



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES, UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO

**PAPEL DEL OPERON OMPB EN LA EXPRESION DE OMPC DE
SALMONELLA TYPHI**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

MARTÍNEZ FLORES, IRMA

ASESOR: PUENTE GARCÍA, JOSÉ LUIS

Ciudad Universitaria, México, D.F.,

1999



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. José Luis Puente García, del Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor., México.

Este trabajo fue asesorado por el siguiente Comité Tutoral:

Dr. José Luis Puente García - Tutor principal

Dra. Gloria Soberón Chávez

Dr. Carlos Federico Arias Ortiz

Durante el desarrollo del trabajo, el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (no. 90278); del Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudio de Posgrado de la UNAM (nos. 030503, 030319 y 030382) y del proyecto Howard Hughes Medical Institute (no. 75191-527102).



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PROYECTO ACADÉMICO DE
ESPECIALIZACIÓN, MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN BIOTECNOLOGÍA
IBT

OF. IBT/088/99

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION ESCOLAR
P R E S E N T E

Por este conducto me permito informar a usted que en la reunión del Comité Académico del Programa de Ciencias Bioquímicas que se llevó a cabo el 24 de noviembre de 1999 se acordó poner a su consideración el siguiente Jurado para el examen de Doctorado en Biotecnología de la M EN B IRMA MARTINEZ FLORES, con número de cuenta 8216040-9 y número de expediente 30921093 con la tesis titulada "Papel del operón ompB en la expresión de OmpC de Salmonella typhi" dirigida por el Dr. José Luis Puente García.

PRESIDENTE:	Dr. Edmundo Calva Mercado
SECRETARIO:	Dr. Lourival Domingos Possani Postay
VOCAL:	Dra. Gloria Soberón Chávez
VOCAL:	Dr. Carlos Federico Arias Ortíz
VOCAL:	Dr. Mario Rocha Sosa
SUPLENTE:	Dr. Mario Soberón Chávez
SUPLENTE:	Dr. David René Romero Camarena

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

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor., 27 de enero de 1999
COORDINADOR DEL PROGRAMA

DRA. AMELIA FARRES GONZALEZ-SARABIA



A V I C T O R,

a quien admiro y amo profundamente, mi compañero incondicional, autor compartido del logro de mis metas y padre de la semillita que crece dentro de mi y a quien también dedico este trabajo.

A mi madre, una GRAN mujer que me ha llenado de amor y confianza, gran ejemplo de tenacidad.

A mi padre, cuyo recuerdo y enseñanzas perduran en mí.

A Elizabeth, mi amiga y hermana; Enrique y Julia, por brindarme un gran cariño; Inés, José, Angélica y Cristoffer por formar parte de mi feliz familia.

A la familia Bustamante Santillán, que me han dado un lugar privilegiado entre ellos.

A María, por haber permanecido cerca de mí durante TODA esta etapa (por todo lo que ello implicó), por nuestras confidencias, nuestra complicidad y nuestra maravillosa amistad.

A José Luis, Roxana, Alejandro, Adriana, Mario, Mauricio, Sofía, Mónica, Toño y Amapola a quienes me une una invaluable y muy especial amistad.

A la zona T, por todo lo que compartimos y la SUPER AMISTAD que logramos.

A las Lulus.

A TODOS mis AMIGOS y Compañeros, especialmente los del Laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

A José Luis Puente, en quien he encontrado además de un excelente guía en mi desarrollo académico, un invaluable amigo, siempre dispuesto a escucharme, aconsejarme y apoyarme.

Al Dr. Edmundo Calva, por su confianza y apoyo, que nos infunde seguridad en nuestro desarrollo, y por compartir con nosotros su filosofía de la vida.

A Roxana Cano, por su valiosa colaboración en la realización de algunos experimentos y por brindarme la oportunidad de dirigir su trabajo de tesis.

A los integrantes de mi comité tutorial y de mi jurado, por su asesoría, revisión y crítica de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio, por su discusión y opinión de este trabajo y por mantener siempre un ambiente de armonía y camaradería.

I N D I C E

capítulo	página
I. RESUMEN	1
II. ABREVIATURAS	3
III. INTRODUCCION	4
-Patogénesis de <i>Salmonella typhi</i> .	4
-Porinas.	5
-Regulación de OmpC y OmpF	6
-Papel del operón <i>ompB</i> en las bacterias.	8
III. ANTECEDENTES	10
IV. OBJETIVOS	12
V. MATERIALES Y METODOS	13
VI. RESULTADOS	23
-Selección de medios de crecimiento.	23
-Efecto de la fase de crecimiento en el patrón de expresión de las porinas en baja y alta osmolaridad.	24
-La diferencia en la expresión de OmpC de <i>S. typhi</i> y OmpC de <i>E. coli</i> , en respuesta a la osmolaridad, es determinada por el fondo genético de la cepa.	27

	-Papel del operón <i>ompB</i> en la expresión de OmpC en <i>S. typhi</i> y <i>E. coli</i> .	27
	-Efecto del operón <i>ompB</i> en la invasión de <i>S. typhi</i> a células epiteliales.	34
VII.	DISCUSION	38
VIII.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	44
IX.	BIBLIOGRAFIA	46
X.	ANEXO	

"The *ompB* operon partially determines the differential expression of *ompC* in *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*".

Irma Martínez-Flores, Roxana Cano, Víctor H. Bustamante, Edmundo Calva and José Luis Puente.

Journa of Bacteriology (1999) 181(2).

RESUMEN

Salmonella typhi es una enterobacteria Gram-negativa que causa la fiebre tifoidea en el hombre. En la membrana externa de *S. typhi* y *Escherichia coli* se encuentran un conjunto de proteínas llamadas porinas, las cuales funcionan como canales de difusión pasiva para pequeñas moléculas hidrofílicas; las más abundantes en ambas bacterias son OmpC y OmpF. En *E. coli* se ha determinado que la expresión de estas porinas se regula por la osmolaridad del medio; así mismo, en nuestro laboratorio se observó que en *S. typhi* OmpF se osmorregula de forma similar que en *E. coli*, mientras que la síntesis de OmpC no se osmorregula, expresándose en altos niveles tanto en baja como en alta osmolaridad. Sin embargo, la expresión del gen *ompC* en ambas bacterias es dependiente de los genes *ompR* y *envZ*, los cuales conforman el operón *ompB*, y codifican para las proteínas reguladoras OmpR y EnvZ, respectivamente.

Con el propósito de entender el mecanismo que controla la expresión de OmpC en *S. typhi*, se exploraron algunos aspectos relacionados con su regulación. Primero, se analizó el papel de la región reguladora de *ompC* de *S. typhi* (la cual tiene una identidad del 81.7% con la correspondiente de *E. coli*); mediante la expresión de fusiones *ompC-lacZ* de *S. typhi* y *E. coli*, en un fondo genético de *E. coli* y *S. typhi* silvestres, respectivamente. Este análisis mostró que las diferencias observadas entre las regiones reguladoras de los genes *ompC* no alteran la osmorregulación en *E. coli*, ni median la expresión independiente de la osmolaridad en *S. typhi*.

También se analizó el papel del operón *ompB*, ya que aunque al caracterizarlo se observó una gran similitud con el correspondientes de *E. coli*, se han reportado mutaciones puntuales en *ompB* de *E. coli*, las cuales provocan el cambio de un aminoácido en OmpR o en EnvZ, alteran la osmorregulación de las proteínas de membrana externa (PME). Para establecer si las variaciones existentes entre las secuencias de los operones *ompB* de *S. typhi* y de *E. coli* determinan que OmpC de *S. typhi* se exprese de forma diferente a OmpC de *E. coli* (en respuesta a la osmolaridad), se analizó el perfil de PME y la expresión de fusiones *ompC-lacZ* de *S. typhi* y *E. coli*, en cepas $\Delta ompB$ complementadas con el operón heterólogo. En resumen, los resultados indicaron que la carencia de osmorregulación de la expresión de OmpC de *S. typhi*, está determinada tanto por el operón *ompB* de *S. typhi* como por otro factor(es) no conocido(s), presente en el fondo genético de *S. typhi*.

ABSTRACT

Salmonella typhi is a Gram-negative enterobacterium, a specific human pathogen that causes typhoid fever, a systemic febrile illness. The outer membranes of *S. typhi* and *Escherichia coli* contain a set of porins, which function as passive diffusion channels for small hydrophilic molecules. The most abundant in both bacteria are OmpC and OmpF. It has been shown that in *E. coli* the expression of these major porins is regulated by osmolarity. In the same manner, in our laboratory we have observed that *S. typhi* OmpF is osmoregulated as in *E. coli*, whereas OmpC has been observed to be expressed at a high level, both at low and high osmolarity. However, in both bacteria, *ompC* expression is regulated by the *ompR* and *envZ* genes, which conform the *ompB* operon, that code for the OmpR regulator and EnvZ sensor proteins, respectively.

In order to better understand the expression mechanism of *S. typhi* OmpC, we explored some aspects related to its regulation. First, the role in expression of the *ompC* 5' regulatory region was determined, by analyzing the expression of either an *S. typhi ompC-lacZ* or an *E. coli ompC-lacZ* fusion, placed in an *E. coli* or in an *S. typhi* background, respectively. In this manner, we found that differences in the regulatory region (both bacteria share an 81.7% identity) did not determine the response to osmolarity in *E. coli*, nor did they mediate the osmolarity-independent expression in *S. typhi*.

In order to explore the possibility that the sequence differences found between the *S. typhi* and *E. coli ompB* operons determined the different behavior of OmpC expression in *S. typhi*, the OMP profile of either *S. typhi* or *E. coli* $\Delta ompB$ strains, complemented with either *ompB* operon, was analyzed. In addition, the activity of *S. typhi ompC-lacZ* and *E. coli ompC-lacZ* fusions in the complemented mutant strains was done. Our results are consistent with the notion that the EnvZ and OmpR regulators, in conjunction with one or more components present in *S. typhi*, determine the high level of OmpC expression at different osmolarities.

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
aa	Aminoácido
Amp	Ampicilina
Cm	Cloranfenicol
SDS	Dodecil sulfato de sodio
EnvZ-P	EnvZ fosforilada
Stp	Estreptomina
g	Gramo
KDa	Kilo Daltones
Km	Kanamicina
LB	Luria-Bertani
MN	Medio A
NB	Medio nutritivo (Difco)
ME	Membrana externa
µg	Microgramo
µl	Microlitro
mA	miliampers
mg	Miligramo
mM	Milimolar
min	minutos
M	Molar
nm	nanómetro
OmpR-P	OmpR fosforilada
ONPG	O-nitrofenil-β-D-galactosido
pb	Pares de bases
PME	Proteínas de membranaexterna
rpm	Revoluciones por minuto
Rif	Rifampicina
seg	segundos
Tc	Tetraciclina

INTRODUCCION

Patogénesis de *Salmonella typhi*.

S. typhi es una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae*, que infecta específicamente al humano, ocasionándole una bacteremia denominada fiebre tifoidea. Esta bacteria penetra al organismo mediante la ingestión de agua o alimentos contaminados con heces (Calva et al., 1988). El mecanismo de patogénesis de *S. typhi* ha sido difícil de estudiar, ya que no existe un modelo animal en el que se reproduzca la infección con esta bacteria. Sin embargo, a partir de investigaciones en ratones infectados con *Salmonella typhimurium* (especie estrechamente relacionada a *S. typhi*), causante en ratones de una infección similar a la fiebre tifoidea en humanos, así como en ensayos *in vitro*, utilizando células epiteliales en cultivo, se ha postulado un modelo de patogénesis. En éste se propone que las bacterias se adhieren y penetran al epitelio intestinal a través de las células "M" de las placas de Peyer, donde son ingeridas por los macrófagos, y transportadas al sistema retículo endotelial, para multiplicarse y propagarse por todo el organismo, colonizando principalmente el bazo y el hígado (Finlay y Falkow, 1989; Groisman et al., 1990). La entrada de *Salmonella* a la célula hospedera a nivel molecular es muy compleja, lo cual se refleja por el gran número de loci involucrados. Algunos de éstos han sido implicados en la movilidad y en la síntesis del lipopolisacárido; sin embargo, no es claro si el papel de estos determinantes es simplemente para facilitar el contacto entre la bacteria y las células hospederas, o si juegan un papel más específico. Muchos otros loci son agrupados en el centisoma 63 del cromosoma de *Salmonella*, el cual ha sido referido como la isla 1 de patogenicidad de *Salmonella* (Galan, 1996). Productos codificados por una segunda isla de patogenicidad, localizados en el centisoma 30, no parecen ser directamente involucrados en el proceso de entrada (Ochman et al., 1996; Shea et al., 1996), aunque hay datos recientes que sugieren comunicación entre las dos islas de patogenicidad (Hensel et al., 1997). Algunos loci requeridos para la entrada de la bacteria, identificados dentro de las islas de patogenicidad son: *hil* (hyperinvasive locus), *prg* (requeridos para la sobrevivencia dentro de macrófagos) y el locus *inv* (el cual es un arreglo de por lo menos 14 genes contiguos *invA-O*, algunos de los cuales son componentes un sistema de secreción tipo III) (Gahring et al., 1990; Galan y Curtiss III, 1989; Lee et al., 1990; Miller, 1991). Además, el sistema regulador de dos componentes

PhoP-PhoQ regula negativamente la expresión de genes de invasión (Pegues et al., 1995; Bajaj et al., 1996). y positivamente la expresión de los genes requeridos para la sobrevivencia dentro de macrófagos (Miller et al., 1989; Alpuche-Aranda et al., 1992).

Porinas.

S. typhi pertenece al grupo de las bacterias Gram-negativas, las cuales presentan una envoltura celular formada por una membrana externa (ME) y una interna, divididas por el periplasma, el cual contiene una capa de peptidoglicano que provee rigidez mecánica a la célula. La ME de las bacterias Gram-negativas es muy importante en su fisiología, ya que las protege de agentes dañinos tales como proteasas, sales biliares, antibióticos, toxinas y fagos; así como contra cambios drásticos en el ambiente. Al mismo tiempo, esta barrera debe permitirle el intercambio de nutrimentos y productos de desecho con el ambiente. Gran parte de las proteínas de membrana externa (PME) forman canales o poros de difusión pasiva, sin selectividad aparente, los cuales conforman la barrera de flujo de la ME (Nikaido y Vaara, 1985).

En *Escherichia coli*, las proteínas OmpC, OmpF, y OmpA (generalmente considerada como una proteína estructural monomérica) son las más abundantes en la ME, presentándose en aproximadamente 10^5 moléculas por célula. Los genes *ompC* y *ompF* que codifican para las proteínas OmpC y OmpF, respectivamente, se encuentran distantes en el cromosoma de *E. coli* (21 y 47 min., respectivamente) (Mizuno et al., 1983). En la ME se han detectado más de veinte proteínas menos abundantes, de las cuales algunas se sobre-expresan bajo condiciones ambientales específicas (Lugtenberg y Van Alphen, 1983).

Las PME OmpC y OmpF se agrupan triméricamente, formando poros a través de la ME, por lo que reciben el nombre de "**porinas**"; los poros formados por estas proteínas permiten el paso de pequeñas moléculas hidrofílicas por difusión pasiva, y excluyen sustancias dañinas, como antibióticos y sales biliares (Nikaido, 1994). Recientemente, se ha propuesto a OmpA como una porina, aunque sus características multiméricas no han sido plenamente elucidadas (Sugawara y Nikaido, 1994). Las porinas están ampliamente distribuidas entre las bacterias Gram-negativas y tienen algunas características en común: alta homología a nivel de la secuencia primaria de aminoácidos (aa); peso molecular similar, sus subunidades monoméricas tienen un peso molecular de alrededor de 35 kDa

(Nikaido, 1994); reacción inmunológica cruzada; y forman poros de difusión pasiva de diámetro similar (Mizuno et al., 1983).

Regulación de OmpC y OmpF.

En *E. coli*, OmpC se expresa preferencialmente cuando la bacteria es crecida en un medio de alta osmolaridad, mientras que la expresión de OmpF es predominante en células crecidas en un medio de baja osmolaridad (Fig. 1) (Van Alphen y Lugtenberg, 1977; Puente et al., 1991). Además, se ha determinado que el poro formado por OmpF es de mayor tamaño que el formado por OmpC, lo cual se ha propuesto puede tener importancia biológica; así, OmpF se expresaría en condiciones de vida libre de la bacteria, permitiendo con ello una mayor difusión de nutrimentos cuando son escasos; mientras que OmpC se expresaría dentro del hospedero y con su poro más chico impediría la entrada de compuestos de alto peso molecular (como las sales biliares), que serían dañinos para la bacteria (Nikaido y Vaara, 1985).

La osmorregulación de estas porinas es mediada a nivel transcripcional por las proteínas OmpR y EnvZ, cuyos genes conforman el operón *ompB* (Hall and Silhavy, 1981). Las proteínas OmpR y EnvZ pertenecen a la familia de reguladores de dos componentes; este sistema es responsable del acoplamiento estímulo/respuesta, e involucra dos tipos de componentes: una proteína histidina-cinasa detectora (EnvZ), que recibe el estímulo y, a su vez, transmite la señal a una segunda proteína reguladora (OmpR), la cual interactúa con el DNA (Gross et al., 1989; Stock et al., 1990).

En *E. coli*, un modelo de regulación de OmpC y OmpF propone que EnvZ (la molécula detectora), se autofosforila en el residuo de His243 cuando la presión osmótica es alta. EnvZ fosforilada (EnvZ-P) es capaz de transferir el fosfato a OmpR (la molécula reguladora), en el residuo de Asp55. OmpR fosforilada (OmpR-P) se convierte así en una proteína activa, capaz de unirse a regiones específicas del DNA (Fig. 2) (Delgado et al., 1993; Russo y Silhavy, 1991).

OmpR se une a dos tipos de secuencias en el DNA, las cajas tipo A (sitios de alta afinidad para OmpR-P) y las cajas tipo B (sitios de baja afinidad para OmpR-P), localizadas en las regiones promotoras de *ompF* y *ompC*. Stock y colaboradores (1989) proponen que en baja osmolaridad, donde los niveles de EnvZ-P son bajos, y por consiguiente hay también bajos niveles de OmpR-P, se activa la transcripción de *ompF* por la unión de

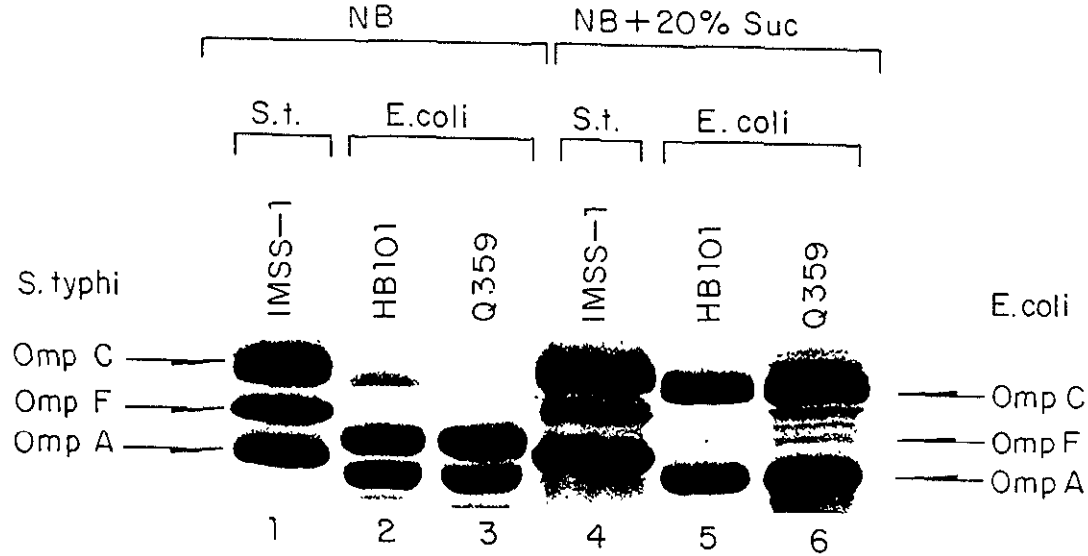


Fig. 1 Perfil electroforético de preparación de PME de *S. typhi* (carriles 1 y 4) y *E. coli* (líneas 2, 3, 5 y 6), crecidas en baja osmolaridad (NB; carriles 1-3) o alta osmolaridad (NB+ 20% sacarosa; líneas 4-6). Las posiciones de OmpC, OmpF y OmpA de *S. typhi* y *E. coli* son mostradas en los márgenes izquierdo y derecho respectivamente (Puente et al., 1991).

