

00571

24j

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Análisis de la regulación del gen *ompS1* de *Salmonella typhi*

T E S I S

Que para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A:

IBQ. Ricardo Oropeza Navarro

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2009



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 Instituto de Biotecnología de la UNAM, Departamento de Microbiología Molecular, bajo la dirección del Dr. Edmundo Calva Mercado. Durante su realización fui becario de CONACyT (85798), PADEP (030344 y 03052) y PAEP (202354)

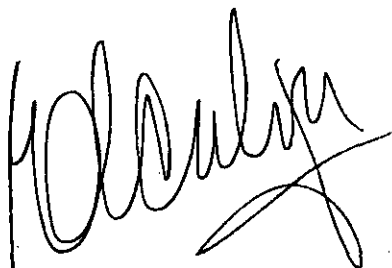
INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
OBJETIVO.....	14
RESULTADOS PUBLICADOS.....	15
Artículo 1.....	18
Artículo 2.....	30
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	36
BIBLIOGRAFIA.....	42

Resumen

El gen *ompS1* de *Salmonella typhi* codifica para una proteína de membrana externa de la familia de las porinas OmpC/OmpF. Este se expresa a muy bajos niveles, respecto a las porinas principales. Sin embargo, el análisis de remociones de la región reguladora 5' mostró que la remoción gradual de los nucleótidos -310 hasta -88, corriente arriba del sitio principal de inicio de la transcripción (P1), resultó en un incremento gradual de la expresión, alcanzando niveles diez veces mayores a los del gen de la porina mayoritaria *ompC*. Entonces, este fragmento de 222 pb contiene elementos reguladores involucrados en el control negativo. Los análisis de extensión del iniciador revelaron la existencia de tres promotores: la actividad de P1 fue dependiente de OmpR; P2 se expresó a un nivel más bajo en la ausencia de OmpR; y P3 tuvo una actividad minoritaria y constitutiva. OmpR se unió preferentemente a la caja II, un sitio canónico de 18 pb tipo F1/C1, la remoción (-88 a -66) de ésta resultó en una disminución de la expresión, confirmando así su función en el control positivo. La expresión de *ompS1* no se indujo por un conjunto de condiciones de estrés, ni por la ausencia del regulador IHF involucrado en el control negativo. Un homólogo de *ompS1* ha sido encontrado en *E. coli* K-12, el cual contiene un codón de paro y un cambio de fase de lectura, mientras que *Salmonella typhimurium* contiene una fase de lectura abierta, en esta región. Así, *ompS1* de *S. typhi* provee características nuevas en la regulación por OmpR.

Vo.Bo.



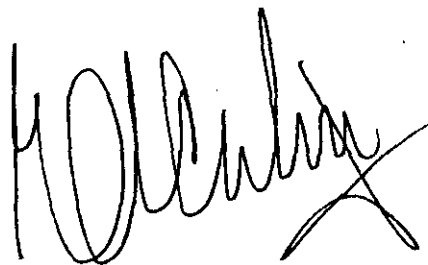
Dr. Edmundo Calva Mercado

Asesor

Summary

The *Salmonella typhi ompS1* gene codes for an outer membrane protein of the OmpC/OmpF porin family. It is expressed at very low levels, relative to the major porins. However, deletion analysis of the 5' regulatory region showed that the gradual removal of nucleotides -310 to -88, upstream from the P1 major transcriptional start-point, resulted in a stepwise increase in expression, reaching levels 10-fold above those for the *ompC* major porin gene. Hence, this 222 bp segment contains *cis*-acting regulatory elements involved in negative control. Primer extension analysis revealed the presence of three promoters: P1 activity was OmpR dependent; P2 was expressed at a lower level in the absence of OmpR; and P3 had a minor constitutive activity. OmpR bound preferentially to box II, an 18 bp F1/C1 canonical site, the removal (-88 to -66) of which resulted in a decrease in expression, thus supporting its role in positive control. Expression of *ompS1* was not induced by a set of stress conditions, including a shift in osmolarity, nor was the IHF regulator involved in negative control. An *ompS1* homologue was found in *E. coli* K-12, which contains a nonsense codon and a shift in the reading frame, whereas *Salmonella typhimurium* contains an open reading frame, in this region. Thus, *S. typhi ompS1* provides novel features in OmpR regulation.

Vo.Bo.



Dr. Edmundo Calva Mercado

Asesor

RESUMEN.

En este trabajo se caracterizó la regulación del gen *ompS1* de *Salmonella typhi* (*S. t.*) que codifica para una porina expresada a bajos niveles en condiciones de crecimiento en el laboratorio.

Las porinas son proteínas de las más abundantemente expresadas en bacterias Gram-negativas y se localizan en la membrana externa. De ellas, OmpC y OmpF en *Escherichia coli* (*E. c.*) presentan un perfil recíproco de expresión en respuesta a la osmolaridad del medio. Interesantemente se encuentran bajo el control del mismo sistema regulador, constituido por la pareja OmpR/EnvZ. Así, su estudio ha constituido un paradigma fundamental de regulación.

Iniciamos este trabajo animados a explorar los mecanismos que rigen la expresión de una porina minoritaria, encontrando para nuestra sorpresa que ésta tiene el potencial para transcribirse a los mismos o mayores niveles que las porinas principales. Además, en su control también desempeña un papel importante la proteína OmpR. Así, nuestros resultados aportan conocimientos particulares interesantes en torno a *ompS1* a la vez que añaden información importante al modelo general propuesto para explicar la regulación de las porinas.

Como primer punto, se construyeron fusiones traduccionales de la región 5' de *ompS1* al gen reportero *lacZ* sobre un plásmido derivado de pBR322, para definir los límites aproximados en los cuales quedan contenidos los elementos *cis*-reguladores que controlan su expresión: encontramos que son suficientes 367 nucleótidos corriente arriba al codón de inicio. Enseguida se procedió a disectar ésta para delimitar subregiones de control; así se ubicaron dos: una distal involucrada en represión, que comprende alrededor de 220 nucleótidos y una proximal de al menos 88 nucleótidos en la que reside una fuerte capacidad de activación. De esta manera, la remoción de la región de control negativo resultó en incrementos en los niveles de expresión del gen reportero hasta 10 veces mayores a los de una construcción con la región reguladora de *ompC*.

