Malamy, 1980; Wanner, 1983) (Figura 3A).

b).- Cuando los niveles externos de Pi son menores a 20µM, es decir en concentraciones de bajo fosfato, el sistema multiproteico que es activo es Pst (Pst, Phosphate specific transport": transporte específico de fosfato). Este sistema forma parte del regulón *pho*. Los genes que

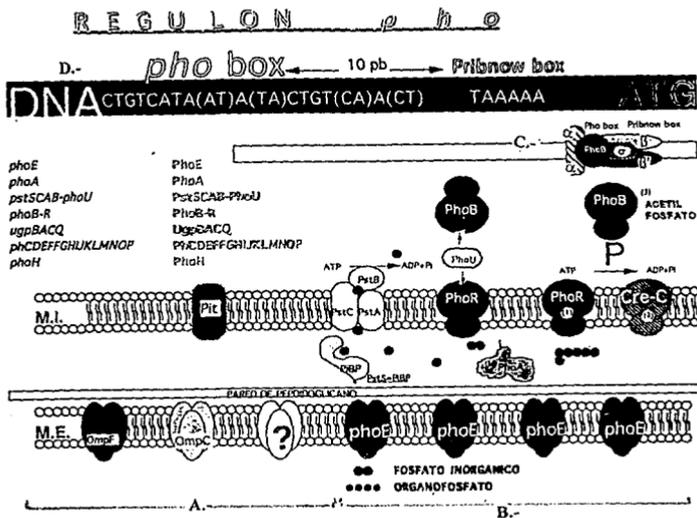


FIGURA 3.- Esquema de las diferentes vías para la entrada del fosfato hacia el interior de la bacteria, dependientes de las fuentes de fosfato y su disponibilidad:

A).- **Condiciones óptimas de fosfato**, posiblemente el fosfato pasa a través de las porinas *OmpC*, *OmpF* u otra (s) porina (s) hacia el periplasma y después es transportado hacia el citoplasma, por un sistema constitutivo de baja afinidad, *Pit* (*Pit* = phosphate inorganic transport; transporte de fosfato inorgánico). Este sistema está compuesto por una sola proteína, localizada en la membrana interna, la cual no forma parte del regulón *pho*.

B).- **Condiciones limitantes de fosfato**, figura donde se muestra los tres sistemas que fosforilan a la proteína *PhoD* de *E. coli* para activar el regulón *pho*. El primer sistema (1), es dependiente de las concentraciones de fosfato inorgánico (P_i) en el interior de la bacteria. Cuando la bacteria se encuentra en condiciones limitantes de fosfato, la porina *PhoE* de M.E. permite el paso de fosfato orgánico hacia el periplasma, donde se localiza la fosfatasa alcalina (*PhoA*). Esta enzima hidroliza el fosfato orgánico para obtener la forma metabolizable que es el P_i , el cual es acarreado por la proteína periplasmática fijadora de fosfato inorgánico *PiPB* (*pstS*), hacia el citoplasma a través un complejo proteico *PstACB* (*pstA-pstC-pstB*), las dos primeras proteínas forman canales transmembranales en la M.I. y la tercera es la permeasa (que aporta energía). Así el P_i se utiliza en la síntesis de ATP. Posteriormente la proteína sensora de la membrana interna, *PhoR*, se autofosforila (aún se desconoce como es este mecanismo) la que a su vez fosforila a *PhoB*, la cual es una proteína soluble en el citoplasma. La proteína *PhoB* se une a la región *pho box* y junto con el factor sigma de la RNA polimerasa activan la transcripción de los genes y operones del regulón *pho*. El segundo sistema (2), que fosforila a *PhoB* y por lo tanto que activa el regulón *pho*, es independiente de las concentraciones de fosfato en el medio de cultivo y actúa a través de la proteína *CreC*, que es también una proteína de la clase histidina-cinasa, que se localiza en la membrana interna; su actividad solo se puede detectar en cepas mutadas en *PhoR*. Aún no está bien definido el mecanismo por el cual esta proteína es fosforilada. El tercer sistema (3), también es independiente de las concentraciones de P_i en el medio y no se sabe si el acetil fosfato, que es un intermediario en el metabolismo del carbono, es el que actúa directamente activando *PhoB* o lo hace indirectamente a través de otra molécula.

C).- Se esquematiza la interacción de la holoenzima con la proteína *PhoD* en la región consenso de *pho box* y Pribnow box.

D).- Se muestra la secuencia de bases de la región consenso *pho box*, donde se une la proteína *PhoB*, así como la secuencia consenso Pribnow box.

codifican para este complejo multiproteico están agrupados en un operón, *pst* (*pstSACS-phoU*) (Surin et al., 1985) (Figura 3B).

La proteína PiBP (PiBP phosphate inorganic binding protein: proteína que une fosfato inorgánico), se localiza en el espacio periplásmico, está es codificada por el gene *pstS*, el cual forma parte del operón *pst* (*pstS*, *pstA*, *pstC*, *pstB* *phoU*). Esta proteína probablemente transporta el fosfato del periplasma hacia los canales transmembranales de la membrana citoplasmática (Magota et al., 1985; Surin et al., 1985; Rao y Torriani et al., 1990; Wanner, 1993).

Los canales transmembranales consisten en dos proteínas, PstA y PstC, las cuales se localizan en la MI. Por mutagénesis de sitio dirigida se demostró que los aminoácidos específicos para el transporte de fosfato son la arginina 227 y glutamina 241 de PstC y la arginina 220 de PstA. A través de un análisis computacional de la secuencia de aminoácidos se observó, que posiblemente las proteínas PstAC contienen de 5 a 6 hélices transmembranales en la MI (Cox et al., 1989a; 1989b; Webb et al., 1992).

En el citoplasma, a un lado del canal transmembranal se une la proteína PstB, la cual contiene un dominio en la región carboxilo terminal para la unión de un nucleótido (posiblemente ATP, adenosin trifosfato). PstB probablemente aporta la energía para la entrada de fosfato inorgánico hacia el periplasma (Stock et al., 1989; Rao y Torriani, 1990; Cox et al., 1989a; Webb et al., 1992).

Se ha observado que las proteínas del sistema Pst tienen dos funciones en *E.coli*:

- 1).- El transporte de fosfato inorgánico (PstSACB).
- 2).- La regulación negativa del regulón de fosfato. A través de la proteína PhoU, la cual está codificada por el gene *phoU* localizado en la parte distal del operón *pst* (Wanner, 1993). Aún existen controversias de la posible participación de la proteína PhoU en el transporte de Pi (Muda et al., 1992; Steed y Wanner, 1993). Sin embargo, se sabe que cuando el Pi es abundante, bajos niveles de la proteína PhoU reprimen al regulón *pho*. En cambio, en condiciones de limitación de fosfato la regulación negativa se pierde.

Recientemente Sinai y Bavoil et al., (1993), con el objetivo de identificar genes *de E. coli*, que no se expresan en condiciones de laboratorio (crecimiento en medios ricos) y que posiblemente codifican para efectores negativos, utilizaron transposones para mutagenizar a una

cepa de *E. coli* entero-invasiva y de esta manera obtuvieron dos mutantes, en las cuales los transposones se insertaron en el operón *pstSACB-phoU*. Las dos *E. coli* mutantes presentaron un fenotipo hiper-invasivo en células de cultivo Hep-2. Estos resultados constituyen la primera evidencia de que el regulón de fosfato no solo está involucrado en el metabolismo de fosfato sino también posiblemente en los procesos de invasión.

D).- HIDROLISIS DE *sn*-glicerol-3-fosfato. COMO VIA ALTERNA PARA LA APORTACION DE FOSFATO.

El sistema para la asimilación de *sn*-glicerol-3-fosfato está determinado por el *locus ugpBACQ* (*ugp*, uptake glycerol phosphate)(Schweizer et al., 1982). *UgpB*, es una proteína análoga a *PstS* y transporta el *sn*-glicerol-3-fosfato del periplasma a los canales transmembranales constituidos por *UgpE* y *UgpA*. La proteína *UgpC* es análoga a la proteína *PstB*. El glicerolfosforil diéster puede ser transportado por *UgpBEC* o directamente hidrolizado por *UgpQ* o *PhoA* (Kasahara et al., 1991; Rao et al., 1993).

E).- HIDROLISIS DE FOSFONATOS (ENLACE P-C). UNA FUENTE ALTERNATIVA DE FOSFATO.

Los fosfonatos (Pn, phosphonates) son una fuente análoga de fosfato. Difieren de los organofosfatos debido a que en lugar del enlace éster P-O, presentan una unión P-C. Algunas bacterias tiene una o dos vías activas (fosfonatasa o C-P Liasa), mediante las cuales hidrolizan el enlace P-C de los Pn, obteniendo así el Pi en condiciones de crecimiento limitantes de fosfato (Metcalf et al., 199; Lee et al., 1992).

En *E. coli* los genes que codifican para las proteínas que permiten la absorción y transporte de Pn, están agrupados en un operón (*phnCDEFGHJKLMN*O). *PhnD* es la proteína que transporta el Pn del periplasma hacia el citoplasma a través de la proteína transmembranal *PhnE*. *PhnC* es la proteína análoga a *PstB* y *UgpC*. La vía P-C liasa posiblemente está constituida por un complejo protéico compuesto por nueve polipéptidos (*PhnG*, *PhnH*, *PhnI*, *PhnJ*, *PhnK*, *PhnL*, *PhnM*, *PhnN*, y *PhnP*). Las proteínas reguladoras de estas vías

probablemente sean PhnF y PhnO pues no se ha observado que participen en la absorción e hidrólisis de Pn (Wanner, 1993).

F).- La activación de los genes del regulón *pho*, es regulada por las proteínas PhoB y PhoR.

La activación de los genes *phoE* y *phoA* así como el de los operones *pstS-ACB-phoU*, *ugpBACQ*, *phnCDEFGHIJKLMNOP*, *phoB-phoR* y otros componentes del regulón *pho*, es dependiente de las proteínas reguladoras PhoB y PhoR (Wanner et al., 1987a; Kimura et al., 1989; Yamada et al., 1989), éstas últimas codificadas por los genes del operón *phoB-phoR*. PhoR es una proteína sensora integrada en la M1 (Yamada et al., 1990), mientras que PhoB es una proteína efectora, soluble en el citoplasma que se une en una región promotora consenso en la molécula de DNA en los genes que pertenecen al regulón *pho* (Makino et al., 1986).

PhoR actúa como un sensor de la concentración de fosfato (Yamada et al., 1990). Cuando sensa niveles bajos de Pi, PhoR se autofosforila, trans-fosforilando a su vez a PhoB (Makino et al., 1989). PhoB fosforilada junto con el factor sigma de la RNA polimerasa, activan la transcripción de los genes del regulón *pho* al unirse a la región consenso llamada *pho box* (caja *pho*) (Figura 3D) (Aoyama y Oka, 1989; Stock et al., 1989) y la proteína producto del gene *phoB* estimula su propia síntesis (Guan et al., 1983).

También se han descrito dos sistemas independientes de la concentración de fosfato, que activan a la proteína efectora PhoB, en *E. coli* (Lee et al., 1990; Amemura et al., 1990; Wanner et al., 1992). Uno de estos sistemas está regulado por la proteína CreC (Catabolite repression: represión catabólica), la cual es también una proteína histidina cinasa (Figura 3B). Se ha observado que esta proteína fosforila a PhoB (Wanner et al. 1988; Wanner et al., 1989). No ha sido posible detectar el fenotipo de CreC en presencia de PhoR (Wanner, 1987b). Usando una fusión de los genes *creC-lacZ*, se mostró que el promotor de *creC* no es regulado por el sistema de control del regulón *pho*. (Wanner y McSharry, 1982).

El segundo sistema que activa al regulón *pho*, el cual es independiente de la concentración de Pi, es el acetil fosfato (Figura 3B). Este es un intermediario en el metabolismo

de la glucosa y no se conoce si es éste quien fosforila directamente a la proteína PhoB o es otro metabolito (Wanner, 1992; McCleary et al., 1993).

4).- REGION PROMOTORA DE LOS GENES Y OPERONES DEL REGULON *pho* EN *E. coli*.

La región reguladora de los genes y operones del regulón *pho*, muestra un aparente **Pribnow box** (caja de Pribnow) en la parte reguladora, pero no una región consenso -35 como en la mayoría de los otros sistemas en *E. coli*. Sin embargo existe una región 10 pb arriba de la de Pribnow box, designada ***pho* box** (Caja de fosfato) (Magota et al., 1984; Surin et al., 1984). Esta es una región de 18 pb, en la cual se localizan 7pb repetidas en ambos extremos de la región separadas por 4pb centrales. En el *pho* box es donde se une la proteína PhoB, que es la activadora del regulón *pho* (Guan et al., 1983; Makino et al., 1993).

En la región promotora del gene *phoA* (Kikuchi et al 1981) y en la de *phoB* (Makino et al 1986), se localiza solo una *pho* box. Sin embargo, en la región reguladora del operon *pst* se localizan dos *pho* box, ubicandose la segundo a 4pb arriba de la primera, y ambas son importantes para la activación óptima del operón (Magota et al., 1984; Surin et al., 1984). En la región reguladora del operon *ugp*, tres *pho* box continuas se han localizado (Overduin et al., 1988; Kasahara et al., 1991).

En la región reguladora del gene *phoE* de *E. coli*, se observó solo una *pho* box, además a 37pb arriba de este *pho* box, se localizó otra región importante para la expresión óptima de la proteína PhoE, denominada pseudo *pho* box y un aparente Pribnow box (**Pribnow box'**) en orientación inversa de la transcripción (Tomassen et al., 1987).

También se ha demostrado la interacción de la región carboxilo terminal del factor sigma de la RNA polimerasa con la proteína PhoB, es indispensable para una eficiente iniciación de la transcripción de los genes que forman parte del regulón *pho* (Figura 3C) (Makino et al., 1993).

5).- REGULON DE FOSFATO EN EL GENERO *Salmonella*.