OmpR-P a sitios de alta afinidad en su región reguladora (caja A). Por otro lado, en condiciones de alta osmolaridad, donde los niveles de EnvZ-P son altos, la cantidad de OmpR-P aumenta, uniéndose a sitios de menor afinidad (caja B), tanto en la región promotora de *ompF* como en la de *ompC*, provocando la represión de *ompF* y la activación de *ompC* (Fig. 2) (Stock et al., 1989).

Por otro lado, la represión de OmpF en respuesta a un incremento en la temperatura, es a nivel post-transcripcional por el RNA de *micF*, el cual esta localizado inmediatamente corriente arriba de *ompC* y es transcrito en dirección opuesta. Los 93 nucleótidos del RNA de *micF* forman un complejo duplex estable con la región de unión a ribosomas del mRNA de *ompF*, inhibiendo así la traducción de *ompF*. El posible papel de *micF* en la osmorregulación de *ompF* ha sido sujeto a mucho debate, ya que aunque el nivel de RNA de *micF* se incrementa cinco veces en alta osmolaridad, la eliminación de *micF* no altera significativamente los niveles de OmpF en cada condición de osmolaridad (baja y alta). Estudios de la cinética de expresión de OmpF indican que *micF* contribuye a una rápida y completa respuesta a cambios en la osmolaridad de la síntesis de OmpF, es decir, que funciona como un sistema de ajuste fino para un mayor control osmótico de *ompF* mediado por EnvZ y OmpR (Esterling y Delihis, 1994; Delihis, 1995; Pratt et al., 1996).

Papel del operón *ompB* en las bacterias.

Mutaciones en *ompC* y *ompF* afectan la virulencia de *S. typhimurium* en el sistema de ratón, la LD₅₀ de esta doble mutante aumentó aproximadamente 320 veces comparanda con la silvestre; no obstante, el nivel de atenuación es aún mayor cuando se muta *ompR*, el aumento de la LD₅₀ de esta mutante es de 1600 veces con respecto a la silvestre (Dorman et al., 1989; Chatfield et al., 1991). Este hecho podría explicarse si tomamos en cuenta que mutaciones en *ompB* afectan la expresión de varios genes; los genes *lamB* y *phoE*, que codifican para PME; los genes *malE* y *malT* involucrados en la utilización de maltosa; los genes *opr* y *cpr*, que codifican para proteasas; el gen *tppB*, el cual codifica para una tripéptido permeasa; *phoA*, que codifica para la fosfatasa alcalina; así como otros genes involucrados en el transporte de hierro (Stock et al., 1989; Case et al., 1986; Lundrigan y Earhart, 1981; Chatfield et al., 1991). En un sistema *in vitro*, se observó que mutaciones en *ompB* de *S. typhimurium* anulan el fenotipo citotóxico de la bacteria en macrófagos; así mismo, estas mismas mutaciones producen una dramática atenuación de esta bacteria *in*

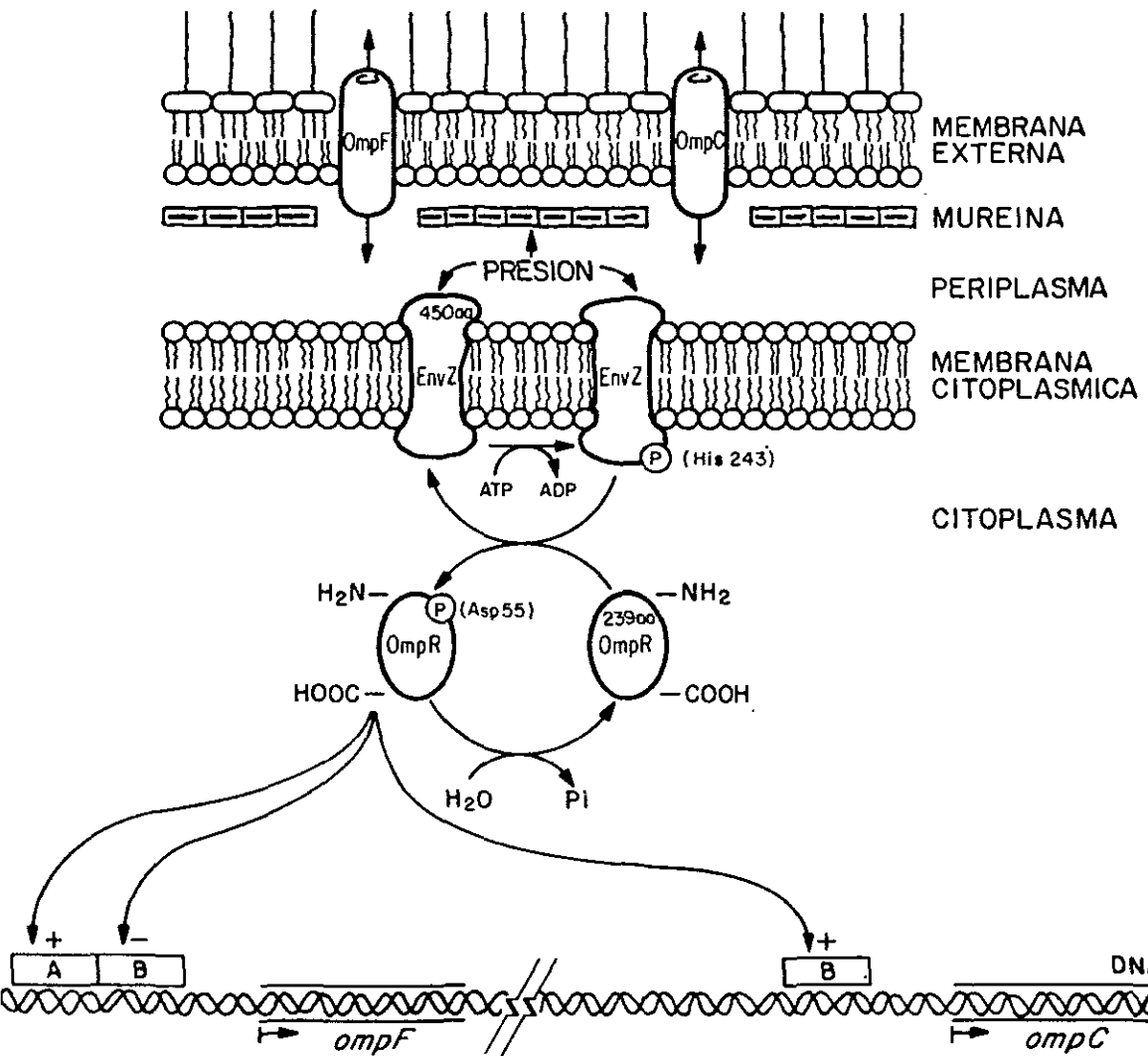


Fig. 2 Modelo propuesto para la regulación de la síntesis de OmpC y OmpF en *E. coli*. P: grupo fosfato; +: activación del gen; -: represión del gen; cajas A: cajas de alta afinidad; cajas B: cajas de baja afinidad.

vivo, en el sistema de ratón (Lindgren et al., 1996). En *Shigella flexneri*, mutaciones en *ompB* u *ompC* afectan su sobrevivencia intracelular y su proliferación en el epitelio intestinal (Bernardini et al., 1990; 1993).

ANTECEDENTES

Una de las líneas principales de nuestro laboratorio ha sido el estudio de la regulación de la expresión de las PME de *S. typhi*. Al respecto, se ha determinado que *S. typhi* expresa tres PME (las más abundantes) que corresponden a las observadas en *E. coli*, OmpA, OmpC y OmpF (Fig. 1). Así mismo, se observó que OmpF de *S. typhi* se osmorregula de forma similar a la de *E. coli*; mientras que la expresión de OmpC de *S. typhi* no es afectada por la osmolaridad del medio, expresándose en altos niveles en alta y baja osmolaridad (Puente et al., 1991). Esto contrasta con OmpC de *E. coli* que se expresa preferencialmente cuando la bacteria se cultiva en condiciones de alta osmolaridad y se reprime cuando crece en baja osmolaridad (Fig. 1) (Hall y Silhavy, 1981). En nuestro laboratorio se han aislado los genes de *S. typhi* que codifican para las PME mayoritarias OmpC y OmpF; así como para las PME minoritarias OmpS1, OmpS2 y PhoE (Puente et al., 1987; apéndice I y II; Puente, 1987; Torres, 1993; Fernández-Mora et al., 1993 y Gutierrez, 1994).

El análisis de la secuencia nucleotídica de *ompC* de *S. typhi* reveló que su región reguladora presenta una homología del 81.7% con la de *ompC* de *E. coli* (Puente et al., 1989); sin embargo, aunque la homología es alta, los cambios existentes en esta región podrían estar involucrados en la diferente respuesta a la osmolaridad del medio de este gen. Así mismo, los genes (que conforman el operón *ompB*), que codifican para las proteínas reguladoras OmpR y EnvZ de *S. typhi*, también han sido aislados y secuenciados (Martínez-Flores et al., 1995). El alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los operones *ompB* de *S. typhi* y *E. coli* mostró un 87% de homología (Martínez-Flores et al., 1995). Aunque la homología es alta, no se descarta que el locus *ompB* pudiera estar involucrado en las diferencias observadas entre ambas bacterias, en la expresión de *ompC* con respecto a la osmolaridad; ya que en *E. coli* se han caracterizado mutaciones puntuales en el operón *ompB*, que provocan el cambio de un solo aminoácido en OmpR o EnvZ, las cuales modifican la regulación por osmolaridad de las porinas (Martínez-Flores et

al., 1995; Forst et al., 1988). En este trabajo evaluamos si la diferente expresión de OmpC en *S. typhi* y *E. coli*, con respecto a la osmolaridad, se debe a los cambios observados en los operones *ompB*.

El papel de OmpR y EnvZ en la regulación por osmolaridad de las PME, la propia regulación de los genes que codifican para estas proteínas (*ompR* y *envZ*), así como su efecto en la expresión de otras proteínas, y su implicación en la virulencia, son fundamentos importantes para comenzar nuevos estudios en *S. typhi*, con los cuales se logre un mejor entendimiento de la función y regulación de las PME. Esto ayudará a comprender el papel específico de las PME en la fisiología de *S. typhi*, cuando se encuentra en diferentes condiciones ambientales, en particular dentro del organismo durante el proceso de infección.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las bases moleculares de la diferencia en la expresión de OmpC en respuesta a la osmolaridad, entre *S. typhi* y *E. coli*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar el efecto de la fase de crecimiento en la expresión de la proteína OmpC, dependiente de la osmolaridad del medio de crecimiento.
2. Generar una cepa $\Delta ompB$ de *S. typhi*.
3. Establecer si la región reguladora del gen *ompC* y/o el operón *ompB* determinan la diferencia en el patrón de expresión de OmpC entre *S. typhi* y *E. coli*, dependiente de la osmolaridad del medio.

MATERIALES Y METODOS

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos.

Cepas, plásmidos u oligos	Descripción	Referencia o fuente
Cepas de <i>E. coli</i>		
MC4100	<i>F⁻ araD139 Δ(argF-lac) U169 rpsL150 relA1 flb5301 deoC1 ptsF25.</i>	Casadaban, 1976.
SG480Δ900	MC4100 <i>malP::neo Δ(envZ-malP)</i> 900.	Garret et al., 1985.
MH760	MC4100, <i>ompR472, recA malQ⁺.</i>	Hall y Silhavy, 1981.
MH1461	MC4100, <i>envZ11, malQ⁺, tpo⁻.</i>	Hall y Silhavy, 1981.
SY327λ _{pir}	<i>F⁻ araD Δ(lac pro) argE (Am) recA56 nalA</i> ; contiene el profago λ _{pir} , Rif ^r .	Miller y Mekalanos, 1988.
Cepas de <i>S. typhi</i>		
IMSS-1	serotipo 9, 12, d, Vi; cepa clínica de referencia.	Puente et al., 1987.
TY2	Vi ⁺ ; cepa clínica de referencia.	Contreras et al., 1995.
STY8	IMSS-1, <i>ompB⁺, Km^r, Amp^r.</i>	Este estudio.
STY81	IMSS-1; <i>ΔompB, Km^r.</i>	Este estudio.
STYC171	IMSS-1; <i>ΔompC, Km^r.</i>	Apéndice I.
STYF302	IMSS-1; <i>ΔompF, Km^r.</i>	Apéndice I.

Plásmidos		
pIM25 y pIM26	Vector pUC19, que contiene el operón <i>ompB</i> de <i>S. typhi</i> , en ambas orientaciones; Amp ^r .	Martínez-Flores et al., 1995.
pIM260	Vector pACYC184, que contiene el operón <i>ompB</i> de <i>S. typhi</i> ; Cm ^r .	Este estudio.
pIM262	Vector pBR322, que contiene el operón <i>ompB</i> de <i>S. typhi</i> ; Amp ^r .	Este estudio.
pAT224	Vector pBR322, que contiene el operón <i>ompB</i> de <i>E. coli</i> ; Amp ^r .	Mizuno et al., 1982.
pIM40	Vector pACYC184, que contiene el operón <i>ompB</i> de <i>E. coli</i> ; Cm ^r .	Este estudio.
pVF27	Vector pBR322, que contiene el gen <i>ompC</i> de <i>S. typhi</i> ; Amp ^r .	Puente et al., 1987.
pMY111	Vector pBR322, que contiene el gen <i>ompC</i> de <i>E. coli</i> ; Amp ^r .	Mizuno et al., 1983.
pBSL46	Vector usado para obtener el casete de resistencia a Km; Amp ^r , Km ^r	Mikhail et al., 1995.
pMC1871	Vector pBR322, que contiene el gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> carente de promotor; Tc ^r .	Shapira et al., 1983.
pSCZ10	Vector pMC1871, que contiene la fusión <i>ompC-lacZ</i> de <i>S. typhi</i> .	Este estudio.
pECZ20	Vector pMC1871, que contiene la fusión <i>ompC-lacZ</i> de <i>E. coli</i> .	Este estudio.

pBKm	Vector pUC19, que contiene el "casete de recombinación" para <i>ompB</i> .	Este estudio.
pKNG101	Vector suicida; <i>oriR6K</i> , <i>Stp'</i> , <i>mobRK2</i> , <i>sacB</i> .	Kaniga et al., 1991.
pKB8	Vector pKNG101, que contiene el "casete de recombinación" para <i>ompB</i> .	Este estudio.
Oligos		
SCSm1	5'd(TACTTGGAGC CCGGG TG GACTACGCGATCA)3'	Este estudio.
SCSc1	5'd(TAC CAGGAGGGAC AGTA CTTTAACTTTCAT)3'	Este estudio.
ECSm2	5'd(AAG TCCGGG ACGATA GTCATGCCCCGCGC)3'	Este estudio.
ECSc2	5'd(GACCAGGAGGGAC AGTA CTTTAACTTTCAT)3'	Este estudio.
Ra	5'd(CGTCAGG ATCC ACCAGAATC)3'	Este estudio.
Zb	5'd(CAGGG GATCC CAAAGAGGC)3'	Este estudio.

Condiciones de crecimiento.

Los cultivos se realizaron en medio Luria-Bertani (LB) a 37°C, toda la noche. Cuando se requirió se agregaron antibióticos a las concentraciones siguientes: ampicilina (Amp) 250 µg/ml; estreptomina (Stp) 100 µg/ml; tetraciclina (Tc) 20 µg/ml; kanamicina (Km) 20 µg/ml; cloranfenicol (Cm) 40 µg/ml; y rifampicina (Rif) 150 µg/ml. En los estudios de osmorregulación se ensayaron varios medios de crecimiento; para condiciones de baja osmolaridad se utilizó LB sin NaCl (por litro, 10 g de extracto de levadura y 10 g de triptona, pH 7.5), medio nutritivo (NB; el cual contiene por litro, 3 g de extracto de res y 5 g de peptona; Difco), y medio A (MN; el cual contiene por litro, 7 g de medio NB, 1 g de extracto de levadura, 2 g de glicerol, 3.7 g de K₂HPO₄ y 1.3 g de KH₂PO₄). Para condiciones de alta osmolaridad, a estos medios se les agregó 20% de sacarosa ó 0.3 M de NaCl (Hirochi et al., 1979; Kawaji et al., 1979; Slauch y Silhavy, 1989; Tokishita et al., 1991; Pickard et al., 1994; Contreras et al., 1995).

Construcción de las fusiones *ompC-lacZ* de *S. typhi* y *E. coli*.

Un fragmento de 1450 pares de bases (pb), que contiene la región reguladora 5' y el primer codón de *ompC* de *S. typhi* se obtuvo por PCR, utilizando como templado el plásmido pVF27 (Puente et al., 1987). La reacción de PCR se realizó con los oligonucleótidos sintéticos SCSm1 y SCSc1, los cuales generaron los sitios *SmaI* y *Scal*, respectivamente. Este fragmento de DNA se clonó en el único sitio de *SmaI* del plásmido pMC1871, generando el plásmido pSCZ10 (*StompC-lacZ*) (Tabla I). Para la construcción de la fusión *ompC-lacZ* de *E. coli* (*EcompC-lacZ*) la estrategia que se siguió fue la misma; un fragmento de 1150 pb, que contiene la región reguladora 5' y el primer codón de *ompC* de *E. coli*, se obtuvo por PCR del plásmido pMY111 (Mizuno et al., 1983), usando los oligos ECsm2 y ECsc2, los cuales generaron los sitios *SmaI* y *Scal*, respectivamente. El fragmento de DNA así obtenido se clonó en el sitio de *SmaI* de pMC181, generandose el plásmido pECZ20 (fusión *EcompC-lacZ*).

Ensayo de β-galactosidasa en microplaca.

La actividad de β-galactosidasa se midió por el método descrito por Miller (Miller, 1972), adaptado para ensayo en microplaca. Brevemente, 110 ml de medio A, sin o con NaCl 0.3 M (baja y alta osmolaridad, respectivamente), se inoculó con 440 µl de una

suspensión de células bacterianas, la cual se preparó a partir de una pastilla de bacterias del cultivo de toda la noche, resuspendida en PBS ("phosphate-buffered saline") a una densidad óptica a 600 nm (D_{600nm}) de 1.8. Los cultivos se incubaron a 37°C en un baño con agitación a 200 r.p.m. Para preparar el extracto crudo, las muestras de células se colectaron cada hora por centrifugación (16000 xg); cosechando 40 ml en la primera hora, 20 ml a la hora 2, 10 ml la hora 3, 5 ml la hora 4 y 1 ml de la hora 5 a la 12; para obtener suficiente masa celular. Las muestras se lavaron dos veces con solución Z 1X (0.06 M de Na_2HPO_4 , 0.04 M de NaH_2PO_4 , 0.01 M KCl, 0.001 M de $MgSO_4$, pH 7); se centrifugaron y la pastilla de células se resuspendió en 1 ml de la misma solución.

Para la cuantificación de β -galactosidasa, en una placa de ELISA se colocó por duplicado 20 μ l de cada extracto, enseguida se agregó a cada pozo 100 μ l de la mezcla desnaturizante (0.22 mg/ml de lisozima, 0.22% de tritón X-100, 1.6X de solución Z y 0.016 M de β -mercaptoetanol), y la reacción se incubó a 37°C con agitación, por 10 min. Después se adicionó 100 μ l de la solución substrato (1 mg/ml de ONPG, o-nitrofenil- β -D-galactosido) para iniciar la reacción. La velocidad de cada una de las reacciones se obtuvo por el registro de cambios en la absorbancia a 415 nm (A_{415nm}), cada 5 segundos durante 3 minutos, en un lector de microplacas (Scanning Autoreader and Microplate Workstation, Ceres 900 C), con el programa KC3™ seleccionado para determinación de cinéticas. Las actividades se obtuvieron por interpolación en una curva estándar, compuesta de concentraciones de 0 a 13200 unidades Miller de la enzima β -galactosidasa purificada (Boehringer Mannheim); considerando que una unidad de la enzima purificada es equivalente a aproximadamente 400 unidades Miller; lo cual determinamos por el método reportado por Miller (Miller, 1972).

Determinación de concentración de proteínas en microplaca.