Se definió que la proteína OmpR interviene directamente en el control de *ompS1*, uniéndose al menos en seis sitios a lo largo de toda su región reguladora con diferentes grados de afinidad, según lo evidenciaron experimentos de protección a la digestión con DNasa.

También se aportan datos que sugieren la participación de factores adicionales en la regulación: mediante experimentos de extensión del iniciador se determinó la presencia de tres

promotores sobrelapados; dos de ellos (P1 y P2) regulados y uno (P3) constitutivo pero débil. Así, su promotor principal (P1) es activado por OmpR, con su sitio de inicio mapeado 57 nucleótidos corriente arriba al primer codón. En ciertas construcciones presentes en el fondo $\Delta ompB$ de *S.t.*, el promotor P2 se activa, lo que indica la existencia de un sitio *cis*-actuante. Este sitio mapea corriente arriba al nucleótido -117 (con referencia a P1).

Todas las construcciones exhibieron básicamente un perfil de expresión similar en los fondos genéticos de *S.t.* y *E.c.* silvestre; lo mismo ocurre en fondos genéticos $\Delta ompB$ de ambas bacterias, aunque la ausencia de transcripción a partir de P1 disminuye considerablemente los niveles de expresión. En conjunto, estos datos sugieren que los factores *trans*-actuantes reguladores para *ompS1* se encuentran conservados en ambas bacterias. Esta conclusión se refuerza por el hecho de que *E.c.* cuenta con un pseudogen *ompS1*, truncado en dos sitios con un codón de paro y un cambio de fase de lectura para las cepas de laboratorio, y con dos cambios de fase de lectura en posiciones diferentes para una cepa de *E.c.* patógena (enterohemorrágica, EHEC).

INTRODUCCION.

***Salmonella typhi*, el agente etiológico de la fiebre tifoidea.**

Salmonella typhi (*S. t.*) es una enterobacteria Gram-negativa patógena que infecta específicamente al ser humano, ocasionando la fiebre tifoidea (F. T.) (Guthrie, 1992a). Su dosis infectiva se encuentra en el intervalo de 10^4 a 10^8 bacterias (Drasar y Barrow, 1985) y está determinada tanto por factores asociados al patógeno (composición genética, condiciones de crecimiento, etc.) como por factores propios del huésped (edad, estado inmune, etc.).

La ruta de infección es a través del tracto gastrointestinal, por ingestión de agua o alimentos contaminados con heces u orina de individuos infectados. La enfermedad se manifiesta luego de una a dos semanas de incubación, siendo caracterizada por fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, dolores musculares y diarrea (en 20% de los casos). La infección generalizada alcanza un máximo luego de 7 a 10 días y puede persistir hasta por dos semanas (Guthrie, 1992b).

Se estima que mundialmente ocurren 16.6 millones de casos de F. T. al año, es decir 237 casos por cada cien mil habitantes, de los cuales 600,000 son fatales (Pang et al., 1998). Por lo que respecta a la República Mexicana, la incidencia ha declinado más del 40% a partir de 1988, ubicándose en 9.8 casos por cada 100,000 habitantes en 1996, con una tasa de mortalidad del 1% o menos (Calva y Calva, 1998).

Debido a la falta de un modelo animal para el estudio de la infección de *S. t.* y a que *Salmonella typhimurium* (*S. tm.*) ocasiona una enfermedad parecida a la F. T. en el ratón, muchos grupos de investigación han elegido a este par huésped-parásito para aportar conocimientos en torno a su interacción. Así, se han definido rutas de invasión y diseminación, órganos, tejidos, tipos celulares, estructuras macromoleculares, mecanismos y genes involucrados en este proceso tan complejo. Algunos de los datos obtenidos parecen ser directamente extrapolables a la infección en el ser humano; sin embargo, otros que involucran genes particulares, es decir presentes sólo en *S. tm.*, tienden a generar dudas de si existen proteínas que desempeñen funciones equivalentes o si el proceso infeccioso difiere entonces significativamente entre ambas bacterias (Richter-Dahlfors y Finlay, 1998; Galan, 1996; Rosenshine y Finlay, 1993, Miller, 1991).

Por otra parte, la genética comparativa entre bacterias del género *Salmonella* permite

explicar, al menos parcialmente, la especificidad de huésped exhibida por algunos de sus miembros. A la vez, ha puesto en evidencia que no es únicamente la ausencia o presencia de genes la que lo determina; sino aunado a esto hay diferencias sutiles en sus patrones de expresión y en la interacción de las proteínas codificadas en ellos (Bäumer et al., 1998).

Las porinas, proteínas de la membrana externa de bacterias Gram-negativas.

Como toda bacteria Gram-negativa, *S. t.* posee una membrana interna y una membrana externa, separadas por el periplasma. La membrana externa, a su vez, está constituida por lípidos y proteínas. Los lípidos en ella son de dos tipos: fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS). En *Escherichia coli* (*E. c.*), *Salmonella* y especies relacionadas su distribución es asimétrica, con la mitad interior constituida por fosfolípidos mientras que al exterior se exhibe el LPS. (Fig. 1, de esta tesis).

Embebidas en la matriz lipídica existen varias clases de proteínas, como son: la lipoproteína mureína, los canales específicos, los receptores de alta afinidad y las porinas clásicas.

Las porinas principales o mayoritarias en *E. c.* son OmpF y OmpC; adicionalmente existe PhoE, la cual llega a ser mayoritaria cuando la bacteria crece en condiciones de ayuno de fosfato. Como su nombre lo sugiere, las porinas forman poros llenos de agua a través de los cuales se establece el intercambio de solutos hidrofílicos (nutrimentos y sustancias de desecho) entre la bacteria y su medio. Las porinas son de las proteínas más abundantes en una bacteria, constituyendo hasta el 2% de la proteína total, equivalente a 10^5 moléculas por célula. (Nikaido, 1996)

Cada una de las porinas mayoritarias ha sido caracterizada intensamente: en términos generales, todas forman trímeros y su límite de exclusión está alrededor de 600 Da. Sin embargo existen ligeras diferencias entre ellas: OmpF forma un poro más grande que OmpC (1.16 vs 1.08 nm), siendo ambas ligeramente selectivas hacia cationes; mientras que PhoE tiene ligera selectividad hacia aniones (Benz, 1988; Nikaido, 1992; Schultz, 1993).