Los primeros estudios de fosfato en el género *Salmonella*, se iniciaron con el reporte de la actividad de tres diferentes fosfatasa en extractos celulares de la cepa de *S. typhimurium* LT-2, crecida en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono, pH, y con concentraciones de bajo y alto fosfato (Carrillo et al., 1967). Se determinó la actividad de dos fosfatasa ácidas en un pH 4 y pH 5.5 respectivamente, siendo la actividad de esta última dependiente de la concentración de fosfato. La tercera fosfatasa fue activa en un pH de 8-9 e independiente de la concentración de fosfato. La actividad de esta fosfatasa alcalina en *S. typhimurium* fue diferente a la fosfatasa alcalina (PhoA) de *E. coli*. En *E. coli* la fosfatasa alcalina se induce en concentraciones de bajo fosfato, es inhibida por altas concentraciones de fosfato y es estable a choque por calor (5 minutos a 100 C°, baja su actividad en un 50%).

Actualmente no se ha demostrado si el locus de *phoA* existe en *S. typhimurium* o si alguna (s) mutacion (es) puntual (es) en la región reguladora o estructural de este locus influyen en la no actividad de fosfatasa alcalina. Sin embargo al insertar el gene de la fosfatasa alcalina de *E. coli* dentro del cromosoma de *S. typhimurium* por transferencia episomal, se observó que *S. typhimurium* sintetizó la fosfatasa alcalina de manera similar como lo hace *E. coli* (Schlesinger y Olsen, 1968).

En estudios de marcaje radiactivo de proteínas de *S. typhimurium* crecida en concentraciones de alto y bajo fosfato, se observó la inducción de proteínas de peso molecular similares al del operón *pst* de *E. coli* en *S. typhimurium* solo en limitación de fosfato (Yagil y Hermoni, 1976). Sin embargo, aún no se han aislado los genes que codifican para tales proteínas.

Bauer et al., (1985), reportaron que *S. typhimurium* induce una porina de ME observando que sólo se expresa en condiciones limitantes de fosfato, sugiriendo que posiblemente es la análoga a la porina PhoE de *E. coli*.

Posteriormente Agterberg et al., (1988) transformaron dos cepas avirulentas de *S. typhimurium* con el plásmido que contiene el gene *phoE* de *E. coli* y observaron la expresión de la porina PhoE de *E. coli* en la ME de las dos cepas avirulentas de *S. typhimurium* crecidas con bajos niveles de fosfato en el medio de cultivo. Sugiriendo con estos resultados la existencia de

los genes *phoB phoR* en *S. typhimurium*, los cuales regulan la expresión de la porina PhoE de *E. coli* en *S. typhimurium* y aún no han sido aislados en *S. typhimurium*.

Finalmente Spierings et al., (1992a), aislaron, secuenciaron y caracterizaron el gene *phoE* de *S. typhimurium*, observando que *E. coli* solo expresa la porina PhoE de *S. typhimurium*, cuando *E. coli* es transformada con el gene *phoE* de *S. typhimurium* contenido en un plásmido de alto número de copias (crecida en condiciones limitantes de fosfato) y no cuando el gene *phoE* de *S. typhimurium* es transferido a *E. coli* por conjugación (unicopia). Con estos resultados comparativos entre los genes *phoE* de estas bacterias, sugirieron posibles respuestas a la no expresión de la porina PhoE de *S. typhimurium* en *E. coli* a nivel cromosomal y estas son las siguientes:

- 1.- Posiblemente la interacción de la proteína efectora PhoB de *E. coli* podría no reconocer eficientemente los promotores del gene *phoE* de *S. typhimurium* debido a las diferencias de bases de la región reguladora de *S. typhimurium* con respecto a la de *E. coli*.
- 2.- La inserción/eliminación de la glicina 12 entre *E. coli* y *S. typhimurium* en la región del péptido, posiblemente altere el transporte de la proteína PhoE de *S. typhimurium* en la ME de *E. coli*.

Es importante mencionar que esta glicina 12 se encuentra en el gene *phoE* de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter cloacae*, los cuales se expresan en *E. coli* cuando son transferidos por conjugación (unicopia) (Van Gysegem and Toussaint, 1982; Verhoef et al., 1984; Van der Ley et al., 1987a; Spierings et al., 1992b).

II.- ANTECEDENTES.

A partir de un banco genómico de *Salmonella typhi*, construido con el fago lambda 1059, se aisló un fago recombinante nombrado LPC1, con un inserto del genoma de *S. typhi* de aproximadamente 15 kpb. El fago LPC1 dió señal positiva de hibridación con el gene *phoE* de *E. coli*, por lo cual se asumió que se trataba del gene homólogo *phoE* en *S. typhi*. El fago LPC1 fue digerido con diferentes endonucleasas de restricción y por medio de la hibridación con el gene *phoE* de *E. coli*, se elaboró un mapa de restricción del fago LPC1 (Puente, 1987; Torres, 1993).

Con el objetivo de caracterizar el gene *phoE* de *S. typhi* (conocer su secuencia nucleotídica, definir la región reguladora, así como la región que codifica para el gene estructural y expresión del gene *phoE* en condiciones limitantes de fosfato en el medio de crecimiento), en mi trabajo de tesis de licenciatura, subcloné un fragmento de aproximadamente 5Kpb del fago LPC1, en un vector plásmido (pBR322), el cual fue nombrado pAT57 (Figura 4), dicho fragmento dió señal positiva de hibridación con el gene *phoE* de *E. coli* (Torres, 1993).

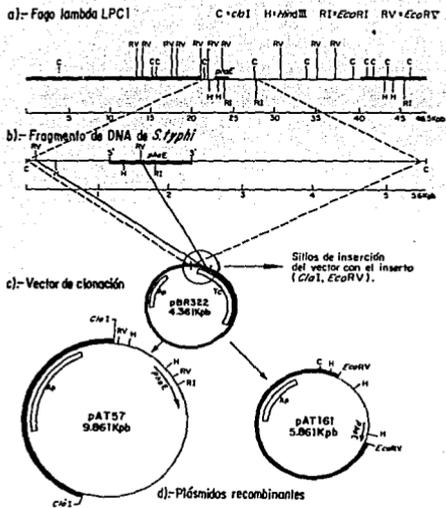


FIGURA 4.- Esquema de la construcción y origen de los plásmidos pAT57 y pAT161

- Mapa del fago LPC1 con cuatro enzimas de restricción, las zonas gruesas representan el fago y la zona delgada representa el genoma de *S. typhi* (aproximadamente 15 Kpb) conteniendo el gene *phoE* de *S. typhi* (más grueso).
- Fragmento de 5 Kpb proveniente del fago LPC1, obtenido con la enzima *Clal*: el rectángulo obscuro representa la posición del gene *phoE* de *S. typhi*; las líneas continuas delimitan el fragmento *EcoRV* de 1.6 Kpb y las líneas discontinuas representan el fragmento obtenido con la enzima *Clal*; ambos fueron insertados individualmente en el plásmido pBR322 en los sitios compatibles para estas enzimas.
- El vector de clonación pBR322: en el círculo pequeño se esquematiza el lugar donde se hicieron las inserciones.
- Mapa de restricción de los plásmidos pAT57 y pAT161 con cuatro enzimas de restricción: la flecha indica la orientación y posición del gene *phoE* de *S. typhi*.

III.- OBJETIVO GENERAL.

Iniciar la caracterización estructura-función del gene *phoE* de *Salmonella typhi*, para comprender los mecanismos básicos de regulación de esta porina y su participación en el metabolismo de fosfato así como su posible interacción como antígeno con el sistema inmune del huésped.

IV.- OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- 1.- Terminar de secuenciar el gene *phoE* de *S. typhi*.
- 2.- Realizar a nivel de secuencia nucleotídica y de aminoácidos un estudio comparativo del gene *phoE* de *S. typhi* con otros genes *phoE* aislados en otras bacterias.
- 3.- Analizar la expresión del gene *phoE* de *S. typhi* en una cepa de *E. coli*, mutada en la proteína PhoR (expresión constitutiva del regulón de fosfato) y en una cepa de *E. coli* silvestre.
- 4.- Fusionar la región reguladora del gene *phoE* de *S. typhi* con el gene estructural *lacZ* de *E. coli*, así como fusionar la región reguladora de gene *phoE* de *E. coli*, con el mismo gene reportero.
- 5.- Realizar un estudio comparativo cuantitativo de la expresión del gene *phoE* de *S. typhi* con respecto al gene *phoE* de *E. coli*, en condiciones de limitación de fosfato, utilizando las fusiones transcripcionales generadas en el punto anterior.

V.- MATERIALES Y METODOS.

TABLA 1 CEPAS.

TABLA 2 PLASMIDOS.

A).- Medios de cultivo.

TABLA 3 ESTANDARIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA EXPRESAR LA PROTEINA PhoE.

B).- Preparación y subclonación de fragmentos de ADN.

C).- Método de transformación de las cepas bacterianas.

TABLA 4 ESTANDARIZACION DEL SISTEMA DE GELES DESNATURALIZANTES DE ACRILAMIDA BISACRILAMIDA-SDS-UREA.

D).- Condiciones de crecimiento para la expresión de la proteína PhoE.

E).- Secuenciación del gene *phoE* de *Salmonella typhi* y análisis comparativo.

F).- Estrategia para fusionar la región reguladora del gene *phoE* con la región estructural del gene *lacZ* de *E. coli*.

TABLA 5 OLIGONUCLEOTIDOS (Onts) PARA AMPLIFICAR LA REGION REGULADORA DEL GENE *phoE*.

G).- Selección de las clonas positivas.

TABLA 6 AMPLIFICACION POR PCR DE LA REGION REGULADORA DEL GENE *phoE*.

H).- Ensayos de β -galactosidasa y Fosfatasa alcalina.

I).- Reactivos.

- a).- Endonucleasas de restricción.
- b).- Otras enzimas.
- c).- Sustratos.
- d).- Antibióticos.
- e).- Isótopos radioactivos.
- f).- kits (estuches).

V.- MATERIALES Y METODOS.

TABLA 1 CEPAS.

E. coli

DS5αIQ ¹	F'f_M15_(<i>lacZYA-argF</i>), U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsd17</i> (r _K , m _K ²), <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA11/f</i> , <i>proAB</i> ³ , <i>lacfZ_M15</i> <i>zzf::Tn5</i> [Km ¹].
MC4100 ²	F' <i>araD139</i> ; <i>del(lac)U169</i> ; <i>rpsL</i> ; <i>thi</i> ; <i>lambda</i>
CE1224 ³	F' <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>his</i> , <i>argE</i> , <i>lacY</i> , <i>galK</i> , <i>xyl</i> , <i>rpsL</i> , <i>ompR</i> , <i>del(proA-proB-phoE-gip)</i> .
CE1248 ⁴	F' <i>thi</i> , <i>pyrF</i> , <i>thr</i> , <i>ilvA</i> , <i>argG</i> , <i>tonA</i> , <i>rpsL</i> , <i>deoC</i> , <i>vir</i> , <i>glpR</i> , <i>ompR471</i> , <i>recA56</i> , <i>phoR69</i> , <i>phoA8</i> , <i>del(proA-proB-phoE-gip)pho</i> ⁵ .

S. typhi

IMSS-1 ⁵	Silvestre
IMSS-1R ⁶	<i>ompR::Cm</i>
IMSS-1Z ⁶	<i>envZ::Cm</i>

- 1.- Hanshan, 1983.
- 2.- Casadaban, 1976.
- 3.- Tommassen et al., 1983.
- 4.- Kortland et al., 1982.
- 5.- Puente et al., 1987.
- 6.- Juárez, 1994 "datos no publicados".

TABLA 2 PLASMIDOS

pJP14 ¹	Contiene el gene <i>phoE</i> de <i>E. coli</i> y fue utilizado como detector heterólogo
pBR322 ²	Plásmido de <i>E. coli</i> utilizado como vector para la subclonación del fragmento que contiene el gene <i>phoE</i> de <i>S. typhi</i> .
pAT57 ³	Plásmido derivado de pBR322, el cual contiene el gene <i>phoE</i> de <i>S. typhi</i> .
pAT20 ⁵	Plásmido derivado de pBR322, el cual contiene el gene <i>phoE</i> de <i>E. coli</i> .
pMC1871 ⁴	Plásmido derivado de pBR322, el cual contiene el gene estructural <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> , sin su región reguladora.
pAT56 ⁵	Plásmido derivado del pMC1871, el cual contiene fusionada la región reguladora del gene <i>phoE</i> de <i>E. coli</i> al gene estructural <i>lacZ</i> .
pAT59 ⁵	Plásmido derivado del pMC1871, el cual contiene fusionada la región reguladora del gene <i>phoE</i> de <i>S. typhi</i> al gene estructural <i>lacZ</i> .

- 1.- Tommassen et al., 1982.
- 2.- Bolivar et al., 1977.
- 3.- Torres, 1993.
- 4.- Shapira et al., 1983.
- 5.- Torres, 1995 (construidos en este trabajo de maestría).

A).- MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo empleados en este trabajo fueron: a) el medio rico Caldo de Luria o LB (LB, "Luria-Bertani") (Maniatis et al., 1991) utilizado para la amplificación de clonas y en los cultivos primarios, b) medios mínimos de cultivo estándares para la inducción de la expresión del gene *phoE* (Tabla 3) y los desarrollados en este trabajo para obtener una expresión óptima de la porina PhoE en concentraciones de bajo fosfato (Torres⁵).

TABLA 3 ESTANDARIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA EXPRESAR LA PROTEINA PhoE.

