

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

03072  
14  
2eje.

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION INICIAL DE LOS GENES *ompR/envZ* DE  
*Salmonella typhi*

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A    L A    A L U M N A

I R M A   M A R T I N E Z   F L O R E S

CUERNAVACA, MOR., 1994.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DEL DR. EDMUNDO CALVA MERCADO, DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LA UNAM, CUERNAVACA, MOR. MEXICO.

ESTE TRABAJO FUE ASESORADO POR EL SIGUIENTE COMITE TUTORIAL:

DR. EDMUNDO CALVA MERCADO,	TUTOR PRINCIPAL.
DR. FERNANDO VALLE BAHEZA,	COTUTOR.
DR. MARIO SOBERON CHAVEZ,	COTUTOR.

DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO, EL AUTOR FUE BECARIO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACyT) Y DEL PROYECTO HOWARD HUGHES MEDICAL INSTITUTE.

## I N D I C E

	página	
I.	Introducción	1
II.	Antecedentes	12
III.	Objetivos	13
IV.	Materiales y Métodos	13
V.	Resultados	14
	a) Identificación de la existencia de los genes <i>ompR</i> y <i>envZ</i> en <i>S. typhi</i> .	14
	b) Aislamiento de un bacteriofago recombinante, conteniendo los genes <i>ompR</i> y <i>envZ</i> de <i>S. typhi</i> .	14
	c) Aislamiento y clonación de los genes <i>ompR</i> y <i>envZ</i> de <i>S. typhi</i> .	15
	d) Secuencia y Análisis de la secuencia.	17
VI.	Discusión y Conclusiones	18
VII.	Referencias	27
VIII.	Apéndice	38

## INTRODUCCION.

El surgimiento de nuevas técnicas de biología molecular ha permitido obtener adelantos en el estudio de determinantes de virulencia, lo cual ha generado valiosa información que podría ayudar en el futuro a la resolución de enfermedades infecciosas.

La salmonelosis es un problema de salud a nivel mundial. En nuestro país la fiebre tifoidea (FT), una enfermedad entérica de carácter invasivo, cuyo agente causal es *Salmonella typhi* (*S. typhi*), constituye un problema de salud.

*S. typhi* es una enterobacteria gram-negativa perteneciente al serotipo 9,12,d, Vi. Esta bacteria penetra al organismo vía tracto gastrointestinal, usualmente por ingestión de comida o agua contaminada con heces de humano. Durante cierta etapa de la enfermedad, *S. typhi* produce bacteremia. (Finlay and Falkow, 1989; Calva et al., 1988).

La fiebre es la principal manifestación clínica de la FT; sin embargo, dentro de la sintomatología común de esta enfermedad se presentan intensos dolores de cabeza, debilitamiento general y diarrea (Calva et al., 1988).

*S. typhi*, como todas las bacterias gram negativas, tiene una envoltura celular formada por una membrana externa y una membrana interna, divididas por un espacio periplásmico. La membrana externa está formada en su mayoría por lípidos, lipopolisacáridos y proteínas (Benz, 1988).

Las proteínas de membrana externa (PME), que se encuentran expuestas a la superficie de la célula, pueden ser valiosas en el diagnóstico de la FT, ya que son reconocidas por sueros de pacientes con FT (Calderón et al, 1986; Verdugo-Rodríguez et al., 1993a,b). Además, se ha reportado que estas proteínas son inmunogénicas, es decir, son capaces de inducir inmunidad protectora contra *S. typhi* y *S. typhimurium*, en modelos experimentales en ratón (Isibasi et al., 1988; Udhayakumar et al., 1987).

En *E. coli* las PME más abundantes son OmpC, OmpF y OmpA. Se ha reportado que OmpA es una proteína estructural de la membrana, mientras que OmpC y OmpF juegan un papel importante, no sólo por formar parte de la estructura basal de la membrana, sino también por formar poros, por lo cual reciben el nombre de porinas (Osawa and Mizushima, 1983; Benz, 1988). De esta forma, las porinas OmpC y OmpF en *Escherichia coli*, producto de los genes *ompC* y *ompF*, respectivamente, facilitan el transporte de pequeñas moléculas a través de la membrana por difusión pasiva, sirven como receptores para varios bacteriófagos y facilitan el transporte de colicinas (Mizuno et al., 1983; Misra and Benson, 1988).

Las bacterias muestran una gran capacidad para responder a pequeñas fluctuaciones en sus alrededores y dar una respuesta adaptativa rápida. Las señales dentro del citoplasma y en el ambiente son usadas para controlar la actividad celular que medía un tipo particular de respuestas (Stock et al 1989b).

En *E. coli*, la síntesis de OmpC y OmpF es influenciada por la osmolaridad del medio. OmpC es preferencialmente producida en alta osmolaridad, mientras que la expresión de OmpF es predominante en baja osmolaridad (Van Alphen and Lugtenberg, 1977; Hall and Silhavy, 1979). Se ha demostrado que el operón *ompB*, conformado por los genes *ompR* y *envZ*, interviene en la regulación de la expresión de OmpC y OmpF a nivel transcripcional.

El mecanismo molecular responsable del acoplamiento estímulo/respuesta, a menudo involucra dos tipos de componentes: una proteína-histidina cinasa (PHK), proteína sensora que detecta estímulos extracelulares o intracelulares, la cual transmite la señal a una segunda proteína reguladora de respuesta (PRR); por lo cual también recibe el nombre de sistema regulatorio de dos componentes.

Las proteínas EnvZ y OmpR conforman un ejemplo de este sistema. Estudios de pares regulatorios análogos, tales como CheA/CheY, PhoR/PhoB, NR<sub>II</sub>/NR<sub>I</sub> y *virA/virG*, muestran gran similitud estructural y funcional. A. Stock y colaboradores (1989), reportaron que hay cuatro regiones altamente conservadas en las PHK, una de las cuales contiene el residuo His, en el cual se lleva a cabo la fosforilación; las otras tres regiones se encuentran formando un dominio homólogo de aproximadamente 100 aminoácidos (aa), localizado en la región carboxi-terminal. Además, las PHK presentan regiones hidrofóbicas características de secuencias que cruzan la membrana. Algunos de los miembros de esta familia son

EnvZ, PhoR, PhoM, CheA y NR<sub>III</sub>. Por otro lado, todas las PRR presentan un dominio homólogo de aproximadamente 100 residuos, localizados en la región amino-terminal; en algunos casos, las PRR se clasifican en tres subfamilias, definidas por la homología entre sus dominios C-terminal. Los pares regulatorios (PRR), correspondientes a las PHK mencionadas anteriormente, son: OmpR, PhoB, ORF2, CheY y NR<sub>I</sub>, respectivamente (Gross et al., 1989; Stock et al., 1990).

EnvZ (PHK) es una proteína de membrana interna de 450 aa, que existe en una proporción muy baja en la bacteria, menos de 10 copias por célula. Su topología es similar a la de las proteínas transductoras quimiotácticas de *E. coli* y *S. typhimurium*; y consta de dos dominios transmembranales: un dominio de receptor periplásmico y un dominio de señal citoplásmico, en donde se localiza el residuo His243 sitio de la fosforilación. (Forst et al., 1987). OmpR (PRR) es una proteína citoplásmica de 239 aa que se encuentra en mayor proporción que EnvZ. La región amino-terminal de OmpR sirve como sustrato para la fosforilación por EnvZ y se piensa que el dominio carboxi-terminal modula la función de unión al DNA (Slauch and Silhavy, 1990; Harlocker et al., 1993).

Modelos propuestos para el mecanismo de regulación de las porinas por OmpR/EnvZ, proponen que EnvZ (PHK) actúa como una molécula sensora que se autofosforila en el residuo de His243 cuando la presión osmótica es alta. EnvZ fosforilada (EnvZ-P) es capaz de transferir el fosfato a la OmpR (PRR), en los residuos de aspártico en las posiciones 11, 12 y 55. OmpR fosforilada (OmpR-P)



se convierte así en una proteína activa, capaz de unirse a regiones específicas del DNA. (Delgado et al., 1993; Russo and Silhavy, 1991).

OmpR se une a dos diferentes motivos en el DNA, la caja A (sitios de alta afinidad para OmpR-P) y las cajas B (sitios de baja afinidad para OmpR-P), localizadas en las regiones promotoras de *ompF* y *ompC*. En un modelo propuesto por J. B. Stock (1989) y colaboradores, se describe que, en baja osmolaridad, en donde los niveles de OmpR-P son bajos, se activa la transcripción de *ompF* por unión de OmpR-P a sitios de alta afinidad (caja A), en la región regulatoria de *ompF*. Por otro lado, en medio de alta osmolaridad, la cantidad de OmpR-P es mayor, así que OmpR-P puede unirse a sitios de menor afinidad (cajas B) en la región promotora de *ompF* y *ompC*, reprimiendo la transcripción de *ompF* y activando la de *ompC*, como se muestra en la Fig.1 (Stock et al., 1989).

Cepas de *E. coli*, mutadas en los genes *ompR* y *envZ*, han sido extensamente caracterizadas en un esfuerzo para entender como controlan la expresión de OmpC y OmpF. Los fenotipos de las cepas mutadas son muy variados y no se presentan en mutaciones específicas; es decir, un mismo fenotipo lo puede dar mutaciones puntuales diferentes en el mismo gene, o puede ser provocado por una mutante en *ompR* o una en *envZ* (Stock et al., 1989 b). Por otro lado, en experimentos en los que se removió el gene *envZ*, se observó la expresión de OmpC y OmpF; esto podría explicarse pensando que otra PHK puede actuar en lugar de EnvZ para fosforilar OmpR (Forst et al., 1988). La posibilidad de una regulación cruzada

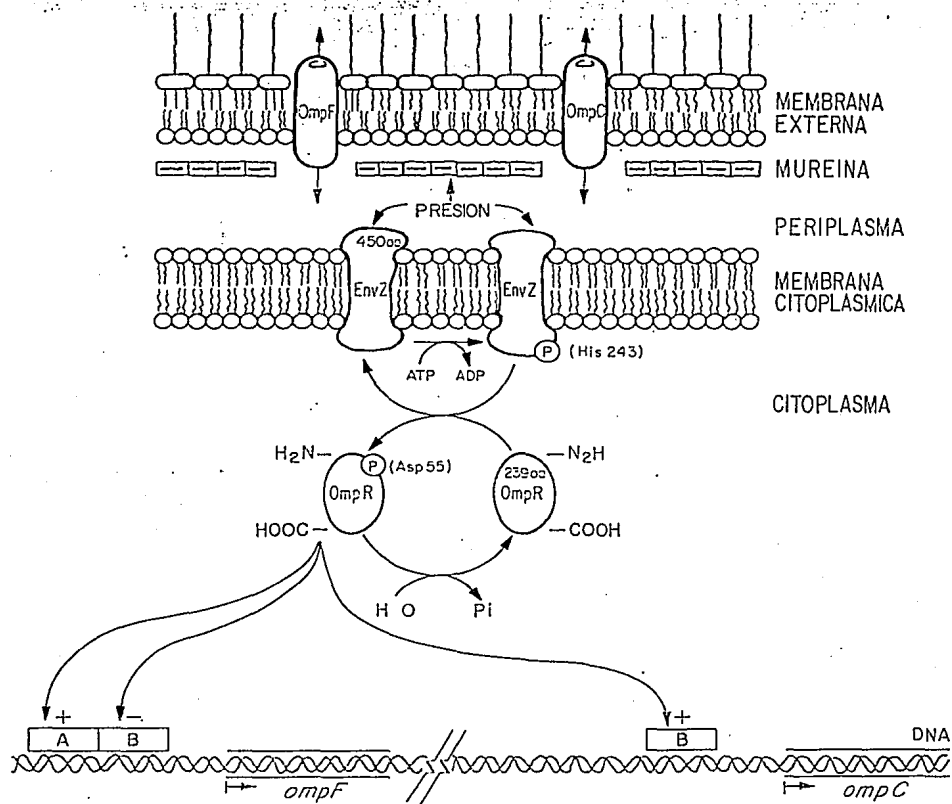


Fig.1 Modelo para la regulación de la síntesis de OmpC y OmpF en *E. coli*. P : grupo fosfato; + : activación del gene; - : represión del gene.

ha sido demostrada in vitro, verificando que OmpR puede ser fosforilada por CheA o NR<sub>II</sub> (Wanner, 1992).