Las porinas constituyen una superfamilia de proteínas distribuida entre bacterias entéricas y neisseriales. Cuando se alinea su secuencia primaria de aminoácidos es evidente la existencia de regiones conservadas y variables intercaladas; esto permite sugerir la conformación probable de estas proteínas en la membrana externa (Jeanteur et al., 1991). También de allí fue notable

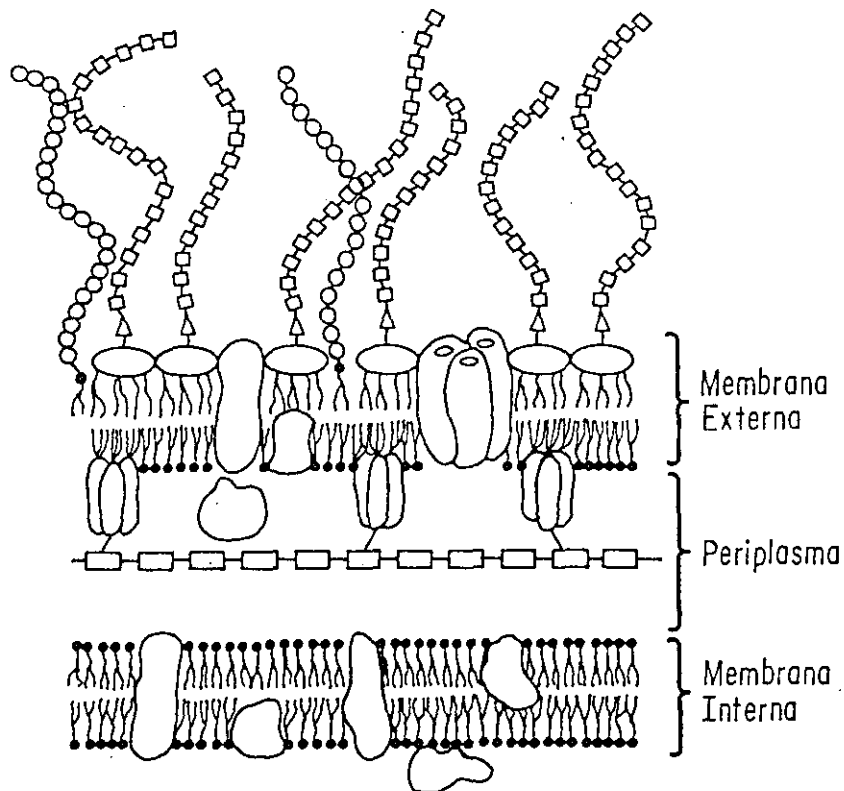


Fig. 1. Envoltura celular de las bacterias Gram-negativas. Nótese la constitución de la membrana externa: una bicapa lipídica asimétrica de la cual sobresalen las cadenas de LPS; en ésta hay embebidas algunas proteínas, entre ellas las porinas, agrupadas formando trímeros.

el hecho que tienen residuos altamente conservados, los cuales han sido caracterizados como importantes para la función de poro, su correcta ubicación en la membrana externa y las interacciones inter e intramoleculares (Bosch et al., 1986; 1987; 1988; Benson et al., 1988).

Un paso muy importante en el estudio de las relaciones estructura-función de las porinas, fue la determinación de la estructura cristalográfica de dos de ellas (OmpF y PhoE). Así se definió que la cadena polipeptídica atraviesa la membrana en 16 ocasiones como tiras β -antiparalelas, formando una estructura de barril que constituye el poro. Cada tira presenta residuos hidrofílicos e hidrofóbicos intercalados, que se orientan hacia el interior del poro o hacia la membrana, respectivamente. Los segmentos transmembranales están conectados del lado exterior de la bacteria por asas o vueltas largas, mientras que del lado periplásmico hay giros o vueltas cortas. En el caso específico de OmpF, se definió que la tercer vuelta externa se pliega hacia adentro del poro obstruyéndolo parcialmente, para definir sus medidas (0.7 x 1.1 nm), las cuales concuerdan con los datos obtenidos por determinaciones indirectas. Por otra parte, se propone que el asa 2 se dobla hacia afuera para interactuar con el monómero vecino, contribuyendo a estabilizar el trímero (Cowan et al., 1992).

Además de los genes de porinas mayoritarias, se han descrito en *E. c.* genes que codifican para porinas que se expresan a bajos niveles en condiciones de laboratorio, como son Lc, NmpC y OmpN, o que se inducen en ausencia de las porinas principales y bajo la presión de crecer en un sustrato definido (maltodextrinas) como OmpG (Misra y Benson, 1989). Para el caso de *S. tm.* se ha descrito adicionalmente una porina mayoritaria, OmpD. Finalmente, por lo que respecta a *S. t.*, hemos clonado, secuenciado y caracterizado en mayor o menor extensión los genes que codifican para OmpC, OmpF, PhoE, OmpS1 y OmpS2 (el homólogo estructural de OmpN) (Puente et al., 1987; Fernández-Mora et al., 1995)

Factores que intervienen en regular la expresión de las porinas.

La regulación de las porinas principales de *E. c.* ha sido materia de estudio durante muchos años por varios laboratorios. Es así que se ha determinado una serie de condiciones del medio ambiente que afectan su expresión. Entre ellas están: pH, temperatura, presencia de sustancias tóxicas o nutrientes, fase de crecimiento y osmolaridad (Pratt et al., 1996).

También se ha generado información, en mayor o menor grado, respecto a algunos de los

procesos intracelulares que definen su expresión en respuesta a una condición ambiental definida. En este respecto, se sabe que *ompF* es controlado negativamente a nivel traduccional por el RNA antisentido *micF*. Este gen está orientado divergente a *ompC* y su transcripción se incrementa por un mecanismo no caracterizado en respuesta al aumento de la temperatura (Forst e Inouye, 1988). Además, se han identificado algunas proteínas reguladoras que activan la transcripción de *micF* uniéndose a su región promotora, entre las que se encuentran: MarA, cuyos niveles se incrementan en presencia de ácidos débiles y antibióticos (Jair et al. 1995), y SoxS, involucrada en la respuesta al estrés oxidativo (Li y Demple, 1994). Entre los represores de *micF* está la proteína Lrp, que es activa en condiciones de ayuno (Ferrario et al., 1995). Por otra parte, la síntesis de OmpF disminuye durante la fase estacionaria de crecimiento a medida que el factor RpoS se produce, sin que hasta ahora se conozca como es que ello se define.