CONCENTRACION EN EL MEDIO (mM).						
INGREDIENTES.						
	M63 (pH 7.5)			TRIS-GLUCOSA (T.G.) (pH 7.5)		
	Miller ¹	Meyer ²	Torres ³	Kaempfer ⁴	Levinthal ⁵	Echols ⁶ Torres ⁷
KH ₂ PO ₄	100.0					0.64 ^a 0.064 ^b
K ₂ HPO ₄		a, b	a, b	0.1		a, b
(NH ₄) ₂ SO ₄	15.0	15.0	15.0			
NH ₄ Cl				20.0	20.0	20.0
Na ₂ SO ₄				2.5	3.0	3.0
MgSO ₄	1.0	1.0	1.0			
FeSO ₄	2.0	2.0				
FeCl ₃				0.002		0.002
MgCl ₂					1.0	1.0
CaCl ₂				0.35	0.2	0.2
NaCl				80.0	80.0	80.0
KCl				20.0	20.0	20.0
ZnCl ₂			0.002		0.002	0.002
Glucosa	0.2%	0.2%	0.2%		0.5%	0.2%
Bacto-peptona					0.5% ^c	0.2%
Tris		100.0	100.0	120.0	80.0	120.0
Osmolaridad (mOsm)	463.8	183.0	183.0	270.0	270.0	270.0

Las vitaminas, aminoácidos y antibióticos se agregaron según los requerimientos y resistencia de las cepas, así como el plásmido contenido por éstas. La concentración de vitaminas fue de 1 mg/ml; aminoácidos 20µg/ml y la concentración de antibióticos fueron las siguientes: tetraciclina 12.5 µg/ml; ampicilina 500µg/ml; Kanamicina 50µg/ml; estreptomyciná 100µg/ml y cloranfenicol 35 µg/ml.

1.- Miller, 1972.

2.- Meyer et al., 1990.

3.- Torres (En este trabajo de maestría), 1995.

4.- Kaempfer et al., 1967.

5.- Levinthal et al., 1962.

6.- Echols et al., 1961.

7.- Torres (En este trabajo de maestría), 1995.

a).- Concentración de bajo fosfato.

b).- Concentración de alto fosfato.

c).- Única fuente de fosfato en el medio de cultivo.

B).- PREPARACION Y SUBCLONACION DE FRAGMENTOS DE ADN.

Las preparaciones del ADN se obtuvieron por medio del método de lisis alcalina y la subclonación de fragmentos de ADN por medio de técnicas de ADN recombinante (Maniatis et al, 1991).

C).- METODO DE TRANSFORMACION DE LAS CEPAS BACTERIANAS.

Los cultivos de las cepas para hacer células competentes fueron realizadas en LB a 37°C en agitación hasta alcanzar una D.O. $_{600nm} = 0.5$ a 1.0. Los cultivos fueron centrifugados y el "pellet" celular fue lavado dos veces con glicerol al 10%, resuspendiéndose en 2ml de glicerol al 10%. Finalmente se hicieron alicuotas en tubos Eppendorff y se almacenaron hasta su uso a -70°C.

Los plásmidos fueron introducidos a las cepas competentes, por medio de la técnica de electroporación (1.4 KV, 25 μ F y 1000 Ohms), utilizando un electroporador Gen Pulser de Bio-Rad.

TABLA 4 ESTANDARIZACION DEL SISTEMA DE GELES DESNATURALIZANTES DE ACRILAMIDA BISACRILAMIDA- SDS-UREA.

En esta tabla se muestra el sistema de geles de Poliacrilamida-SDS-Urea empleado. Este sistema permitió una mejor resolución en el perfil electroforético de la porina PhoE de las demás proteínas, que en geles sin urea migran en la misma posición.

Gel concentrador.

Concentración final		Concentración inicial
4.8 %	ACRILAMIDA	14.75 %
0.3 %	BISACRILAMIDA.	0.4 %
6.0 M	UREA.	8.0 M
0.1 %	0.5 M Tris-HCl pH 6.8- Dodecil sulfato de sodio 0.4% ("SDS").	0.4 %
12 mM	Persulfato de amonio ("PSA").	1.0 M
0.05 %	N,N,N',N'-Tetra-metil-etilen-diamina ("TEMED").	100.0 %

Gel separador.

Concentración final		Concentración inicial
11 %	ACRILAMIDA	14.75 %
0.3 %	BISACRILAMIDA.	0.4 %
6.0 M	UREA.	8.0 M
0.1 %	1.5 M Tris HCl pH 8.8- Dodecil sulfato de sodio 0.4% ("SDS").	0.4 %
12 mM	Persulfato de amonio ("PSA").	1.0 M
0.05 %	N,N,N',N'-Tetra-metil-etilen-diamina ("TEMED").	100.0 %

D). CONDICIONES DE CRECIMIENTO PARA LA EXPRESION DE LA PROTEINA PhoE.

Para inducir la expresión del gene *phoE*, las cepas de *E. coli* (MC4100, CE1248 y CE1224) y *S. typhi* (IMSS-1), así como estas mismas cepas transformadas con los plásmidos pJP14, pAT20 y pAT57, fueron crecidas cada una en 10 ml de LB hasta llegar a una D.O. $600_{nm} = 0.5$. Posteriormente los cultivos fueron centrifugados y lavados por 2 ocasiones con el medio Tris-glucosa (T.G.) sin fosfato. El cultivo primario de cada una de estas cepas fue dividido para inocular 2 matraces con 62.5 ml de T.G. El primer matraz con 0.064 mM de K_2HPO_4 (condición limitante de fosfato) y el segundo con 0.64 mM de K_2HPO_4 (condición de alta concentración de fosfato). Estos cultivos fueron crecidos a 37°C en agitación por 10 horas (fase estacionaria).

Las cepas de *S. typhi* IMSS-1 *ompR::Cm* e IMSS-1 *envZ::Cm*, fueron crecidas en los medios señalados anteriormente con la finalidad de analizar el efecto de los genes *ompR* y *envZ* sobre la expresión del gene *phoE* de *S. typhi* en condición de alta concentración y limitación de fosfato.

Posteriormente, las preparaciones de proteínas de M.E. de estas cepas, fueron obtenidas en la fracción insoluble con triión X-100, por el método de Matsuyama et al., (1984).

E).- SECUENCIACION DEL GENE *phoE* DE *Salmonella typhi* Y ANALISIS COMPARATIVO.

El gene *phoE* de *Salmonella typhi* clonado en el plásmido pAT57, fue secuenciado en ambas direcciones, por el método derivado de dideoxinucleótidos para ADN de doble cadena. Los oligonucleótidos utilizados en la secuenciación fueron sintetizados por el método de los fosforamiditos usando un sintetizador automático de ADN, en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM. La secuencia nucleotídica obtenida presentó un frente de lectura abierto. Este frente de lectura abierto fue comparado a nivel de nucleótidos y de aminoácidos con el gene *phoE* de *E. coli* y los de otras bacterias ya reportados. Este análisis comparativo se efectuó por medio de el programa "Gene Works" (EMBL, European Molecular Biology Laboratory).

F).- ESTRATEGIA PARA FUSIONAR LA REGION REGULADORA DEL GENE *phoE* CON LA REGION ESTRUCTURAL DEL GENE *lacZ* DE *E. coli*.

Las regiones reguladoras del gene *phoE* de *E. coli* y *S. typhi* fueron amplificadas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la reacción de amplificación se emplearon como ADN templado, los genes *phoE* contenidos en los plásmidos pJP14 y pAT57. Los pares de oligos fueron coli II y IV y typhi III y I, para *E. coli* y *S. typhi* respectivamente. Las reacciones de amplificación se efectuaron con 25 ciclos de 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 60°C y 1 minuto 20 segundos a 72°C, y un ciclo final de 4 minutos a 72°C.

Los oligonucleótidos sentido y antisentido de la región reguladora del gene *phoE* de *S. typhi*, introdujeron sitios de restricción para las enzimas *SmaI* y *EcoRV* en los extremos 5' y 3' respectivamente de la región reguladora (Tabla 5). El fragmento amplificado por PCR de 445 pb contiene los promotores consenso para la unión de la proteína PhoB, el sitio de unión al ribosoma (*Shine Dalgarno*) los cuatro primeros codones del péptido señal y un codón producto del sitio de restricción generado (Tabla 6). Este fragmento fue purificado y digerido con las enzimas de restricción *SmaI* y *EcoRV*, obteniéndose así, la región reguladora de *S. typhi* amplificada y con extremos rasurado, la cual se purificó y fue clonada en el sitio de *SmaI* del plásmido pMC1871, lo cual permitió clonar en fase esta región reguladora con el gene *lacZ* de *E. coli* (el cual no contiene

su región promotora ni los 8 primeros codones del gene estructural), generando de esta forma el plásmido pAT59.

La fusión en fase de la región reguladora del gene *phoE* de *E. coli* con el gene *lacZ* se realizó siguiendo la estrategia anterior, con la diferencia, que con el oligonucleótido antisentido se introdujo un sitio de restricción para la enzima *Hpa* I, debido a que esta región reguladora presenta un sitio para *EcoRV* interno. El producto amplificado por PCR de 454 pb correspondiente a la región reguladora de *phoE* de *E. coli*, también fue clonado en el sitio de *Sma*I del plásmido pMC1871, originando el plásmido pAT56.

TABLA 5 OLIGONUCLEOTIDOS (Ont's) PARA AMPLIFICAR LA REGION REGULADORA DEL GENE *phoE*.

Onts utilizados para amplificar la región reguladora del gene *phoE* de *E. coli*.

Sentido.

Clave del Ont: coli II (región reguladora).

5'CCC-CCG-GGG-TCA-CAA-TAA-CAA-TCC-G 3'

Antisentido.

Clave del Ont: coli IV (región del péptido señal).

5'GGG-GTT-AAC-GCT-CTT-TTT-CAT-TTT-CAT-TCC-TGA-TTT-TAA-TTA-ACG-GCG-G 3'

Onts para amplificar la región reguladora del gene *phoE* de *S. typhi*.

Sentido.

Clave del Ont: typhi III (región reguladora).

5'GGG-CCC-GGG-ATA-ACA-ATA-CGA-TGT-CCC 3'

Antisentido.

Clave del Ont: typhi I (región del péptido señal).

5'CCG-ATA-TGC-CTC-TTA-TTC-ATT-TCC-ATT-CCT-GTT-TTA-ATT-ACG-GCG 3'

G.- SELECCION DE LAS CLONAS POSITIVAS.

Las clonas positivas fueron seleccionadas por su fenotipo azul, en placas de LB conteniendo 12.5 ug/ml de tetraciclina y 35 ug/ml de 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido ("X-gal"). Sin embargo, solo las clonas positivas para la fusión de la región reguladora del gene *phoE* de *E. coli* con el gene *lacZ* dieron este fenotipo azul. En cambio, las clonas con la fusión de la región reguladora del gene *phoE* de *S. typhi* no presentaron este fenotipo. Por esta razón, fue necesario seleccionar estas clonas positivas por medio de hibridación ADN-ADN del tipo "Slot-blot", utilizando como detector la misma región reguladora del gene *phoE* de *S. typhi* amplificada por PCR.

Las clonas positivas seleccionadas fueron analizadas por patrón de restricción y por medio de la secuenciación (Sanger et al., 1977) se verificó la fusión en fase de la región reguladora del gene *phoE* con el gene *lacZ*, así como la ausencia de mutaciones puntuales en la región reguladora introducidas por el PCR.

TABLA 6 AMPLIFICACION POR PCR DE LA REGION REGULADORA DEL GENE *phoE*.

REGION REGULADORA DE *Salmonella typhi*.

<u>GC</u> CCGGGATAACAATACGATGTCGGCGGGCGGTAGCTGCGCCACTGGC	50
GGACAAGTTCACGATATGGGCACGTTCCAGCGGGCGGATCCGCCTGTT	100
AGCACGGCTGGTGCCGAGTTTTACGAACAGCTCTGGCTGTCACTCATGAT	150
TCTCTCGCGTCAAATAAAGAAATAAAGACCAATGAACTTTTAGCAGG	200
ACTGGCTCCGGTTGTAAACAACCTGTACGGCGATGAAATTTCTTGCGCA	250
GGGATCAGCAAGCGT <u>AGCGGCGGAATTGACCA</u> TTTTATACGCNACAA	300
TTAAATATATTTTTTAAAAAACTCTCACTT <u>AGCATAAATCTTTCAT</u> T	350
ACCGAACGTTAAAAA <u>CCCTTCTCTGTTTTTACGGGTC</u> CCGCACAAATCA	400
TAGCGCGTAATTAAACA <u>AGGAATGGAA</u> ATG AAT AAG AGC GAT.GGG	442
SD ¹ M N K S D G ⁴	

REGION REGULADORA DE *Escherichia coli*.

CCGGGTCACAATAACAATCCGATGCCCGCGGCGCATGTAATCGCCGCAC	50
TGGCGAACAAAGTTCACGATATGGGCACGTTCCAGCGGGCGGATCCGCC	100
TGTTAGCACACTGGTGCCGAGTTTTAACACCAGCGTCTGGCTGTCACTCA	150
TGATTCTCTGCCATTCAATTTTAGGAAAAATGATATCAAACGAACTGTTT	200
AGCAGGACTGTCTCGGTGCCAACCATCTCGGAGCAAGCATGGCGTTT	250
TGTTGCCCGGGATCAGCAAG <u>CGCTAGAGGCAGTTGTATACGGTCTTATAC</u>	300
AGATTTAATAAATTACCACTTTTAAAGAATATTAATTAATTAATATAT	350
CTTTAACAAATCTCAGGTAAAAA <u>CTTTCTCTGTTTTCAACGGGACTCTCCC</u>	400
GCTGAATATTCCGGCGTTAATAAAAATCAGGAATGAAA ATG AAA AAG	448
AGC GTT GGG	454
S V G ³	

- 1.- Pribnow box¹ del pseudo *pho* box * orientación inversa de la transcripción² (Tommasen et al., 1987).
 2.- Pribnow box.
 3.- Shine-Dalgarno.
 4.- Codon 6 (originado por el sitio de restricción), letras cursivas.

H).- ENSAYOS DE β -galactosidasa y Fosfatasa alcalina.

Se hicieron cultivos primarios de las cepas MC4100 e IMSS-1 transformadas con los plásmidos pAT56, pAT59 y pMC1871, en 10 ml de LB, 37°C^o y en agitación, hasta alcanzar una D.O. 600nm = 0.5. Con este cultivo primario se inocularon dos matraces, uno conteniendo el medio T.G. con baja concentración de fosfato (0.064 mM de K₂HPO₄) y el otro con T.G. y alta concentración de fosfato (0.64 mM de K₂HPO₄), y se crecieron a 37°C^o con agitación. De estos cultivos se tomaron alícuotas cada hora, desde la hora cero hasta la hora 10. La alícuota tomada cada hora fue dividida para realizar el ensayo de actividad de β -galactosidasa, ensayo de fosfatasa alcalina y cuantificación de proteínas (Lowry, 1951).