Diferentes experimentos con mutaciones, han revelado que *ompR* y *envZ* no intervienen exclusivamente en la regulación de OmpC y OmpF. Entre los genes regulados por OmpR, se encuentra una proteasa de membrana externa *opr* (Stock et al., 1989). Mutaciones sin sentido en *envZ* pueden afectar la síntesis de MalE, LamB y la proteasa *cpr*, entre otras (Gibson et al., 1987).

OmpR y EnvZ son requeridos para la expresión normal del gene *tppB*, el cual codifica para la tripéptido permeasa. Este efecto es directamente a nivel transcripcional y no es una consecuencia de la reducción en la síntesis de porinas; además, la expresión de *tppB* no es controlada osmóticamente (Gibson et al., 1987). Otros genes son reprimidos por un mecanismo dependiente de EnvZ/OmpR, éstos incluyen a *phoA* y *phoE*, así como los genes involucrados en el transporte de fierro. Este mecanismo de represión no está bien entendido, pero podría involucrar la unión de OmpR-P a sitios de baja afinidad en regiones promotoras de los genes. (Case et al., 1986; Lundrigan and Earhart, 1981).

Considerando los comentarios descritos anteriormente, se ha comprobado que OmpR y EnvZ forman un sistema regulatorio pleiotrópico (Stock et al., 1989).

Por otro lado, se ha descrito la presencia de las proteínas OmpC y OmpF en *S. typhimurium* (Sato and Yura, 1979) y se observó que su expresión, en respuesta a la osmolaridad, es similar a la descrita para *E. coli* (Liljestöm et al., 1982 a,b; 1987). Asimismo,

se aislaron los genes *ompR* y *envZ* en esta bacteria, mostrando una gran homología comparados con los de *E. coli* ( ver tabla II, Apéndice I). (Liljeström et al., 1988).

En un estudio de virulencia se demostró que mutaciones sólo en *ompC* u *ompF*, no afectan la virulencia de *S. typhimurium* en el sistema de ratón, mientras que una mutación en *ompR* presenta un estricto efecto en la virulencia de esta cepa, siendo altamente atenuada *in vivo* (Dorman et al., 1989). Por otro lado, se demostró que en cepas que llevan dobles mutaciones (en *ompC* y *ompF*), resultaron en la atenuación de la virulencia de una cepa de *S. typhimurium*; sin embargo, el nivel de atenuación no es el mismo que cuando la mutación es en *ompR*, ya que el efecto de esta última es más estricto. Este hecho podría explicarse si tomamos en cuenta que mutaciones en *ompR* son altamente pleiotrópicas, mientras que mutaciones en *ompC* y *ompF*, los cuales son genes estructurales, son específicas (Chatfield et al., 1991). También tenemos información, que cepas de *Shigella flexneri* mutadas en *ompB* se ven atenuadas en su virulencia (Bernardini et al., 1993; 1990).

En nuestro laboratorio se observó la expresión de las proteínas *OmpF* y *OmpC* en *S. typhi* (Fig. 2); la proteína *OmpF* se expresa en respuesta a la osmolaridad del medio, de igual forma que en *E. coli*, mientras que *OmpC* responde de forma diferente, es decir, no reprime su expresión en baja osmolaridad (Puente et al., 1991). Se realizó también el aislamiento y caracterización del gene *ompC* de *S. typhi* y se observó que la expresión de *OmpC* de *S. typhi* en *E. coli* es dependiente del activador transcripcional *OmpR* de *E.*

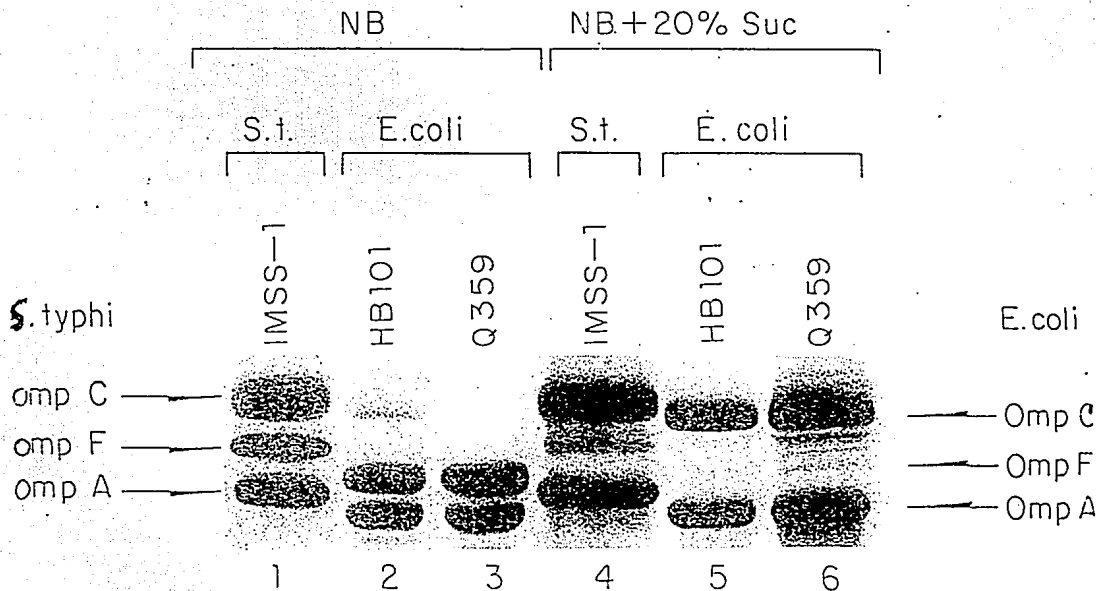


Fig.2 Patrón electroforético de preparación de proteínas de membrana externa (PME) de *S. typhi* (líneas 2, 3, 5 y 6); crecidas en baja osmolaridad (NB; líneas 1-3) o alta osmolaridad (NB + 20% sacarosa; líneas 4-6). Las posiciones de OmpC, OmpF y OmpA de *S. typhi* y *E. coli* son mostradas en los márgenes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

*coli*, como se puede ver en la Fig. 3, (Puentes et al., 1987; 1989; 1991). Esto nos sugirió que en *S. typhi* podría haber un mecanismo de regulación similar al de *E. coli* y *S. typhimurium* (OmpR/EnvZ), que tuviera diferencias que resultaran en una diferente respuesta a la osmolaridad del medio.

Con base en lo descrito anteriormente, algunas preguntas que nos gustaría contestar son:

- ¿Existe en *Salmonella typhi* un mecanismo de regulación similar al de *E. coli* y *S. typhimurium* (OmpR/EnvZ)?
- Si es el caso, los genes que codifican para estas proteínas ¿se encuentran agrupados en un operón de igual forma que en *E. coli* y en *S. typhimurium*, o se encuentran dispersos?
- ¿Qué tan parecidos son estos genes a los ya aislados en otras enterobacterias?

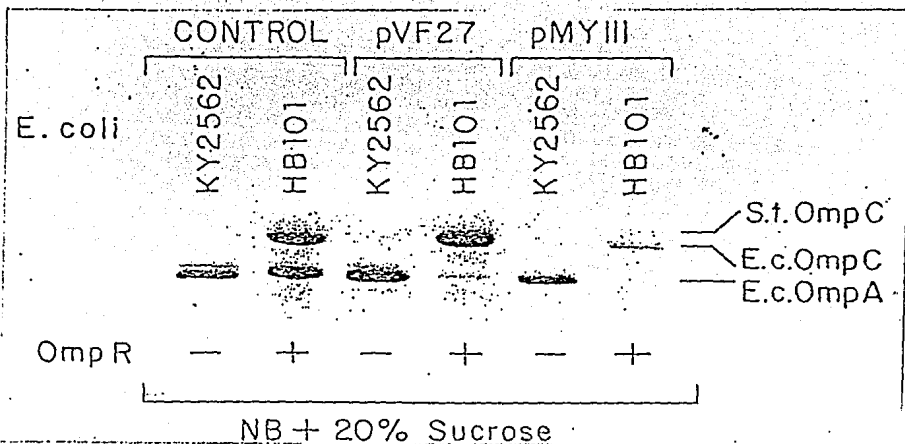


Fig.3 Patrón electroforético de preparaciones de PME de *E. coli* KY2562 (OmpR-) y HB101 (OmpR+), sin plásmido (controles) o bien, conteniendo el plásmido pVF27 (llevando ompC de *S. typhi*) o pMY111 (llevando ompC de *E. coli*). Las bacterias fueron crecidas en NB + 20% sacarosa (Puentes et al., 1991).

## ANTECEDENTES

Los antecedentes producidos por nuestro grupo de investigación para la caracterización de las proteínas de membrana externa (PME) de *S. typhi* son:

- La caracterización inicial de las PME como inmunógenos (Verdugo-Rodríguez et al 1993 a,b,c).
- Clonación de los genes para las proteínas de membrana externa OmpF-1 y PhoE (Puente, 1987; Fernández et al., en preparación).
- La clonación y caracterización del gene para la PME OmpC (Flores, 1988; Puente et al., 1987; Puente, 1988; Puente et al., 1989).
- La expresión de OmpC de *S. typhi* es diferente a la de *E. coli* en respuesta a la osmolaridad del medio. Fig. 2 (Puente et al., 1991).
- La expresión de OmpC de *S. typhi* en *E. coli* es dependiente del activador transcripcional OmpR de *E. coli*. Fig.3 (Puente et al., 1991).



## OBJETIVOS

- 1- Aislamiento de los genes *ompR* y *envZ* de *Salmonella typhi*.
- 2- Caracterización inicial de dichos genes.

## MATERIALES Y METODOS

Los materiales y métodos utilizados en este estudio se encuentran descritos en los pies de figura del apéndice.

Preparación de proteínas de membrana externa (PME).

Las células fueron cultivadas en medio LB (medio de Luria) y las fracciones de membrana insolubles en tritón X-100 fueron obtenidas, como describe Matsuya et al (1984).

Gel de poliacrilamida para electroforesis.

La preparación de PME fue sujeta a electroforesis (10h en 10mA), en gels de poliacrilamida, preparados con 11% de acrilamida, 0.3% bis-acrilamida y 6M urea. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie.

## RESULTADOS

Los resultados que cubren los objetivos de este trabajo son descritos con detalle en el apéndice.

En resumen, la estrategia que se siguió fue:

- I) Identificación de la existencia de los genes *ompR* y *envZ* en *S. typhi*, por medio de una hibridación tipo "Southern" del DNA de *S. typhi*, utilizando como sondas los genes *ompR* y *envZ* de *S. typhimurium* (apéndice: Fig. 1).
- II) Aislamiento de un bacteriofago recombinante, conteniendo los genes *ompR* y *envZ* de *S. typhi*. Para esto se utilizó un banco genómico de *S. typhi*, en el fago lambda 1059, realizando los siguientes pasos:
  - a) Rastreo de fagos recombinantes que pudieran contener las secuencias de *ompR* y *envZ*, mediante el método de Benton y Davis (como se describe en el pie de figura del apéndice, Fig: 2).
  - b) Se hacen agrupamientos de fagos (cinco fagos por grupo), utilizando fagos alrededor de la señal positiva por hibridación, en el muestreo anterior.
  - c) Digestión del DNA de los grupos de fagos con enzimas de restricción e hibridación tipo "Southern" utilizando como sonda *ompR* y *envZ* de *S. typhimurium*,

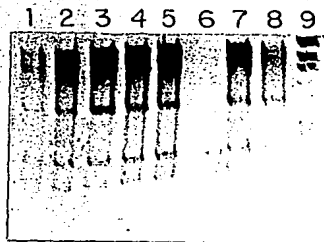
para identificar si alguno de los agrupamientos contiene un bacteriófago que llevara las secuencias buscadas, (apéndice: Fig.2 líneas a, b, c y d).

- d) Elección de un agrupamiento que dió señales positivas de hibridación (apéndice: Fig.2 líneas d). Este agrupamiento se amplificó y se utilizó para separar fagos individuales que pudieran contener las secuencias buscadas (como se describe en el inciso a).
- e) El DNA de los fagos individuales se digirió con enzimas de restricción y se determinó si contenían *ompR* y *envZ* por medio de hibridación tipo "Southern", utilizando como sondas *ompR* y *envZ* de *S. typhimurium*.
- f) Algunos de los fagos mostraron el mismo patrón de restricción (Fig. 4) e hibridaron de igual forma con *ompR* y *envZ* de *S. typhimurium*, por lo que concluimos que se trataba del mismo fago. A este fago se le designó MB2. (apéndice: Fig. 3).