La concentración de proteína de los extractos celulares se determinó por el método de Lowry, adaptado para realizarlo en microplacas. Se utilizaron placas de ELISA de 96 pozos, donde se adicionó por duplicado 20 μ l de cada muestra por pozo; enseguida se agregaron 100 μ l de la mezcla de reacción, la cual contiene 98 μ l de una solución de carbonato-hidróxido de sodio (3.4% de Na_2CO_3 y 0.17 N de NaOH) y 2 μ l de una solución

de sulfato de cobre-tartrato (0.85% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 1.7% de tartrato de sodio y potasio); la reacción se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente se adicionó 100 μl de la solución Folin-Ciocalteu 16.9% (v/v) y se incubó nuevamente a temperatura ambiente por 15 minutos más. La concentración de proteínas se obtuvo de la lectura de $A_{620\text{nm}}$ con un lector de microplacas ("Scanning Autoreader and Microplate Workstation, Ceres 900C"), con el programa KC3™, seleccionado para la medición en un punto final. Las concentraciones se obtuvieron por interpolación en una curva estándar, compuesta de concentraciones de 0 a 0.6 mg/ml de albumina de suero de bovino. Estos valores se usaron para el cálculo de la actividad específica de β -galactosidasa. Cada valor, representa el promedio de la actividad obtenida de por lo menos dos experimentos independientes, realizados por duplicado.

Preparación de PME.

Las PME se prepararon como se describió previamente (Lobos y Mora de 1991). Los cultivos se realizaron básicamente como en el ensayo de β -galactosidasa, excepto que 50 ml del medio de cultivo apropiado fueron inoculados con 200 μl de la suspensión de células bacterianas. Para la cinética de expresión de PME, se tomaron muestras de los cultivos cada hora, durante 12 horas. En los estudios de osmorregulación, las muestras se tomaron en la quinta hora, donde se observó el mejor perfil de osmorregulación (este estudio, Fig. 5).

Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Dos diferentes sistemas de geles se usaron para obtener la mejor separación de las PME más abundantes. Las preparaciones de PME de *S. typhi* se sometieron a electroforesis en geles con 11% acrilamida, 0.12% bisacrilamida y 0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate), a 30 mA, por 6 horas. Las preparaciones de PME de *E. coli* se sometieron a electroforesis en geles con 11% acrilamida, 0.3% bis-acrilamida, 8 M urea, y 0.1% SDS a 20 mA, por 8 horas;. En ambos casos se utilizaron los sistemas discontinuos de Laemmli y se aplicó de 20 a 30 μg de proteína, determinada por el método de Lowry, por carril (Laemmli, 1970). Los geles se teñieron con azul brillante de Coomassie.

Bajo las condiciones señaladas, OmpC de *S. typhi* migra adelante de OmpF, una característica que ha sido previamente asociada a la concentración de persulfato de

amonio o a un exceso de sales adicionadas al gel (Lobos y Mora, 1991). Las posiciones de OmpC y OmpF en los perfiles de PME, que se muestran en el margen izquierdo de cada gel, se determinaron por comparación de los perfiles de preparaciones de PME de cepas mutantes: para *S. typhi* fueron las cepas STYC171 ($\Delta ompC$) y STYF302 ($\Delta ompF$) y para *E. coli* fueron las cepas MH760 (*ompR472*; OmpC⁻/OmpF⁺), MH1461 (*envZ11*; OmpC⁺/OmpF⁻)

Construcción del plásmido “suicida” pKB8.

Para la construcción del “casete de recombinación” (formado por el gen que confiere Km^r flanqueado por las regiones reguladoras, corriente arriba y corriente abajo, del locus *ompB*), se eliminó al operón *ompB* del plásmido pIM26 mediante una reacción de PCR inverso con los oligos Ra y Zb, dejando al vector pUC19 con dos regiones adyacentes, la región **a** (que contiene 37 pb del gen estructural *ompR* y 350 pb de la región reguladora corriente arriba) y la región **b** (que contiene 24 pb del gen estructural *envZ* y cerca de 2000 pb de la región corriente abajo). Con los oligos Ra y Za se introdujeron sitios de restricción de *Bam*HI, los cuales se utilizaron para clonar un fragmento de *Bam*HI que contiene el gen Km^r, obtenido del plásmido pBSL46 (Mikhail et al., 1995); generándose así el plásmido pBKm. El “casete de recombinación” completo (de aproximadamente 3.8 kb) se obtuvo al digerir el pBKm con *Sac*I, y se clonó en el vector “suicida” pKNG101 (Fig. 3).

El vector “suicida” pKNG101 (Kaniga et al., 1991) presenta las siguientes características: el origen de replicación *oriR6K*, el cual requiere para su funcionamiento una proteína llamada π (que no está presente en *S. typhi*); un gen que le confiere Stp^r; el origen de transferencia *mob RK2*; el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*; y una región de múltiples sitios de clonación. El fragmento de *Sac*I que contiene el “casete de recombinación” se purificó de gel y se trató con la enzima Klenow para generar extremos rasos; este fragmento se clonó en el sitio *Sma*I del pKNG101, generando el plásmido pKB8 (Fig. 3).

Construcción de plásmidos que llevan los operones *ompB* de *S. typhi* y *E. coli*.

La construcción de los plásmidos que llevan el operón *ompB* (Tabla I) se describe a continuación. Los plásmidos pIM25 y pIM26, construídos previamente, son derivados del vector pUC19 (plásmido de alto número de copias) que contiene el operón *ompB* de *S.*

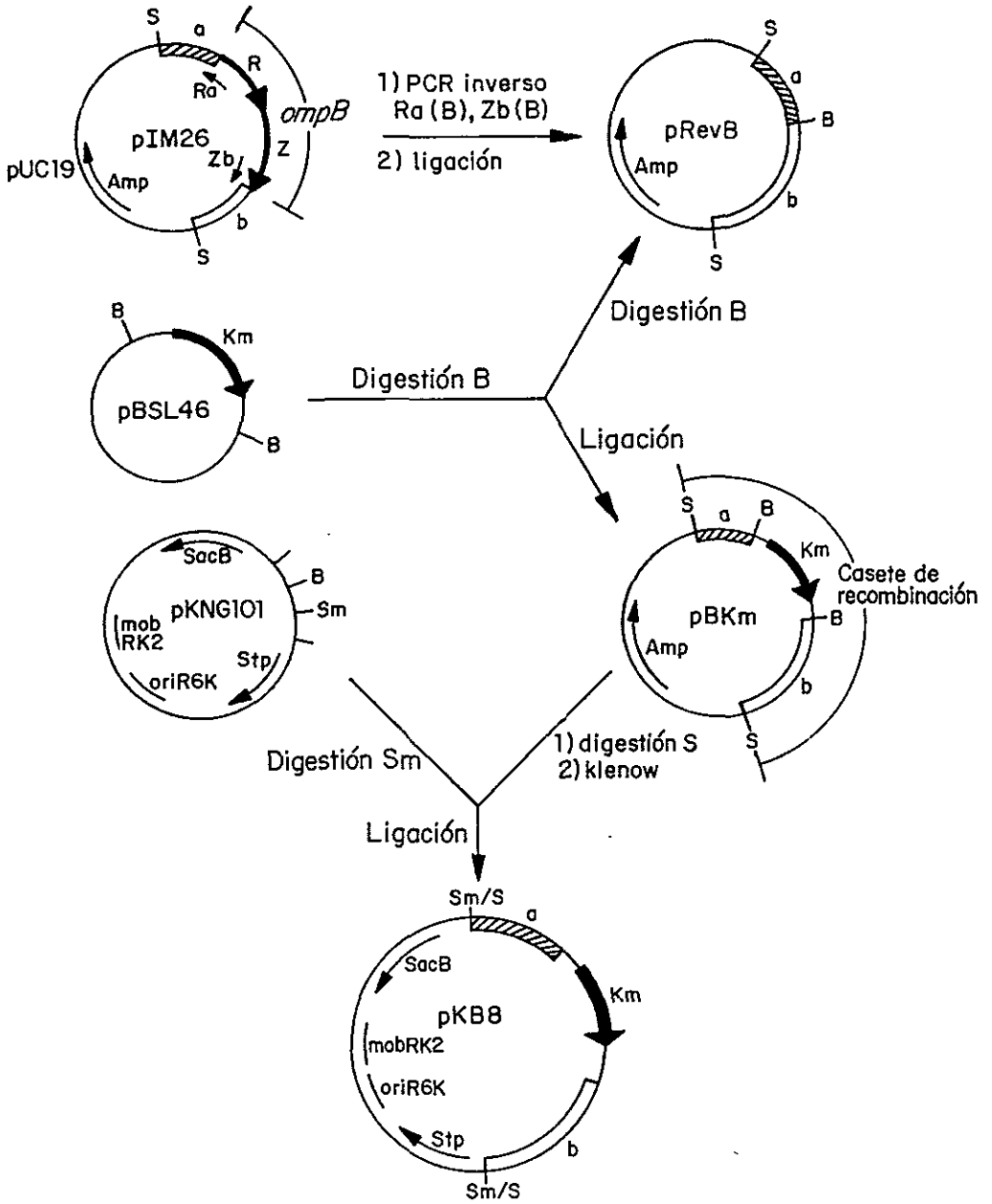


Fig. 3 Construcción del plásmido "suicida" pKB8. El plásmido pRevB, el cual contiene las regiones corriente arriba (**a**) y corriente abajo (**b**) del operón *ompB*, se generó por PCR inverso, con los oligos **Ra** y **Zb**, los cuales introducen un sitio de *Bam*HI (**B**). Un fragmento de B del plásmido pBSL46 que contiene un gen que confiere resistencia a Km, se clonó en el sitio de B de pRevB, generando el plásmido pBKm. De este último se purifica el fragmento de *Sac*I (**S**) que contiene el "casete de recombinación" y se trató con la enzima Klenow para generar extremos rasos. Este fragmento se clonó en el sitio *Sma*I (**Sm**) del vector suicida pKNG101, generando el plásmido pKB8. **R**:gen *ompR*; **Z**:gen *envZ*.

typhi en ambas orientaciones, respectivamente (Martínez-Flores et al., 1995). Estos plásmidos fueron utilizados para obtener fragmentos de DNA que contienen el operón *ompB* de *S. typhi*. Para la construcción de los plásmidos pIM262 y pIM263, el fragmento de *SacI* que contiene al operón *ompB* del plásmido pIM25, se subclonó en ambas orientaciones en el sitio *SacI* que se generó previamente en el plásmido pBR322, entre los sitios *EcoRI* y *NruI* (un vector de mediano número de copias). Los plásmidos pIM260 y pIM261 se generaron al subclonar el fragmento *EcoRV/BamHI* de pIM26 que contiene el operón *ompB*, en el vector pACYC184 (de bajo número de copias), digerido con *EcoRV-BamHI* o *NruI-BamHI*, respectivamente.

El plásmido pAT224, previamente construido, es un derivado del vector pBR322 que lleva al operón *ompB* de *E. coli* (Mizuno et al., 1982). Este plásmido fue utilizado para la construcción del pIM40, el cual se generó al subclonar el fragmento *BamHI/SacI* de pAT224, que contiene el operón *ompB* de *E. coli*, en el vector pACYC184 digerido con las mismas enzimas.

Hibridación tipo "Southern".

Los experimentos de hibridación se realizaron como se describió previamente (Martínez-Flores et al., 1995). La sonda de *ompB* se obtuvo por digestión del plásmido pIM26 con *SacI*, y la sonda del gen *Km^r* se obtuvo por digestión con *BamHI* del pBSL46 (ver Tabla I). Las sondas de DNA se marcaron con [α -³²P]dCTP (Amersham), usando el estuche de "Multiprime DNA labelling system" (Amersham), según las instrucciones del fabricante.

Técnicas de biología molecular.

Diferentes técnicas de biología molecular se utilizaron siguiendo los protocolos establecidos (Sambrook et al 1989). Las enzimas de modificación y restricción de DNA se obtuvieron de las compañías Boehringer Mannheim (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania) o Gibco BRL (Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD., EUA), y se usaron de acuerdo a las instrucciones de los proveedores. Los oligonucleótidos que se utilizaron para los experimentos de PCR se sintetizaron en la compañía Bio-Synthesis (Bio-Synthesis, Lewinsville, TX, EUA) o en la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología/UNAM. Las reacciones de PCR se hicieron con la enzima AmpliTaq (Perkin Elmer Corp., Branchburg, NJ, EUA), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Ensayos de invasión.

Los ensayos de invasión se realizaron como se describió previamente (Contreras et al., 1995). Las células HEP-2 (ATCC CCL23), derivadas de carcinoma de laringe humano, fue la línea celular que se empleó. Los ensayos de invasión se realizaron en placas para cultivo de tejidos de 96 pozos, para lo cual se formó una monocapa con 5×10^4 células por pozo, cultivadas a confluencia, incubando toda la noche a 37°C , en una atmósfera conteniendo 5% de CO_2 . Para la infección de la monocapa de células Hep-2, cultivos bacterianos crecidos en 5 ml de LB, en condiciones de anaerobiosis, hasta una D. O._{600nm} de 0.2, se centrifugaron y se resuspendieron en DMEM ("Dulbecco's modified Eagle's Medium"); con esta suspensión se inoculó cada pozo a una razón de 10 bacterias/célula.

Para los ensayos de invasión las placas se incubaron a 37°C por 1 hora en una atmósfera conteniendo 5% de CO_2 . Después de este período, la monocapa se lava varias veces con buffer PBS para eliminar las bacterias no adheridas. Posteriormente se agregan 100 μl de DMEM con 250 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, un antibiótico que no penetra a las células epiteliales (para eliminar bacterias extracelulares), y se deja incubando dos horas mas. El antibiótico se removió haciendo varios lavados con PBS, la monocapa fue lisada y determinamos el número de bacterias dentro; mediante plateo de diluciones en agar LB. El porcentaje de invasión fué calculado como: (el número total de bacterias sobrevivientes dividido entre el número total de bacterias inoculadas) X 100. Cada ensayo fue repetido por duplicado.

RESULTADOS

En nuestro laboratorio estamos interesados en el estudio de la función y regulación de las porinas de *S. typhi*; en este trabajo nos enfocamos particularmente al estudio de la regulación de OmpC, ya que en trabajos previos se determinó que su expresión (en altos niveles tanto en baja como en alta osmolaridad) difiere de la de OmpC de *E. coli* (cuya expresión es inducida en medios de alta osmolaridad y reprimida en baja) (Puente et al., 1991; Forst e Inouye, 1988). Sin embargo, también se realizaron algunas observaciones del patrón de expresión de las porinas en general.

El estudio de la expresión de las porinas se realizó mediante el análisis de los perfiles electroforéticos de PME de diferentes cepas y mediante la determinación de la actividad de β -galactosidasa del gen reportero *lacZ*, fusionado a las regiones reguladoras de los genes *ompC* de *S. typhi* y *ompC* de *E. coli* (*StompC-lacZ* y *EcompC-lacZ*, respectivamente; ver Materiales y Métodos).

Selección de medios de crecimiento.

Varios medios de crecimiento se probaron con el fin de elegir el que nos permitiera visualizar la mejor osmorregulación de las porinas. Los medios de cultivo ensayados fueron los comúnmente utilizados en experimentos de osmorregulación de porinas: Luria-Bertani (LB), medio nutritivo (NB), y medio A (MN) (ver Materiales y Métodos). Así mismo, para el aumento en la osmolaridad de los medios, se probó la utilización de sacarosa al 20% ó NaCl 0.3 M (Hirochi et al., 1979; Hall and Silhavy, 1981 a y b; Slauch y Silhavy, 1989; Tokishita et al., 1991; Pickard et al., 1994; Contreras et al., 1995).

Como control para verificar la osmorregulación en los diferentes medios de cultivo, se comparó la expresión en baja y alta osmolaridad de OmpC de *E. coli*; mediante la medición de la expresión de la fusión *EcompC-lacZ*. La cepa silvestre *E. coli* MC4100 transformada con el plásmido pECZ20 (el cual contiene la fusión *EcompC-lacZ*) se creció en los medios LB, NB y MN sin (baja osmolaridad) y con (alta osmolaridad) sacarosa al 20% ó NaCl 0.3M. La actividad de β -galactosidasa se determinó de muestras colectadas a lo largo de la curva de crecimiento. En la figura 4A se observan los datos representativos de las muestras obtenidas en la hora 5.

En el medio MN se obtuvo el mejor perfil de osmorregulación de *ompC*, a lo largo

de la curva de crecimiento (Fig. 4A y datos no mostrados). Para el incremento en la osmolaridad en el medio, aunque los niveles de actividad en MN con sacarosa o con NaCl fueron similares (Fig. 4A), hubo diferencias en el crecimiento; así en el medio MN con sacarosa el crecimiento se retardó con respecto a los medios MN y MN con NaCl (Fig. 4B). Por tanto, para estudiar la regulación de las porinas en respuesta a la osmolaridad, se seleccionó el medio MN (baja osmolaridad) y MN con NaCl 0.3M (alta osmolaridad). Los medios seleccionados para los ensayos realizados en este trabajo serán, además, utilizados para el desarrollo de otros proyectos de este laboratorio, específicamente los involucrados en la regulación de porinas de *S. typhi*.

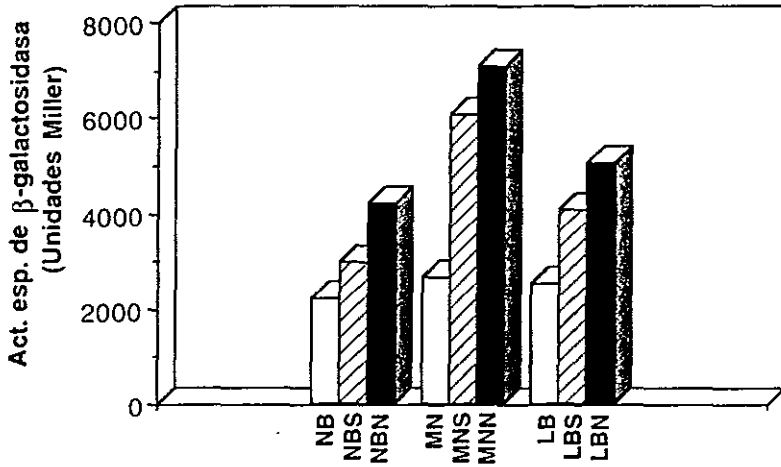
Efecto de la fase de crecimiento en el patrón de expresión de las porinas en baja y alta osmolaridad.

La expresión de las porinas en respuesta a la osmolaridad ha sido descrita anteriormente (Puente et al 1991); sin embargo, no se ha determinado si dichos patrones de expresión varían a lo largo de la curva de crecimiento. Para evaluar esto, se midió la actividad de β -galactosidasa de las fusiones *StompC-lacZ* y *EcompC-lacZ*, de muestras de cultivos de *S. typhi* IMSS-1/pSCZ10 (plásmido que contiene la fusión *StompC-lacZ*) y *E. coli* MC4100/pECZ20 (plásmido que contiene la fusión *EcompC-lacZ*), crecidos en medios de baja y alta osmolaridad, colectadas cada hora a lo largo de la curva de crecimiento, (Fig. 5A). El análisis de las actividades mostró que la expresión de *ompC* de *S. typhi* es similar en baja y alta osmolaridad, a lo largo de la curva de crecimiento; mientras que la osmorregulación de *ompC* de *E. coli* se observa claramente en fase exponencial y es menos evidente al llegar a la fase estacionaria (Fig. 5A).

El mismo efecto de la fase de crecimiento se observó también al comparar el perfil electroforético de PME de las cepas silvestres, *S. typhi* IMSS-1 y *E. coli* MC4100, crecidas en medios de baja y alta osmolaridad (Fig. 5B). En *S. typhi*, la expresión independiente de la osmolaridad de *OmpC*, así como la osmorregulación de *OmpF* se mantuvo durante las diferentes fases del crecimiento (Fig. 5B, panel de arriba). Sin embargo, en *E. coli*, la osmorregulación de *OmpC* y *OmpF*, claramente observada en fase exponencial, fue menos evidente en la fase estacionaria (Fig. 5B, panel de abajo).