Los ensayos de β -galactosidasa fueron realizados siguiendo el protocolo descrito por Miller, (1972) los resultados reportados son el producto de tres ensayos realizados independientemente. Los ensayos de fosfatasa alcalina fueron realizados siguiendo el protocolo descrito por Brickman and Beckwith, (1975), los resultados reportados para fosfatasa alcalina son de la cepa MC4100 transformada y sin transformar, debido a que la *S. typhi* IMSS-1 no presentó actividad de fosfatasa alcalina.

I). REACTIVOS.

a).- Endonucleasas de restricción.

*Sma*I, *EcoRV* *Hpa*I (Boehringer Mannheim Biochemical).

b).- Otras enzimas.

T4 ligasa, fosfatasa alcalina, ribonucleasa, T4 polimerasa (Boehringer Mannheim Biochemical).

c).- Sustratos.

4-Nitrofenil fosfato "NP" (Boehringer Mannheim Biochemical).

Ortho-nitrofenil β -D-galactopiranosido "OPNG" y 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido "X-Gal" (Sigma).

d).- Antibióticos.

Ampicilina (Sigma)

Kanamicina (Gibco BRL).

Estreptomocina y Tetraciclina (Boehringer Mannheim Biochemical).

e).- Isótopos radioactivos.

[α -³²P] dATP, 3000 Ci/mmol (Amersham # cat PB10204).

[α -³²P] dCTP, 3000 Ci/mmol (Amersham # cat PB10205).

f).- kits (estuches).

Secuenasa (United States Biochemical Corp.).

GlassMax (Gibco BRL).

GeneClean II (Bio 101).

Multiprime DNA Labelling system RPN.1600Y (Amersham).

VI.- RESULTADOS.

- 1).- Secuencia nucleotídica del gene *phoE* de *S. typhi*.
 - A).- Análisis de la región reguladora del gene *phoE* de *S. typhi*.
 - B).- La región del péptido señal de la porina PhoE de *S. typhi*.
 - C).- La región estructural de la porina PhoE de *S. typhi*.
- 2).- Expresión de la porina PhoE de *S. typhi* en *E. coli*.
- 3).- Expresión endógena de la porina PhoE de *S. typhi*.
- 4.- Las proteínas EnvZ y OmpR no regulan la expresión del gene *phoE* en concentraciones altas y bajas de fosfato.
- 5).- Cuantificación de la expresión del gene *phoE* de *Salmonella typhi* y *E. coli*.

VII.- DISCUSION.

VIII.- CONCLUSIONES.

IX.- BIBLIOGRAFIA.

VI.- RESULTADOS.

1).- SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL GENE *phoE* DE *S. typhi*.

En estudios previos se mostró que un fragmento de aproximadamente 5 kpb del genoma de *S. typhi* contenido en el fago LPC1, dió señal positiva de hibridación con el gene *phoE* de *E. coli* (Punte, 1985). Posteriormente este fragmento fué subclonado en el plásmido pBR322 y designado pAT57 (Torres, 1993) (Figura 5). En este plásmido se secuenció en ambas direcciones, un fragmento de aproximadamente 1.5 kpb correspondiente al genoma de *S. typhi*. En el análisis de la secuencia realizada se observó un frente de lectura abierta, el cual se comparó con la secuencia nucleotídica del gene *phoE* de *E. coli* y de otras bacterias (Tablas 7 y 8).

En el análisis comparativo se observó un 79% de similitud a nivel nucleotídico y de 88% a nivel de aminoácidos entre el gene *phoE* de *E. coli* y *S. typhi* (Tabla 8). Estos resultados permitieron suponer que efectivamente podría tratarse del gene *phoE* de *S. typhi*. Al secuenciar la región ubicada a 600 pb hacia arriba del *pho* box del gene *phoE* de *S. typhi*, se localizó una secuencia homóloga al operón de *proAB* de *E. coli* (datos no mostrados). Por lo tanto, ésto hizo suponer que se trataba del operón *proAB* de *S. typhi* y que también se encuentra adyacente al gene *phoE* de *S. typhi* como se ha observado en *E. coli*, *S. typhimurium*, *E. cloacae*, *K. oxitoca*, *K. pneumoniae* y *C. freundii* (Verhoef et al., 1984; Van der Ley et al., 1987a; Spierings et al., 1992a; Spierings et al., 1992b).

A).- Análisis de la región reguladora del gene *phoE* de *S. typhi*.

Al terminar la secuencia del gene *phoE* de *S. typhi*, se compararon 175 pb de la región reguladora de este gene con el gene *phoE* de *S. typhimurium* aislado por Spierings et al., (1992a) (Tabla 7A). En esta comparación solo se observaron tres cambios de nucleótidos entre ambas regiones reguladoras. Estos cambios no se localizaron en las regiones consenso de Pribnow box, *pho* box, pseudo *pho* box y Pribnow box'.

La región de Pribnow box de *S. typhi*, es idéntica a la de los genes *phoE* de *S. typhimurium*, *E. coli* y *K. pneumoniae*, excepto en *E. cloacae* en donde se localiza una

Citosina en lugar de Adenina. La secuencia nucleotídica de la región reguladora de *K. oxitoca* y *C. freundii* no se ha reportado, pero sí la región de péptido señal y región estructural de la proteína (Spierings et al., 1992b).

Es importante notar la diferencia de 2 bases en la región *pho box* de *E. cloacae* y *K. pneumoniae* al compararlas con el *pho box* de *S. typhimurium* y *S. typhi*. En cambio, en la región *pho box* de *E. coli* se pueden observar 6 nucleótidos diferentes al compararla con la región *pho box* de *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium* y *S. typhi*. Por otra parte, en la región pseudo *pho box* de *E. cloacae*, puede notarse el cambio de tres bases con respecto a la región pseudo *pho box* de *S. typhimurium* y *S. typhi*.

La supuesta región de Pribnow box (Pribnow box'), se localiza en dirección inversa de la transcripción arriba del pseudo *pho box*, según Tommassen et al., (1987) es idéntica en *E. coli*, *E. cloacae*, *S. typhimurium* y *S. typhi*. Las regiones consenso, Pribnow box y la pseudo *pho box* en *K. pneumoniae*, son las más diferentes al compararlas con *E. coli*, *E. cloacae*, *S. typhimurium* y *S. typhi*.

B).- La región del péptido señal de la porina PhoE de *S. typhi*.

En este estudio se observó la ausencia de la glicina 12 en la región del péptido señal en la porina PhoE de *S. typhi* al igual a lo reportado por Spierings et al., (1992a) en *S. typhimurium* (Tabla 7).

Spierings et al., (1992a; b) han reportado que en el péptido señal de la porina PhoE de *E. coli*, *C. freundii*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* tienen una longitud de 21 aminoácidos y postularon que la ausencia de la expresión de la porina PhoE de *S. typhimurium* en *E. coli*, podría ser debido a la ausencia de ésta glicina 12 en el péptido señal del gene *phoE* de *S. typhimurium*, afectando posiblemente el traslado de la porina hacia la membrana externa. Esta hipótesis está, además apoyada en los resultados experimentales obtenidos en *E. coli* por este grupo. Utilizando la técnica de mutagénesis de sitio dirigida cambiaron la glicina 12 por una alanina en el péptido señal del gene *phoE* de *E. coli*, demostraron que la proteína precursora es trasladada a la M.I. pero los niveles de la proteína disminuyeron drásticamente en la M.E. (Maximilian et al., 1988; Bosch et al.,

1988; Batenburg et al., 1988; Bosch et al., 1989b; De Vrije et al., 1989; Killian et al., 1990a; 1990b; Kuster et al 1991; Nouwen et al., 1994).

C).- La región estructural de la porina PhoE de *S. typhi*.

En el modelo de estructuración de las porinas en la M.E, se propone la presencia de 16 regiones conservadas transmembranales de la porina PhoE y ocho regiones hipervariables en la superficie de la M.E. (Van der ley et al., 1986; Bosch y Tommassen, 1987; Agterberg et al., 1987a; Agterberg et al., 1989). El análisis de hidrofobicidad e hidrofiliidad realizado con la porina PhoE de *S. typhi* se ajusta a este modelo (resultado no mostrado).

En la porina PhoE de *E. coli* se ha demostrado la conservación de aminoácidos esenciales para la biogénesis de la porina y su estructuración en la membrana externa (Bosch et al., 1989a; De Cock et al., 1990; Struyvé et al., 1991). Estos aminoácidos también se conservan en la proteína PhoE de *S. typhi*. Existe una región que abarca del aminoácido 90 al 140 la cual corresponde, según el modelo de estructuración, a la tercera región expuesta hacia la superficie celular y se ha sugerido que en esta región es donde posiblemente se ajusta la abertura del poro de la porina, denominada región eyelet (ajuste de poro) (Struyvé et al., 1993). Además también se conserva la lisina 125 que, se ha observado, es la responsable de la selectividad aniónica de la porina PhoE. Esta lisina no se ha observado en las otras porinas (OmpC, OmpF) (Bauer et al., 1989).

Otra diferencia observada en las porinas PhoE hasta ahora aisladas, es la ausencia de la glutamina en la posición 72 de las porinas de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *E. cloacae*, o la inserción de esta glutamina en *E. coli*, *S. typhi*, *S. typhimurium* y *C. freundii*. Se ha observado que la ausencia/inserción de la glutamina 72 en la porina PhoE de estas bacterias, no altera su expresión. Por otra parte, la porina PhoE de *K. oxytoca* no presenta la glutamina 222 presente en *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, correspondiente a la tirosina 222 de PhoE de *S. typhi* y *S. typhimurium* y a la tirosina 223 de PhoE de *E. coli* y *C. freundii*. No se ha reportado aún como es la expresión de la porina PhoE de *C. freundii* en *E. coli*.

	<i>C.freundii</i>	<i>S.typhimurium</i>	<i>S.typhi</i>	<i>E.cloacae</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>K.oxytoca</i>
<i>E.coli</i>	82	79	79	79	76	77
	90	89	88	87	85	87
<i>C.freundii</i>	83		82	80	79	81
	92		91	86	86	87
<i>S.typhimurium</i>			99	78	78	80
			98	86	87	88
<i>S.typhi</i>				77	78	79
				85	86	87
<i>E.cloacae</i>					81	82
					86	86
<i>K.pneumoniae</i>						88
						92

TABLA 8.- Porcentaje de identidad de la región estructural del gene *phoE* y similitud de la proteína PhoE entre diferentes enterobacterias.

- Porcentaje de identidad a nivel nucleotídico.
- Porcentaje de similitud a nivel de aminoácidos.

2).- EXPRESION DE LA PROTEINA PhoE de *Salmonella typhi* EN *E. coli*

Para determinar si el gene *phoE* de *S. typhi* es dependiente del sistema de dos componentes PhoB-PhoR, y si la proteína PhoE de esta bacteria se expresa en concentraciones bajas de fosfato como se ha descrito para el gene *phoE* de *E. coli*, se utilizaron dos cepas de *E. coli* (CE1248 y CE1224), ambas carecen del gene *phoE* y por lo tanto, no expresan la proteína PhoE. También ambas cepas tienen una mutación en el gene *ompR* (el activador transcripcional de los genes *ompC* y *ompF*), por lo que no expresan las porinas OmpC y OmpF.

La cepa CE1248, además de lo anterior, tiene una mutación en el gene *phoR* que confiere un fenotipo constitutivo del regulón *pho*. Esta cepa fue utilizada para determinar si el sistema PhoB-PhoR de *E. coli* activa al gene *phoE* de *S. typhi*.

La cepa CE1224 (fenotipo silvestre del regulón *pho*), induce el regulón de fosfato únicamente en concentraciones bajas de fosfato. Fue utilizada para determinar si el gene *phoE* de *S. typhi* se induce en estas condiciones.

Ambas cepas fueron complementadas individualmente con los plásmidos pAT57 (derivado del plásmido pBR322) el cual contiene el gene *phoE* de *S. typhi* y pAT20, éste último también derivado del pBR322, el cual contiene el gene *phoE* de *E. coli*, que fue subclonado del plásmido pJP14 (Figura 5). Esto se hizo con el objetivo de tener el gene *phoE* de *S. typhi* y *E. coli* en un plásmido con el mismo origen de replicación (con igual número de copias), y evitar posibles diferencias al determinar la expresión de ambos genes ya que el plásmido pJP14 es un derivado del plásmido pACYC184 (con bajo número de copias) (Chang, 1978).

La eficiencia de transformación de la cepa CE1224 con el plásmido pAT20 fue alta (del orden de 10^5 colonias/ μ g de DNA). Sin embargo, no se obtuvieron células transformantes estables de la cepa CE1248 con el plásmido pAT20. Esto último pudo ser debido a que al encontrarse el gene *phoE* de *E. coli*, en un plásmido con alto número de copias y en un sistema con expresión constitutiva, dicha expresión resultó nociva para la bacteria. En cambio, la transformación de la cepa CE1248 con el plásmido pAT57 (que lleva el gene *phoE* de *S. typhi*) fue alta, a pesar de que este plásmido también es de alto

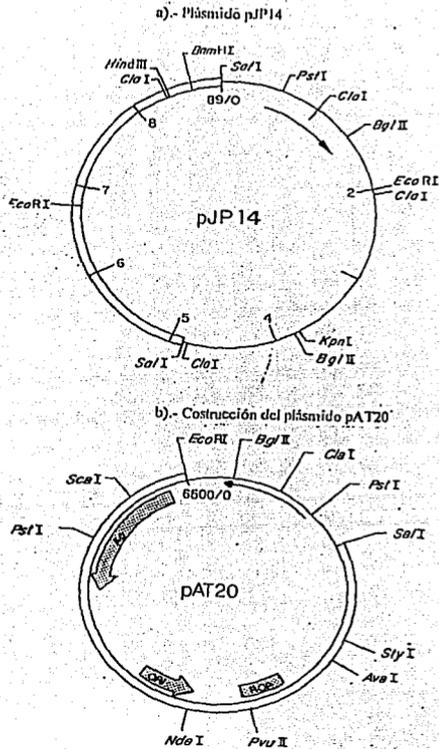


FIGURA 5).- Esquema de los plásmidos que contienen clonado el gene *phoE* de *E. coli*.

a).- Plásmido pJP14: la doble línea representa el plásmido pACYC184 (bajo número de copias) y la línea delgada el segmento de DNA de *E. coli*, la flecha indica la orientación del gene *phoE* de *E. coli*

b).- Construcción del plásmido pAT20: la doble línea representa el plásmido pBR322 (alto número de copias), la línea delgada representa el fragmento clonado del plásmido pJP14 (obtenido con las enzimas de restricción *EcoRI-SalI*), en los sitios compatibles con el pBR322, dicho fragmento contiene el gene *phoE* de *E. coli*. La flecha indica la orientación del gene.

número de copias. La posible explicación en la eficiencia de transformación de esta cepa con los plásmidos pAT20 y pAT57, podría deberse a que el activador transcripcional PhoB de *E. coli* presenta mayor afinidad por el promotor del gene *phoE* de *E. coli* y tiene menos afinidad por el del gene *phoE* de *S. typhi*. Por esta razón la cepa CE1248 se transformó con el plásmido pJP14 (Figura 6A, carriles 3 y 7).