### III) Aislamiento y clonación de los genes *ompR* y *envZ* de *S. typhi*.

- a) Se purificaron fragmentos de DNA conteniendo *ompR*, *envZ* y *ompB* de *S. typhi*. Esto se realizó digiriendo el fago MB2 con *EcoRI/SacI*, de donde se obtuvo un fragmento de 1.3kb que contiene el gene *ompR*; con *BglIII* obtuvimos un fragmento de 3.0kb que lleva el gene *envZ*; y con *SacI* un fragmento de 4.2kb que contiene el operón *ompB* completo. Los fragmentos

PANEL A



PANEL B



Fig.4 Patrón de restricción del DNA de los bacteriófagos recombinantes individuales digeridos con EcoRI/SacI (Panel A) y con EglIII (Panel B). Líneas 1-8, fagos individuales; línea 9, marcador de peso molecular.

fueron detectados por hibridación tipo "Southern", utilizando como sonda *ompR*, *envZ* y *ompB* de *S. typhimurium*. (apéndice: Fig. 2, líneas e y f).

b) Se subclonaron los fragmentos purificados en vectores tipo plásmido pUC, obteniendo los plásmidos pIM12, pIM18, pIM25, pIM26 y pIM30 (apéndice: Fig. 3).

#### IV) Secuencia y Análisis de la secuencia.

a) Se obtuvo la secuencia nucleotídica de los genes clonados, por el método de secuenciación de doble cadena de Sanger (apéndice, Fig. 4).

b) Se analizó la secuencia nucleotídica usando el programa GeneWorks (Intell, Genetics, Inc., Mountain View, Ca., USA); (apéndice: sección e, Tabla II y III y Figs. 4, 5 y 6).

## DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Al inicio de este trabajo se planteron varias preguntas, de la cuales ahora podemos dar respuestas.

En *S. typhi* existe un operón *ompB* equivalente al descrito para *E. coli* y *S. typhimurium* (Udhayakumar and Muthukkaruppan, 1987; Liljström et al., 1988), el cual se aisló y caracterizó. La discusión detallada de la secuencia se hace en la sección e, del apéndice. Se observó una gran similitud entre el operón *ompB* de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli*. Sin embargo, el hecho de que sean tan similares no descarta que los genes *ompR* y *envZ* estén involucrados de forma diferente en la regulación de la expresión del gene *ompC* de *S. typhi* en respuesta a la osmolaridad; ya que se ha observado en mutantes de *E. coli* reportadas (Tabla I), que cambios puntuales en *ompR* o *envZ*, que producen un cambio a nivel de aminoácidos (aa), resulta en un cambio en el fenotipo de PME en respuesta a la osmolaridad (ver Tabla I).

Un primer planteamiento nos conduce a preguntarnos si el aa 354 de la proteína EnvZ de *S. typhi* puede estar involucrado en la diferente respuesta regulatoria de la proteína OmpC (apéndice: Tabla III). Si analizamos la Tabla I, podremos notar que en EnvZ de *E. coli*, la mayoría de las mutaciones reportadas se encuentran cercanas al residuo His243 (residuo blanco de la fosforilación) y sólo una mutación cae alejada de esta región, la mutación *envZ30*, la cual cambia Tyr351Ser. Además, las mutaciones reportadas en OmpR de *E. coli* no están localizadas en una región específica, sino que se encuentran dispersas a lo largo de la proteína. Cabe hacer notar

TABLA I.  
Mutaciones en el operón *ompB* que afectan la expresión de *OmpC* y *OmpF* en *E. coli*.

GENE Y CARACTERISTICAS	ALELO	MUTACION	FENOTIPO	REFERENCIA
<i>ompR</i> 717 nucleótidos. Codifica para una proteína de 239 aa. Residuos importantes para la fosforilación: Asp 55, 11 y 12.	<i>ompR</i>	◄ Asp11Ala	<i>ompC</i> <sup>+</sup> <i>ompF</i> <sup>+</sup>	Delgado et al., 1993.
	<i>ompR</i>	◄ Asp12Ala	<i>ompC</i> <sup>+</sup> <i>ompF</i> <sup>+</sup>	Delgado et al., 1993.
	<i>ompR</i>	◄ Asp12Gln	<i>ompC</i> <sup>+</sup> <i>ompF</i> <sup>-</sup>	Brissette et al., 1991.
	<i>ompR36</i>	Arg15Cys	<i>ompC</i> <sup>c</sup> <i>ompF</i> <sup>-</sup>	Nara et al., 1986a,b.
	<i>ompR44</i>	Arg71Cys	<i>ompC</i> <sup>+</sup> <i>ompF</i> <sup>(+)</sup>	Nara et al., 1986a,b.
	<i>ompR</i>	◄ Asp55Gln	<i>ompC</i> <sup>+</sup> <i>ompF</i> <sup>-</sup>	Nakashima et al., 1991.
	<i>ompR</i>	◄ Asp55Ala	<i>ompC</i> <sup>c</sup> <i>ompF</i> <sup>c</sup>	Delgado et al., 1993.
	<i>ompR96A</i>	Glu96Ala	<i>ompC</i> <sup>-</sup> <i>ompF</i> <sup>-</sup>	Nakashima et al., 1991.
	<i>ompR115s</i>	Arg115Ser	<i>ompC</i> <sup>-</sup> <i>ompF</i> <sup>-</sup>	Nakashima et al., 1991.
	<i>ompR20</i>	Arg150Cys	<i>ompC</i> <sup>-</sup> <i>ompF</i> <sup>*</sup>	Nara et al., 1986a,b.
	<i>ompR101</i>	Gly164 a Arg182	<i>ompC</i> <sup>-</sup> <i>ompF</i> <sup>-</sup>	Nara et al., 1986a,b.
	<i>ompR119</i>	Val203Met	<i>ompC</i> <sup>-</sup> <i>ompF</i> <sup>c</sup>	Nara et al., 1986a,b.
	<i>ompR</i>	Val203Gln	<i>ompC</i> <sup>-</sup> <i>ompF</i> <sup>c</sup>	Harlocker et al., 1993
	<i>envZ</i> 1350 nucleótidos. Codifica para una proteína de 239 aa. Residuo importantes para la fosforilación: His 243.	<i>envZ</i>	Ala193Val	<i>ompC</i> <sup>+</sup> <i>ompF</i> <sup>-</sup>
<i>envZ</i>		Glu212Lys	<i>ompC</i> <sup>+</sup> <i>ompF</i> <sup>-</sup>	Harlocker et al., 1993.
<i>envZ3</i>		Ala219Val	<i>ompC</i> <sup>c</sup> <i>ompF</i> <sup>c</sup>	Waukan and Forst, 1992.
<i>envZ</i>		Gly240Glu	<i>ompC</i> <sup>c</sup> <i>ompF</i> <sup>-</sup>	Waukan and Forst, 1992.
<i>envZ473</i>		Val241Gly	<i>ompC</i> <sup>c</sup> <i>ompF</i> <sup>-</sup>	Waukan and Forst, 1992.
<i>envZ11</i>		Thr247Arg	<i>ompC</i> <sup>c</sup> <i>ompF</i> <sup>-</sup>	Waukan and Forst, 1992.
<i>envZ</i>		Arg253His	<i>ompC</i> <sup>+</sup> <i>ompF</i> <sup>-</sup>	Harlocker et al., 1993.
<i>envZ30</i>	Tyr351Ser	<i>ompC</i> <sup>c</sup> <i>ompF</i> <sup>c-</sup>	Kanamaru et al., 1989.	

+ : expresión similar a la de *E. coli* silvestre (se regula según la osmolaridad del medio).

- : no hay expresión (en ninguna condición de osmolaridad).

c : expresión constitutiva (se expresa en baja y alta osmolaridad).

± : expresión similar a la de *E. coli* silvestre pero en menor cantidad.

\* : expresión constitutiva pero un poco reducida en baja osmolaridad.

(+): expresión similar a la de *E. coli* silvestre pero no se reprime por completo en baja osmolaridad.

♦ : se expresa en alta osmolaridad y se reprime en baja osmolaridad.

◄ : mutaciones puntuales dirigidas; las que no están marcadas son espontáneas.

que la mayoría de estas mutaciones fueron espontáneas. Además la Tabla III del apéndice nos muestra que la proteína OmpR, a nivel de aa sólo tiene dos cambios entre *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli*, mientras que EnvZ presenta veintidos. Sólo uno de éstos, en la posición 354, es diferente tanto en la EnvZ de *E. coli* como en la de *S. typhimurium*; los demás se conservan con una o con la otra. Esto nos sugiere que la diversidad genética de EnvZ es mayor que la de OmpR.

Por otro lado, en la misma forma que los cambios cercanos al residuo conservado His, en las PHK, afectan a la expresión de las PME (Tabla I), la simple sustitución Tyr351Ser en EnvZ de *E. coli*, adyacente a una de las cuatro secuencias conservadas en los miembros de la familia de EnvZ, la secuencia Asn343-X-X-X-Asn-Ala, dió como resultado la pérdida de la capacidad de fosforilar y defosforilar a OmpR. Estos resultados sugieren que esta región puede también jugar un papel importante en la reacción de fosfotransferencia EnvZ-OmpR (Kanamaru et al., 1989).

El cambio de aa Gly354Cys en *S. typhi* (ver apéndice: Tabla III), se encuentra en la misma región que la mutación Tyr351Ser de *E. coli*, por lo que este cambio podría también estar involucrado en la reacción de fosfotransferencia EnvZ-OmpR. Por otro lado, no es un cambio por un aa equivalente; por el contrario, el cambio es por un aa (Cys) con un grupo lateral sulfhidrilo, muy reactivo. Al analizar la secuencia, encontramos la presencia de un sólo residuo más de Cys, en la región de esta proteína que se propone se encuentre en el citoplasma. Así, el cambio de Gly354Cys podría



traer como consecuencia la formación de un puente disulfuro y esto provocar un cambio conformacional que, a su vez, dé como resultado que la respuesta regulatoria sea diferente, o bien, pudiera ser que debido a la reactividad de este grupo hubiera interacciones con otros factores en el medio que alteren el mecanismo de regulación.

La formación de enlaces disulfuro entre residuos Cys ha sido estudiado extensamente, algunas proteínas que contienen enlaces disulfuro en su doblamiento conformacional, requieren este, para su estabilidad. Pocas proteínas citoplásmicas son conocidas que formen puentes disulfuro, esto es debido a las condiciones redox del ambiente, que en el citoplasma son muy reductoras y la formación de un enlace disulfuro provee más estabilidad a un doblamiento conformacional en un ambiente oxidante. Sin embargo, la conformación de la proteína puede estabilizar el enlace disulfuro entre dos residuos Cys, ya sea por interacciones de carga, formación de puentes de hidrógeno u otros (Creighton, 1993). En este caso, en la región citoplásmica de la proteína hay 38 aminoácidos polares, 25 con carga positiva y 30 con carga negativa, lo cual puede propiciar interacciones polares y/o de carga que coloquen a los residuos Cys en posiciones cercanas, de tal manera que pueda formarse el enlace disulfuro.

La importancia del cambio en el aa 354 de EnvZ debe ser determinada, para lo cual, una primera estrategia es hacer mutaciones sitio dirigidas, cambiando el residuo Cys 354 por Gly que es el aa que se encuentra en *E. coli* y en *S. typhimurium*, para ver su efecto sobre la expresión de *ompC* en respuesta a la

osmolaridad. Así mismo, se pudieran realizar los cambios respectivos en *E. coli* y *S. typhimurium*.

Por otro lado, la regulación de *OmpC* y *OmpF* de *S. typhimurium*, reportada por el grupo del Dr. Tapio Palva (1982a,b; 1987) y colaboradores, no ha podido ser reproducida en nuestro laboratorio, por lo que las diferencias en *EnvZ* observadas en el apéndice: Tabla III, a nivel de aa de *S. typhi* con respecto a *E. coli* (y conservadas con *S. typhimurium*), deben ser consideradas.