Sin embargo, no cabe duda que el mecanismo de regulación de las porinas en respuesta a la osmolaridad es el más ampliamente caracterizado (Fig. 2, de esta tesis). El hecho es que en *E. c.* las porinas mayoritarias se expresan de manera recíproca en respuesta a la osmolaridad. Así, cuando la osmolaridad es baja, se expresa preferentemente OmpF; pero cuando la osmolaridad aumenta OmpF se reprime y se sintetiza OmpC (Fig. 2B, de esta tesis) (Alphen y Lugtenberg, 1977; Pratt y Silhavy, 1995a).

La justificación empleada para explicar este patrón de expresión alude a que un medio de baja osmolaridad equivale a un medio pobre en nutrimentos, mientras que un medio de alta osmolaridad es rico en nutrimentos y quizás también en sustancias tóxicas. Así, el expresar un poro grande como el de OmpF, o más pequeño como el de OmpC, constituye una ventaja para la bacteria en función del medio en el que se encuentre.

Desde muy temprano en el estudio de las porinas, fue evidente la existencia de un locus involucrado en su osmorregulación, al cual se denominó *ompB*. Posteriormente se definió que en él están codificados los genes para las proteínas OmpR y EnvZ, organizados en un operón. Estudios extensivos y de comparación revelaron que pertenecen a la familia de reguladores del llamado sistema de dos componentes (Sarma y Reeves, 1977; Hall y Silhavy, 1981; Wurtzel et al., 1982; Slauch y Silhavy, 1989).

EnvZ, la proteína detectora, tiene una longitud de 450 aminoácidos (aas) y está presente en aproximadamente 10 copias por célula; en ella residen además actividades de fosforilación

dependiente de ATP, cinasa de OmpR y fosfatasa de OmpR fosforilado. Posee en su extremo amino terminal dos segmentos transmembranales (TM1, aas 16-47 y TM2, aas 163-179), que la anclan a la membrana interna, exponiendo hacia el periplasma los residuos 48 al 162. La evidencia experimental indica que la capacidad detectora-transmisora de la variación en la osmolaridad reside en estas regiones, sin que se conozca con certeza el estímulo detectado en sí. (Forst et al., 1987; Igo y Silhavy, 1988; Igo et al., 1989; Tokishita et al., 1991; Waukau y Forst, 1992).

Las funciones enzimáticas o de señalización residen en el dominio citoplásmico de EnvZ (carboxilo terminal) (Roberts et al., 1994). Este a su vez se divide en dos subdominios: el A de 67 residuos (aas 223 al 289), que contiene el sitio de autofosforilación (la His 243), y el B de 161 residuos, en donde se ubica la función de unir ATP y las actividades de fosforilación hacia el dominio A y hacia OmpR (Fig. 2A, de esta tesis)(Park et al., 1998; Tanaka et al., 1998).

Adicionalmente se sabe que dos mutantes de EnvZ en distintas actividades pueden transcomplementarse, lo que sugiere que la función de detección y transducción es bimolecular (Yang e Inouye, 1991). Sin embargo, existe controversia respecto a cuál o si todas las actividades de EnvZ son objeto de regulación (Russo y Silhavy, 1991; Jin e Inouye, 1994).

OmpR es la proteína reguladora o efectora del sistema, de 239 aas de longitud y naturaleza soluble (citoplásmica), presente en aproximadamente 1000 copias por célula. Entre otras funciones, interactúa con EnvZ para recibir el estímulo (fosforilación) o ser inactivada (desfosforilación), y se une al DNA para activar o reprimir la transcripción e interactúa con otras proteínas (Fig. 2, de esta tesis) (Wurtzel et al., 1982).

También esta proteína posee dos dominios: el amino terminal, donde es fosforilada en Asp 55, y el carboxilo terminal donde reside la capacidad de unir al DNA y de interactuar consigo misma y con la RNA polimerasa (específicamente con el extremo carboxilo terminal de la subunidad α) (Tate et al., 1988; Tsung et al., 1989; Igarashi et al., 1991; Slauch et al., 1991; Shariff e Igo, 1993).

Se ha determinado que la fosforilación de OmpR aumenta su afinidad por el DNA al menos 10 veces (Aiba et al., 1989); entonces, básicamente por ese motivo es que en condiciones normales *in vivo* la forma desfosforilada de OmpR es inactiva, pues el resto de sus actividades son consecuencia de su capacidad de unir DNA. Por otra parte, se ha correlacionado que el