El gene *phoE* de *E. coli* (contenido en el plásmido pJP14 y pAT20), dependiente del sistema PhoB-PhoR y expresado en condiciones de baja concentración de fosfato (M63, o T.G.), fue el control positivo de expresión. Al transformar las cepas CE1248 y CE1224 con el plásmido pAT20 o pJP14 y al obtener los perfiles electroforéticos de las PME de estas cepas en geles de Poliacrilamida-SDS-Urea, se observó de acuerdo al fenotipo de las cepas lo siguiente (Figuras 6 y 7):

a).- En la cepa CE1248/pJP14 la expresión del gene *phoE* de *E. coli* fue independiente de las concentraciones de fosfato en el medio de cultivo (M63, T.G. LB), es decir, la expresión fué constitutiva (Figura 6, carriles 3 y 7). Por otra parte en la cepa CE1224/pAT20 la expresión del gene *phoE* de *E. coli* se observó únicamente en condiciones de crecimiento con baja concentración de fosfato (Figura 7, carriles 3 y 7).

b).- La cepa CE1248 complementada con el plásmido pAT57 y crecida en el medio de cultivo M63 o TG, con concentraciones tanto de bajo fosfato (0.064 mM de K_2HPO_4) como de alto fosfato (0.64 mM de K_2HPO_4) o LB; presentó la inducción de una proteína de 36 KDa en ambas concentraciones de fosfato (Figura 6, carriles 2 y 6). La complementación de la cepa CE1224 con el plásmido pAT57, crecida en las condiciones descritas anteriormente de bajo y alto fosfato, solo mostró la inducción de una proteína de aproximadamente de 36 KDa, en baja concentración de fosfato pero no así en la cepa que creció en alto fosfato (Figura 7, carriles 2 y 6).

c).- En contraste las cepas CE1248 y CE1224 no transformadas y crecidas en las mismas condiciones de baja y alta concentración de fosfato, no expresaron la proteína de 36 KDa (Figura 6, carriles 4 y 5; Figura 7, carriles 4 y 5).

Con el análisis de la secuencia a nivel nucleotídico y de aminoácidos, además de los resultados de la expresión de la proteína de 36KDa de *S. typhi* en *E. coli*, han permitido

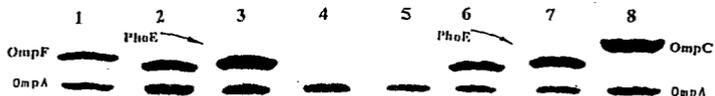


FIGURA 6.- Perfil electroforético de PME separadas en un gel de Poliacrilamida-SDS-Urea. La cepa CE1248 ($\text{PhoE}^- \text{OmpC}^+, \text{OmpF}^+, \text{Pho}^-$) y controles MH760 y MH1461 fueron crecidas en T.G. con concentraciones de bajo y alto fosfato: A).-1.-MH760 (OmpF⁺); 2,6.-CE1248/pAT57; 3,7.-CE1248/pJP14; 4,5.-CE1248 sin transformar; 8.-MH1461(OmpC⁺); 1,8.-Crecidas en LB; 2,3,4.-Alto fosfato; 5,6,7.-Bajo fosfato. La flecha indica la porina PhoE. Únicamente se muestra la parte importante del gel, el cual fue teñido con azul de Coomassie.

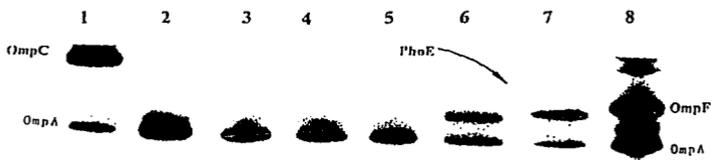


FIGURA 7.- Perfil electroforético de PME separadas en un gel de Poliacrilamida-SDS-Urea. La cepa CE1224 ($\text{PhoE}^-, \text{OmpC}^-, \text{OmpF}^-$) y controles MH1461 y MH760 fueron crecidas en T.G. con concentraciones de bajo y alto fosfato: A).-1.-MH1461 (OmpC⁺); 2,6.-CE1224/pAT57; 3,7.-CE1224/pAT20; 4,5.-CE1224 sin transformar; 8.-MH760(OmpF⁺); 1,8.-Crecidas en LB; 2,3,4.-Alto fosfato; 4,6,7.-Bajo fosfato. La flecha indica la porina PhoE. Únicamente se muestra la parte importante del gel, el cual fue teñido con azul de Coomassie.

proponer que el gene clonado en el plásmido pAT57, codifica para la porina PhoE de *S. typhi*, y que depende del sistema de dos componentes PhoB-PhoR de *E. coli*. Sin embargo la porina PhoE de *S. typhi* presentó una migración ligeramente distinta a la porina PhoE de *E. coli* (Figuras 6 y 7, carriles 2,3 y carriles 6,7), posiblemente debida a la composición de aminoácidos entre ambas proteínas y al sistema de geles de Poliacrilamida-SDS-Urea utilizados.

3).- EXPRESION ENDOGENA DE LA PROTEÍNA PhoE DE *S. typhi*.

Con el objetivo de detectar la expresión endógena de la porina PhoE de *S. typhi* y determinar al mismo tiempo si *S. typhi* presenta actividad de fosfatasa alcalina, pues se ha reportado que *S. typhimurium* es PhoA⁺, se creció a *S. typhi* (IMSS-1) en el medio T.G con baja y alta concentración de fosfato (ver métodos).

Posteriormente, al analizar los perfiles electroforéticos de las PME de *S. typhi* en geles de Poliacrilamida-SDS-Urea, se observó la expresión de una proteína de 36 KDa únicamente en la cepa crecida en baja concentración de fosfato en el medio. Esta proteína de 36 KDa migró por debajo de las porinas OmpC y OmpF (Figura, 8). Con estos resultados puede sugerirse que es la proteína PhoE de *S. typhi*, la cual es regulada posiblemente por un sistema de dos componentes PhoB-PhoR endógeno de *S. typhi*, similar al de *E. coli*.

Por otra parte, no se detectó actividad de fosfatasa alcalina en ninguna de las dos condiciones de crecimiento (bajo y alto fosfato) en *S. typhi*, demostrando así que *S. typhi* no expresa la enzima fosfatasa alcalina (Figura 10B). Especulando de esta manera, la posible existencia de otras fosfatasas inespecíficas en *S. typhi* involucradas en la hidrólisis de los compuestos con fosfato.

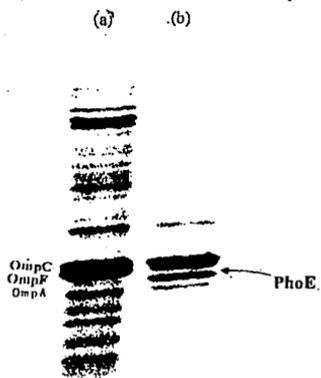


Figura.- 8 Perfil electroforético de PME separadas en un gel de Poliacrilamida-SDS-Urea, de la cepa de *Salmonella typhi* IMSS-1, crecida en T.G. con concentraciones de alto (a) y bajo fosfato (b). La flecha indica la porina PhoE.

4.- LAS PROTEINAS OSMOREGULADORAS EnvZ y OmpR, NO REGULAN LA EXPRESIÓN DEL GENE *phoE* EN CONCENTRACIONES ALTAS Y BAJAS DE FOSFATO.

Meyer et al. (1990), reportaron que la expresión de la proteína PhoE de *E. coli* disminuye cuando aumenta la osmolaridad del medio, pero este mecanismo de osmoregulación no es dependiente de las proteínas sensoras PhoR (metabolismo de fosfato) y EnvZ (sistema de osmoregulación). Considerando lo anterior y con los resultados que se obtuvieron en la expresión de la porina PhoE de *E. coli* y *S. typhi* en las cepas de *E. coli* CE1248 y CE1224, crecidas en concentraciones altas y bajas de fosfato, en los cuales no se observó ninguna alteración en la expresión por la mutación en el activador transcripcional OmpR (el cual regula la transcripción de las osmoporinas OmpC y OmpF en condiciones de alta y baja osmolaridad respectivamente).

Con base en lo anterior, se analizó la expresión de la proteína PhoE de *S. typhi* endógena en cepas de *S. typhi* IMSS-1 *ompR*::Cm y en IMSS-1 *envZ*::Cm. (construidas en el laboratorio del Dr. E. Calva por Juárez, D; datos no publicados). Estas cepas contienen los genes *ompR* o *envZ* interrumpidos por un cassette de cloranfenicol y no expresan las proteínas OmpC y OmpF. Ambas cepas fueron crecidas en concentraciones altas y bajas de fosfato y no se observó ninguna alteración en la expresión de la proteína PhoE endógena de *S. typhi*, concluyendo así que los genes que codifican para las proteínas OmpR y EnvZ no influyen en la expresión del gene *phoE* de *S. typhi* en limitación de fosfato al igual que lo reportado en *E. coli* (resultados no mostrados).

5).- CUANTIFICACION DE LA EXPRESION DEL GENE *phoE* DE *Salmonella typhi* Y *E. coli*

Para comparar la expresión entre los genes *phoE* de *E. coli* y *S. typhi* y determinar las posibles diferencias entre ambos genes, así como la posible existencia de un sistema PhoB-PhoR en *S. typhi* funcionalmente similar al de *E. coli*, se fusionó la región reguladora de cada uno de estos genes con el gene estructural *lacZ* de *E. coli* (como se describió en métodos) y se cuantificó la actividad de β -galactosidasa de estas fusiones transcripcionales

tanto en *E. coli* (MC4100/pAT56, MC4100/pAT59), como en *S. typhi* (IMSS-1/pAT56, IMSS-1/pAT59), así como en las cepas controles de *E. coli* MC4100/pMC1871 y de *S. typhi* IMSS-1/pMC1871.

Se empleó la cepa de *E. coli* MC4100, porque tiene eliminado el gene *lacZ* y por lo tanto no tiene actividad de β -galactosidasa y por otra parte, se ha observado que naturalmente el género *Salmonella* no presenta actividad de β -galactosidasa.

Las cepas MC4100 e IMSS-1, electroporadas independientemente con los plásmidos pAT56, pAT59 y pMC1871 y crecidas en el medio T. G. con fosfato en el medio de cultivo, mostraron una cinética de crecimiento típica (fase lag-exponencial-estacionaria) (Figuras 9A, 10A). En cambio, las mismas cepas crecidas en el medio T.G. con limitantes de fosfato, permanecieron en fase lag durante todo el periodo del cultivo (figuras 9A, 10A).

No se observó actividad de β -galactosidasa en las cepas MC4100 e IMSS-1 transformadas con los plásmidos pAT56, pAT59 y pMC1871, crecidas en condiciones de alto fosfato (Figuras, 9b, 10b). Estas mismas cepas con excepción de las que llevan el plásmido pMC1871 (control), sí presentaron actividad de β -galactosidasa al cultivarlas en limitación de fosfato (Figuras, 9b, 10b), condición en la cual se activa el regulón *pho*.

Por otra parte, la actividad de fosfatasa alcalina endógena de la cepa MC4100, fue el control positivo ya que indirectamente permitió correlacionar esta actividad con las actividades de β -galactosidasa, ya que la fosfatasa alcalina solo es activa en condiciones de bajo fosfato.

También se observó que la actividad de β -galactosidasa fue similar en las cepas MC4100/pAT56 e IMSS-1/pAT56 así como en las cepas MC4100/pAT59 e IMSS-1/pAT59 crecidas con concentraciones bajas de fosfato, estos resultados permiten sugerir la existencia de la proteína PhoB y PhoR de *S. typhi* con una función similar a la de *E. coli*.

Sin embargo, es importante considerar que el análisis de la expresión del gene *phoE* de *S. typhi* y *E. coli*, así como los resultados de la actividad de β -galactosidasa, fueron realizados con plásmidos de alto número de copias (derivados de pBR322).

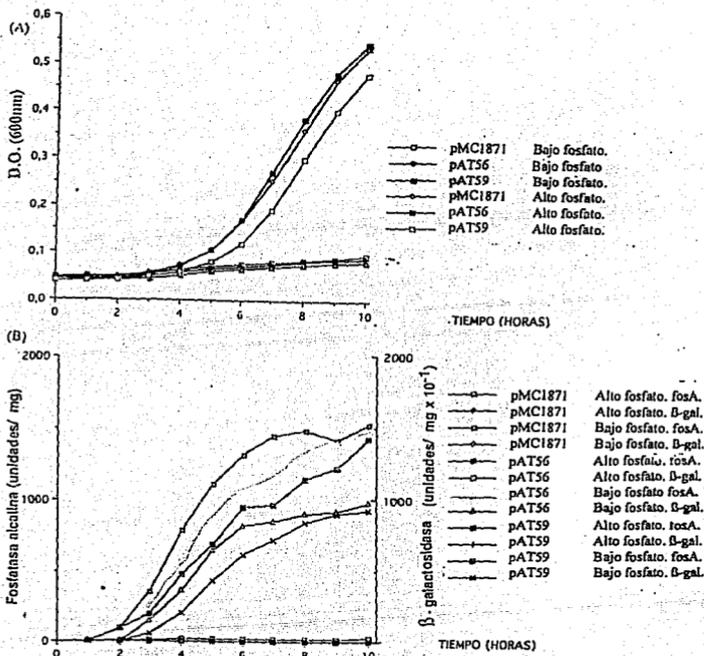


Figura 9.-
 A).- Cinética de crecimiento.
 B).- Cuantificación de la actividad de β -galactosidasa (β -gal) y fosfatasa alcalina (FosA), de la cepa de *E. coli* MC4100, transformada individualmente con las fusiones transcripcionales de *E. coli* (pAT56) y *S. typhi* (pAT59) y con el plásmido pMC1871 (control).