Otra forma para estudiar si *ompR* y *envZ* de *S. typhi* intervienen en la diferente expresión de *OmpC*, con respecto a la osmolaridad, es mediante ensayos de complementación. En el laboratorio contamos con varias cepas que presentan mutaciones en *ompR* o *envZ*, lo que les confiere un fenotipo de PME diferente al de una cepa tipo silvestre (Tabla II y Fig. 5). A este respecto, podemos realizar ensayos de complementación transformando estas cepas con los plásmidos que lleven los genes de *S. typhi* y ver que efecto causa en el fenotipo, en diversas condiciones ambientales. Sin embargo, se debe tener cuidado con este experimento, ya que se ha visto en experimentos similares, realizados por otros grupos, que el efecto en el fenotipo puede ser alterado por muchos factores, tales como el efecto multicopia de genes clonados y las condiciones de crecimiento.

Para realizar los experimentos de complementación, se debe contar con los controles adecuados, tales como los genes *ompR* y *envZ* de *E. coli* y *S. typhimurium*, las cepas silvestres, y, de preferencia, que los genes se encuentren en un vector común y de

Tabla II.

Cepas Bacterianas.

Cepa	Genotipo	Fenotipo	Referencia
<i>E. coli</i>			
▶ MC4100	F <sup>-</sup> , delta(lac) U169araD139, rpsL150, relA1, thiA, flbB5301, ptsF25, derivada de <i>E. coli</i> K-12	OmpC <sup>+</sup> , OmpF <sup>+</sup>	Hall and Silhavy, 1981a.
◆ MH760	MC4100, ompR472, malQ <sup>+</sup> , recA	OmpC <sup>-</sup> , OmpF <sup>c</sup>	Mizuno et al., 1988.
◆ MH1461	MC4100, envZ11 malQ <sup>+</sup> , tpo <sup>-</sup>	OmpC <sup>c</sup> , OmpF <sup>-</sup>	Hall and Silhavy, 1981a.
◆ MH1160	MC4100, ompR101	OmpC <sup>-</sup> , OmpF <sup>-</sup>	Nara et al., 1986a, b.
◆ MH225.101	MC4100, ompR101, Φ(ompC'-lacZ')10-25	OmpC <sup>-</sup> , OmpF <sup>-</sup>	Russo and Silhavy, 1991.
◆ MH513.101	MC4100, ompR101, Φ(ompF'-lacZ')16-23	OmpC <sup>-</sup> , OmpF <sup>-</sup>	Russo and Silhavy, 1991.
<i>S. typhi</i>			
▶ IMSS 1	9,12,d,vi serotype clinical strain	OmpC <sup>+</sup> , OmpF <sup>+</sup>	Puente et al., 1987.

+ : expresión similar a la de *E. coli* silvestre (se regula según la osmolaridad).

- : no hay expresión en ninguna condición de osmolaridad.

c : expresión constitutiva (se expresa en baja y alta osmolaridad).

Φ : fusión.

▶ : cepas tipo silvestre.

◆ : cepas mutadas en ompB.

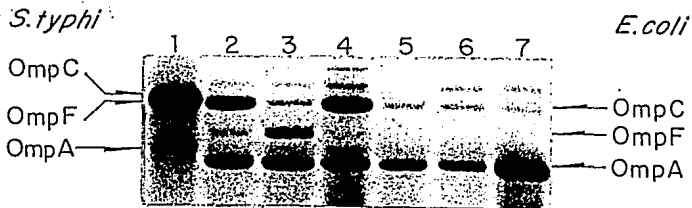


Fig.5 Patrón electroforético de preparaciones de PME de *S. typhi* (línea 1); MC4100 (línea 2); MH760 (línea 3); MH1461 (línea 4); MH1160 (línea 5); MH225.101 (línea 6) y MH513.101 (línea 7). El genotipo y fenotipo de cada cepa se describe en la Tabla II. Las posiciones de OmpC, OmpF y OmpA, se muestran en el margen izquierdo para *S. typhi* y en el margen derecho para *E. coli*. Las bacterias fueron crecidas en medio LB.

bajo número de copias. En muchos estudios de complementación, se ha encontrado que un gene *ompR* clonado en plásmidos multicopia es dominante al del cromosoma en la respuesta a la osmoregulación. Sin embargo, la expresión dominante de los genes clonados en plásmidos multicopia no fué siempre el caso. Se observó una expresión dominante de fenotipos  $OmpF^-$ ,  $OmpC^-$ , en ciertos casos, dependiendo de las mutaciones y las complementaciones (Nara et al., 1986). También se ha observado que la sobreproducción de la proteína *OmpR* (del gene *ompR* clonado en un vector de alto número de copias) resulta en la síntesis constitutiva de *OmpC*, aún en cepas llevando una mutación en *envZ*. (Slauch et al., 1988).

En otros experimentos de complementación, usando los genes *ompR* o *envZ* de *S. typhimurium*, se transformaron cepas mutadas en estos genes con un fenotipo  $OmpF^-$ ,  $OmpC^-$ , de *E. coli* y *S. typhimurium*. Las cepas complementadas no presentaron un fenotipo claro; sólo cuando fueron transformadas con el operón *ompB* completo se obtuvo la expresión normal de las PME, dependiente de la osmolaridad del medio. (Liljeström et al., 1982 b).

Con respecto a las condiciones de cultivo, la expresión de *OmpC* es favorecida en presencia de una fuente de carbono fermentable, alta salinidad, alta temperatura y anaerobiosis (Hall and Silhavy, 1981; Csonka, 1989). Por lo tanto, se debe poner atención, tanto para plantear un experimento como para interpretar los resultados, en las condiciones de cultivo y en la fase de crecimiento en la que se toman las bacterias. El desarrollo de los puntos anteriores nos dará la pauta para determinar la

participación de OmpR y EnvZ en la diferente expresión de la proteína OmpC, en respuesta a la osmolaridad.

La información proporcionada hasta ahora sobre la importancia de OmpR y EnvZ, en la regulación osmótica de las PME, así como su efecto pleiotrópico e implicación en la virulencia de las cepas, nos sirve de fundamento para comenzar nuevos estudios en *S. typhi* con los cuales se esclarezca la participación de estas proteínas en cada caso.

## BIBLIOGRAFIA

- Aiba, H. and Mizuno, T.: Phosphorylation of a bacterial activator protein, OmpR, by a protein kinase, EnvZ, stimulates the transcription of the ompF and ompC genes in *Escherichia coli*. FEBS. 261 (1990) 19-22.
- Benz, R.: Structure and function of porins from gram-negative bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 42 (1988) 359-393.
- Bernardini, M. L., Fontaine, A. and Sansonetti, P.: The two-component Regulator system OmpR-EnvZ controls the virulence of *Shigella flexneri*. J. Bacteriol. 172 (1990) 6274-6281.
- Bernardini, M. L., Sanna, M. G., Fontaine, A. and Sansonetti, P.: OmpC is involved in invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri*. Infect. Immun. 61 (1993) 3625-3635.
- Brissette, R. E., Tsung, K. and Inouye, M.: Suppression of a mutation in OmpR at the putative phosphorylation center by a mutant EnvZ protein in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 173 (1991) 601-608.
- Calderón, I., Lobos, S. R., Rojas, H. A., Palomino, C., Rodríguez, L. H. and Mora, G. C.: Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid fever in humans. Infect. Immun. 52 (1986) 209-212.
- Calva, E., Puente, J. L. and Calva, J. J.: Research opportunities in typhoid fever: Epidemiology and molecular biology. Bio Essays 9 (1988) 173-177.

- Case, C. C., Bukau, B., Granett, S., Villarejo, M. R. and Boos, W.: Contrasting mechanisms of *envZ* control of *mal* and *pho* regulon genes in *E. coli* J. Bacteriol. 166 (1986) 700-712.
- Chatfield, S. N., Dorman, C. J., Hayward, C. and Dougan, G.: Role of *ompR*-dependent genes in *Salmonella typhimurium* virulence: Mutante deficient in both *OmpC* and *OmpF* are attenuated in vivo. 59 (1991) 449-452.
- Comeau, D. E., Ikenaka, K., Tsung, K. and Inouye, M.: 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 (1985) 578-584.
- Creighton, T. E.: Proteins: Structures and molecular properties. European Molecular Biology Laboratory, NY, 1993.
- Csonka, L. N.: Physiological and genetic responses of bacterial to osmotic stress, Microbiological Reviews 53 (1989) 121-147.
- Delgado, J. Forst, S. Harlocker, S. and Inouye, M.: 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 (1993) 1037-1047.
- Dougan, C. J., Chatfield, S. N., Higgings, C. F., Hayward, C. and Dougan, G.: Characterization of porin and *ompR* mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*: *ompR* mutants are attenuated in vivo. Infect. Immun. 57 (1989) 2136-2140.
- Finlay, B. B. and Falkow, S.: *Salmonella* as an intracellular parasite. Mol. Microbiol. 3 (1989) 1833-1841.



- Flores, V.: Aislamiento del gene para la proteina de membrana externa OmpC de *S. typhi*. Facultad de Ciencias. Tesis de Licenciatura; 1988.
- Forst, S., Comeau, D., Norioka, S. and Inouye, M.: Localization and membrane topology of EnvZ, a protein involved in osmoregulation of OmpF and OmpC in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 16433-16438.
- Forst, S., Delgado, J. and Inouye, M.: DNA-Binding properties of the transcription activator (OmpR) for the upstream sequences of ompF in *Escherichia coli* are altered by envZ mutations and medium osmolarity. *J. Bacteriol.* 171 (1989) 2949-2955.
- Forst, S., Delgado, J., Ramakrishnan, G. and Inouye, M.: Regulation of ompC and ompF expression in *Escherichia coli* in the absence of envZ. *J. Bacteriol.* 170 (1988) 5080-5085.
- Forst, S., and Inouye, M.: Environmentally regulated gene expression for membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 4 (1988) 21-42.
- Gibson, M. M., Ellis, E. M., Graeme-Cook, K. A. and Higgins, C. F.: OmpR and EnvZ are pleiotropic regulatory proteins: positive regulation of the tripeptide permease (ttb) of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* 207 (1987) 120-129.
- Gross, R., Aricò, B. and Rappuoli, R.: Families of bacterial signal-transducing proteins. *Mol. Microbiol.* 3 (1989) 1661-1667.
- Hall, M. N. and Silhavy, T. J.: Genetic Analysis of the ompB locus in *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* 151 (1981 a) 1-15.
- Hall, M. N. and Silhavy, T. J.: The locus and the regulation of the

- major Outer Membrane Porin of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* 146 (1981 b) 23-43.
- Harlocker, S. L., Rampersaud, A., Yang, W-P. and Inouye, M.: Phenotypic revertant mutations of a new *OmpR2* mutant (V203Q) of *Escherichia coli* lie in the *envZ* gene, which encodes the *OmpR* kinase. *J. Bacteriol.* 175 (1993) 1956-1960.
- Hess, J. F., Oosawa, K., Matsumura, P. and Simon, M. I.: Protein phosphorylation is involved in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 (1987) 7609-7613.
- Igo, M. M., Ninfa, A. J. and Silhavy, T. J.: A bacterial environmental sensor that functions as a protein kinase and stimulates transcriptional activation. *Genes and Development* 3 (1989) 598-605.
- Igo, M. M. and Silhavy, T.J.: *EnvZ*, a transmembrane environmental sensor of *Escherichia coli* K-12, is phosphorylated in vitro. *J. Bacteriol.* 170 (1988) 5971-5973.
- Isibasi, A., Ortíz, V., Vargas, M., Paniagua, J., González, C., Moreno, J. and Kumate, J.: Protection against *Salmonella typhi* 9,12,d,vi. *Infect. Immun.* 56 (1988) 2953-2959.
- Jap, B. K. and Walian, P. J.: Biophysics of the structure and function of porins. *Quarterly Reviews of Biophysics* 23 (1990) 367-403.
- Kanamaru, K., Aiba, H., Mizushima, S. and Mizuno, T.: Signal transduction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 21633-21637.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F.: A simple method for displaying the

- hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157 (1982) 105-132.
- Liljeström, P., Laamanem, I. and Palva, E. T.: Structure and expression of the ompB operon, the regulatory locus for the outer membrane porin regulon in *Salmonella typhimurium* LT-2. *J. Mol. Biol.* 20 (1988) 663-673.
- Liljeström, P., Luokkamäki, M. and Palva, E. T.: Isolation and characterization of a substitutum mutation in the ompR gene of *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Bacteriol.* 169 (1987) 438-441.
- Liljeström, P., Pirkko, L., Määttänen, and Palva, E. T.: Cloning of the regulatory locus ompB of *Salmonella typhimurium* LT-2. *Mol. Gen. Genet.* 188 (1982 a) 184-189.
- Liljeström, P., Pirkko, L., Määttänen, and Palva, E. T.: Cloning of the regulatory locus ompB of *Salmonella typhimurium* LT-2. *Mol. Gen. Genet.* 188 (1982 b) 190-194.
- Lundrigan, M. D. and Earhart, C. F.: Reduction in three iron-regulated outer membrane proteins and protein a by the *E. coli* K-12 per A mutation. *J. Bacteriol.* 146 (1981) 804-807.
- Maniatis, T. Fritsch, E. F. and Sambrook, J.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.
- Matzuyama, S., Mizuno, T. and Mizushima, S.: Interaction between two regulatory proteins in osmoregulatory expression of ompF and ompC genes in *Escherichia coli* a novel ompOR mutation suppresses pleiotropic defects caused by an envZ mutation. *J. Bacteriol.* 168 (1986) 1309-1314.