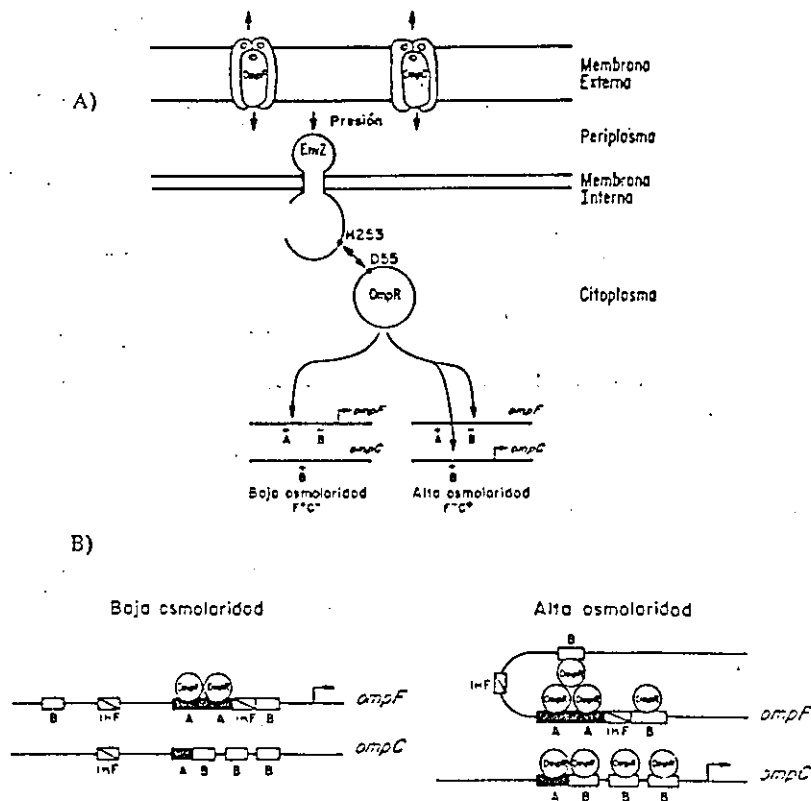


Fig. 2. Modelo clásico de regulación de las porinas mayoritarias en *E. c.* A) Esquema general que muestra el par de proteínas involucradas en osmorregulación: EnvZ, proteína de membrana interna, con un dominio detector (periplásmico) y un dominio de señalización (citoplásmico), se indica su sitio de autofosforilación (H253); la otra proteína es OmpR, citoplásmica, fosforilada en el residuo D55 y con capacidad de unirse a la región reguladora de *ompC* y *ompF*. B) Esquema de las interacciones propuestas entre OmpR y la región reguladora de *ompC* y *ompF* en baja y alta osmolaridad; en la primer condición la interacción ocurre entre OmpR y las cajas de alta afinidad (señaladas con la letra A) sobre *ompF*; en la otra OmpR interactúa con cajas de alta y baja afinidad (estas últimas señaladas con la letra B) formando una horquilla represora en *ompF*, pero favoreciendo la transcripción de *ompC*.

aumento en la osmolaridad del medio ocasiona incrementos en el nivel de OmpR fosforilado (Forst et al. 1990).

Tomando en consideración todos estos hechos, se propuso un modelo para explicar la regulación recíproca de la expresión de los genes de porinas en respuesta a la osmolaridad, el cual postula que cuando la osmolaridad del medio es baja también lo son los niveles de OmpR fosforilado. En estas condiciones, OmpR se une a sitios de alta afinidad sobre la región reguladora de *ompF* para activar su transcripción, pero que cuando la osmolaridad aumenta, lo propio ocurre con el nivel de OmpR fosforilado. Así, en este caso OmpR fosforilado satura los sitios de alta afinidad y une sitios de baja afinidad, sobre la región reguladora de *ompF* ocasionando su represión y en la región reguladora de *ompC* activando su transcripción (Norioka et al., 1986; Mizuno et al., 1988; Mizuno y Mizushima, 1990; Russo y Silhavy, 1991) (Fig. 2).

Este modelo permite hacer una serie de predicciones respecto a la existencia de sitios de alta y baja afinidad, encargados de activar y reprimir, respectivamente, en la región reguladora de *ompF*; así como sitios de baja afinidad corriente arriba a *ompC*, involucrados en la activación. Además, predice que, en términos generales, la región reguladora de *ompF* debe ser al menos 20 veces más afín por OmpR fosforilado que su contraparte en *ompC*.

Estas predicciones fueron difíciles de evaluar hasta hace tiempo, pero antes de proceder en ese sentido quedaban aún por definir: la secuencia consenso que reconoce OmpR, su longitud y las bases nucleotídicas importantes que determinan el grado de afinidad; el número de moléculas de OmpR que se unen a cada región reguladora, las interacciones entre éstas y la comparación directa y cuantitativa de la capacidad de unión de OmpR hacia las dos regiones reguladoras.

Si bien resultaría complaciente afirmar que cualquiera de estos tópicos ha sido explorado de manera extensiva y concluyente, es bueno reconocer que en los últimos años se han hecho avances importantes cuya consideración nos permite conceptualizar la situación actual en términos más adecuados.

Así, de manera simultánea e independiente, dos grupos (Rampersaud et al., 1994; Huang et al., 1994) identificaron la existencia de un sitio de unión de baja afinidad para OmpR en la región 5' reguladora de *ompF*, involucrado en reprimir probablemente a través de la formación de una horquilla con la ayuda de la proteína IHF (Ramani et al., 1992) y de la curvatura

intrínseca del DNA. Posteriormente, Harlocker et al. (1995) encontraron que la proteína OmpR se une al DNA en una modalidad de "dos a la vez" y si bien en solución nunca se ha demostrado la existencia de dímeros de OmpR, aparentemente el pegado al DNA en sitios contiguos desencadena una interacción proteína-proteína. Estos resultados han sido corroborados posteriormente por otros grupos (Huang e Igo, 1996), madurando así el concepto de que cada monómero de OmpR reconoce la mitad del sitio de unión, pero que es importante una secuencia íntegra y correcta en cada mitad para que el complejo se forme.

Aun con toda esta información, ha sido difícil establecer la secuencia consenso reconocida por OmpR, aunque varios grupos han abordado el problema (Harlocker et al., 1995; Huang e Igo, 1996; Pratt y Silhavy, 1995b), empleando diversas metodologías que van desde las diferentes técnicas de protección *in vivo* (con dimetil sulfato) e *in vitro* (DNasa, radicales hidroxilo), hasta el rastreo de mutantes que aumenten o disminuyan la afinidad *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. La conclusión de estos trabajos, en términos generales, es que el par de moléculas de OmpR reconoce alrededor de 18 a 20 nucleótidos. Sin embargo, el conjunto de secuencias reconocidas, cuatro cajas sobre la región reguladora de *ompF* (F1 a F4) y tres sobre la correspondiente en *ompC* (C1 a C3), no guardan un buen consenso, de tal manera que sólo ha sido posible proponer la importancia de algunos cuantos nucleótidos y especular en torno a su distribución particular para definir la afinidad de toda la caja.