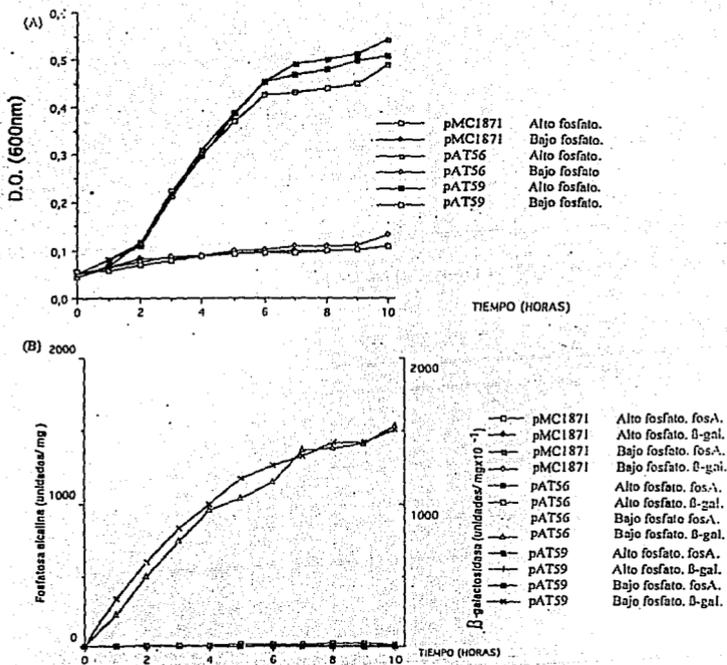


Figura 10.-

A.-Cinética de crecimiento.

B.- Cuantificación de la actividad de la β -galactosidasa (β -gal) y fosfatasa alcalina (fosA), de la cepa de *S. typhi* IMSS-1, transformada individualmente con las fusiones transcripcionales de *E. coli* (pAT56) y *S. typhi* (pAT59) y con el plásmido pMC1871 (control).

VII.- DISCUSION.

En este trabajo se caracterizó el gene *phoE* de *Salmonella typhi*, el cual se subclonó en el plásmido pBR322, a partir de un banco genómico de *S. typhi* construido en el fago lambda 1059, el cual dió señal de hibridación positiva con el gene *phoE* de *E. coli*, con el objetivo de determinar si efectivamente éste era el gene homólogo *phoE* de *S. typhi* y si la proteína producto de este gene se expresaba en condiciones limitantes de fosfato.

Al analizar la secuencia del fragmento subclonado en el pBR322, se observó que el porcentaje de identidad de este gene de *S. typhi* fué del 89% y 79% a nivel de aminoácidos y nucleótidos respectivamente, a el gene *phoE* de *E. coli*. Además, se demostró que la inducción/represión de este gene es dependiente de las concentraciones de fosfato y que el gene es regulado por el sistema de dos componentes PhoB-PhoR como ha sido demostrado para *E. coli*, puesto que al utilizar la cepa de *E. coli* CE1248/pAT57 (la cual expresa constitutivamente el regulón de fosfato) la proteína PhoE de *S. typhi* se expresó constitutivamente. En contraste al utilizar la cepa CE1224/pAT57 (silvestre), la porina PhoE de *S. typhi* se expresó únicamente en concentraciones de bajo fosfato.

Los resultados anteriores permiten afirmar que el fragmento subclonado en el pBR322 es el gene *phoE* de *S. typhi*.

Por otra parte, Bauer et al. (1985), reportaron la expresión endógena de una proteína de ME en *S. typhimurium* cuando es crecida en condiciones limitantes de fosfato, sugiriendo que se trataba de la porina PhoE de *S. typhimurium*, análoga a la porina PhoE de *E. coli*. Posteriormente, Agterberg et al., (1988), observaron la expresión de la porina PhoE de *E. coli* en la ME de *S. typhimurium* al transformar dos cepas avirulentas de *S. typhimurium* con un plásmido que contiene el gene *phoE* de *E. coli*, sugiriendo con estos resultados la presencia del sistema PhoB-PhoR en las cepas avirulentas de *S. typhimurium* funcionalmente similar al de *E. coli*. Finalmente Spierings et al., (1992a), caracterizaron el gene *phoE* de *S. typhimurium*, observando que la proteína PhoE de *S. typhimurium* solo se expresa en *E. coli*, cuando el gene *phoE* de *S. typhimurium* está contenido en un plásmido de alto número de copias.

En este trabajo cuando se analizaron los perfiles electroforéticos de las PME de *S. typhi*, en geles de Poliacrilamida-SDS-Urea, crecida en T.G. con concentraciones de bajo y alto fosfato, se observó la expresión de una proteína únicamente en condiciones limitadas de fosfato, la cual migró por debajo de las osmoporinas OmpC y OmpF. Además cuando se transformó a la *S. typhi* con los plásmidos pAT57 y pAT20, los cuales contienen el gene *phoE* de *S. typhi* y *E. coli* respectivamente produjo un enriquecimiento en esta proteína. Estos resultados permitieron proponer que se trataba de la proteína PhoE de *S. typhi* y la posible existencia de un sistema PhoB-PhoR en *S. typhi* el cual regula la expresión de esta porina de igual manera que en *E. coli*.

Por otra parte la actividad de β -galactosidasa en las cepas MC4100 e IMSS-1 electroporadas individualmente tanto con el plásmido pAT59 como con el plásmido pAT56, los cuales contienen la región reguladora de los genes *phoE* de *S. typhi* y *E. coli* respectivamente, fusionados en fase con el gene estructural de *lacZ* de *E. coli*, fueron similares tanto en *S. typhi* como en *E. coli*. Estos resultados permiten concluir la existencia de las proteínas PhoB y PhoR de *S. typhi* funcionalmente similar al de *E. coli*.

Meyer et al., (1990), observaron que la expresión de la proteína PhoE de *E. coli* se ve afectada cuando aumenta la osmolaridad del medio, pero este mecanismo de osmoregulación no es dependiente de PhoR y EnvZ, sus resultados son similares o lo que se observó en este trabajo, puesto que la expresión de la porina PhoE de *E. coli* y *S. typhi* no se ve afectada por la mutación en el activador transcripcional OmpR de *E. coli*, (el cual regula la transcripción de las osmoporinas OmpC y OmpF en condiciones de alta y baja osmolaridad respectivamente) en las cepas CE1248 y CE1224 y por las mutaciones en los genes *envZ* y *ompR* de *S. typhi* (IMSS-1 *ompR*::Cm e IMSS-1 *envZ*::Cm) las cuales tampoco alteraron la expresión de la porina PhoE endógena en condiciones limitadas de fosfato en el medio de cultivo. Con estos resultados se sugiere que en *S. typhi* al igual que en *E. coli*, los genes que codifican para las proteínas OmpR y EnvZ no influyen en la expresión del gene *phoE* (resultados no mostrados).

Desafortunadamente los resultados obtenidos en este trabajo a nivel cromosomal (unicopia) no se pueden comparar con los observados por Spierings et al., (1992a) en *S.*

typhimurium, debido a que la expresión de la proteína PhoE de *S. typhi* en CE1248 y CE1224 fueron realizados con plásmidos derivados de pBR322 (alto número de copias). Sin embargo, los resultados en multicopia fueron similares a los reportados también por Spierings et al., (1992a). Por otra parte, se demostró claramente la expresión de la proteína PhoE de *S. typhi* endógena en limitaciones de bajo fosfato. Además, con la cuantificación de la actividad de β -galactosidasa de la fusión transcripcional de *E. coli* (pAT56) en *S. typhi*, es clara la presencia funcional del sistema de dos componentes PhoB-PhoR de *S. typhi*.

Recientemente, Scholten et al., (1995), demostraron que *Shigella flexneri* contiene el locus *phoE* (aún no ha sido aislado). Sin embargo, no observaron la expresión de la proteína PhoE endógena de *S. flexneri* al crecerla en concentraciones de bajo fosfato, tampoco lograron expresar la proteína PhoE de *E. coli*, cuando transformaron a *S. flexneri* con el gene *phoE* de *E. coli*. Posteriormente demostraron que la ausencia de expresión del gene *phoE* en *S. flexneri*, se debe a que la proteína PhoB de *S. flexneri* presenta en la posición 172 una leucina, que en *E. coli* es una arginina. Por medio de mutagenesis de sitio dirigida cambiaron la leucina 172 por arginina en la proteína PhoB de *S. flexneri* y de esta manera lograron expresar el gene *phoE* de *S. flexneri*. Con estos resultados sugirieron que posiblemente la arginina 172, es importante en la interacción de la proteína PhoB con el factor sigma de la RNA polimerasa, para promover la transcripción de los genes del regulón *pho* en concentraciones de bajo fosfato.

En la mayoría de las regiones reguladoras de diferentes genes de *E. coli* se ha observado que la región Pribnow box consenso es TATAAT, pero en los genes *phoE* hasta ahora aislados es TAAAAA. Con el objetivo de conocer si esta región TAAAAA influye en la expresión del gene *phoE* de *E. coli*, Scholten y Tommassen, (1994), modificaron la región Pribnow box, TAAAAA, del gene *phoE* de *E. coli* por la región consenso TATAAT, al introducir este gene alterado en su región Pribnow box en *S. flexneri* (a través de un plásmido) observaron la expresión de la proteína PhoE de *E. coli* en *S. flexneri*. Con estos resultados sugirieron que la proteína PhoB de *S. flexneri* es poco eficiente en promover la transcripción del gene *phoE* con la región pribnow box TAAAAA y que la leucina 172 en

la proteína PhoB de *S. flexneri* es importante para la interacción PhoB-RNA polimerasa-*pho* box en el gene *phoE* de *S. flexneri* o posiblemente para *S. flexneri* exista otro efector para promover eficientemente la expresión de la porina PhoE

Tomando como base lo anterior es posible que existan cambios críticos en la parte reguladora del gene *phoE* de *S. typhimurium* con respecto al de *E. coli*, motivo por el cual el gene *phoE* de *S. typhimurium* únicamente se expresa en *E. coli* cuando esta contenido en un plásmido de alto número de copias.

La diferencia interesante entre ambas bacterias, es la falta de actividad de fosfatasa alcalina en los extractos celulares de *S. typhi*. La explicación probable podría ser que en *Salmonella* existan otras fosfatasas para hidrolizar el fosfato, como consecuencia de los nichos ecológicos ocupados por una y otra bacteria y es posible que los mecanismos de regulación de fosfato entre *S. typhi* y *E. coli* sean similares.

III.- CONCLUSIONES.

- 1).- El locus *phoE* de *S. typhi* esta localizado en el cromosoma junto al operón *proAB* de manera similar a la del locus *phoE* en *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *S. typhimurium* y *C. freundii* (resultados no mostrados).
- 2).- La región consenso Pribnow box de *S. typhi* es idéntica a la de los otros genes *phoE* aislados, así como el número de bases entre el Pribnow box, *pho* box y pseudo box.
- 3).- De acuerdo a la comparación de la secuencia de aminoácidos puede sugerirse que la longitud del péptido señal de *S. typhi* y *S. typhimurium* es de 20 aminoácidos.
- 4).- La parte estructural de la proteína PhoE de *S. typhi* es altamente homóloga a las otras porinas (PhoE) aisladas. Además se conservan los aminoácidos esenciales para la biogénesis de la proteína, importantes para su estructuración en la ME
- 5).- La expresión de la porina PhoE de *S. typhi* es similar a la de *E. coli*, la cual se expresa en concentraciones de bajo fosfato y se reprime en altas concentraciones de fosfato.
- 6).- En *S. typhi* al igual que *S. typhimurium* no hay actividad de fosfatasa alcalina, en concentraciones de bajo y alto fosfato.
- 7).- La regulación de la porina PhoE de *S. typhi* es a través del sistema de dos componentes PhoB-PhoR endógeno, el cual es funcionalmente similar al de *E. coli*.
- 8).- La expresión de la proteína PhoE de *E. coli* y *S. typhi* no dependen del sistema OmpR-EnvZ cuando está creciendo con concentraciones de bajo y alto fosfato.

IX.- BIBLIOGRAFIA.