- Misra, R. and Benson, A.: Isolation and characterization of OmpC porin mutants with altered pore properties. J. Bacteriol. 170 (1988) 528-533.
- Mizuno, T., Chow, M - Y. and Inouye, M.: A comparative study on the genes for three porins of *Escherichia coli* outer membrane. J. Biol. Chem. 258 (1983) 6932 -6940.
- Mizuno, T., Kato, M., Jo, Y-L. and Mizushima, S.: Interaction of OmpR, a positive regulator, with the osmoregulated ompC and omp genes of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 263 (1988) 1008-1012.
- Mizuno, T. and Mizushima, S.: 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 (1990) 1077-1082.
- Mizuno, T., Wurtzel, E. T. and Inouye, M.: Osmoregulation of gene expression. J. Biol. Chem. 257 (1982) 13692-13698.
- Moran Jr, Ch. P., Lang, N., LeGrise, S. F. J., Lee, G., Stepheus, M.: Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. Mol. Gen. Genet. 186 (1982) 339-346.
- Nakashima, K., Kanamaru, K., Aiba, H. and Mizuno, T.: Signal transductional osmoregulation in *Escherichai coli*. J. Biol. Chem. 266 (1991) 10775-10780.
- Nara, F., Mizuno, T. and Mizushima, S.: Complementation analysis of the wild-type and mutant ompR genes exhibiting different phenotypes of osmoregulation of the ompF and ompC genes of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 205 (1986a) 51-55.

- Nara, F., Matsuyama, S-I., Mizuno, T. and Mizushima, S.: Molecular analysis of mutant *ompR* genes exhibiting different phenotypes as to osmoregulation of the *ompF* and *ompC* genes of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 202 (1986b) 194-199.
- Nikaido, H.: Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Mol. Microbiol.* 6 (1992) 435-442.
- Norioka, S., Ramakrishnan, G., Ikenaka, K. and Inouye, M.: Interaction of a transcriptional activator, *OmpR* with reciprocally osmoregulated genes, *ompF* and *ompC* of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 17113-17119.
- Osawa, Y. and Mizushima, S.: Regulation of Outer Membrane Protein synthesis in *E. coli* K-12: *OmpF* regulates the expression of *ompC*. *J. Bacteriol.* 154 (1983) 669-675.
- Pitcher, D. G., Saunders, N. A., Owen, R. J.: Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 8 (1989) 151-156.
- Puente, J. L.: Aislamiento de los genes *phoE* y *gltB* de *Salmonella typhi*. Facultad de Ciencias. Tesis de licenciatura; 1987.
- Puente, J. L.: Caracterización del gene para la proteína de membrana externa *OmpC* de *Salmonella typhi*. Instituto de Biotecnología. Tesis de Maestría; 1988.
- Puente, J. L., Alvarez-Scherer, V., Gosset, G. and Calva, E.: comparative analysis of the *Salmonella typhi* and *Escherichia coli ompC* genes. *Gene* 83 (1989) 197-206.
- Puente, J. L., Flores, V., Fernández, M., Fuchs, Y. and Calva, E.: Isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from

- Salmonella typhi. Gene 61 (1987) 75-83.
- Puente, J. L., Verdugo-Rodríguez, A., and Calva, E.: Expression of Salmonella typhi and Escherichia coli OmpC is influenced differently by medium osmolarity; dependence on Escherichia coli OmpR. Mol. Microbiol. 5 (1991) 1205-1210.
- Raubaud, O. and Schwartz, M.: Positive control of transcription initiation in bacteria. Ann Rev. Genet. 18 (1984) 173-206.
- Ronson, C. W., Nixon, B. T. and Ausubel, F. M.: Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. Cell 49 (1987) 579-581.
- Ruso, F. D. and Silhavy, T. J.: EnvZ controls the concentration of phosphorylated OmpR to mediate osmoregulation of the porin genes. J. Mol. Biol. 222 (1991) 567-580.
- Sanders, D. A., Gillece-Castro, B. L., Stock, A. M., Burlingame, A. L. and Koshland Jr. D. E.: Identification of the site of Phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY. J. Biol. Chem. 264 (1989) 21770-21778.
- Sato, T. and Yura, T.: Chromosomal location and expression of the structural gene for major outer membrane protein Ia of Escherichia coli K-12 and of the homologous gene of Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 139 (1979) 468-477.
- Slauch, J. M., Garrett, S., Jackson, D. E. and Silhavy, T. J.: EnvZ functions through OmpR to control porin gene expression in Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 170 (1988) 439-441.
- Slauch, J. M. and Silhavy, T. J.: Genetic analysis of the switch that controls porin, gene expression in Escherichia coli K-12.

- J. Mol. Biol. 210 (1989) 281-292. (Erratum, 221: 429, 1990).
- Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separate by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98 (1975) 503-507.
- Stock, A. M., Mottonen, J. M., Stock, J. B. and Schutt, C. E.: Three-dimensional structure of Che Y, the response regulator of bacterial chemotaxis. Nature 337 (1989 a) 745-749.
- Stock, J. B., Ninfa, A. J. and Stock, A. M.: Protein Phosphorylation and regulation of adaptive response in bacteria. Microbiol Rev. 53 (1989 b) 450-490.
- Stock, J. B., Stock, A. M. and Mottonen, J. M.: Signal transduction in bacteria. Nature 344 (1990) 395-400.
- Takayanagi, K and Mizuno, T.: Activation of the osmoregulated *ompF* and *ompC* genes by the OmpR protein in *Escherichia coli*: A study involving chimeric promoters. J. Biochem. 112 (1992) 1-6.
- Tsung, K., Brissette, R. E. and Inouye, M.: Identification of the DNA - binding domain of the OmpR protein required for transcriptional activation of the *ompF* and *ompC* genes of *Escherichia coli* by in vivo DNA Footprinting. J. Biol. Chem. 264 (1989) 10104-10109.
- Undhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V. R.: Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. Infect Immun. 55 (1987a) 816-821.
- Undhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V. R.: An outer membrane protein (porin) as an eliciting antigen for delayed - type hypersensitivity in murine salmonellosis. Infect. Immun. 55

(1987 b) 822-824.

Van Alphen, W., and Lugtenberg, B.: Influence of osmolarity of the growth medium on the Outer Membrane Protein pattern of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 131 (1977) 623-630.

Verdugo - Rogdríguez, A. and Calva, E., Denaturing treatment of *S. typhi* outer membrane protein preparations for improved immuno diagnosis of typhoid fever. *AsPac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 1 (1993 a) 113-116

Verdugo - Rodríguez, A., Gaus, L - H., Devi, S., Koh, C. L., Puthuchear, S. D., Calva, E. and Pang, T.: Detection of antibodies against *Salmonella typhi* outer membrane protein (OMP) preparations. *Asian Pacific J. Allergy Immunology* 11 (1993 b) 45-52.

Verdugo - Rodríguez, A., López - Vidal, Y., Puente, J. L., Ruíz - Palacios, G. M. and Calva, E.: Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (1993 c) 248-254.

Von Hippel, P. H., Bear, D. G., Morgan, W. D. and McSwiggen, J. A.: Protein nucleic acid interactions in transcription: A molecular analysis. *Ann. Rev. Biochem.* 53 (1984) 389-446.

Warnner, B. L.: Is cross regulation by phosphorylation of two - component response regulator proteins important in bacteria?. *J. Bacteriol.* 174 (1992) 2053-2058.

Waukan, J. and Forst, S. Molecular analysis of the signalin pathway between EnvZ and OmpR in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174



(1992) 1522-1527.

Wurtzel, E. T., Chou, M. and Inouye, M.: Osmoregulation of gene expression. *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 13685-13691.

**A P E N D I C E**

Title:

The *Salmonella typhi* ompB locus

Authors:

Irma MARTINEZ, Victor BUSTAMANTE, José Luis PUENTE and E.  
CALVA\*

Address:

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma  
de México, Cuernavaca, Morelos, México.

\* For correspondence: Instituto de Biotecnología UNAM, Apdo. Postal  
510-3, Cuernavaca, Mor. 62271, México. Fax: (52) (73) 17-23 88;  
e-mail: ecalva@pbr322.ceingebi.unam.mx

Abbreviations:

nt nucleotide; aa amino acid; *S. typhi* *Salmonella typhi*; *S.*  
*typhimurium* *Salmonella typhimurium*; *S. arizonae* *Salmonella*  
*arizonae*; *E. coli* *Escherichia coli*; OMP outer membrane protein; RBS  
ribosome binding site

## SUMMARY

In order to better understand the regulation of *Salmonella typhi* OmpC, a major outer membrane protein whose synthesis is not repressed at low osmolarity as in *Escherichia coli* (*E. coli*) (Puentes et al., 1991), we have isolated and done an initial characterization of the regulatory *ompB* locus from *S. typhi*. The comparison of *S. typhi ompB* with the respective *E. coli* and *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) sequences, revealed that it is highly conserved, also constituted in *S. typhi* by an *ompR* and an *envZ* gene. The coding regions overlapped by four base pairs, corresponding to proteins OmpR and EnvZ of 239 and 450 amino acids (aa), respectively. The similarity between *ompB* of *S. typhi* and *E. coli* was 86.7%, and between *ompB* of *S. typhi* and *S. typhimurium* was 98.7%. The alignments also revealed the conservation of some important aa, such as Asp55 of OmpR and His243 of EnvZ. Only one change, Gly354Cys of *S. typhi* EnvZ, was different with respect to *ompB* of both *E. coli* and *S. typhimurium*.

## INTRODUCTION

Typhoid fever in man is the clinical manifestation of a generalized infection by *S. typhi*, a gram-negative enterobacterium that enters the body via the gastrointestinal tract. The bacteria adhere and penetrate to the intestinal epithelium, and then they are ingested by macrophages and transported to the reticuloendothelial system, where they multiply and propagate throughout the organism (Finlay and Falkow, 1989; Calva et al., 1988).

The outer membrane of *S. typhi*, as in *S. typhimurium* and *E. coli*, contains a set of abundant proteins, called porins, which function as passive diffusion channels for small hydrophilic molecules (Nikaido, 1992). Outer membrane protein (OMP) preparations have elicited active immunity in mice against *S. typhimurium* and *S. typhi* (Udhayakumar and Muthukkaruppan, 1987a,b; Isibasi et al., 1988) and the presence of specific anti-OMP antibodies in the sera of patients might be of diagnostic values (Calderon et al., 1986; Verdugo-Rodríguez et al., 1993a,b,c).

Bacteria have shown a great capacity of response to small environmental fluctuations, one of them being osmolarity, which influences the expression of *E. coli* porins, OmpC and OmpF (Forst and Inouye, 1988). OmpF is preferentially expressed in media of low osmolarity, whereas OmpC expression is increased in media of high osmolarity (Van Alphen and Lugtenberg, 1977). The *E. coli* *ompB* locus, which contains two distinct genes, *ompR* and *envZ*, has been identified as the locus that regulates OmpF and OmpC expression at the level of transcription (Hall and Silhavy, 1981a,b). The

*ompR/envZ* genes from *S. typhimurium* have also been isolated and sequenced (Liljeström, et al., 1982 a, b).