Por ello mismo, ha sido difícil distinguir si cada monómero reconoce una secuencia repetida directa o inversa y por lo tanto definir si la interacción proteína-proteína ocurre en tándem o es encontrada. Un avance previo a la resolución de este problema, lo constituyeron los experimentos tendientes a definir la estructura tridimensional de la proteína OmpR, pues resultaba difícil encontrar, en base a su secuencia primaria y a los datos de mutantes puntuales, un motivo típico de unión a DNA. Así, de manera casi simultánea, dos grupos (Kondo et al., 1996; Martínez-Hackert y Stock, 1997a), reportaron la cristalización del dominio carboxilo terminal de OmpR; la estructura definida por ambos es coincidente. Estos trabajos concluyen que OmpR puede agruparse en una subfamilia de reguladores transcripcionales que poseen un dominio de unión a DNA de hélice-vuelta-hélice con alas (Martínez-Hackert y Stock, 1997b), lo cual implica que la función de reconocimiento del DNA está dada no solo por la estructura de hélice-vuelta-hélice, sino también por dos estructuras adicionales que la flanquean a cada uno de sus lados,

denominadas alas.

Con esta serie de datos, se determinó la orientación de los monómeros de OmpR sobre su sitio de unión, empleando un conjunto de proteínas modificadas en sitios presumiblemente cercanos a la interfase proteína-DNA con un reactivo (*o*-cobre-fenantrolina) que corta al DNA. De esta forma, se definió que los monómeros de OmpR se orientan en tándem, con las alas 1 proximales y las alas 2 distales al sitio de inicio de la transcripción, lo que indica que en el dímero se establece una interfase proteína-proteína entre el ala 1 de la molécula 5' y el ala 2 de la 3'. También se observaron variaciones en la intensidad y especificidad de reconocimiento de cada monómero hacia su medio sitio (Harrison-McMonagle et al., 1999).

En otro estudio que añade información importante, compararon de manera cuantitativa la afinidad de OmpR y OmpR fosforilado por sus sitios de unión sobre las regiones reguladoras de *ompF* y *ompC in vitro*, a través del cambio en la anisotropía de fluorescencia de fragmentos de DNA marcados. Los resultados obtenidos indican que OmpR sin fosforilar es seis veces más afín a la región reguladora de *ompC* (cajas C1 a C3) que a la de *ompF* (cajas F1 a F3) y que una vez fosforilado, si bien la afinidad se incrementa, ello no ocurre de manera constante para ambas secuencias, lo que ocasiona que en esa condición OmpR fosforilado sea solo alrededor de dos veces más afín, por las cajas tipo F que por las C, lo cual entra en conflicto con una de las predicciones básicas del modelo (Head et al., 1997). De ser corroborados estos datos, será necesario postular un modelo más elaborado que involucre actores o mecanismos desconocidos a la fecha.

En lo que respecta a las porinas de *S. t.*, el estudio de su regulación fue abordado por nuestro laboratorio en los aspectos que en principio resultaron más novedosos, como lo es el hecho de que *ompC* no se osmorregule, aunque su expresión depende también de OmpR (Puente et al., 1991). Ello nos llevo a aislar los genes codificados en el operón *ompB* (Martínez-Flores et al., 1995) y a generar una mutante en este locus (Martínez-Flores et al., 1999). Todo ello con la finalidad de comprender los mecanismos de regulación de esta porina. La información respecto a la secuencia de las proteínas OmpR y EnvZ es por sí misma interesante: mientras que OmpR es idéntica a su homólogo en *E. c.* EnvZ exhibe algunas diferencias, las cuales se agrupan principalmente en el subdominio B del dominio citoplásmico. Más aun, experimentos de complementación en mutantes en *ompB* de *E. c.* y *S. t.*, empleando fusiones de las regiones

reguladoras de los respectivos genes *ompC*, revelan que las diferencias en la expresión están dadas en parte por el fondo genético de cada cepa empleada pero también por el locus regulador en sí; de manera que cuando no se reúnen estos dos requisitos, el perfil particular de expresión de *S. t.* no se presenta (Martínez-Flores et al., 1999).

Por otra parte, el gen *ompS1* fue aislado en nuestro laboratorio de un banco genómico de *S. t.* construido en fagos, mediante hibridación tipo southern, empleando como sonda fragmentos del gen *ompF* de *E. c.* A partir del fago recombinante que lo portaba fue subclonado como un fragmento de *SaII* de 5.6 kb en pBR325 (Fernandez-Mora et al., 1995). Con su secuencia nucleotídica se dedujo la secuencia de la proteína, que al alinearla con otros miembros de la familia de las porinas muestra todos los rasgos conservados en ellas: un péptido líder o secuencia señal propio de proteínas exportadas, dieciséis segmentos que guardan entre sí alta similitud y ocho regiones variables, correspondientes a las secuencias transmembranales y a las asas o vueltas largas expuestas hacia el exterior de la bacteria, respectivamente; así como aminoácidos que han sido caracterizados como importantes en la función de poro y en la correcta ubicación de estas proteínas en la membrana externa (Benson et al., 1988; Misra y Benson, 1988; Jap y Walian, 1990).

Un hecho que llamó nuestra atención fue que aún clonado en un plásmido, los niveles de expresión de *ompS1* a partir de su propio promotor son bajos cuando la bacteria crece en condiciones estándar de laboratorio, de manera que la proteína solo es observable en el sistema de minicélulas. Sin embargo, cuando la región codificante es clonada bajo el control de un promotor fuerte e inducible, y se analiza el perfil electroforético de proteínas de membrana externa (OMPs) teñidas con comassie de bacterias transformadas con esta construcción, es posible detectar una proteína del peso molecular de OmpS1 (Fernandez-Mora et al., 1995).

Lo anterior sugiere que *ompS1* está sujeto a un estricto control transcripcional, pero que cuenta con todas las señales para ser traducido y exportada eficientemente.

OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo fue aportar datos que contribuyan a establecer un modelo del mecanismo molecular por el cual *S. t.* mantiene bajos niveles de expresión de *ompS1* cuando crece en condiciones de laboratorio.

RESULTADOS PUBLICADOS.

A continuación se incluyen dos artículos ya publicados que son el fruto del trabajo de investigación en torno a *ompS1*.

En el más reciente se inicia el estudio detallado de su región reguladora para delimitar los elementos *cis*-actuantes requeridos para un bajo nivel de expresión e identificar los factores *trans*-actuantes directos o indirectos.

La estrategia experimental consistió en la generación de fusiones traduccionales con diferentes fragmentos de la región reguladora recortada por su extremo 5' al gen reportero *lacZ*. En la gráfica de la Fig. 1 (panel A) se reportan los diferentes niveles de expresión cuantificados para siete fusiones, así como el efecto de cuatro fondos genéticos; el esquema adjunto (panel B) destaca los elementos *cis*-reguladores incluidos en cada construcción.