- Ades, E., Rest, R. and Morse, S. (ed) (1994). Microbial pathogenesis and immune response. **Annals of the New York Academy of Sciences** Vol 730.
- Agrawal, D. K. and Wanner, B. L. (1990). A *phoA* structural gene mutation that conditionally affects formation of the enzyme bacterial alkaline phosphatase. **J. Bacteriol.** 172: 3180-3190.
- Agterberg, M., Benz, R. and Tommassen, J. (1987a). Insertion mutagenesis on a cell-surface-exposed region of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* K-12. **Eur. J. Biochem.** 169: 65-71.
- Agterberg, M., Adriaanse, H. and Tommassen, J. (1987b). Use of outer membrane protein PhoE as a carrier for the transport of a foreign antigenic determinant the cell surface of *Escherichia coli* K-12. **Gene** 59: 145-150.
- Agterberg, M., Fransen, R. and Tommassen, J. (1988). Expression of *Escherichia coli* PhoE protein in avirulent *Salmonella typhimurium aroA* and *galE* strains. **FEMS Microbiol. Lett.** 50: 295-299.
- Agterberg, M., Adriaanse, H., Tijhaar, E., Resink, A. and Tommassen, J. (1989). Role of the cell surface-exposed regions of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* K-12. in the biogenesis of the protein. **Eur. J. Biochem.** 185: 365-370.
- Agterberg, M., Adriaanse, H., Van Bruggen, A. Kasperien, M. and Tommassen, J. (1990). Outer-membrane PhoE protein of *Escherichia coli* K-12 as an exposure vector: possibilities and limitations. **Gene** 88: 37-45.
- Amemura, M., Makino, K., Shinagawa, H. and Nakata, A. (1990). Cross talk to the phosphate regulon of *Escherichia coli* by PhoM protein: PhoM is a histidina protein kinase y catalyzes phosphorylation of PhoB and PhoM-open reading frame 2. **J. Bacteriol.** 172: 6300-6307.
- Aoyama, T. and Oka, A. (1990). A common mechanism of transcriptional activation by the *trc* positive regulators, VirG, PhoB, and OmpR. **FEBS Lett.** 263: 1-4.
- Bauer, K., Benz, R., Brass, J. and Boos W. (1985). *Salmonella typhimurium* contains an anion selective outer membrane porin induced by phosphate starvation. **J. Bacteriol.** 161: 813-816.
- Bauer, K., Schmid, A., Boos, W., Benz R. and Tommassen, J. (1988). Pore formation by *pho*-controlled outer-membrane protein of various Enterobacteriaceae in bilayers. **Eur. J. Biochemistry.** 174: 199-205.
- Bauer, K., Struyvé, M., Bosch, D., Benz, R. and Tommassen, J. (1989). One single lysine residue is responsible for the special interaction between polyphosphate and the outer membrane porin PhoE of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** 264: 16393-16398.
- Batenburg, A. M., Demel, R. A., Verkleij, A. J. and De Kruijff, B. (1988). Penetration of the signal sequence of PhoE protein into phospholipid model membranes leads to lipid-specific changes in signal peptide structure and alteration of lipid organization. **Biochemistry.** 27: 5678-5685.
- Benz, R., Schmid, A., Van der Ley P. and Tommassen, J. (1989). Molecular basis of porin selectivity: membrane experiments with OmpC-PhoE and OmpF-PhoE hybrid proteins of *Escherichia coli* K-12. **Biochim. Biophys. Acta.** 981: 8-14.
- Bernardini, L.M., Sanna, G.M., Fontaine, A. and Sansonetti, J.P. (1993). OmpC is involved in invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri*. **Infect. Immun.** 61(9): 3625-3635
- Bergey, D. H., Bredd, R. S., Murray, E. G., and Hitchens, A. P. (1984). **Manual of systematic bacteriology.** Vol. I. **Williams & Wilkins.** Baltimore.

- Blanco, F., Isibasi, A., Gonzalez C.R., Ortiz, V., Paniagua, J., Arreguin, C. and Kumate, J. (1993) Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. *Scand J. Infect Dis.* 25: 73-80.
- Brickman, E. and Beckwith J. (1975). Analysis of the regulation of E. coli alkaline phosphatase synthesis using deletions and 80 transducing phages. *J. Mol. Biol.* 96: 307-316.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H. and Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles II. A new multipurpose cloning system. *Gene.* 2: 95-113.
- Bosch, D. and Tommassen, J. (1987). Effects of linker insertions on the biogenesis and functioning of the *Escherichia coli* outer membrane pore protein PhoE. *Mol. Gen. Genet.* 208: 485-489.
- Bosch, D., Voorhout, W. and Tommassen, J. (1988). Export and localization of N-terminal truncated derivatives of *Escherichia coli* K-12 outer membrane protein PhoE. *J. Biol. Chem.* 263: 9952-9957.
- Bosch, D., Scholten, M., Verhagen, C., and Tommassen, J. (1989a). The role of the carboxy-terminal membrane -spanning fragment in the biogenesis of *Escherichia coli* K-12 outer membrane protein PhoE. *Mol. Gen. Genet.* 216: 144-148.
- Bosch, D., De Boer, P., Bitter, W. and Tommassen, J. (1989b). The role of the positively charged N-terminus of the signal sequence of *Escherichia coli* outer membrane protein PhoE in export. *Biochim. Biophys. Acta.* 979: 69-76.
- Buechner, M., Delcour, A.H., Martinac, B., Adler, J. and Kung, C. (1990). Ion channel activities in the *Escherichia coli* outer membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 1024: 111-121.
- Carrillo, C. G. and Ortega V.M. (1967) Effect of inorganic phosphate upon *Salmonella typhimurium* phosphatase activities: non-repressible alkaline phosphatase and non-inhibited acid phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta.* 146 535-543.
- Casadaban, M. J. (1976). *J. Mol. Biol.* 104: 541-555.
- Calva, E., Puente, J. L. and Calva, J. J. (1988). Research opportunities in typhoid fever: epidemiology and molecular biology. *Bio Essays.* 9: 173-177.
- Chang, A. C. and Cohen. S. N. (1978). Construcción and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* 134: 1141-1156.
- Cox. G., Webb, D. and Rosenberg, H. (1989a). Specific amino acid residues in both the PstB and PstC protein are required for phosphate transport by the *Escherichia coli* Pst system. *J. Bacteriol.* 171:1531-1534.
- Cox. G., Rosenberg, H., Downie, J. and Silver, S.(1989b). Genetic Analysis of Mutants affected in the Pst inorganic phosphate transport system. *J. Bacteriol.* 148: 1-9.
- Cryz, J.S., Furer, E., Baron, S., Noon, K.F., Rubin, F.A. and Kopecko, D. J. (1989). Construction and characterization of a Vi-positive variant of the *Salmonella typhi* live oral vaccine strain Ty21a. *Infect. Immun.* 57: 3863-3868.
- De Cock, H., Hendriks, R., De Vrije, T. and Tommassen, J. (1990a). Assembly of an *in vitro* synthesized *Escherichia coli* outer membrane porin into its stable trimeric configuration. *J. Biol. Chem.*, 265: 4646-4651.
- De Cock, H., Hekstra, D. and Tommassen, J. (1990b). *In vitro* trimerization of outer membrane protein PhoE. *Biochemistry.* 72: 177-182.
- De Cock, H., Quaedvlieg, N., Bosch, D., Scholten, M. and Tommassen, J. (1990c). Glycine-144 is required for efficient folding of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* K-12. *FEBS Lett.* 279: 285-288.

- De Vrije, T., Batenburg, M., Jordi, W. and Kruijff, B. (1989). Inhibition of PhoE translocation across *Escherichia coli* inner-membrane vesicles by synthetic signal peptides suggests an important role of acidic phospholipids in protein translocation. *Eur. J. Biochem.* 180: 385-392.
- Echois, H., Garen, A., Garen, S. and Torriani, A. (1961). Genetic control of repression of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 3: 425-433.
- Edelman, R. and Levine M.M. (1986) Summary of an international workshop on Typhoid Fever. *Rev. Infect. Dis.* 8: 329-349.
- Edwin, W. H., (1963). An outline of nomenclature for the family *Enterobacteriaceae*. *Int. Bull. Bact. Nomencl.* 13: 95-110.
- Finlay, B. and Falkow, S. (1989). *Salmonella* as an intracellular parasite. *Mol. Microbiol.* 3(12) 1833-1841.
- García, V. M. G., Zarate, P. S. E., Calva, M. E. y Berruecos, V. J. M. (1991). Ingeniería genética molecular en Medicina Veterinaria. *Universidad Autónoma de Chiapas*. México.
- González, C. R., Isibasi, A., Ortiz, V., Paniagua, J., García, J., Blanco, F. and Kumate, J. (1993). *Microbiol. Immunol.* 37: 793-799.
- Groisman, E. A. and Saler, M. H. Jr. (1990) *Salmonella* virulence: new clues to intramacrophages survival. *TIBS.* 15: 30-33.
- Guan, C., Wanner, B. and Inouye, H. (1983). Analysis of regulation of *phoB* expression using a *phoB-cat* fusion. *J. Bacteriol.* 156: 710-717.
- Gulzar, V. J. J., Lisker, R. y Armendaraz, S. (1991). Temas selectos en Biomedicina. *DEMESA México*.
- Hall, M. N. and Silhavy, T. J. (1981). Genetic analysis of the major outer proteins of *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Genet.* 15: 91-142.
- Hancock, R. E. W. (1991). Bacterial outer membranes: evolving concepts. *Features.* 57: 175-182.
- Hogervorst, E. J. M., Agterberg, M., Wagenaar, J. P. A., Adriaanse, H., Boog, C. J. P., Van der Zee, R., Van Embden, J. D. A., Van Eden, W. and Tommassen, J. (1990). Efficient recognition by rat T cell clones of an epitope of mycobacterial hsp 65 inserted in *Escherichia coli* outer membrane protein PhoE. *Eur. J. Immunol.* 20: 2763-2768.
- Huckstep, R. (1962). Typhoid fever and other *Salmonella* infections Edinburgh and London: E & S Livingston Ltd.
- Inokuchi, K., Mutoh, N., Matsuyama, S. and Mizushima, S. (1982). Primary structure of the *ompF* gene that codes for major outer membrane protein of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 178: 653-668.
- Isibasi, A., Paniagua, J., Rojo, M., Martín, N., Ramírez, G., González, C., López, C., Kumate, J. and Ortiz, V. (1994). Role of porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity: In Ades, E., Rest, R. and Morse, S. (ed) (1994). *Microbial pathogenesis and immune response. Annals of the New York Academy of Sciences* Vol 730.
- Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., González, C., Moreno, J. and Kumate, J. (1988). *Infect. Immun.* 56: 2953-2959.
- Jeanteur, D., Lakey, J. H. and Pattus, F. (1991). The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction. *Mol. Microbiol.* 5(9): 2153-2164.
- Jap, B. K., Downing, H. K. and Walian, J. P. (1990). Structure of PhoE porin in projection at 3.5 Å resolution. *J. Struct. Biol.* 103: 57-63.
- Kaempfer, R. and Magasanik, B. (1967). Effect of infection with T-even phage on the inducible synthesis of beta-galactosidase in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 27: 453-468.
- Kasahara, M., Makimo, K., Amemura, M., Nakata, A. and Shinagawa, H. (1991). Dual regulation of the *ugp* operon by phosphate and carbon starvation at two interspaced promoters. *J. Bacteriol.* 173: 549-558.

- Kikuchi, Y., Yoda, K., Yamasaki, M. and Tamura, G. (1981). The nucleotide sequence of the promoter and the aminoterminal region of alkaline phosphatase structural gene (*phoA*) of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids. Res.* 21: 5671-5678.
- Killian, J. A., De Jong, A. M. Ph., Bijvelt, A. J. and De Kruijff, B. (1990a). Induction of non-bilayer lipid structures by functional signal peptides. *EMBO J.* 9: 815-819.
- Killian, J. A., Keller, R. C. A., Struyvé, M., De Kroom, A. I. P.M., Tommassen, J. and De Kruijff, B. (1990b). Tryptophan fluorescence study on the interaction of the signal peptide of the *Escherichia coli* outer membrane protein PhoE with model membranes. *Biochemistry.* 29: 8131-8137.
- Kimura, S., Makino, K., Shinagawa, H., Amemura M. and Nakata, A. (1989). Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: characterization of the promoter of the *ptsS* gene. *Mol. Gen. Genet.* 215: 374-380.
- Korteland, J., Tommassen, J. and Lugtenberg, B. (1982). PhoE protein pore of the outer membrane of *Escherichia coli* K-12 is a particularly efficient channel for organic phosphate. *Biochim. Biophys. Acta.* 690: 282-289.
- Kuster, R., Dowhan, W. and De Kruijff B. (1991). Negatively Charged phospholipids restore prePhoE translocation across phosphatidylglycerol-depleted *Escherichia coli* inner membranes. *J. Biol. Chem.* 266: 8659-8662.
- Lee, Y., Makino, K., Shinagawa H. and Nakata, A. (1990). Overproduction of acetate kinase activates the phosphate regulon in the absence of the PhoR and PhoM functions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172: 2245-2249.
- Lee, S. K., Metcalf, W.W. and Wanner, B.L. (1992) Evidence for two phosphate degradative pathways in enterobacter aerogenes. *J. Bacteriol.* 174: 2501-2510.
- Levinthal C.B., Singer, R.E. and Fetherolf, K. (1962). Reactivation and hybridization of reduced alkaline phosphatase. *Biochemistry.* 48: 1230-1237.
- Lowry, H. O., Rosebrough, J. N. Farr, L.A. and Randall J.R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lugtenberg, B., Van Boxtel, R., Verhoef, C. and Van Alphen, W. (1978). Pore protein e of the outer membrane of *Escherichia coli* K-12. *FEBS Lett.* 96: 99-105.
- Magota, K., Otsuji, N., Miki, T., Horiuchi, T., Tsunasawa, S., Kondo, J., Sakiyama, F., Amemura, M., Morita, T., Shinagawa, H. and Nakata, A. (1984). Nucleotide sequence of the *phoS* gene, the structural gene for the phosphate-binding protein of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 2793-2798.
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M. and Nakata, A. (1986). Nucleotide sequence of the *phoB* gene, the positive regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* 190: 37-44.
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Kawamoto, T., Yamada, M. and Nakata, A. (1989). Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J. Mol. Biol.* 210: 551-559.
- Makino, K., Amemura, M., Kim, S., Nakata, A. and Shinagawa, H. (1993). Role of the σ^{70} subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*. *Gene Dev.* 7: 149-160.
- Maniatis, T., Fritsch, E., and Sambrook, J. (1989). Molecular cloning. A Laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY.
- Matsuyama, S. I., Inokuchi, K. and Mizushima, S. (1984). Promoter exchange between *ompF* and *ompC* genes for osmoregulated major outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 158: 1041-1047.