EnvZ and OmpR belong to a group of two-component regulatory factors, that respond to environmental stimulus (Ronson et al., 1987; Mizuno and Mizushima, 1990). OmpR, a cytoplasmic protein, is the activator that binds to both the *ompF* and *ompC* promoters (Mizuno et al 1988; Norioka et al., 1986). EnvZ, a inner membrane protein, is thought to sense an enviromental osmotic signal and then to modulate the OmpR function (Hall and Silhavy, 1981 b; Matsuyama et al., 1986; Slauch et al., 1988).

The *S. typhi ompC* gene was isolated and characterized in our laboratory. It codes for a major outer membrane protein (Puente et al., 1987; 1989). In *S. typhi*, in contrast with what happens in *E. coli*, OmpC has been observed to be expressed at the same level, both at low and high osmolarity. However, the expression of *S. typhi ompC* is dependent on the *E. coli* OmpR transcriptional activator. On the other hand, the synthesis of OmpF in both bacteria was regulated in a similar manner. (Puente et al., 1991). These findings suggested differences between the mechanisms of osmoregulation of gene expression in both bacteria although common effectors appeared to be shared.

We have encountered that *S. typhi* possesses an EnvZ/OmpR -like signal-transducing sensor/regulator system, similar to, the corresponding *ompB* locus in *E. coli* and *S. typhimurium*. In this paper, we describe its identification, isolation, and initial characterization. Various bacterial strains and plasmids used for this purpose are listed in Table I.

TABLE I

## Bacterial strains and plasmids

Strain/plasmid	Genotype	Reference
<i>E. coli</i> HB101	F <sup>del</sup> (gpt-proA)62 leu supE 44 ara 14 gal K 2 lacY 1 del (mcrC-mrr) rpsL 20(Sm <sup>R</sup> ) xyl-5 mtl-1 recA-13	Maniatis et al., 1982.
<i>S. typhi</i> IMSS-1	9,12,d,vi serotype clinical strain	Puente et al., 1987.
<i>S. typhimurum</i> LT-2	Reference strain, Herzberg strain (SL937)	Provided by Dr. B. Stocker Stanford University.
<i>S. arizonae</i> INN-1	Reference strain	From the Instituto Nacional de la Nutrición, México City.
<b>Plasmids</b>		
pPLH62	Ap <sup>R</sup> ; cosmid vector, pHCT9; cloned gene, ompR.	Liljeström et al., 1982 a.
pPLH65	Ap <sup>R</sup> ; cosmid vector, pKN410; cloned gene, envZ.	Liljeström et al., 1982 b.
pUC19	Ap <sup>R</sup>	Yanisch-Perron et al, 1985.
pUC18	Ap <sup>R</sup>	Yanisch-Perron et al, 1985.

Ap<sup>R</sup> Ampiciline resistant  
Sm<sup>R</sup> Streptomycin

## RESULTS AND DISCUSSION.

### **(a) Identification of the regulatory *ompB* locus of *S. typhi*.**

To identify the existence of an *ompB* locus in *S. typhi*, homologous to *S. typhimurium ompB* (Sato and Yura, 1979), plasmids pPLH62 and pPLH65 were used (Liljeström et al, 1982) for obtaining heterologous probes, as described in Fig.1. By the method of Southern (Southern et al., 1975), *S. typhimurium ompR* and *envZ* genes hybridized to a 1.3kb band of *S. typhi* genomic DNA, cleaved with *EcoRI/SacI* (Fig.1, Panel A, lane b) and with a 3.0kb band of *S. typhi* genomic DNA, cleaved with *BglIII*, (Fig.1) respectively. In the same conditions *Salmonella arizonae* (*S. arizonae*) genomic DNA hybridized with weak intensity (Fig.1, Panel A and B, lanes c), and with *E. coli* genomic DNA it did not hybridize (Fig.1, Panel A and B, lanes d). If we used less strict conditions of hybridization, the *E. coli* genomic DNA also hybridized.

### **(b) Isolation of the *S. typhi ompR* and *envZ* genes.**

Screening of the *S. typhi* genomic library, constructed in bacteriophage lambda 1059 (Puente et al, 1987), provided recombinant bacteriophages which carried the 1.3kb *EcoRI/SacI* band and the 3.0kb *BglIII* band (Fig 2, Panel A and B, lanes 5 and 6). One phage, designated MB2, was chosen for further analysis (Fig. 3, Panel A).

### **(c) Restriction endonuclease map.**

The restriction endonuclease map of the insert, containing the *ompB* locus was constructed. Comparison of the *S. typhi ompB* operon



PANEL A

PANEL B

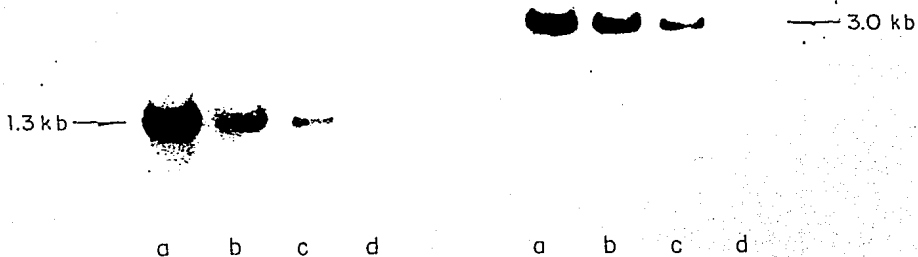
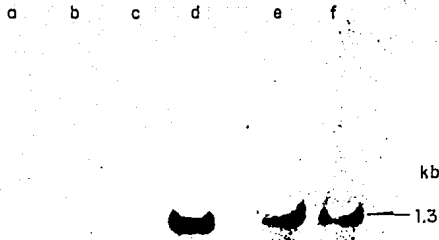


Fig.1. Southern blot hybridization of DNA from (a) *S. typhimurium*, (b) *S. typhi*, (c) *S. arizonae* and (d) *E. coli*, digested with *EcoRI/SstI* and hybridized with the *S. typhimurium ompR* gene (Panel A); or digested with *BglIII* and hybridized with the *S. typhimurium envZ* gene (panel B). **METHODS.** Chromosomal DNA was extracted and purified, from a culture grown overnight, essentially as described by Pitcher et al. (1989), with exception that after the cells were lysed with guanidium thiocyanate, RNase A was added to a final concentration of 50  $\mu\text{g/ml}$  and the suspension was incubated for 15 min at 4°C.

For the preparation of radioactive probes, plasmids pPLH62 and pPLH65, containing the *S. typhimurium ompR* and *envZ* genes, respectively (Liljeström, 1982), were digested with *EcoRI/SacI* and with *BglIII*, respectively. The resulting fragments were separated by agarose gel electrophoresis, and those containing *ompR* (1.3kb) and *envZ* (3.0kb) were purified by the GeneClean assay (Bio101, La Jolla, Ca, USA). They were labelled with (alpha- $^{32}\text{P}$ )dCTP (3000Ci/mmol; Amersham, U.K.) to  $5 \times 10^8$  cpm/ $\mu\text{g}$ , using a commercially available nick-translation kit (Amersham International, Amersham, U.K.), as recommended by the manufacturer. Southern-blot hybridization was done with fifty nanograms of digested chromosomal DNA from each strain (Southern et al., 1975). The filters were subjected to a pre-hybridization procedure by incubating for 4h at 42°C in 5X SSC, 10X Denhardt solution (1X Denhardt is 0.02% each polyvinylpyrrolidone, Ficoll 400 and bovine serum albumin), 50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mg/ml of heat-denatured calf thymus DNA and 40% formamide. The DNA was hybridized for 16h at 42°C, in a fresh solution of identical composition, containing the labeled DNA probes ( $10^6$  cpm per lane), 0.1% SDS and 1.0 mM EDTA. Subsequently, the filters were washed once for 20 min, at 65°C, with 0.1X SSC/0.1% SDS, dried and autoradiographed.

PANEL A



PANEL B



Fig.2. Southern blot hybridization of DNA from different pools of five recombinant phages, or else of DNA from a single recombinant phage, digested with *EcoRI/SstI* and hybridized with the *S. typhimurium ompR* gene (Panel A), or digested with *BglII* and hybridized with the *S. typhimurium envZ* gene (panel B). (a) pool 1, (b) pool 2, (c) pool 3, (d) pool 4, (e) phage 1 and (f) phage 2; **METHODS.** A *Salmonella typhi* gene library, in bacteriophage lambda 1059 (Puente et al., 1987), was used for the screening of recombinant bacteriophages by hybridization as described by Benton and Davis (Maniatis et al., 1982) with the exception that the denaturing solution was 0.2M NaOH/1.5M NaCl, the neutralizing solution was 0.5M Tris-HCl pH 7.5/3M NaCl, and the filters were rinsed in 2X SSC (3M NaCl and 0.3M sodium citrate, pH 7). The DNA on the filters was hybridized with the radioactive DNA probes as described for the Southern-blot hybridization (see Fig.1), except that the washing conditions were 1X SSC/0.1% SDS, 50°C. Phage plaques around the hybridization signal were pooled, the pool of bacteriophages that presented the appropriate hybridization signal was chosen (pool 4, lanes d) for the isolation of individual bacteriophages as described above. Two of them hybridized with both probes (lanes e and f).

with its counterpart in *S. typhimurium* (Liljeström et al., 1988), revealed the conservation of the all tested restriction sites. Only one *Eg*III site was added to the restriction map (Fig. 3, Panel A).

#### **(d) Plasmid Subcloning**

The 1.3kb band, containing *ompR*, was subcloned into the *Eco*RI and *Sac*I sites of pUC19 and pUC18, to construct plasmids pIM12 and pIM18, respectively. The 3.0kb band, containing *envZ*, was subcloned into the *Bam*HI site of pUC19 to construct plasmid pIM30. (Fig. 3, Panel B).

Also, the 4.2kb insert, containing *ompB* (see Fig. 3, Panel A), was subcloned into the *Sac*I site of pUC19, to construct plasmids pIM25 and pIM26. The subcloned plasmids have the structure shown in Fig. 3, Panel B.

#### **(e) DNA Sequence determination and analysis.**

The sequencing strategy for the *ompB* region of *S. typhi* is shown in Fig. 3, Panel B. The entire nucleotide sequence and the amino acid (aa) sequence, deduced, from the nucleotide sequence, are shown in Fig. 4. The *S. typhi ompR* and *envZ* genes are conforming an operon, in the same way as in *S. typhimurium* and *E. coli* (Hall and Silhavy, 1979; Liljeström et al., 1982). The open translational reading frames are in the same orientation (Fig. 4); they also code for a 239 aa OmpR protein and for a 450 aa EnvZ protein. The sequence of *S. typhi ompB* was compared with the corresponding sequences of *E. coli* and *S. typhimurium* (Mizuno et al 1982 a,b; Liljeström et al., 1988). The homology between the