Del análisis de esta figura es evidente que: 1) una construcción que tiene 310 nucleótidos de la región reguladora aún contiene integros los elementos *cis*-actuantes que mantienen un bajo nivel de expresión; 2) existe una región distal de alrededor de 222 nucleótidos involucrada en represión; y 3) existe una región proximal corriente abajo de -88 capaz de activar hasta 10 veces más que la región reguladora de *ompC*.

Por lo que respecta al efecto del fondo genético, observamos que el perfil de expresión para cada construcción es muy similar en términos generales, independientemente de si están transformadas en *S. t.* o en *E. c.* lo cual sugiere que los elementos reguladores en *trans* están conservados entre ambas bacterias.

También es importante hacer notar que una mutación que inactiva el operón *ompB*, donde están codificados *OmpR* y *EnvZ* tiene el efecto de disminuir la expresión tanto en *S. t.* como en *E. c.*

Con estos resultados un punto a explorar era si el análisis de remociones refleja el comportamiento total de *ompS1*. Para ello se generó la construcción pRO269, que es equivalente a la pRO266 del experimento anterior, solo que lleva el gen estructural en lugar del reportero.

El análisis del perfil electroforético de OMPs de *S. t.* silvestre y $\Delta ompB$ transformada con esta y otras construcciones se muestra en la Fig. 2. Con el se validan los resultados del análisis de remociones a la vez que se refuerza la idea de que el control sobre *ompS1* es principalmente

a nivel transcripcional.

Con el fin de ubicar las regiones recién identificadas como importantes para la regulación con el sitio de interacción de la RNA polimerasa se mapeó el sitio de inicio de la transcripción. Los resultados de este experimento se muestran en la Fig. 3. Estos evidencian que *ompS1* tiene tres sitios de inicio de la transcripción, que denominamos P1, P2 y P3. Es decir que este gen tiene tres promotores que están sobrelapados (Fig. 4). El P1 es el promotor principal en el fondo silvestre, P2 exhibe un perfil complejo de transcripción, mientras que P3 se transcribe en forma débil y constitutiva.

Para evaluar la existencia de una interacción entre la proteína OmpR y la región reguladora bajo estudio se emplearon ensayos de protección a la digestión con DNasa (Fig. 5), ello permitió delimitar experimentalmente los sitios de unión a OmpR, a la vez que sugiere la existencia de una jerarquía en el reconocimiento, conforme se incrementa la concentración de OmpR.

En un intento de reunir más datos en torno al probable papel de OmpR en la represión de *ompS1*, se generó un plásmido que contiene la totalidad de la región mínima reguladora, pero con una remoción interna de 31 pares de bases que incluye la caja IV (Fig. 4), al que denominamos pRO310d4; este plásmido dirige niveles de expresión similares a los de una construcción de tamaño intermedio en fondos genéticos de *S. t.* silvestre y $\Delta ompB$ (Fig. 6), transcribiéndose en el primer caso a partir de P1 y en el otro a partir de P2 (Fig. 3).

He añadido dos figuras adicionales en esta sección, que complementan el artículo.

La Fig. 3. de esta tesis es un alineamiento entre la región reguladora de *ompS1* y un fragmento de DNA 5' al pseudogen *ompS1* de *E. c.* La identidad existente es de un 62%.

La Fig. 4. de esta tesis es el alineamiento entre la proteína OmpS1 de *S. t.* y la secuencia deducida y editada a partir del pseudogen *ompS1* en *E. c.* (panel A) en el que también se incluyen mutaciones encontradas en la misma región pero en EHEC, y el alineamiento (panel B) de la secuencia correspondiente en *S. tm.* donde hay una fase de lectura continua.

El otro artículo describe el aislamiento, clonación secuenciación y caracterización inicial de *ompS1*.

Mi contribución a este trabajo fue la generación de una primer fusión traduccional al gen reportero *lacZ*, equivalente al pRO266 del segundo artículo, que nos dio las primeras evidencias

del requerimiento de una región reguladora íntegra para el estricto control transcripcional sobre *ompS1* y de la importancia de OmpR en éste. Apoyados en dichos datos participé en el análisis de su secuencia en busca de cajas con similitud al consenso que reconoce OmpR.

Por otra parte, analicé por hibridación tipo Southern el DNA de distintas Salmonellas, empleando como sonda el gen *ompS1*, encontrando que existen secuencias similares en otras cepas de *S. t.*, así como en bacterias de este género.

MARKED SET

Molecular Microbiology (1999) 31(0), 000-000

Negative and positive regulation of the non-osmoregulated *ompS1* porin gene in *Salmonella typhi*: a novel regulatory mechanism that involves OmpR

Ricardo Oropeza, Clara Luz Sampieri, José Luis Puente and Edmundo Calva*

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico.

Summary

The *Salmonella typhi ompS1* gene codes for an outer membrane protein of the OmpC/OmpF porin family. It is expressed at very low levels, relative to the major porins. However, deletion analysis of the 5' regulatory region showed that the gradual removal of nucleotides -310 to -88, upstream from the P1 major transcriptional start-point, resulted in a stepwise increase in expression, reaching levels 10-fold above those for the *ompC* major porin gene. Hence, this 222 bp segment contains *cis*-acting regulatory elements involved in negative control. Primer extension analysis revealed the presence of three promoters: P1 activity was OmpR dependent; P2 was expressed at a lower level in the absence of OmpR; and P3 had a minor constitutive activity. OmpR bound preferentially to box II, an 18 bp F1/C1 canonical site, the removal (-88 to -66) of which resulted in a decrease in expression thus supporting its role in positive control. Expression of *ompS1* was not induced by a set of stress conditions, including a shift in osmolarity, nor was the IHF regulator involved in negative control. An *ompS1* homologue was found in *E. coli* K-12, which contains a nonsense codon and a shift in the reading frame, whereas *Salmonella typhimurium* contains an open reading frame in this region. Thus, *S. typhi ompS1* provides novel features in OmpR regulation.