- Maximiliaan, B. A., Brasseur, R. and Ruyschaert, J.-M. (1988). Characterization of the interfacial behavior and structure of the signal sequence of *Escherichia coli* outer membrane pore protein PhoE. *J. Biol. Chem.* 263: 4202-4207.
- Marshall, N. E. and Ziegler, H. K. (1991). Lipopolysaccharide responsiveness is an important factor in the generation of optimal antigen-specific T cell responses during infection with Gram-negative bacteria. *J. Immuno.* 2333-2339.
- Meyer, S., Granett, S., Jung, J. and Villarejo. (1990). Osmotic Regulation of PhoE porin synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* 172: 5501-5502.
- Metcalf, W.W., Steed, M. P. and Wanner L. B. (1990). Identification of phosphate starvation inducible genes in *Escherichia coli* K-12 by DNA sequences analysis of *psi::lacZ* (Mu d1) transcriptional fusions. *J. Bacteriol* 172: 3191-3200.
- McCleary, W., Stock, J. and Ninfa, J. (1993). Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* 175: 2793-2798.
- Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor N.Y.
- Miller, S. I. and Mekalanos J. J. (1990). Constitutive expression of the PhoP regulon attenuates *Salmonella* virulence and survival within macrophages. *J. Bacteriol* 172: 2485-2490.
- Miller, S. I. (1991). PhoP/PhoQ: macrophage-specific modulators of *Salmonella* virulence?. *Mol. Microbiol.* 5: 2023-2028.
- Mizuno, T., Chou, K. Y. and Inouye, M. (1983). DNA sequence of the promoter region of the *ompC* gene and the amino acid sequence of the signal peptide of pro-OmpC protein of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 151: 159-164.
- Muda, M., Rao, N. and Torriani A. (1992). Role of PhoU in transport and alkaline phosphatase regulation. *J. Bacteriol* 174: 8057-8064.
- Neidhardt C.F., Bloch P.L. and Smith F.D. (1974) Culture medium for enterobacteria. *J. Bacteriol* 119: 736-747.
- Nikaido, H. and Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49: 1-32.
- Nikaido, H. (1992). Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Mol. Microbiol* 6: 435-442.
- Nouwen, N., Tommassen, J. and Kruijff, B. (1994). Requirement for conformational flexibility in the signal sequence of precursor protein. *J. Biol. Chem.* 269(23): 16029-16033.
- Osawa, Y. and Mizushima, S. (1983). Regulation of outer membrane porin protein synthesis in *Escherichia coli* K-12: OmpF regulates the expression of *ompC*. *J. Bacteriol* 154: 669-675.
- Old, L. J. (1987). Tumor necrosis factor. *Science.* 41-49.
- Overduin, P., Boos, W. and Tommassen, J. (1988). Nucleotide sequence of the *ugp* genes of *Escherichia coli* K-12: homology to maltose system. *Mol. Microbiol.* 2: 767-775.
- Overbeeke, N. and Lugtenberg, B. (1980). Expression of outer membrane protein e of *Escherichia coli* K-12 by phosphate limitation. *FEBS Lett.* 122: 229-232.
- Overbeeke, N., Bergmans, H., Mansfield F. H. and Lugtenberg, B. (1983). Complete nucleotide sequence of the *phoE*, the structural gene for the phosphate limitation inducible outer membrane pore protein of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* 163: 513-532.
- Pang, T., Koh, C. L. and Puthucherry D. (1992a). Typhoid Fever, strategies for the 90's. *World Scientific*. Singapore.
- Pang, T., Calva, E., Punjabi, N. and Rowley, D. (1992b). Report from an international symposium on Typhoid Fever. *Journal of Allergy and immunology.* 10: 81-83.
- Primrose, S. B. (1991). Molecular biotechnology. Second edition. *Blackwell Scientific Publication*. Spain.

- Puente, J. L., Alvarez, S. V., Gosset, G. and Calva, E. (1989). Comparative analysis of the *Salmonella typhi* and *Escherichia coli ompC*. **Gene**. 61: 75-83.
- Puente, J. L. (1987). "Aislamiento de los genes *phoE* y *glbB* de *Salmonella typhi*". UNAM. Tesis.
- Rao, N. N. and Torriani A. (1990). Molecular aspect of phosphate transport in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 4: 1083-1090.
- Rao, N. N., Roberts, M., Torriani, A. and Yashphe, J. (1993). Effect of *glp* and *glpD* mutations on expression of *phoA* gene in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol** 175: 74-79.
- Rosenberg, H. Gerdes, R.G. and Chegwiddden (1977). Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 131:505-511.
- Steed, P. and Wanner B.L. (1993) Use of the *rep* technique for allele replacement to construct mutants with deletions of *pstSCAB-U* operon: Evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon **J. Bacteriol** 175:6797-6809.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 74:5463-5467.
- Sinai, A. and Bavoil, P. (1993). Hyper-invasive mutants define a novel *pho*-regulated invasion pathway in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 10(5), 1125-1137.
- Schlesinger, M. J. and Olsen, R. (1968). Expression and localization of *Escherichia coli* alkaline phosphatase synthesized in *Salmonella typhimurium* cytoplasm. **J. Bacteriol.** 96: 1601-1605.
- Scholten, M., Janssen, R., Bogaarts, C., Van Strien J. and Tommassen J. (1995) The *pho* regulon of *Shigella flexneri*. **Mol. Microbiol.** 15(2): 247-254.
- Scholten, M. and Tommassen J. (1994) Effect of mutations in the -10 region of the *phoE* promoter in *Escherichia coli* on regulation of gene expression **Mol. Gen. Genet.** 10(5), 1125-1137.
- Schweizer, H., Grussenmeyer, T. and Boos, W. (1982). Mapping of two *ugp* genes coding for the regulon-dependent sn-glycerol-3-phosphate transport system of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 150: 1164-1171.
- Shinagawa, H., Makino K. and Nakata, A. (1983). Regulation of the *pho* regulon in *Escherichia coli* K-12. **J. Mol. Biol.** 168: 477-488.
- Shapira, S., Chou, J., Richaud, F. and Casadaban, M. (1983). New versatile plasmid vectors of hybrid proteins coded by a cloned gene fused to *lacZ* gene sequences encoding an enzymatically active carboxy-terminal portion of β -galactosidase. **Gene** 25: 71-82.
- Silver, S. and Walderbaug, M. (1992). Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. **Microbiol. Rev.** 56: 195-228.
- Spierings, G., Elders, R., Van Lith, B., Hofstra, H. and Tommassen, J. (1992a). Characterization of the *Salmonella typhimurium phoE* gene and development of *Salmonella* specific DNA probes. **Gene.** 172: 45-52.
- Spierings, G., Ockhuijsen, C., Hofstra, H. and Tommassen, J. (1992b). Characterization of the *Citrobacter freundii phoE* gene and development of *Citrobacter freundii* oligonucleotides. **FEMS-Microbiol-Lett.** 78: 199-204
- S. N. S. (1991). Epidemiología. Dirección General de Epidemiología. México.
- Stock, J. B., Ninfa, A.J. and Stock A.M. (1989). Protein phosphorylation of adaptive responses in bacteria. **Microbiol. Rev.** 53: 450-490.
- Struyvé, M., Moons, M. and Tommassen, J. (1991). Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. **J. Mol. Biol.** 218: 141-148.
- Struyvé, M., Visser, J., Adriaanse, H., Benz, R. and Tommassen, J. (1993). Topology of PhoE protein: the "eyelet" region. **Mol. Microbiol.** 7(1): 131-140.

- Surin, B.P., Jans, D.A., Fimmel, A.L., Shaw, D.C., Cox, G.B. and Rosenberg H. (1984). Structural gene for the phosphate-repressible phosphate-binding protein of *Escherichia coli* has its own promoter: complete nucleotide sequence of the *phoS* gene. **J. Bacteriol.** 157:772-778.
- Surin, B.P., Rosenberg, H and Cox, G.B. (1985). Phosphate-specific transport system of *Escherichia coli*: nucleotide sequence and gene-polypeptide relationship. **J. Bacteriol.** 161:189-198.
- Tartera, C. and Metcalf, E. (1993). Osmolarity and growth phase overlap in regulation of *Salmonella typhi* adherence to and invasion of human intestinal cell. **Infect Immun.** 61: 3084-3089.
- Tommasen, J. and Lugtenberg, B. (1980). Outer membrane protein e of *Escherichia coli* K-12 is co-regulated with alkaline phosphatase. **J. Bacteriol.** 143: 151-157.
- Tommasen, J., Van de Ley, P., Van der Ende, A., Bergmans, H. and Lugtenberg, B. (1982). "Cloning of *ompF* the structural gene for an outer membrane pore protein of *Escherichia coli* K-12: physical localization and homology with the *phoE* gene" **Mol. Gen. Genet.** 185:105-110.
- Tommasen, J., Overduin, P., Lugtenberg, B. and Bergmans, H. (1982). Cloning of *phoE*, the structural gene for the *Escherichia coli* phosphate limitation-inducible outer membrane pore protein. **J. Bacteriol.** 149: 668-672.
- Tommasen, J., Van Tol, H. and Lugtenberg, B. (1983). The ultimate localization of an outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12 is not determined by the signal sequence. **EMBO J.** 2: 1275-1279.
- Tommasen, J., Miemstra, P., Overduin, P. and Lugtenberg, B. (1984). Cloning of *phoM*, a gene involved in regulation of the synthesis of phosphate limitation inducible protein in *Escherichia coli* K-12. **Mol. Gen. Genet.** 195: 190-194.
- Tommasen, J., Koster, M. and Overduin, P. (1987). Molecular analysis of the promoter region of the *Escherichia coli* K-12 *phoE* gene. **J. Mol. Biol.** 198: 633-641.
- Tommasen, J., Agterberg, M., Janssen, R. and Spierings, G. (1993). Use of the enterobacterial outer membrane protein PhoE in the development of new vaccines and DNA probes. **Int. J. Med Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.** 278: 396-406.
- Torres, A. (1993). Caracterización parcial del gene que codifica para la proteína de la membrana externa PhoE de *Salmonella typhi*. EMVZ BUAP. Tesis de licenciatura.
- Van der Ley, P., Ames, H., Tommasen, J. and Lugtenberg, B. (1985). Monoclonal antibodies directed against the cell-surface-exposed part of PhoE pore protein of *Escherichia coli* K-12 outer membrane. **Eur. J. Biochem.** 147: 401-407.
- Van der Ley, P., Struyvé, M. and Tommasen, J. (1986). Topology of outer membrane pore protein PhoE of *Escherichia coli*. Identification of cell surface-exposed amino acids with the aid of monoclonal antibodies. **J. Biol. Chem.** 261: 12222-12225.
- Van der Ley, P., Bekkers, A., Van Meersbergen, J. and J. Tommasen, J. (1987a). A comparative study on the *phoE* genes of three enterobacterial species. **Eur. J. Biochem.** 164: 469-475.
- Van der Ley, P., Burm, P., Agterberg, M., Van Meersbergen, J. and J. Tommasen, J. (1987b). Analysis of structure-function relationships in *Escherichia coli* K-12 outer membrane porins with the aid of *ompC-phoE* y *phoE-ompC* hybrid genes. **Mol. Gen. Genet.** 209: 585-591.
- Van Gysegem, F., and Toussaint, A. (1982). Chromosome transfer and R. prime formation by an RP4::mini-Mu derivative in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* **Plasmid** 7: 30-44

- Verdugo, A., López, Y., Puente, J. L. and Ruiz, G. (1993). Early diagnostic of Typhoid Fever by an immunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis** 12: 248-254.
- Verhoef, C., Lugtenberg, B., Van Bostel, R. De Graaff, P. and Verheij, H. (1979). Genetics and biochemistry of the peptidoglycan-Associated proteins b and c of *Escherichia coli* K-12. **Mol. Gen. Genet.** 169: 137-146.
- Verhoef, C., Van Koppen, C., Overduin, P., Lugenberg, B., Korteland J and Tommassen J. (1984). Cloning and expression in *Escherichia coli* K-12 of the structural gene for outer membrane PhoE protein from *Enterobacter cloacae*. **Gene** 32: 107-115.
- Walian, J. P. and Jap K. B. (1990). Three-dimensional electron diffraction of PhoE porin to 2.8 Å resolution. **J. Mol. Biol.** 215: 429-438.
- Wanner, B. L. and McSharry. (1982). Phosphate-controlled gene expression in *Escherichia coli* K-12 using Mud1-directed *LacZ* fusions. **J. Mol. Biol.** 158: 347-363.
- Warner, B. L. (1987a). The *phoBR* operon in *Escherichia coli* K12. **J. Bacteriol.** 169:5569-5574.
- Warner, B. L. (1983). Overlapping and separate controls on the phosphate regulon in *Escherichia coli* K12. **J. Mol. Biol.** (1983) 166: 283-308.
- Wanner, B. L. (1987b). Control of *phoR*-dependent bacterial alkaline phosphatase clonal variation by *phoM* region. **J. Bacteriol.** 169: 900-903.
- Wanner, B. L., Wilmes, M. R. and Young D. C. (1988). Control of bacterial alkaline phosphatase synthesis and variation in an *Escherichia coli* K-12 *phoR* mutant by adenyl cyclase, the cyclic AMP receptor protein, and the *phoM* operon. **J. Bacteriol.** 170: 1092-1102.
- Wanner, B. L., Wilmes, M. R. and Hunter, E. (1989). Molecular cloning of the wild-type *phoM* operon in *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.** 170: 279-288.
- Wanner, B. L. and Wilmes-Riesenberg, M. R. (1992). Involvement of phosphotransacetylase, acetate kinase, γ acetyl phosphate synthesis in control of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 174: 2124-2130.
- Wanner, B. L. (1993). Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. **J. Cell Biochem.** 51: 47
- Webb, D., Rosenberg, H. and Cox, G. (1992) Mutational analysis of *Escherichia coli* phosphate-specific transport system a member of the traffic ATPase (or ABC) family of membrane Transporters. **J. Biol. Chem.** 267: 24661-24668.
- Willisky, G. Malamy, M. (1980). Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol** 144:356-365.
- Yagil, E. and Hermoni, E. (1976). Repression of alkaline phosphatase in *Salmonella typhimurium* carrying a $phoA^+$ $phoR^-$ episome from *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 176: 661-664.
- Yamada, M., Makino, K., Amemura, M., Shinagawa, H. and Nakata, A. (1989). Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: analysis of mutant *phoB* and *phoR* genes causing different phenotypes. **J. Bacteriol.** 171: 5601-5606.
- Yamada, M., Makino, K., Shinagawa, H. and Nakata, A. (1990). Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: properties of *phoR* deletion mutants and subcellular localization of PhoR protein. **Mol. Gen. Genet.** 220: 366-372.