A

Expresión de la fusión *EcompC-lacZ* en medios con diferentes osmolaridades

**B**

Crecimiento de MC4100 / *EcompC-lacZ* en medio MN de baja y alta osmolaridad

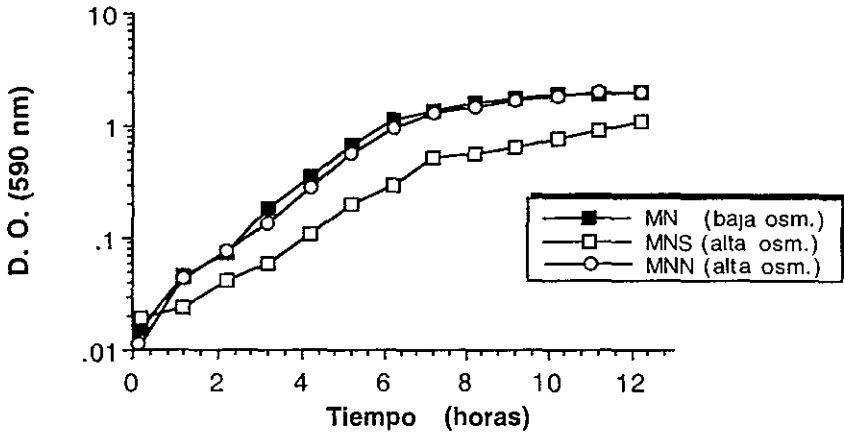


Fig. 4 Expresión de la fusión *ompC-lacZ* de *E. coli* en medios con diferentes osmolaridades, para la selección de medios de crecimiento. (A) La cepa *E. coli* MC4100 llevando el plásmido pECZ20 (el cual contiene la fusión *EcompC-lacZ*), se creció en los medios LB, NB y MN, sin y con sacarosa al 20% (LBS, NBS y MNS) ó NaCl 0.3M (LBN, NBN y MNN), baja osmolaridad y alta osmolaridad, respectivamente. La actividad de β -galactosidasa se determinó de muestras colectadas a lo largo de la curva de crecimiento. Los datos muestran la actividad obtenida después de 5 horas de crecimiento, un punto donde la osmorregulación es más evidente, como se muestra en la figura 5. (B) Curva de crecimiento de la cepa *E. coli* MC4100 llevando el plásmido pECZ20, en el medio MN (baja osmolaridad) y con 20% de sacarosa ó 0.3M de NaCl (alta osmolaridad). La D. O_{590 nm} se midió de muestras colectadas a lo largo de la curva de crecimiento.

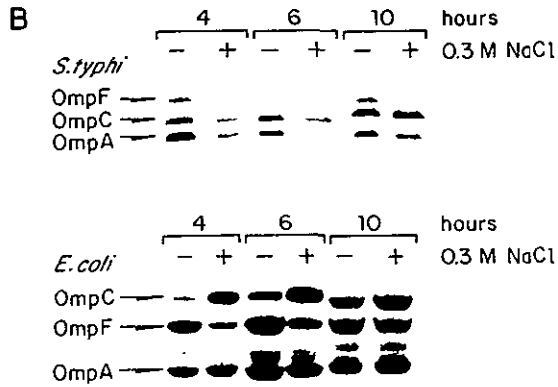
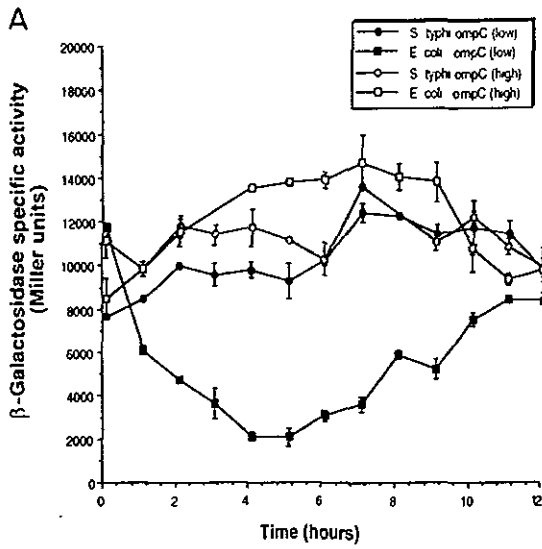


Fig.5 Cinética de expresión de *ompC* y *ompF* de *S. typhi* y *E. coli*, a lo largo de la curva de crecimiento. **(A)** Las cepas *S. typhi* IMSS-1 conteniendo el plásmido pSCZ10 (fusión *ompC-lacZ* de *S. typhi*, círculos) y *E. coli* MC4100 conteniendo el plásmido pECZ20 (fusión *ompC-lacZ* de *E. coli*, cuadros), fueron crecidas en medio MN con (símbolos blancos) o sin (símbolos negros) 0.3M de NaCl, alta y baja osmolaridad, respectivamente. La actividad de β -galactosidasa se determinó de muestras colectadas cada hora de cultivos duplicados. Los datos representan el promedio de tres diferentes experimentos. **(B)** *S. typhi* IMSS-1 y *E. coli* MC4100 fueron crecidas a 37⁰C en medio MN con (+) o sin (-) 0.3 M de NaCl (alta y baja osmolaridad, respectivamente); Las PME fueron purificadas de muestras tomadas cada hora y sujetas a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) para *S. typhi*, o a urea-SDS-PAGE para *E. coli*. Cepas a las cuales se les eliminó *ompC* u *ompF* fueron usadas para determinar la posición de cada porina, como se describió en Materiales y Métodos, y como se muestra en la Fig. 9. En este panel se observan muestras de PME de las horas 6, 8 y 10.

La diferencia en la expresión de OmpC de *S. typhi* y OmpC de *E. coli*, en respuesta a la osmolaridad, es determinada por el fondo genético de la cepa.

Al alinear las regiones reguladoras corriente arriba de los genes *ompC* de *S. typhi* y de *E. coli*, se encontró que presentan una alta identidad (81.7%) (Puente et al., 1989). Para establecer si las diferencias en la región reguladora del gene *ompC* de *S. typhi* están involucradas en que éste se exprese en altos niveles, independientemente de la osmolaridad del medio, los plásmidos pSCZ10 (*StompC-lacZ*) y pECZ20 (*EcompC-lacZ*) se introdujeron tanto en *S. typhi* IMSS-1 como en *E. coli* MC4100. La actividad de β -galactosidasa se determinó de muestras colectadas a lo largo de la curva de crecimiento, en medios de baja y alta osmolaridad. En forma interesante, la expresión de la fusión *StompC-lacZ* se reguló por osmolaridad en *E. coli*; mientras que altos niveles de expresión independiente de la osmolaridad se detectaron para la fusión *EcompC-lacZ* expresada en *S. typhi* (Fig. 6).

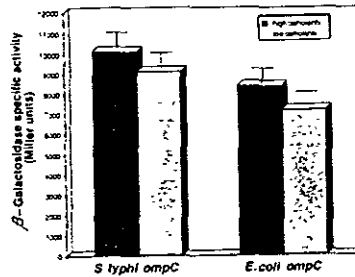
Estos resultados indican que las diferencias observadas entre las regiones reguladoras de los genes *ompC*, no especifican la osmorregulación en *E. coli*, ni la expresión independiente de la osmolaridad en *S. typhi*. Así, la diferente expresión de OmpC en *S. typhi* y *E. coli*, en respuesta a la osmolaridad del medio, está determinada por el fondo genético de cada bacteria.

Papel del operón *ompB* en la expresión de OmpC en *S. typhi* y *E. coli*.

En un estudio previo, nosotros identificamos el operón *ompB* de *S. typhi*, el cual codifica para las proteínas reguladoras de porinas, OmpR y EnvZ. El alineamiento de las secuencias nucleotídicas del locus *ompB* de *S. typhi* y *E. coli* mostró un 87% de homología (Martínez-Flores et al., 1995). Sin embargo, ya que en *E. coli* se ha determinado que mutaciones puntuales en el operón *ompB* alteran la osmorregulación de las porinas, en este trabajo evaluamos si las diferencias en la expresión de OmpC de *S. typhi* y *E. coli* en respuesta a la osmolaridad, se debe a los cambios observados en los operones *ompB*. La estrategia que se siguió fue construir una cepa mutante de *S. typhi* en este locus, con el fin de estudiar la expresión de OmpC al ser complementada con el operón *ompB* homólogo (de *S. typhi*) o heterólogo (de *E. coli*).

La construcción de la cepa mutante se realizó mediante el reemplazamiento, por recombinación homóloga, del operón *ompB* por un gen que confiere resistencia a

S. typhi



E. coli

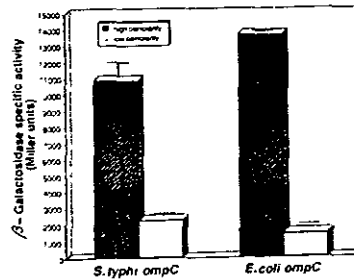


Fig. 6 Expresión de las fusiones *ompC-lacZ* de *S. typhi* o *E. coli* en un fondo genético heterólogo. Las cepas *S. typhi* IMSS-1 (panel superior) o *E. coli* MC4100 (panel inferior), llevando las fusiones *ompC-lacZ* de *S. typhi* o de *E. coli*, fueron crecidas en medio MN, con (alta osmolaridad) o sin (baja osmolaridad) 0.3 M de NaCl. La actividad de β -galactosidasa se determinó de muestras colectadas cada hora de cultivos duplicados. Los datos muestran la actividad obtenida después de 5 horas de crecimiento (donde la osmorregulación es más evidente, ver figura 5), y representan el promedio de tres diferentes experimentos.

kanamicina (Km^r) (Fig. 7). Para propiciar el intercambio genético en el cromosoma de la bacteria, se construyó un "casete de recombinación", formado por el gen que confiere Km^r, flanqueado por las regiones reguladoras corriente arriba (a) y corriente abajo (b) del locus *ompB* el cual, para ser introducido en la cepa, se clonó en el vector "suicida" pKNG101 (Fig. 7).

La cepa *S. typhi* IMSS-1 se transformó por electroporación con el plásmido pKB8 (el vector "suicida" pKNG101 que contiene el "casete de recombinación"), y las transformantes obtenidas se seleccionaron en un medio con Km; posteriormente se realizó la identificación del primer evento de recombinación, en un medio con Amp, seleccionándose colonias Km^r, Amp^r (clonas STY3, 8 y 12). Para la obtención de un segundo evento de recombinación, las clonas seleccionadas se inocularon en medio LB con 10% de sacarosa y Km 30 µg/ml; ya que en el vector "suicida" se encuentra el gen *sacB*, el cual codifica para la proteína SacB, una enzima levansacarasa letal para bacterias gram-negativas crecidas en medios con sacarosa. Así, al crecer las colonias en presencia de este azúcar se pueden seleccionar las clonas que hayan perdido el vector, y por tanto efectuado el segundo evento de recombinación (Ried y Collmer, 1987). De este modo se seleccionó una clona, Km^r, Amp^s (clona STY81).

La ausencia del locus *ompB* se confirmó por hibridación tipo "Southern" (Fig. 8). El DNA cromosomal de *S. typhi* IMSS-1 (silvestre) y de las cepas recombinantes STY8 (primer evento de recombinación) y STY81 (segundo evento de recombinación) se digirió con *SacI* y se hibridó con una sonda que lleva el operón *ompB* de *S. typhi*, marcada radioactivamente (Fig. 8A). La señal de 4.2 kb corresponde a un fragmento que lleva el *ompB* silvestre (carril 1); en la cepa STY8 la señal de 4.2 kb se conservó y adicionalmente se observó una banda de 3.8kb, correspondiente al tamaño del fragmento que lleva el "casete de recombinación" (carril 2). En la cepa STY81 sólo se detectó la banda de 3.8 kb, indicando que el doble evento de recombinación se efectuó en el sitio correcto del cromosoma (carril 3). Para confirmar que el fragmento de 3.8 kb corresponde al casete de recombinación, el mismo filtro se lavó y rehibridó con un fragmento que contiene el gen que confiere Km^r marcado radioactivamente (Fig. 8B). Únicamente los fragmentos de 3.8 kb de STY8 (carril 2) y STY81 (carril 3) hibridaron con esta sonda (Fig. 8B).

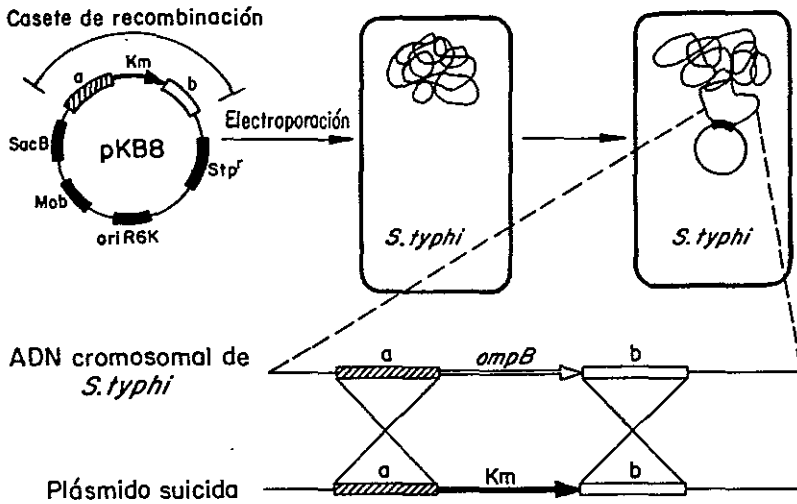


Fig. 7 Estrategia para la eliminación del operón *ompB* en el cromosoma de *S. typhi*. Reemplazamiento en el cromosoma del operón *ompB* por un gen que confiere Km^r; generado por recombinación homóloga entre las regiones a y b del plásmido suicida pKB8 (introducido por electroporación) y el cromosoma. a: región corriente arriba del locus *ompB*; b: región corriente abajo del locus *ompB*.

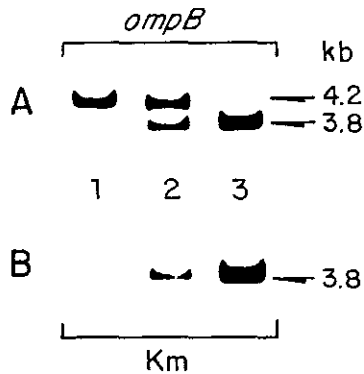


Fig. 8 Caracterización de la cepa $\Delta ompB$ de *S. typhi* por experimentos de hibridación tipo "Southern". El DNA cromosomal de las cepas de *S. typhi*, IMSS-1 (silvestre, carril 1); STY8 (primer evento de recombinación, carril 2); y STY81 (segundo evento de recombinación, carril 3), digerido con *SacI* e hibridado con una sonda que contiene el gen *ompB* de *S. typhi* (A) o el gen que confiere Km^r (B). El tamaño de las bandas de hibridación se muestra a la derecha.

Para determinar el efecto de la pérdida del locus *ompB*, se analizó el perfil de expresión de PME de la cepa STY81; como se esperaba, el fenotipo conferido fue OmpC⁻/OmpF⁻ (ver Fig. 9, último carril). Esto confirmó que el sistema OmpR/EnvZ es necesario para la expresión de OmpC y OmpF en *S. typhi* de una forma similar a lo reportado en *E. coli* (Garret et al., 1985; Puente et al., 1991).

Colateralmente, utilizando la misma estrategia, se generaron otras dos cepas mutantes derivadas de *Styphi* IMSS-1; la STYC171 ($\Delta ompC$) y la STYF302 ($\Delta ompF$) (Apendices I y II). Estas nos permitieron determinar las posiciones de OmpC y OmpF en los perfiles de PME, que se muestran en el margen izquierdo de cada gel.

Para establecer si las variaciones existentes entre las secuencias de los operones *ompB* de *S. typhi* y *E. coli*, determinan que OmpC de *S. typhi* se exprese de forma diferente que OmpC de *E. coli*, se analizó el perfil de PME de cepas $\Delta ompB$ complementadas con cada uno de los operones. Las cepas STY81 (*S. typhi* $\Delta ompB$) y SG480 Δ 900 (*E. coli* $\Delta ompB$) se transformaron con los plásmidos pIM262 (*ompB* de *S. typhi*) y pAT224 (*ompB* de *E. coli*) (ver Tabla I). El perfil electroforético de preparaciones de PME obtenido de estas cepas (crecidas en medios de baja y alta osmolaridad) se muestra en la Fig. 9. En el panel A, se observa que en la cepa STY81 ($\Delta ompB$ de *S. typhi*) complementada con el operón *ompB* de *S. typhi*, la expresión de porinas (en baja y alta osmolaridad) es similar a la de la cepa silvestre. De forma interesante, cuando se complementó con *ompB* de *E. coli*, OmpC se osmorregula de forma similar a lo reportado para *E. coli*, es decir, se reprime en baja osmolaridad.

En el panel B (Fig. 9) se muestra el experimento recíproco con la cepa *E. coli* SG480 Δ 900 ($\Delta ompB$). Cuando esta cepa se complementó con *ompB* de *E. coli* se recuperó el patrón de PME (en alta y baja osmolaridad) similar al de la cepa silvestre. Sorprendentemente, cuando la complementación fue con *ompB* de *S. typhi*, OmpC se osmorreguló (su expresión se reprimió en baja osmolaridad y se indujo en alta osmolaridad), como en la *E. coli* silvestre.

Un análisis densitométrico cuantitativo de las bandas en los geles de la Fig. 9 (paneles A y B) confirmó las observaciones descritas arriba (datos no mostrados).

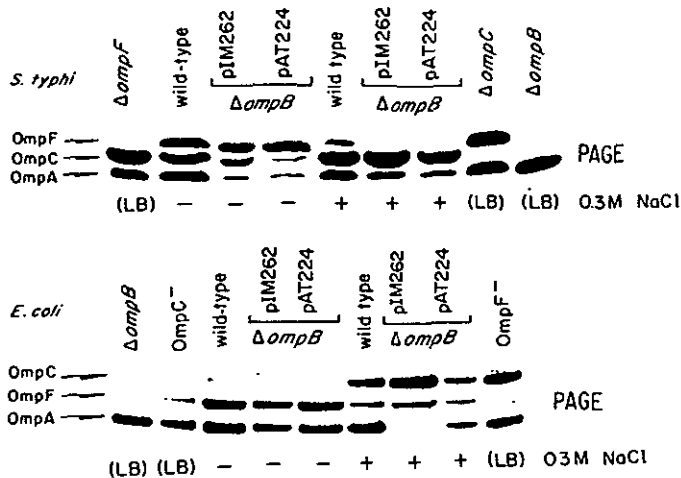


Fig. 9 Perfil electroforético de PME de cepas $\Delta ompB$ de *S. typhi* o *E. coli*, complementadas con los operones *ompB* de *S. typhi* o de *E. coli*. Las cepas fueron crecidas en medio MN, con (+) o sin (-) 0.3 M de NaCl (alta y baja osmolaridad, respectivamente) o en LB. Las PME fueron purificadas de muestras de cultivos obtenidas después de 5 horas de crecimiento a 37°C, y fueron sujetas a SDS-PAGE (muestras de *S. typhi*), o a urea-SDS-PAGE (muestras de *E. coli*), como se describió en Materiales y Métodos. La posición de las PME de *S. typhi* o *E. coli* se muestran en el margen izquierdo de cada gel y corresponde a las siguientes cepas: (A) cepas de *S. typhi*: STYF302 ($\Delta ompF$); IMSS-1 (silvestre); STY81 ($\Delta ompB$)/pIM262 (pBR322 conteniendo *ompB* de *S. typhi*); STY81 ($\Delta ompB$)/pAT224 (pBR322 conteniendo *ompB* de *E. coli*); STYC171 ($\Delta ompC$); y STY81 ($\Delta ompB$). (B) cepas de *E. coli*: SG480 Δ 900 ($\Delta ompB$); MH760 (*ompR472*; OmpC/OmpF⁺); MC4100 (silvestre); SG480 Δ 900 ($\Delta ompB$) / pIM262; SG480 Δ 900 ($\Delta ompB$) / pAT224; MH1461 (*envZ11*; OmpC⁺/OmpF⁻).

Resultados similares se obtuvieron complementando con los operones *ompB* clonados en otros vectores con diferente número de copias (datos no mostrados).

Mediante el uso de las fusiones *ompC-lacZ* se corroboraron y cuantificaron nuestros resultados. Las cepas *S. typhi* $\Delta ompB$ que contenían el operón *ompB* de *S. typhi* (pIM261) o el operón *ompB* de *E. coli* (pIM40) se transformaron cada una con pSCZ10 (*StompC-lacZ*) o con pECZ20 (*EcompC-lacZ*) (Fig 10, paneles superiores). La actividad de β -galactosidasa se determinó para cada cepa, en medios de baja y alta osmolaridad, a lo largo de la curva de crecimiento. En *S. typhi* $\Delta ompB$ la expresión de *ompC* de *S. typhi* o de *ompC* de *E. coli* se reguló por osmolaridad cuando se complementó con *ompB* de *E. coli*; mientras que la expresión de ambas fusiones no se afectó por la osmolaridad cuando se complementó con *ompB* de *S. typhi* (Fig. 10, paneles superiores).

El experimento recíproco se realizó complementando la cepa *E. coli* $\Delta ompB$ con las mismas construcciones descritas arriba. El análisis de la actividad de β -galactosidasa mostró que la expresión de *ompC* de *S. typhi*, así como la de *ompC* de *E. coli*, se reguló por osmolaridad cuando se complementó tanto con el operón *ompB* de *E. coli* como con el *ompB* de *S. typhi* (Fig. 10, panel de abajo).