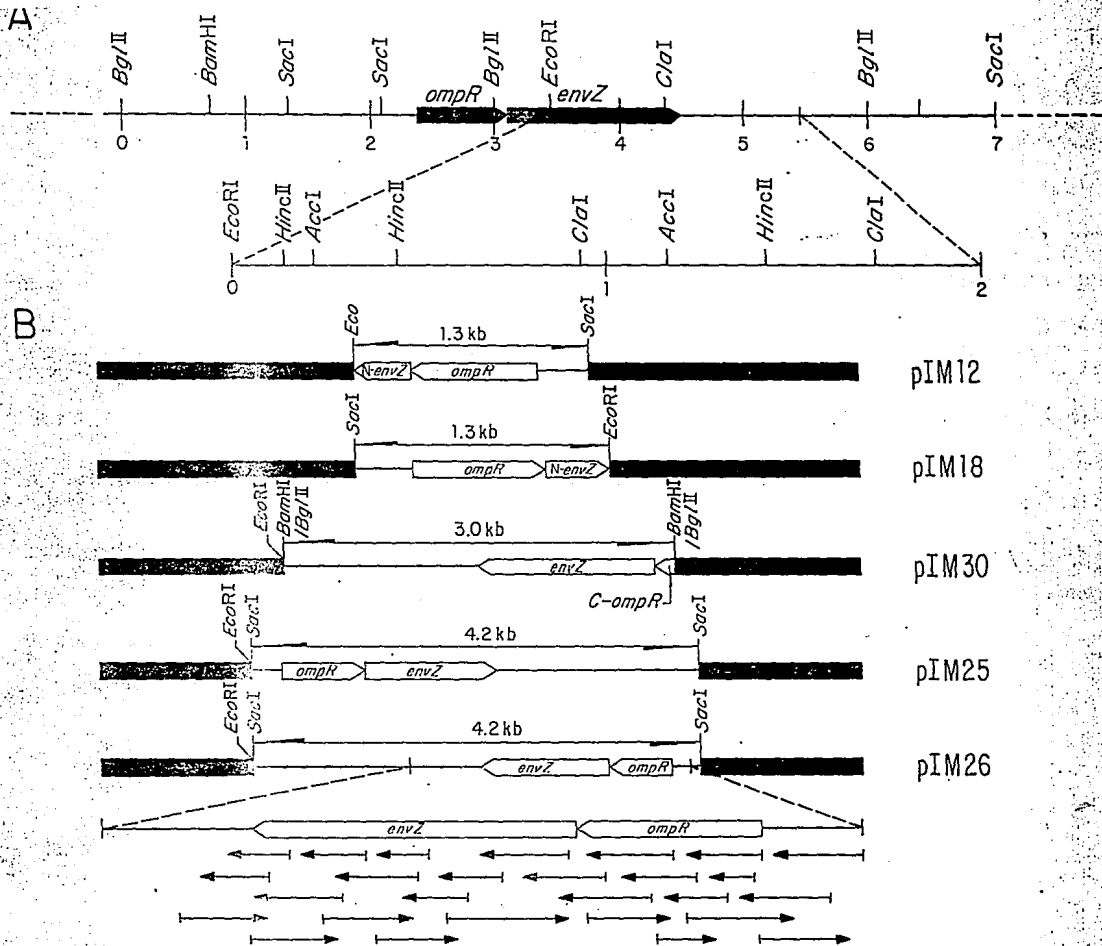


Fig. 3.

Fig.3. Panel A. Restriction endonuclease map of the *ompB* region of *S. typhi* in recombinant phage MB2; the continuous line comprises the region that carries the *ompB* operon, the dotted line represents the other part of the DNA insert of *S. typhi* and arms of the bacteriophage lambda 1059 vector. Panel B. Simplified map of the constructed plasmids and sequencing strategy of the *S. typhi ompR* and *envZ* genes. Standard procedures (Maniatis et al., 1982) were followed for subcloning DNA fragments from recombinant bacteriophage lambda 1059 into pUC19, only in the case of pIM18 was vector pUC18 used. For more details on this construction, see Results and Discussion, section (d). For the sequencing strategy, horizontal arrows indicate the direction and extent of sequencing from each site. All distances are in kb; N-*envZ* represent amino-terminal of *envZ* gene and C-*ompR* represent carboxy-terminal of *ompR* gene.



structural gene and regulatory regions are shown in Table II.

The differences of the upstream and downstream *ompB* regions are the result of additional nucleotides in one or another gene (insertions/deletions; in/dels), or else of nucleotide changes, as shown in Fig. 5. The reported regulatory sequences for *E. coli* are conserved in *S. typhi*; the putative -10 promoter site, at position -49 to -44 (Liljeström et al., 1988); the typical ribosome binding site (RBS) at position -9 to -12 (Shine and Dalgarno, 1974). The translation of the *E. coli envZ* starts at a position corresponding to 717 in Fig. 4 and, hence, the termination codon of *ompR* overlaps with the initiation codon of *envZ* as in *E. coli* (Comeau et al., 1985; Forst et al., 1987). The coding region of *envZ* is followed by a nucleotide stretch that may form a stem and loop structure at nucleotides 2070 to 2095 (Mizuno et al., 1982), which is a typical rho-independent transcription termination site (Von Hippel et al., 1984), that is followed by an inverted repeat (2101 to 2141) with a very strong homology with the REP (repetitive extragenic palindromic) consensus sequence. This sequence is commonly positioned adjacent to operons, and has been attributed a role in mRNA stabilization, although its physiological role is not clear (Liljeström et al., 1988).

The *S. typhi ompB* operon, as in *E. coli* and *S. typhimurium*, lacks, a typical -35 region and the *envZ* gene is not preceded by a typical RBS, (Raibaud, 1984). It has been noted in the past that many promoters, which are subject to positive control in vivo, have relatively poor homology to the consensus sequence in the -35 region. (Moran, 1982).

TABLE II

Percent of homology of ompB genes in both structural and regulatory sequences (upstream and downstream) of *E. coli*, *S. typhimurium* and *S. typhi*.

STRAIN	NUCLEOTIDES						AMINO ACIDS			
	upstream		structural genes		downstream		<i>E. coli</i>		<i>S. tm.</i>	
	<i>E.coli.</i>	<i>S.tm.</i>	<i>E.coli</i>	<i>.S.tm.</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.tm.</i>	ompR	envZ	ompR	envZ
<i>E.coli</i>	100.0	88.0	100.0	86.4	100.0	73.5	100.0	100.0	99.2	95.3
<i>S.tm</i>	88.0	100.0	86.4	100.0	73.5	100.0	99.2	95.3	100.0	100.0
<i>S.typhi</i>	86.5	99.0	86.7	98.7	73.0	96.8	99.6	81.6	99.6	98.8

*S. tm. Salmonella typhimurium*



A.

E. coli	A G	TT T	A A T A	C	-TT C	+A A	C	T	G	
S. typhi	TTTCGCACACGGGGCATAACGGTACGTCGCCGACAGAAATAATAATGGGGTTGCCGATTAATTTGTATATTTAAGCTGCTGTTAAATATGCTTTGTAAACAATTTAGCCTGA									-79
S. tm.	G	T								

E. coli		T A	GA		G	+A		A	
S. typhi	AATTCATACCAGAAATTTGCTGGTGACTCAAGTGAGCTTTTTTAAGAATACACACTTACATTTTGTGCGAACCTTTGGGAGTACAGACA								- 1
S. tm.						+A			

B.

E. coli	A C	+A	C GGTG	G T G	TCT TAA	-	TGGA AG T TT T	G T	-T AAA A	T	A +AC	-	+C	CGA C	
S. typhi	GAAAGGGAGGTATTTACCTCCCTTTCTCTTAACACCGGATGAGCGCTTTCAAAGCCGCCATCCGGCCGTTCCCTTACAGCTTCGGTCCGGCGCTAACCGCGTTGCTGC														2185
S. tm.		+G		C G			C							+C	

E. coli	A	G G G T A	G G A	G TTTC		C	A	C CC		C A	C T				
S. typhi	CGGGTATCCGCTACTTCTCGAAGTTCCTCAATGAACAGTTTCGCCAGCCGGTGGCTTTTCCCTGCCATGTGTTCCGGGAAGATAGSRTTACGTGGGTGAGAAATGTG														2296
S. tm.								C		C					

E. coli	C G T C	G T	G T A	T	AGT	T A	C -C	G G G	+G	G	G	G		
S. typhi	GGTATCCACCGCTGGCAGTTCAGTCGGGATCGCCAGATCGAACAGCGCCAGGCGGAAGGTTTCCCGCTTATCAAGAGAACCGTTCAGAAATAGCGTCAATAATCGCGCGGT									G	G	G		2408
S. tm.					A					G	T		+G	

E. coli	A C	T G			
S. typhi	ATCTTTGATGGAGATACGTTTGGCCGGTGCCTTC				2442
S. tm.					

Fig.5. Alignment of the nt sequence of the upstream (Panel A) and downstream (Panel B) regions of *ompB* from *E. coli*, *S. typhi* and *S. typhimurium*. The complete sequence of *S. typhi* and the differences found in the sequences from *E. coli* and *S. typhimurium* are shown. Minus symbols above the nt indicate corresponding absences in *S. typhi*. Plus symbols to the right of nucleotides indicate corresponding additional nt.

There are different types of nonsimilarities at the nucleotide level in the structural genes. There are single nucleotide changes that result in a conserved aa in the three bacteria (silent changes); others that result in a change of aa which is conserved only relative to *E. coli* or to *S. typhimurium*. Only one of these changes result in an aa not conserved with either sequences of *S. typhimurium* or *E. coli* that is glycine to cysteine at position 354 (Table III). Table II shows that the aa sequence of the *S. typhi* OmpR and EnvZ proteins deduced, have a high similarity with the corresponding ones in *E. coli* and *S. typhimurium*. The most conspicuous change is the G354C, mentioned above.

There are homologies among bacterial signal transduction proteins (Ronson et al., 1987), but the three-dimensional structure of a histidine kinase has not yet been determined. A comparison of the amino acid (aa) sequences of these proteins indicates a homologous C-terminal region of approximately 100 residues, as well as sequence similarities surrounding a conserved histidine residue, which is thought to be the site of autophosphorylation, this residues are conserved in *S. typhi* EnvZ (Stock et al., 1990; Igo and Silhavy, 1988).

Many of the signal-transducing proteins, similar to EnvZ, contain two membrane-spanning regions, a periplasmic domain containing the sensory receptor, and a carboxy-terminal cytoplasmic domain, harbouring the histidine-protein kinase activity as well as the autophosphorylated histidine residue (Forst et al., 1987). A hydrophathy profile of EnvZ (Kyte and Doolittle, 1982), revealed two hydrophobic sequences in the N-terminal region (Fig.6). Both the 31

TABLE III

Amino acid differences between *E. coli*, *S. typhimurium* and *S. typhi* OmpR and EnvZ.

Protein	Position	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhi</i>
OmpR	7	Asn	Ile	Ile
	118	Ala	Pro	Ala
EnvZ	4	Leu	Met	Met
	25	Ala	Val	Val
	90	Ser	Thr	Thr
	206	Arg	Leu	Arg
	260	Ser	Gly	Gly
	262	Gln	Glu	Glu
	303	Ala	Ser	Ser
	320	Glu	Asn	Asn
	324	Tyr	Gln	Gln
	325	Pro	Ala	Ala
	329	Glu	Gln	Gln
	→ 354	Gly	Gly	Cys
	364	Pro	Ser	Ser
	365	Asn	His	His
	379	Ala	Lys	Lys
	398	Thr	Ser	Ser
	399	Ile	Thr	Thr
	413	Val	Ile	Ile
	422	Leu	Ile	Ile
441	Thr	Ala	Ala	
443	Ala	Val	Val	
450	Gly	Ala	Ala	

→ Only amino acid of *S. typhi ompB* different in both *E. coli* and *S. typhimurium*.

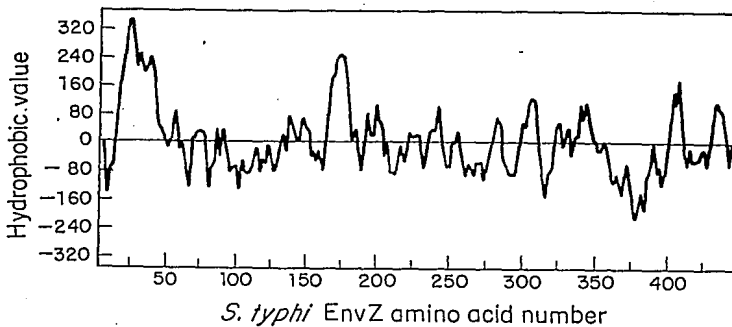


Fig.6. Hydropathy plot for the deduced aa sequence of *S. typhi* EnvZ. The hydrophobicity value of each aa residues is plotted against its position in the polypeptide, starting with the amino terminus (Kyte and Doolittle, 1982) (for more comments see text, part (e)). Nucleotide sequence analysis was done using the GeneWorks program (Intell, Genetics, Inc., Mountain View, Ca., USA).

amino acid stretch (between Leu-16 and Phe-46) and the 17 amino acid stretch (between Tyr 163 and Ile 179) are long enough to cross a cytoplasmic membrane (Jap and Walian, 1990).