En resumen, nuestros resultados indican que el locus *ompB* de *S. typhi*, en combinación con otro factor (es) presente (s) en el fondo genético de *S. typhi*, determinan la particular expresión de *ompC* independiente de la osmolaridad del medio.

Efecto del operón *ompB* en la invasión de *S. typhi* a células epiteliales.

Considerando que el operón *ompB* está involucrado en la virulencia de bacterias como *S. typhimurium* y *Shigella flexneri* (Dorman et al., 1989; Bernardini et al., 1990; 1993), nosotros analizamos si este operón en *S. typhi* está involucrado en la invasión de la bacteria a células epiteliales en cultivo. Para lo cual, la generación de mutantes a las que se remueve un gen o u operón del cromosoma de una bacteria patógena, es de gran utilidad para el análisis específico del papel de dicho locus en su virulencia.

Durante una estancia de dos meses en el laboratorio del Dr. Guido C. Mora, en la Unidad de Microbiología del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Pontificia Universidad Católica de Chile, se realizaron algunos ensayos preliminares de invasión con las cepas mutantes de *S. typhi* $\Delta ompB$, $\Delta ompC$, y

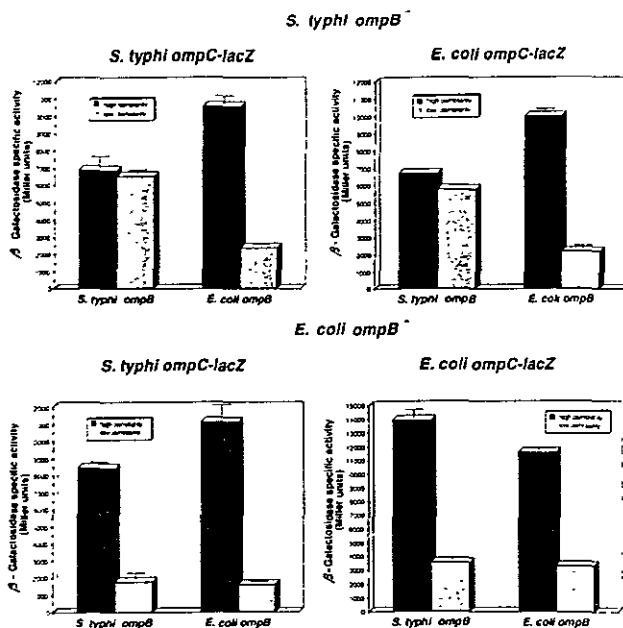


Fig. 10 Expresión de las fusiones *ompC-lacZ* de *S. typhi* y *E. coli* en cepas mutantes $\Delta ompB$, complementadas con el operón *ompB* homólogo o heterólogo. La expresión de las fusiones *StompC-lacZ* (izquierda) y *EcompC-lacZ* (derecha) en las cepas *S. typhi* $\Delta ompB$ (panel superior) o *E. coli* $\Delta ompB$ (panel inferior), complementadas con el operón *ompB* de *S. typhi* (pIM261) o con *ompB* de *E. coli* (pIM40), se midió después del crecimiento en MN, con o sin 0.3M de NaCl (alta y baja osmolaridad, respectivamente). La actividad de β -galactosidasa se determinó de muestras colectadas cada hora de cultivos duplicados. Los datos muestran la actividad obtenida después de 5 horas de crecimiento, y representan el promedio de dos diferentes experimentos.

ΔompF.

En estos ensayos, la invasión a células epiteliales Hep-2 por las cepas mutantes de *S. typhi* STY81 (*ΔompB*), STYC171 (*ΔompC*) y STYF302 (*ΔompF*) fue 27.8, 10.4 y 2.6 veces menor, respectivamente, con respecto a las cepas silvestres IMSS-1 (cepa parental silvestre) y TY2 (Tabla 2). Sin embargo, estos datos deben tomarse con reserva, ya que para la interpretación de resultados en este tipo de ensayos se debe contar con un mayor número de repeticiones y una serie de controles que en este caso no fueron incluidos; como son el ensayo de cada mutante complementada con el gen respectivo.

No obstante las limitaciones mencionadas, nuestros datos sugieren que estos loci pudieran estar involucrados en la invasión de *S. typhi* a células epiteliales; sin embargo, la determinación del papel específico de cada locus, no sólo en la invasión sino en la adherencia, proliferación y sobrevivencia en células epiteliales, será estudiado con más detalle en otro trabajo en nuestro laboratorio. En dicho estudio se incluirán mutantes en genes que codifican para las porinas OmpS1 y OmpS2 de *S. typhi*, cuya expresión en condiciones de laboratorio no es detectada, y cuya función, hasta el momento, es desconocida (Fernández Mora et al., 1995; y datos no publicados).

Tabla 2. Capacidad invasiva de mutantes de *S. typhi* a células epiteliales Hep-2.

CEPAS DE <i>S. typhi</i>	% DE INVASION ^a	% DE INVASION RELATIVA ^b
IMSS-1 (silvestre)	69.4 ± 8.7	100.0
TY2 (silvestre)	71.6 ± 10.5	103.2
STY81 ($\Delta ompB$)	3.8 ± 1.6	5.5
STYC171 ($\Delta ompC$)	6.8 ± 1.4	9.8
STYF302 ($\Delta ompF$)	38.9 ± 18.5	56.1

^a los resultados corresponden al promedio de tres experimentos ± desviación estándar.

^b con respecto a la cepa IMSS-1.

DISCUSION

En la ME de *E. coli*, la cantidad de las proteínas OmpC y OmpF varía dependiendo de la osmolaridad del medio de cultivo; sin embargo, como sus niveles relativos fluctúan en una manera inversa en alta y baja osmolaridad, se considera que la suma de la cantidad de estas proteínas permanece constante. Un incremento en la osmolaridad resulta en un incremento en la proteína OmpC, con un concomitante decremento en la proteína OmpF (Forst e Inouye, 1988). De forma interesante, en *S. typhi*, OmpC se expresa altamente independiente de la osmolaridad del medio; mientras que OmpF se osmorregula en forma similar que en *E. coli* (Puente et al., 1991).

En este trabajo, nosotros mostramos que la síntesis de OmpC de *S. typhi* es similar en baja y alta osmolaridad, a lo largo de la curva de crecimiento; así mismo, que la osmorregulación de OmpF es independiente de la fase de crecimiento (Fig. 5). Por otro lado, se observó que la osmorregulación de la expresión de OmpC y OmpF en *E. coli* es más evidente durante la fase exponencial y se va perdiendo al entrar a la fase estacionaria, donde la represión por osmolaridad de OmpC y OmpF es menor. Este efecto de la fase de crecimiento en la osmorregulación de las porinas en *E. coli* no había sido reportado anteriormente, ya que trabajos previos de osmorregulación se realizaron en la fase exponencial, y aunque se había observado que la expresión de las porinas se ve afectada por la fase de crecimiento, esta determinación no involucró diferentes condiciones de osmolaridad. Al respecto, se ha reportado que la transcripción de *ompF* disminuye ligeramente en fase estacionaria y que el factor sigma de la fase estacionaria, RpoS, es esencial para esta regulación por fase de crecimiento; sin embargo, el mecanismo por el cual se efectúa no es conocido (Pratt y Silhavy, 1995). Considerando estas observaciones, RpoS pudiera tener un efecto en la osmorregulación de las porinas en *E. coli* dependiente de la fase de crecimiento, lo cual analizaremos más adelante.

Por otro lado, nosotros demostramos que la expresión de las porinas OmpC y OmpF se suprime en la cepa de *S. typhi* IMSS-1 a la cual le removimos el operón regulador *ompB* (Fig. 9A), como se ha demostrado previamente para *E. coli* MC4100 y *S. typhi* TY2 (Garret et al., 1985; Pickard et al., 1994). Por ello concluimos que las porinas OmpC y OmpF de *S. typhi* son reguladas por las proteínas OmpR/EnvZ, como ocurre en *E. coli* (Hall y Silhavy, 1981).

Cuando se removió el gen *ompC* u *ompF* del cromosoma de *S. typhi*, no se modificó la expresión del gen codificante para la otra porina mayoritaria, i. e., la osmorregulación de la síntesis de OmpF fue independiente de la expresión de OmpC; además, OmpC fue altamente expresada en el fondo genético *ompF*⁻ (Fig. 3C del apéndice I). Estas observaciones difieren con lo reportado anteriormente para las mutantes *ompC*⁻ y *ompF*⁻ de *E. coli*, donde se mostró que estas mutantes presentan una expresión constitutiva de OmpF y OmpC, respectivamente; i. e. la ausencia de una de las porinas produce la expresión constitutiva de la otra, suscitando que la suma de la cantidad relativa de éstas permanezca constante (Morona y Reeves, 1982; Ozawa y Mizushima, 1983; Schnaitman y McDonald, 1984; Mizuno y Mizushima, 1990).

En este trabajo también mostramos (determinando la actividad enzimática de fusiones *ompC-lacZ*), que los genes *ompC* de *S. typhi* y de *E. coli* se expresan en altos niveles tanto en baja como en alta osmolaridad, cuando están presentes en una cepa *S. typhi* silvestre. Por otro lado, cuando se encuentran en *E. coli*, ambos genes se osmorregularon. Aunque la actividad de las fusiones *ompC-lacZ* expresadas en *S. typhi*, fue ligeramente menor en baja osmolaridad (Fig. 5A y 6), esto no se reflejó en una notable reducción de proteína incorporada en la ME, como claramente pasa en *E. coli* (Fig. 5B). En otras palabras, en *S. typhi*, OmpC es siempre más abundante que OmpF, independientemente de las condiciones de crecimiento. Esto ha sido observado también por otro grupo, el cual reportó que la expresión de *ompC* en *S. typhi* es influenciada ligeramente por la osmolaridad del medio y la disponibilidad de oxígeno (Contreras et al., 1995).

Más aún, la expresión de las fusiones *ompC-lacZ* de *S. typhi* y de *E. coli* (Fig. 10), en cepas $\Delta ompB$ de *S. typhi* o de *E. coli*, complementadas con el operón *ompB* de *S. typhi* u *ompB* de *E. coli*, mostró que ambos genes no se regulan por osmolaridad cuando están bajo el control de *ompB* de *S. typhi*, en un fondo genético de *S. typhi*. Interesantemente, en este mismo fondo genético, ambos genes son osmorregulados bajo el control de *ompB* de *E. coli*. En contraste, en un fondo genético de *E. coli*, ambos genes son osmorregulados bajo *ompB* de *E. coli* y, sorprendentemente, también por el operón *ompB* de *S. typhi* (Fig. 10). Resultados similares fueron observados al analizar el patrón electroforético de PME de las cepas $\Delta ompB$ de *S. typhi* y *E. coli*, complementadas con los operones *ompB* de *S. typhi*

u *ompB* de *E. coli* (Fig. 9).

Así, parece haber factores no conocidos en *S. typhi* que, junto con las proteínas reguladoras *OmpR* y *EnvZ*, determinan el particular comportamiento de la expresión de *OmpC*. Sin embargo, no se pueden descartar modelos más complejos; por ejemplo, que existan factores desconocidos en ambas bacterias, que estén actuando de forma diferente. Al respecto, se han presentado evidencias de que en *E. coli*, la proteína *SixA* parece estar implicada en una vía de fosforilación de *OmpR*, independiente de *EnvZ*, específicamente funcionando como un modulador negativo para la fosfotransferencia entre un fosfodonador no conocido y *OmpR* (Ogino et al., 1998).

Particularmente, es atractivo especular que las diferencias en la secuencia de las proteínas *EnvZ* pudieran determinar los niveles diferentes de la expresión de *ompC*, al mediar diferentes interacciones moleculares. Esto, en virtud de que la proteína reguladora *OmpR* de *S. typhi* es idéntica a la de *E. coli*; mientras que las proteínas detectoras *EnvZ* difieren en 21 de los 450 residuos de aa, entre ambas bacterias (Martínez-Flores et al., 1995).

La proteína *EnvZ* pertenece a la familia de proteínas histidina-cinasa, las cuales se definen por regiones de secuencias conservadas, generalmente localizadas cerca del carboxilo-terminal (Stock et al., 1989). En *EnvZ*, el carboxilo-terminal es un módulo transmisor, el cual puede actuar como fosfatasa-cinasa sobre el módulo receptor de la proteína *OmpR* (Igo y Silhavy, 1988). Llama la atención que 18 de las 21 diferencias entre las proteínas *EnvZ* de *E. coli* y *S. typhi* estén localizadas en la región carboxilo-terminal, entre los residuos 260 y 450 (Martínez-Flores et al., 1995) (Fig. 11).

En *E. coli* se han analizado mutantes de *EnvZ*, lo cual ha permitido la localización de dominios funcionales que son importantes en el mecanismo de osmorregulación. Mutaciones puntuales en la región I, que se localiza entre los aa A239 a R253, pueden inactivar las actividades de fosfatasa o cinasa (Russo y Silhavy, 1991; Skarphol et al., 1997; Waukau y Forst 1992). A este respecto, dos de las diferencias observadas entre las *EnvZ* de *E. coli* y de *S. typhi* están cerca de esta región, en las posiciones 260 y 262 (Fig. 11).

Se ha observado también que la mutación de uno de los residuos más conservados de la región II, N347, elimina la actividad auto-cinasa de *EnvZ* y la cinasa de *OmpR*, pero no la actividad fosfatasa de *OmpR* (Dutta e Inouye, 1996). Otra mutación adyacente, Y351S,

elimina ambas actividades de cinasa y fosfatasa de OmpR. Sin embargo, una mutación en el residuo conservado, N343K, no altera las actividades de cinasa y fosfatasa de EnvZ (Hsing y Silhavy 1997; Kanamaru et al., 1989). En esta región se localiza uno de los aa que difiere entre EnvZ de *S. typhi* y de *E. coli*, en la posición 354 (Fig. 11).

En este contexto, para determinar las características moleculares que confieren el particular comportamiento de EnvZ en *S. typhi*, se requiere del análisis de sus dominios funcionales; específicamente del análisis por mutagénesis sitio-dirigida en los residuos que son diferentes entre las secuencias de EnvZ de *S. typhi* y de *E. coli*.

Por otro lado, se ha postulado que la concentración de OmpR-P modula la expresión, en respuesta a la osmolaridad, de los genes que codifican para las porinas en *E. coli* (Mizuno y Mizushima, 1990; Pratt et al., 1996). Sin embargo, es incierto si diferentes niveles de OmpR-P juegan un papel en la expresión de *ompC* en *S. typhi* (la cual es independiente de la osmolaridad). No obstante, ya que la expresión de OmpF de *S. typhi* es osmorregulada como en *E. coli*, es probable que los niveles de OmpR-P cambien de acuerdo a la osmolaridad. Aún más, la observación de que el operón *ompB* de *S. typhi* es capaz de osmorregular correctamente la síntesis de porinas en un fondo genético de *E. coli*, también sugiere que EnvZ de *S. typhi* puede modular la fosforilación de OmpR en respuesta a la osmolaridad (Fig. 10).

La diferencia en la expresión de genes entre *S. typhi* y *E. coli* podría tener un papel en la fisiología bacteriana, posiblemente por ejercer un efecto en los mecanismos por los cuales las bacterias sobreviven en vida libre o durante la patogénesis. Sin embargo, a la fecha no se sabe si los diferentes niveles de expresión de OmpC pueden afectar la virulencia o algunas funciones fisiológicas específicas de esta bacteria. A este respecto, previamente se determinó que el regulador SpvR presenta otro ejemplo de polimorfismo funcional en *Salmonella*. Se ha postulado que los genes *spv* son necesarios para la multiplicación de la bacteria dentro de macrófagos; las secuencias de estos genes ha sido reportada para varias serovariedades. Este grupo de genes consta de cinco genes, *spvR*, *A*, *B*, *C* y *D*, que contienen dos promotores, uno de *spvR* y uno para *spvABCD*. SpvR que pertenece a la familia LysR de proteínas reguladoras, regula positivamente al operón *spvABCD*, e induce la transcripción de su propio promotor en trans. Recientemente se ha encontrado que las dos diferencias en la secuencia de aa que se presentan entre SpvR de

S. dublin y *S. typhimurium*, determinan el diferente patrón de expresión de SpvA entre ambas bacterias (10 veces mayor expresión de SpvA en *S. dublin* que en *S. typhimurium* (Taira et al., 1995). El operón *spvA-D* y el gen *spvR* de *S. typhimurium* están involucrados en la capacidad de la bacteria para causar infección sistémica en ratón; así mismo, se observó que un mayor nivel de expresión de la proteína SpvA incrementa la virulencia de *S. typhimurium* en ratón (Taira et al., 1995; Chen et al., 1996).

Es importante mencionar que el operón *ompB* ha sido involucrado en la virulencia de *S. typhimurium*, lo cual remarca el papel pleiotrópico de este sistema regulador en la fisiología de *Salmonella* (Dorman et al., 1989; Lindgre et al., 1996; Pickard et al., 1994). Resultados preliminares de nuestro estudio sobre el papel del operón *ompB* en la virulencia de *S. typhi*, mediante ensayos con cultivos de células epiteliales, sugieren que dicho locus podría estar involucrado en el proceso de invasión de la bacteria a células epiteliales, junto con los genes *ompC* y *ompF*. Sin embargo, para determinar el papel específico de cada uno de estos genes, se necesita hacer un estudio más completo, en el cual se analicen, además de la invasión, la adherencia, proliferación y sobrevivencia en células epiteliales. Este estudio será realizado en nuestro laboratorio e incluirá también mutantes de *S. typhi* a las cuales se les eliminó del cromosoma los genes que codifican para las porinas OmpS1 u OmpS2, cuya expresión en condiciones de laboratorio es menor que la de las porinas mayoritarias.

En resumen, los hallazgos en este trabajo son fundamentos importantes para comenzar nuevos estudios en *S. typhi*, con el fin de aclarar algunas de las interrogante que se han originado como, por ejemplo, si las diferencias alélicas en los genes, y sutiles diferencias en los mecanismos reguladores, tienen un papel en la fisiología de *Salmonella*, determinando su sobrevivencia en el medio ambiente o durante los procesos de patogénesis.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo demostramos que la expresión de las porinas OmpC y OmpF de *S. typhi* es dependiente del sistema regulador de dos componentes OmpR/EnvZ, como sucede en *E. coli*; sin embargo, algunas diferencias adicionales a la ya reportada falta de osmorregulación de la expresión de OmpC de *S. typhi* fueron observadas. Al analizar la expresión de las porinas en baja y alta osmolaridad, se observó que en *S. typhi* dicha expresión no varía a lo largo de la curva de crecimiento; mientras que, en *E. coli* la osmorregulación de las porinas sí depende de la fase de crecimiento. A este respecto, RpoS pudiera estar involucrado en la osmorregulación de las porinas dependiente de la fase de crecimiento en *E. coli*; lo cual será determinado en estudios posteriores, mediante el análisis de la expresión de PME en una cepa mutante en RpoS. Otra observación fue que al remover el gen *ompC* u *ompF* del cromosoma de *S. typhi*, la expresión del gen codificante para la otra porina mayoritaria no se modificó, a diferencia de lo reportado para *E. coli*; donde la ausencia de una de las porinas produce la expresión constitutiva de la otra. Será interesante determinar si los diferentes niveles de expresión de las porinas entre *S. typhi* y *E. coli* son importantes en alguna condición fisiológica específica de estas bacterias.

La carencia de osmorregulación en la expresión de *ompC* de *S. typhi* está determinada tanto por el operón *ompB* de *S. typhi*, como por otro (s) factor (es) no conocido (s), presente en el fondo genético de *S. typhi*; y es independiente de las diferencias en la región reguladora del gene *ompC*. Actualmente, en nuestro laboratorio se están realizando experimentos para determinar las características moleculares que confieren el particular comportamiento de EnvZ en *S. typhi*; mediante un análisis de sus dominios funcionales; específicamente por mutagénesis sitio dirigida en los residuos que difieren entre las secuencias de EnvZ de *S. typhi* y de *E. coli*. Así mismo, se llevará a cabo la búsqueda del factor específico de *S. typhi* involucrado en la expresión independiente de la osmolaridad de OmpC; mediante una mutagénesis con transposones, seleccionando aquellas mutaciones, que no sean en *ompB*, que permitan la represión en baja osmolaridad de *ompC* o que, en general, afecten la expresión de *ompC*.

Por otro lado, se realizarán estudios para establecer el papel específico de *ompB*, *ompF* y *ompC*, en los proceso de interacción de la *S. typhi* con células epiteliales y

fagocíticas en cultivo. Este estudio incluirá además mutantes a las cuales se les eliminó del cromosoma los genes que codifican para las porinas minoritarias OmpS1 u OmpS2.

BIBLIOGRAFIA.

- Alpuche-Aranda, C. M., J. A. Swanson, W. P. Loomis, and S. I. Miller.** 1992. *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:10079-10083.
- Bajaj, V., R. L. Lucas, C. Hwang, and C. A. Lee.** 1996. Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol. Microbiol.* **22**:703-714.
- Bernardini, M. L., A. Fontaine, and P. Sansonetti.** 1990. The two-component regulator system OmpR-EnvZ controls the virulence of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* **172**:6274-6281.
- Bernardini, M. L., M. G. Sanna, A. Fontaine, P. Sansonetti.** 1993. OmpC is involved in invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **61**:3625-3635.
- Calva, E., J. L. Puente and J. J. Calva.** 1988. Research opportunities in typhoid fever: epidemiology and molecular biology. *Bio Essays.* **9**:173-177.
- Cano V. R.** 1997. Generación y caracterización de cepas de *Salmonella typhi* con mutaciones en genes que codifican para proteínas de membrana externa formadora de poro. Tesis de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Juárez del Estado de Durango. Victoria de Durango, Dgo. México.
- Casadaban, M. J.** 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* **104**:541-555.
- Case, C. C., B. Bukau, S. Granett, M. R. Villarejo, and W. Boos.** 1986. Contrasting mechanisms of *envZ* control of *mal* and *pho* regulon genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **166**:700-712.
- Comeau, D. E., K. Ikenaka, K. Tsung, and M. Inouye.** 1985. Primary characterization of the protein products of the *Escherichia coli ompB* locus: structure and regulation of synthesis of the OmpR and EnvZ proteins. *J. Bacteriol.* **164**:578-584.
- Contreras, I., L. Muñoz, C. Toro, G. C. Mora.** 1995. Heterologous expression of *Escherichia coli* porin genes in *Salmonella typhi* Ty2: regulation by medium osmolarity temperature and oxygen availability. *FEMS Microbiol. Lett.* **133**:105-111.
- Contreras, I., V. H. Obreque, L. P. Blanco, C. S. Toro and G. C. Mora.** 1995. Anaerobically induced *Salmonella typhi* genes are involved in entry to and proliferation

- within human-derived cell lines. *Southeast Asian J. Trop. Med. and Public Health*. **26**:100-117.
- Chatfield, S. N., C. J. Dorman, C. Hayward, and G. Dougan.** 1991. Role of *ompR*-dependent genes in *Salmonella typhimurium* virulence: Mutants deficient in both OmpC and OmpF are attenuated in vivo. *Infect. Immun.* **59**:449-452.
- Chen, Ch-Y., L. Eckmann, S. J. Libby, F. C. Fang, S. Okamoto, M. F. Kagnoff, J. Fierer, and D. G. Guiney.** 1996. Expression of *Salmonella typhimurium* *rpoS* and *rpoS*-dependent genes in the intracellular environment of eukaryotic cells. *Infect. Immun.* **64**:4739-4743.
- Delgado, J., S. Forst, S. Harlocker, and M. Inouye.** 1993. Identification of a phosphorylation site and functional analysis of conserved aspartic acid residues of OmpR, a transcriptional activator for *ompF* and *ompC* in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **10**:1037-1047.
- Delilhas, N.** 1995. Regulation of gene expression by *trans*-encoded antisense RNAs. *Mol. Microbiol.* **15**:411-414.
- Dorman, C. J., S. Chatfield, C. F. Higgins, C. Hayward, and G. Dougan.** 1989. Characterization of porin and *ompR* mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*: *ompR* mutants are attenuated *in vivo*. *Infect. Immun.* **57**:2136-2140.
- Dutta, R., and M. Inouye.** 1996. Reverse phosphotransfer from OmpR to EnvZ in a kinase- / phosphatase+ mutant of EnvZ (EnvZ-N347D), a bifunctional signal transducer of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **271**:1424-1429.
- Esterling, L., and N. Delilhas.** 1994. The regulatory RNA gene *micF* is present in several species of Gram-negative bacteria and is phylogenetically conserved. *Mol. Microbiol.* **12**:639-646.
- Fernández-Mora, M., R. Oropeza, J. L. Puente, and E. Clava.** 1995. Isolation and characterization of *ompS1*, a novel *Salmonella typhi* outer membrane protein-encoding gene. *Gene*. **58**:67-72.
- Finlay, B. B. and S. Falkow.** 1989. *Salmonella* as an intracellular parasite. *Mol. Microbiol.* **3**:1833-1841.
- Forst, S., and M. Inouye.** 1988. Environmentally regulated gene expression for membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **4**:21-42.

- Forst, S. A., and D. L. Roberts.** 1994. Signal transduction by the EnvZ-OmpR phosphotransfer system in bacteria. *Res. Microbiol.* **145**:363-373.
- Gahring, L. C., F. Heffron, B. B. Finlay and S. Falkow.** 1990. Invasion and replication of *Salmonella typhimurium* in animal cells. *Infect. Immun.* **58**:443-448.
- Galan, J. E.** 1996. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol. Microbiol.* **20**:263-271.
- Galan, J. E., and R. Curtiss III.** 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:6383-6387.
- Garret, S., R. K. Taylor, T. J. Silhavy, and M. L. Berman.** 1985. Isolations and characterization of $\Delta ompB$ strains of *Escherichia coli* by a general method based on gene fusions. *J. Bacteriol.* **162**:840-844.
- Groisman, E. a., P. I. Fields, and F. Heffron.** 1990. Molecular biology of *Salmonella* pathogenesis. Molecular basis of bacterial pathogenesis. Iglewski, B. H., and V. L. Clark, eds. San Diego: Academic Press. pp. 251-72.
- Gross, R., B. Arico, and R. Rappuoli.** 1989. Families of bacterial signal-transducing proteins. *Mol. Microbiol.* **3**:1661-1667.
- Gutiérrez, M. L.** 1994. Identificación en *Salmonella typhi* de secuencias similares al gene *ompF* de *Escherichia coli*. Tesis de maestría. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hall, M. N., and t. J. Silhavy.** 1981. Genetic analysis of the *ompB* locus in *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* **151**:1-15.
- Hall, M. N., and t. J. Silhavy.** 1981. The *ompB* locus and the regulation of the major outer membrane porins of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* **146**:23-43.
- Hensel, M., J. E. Shea, B. Raupach, D. Monack, S. Falkow, C. Gleeson, R. Kubo, and D. W. Holden.** 1997. Functional analysis of *ssaJ* and the *ssaK/U* operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of *Salmonella* Pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.* **24**:155-167.
- Hiroshi, K., T. Mizuno, and s.Mizuchima.** 1979. Influence of molecular size and osmolarity of sugars and dextrans on the synthesis of outer membrane proteins O-8 and O-9 of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **140**:843-847.

- Hsing, W., and T. J. Silhavy.** 1997. Function of conserved His-243 in phosphatase activity of EnvZ, the sensor for porin osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:3729-3735.
- Igo, M. M. and T. J. Silhavy.** 1988. EnvZ, a transmembrane environmental sensor of *Escherichia coli* K-12 is phosphorylated in vitro. *J. Bacteriol.* **170**:5971-5973.
- Kanamaru, K., H. Aiba, S. Mizushima, and T. Mizuno.** 1989. Signal transduction and osmoregulation in *Escherichia coli*. A single amino acid change in the protein kinase, EnvZ, results in loss of its phosphorylation and dephosphorylation abilities with respect to the activator protein, OmpR. *J. Biol. Chem.* **264**:21633-21637.
- Kaniga, K., I. Detor, and G. R. Cornelis.** 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *blaZ* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene.* **109**:137-141.
- Laemmli, U. K.** 1970. Clavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
- Lee, C. A., B. D. Jones, and S. Falkow.** 1992. Identification of a *Salmonella typhimurium* invasion locus by selection of hyperinvasive mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:1847-1851.
- Lindgren, S. W., I. Stojiljkovic, and F. Heffron.** 1996. Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:4197-4201.
- Lobos, S. R., and G. C. Mora.** 1991. Alteration in the electrophoretic mobility of OmpC due to variations in the ammonium persulfate concentration in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis.* **12**:448-450.
- Lugtenberg, B., and L. Van Alphen.** 1983. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta.* **737**:51-115.
- Lundrigan, M. D., and C. F. Earhart.** 1981. Reduction in three iron-regulated outer membrane proteins and protein a by the *Escherichia coli* K-12 *perA* mutation. *J. Bacteriol.* **146**:804-807.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook.** 1982. Molecular cloning. A laboratory manual, p. 68. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- Martínez-Flores, I., V. H. Bustamante, J. L. Puente, and E. Calva.** 1995. Cloning and Characterization of the *Salmonella typhi ompR* and *envZ* genes. *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotech.* **3**:135-144.
- Martínez-Flores, I., R. Cano, V. H. Bustamante, E. Calva, and J. L. Puente.** 1999. The *ompB* operon partially determines the differential expression of *ompC* in *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**:
- Mikail, F. A., I. N. Shokolenko, and T. P. Croughan.** 1995. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene.* **160**:63-67.
- Miller, J. H.** 1972. Experiments in Molecular genetics, p. 352-355 and 403-404. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Miller, S. I., A. M. Kukral, and J. J. Mekalanos.** 1989. A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:5054-5058.
- Miller, V. L., and J. J. Mekalanos.** 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* **170**:2575-2583.
- Mizuno, T., and S. Mizushima.** 1990. Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: The molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. *Mol. Microbiol.* **4**:1077-1082.
- Mizuno, T., M-Y Chow, and M. Inouye.** 1983. A comparative study on the genes for three porins of *Escherichia coli* outer membrane. *J. Biol. Chem.* **258**:6932-6940.
- Mizuno, T., E. T. Wurtzel, and M. Inouye.** 1982. Cloning of the regulatory genes (*ompR* and *envZ*) for the matrix proteins of the *Escherichia coli* outer membrane. *J. Bacteriol.* **150**:1462-1466.
- Morona, R., and P. Reeves.** 1982. The *tolC* locus of *Escherichia coli* affects the expression of three major outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* **150**:1016-1023.
- Nikaido, H.** 1994. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J. Biol. Chem.* **269**:3905-3908.
- Nikaido, H., and M. Vaara.** 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**:1-32.

- Ochman, H., F. C. Soncini, F. Solomon, and E. A. Groisman. 1996. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:7800-7804.
- Ogino, T., M. Matsubara, N. Kato, Y. Nakamura, and T. Mizuno. 1998. An *Escherichia coli* protein that exhibits phosphohistidine phosphatase activity towards the HPT domain of the ArcB sensor involved in the multistep His-Asp phosphorelay. Mol. Microbiol. 27:573-585.
- Ozawa, Y. and T. Mizushima. 1983. Regulation of outer membrane porine protein synthesis in *Escherichia coli* K-12: *ompF* regulates de expression of *ompC*. J. Bacteriol. 154:669-675.
- Park, H., and M. Inouye. 1997. Mutational analysis of the linker region of EnvZ, an osmosensor in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 179: 4382-4390.
- Pegues, D. A., M. J. Hantman, I. Behlau, and S. I. Miller. 1995. PhoP/PhoQ transcriptional repression of *Salmonella typhimurium* invasion genes: evidence for a role in protein secretion. Mol. Microbiol. 17:169-181.
- Pickard, D., J. Li, M. Roberts, D. Maskell, D. Hone, M. Levine, G. Dougan, and S. Chatfield. 1994. Characterization of defined *ompR* mutants of *Salmonella typhi*: *ompR* is involved in the regulation of Vi polysaccharide expression. Infect. Immun. 62:3984-3993.
- Pratt, L. A., W. Hsing, K. E. Gibson and T. J. Silhavy. 1996. From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 20:911-917.
- Pratt, L., and T. J. Silhavy. 1995. Porin regulon of *Escherichia coli*. In two-component signal transduction. Hoch, J. A., and Silhavy, T. J. (eds). Washington, D. C.: The American Society for Microbiology, 105-127.
- Puente, J. L., V. Alvarez-Scherer, G. Gosset and E. Calva. 1989. Comparative analysis of the *Salmonella typhi* and *Escherichia coli ompC* genes. Gene. 83:197-206.
- Puente, J. L., V. Flores, M. Fernández, Y. Fuchs, and E. Calva. 1987. Isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. Gene. 61:75-83.
- Puente, J. L., A. Verdugo-Rodríguez, and E. Calva. 1991. Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* OmpC is influenced differently by medium osmolarity, dependence on *Escherichia coli* OmpR. Mol. Microbiol. 5:1205-1210.

- Ried, J. L. and Collmer, A.** 1987. An *nptI-sacB-sacR* cartridge for constructing directed, unmarked mutations in Gram-negative bacteria by marker exchange- eviction mutagenesis. *Gene*. **57**:239-246.
- Russo, F. D. and T. J. Silhavy.** 1991. EnvZ controls the concentration of phosphorylated OmpR to mediate osmoregulation of the porin genes. *J. Mol. Biol.* **222**:567-580.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Schnaitman, C. A., and G. A. McDonald.** 1984. Regulation of outer membrane protein synthesis in *Escherichia coli* K-12: deletion of *ompC* affects expression of the OmpF protein. *J. Bacteriol.* **159**:555-563.
- Shapira, S. K., J. Chou, F. V. Richaud, and M. J. Casadaban.** 1983. New versatile plasmid vectors of hybrid proteins code by a cloned *gen* fused to *lacZ* gene sequences encoding an enzymatically active carboxy-terminal portion of β -galactosidase. *Gene*. **25**:71-82.
- Shea, J. E., M. Hensel, C. Gleeson, and D. W. Holden.** 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:2593-2597.
- Slauch, J. M., and T. J. Silhavy.** 1989. Genetic analysis of the switch that controls porin gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* **210**:281-292.
- Skarphol, K., J. Waukan, and S. A. Forst.** 1997. Role of H-243 in the phosphatase activity of EnvZ in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:1413-1416.
- Stock, J. B., A. J. Ninfa, and A. M. Stock.** 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptative response in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**:450-490.
- Stock, J. B., A. M. Stock, and J. M. Mottonen.** 1990. Signal transduction in bacteria. *Nature.* **344**:395-400.
- Sugawara, E., and H. Nikaido.** 1994. OmpA protein of *Escherichia coli* outer membrane occurs in open and closed channel forms. *J. Biol. Chem.* **269**:17981-17987.
- Taira, S., P. Heiskanen, R. Hurme, H. Heikkilä, P. Riikonen, and M. Rhen.** 1995. Evidence for functional polymorphism of the *spvR* gene regulating virulence gene expression in *Salmonella*. *Mol. Gen. Genet.* **246**:437-444.

- Tokishita, S., A. Kojima, H. Aiba, and T. Mizuno.** 1991. Transmembrane signal transduction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**:6780-6785.
- Torres, E. A.** 1993. Caracterización parcial del gene que codifica para la proteína de membrana externa PhoE, de *Salmonella typhi*. Tesis de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Puebla. Tecamachalco, Pue., México.
- Van Alphen, U. and B. Lugtenberg.** 1977. Influence of osmolarity of the growth medium on the outer membrane protein pattern of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **131**:623-630.
- Waukau, J., and S. Forst.** 1992. Molecular analysis of the signaling pathway between EnvZ and OmpR in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**:1522-1527.

A N E X O

The *ompB* Operon Partially Determines Differential Expression of OmpC in *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*

IRMA MARTÍNEZ-FLORES, ROXANA CANO, VÍCTOR H. BUSTAMANTE,
EDMUNDO CALVA,* AND JOSE LUIS PUENTE

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62250, México

Received 15 May 1998/Accepted 15 November 1998

Expression of the *Escherichia coli* OmpC and OmpF outer membrane proteins is regulated by the osmolarity of the culture media. In contrast, expression of OmpC in *Salmonella typhi* is not influenced by osmolarity, while OmpF is regulated as in *E. coli*. To better understand the lack of osmoregulation of OmpC expression in *S. typhi*, we compared the expression of the *ompC* gene in *S. typhi* and *E. coli*, using *ompC-lacZ* fusions and outer membrane protein (OMP) electrophoretic profiles. *S. typhi ompC* expression levels in *S. typhi* were similar at low and high osmolarity along the growth curve, whereas osmoregulation of *E. coli ompC* in *E. coli* was observed during the exponential phase. Both genes were highly expressed at high and low osmolarity when present in *S. typhi*, while expression of both was regulated by osmolarity in *E. coli*. Complementation experiments with either the *S. typhi* or *E. coli ompB* operon in an *S. typhi ΔompB* strain carrying the *ompC-lacZ* fusions showed that both *S. typhi* and *E. coli ompC* were not regulated by osmolarity when they were under the control of *S. typhi ompB*. Interestingly, in the same strain, both genes were osmoregulated under *E. coli ompB*. Surprisingly, in *E. coli ΔompB*, they were both osmoregulated under *S. typhi* or *E. coli ompB*. Thus, the lack of osmoregulation of OmpC expression in *S. typhi* is determined in part by the *ompB* operon, as well as by other unknown *trans*-acting elements present in *S. typhi*.

Salmonellae are gram-negative enterobacteria that can be pathogenic for both humans and animals. They cause disease ranging from gastroenteritis to typhoid fever, depending on their serotype and on the infected host. In particular, *Salmonella typhi* is a human-specific pathogen that causes typhoid fever, a systemic febrile illness acquired by ingesting food or water that has been contaminated by human feces (1).

Escherichia coli, as well as other gram-negative bacteria, exhibits a wide variety of adaptive responses to changes in the environment; these include an increase or decrease in the expression of the major outer membrane porin proteins OmpC and OmpF in response to different demands and stresses (i.e., osmolarity, temperature, pH, oxygen tension, and nutrient starvation) (29). In particular, the influence of osmolarity on the regulation of OmpC and OmpF expression has been extensively studied. OmpF is preferentially expressed in media of low osmolarity, whereas OmpC expression is increased in media of high osmolarity. The *E. coli ompB* locus, which contains two distinct genes, *ompR* and *envZ*, regulates OmpF and OmpC expression at the transcriptional level. EnvZ and OmpR belong to the two-component regulatory systems that respond to environmental stimuli. OmpR, a cytoplasmic protein, is the activator that binds to both the *ompF* and *ompC* promoters; EnvZ, an inner membrane protein, is thought to sense an environmental signal in order to modulate OmpR function by phosphorylation and dephosphorylation (for reviews, see references 6, 7, 24, and 29).

The *S. typhi ompC* gene was isolated and characterized in our laboratory (30, 31). In *S. typhi*, in contrast to *E. coli*, OmpC has been observed to be expressed at the same level at both low and high osmolarity, whereas the synthesis of OmpF in both

bacteria is regulated in similar manners (32). These findings suggest different mechanisms of osmoregulation of gene expression between *E. coli* and *S. typhi*.

We have characterized the *S. typhi ompR* and *envZ* genes. Amino acid sequence alignment between the *S. typhi* OmpR and EnvZ proteins and the corresponding *E. coli* proteins revealed that *S. typhi* and *E. coli* OmpR are identical; in contrast, *S. typhi* EnvZ shows 95% identity with the *E. coli* EnvZ protein. Interestingly, most of the differences between the EnvZ proteins lie toward the carboxy terminus, mostly between residues 260 and 450, in a region generally regarded as conserved within the histidine kinase protein family (19).

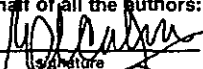
To determine whether the lack of *ompC* osmoregulation in *S. typhi* is mediated by particular features of *cis*- or *trans*-acting elements, in this work we analyzed the expression of *S. typhi* and *E. coli ompC-lacZ* fusions in both *E. coli* and *S. typhi*. The studies were performed with wild-type strains as well as with *ΔompB* strains complemented with either the *E. coli* or the *S. typhi ompB* operon. In the same manner, we analyzed the outer membrane protein (OMP) electrophoretic pattern of the complemented *S. typhi* and *E. coli ΔompB*. Our observations support the notion of a functionally polymorphic *ompB* operon with regard to regulation of OmpC expression in response to changes in osmolarity.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids and growth conditions. The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Bacteria were grown overnight at 37°C in Luria-Bertani (LB) broth plus either ampicillin (250 µg/ml), streptomycin (100 µg/ml), tetracycline (20 µg/ml), kanamycin (20 µg/ml), chloramphenicol (40 µg/ml), or rifampin (150 µg/ml) as required. *E. coli* SV327 λ pr was used as the transformation recipient of pKNG101 derivatives. To study OMP expression, medium A (containing, per liter, 7 g of nutrient broth, 1 g of yeast extract, 2 g of glycerol, 3.7 g of K₂HPO₄, and 13 g of KH₂PO₄) was used (15). To test the influence of osmolarity on OMP expression, medium A was prepared with or without 0.3 M NaCl (high or low osmolarity, respectively). All cultures were grown with vigorous shaking (250 rpm) at 37°C.