The hydropathy plot also allows the prediction of soluble domains (Fig. 6). These domains correspond to those proposed by Forst et al, 1987, in a topological model of EnvZ in the inner membrane of *E. coli*. In this model, the change of Gly to Cys at the position 354 (G354C) (Table III), is localized in a long C-terminal cytoplasmic domain. This change could be interesting, because in several studies it has been shown that points mutations have resulted in an altered phenotype of the outer membrane protein profile (Nara et al., 1986; Matsuyama et al., 1986; Hall and Silhavy, 1981 a,b). All of these mutations are spontaneous and some of them are changes for a cysteine. Analysis of the C-terminal cytoplasmic domain, revealed that there is only one other Cys residue present, at position 277, aside of that at position 354. Therefore, *S. typhi* EnvZ could undergo a conformational change relative to *E. coli* EnvZ, by the forming of disulfide bond, which could result in an alteration of OmpC osmoregulation. The 277 and 354 Cys residues, in a hydropathy plot, are located in the same environmental condition; this condition is a transition between hydrophobicity and hydrophilicity (Fig. 6), which could favor others interactions, such as, hydrogen bridge and polar interaction; so that the protein acquires a conformation that enhances the stabilization of the disulfide; by bringing the two Cys residues into proximity (Creighton, 1993).

On the other hand, response regulators have a homologous

domain of approximately 100 residues generally located at the N-terminus (Gross et al., 1989), and many regulator proteins fall into one of three subfamilies defined by homologies between their Carboxy-terminal domains. (Stock et al., 1990). The OmpR protein has identity with this member of the regulatory protein pair and conserves structural similarities. (Igo et al., 1989). On basis of three-dimensional structure of CheY, defined by X-ray crystallography (Stock, 1989 a), and considering that the OmpR and CheY proteins belong to the same family (Hess et al., 1987), and that the OmpR protein shares extensive aa sequence homology to the N-terminal domain of Che Y (Stock et al., 1989 b), we compared OmpR with the CheY protein. From the sequence similarities between the two proteins, three aspartic residues, D11, D12, and D55 of OmpR, are considered to form a triacidic pocket at the C-terminal edge of the beta-sheet, serving as the phosphorylation center, corresponding to D12, D13, and D57, of CheY and they are highly conserved in the response regulators (Sanders et al., 1989). The conserved aspartates in CheY are located in a cross-over crevice, formed by loops connecting the C-terminal end of  $\beta$ -strands to alpha-helices (Stock et al., 1989 a).

## (f) Conclusions

(1) *S. typhi* possesses an EnvZ/OmpR signal-transducing sensor/regulator system, similar to that in *E. coli* and *S. typhimurium*. Whether they have similar functions system, is yet an open question.

(2) Comparison of the nt and deduced aa sequences of the *ompB* regions of *S. typhi*, with *S. typhimurium* and *E. coli ompB*, shown that they are highly conserved. Particularly, OmpR is highly conserved, 99.6%, with both, showing only one amino acid change with *E. coli* OmpR and one with *S. typhimurium* OmpR. On the other hand, EnvZ reveals slightly less homology (81.6%, 98.8%, respectively), apparently being able to sustain more genetic diversity.

(3) An amino acid change (G354C) in *S. typhi* EnvZ with respect to *E. coli* and *S. typhimurium* EnvZ, could be involved in a different conformational bend or interaction (s) with the surrounding environment, since the cysteine at position 354 could presumably form a disulfide bond with a cysteine at position 277, or with other surrounding molecules. However, this is a matter of further research.

## REFERENCES

- Calderón, I., Lobos, S. R., Rojas, H. A., Palomino, C., Rodríguez, L. H. and Mora, G. C.: Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid fever in humans. *Infect. Immun.* 52 (1986) 209-212.
- Calva, E., Puente, J. L. and Calva, J. J.: Research opportunities in typhoid fever: Epidemiology and molecular biology. *Bio Essays* 9 (1988) 173-177.
- Comeau, D. E., Ikenaka, K., Tsung, K. and Inouye, M.: 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 (1985) 578-584.
- Creighton, T. E.: *Proteins: Structures and molecular properties.* European Molecular Biology Laboratory. Heidelberg, Germany. NY, 1993.
- Finlay, B. B. and Falkow, S.: *Salmonella* as an intracellular parasite. *Mol. Microbiol.* 3 (1989) 1833-1841.
- Forst, S., Comeau, D., Norioka, S. and inouye, M.: Localization and membrane topology of EnvZ, a protein involved in osmoregulation of OmpF and OmpC in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 16433-16438.
- Forst, S., Delgado, J. and Inouye, M.: DNA-Binding properties of the transcription activator (OmpR) for the upstream sequences of ompF in *Escherichia coli* are altered by envZ mutations and medium osmolarity. *J. Bacteriol.* 171 (1989) 2949-2955.
- Forst, S., and Inouye, M.: Environmentally regulated gene expression for membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu. Rev.*



- Cell. Biol. 4 (1988) 21-42.
- Gross, R., Aricò, B. and Rappuoli, R.: Families of bacterial signal-transducing proteins. Mol. Microbiol. 3 (1989) 1661-1667.
- Hall, M. N. and Silhavy, T. J.: Genetic Analysis of the ompB locus in Escherichia coli K-12. J. Mol. Biol. 151 (1981 a) 1-15.
- Hall, M. N. and Silhavy, T. J.: The locus and the regulation of the major Outer Membrane Porin of Escherichia coli K-12. J. Mol. Biol. 146 (1981 b) 23-43.
- Hess, J. F., Oosawa, K., Matsumura, P. and Simon, M. I.: Protein phosphorylation is involved in bacterial chemotaxis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84 (1987) 7609-7613.
- Igo, M. M., Ninfa, A. J. and Silhavy, T. J.: A bacterial environmental sensor that functions as a protein kinase and stimulates transcriptional activation. Genes and Development 3 (1989) 598-605.
- Igo, M. M. and Silhavy, T.J.: EnvZ, a transmembrane environmental sensor of Escherichia coli K-12, is phosphorylated in vitro. J. Bacteriol. 170 (1988) 5971-5973.
- Isibasi, A., Ortíz, V., Vargas, M., Paniagua, J., González, C., Moreno, J. and Kumate, J.: Protection against Salmonella typhi 9,12,d,vi. Infect. Immun. 56 (1988) 2953-2959.
- Jap, B. K. and Walian, P. J.: Biophysics of the structure and function of porins. Quarterly Reviews of Biophysics 23 (1990) 367-403.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F.: A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. J. Mol. Biol. 157 (1982) 105-132.

- Liljeström, P., Laamanem, I. and Palva, E. T.: Structure and expression of the ompB operon, the regulatory locus for the outer membrane porin regulon in *Salmonella typhimurium* LT-2. *J. Mol. Biol.* 20 (1988) 663-673.
- Liljeström, P., Luokkamäki, M. and Palva, E. T.: Isolation and characterization of a substitutum mutation in the ompR gene of *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Bacteriol.* 169 (1987) 438-441.
- Liljeström, P., Pirkko, L., Määttänen, and Palva, E. T.: Cloning of the regulatory locus ompB of *Salmonella typhimurium* LT-2. *Mol. Gen. Genet.* 188 (1982 a) 184-189.
- Liljeström, P., Pirkko, L., Määttänen, and Palva, E. T.: Cloning of the regulatory locus ompB of *Salmonella typhimurium* LT-2. *Mol. Gen. Genet* 188 (1982 b) 190-194.
- Maniatis, T. Fritsch, E. F. and Sambrook, J.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.
- Matzuyama, S., Mizuno, T. and Mizushima, S.: Interaction between two regulatory proteins in osmoregulatory expression of ompF and ompC genes in *Escherichia coli* a novel ompOR mutation suppresses pleiotropic defects caused by an envZ mutation. *J. Bacteriol.* 168 (1986) 1309-1314.
- Mizuno, T., Kato, M., Jo, Y-L. and Mizushima, S.: Interaction of OmpR, a positive regulator, with the osmoregulated ompC and omp genes of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 1008-1012.
- Mizuno, T. and Mizushima, S.: 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 (1990) 1077-1082.
- Mizuno, T., Wurtzel, E. T. and Inouye, M.: Osmoregulation of gene expression. *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 13692-13698.
- Moran Jr, Ch. P., Lang, N., LeGrise, S. F. J., Lee, G., Stepheus, M.: Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 186 (1982) 339-346.
- Nara, F., Mizuno, T. and Mizushima, S.: Complementation analysis of the wild-type and mutant *ompR* genes exhibiting different phenotypes of osmoregulation of the *ompF* and *ompC* genes of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 205 (1986) 51-55.
- Nikaido, H.: Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Mol. Microbiol.* 6 (1992) 435-442.
- Norioka, S., Ramakrishnan, G., Ikenaka, K. and Inouye, M.: Interaction of a transcriptional activator, *OmpR* with reciprocally osmoregulated genes, *ompF* and *ompC* of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 17113-17119.
- Pitcher, D. G., Saunders, N. A., Owen, R. J.: Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 8 (1989) 151-156.
- Puente, J. L., Alvarez-Scherer, V., Gosset, G. and Calva, E.: comparative analysis of the *Salmonella typhi* and *Escherichia coli ompC* genes. *Gene* 83 (1989) 197-206.
- Puente, J. L., Flores, V., Fernández, M., Fuchs, Y. and Calva, E.: Isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. *Gene* 61 (1987) 75-83.
- Puente, J. L., Verdugo-Rodríguez, A., and Calva, E.: Expression of

- Salmonella typhi and Escherichia coli OmpC is influenced differently by medium osmolarity; dependence on Escherichia coli OmpR. Mol. Microbiol. 5 (1991) 1205-1210.
- Raibaud, O. and Schwartz, M.: Positive control of transcription initiation in bacteria. Ann Rev. Genet. 18 (1984) 173-206.
- Ronson, C. W., Nixon, B. T. and Ausubel, F. M.: Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. Cell 49 (1987) 579-581.
- Sanders, D. A., Gillece-Castro, B. L., Stock, A. M., Burlingame, A. L. and Koshland Jr. D. E.: Identification of the site of Phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY. J. Biol. Chem. 264 (1989) 21770-21778.
- Sato, T. and Yura, T.: Chromosomal location and expression of the structural gene for major outer membrane protein Ia of Escherichia coli K-12 and of the homologous gene of Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 139 (1979) 468-477.
- Slauch, J. M., Garrett, S., Jackson, D. E. and Silhavy, T.J.: EnvZ functions through OmpR to control porin gene expression in Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separate by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98 (1975) 503-507.
- Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 170 (1988) 439-441.
- Stock, A. M., Mottonen, J. M., Stock, J. B. and Schutt, C. E.: Three-dimensional structure of Che Y, the response regulator of bacterial chemotaxis. Nature 337 (1989 a) 745-749.
- Stock, J. B., Ninfa, A. J. and Stock, A. M.: Protein Phosphorylation and regulation of adaptive response in bacteria.

- Microbiol Rev. 53 (1989 b) 450-490.
- Stock, J. B., Stock, A. M. and Mottonen, J. M.: Signal transduction in bacteria. Nature 344 (1990) 395-400.
- Undhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V. R.: Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. Infect Immun. 55 (1987a) 816-821.
- Undhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V. R.: An outer membrane protein (porin) as an eliciting antigen for delayed - type hypersensitivity in murine salmonellosis. Infect. Immun. 55 (1987 b) 822-824.
- Van Alphen, W., and Lugtenberg, B.: Influence of osmolarity of the growth medium on the Outer Membrane Protein pattern of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 131 (1977) 623-630.
- Verdugo - Rodríguez, A. and Calva, E., Denaturing treatment of *S. typhi* outer membrane protein preparations for improved immuno diagnosis of typhoid fever. AsPac. J. Mol. Biol. Biotechnol. 1 (1993 a) 113-116
- Verdugo - Rodríguez, A., Gaus, L - H., Devi, S., Koh, C. L., Puthuchery, S. D., Calva, E. and Pang, T.: Detection of antibodies against *Salmonella typhi* outer membrane protein (OMP) preparations. Asian Pacific J. Allergy Immunology 11 (1993 b) 45-52.
- Verdugo - Rodríguez, A., López - Vidal, Y., Puente, J. L., Ruíz - Palacios, G. M. and Calva, E.: Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12 (1993 c) 248-254.

Von Hippel, P. H., Bear, D. G., Morgan, W. D. and McSwiggen, J. A.:  
Protein nucleic acid interactions in transcription: A molecular  
analysis. *Ann. Rev. Biochem.* 53 (1984) 389-446.

Wurtzel, E. T., Chou, M. and Inouye, M.: Osmoregulation of gene  
expression. *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 13685-13691.