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Biotecnología, UNAM, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, México. Phone: (52) (73) 29-1645. Fax: (52) (73) 13-8673. E-mail: ecalva@ibt.unam.mx.

AUTHOR: Publication of this article cannot proceed without the signature of the person who read and corrected the proof on behalf of all the authors:

 Dec 7 '98
signature date

Org. Op.	OPERATOR:	Session	PROOF:	PE's:	AA's:	COMMENTS	ARTNO:
1st cac, 2nd ww	dawsonb	3					

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used

Strains or plasmids	Description	Reference
MC4100	F ⁻ <i>araD139 Δ(margF-lac)U169 rpsL150 relA1 fts5301 deoC1 pifF25</i>	2
SG4801900	MC4100 Δ(<i>envZ-malP</i>)900 <i>malP::neo</i>	8
MH760	MC4100 <i>ompR472 malQ⁻ recA</i>	9
MH1461	MC4100 <i>envZ11 malQ⁻ ipo</i>	9
SY337 λ pir	F ⁻ <i>and Δ(lac pro) argE(Am) recA56 nal4</i> ; contains the prophage λ pir, Rif ^r	22
S. typhi strains		
IMSS-1	9, 12. d. V1 serotype; reference clinical strain	30
STY81	IMSS-1; Δ <i>ompB</i> Km ^r	This study
STYC171	IMSS-1; Δ <i>ompC</i> Km ^r	This study
STYF302	IMSS-1; Δ <i>ompF</i> Km ^r	This study
Plasmids		
pIM25 and pIM26	Vector pUC19, carrying the <i>S. typhi ompB</i> operon in orientations Amp ^r	19
pIM260	Vector pACYC184, carrying <i>S. typhi ompB</i> ; Cm ^r	This study
pIM262	Vector pBR322, carrying <i>S. typhi ompB</i> ; Amp ^r	This study
pAT224	Vector pBR322, carrying the <i>E. coli ompB</i> operon; Amp ^r	25
pIM40	Vector pACYC184, carrying the <i>E. coli ompB</i> operon; Cm ^r	This study
pVF27	Vector pBR322, carrying the <i>S. typhi ompC</i> gene, Amp ^r	30
pMY111	Vector pBR322, carrying the <i>E. coli ompC</i> gene, Amp ^r	23
pRCV3	Vector pACYC184, carrying the <i>S. typhi ompF</i> gene; Cm ^r	This study
pBSL46	Amp ^r Km ^r ; used to provide the Km ^r cassette	20
pMC1871	Vector pBR322, carrying a promoterless <i>E. coli lacZ</i> gene; Tc ^r	35
pS ϕ Z10	<i>S. typhi ompC-lacZ</i> translational fusion in pMC1871	This study
pECZ20	<i>E. coli ompC-lacZ</i> translational fusion in pMC1871	This study
pKNG101	<i>oriRK</i> Stp ^r <i>mobRK2 sacB</i>	14
pKB8	Vector pKNG101, carrying a Km ^r gene flanked by up- and downstream sequences of the <i>ompB</i> operon	This study
pKC17	Vector pKNG101, carrying a Km ^r gene flanked by up- and downstream sequences of the <i>ompC</i> gene	This study
pKF30	Vector pKNG101, carrying a Km ^r gene flanked by up- and downstream sequences of the <i>ompF</i> gene	This study

both \rightarrow respectively
1 gene

cl

Construction of *S. typhi ompB*, *ompC*, and *ompF* mutants. The mutagenesis strategy used to replace the *omp* loci for a kanamycin resistance (Km^r) gene was based on the reverse counterselection technique, using suicide clones derived from vector pKNG101 (14). To construct suicide clone pK88 (Table 1), a fragment carrying both an *S. typhi ompB* upstream fragment (containing 37 nucleotides [nt] of the structural gene and about 350 nt of the 5' regulatory region) and a downstream fragment (containing 24 nt of the structural gene and about 200 nt of the 3' downstream region), as well as the pUC19 vector sequence, was amplified by the inverse PCR method (26), using as template pIM26 DNA (19) and synthetic oligonucleotides Ra and Zb, which were designed to generate *Bam*HI restriction sites where the Km^r gene from pBSL46 (20) was cloned. A *Sac*I restriction fragment encompassing the recombinant cassette (the Km^r gene flanked by the upstream and downstream sequences to *S. typhi ompB*) was gel purified; the ends were blunted and ligated into the *Sma*I site of pKNG101.

Construction of pKC17 (Table 1) was basically as described for pK88. Inverse PCR was carried out with pVF27 DNA (30) as the template plus synthetic oligonucleotides C1 and C2, which were also designed to generate a *Bam*HI site to clone the Km^r gene. The upstream fragment contained 40 nt of the structural gene and about 1,300 nt of upstream region, whereas the downstream fragment contained 88 nt of the structural gene and about 500 nt of downstream region. An *Eco*RV fragment containing this recombination cassette was ligated into the *Sma*I site of plasmid pKNG101.

Construction of pKF30 was also as described for pK88. Plasmid pRCV3 (Table 1) and synthetic oligonucleotides S32 and S33, which generate *Bam*HI sites, were used to amplify, by inverse PCR, a fragment carrying regions that flanked the *ompF* gene (the upstream portion carrying 59 nt of the structural gene and 397 nt of 5' upstream sequence, and the downstream segment carrying 173 nt of the structural gene and 191 nt of the 3' downstream region). The Km^r gene was subsequently cloned into the *Bam*HI site; from the resultant plasmid, a *Sall*/XbaI fragment containing the recombination cassette was cloned into pKNG101.

Construction of plasmids carrying the *S. typhi* or *E. coli ompB* operon. Plasmids pIM25 and pIM26 are derivatives of the high-copy-number vector pUC19, carrying the *S. typhi ompB* operon in both orientations (19). The *ompB* operon from pIM25 was subcloned, in both orientations, in a *Sac*I site previously introduced between the *Eco*RI and *Nru*I sites of pBR322 (a medium-copy-number plasmid), thus generating pIM262 and pIM263. The *Eco*RV/*Bam*HI fragment of pIM26, containing the *ompB* operon, was subcloned into pACYC184 (a low-copy-number plasmid) between the *Eco*RV-*Bam*HI and *Nru*I-*Bam*HI sites to obtain both orientations, thus generating pIM260 and pIM261, respectively. To subclone the *E. coli ompB* operon, the *Bam*HI/*Sall* fragment of pAT224 (25) was cloned into pACYC184, generating pIM40.

Construction of *S. typhi* and *E. coli ompC-lacZ* fusions. A fragment containing 1,450 bp of the 5' upstream regulatory region and the first codon of *S. typhi ompC* was obtained by PCR from plasmid pVF27 (30), using synthetic oligonucleotides SCSm1 and SCSce1, which generated *Sma*I and *Sca*I sites, respectively. This DNA fragment was cloned into the unique *Sma*I site of the pMC1871 translational fusion vector, which contains a promoterless *lacZ* gene (Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Sweden) (35), generating plasmid pS ϕ Z10 (*S. typhi ompC-lacZ*) (Table 1). Similarly, a fragment containing 1,450 bp of the *E. coli 5' ompC* upstream regulatory region and the first codon was obtained by PCR from plasmid pMY111 (23), using synthetic oligonucleotides ECSm2 and ECSce2, which generated *Sma*I and *Sca*I sites, respectively. This DNA fragment was cloned into the *Sma*I site of pMC1871, generating plasmid pECZ20 (*E. coli ompC-lacZ*).

Preparation of OMPs. OMPs were prepared essentially as described previously (18). Briefly, 50 ml of medium A, with or without 0.3 M NaCl (high or low osmolality, respectively), was inoculated with 200 μ l of a bacterial cell suspension from an overnight LB culture, prepared in phosphate-buffered saline (pH 7.4), and adjusted to an optical density at 600 nm of 1.8. Cultures were incubated at 37°C in a shaking water bath at 200 rpm, and samples were taken each hour, over a 12-h period for assays of the kinetics of OMP expression. For osmoregulation studies, samples were taken at the fifth hour, where the best osmoregulation profiles were obtained.

SDS-PAGE. Two different gel systems were used to obtain the best separation of the major OMPs. *S. typhi* OMP preparations were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), at 30 mA for 6 h, in gels containing 11% acrylamide, 0.12% bisacrylamide, and 0.1% SDS. *E. coli* OMP preparations were analyzed by urea-SDS-PAGE, at 20 mA for 8 h, in gels prepared with 11% acrylamide, 0.3% bisacrylamide, 8 M urea, and 0.1% SDS. For both systems, the discontinuous buffer system of Laemmli (16) was used. The gels were stained with Coomassie brilliant blue. Under these conditions, *S. typhi* OmpC migrated ahead of OmpF, a feature that has been previously attributed to the ammonium sulfate concentration or to an excess of salt added to the gel (18). The positions of OmpC and OmpF on the OMP profiles were ascertained by comparing the profiles of OMP preparations from the *S. typhi* mutant strains STYC171 (Δ*ompC*) and STYF302 (Δ*ompF*) or the *E. coli* mutant strains MH760 (*ompR472 OmpC⁻ OmpF⁻*) and MH1461 (*envZ11 OmpC⁻ OmpF⁻*).

Microplate β -galactosidase assays. β -Galactosidase activity was measured by the method described by Miller (21), adapted as a microtiter plate assay. Briefly, cell samples were washed twice and resuspended in 1 \times Z buffer (0.06 M Na₂HPO₄, 0.04 M NaH₂PO₄, 0.01 M KCl, 0.001 M MgSO₄, [pH 7]). Then 20 μ l of cell suspension was lysed by addition of 100 μ l of lysis mixture (0.22 mg of lysozyme per ml, 0.22% Triton X-100, 1.6 \times Z buffer, 0.016 M β -mercaptoethanol) for 10 min with shaking at 37°C. Upon addition of 100 μ l of substrate

T

Ong. Op.	OPERATOR:	Session	PROOF:	PE's:	AA's:	COMMENTS	ARTNO:
1st cac, 2nd ww	dawsonb	3					

pS ϕ Z10

Jr software (Bio-Tek Instruments, Inc) set in the kinetics mode. Microplate protein determinations. Protein concentrations in cell extracts were determined by the method of Lowry et al (18a), also adapted as a micro-plate assay as follows. Twenty microliter of cell suspension was treated with 100 μ l of reaction mixture containing 98 μ l of a carbonate (3.4% Na_2CO_3)-hydroxide (0.17 N NaOH) solution and 2 μ l of a copper (0.85% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)-tartrate (1.7% sodium potassium tartrate) solution for 10 min at room temperature, with the subsequent addition of 100 μ l of 16.9% (w/v) Folin-Ciocalteu solution for 15 min at room temperature. Absorbance at 620 nm was obtained with a Ceres 900 C scanning autoreader and microplate workstation and KC Jr software set in the endpoint mode.

Recombinant DNA techniques. All DNA manipulations were performed according to standard protocols (34). Oligonucleotides used for amplification by PCR were provided by the Oligonucleotide Synthesis Facility at our institute. PCRs were performed by using AmpliTaq (Perkin-Elmer) according to the manufacturer's instructions. Restriction and modification enzymes were used as instructed by the manufacturer (Boehringer Mannheim, New England Biolabs, or Gibco BRL).

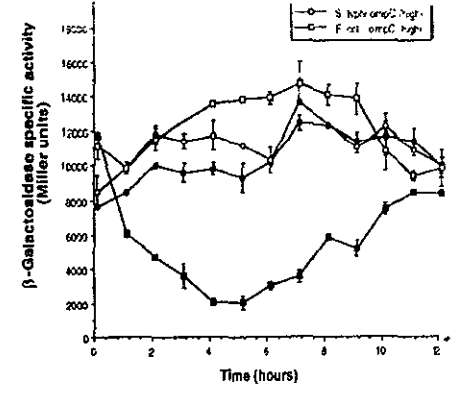
RESULTS

Levels of *ompC* expression in *S. typhi* are similar at low and high osmolality along the growth curve. Previous analysis of OMP electrophoretic patterns showed that while OmpF is osmoregulated in *S. typhi* as it is in *E. coli*, *S. typhi* OmpC is highly expressed at both low and high osmolality (32). However, it had not been tested whether *S. typhi ompC* expression varied according to the growth phase and how it compared with the kinetics of *ompC* expression in *E. coli*. Thus, we compared the expression levels of *ompC-lacZ* and *ompC-lacZ* in *S. typhi* and *E. coli* wild-type strains, respectively. β -Galactosidase activity was measured from samples obtained throughout the growth curve (exponential to stationary phase) of *E. coli* MC4100/pECZ20 (plasmid carrying the *E. coli ompC-lacZ* fusion) and *S. typhi* IMSS-1/pSCZ10 (plasmid carrying the *S. typhi ompC-lacZ* fusion) cultures grown in low and high osmolality (Fig. 1A). *S. typhi ompC* expression levels were similar at low and high osmolality throughout the growth curve, whereas *E. coli ompC* expression was reduced at low osmolality during the exponential phase, mainly at 4 to 6 h of growth.

This behavior was also observed when we compared the OMP electrophoretic patterns of *S. typhi* IMSS-1 and *E. coli* MC4100 grown in low and high osmolality (Fig 1B and C). In *S. typhi*, OmpC expression was not affected by osmolality along the different stages of growth (Fig. 1B), as described previously (32). As observed above, *E. coli* OmpC osmoregulation was most evident during the logarithmic phase (Fig. 1C).

Osmoregulation of *S. typhi* and *E. coli ompC* is determined by strain background. The 5' upstream regulatory regions of the *S. typhi* and *E. coli ompC* genes are slightly different (31). To investigate if these differences in *cis*-acting elements allow *S. typhi* to express *ompC* regardless of medium osmolality, plasmids pSCZ10 (*S. typhi ompC-lacZ*) and pECZ20 (*E. coli ompC-lacZ*) (Table 1) were transformed into either *S. typhi* IMSS-1 or *E. coli* MC4100 and grown at either low or high osmolality. β -Galactosidase activities of transformed cells were measured from samples collected along the growth curve. As shown in Fig. 2, the expression of *S. typhi ompC* was regulated by osmolality in *E. coli*, whereas the expression of *E. coli ompC* was independent of medium osmolality in *S. typhi*. These results indicated that the differences in the regulatory region did not alter the response to osmolality in *E. coli*, nor did they mediate the osmolality-independent expression in *S. typhi*. Instead, the expression of *ompC* in response to osmolality was determined by the strain background.

Characterization of *S. typhi ompB*, *ompC*, and *ompF* mutants. To corroborate the role of the *ompB* operon in OMP



S. typhi

E. coli

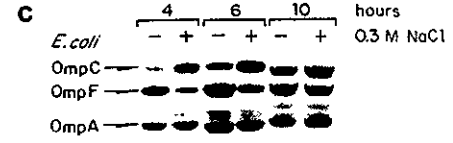
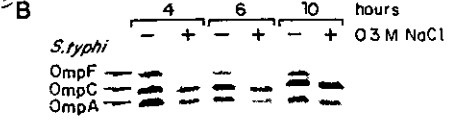


FIG. 1 Kinetics of *E. coli* or *S. typhi ompC* and *ompF* expression throughout the growth curve (A) *S. typhi* IMSS-1 carrying plasmid pSCZ10 (*S. typhi ompC-lacZ* fusion; circles) and *E. coli* MC4100 carrying plasmid pECZ20 (*E. coli ompC-lacZ* fusion; squares) were grown in medium A with (open symbols) or without (closed symbols) 0.3 M NaCl (high or low osmolality, respectively). β -Galactosidase activity was measured from samples taken hourly from duplicate cultures. The data represent the average of three different experiments. (B) *S. typhi* IMSS-1 and *E. coli* MC4100 were grown at 37°C in medium A with (+) or without (-) 0.3 M NaCl (high or low osmolality, respectively); OMPs were purified from samples taken hourly and subjected to SDS-PAGE for *S. typhi* or to urea-SDS-PAGE for *E. coli*. Strains carrying deletions in either *ompC* or *ompF* were used to ascertain the positions of both porins (see Materials and Methods and Fig. 3). Data for OMPs at 4, 6, and 10 h are shown.

46

synthesis in *S. typhi*, a specific mutation was constructed in this locus by replacing this operon with a Km^r cassette, using plasmid pKB8 (Table 1; see Materials and Methods). Mutations in either the *ompC* or *ompF* gene were also constructed by using plasmids pKC17 and pKF30 (Table 1; see Materials and Methods). The resultant *S. typhi* mutant strains were named STY81 (Δ ompB), STY171 (Δ ompC), and STYF302 (Δ ompF) (Table

Ong. Op.	OPERATOR	Session	PROOF:	PE's:	AA's:	COMMENTS	ARTNO:
1st cac, 2nd ww	dawsonb	3					

... compared the expression levels of *S. typhi ompC-lacZ* and *E. coli ompC-lacZ* in *S. typhi* and *E. coli* wild-type strains respectively

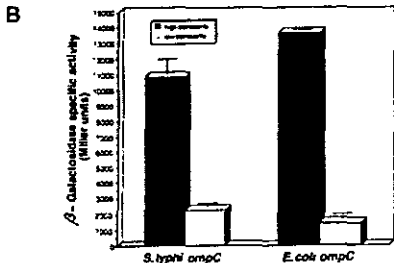
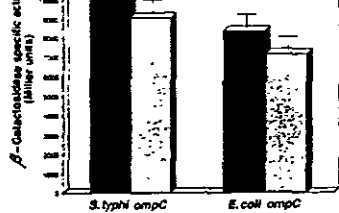


FIG 2. Expression of *S. typhi* and *E. coli ompC-lacZ* fusions in a heterologous background. *S. typhi* IMSS-1 (A) and *E. coli* MC4100 (B) strains carrying either the *S. typhi* or the *E. coli ompC-lacZ* fusion were grown in medium A with (high osmolarity) or without (low osmolarity) 0.3 M NaCl. β -Galactosidase activity was measured from samples taken hourly from duplicate cultures. The data show the activity attained after 5 h of growth, a point where osmoregulation was most apparent for both the *E. coli* OmpC and OmpF porins, and for *S. typhi* OmpF. As shown in Fig. 1, and represent the average of three different experiments.

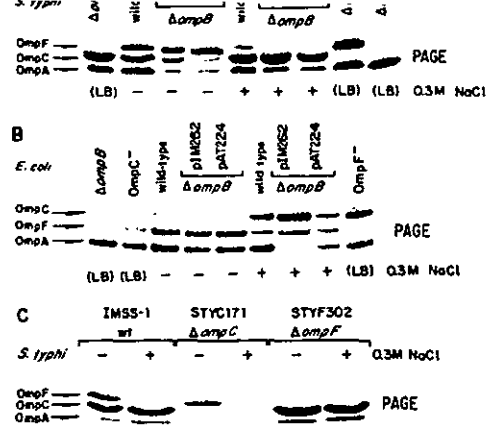


FIG 3. OMP electrophoretic patterns from *S. typhi* and *E. coli* $\Delta ompB$ strains complemented with either the *S. typhi* or *E. coli* *ompB* operon. Cells were grown in medium A with (+) or without (-) 0.3 M NaCl (high or low osmolarity, respectively) or in LB. OMPs were purified from culture samples obtained after 5 h of growth at 37°C and then subjected to SDS-PAGE (*S. typhi*) or urea-SDS-PAGE (*E. coli*) as described in Materials and Methods. Positions of the *S. typhi* and *E. coli* OMPs are shown on the left and correspond to the following strains: (A) *S. typhi* STYF302 ($\Delta ompB$), IMSS-1 (wild type), STY81 ($\Delta ompB$) pIM262 (pBR322 carrying *S. typhi ompB*), STY81 ($\Delta ompB$) pAT224 (pBR322 carrying *E. coli ompB*), STY81 ($\Delta ompB$), and STY81 ($\Delta ompB$); (B) *E. coli* SG4803900 ($\Delta ompB$), MH760 (*ompR472* OmpC⁻ OmpF⁺), MC4100 (wild type), SG4803900 ($\Delta ompB$) pIM262, SG4803900 ($\Delta ompB$) pAT224 and MH1461 (*envZ11* OmpC⁻ OmpF⁺). (C) OMP profile of control strains used to ascertain the electrophoretic mobilities of OmpC and OmpF: *S. typhi* IMSS-1 (wild type [wt]), STY81 ($\Delta ompC$), and STYF302 ($\Delta ompF$).

1). The disruption of each gene was confirmed by Southern blot hybridization with the appropriate *omp* probe and the Km^r gene (data not shown).

Deletion of the *ompB* operon abrogated the expression of OmpC and OmpF (Fig. 3A, last lane). Deletion of *ompC* and *ompF* generated phenotypes OmpC⁻ OmpF⁺ and OmpC⁺ OmpF⁻, respectively, where each porin was still expressed as in the wild type (Fig. 3A and C). The electrophoretic patterns of these strains were used for confirming the identity of each porin.

The lack of *S. typhi ompC* osmoregulation was determined both by the *S. typhi ompB* operon and by another unknown factor(s) present in *S. typhi*. To explore the possibility that the sequence differences found between the *S. typhi* and *E. coli ompB* operons determined the differences in behavior of OmpC expression in *S. typhi* (19), the *S. typhi* STY81 and *E. coli* SG4803900 *ompB* deletion mutant strains, which fail to produce both OmpC and OmpF, were complemented with either the *S. typhi* or *E. coli ompB* operon. Figures 3A and B show the OMP electrophoretic profiles of these strains complemented with one of plasmids pIM262 and pAT224 (pBR322 derivatives carrying the *S. typhi* and *E. coli ompB* operons, respectively [Table 1]).

The OMP profile of *S. typhi* STY81 complemented with *S. typhi ompB* (pIM262) showed that the proportion of OmpC and OmpF was similar to that of the wild type in both low and

high osmolarity (Fig. 3A). Interestingly, when STY81 was transformed with *E. coli ompB* (pAT224), *S. typhi* OmpC expression was osmoregulated; that is, its expression with respect to OmpF was reduced in low osmolarity and increased at high osmolarity, as has been described for *E. coli* (Fig. 3A).

The reciprocal experiments with *E. coli* SG4803900 ($\Delta ompB$) were carried out. When complemented with pAT224 (*E. coli ompB*), this strain showed a wild-type OMP profile in both low and high osmolarity (Fig. 3B). Surprisingly, when complemented with pIM262 (*S. typhi ompB*), the OMP pattern showed that OmpC expression was still repressed in low osmolarity and induced in high osmolarity (Fig. 3B). Thus, *E. coli ompB* was osmoregulated even when under the control of the *S. typhi ompB* operon, as long as it was in *E. coli*. A quantitative densitometric analysis of the gel bands present in Fig. 3A and B further supported the observations described above (data not shown). Furthermore, the same effects were seen with other constructs, regardless of plasmid copy number (data not shown).

These observations were further confirmed and quantified by measuring the activity of *S. typhi ompC-lacZ* and *E. coli ompC-lacZ* fusions (plasmids pSCZ10 and pECZ20, respectively) carried by *S. typhi* and *E. coli* $\Delta ompB$ strains, complemented either with pIM261 (pACYC184 carrying the *S. typhi ompB* [Table 1]) or with pIM40 (pACYC184 carrying *E. coli ompB* [Table 1]). Complemented strains were grown in me-

T

Orig. Op.	OPERATOR:	Session	PROOF:	PE's:	AA's	COMMENTS	ARTNO:
1st cac. 2nd vw	dawsonb	3		2			

Deletion of *ompC* (or *ompF*) generated phenotypes OmpC⁻ OmpF⁺ and OmpC⁺ OmpF⁻, respectively, ...

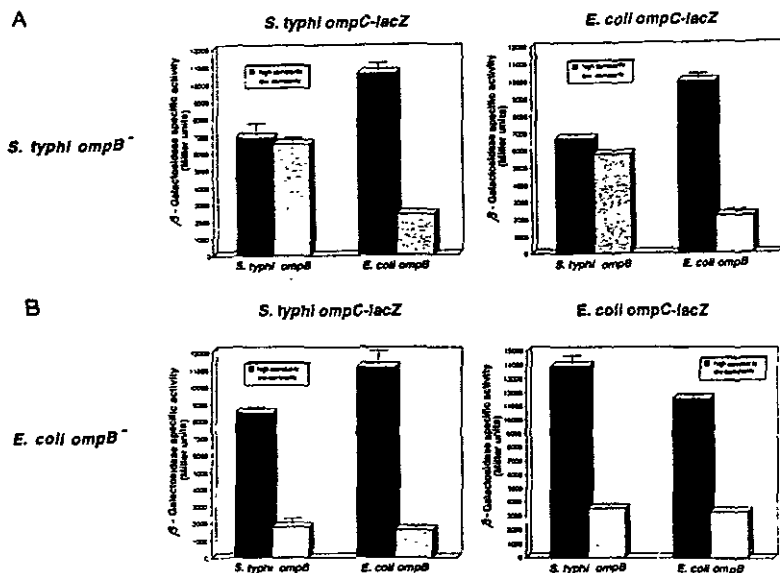


FIG. 4. Expression of *S. typhi* and *E. coli ompC-lacZ* fusions in $\Delta ompB$ mutant strains complemented with a homologous or heterologous *ompB* operon. Expression of *S. typhi ompC-lacZ* and *E. coli ompC-lacZ* fusions in *S. typhi* $\Delta ompB$ and *E. coli* $\Delta ompB$ strains complemented with the *S. typhi ompB* (pIM261) or *E. coli ompB* (pIM40) operon was measured after growth in medium A with or without 0.3 M NaCl (high or low osmolarity, respectively). β -Galactosidase activity was assayed from samples taken hourly from duplicate cultures. The data show the activity after 5 h of growth and represent the average of two different experiments.

dium A with or without 0.3 M NaCl (high or low osmolarity, respectively), and β -galactosidase activity was measured throughout the growth curve.

Expression of *S. typhi ompC-lacZ* or *E. coli ompC-lacZ* in *S. typhi* $\Delta ompB$ showed that expression of *S. typhi* or *E. coli ompC* was regulated by osmolarity when the strain was complemented with the *E. coli ompB* operon but was independent of osmolarity when the strain was complemented with the *S. typhi ompB* operon (Fig. 4A). In contrast, analysis of the expression of *S. typhi ompC-lacZ* or *E. coli ompC-lacZ* in *E. coli* $\Delta ompB$ showed that expression of *S. typhi* and *E. coli ompC* was regulated by osmolarity when the strain was complemented with *E. coli ompB* or even with the *S. typhi ompB* operon (Fig. 4B).

All of these results lead to the notion that the EnvZ and OmpR regulators coded by the *S. typhi ompB* operon, in conjunction with one or more components present in *S. typhi*, determine the high levels of *ompC* expression at high and low osmolarity.

DISCUSSION

The amount of the OmpC and OmpF proteins in the outer membrane of *E. coli* varies depending on the osmolarity of the culture media; however, it is considered that the total amount of these two proteins remains constant, since their relative levels fluctuate in a reciprocal manner. An increase in osmolarity results in a decrease in the amount of the OmpF protein, with a concomitant increase in the amount of the OmpC protein (6, 7). Interestingly, in *S. typhi*, OmpC is highly expressed independent of medium osmolarity, whereas OmpF is osmoregulated as it is in *E. coli* (32). In this work, we have shown that *S. typhi* OmpC is synthesized similarly at low and high osmolarity throughout the growth curve (Fig. 1), while the

osmoregulation of OmpC expression in *E. coli* is observed mainly during the logarithmic phase.

We have also shown that the *S. typhi* and *E. coli ompC* genes are highly expressed at both low and high osmolarity in *S. typhi* but are osmoregulated in *E. coli*. We have observed in *S. typhi* a slight decrease in the activity of *ompC-lacZ* fusions under low osmolarity (Fig. 1A and 2), but this does not account for a noticeable reduction of protein incorporated in the outer membrane, as clearly happens in *E. coli* (Fig. 1B). In other words, in *S. typhi*, OmpC is always more abundant than OmpF, regardless of the growth conditions. This has also been observed by others, even though *ompC* expression in *S. typhi* was found to be slightly influenced by medium osmolarity and oxygen availability (3).

We have also demonstrated that expression of OmpC and OmpF porins is abolished in our *S. typhi* $\Delta ompB$ strain (Fig. 3A), as has been also shown for an $\Delta ompR$ derivative of *S. typhi* Ty2 (28). Therefore, *S. typhi* OmpC and OmpF are regulated by the OmpR and EnvZ proteins, as the *E. coli* major porins (9, 10). On the other hand, deletion of either *ompC* or *ompF* had no effect on expression of the gene coding for the other major porin: osmoregulation of OmpF synthesis was independent of OmpC expression; likewise, OmpC was still highly expressed in a $\Delta ompF$ background (Fig. 3C).

Moreover, our analysis of the expression of *S. typhi* and *E. coli ompC-lacZ* fusions (Fig. 4), in cross-complementation experiments with either the *S. typhi* or *E. coli ompB* operons in either the *S. typhi* or *E. coli* $\Delta ompB$ background showed that both *S. typhi* and *E. coli ompC* are not regulated by osmolarity when they are under the control of the *S. typhi ompB* in an *S. typhi* background. Interestingly, in this background, both genes are osmoregulated under *E. coli ompB*. In contrast, in *E. coli* they are both osmoregulated under *E. coli ompB* and, surprisingly,

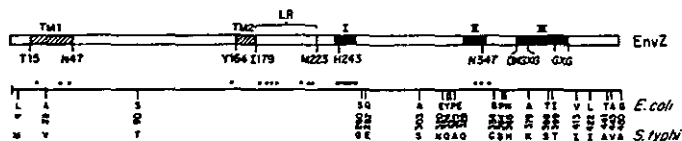


FIG. 5. Schematic representation of the EnvZ protein. The sequences corresponding to conserved regions in histidine kinase proteins (I, II, and III) (37) are indicated by solid boxes. Region I contains the conserved histidine residue (H243) (11, 36), region II contains the conserved asparagine (N347) (5), and region III has a conserved glycine-rich segment. This last region is represented by five residues that are especially conserved (DXGXG...GXG). Hydrophobic putative membrane-spanning sequences (TM1 and TM2) are indicated by hatched boxes. The LR (putative linker) region has been suggested to modulate the activity of EnvZ (27). Mutants in the *envZ* gene which produced an amino acid substitution in the EnvZ protein that provided insight into its function as an osmolarity sensor are indicated (black circles) (12, 13). Other residues that have been implicated in the overall mechanism of osmoregulation by EnvZ are also shown. An spontaneously mutant has been found clustered in regions LR, I, and III (references 7 and 11 and references therein). Below the schematic representation of EnvZ domains, amino acid differences between *E. coli* and *S. typhi* EnvZ proteins are shown, the numbers represent amino acid positions.

are also osmoregulated by *S. typhi ompB* (Fig. 4). Furthermore, similar results were observed with OMP electrophoretic patterns from *S. typhi* and *E. coli* Δ *ompB* strains complemented with either the *S. typhi* or *E. coli* *ompB* operon (Fig. 3A and B).

Thus, there appear to be unknown factors in *S. typhi* that, together with the EnvZ and OmpR regulatory proteins, determine the particular behavior of OmpC expression. The alternative of having a factor present in *E. coli*, but absent in *S. typhi*, that allows osmoregulation of *ompC* is not supported by our observations, since both *S. typhi ompC* and *E. coli ompC* were osmoregulated in *S. typhi* under *E. coli ompB* (Fig. 4). However, we cannot discount more complex models, such as one in which the unknown factor(s) is present both in *S. typhi* and *E. coli* but acts somewhat differently in the two species.

In particular, it is tempting to speculate that differences between sequences in the EnvZ proteins of *S. typhi* and *E. coli* may account for the different levels of *ompC* expression, by mediating different molecular interactions. As mentioned above, comparison of OmpR and EnvZ protein sequences from *E. coli* and *S. typhi* has shown that the OmpR regulatory proteins are identical in *S. typhi* and in *E. coli*, while the EnvZ sensor protein differs in 21 of 450 amino acid residues between the two bacteria (19). The EnvZ protein belongs to the family of histidine kinase proteins, which is defined by regions of conserved sequences generally located near the C terminus (Fig. 5) (37). The whole C terminus of the sensor protein is the transmitter module, acting as a kinase/phosphatase upon the N-terminal receiver module of the OmpR regulator protein (12). It is thus remarkable that 18 of 21 differences between the *E. coli* and *S. typhi* EnvZ proteins lie toward the carboxy terminus, between residues 260 and 450 (19) (Fig. 5). In this context, analyses of chimeric proteins and site-directed mutants will be required in order to characterize the molecular features in EnvZ that confer its particular behavior in *S. typhi*.

Moreover, it is thought that the concentration of OmpR-phosphate modulates the reciprocal regulation of porin gene expression in *E. coli* in response to osmolarity (24, 29, 33); however, it is uncertain if different OmpR-phosphate levels play a role in the osmolarity-independent expression of *ompC* in *S. typhi*. In particular, since *S. typhi* OmpF expression is osmoregulated as in *E. coli*, one could envision that the OmpR-phosphate levels indeed change according to osmolarity. Furthermore, the observation that the *S. typhi ompB* operon is able to correctly osmoregulate porin synthesis in an *E. coli* background also suggests that *S. typhi* EnvZ can modulate the phosphorylation of OmpR in response to osmolarity.

These observations have evidenced differences between *S. typhi* and *E. coli* that could play a role in bacterial physiology, possibly by having an effect on how the bacteria survive in the environment or during pathogenesis. However, we do not

know whether the dissimilar levels of *ompC* expression can affect bacterial virulence or any specific physiological function. It is interesting that the *ompB* operon has been involved in bacterial virulence, which reflects the pleiotropic role of this regulatory system in the physiology of *Salmonella* (4, 17, 28). Another functional polymorphism has been found in *Salmonella*. The *spvR* genes of *S. dublin* and *S. typhimurium* determine the different regulation patterns of SpvA; moreover, the two *spvR* genes have relatively few differences in their nucleotide sequences (38). These findings raise the interesting question of whether the allelic differences in genes, and subtle differences in the regulatory mechanisms, play a role in the host spectrum or the pathogenesis of salmonellosis. Our interest in resolving this question has led us to probe structure-function relationships in EnvZ.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Eugenio López-Bustos for help with the densitometric analysis.

This research was supported by grants from the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA IN206594 to E.C. and J.L.P.; PADEP 30382, 30503, and 30530 to I.M.-F.), by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT 3466-N to E.C.), and by an International Research Scholar Award (75191-527102 to E.C.) from the Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase Md. I.M.-F. was supported by a Ph.D. fellowship (90278) from the CONACyT.

REFERENCES

- Calva, E., J. L. Puente, and J. J. Calva. 1988. Research opportunities in typhoid fever: epidemiology and molecular biology. *BioEssays* 9:173-177.
- Casadaban, M. J. 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* 104:541-555.
- Contreras, L., L. Mijang, C. S. Toro, and G. C. Mora. 1995. Heterologous expression of *Escherichia coli* porin genes in *Salmonella typhi* Ty2: regulation by medium osmolarity, temperature and oxygen availability. *FEMS. Microbiol. Lett.* 133:105-111.
- Dorman, C. J., S. Chatfield, C. F. Higgins, C. Hayward, and G. Dougan. 1989. Characterization of porin and *ompR* mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*: *ompR* mutants are attenuated in vivo. *Infect. Immun.* 57:2136-2140.
- Dutta, R., and M. Inouye. 1996. Reverse phosphotransfer from OmpR to EnvZ in a kinase γ -phosphatase⁻ mutant of EnvZ (EnvZ-N347D): a bifunctional signal transducer of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 271:1424-1429.
- Forst, S., and M. Inouye. 1988. Environmentally regulated gene expression for membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:21-42.
- Forst, S. A., and D. L. Roberts. 1994. Signal transduction by the EnvZ-OmpR phosphotransfer system in bacteria. *Res. Microbiol.* 145:363-373.
- Garret, S., R. K. Taylor, T. J. Silhavy, and M. L. Berman. 1985. Isolation and characterization of Δ *ompB* strains of *Escherichia coli* by a general method based on gene fusions. *J. Bacteriol.* 162:840-844.
- Hall, M. N., and T. J. Silhavy. 1981. Genetic analysis of the *ompB* locus in *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* 151:1-15.
- Hall, M. N., and T. J. Silhavy. 1981. The *ompB* locus and the regulation of the major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* 146:23-43.

11. Hsling, W., and T. J. Silhavy. 1997. Function of conserved His-243 in phosphatase activity of EnvZ, the sensor for porin osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179:3729-3735.
12. Igo, M. M., and T. J. Silhavy. 1988. EnvZ, a transmembrane environmental sensor of *Escherichia coli* K-12 is phosphorylated in vitro. *J. Bacteriol.* 170:5971-5973.
13. Kanaamaru, K., H. Aiba, S. Mizushima, and T. Mizuno. 1989. Signal transduction and osmoregulation in *Escherichia coli*. A single amino acid change in the protein kinase, EnvZ, results in loss of its phosphorylation and dephosphorylation abilities with respect to the activator protein, OmpR. *J. Biol. Chem.* 264:21633-21637.
14. Kaniga, K., I. Deter, and G. R. Cornelis. 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *blaZ* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 109:137-141.
15. Kawaji, H., T. Mizuno, and S. Mizushima. 1979. Influence of molecular size and osmolarity of sugars and dextrans on the synthesis of outer membrane proteins O-8 and O-9 of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 140:843-847.
16. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
17. Lindgren, S. W., L. Stojiljkovic, and P. Heffron. 1996. Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:4197-4201.
18. Lobos, S. R., and G. C. Mora. 1991. Alteration in the electrophoretic mobility of OmpC due to variations in the ammonium persulfate concentration in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 12:448-450.
- 18a. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
19. Martínez-Flores, L., V. H. Bustamante, J. L. Puente, and E. Calva. 1995. Cloning and characterization of the *Salmonella typhi* *ompR* and *envZ* genes. *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 3:135-144.
20. Mikhail, F. A., I. N. Shkolentko, and T. P. Croughan. 1995. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160:63-67.
21. Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics, p. 352-355 and 403-404. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
22. Miller, V. L., and J. J. Mekalanos. 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* 170:2575-2583.
23. Mizuno, T., M. Y. Chou, and M. Inouye. 1983. A comparative study on the genes for three porins of the *Escherichia coli* outer membrane. *J. Biol. Chem.* 258:6932-6940.
24. Mizuno, T., and S. Mizushima. 1990. Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. *Mol. Microbiol.* 4:1077-1082.
25. Mizuno, T., E. T. Wurtzel, and M. Inouye. 1982. Cloning of the regulatory genes (*ompR* and *envZ*) for the matrix proteins of the *Escherichia coli* outer membrane. *J. Bacteriol.* 150:1462-1466.
26. Ochman, H., A. S. Gerber, and D. L. Hartl. 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120:621-623.
27. Pavk, H., and M. Inouye. 1997. Mutational analysis of the linker region of EnvZ, an osmosensor in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179:4382-4390.
28. Pickard, D., J. Li, M. Roberts, D. Maskell, D. Hone, M. Levine, G. Dougan, and S. Chatfield. 1994. Characterization of defined *ompR* mutants of *Salmonella typhi*: *ompR* is involved in the regulation of Vi polysaccharide expression. *Infect. Immun.* 62:3984-3993.
29. Prall, L. A., W. Hsling, K. E. Gibson, and T. J. Silhavy. 1996. From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 20:911-917.
30. Puente, J. L., V. Alvarez-Scherer, G. Gosset, and E. Calva. 1989. Comparative analysis of the *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* *ompC* genes. *Gene* 83:197-206.
31. Puente, J. L., V. Flores, M. Fernández, Y. Fuchs, and E. Calva. 1987. Isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. *Gene* 61:75-83.
32. Puente, J. L., A. Verdugo-Rodríguez, and E. Calva. 1991. Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* *ompC* is influenced differently by medium osmolarity; dependence on *Escherichia coli* OmpR. *Mol. Microbiol.* 5:1205-1210.
33. Russo, F. D., and T. J. Silhavy. 1991. EnvZ controls the concentration of phosphorylated OmpR to mediate osmoregulation of the porin genes. *J. Mol. Biol.* 222:567-580.
34. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
35. Shapiro, S. K., J. Chou, F. V. Richaud, and M. J. Casadaban. 1983. New versatile plasmid vectors of hybrid proteins code by a cloned gene fused to *lacZ* gene sequences encoding an enzymatically active carboxy-terminal portion of β -galactosidase. *Gene* 25:71-82.
36. Skarphol, K., J. Waukan, and S. A. Forst. 1997. Role of H-243 in the phosphatase activity of EnvZ in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179:1413-1416.
37. Stock, J. B., A. J. Ninfa, and A. M. Stock. 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* 53:450-490.
38. Taira, S., P. Heiskanen, R. Hurme, H. Heikkilä, P. Rilkonen, and M. Rhen. 1995. Evidence for functional polymorphism of the *spvR* gene regulating virulence gene expression in *Salmonella*. *Mol. Gen. Genet.* 246:437-444.