Introduction

Typhoid fever (TF) in humans is the result of a systemic infection by *Salmonella typhi*, affecting a wide sector of the world population (Pang *et al.*, 1995). A specific humoral and cellular immune response is mounted against *S. typhi*

outer membrane proteins (OMPs) in TF patients, which has allowed the design of novel diagnostic assays (Calderón *et al.*, 1986; Aron *et al.*, 1993; Verdugo-Rodríguez *et al.*, 1993). Furthermore, *Salmonella typhimurium* and *S. typhi* OMPs have proven to be relevant immunogens for protection of mice challenged with virulent strains (Kuusi *et al.*, 1981; Isibasi *et al.*, 1988; Muthukumar and Muthukaruppan, 1993). The stimulation of peripheral lymphocytes, toxic effects on HeLa and Hep-2 cells, the activation of complement, and the release of several cytokines have been observed in response to *S. typhimurium* porins (Galdiero *et al.*, 1984; 1993; Tufano *et al.*, 1984). Interestingly, double *ompC* and *ompF* mutants were less virulent than the wild type (Chatfield *et al.*, 1991). Thus, the study of OMPs, including porins, is of relevance towards the understanding of the interaction between a bacterial pathogen and its host.

S. typhi synthesizes three major OMPs that are highly abundant upon growth in standard laboratory media: the OmpC and OmpF porins and OmpA, a structural protein (Puente *et al.*, 1991). Another major porin, PhoE, is synthesized under phosphate limitation (Calva *et al.*, unpublished). Expression of *E. coli* OmpC and OmpF is under the control of EnvZ and OmpR, a two-component signal transduction system coded by the *ompB* (*ompA envZ*) locus. The relative levels of OmpC and OmpF expression in *E. coli* are modulated by changes in osmolarity, which affects the level of phosphorylated OmpR (Forst and Inouye, 1988; Mizuno and Mizushima, 1990; Pratt *et al.*, 1996). In *S. typhi*, *ompC* and *ompF* expression is reduced in *ompA* and $\Delta ompB$ backgrounds; although a shift in osmolarity only affects expression of OmpF (Puente *et al.*, 1991; Martínez-Flores *et al.*, submitted). The OmpR proteins are identical between *E. coli* and *S. typhi* and the EnvZ proteins are 95% identical; most differences are located towards the carboxy terminus (Martínez-Flores *et al.*, 1995; Martínez-Flores *et al.*, submitted). It is interesting to note that the *ompB* operon has been implicated in bacterial virulence, which highlights the pleiotropic role of this regulatory system in the physiology of *Salmonella* (Dorman *et al.*, 1989; Pickard *et al.*, 1994; Lindgren *et al.*, 1996).

To add further to our investigations, *S. typhi* contains the novel *ompS1* gene that codes for an OMP with all the molecular features of the OmpC/OmpF family, which

Received 26 October, 1998; revised 21 December, 1998; accepted 31 December, 1998. *For correspondence. E-mail ecalva@ibt.unam.mx; Tel. (+52) 73 291 645; Fax (+52) 73 138 673.

that the bacterium synthesizes a ompS1 protein
emphasizes the fact

2 R. Oropeza, C. L. Sampieri, J. L. Puente and E. Calva

15/ can be synthesized at relatively low levels under standard laboratory growth conditions (Fernández-Mora *et al.*, 1995). Moreover, although some variation in size and in anion or cation selectivity has been observed among the porins formed by *E. coli* and *S. typhimurium*, no clear functional difference has been established yet between them, and it is not readily apparent why a bacterium synthesizes a variety of structurally related porins (Benz *et al.*, 1985; Hancock, 1987). This wider porin repertoire in *Salmonella* has raised new questions to be addressed, including those regarding the function and expression of *S. typhi* *ompS1*. In this context, various attributes that determine *ompS1* negative and positive regulation, both in the presence and absence of the OmpR transcriptional regulator, are described herein.

Results

Expression of reporter genes harbouring different lengths of the *ompS1* 5' regulatory region

Previously, we had shown that *ompS1* can direct the expression of a major OMP when under the control of a strong inducible promoter, but not under the control of 1.4 kb of its own 5' regulatory region as in plasmid pFC63 (Fernández-Mora *et al.*, 1995). This observation prompted us to investigate whether this region contained negative *cis*-acting regulatory elements that determined the low level of *ompS1* expression. Fragments carrying 1.4 kb, 600 bp or 521 bp of the *ompS1* 5' upstream region were used to create translational fusions to the *lacZ* reporter gene, rendering plasmids pRO1.4, pRO600 and pRO521 respectively (see *Experimental procedures*). These constructions were transformed into the *S. typhi* wild-type Mexican reference strain IMSS-1 (Puente *et al.*, 1987), and the reporter activity levels were determined. All three constructs had similar low levels of expression (not shown) to those displayed by pAT59 (E. Calva *et al.*, unpublished). pAT59 contains a *lacZ* fusion to the 5' regulatory region of the *S. typhi* *phoE* gene, which served as a background control under high-phosphate repression.

Exonuclease *Ba*31 and pRO521 were used to generate a collection of shorter pRO *lacZ* fusion plasmids containing various lengths of the *ompS1* 5' regulatory region, as described in *Experimental procedures*. Several clones, exhibiting different blue tonalities on Xgal Luria-Bertani (LB) plates, were selected and sequenced in order to define the extent of the *Ba*31 digestion. Beta-galactosidase assays on cultured samples of *S. typhi* IMSS-1 carrying these deletions showed that pRO310 was the shortest clone to exhibit a similar low level of expression to the longer clones. This defined the minimal region for negative control because shorter clones presented higher activities (Fig. 1 and data not shown).

In *S. typhi* wild type, expression increased more than 100-fold, in a stepwise fashion, upon removal of 222 bp, which is the observed difference between pRO310 and pRO88 (Fig. 1). Interestingly, this expression was more than 10-fold greater than that shown by pSCZ10, which contains an *S. typhi* *ompC-lacZ* fusion (Martínez-Flores *et al.* Submitted) and which was used as a positive control. Further removal of 22 bp (from pRO88 to pRO66) resulted in a 10-fold decline in expression (Fig. 1).

Role of OmpR in *ompS1* activation

To assess the role of OmpR in *ompS1* activation, the expression of representative fusions was analysed in *S. typhi* Δ *ompB* (*ompR envZ*) and in *E. coli* wild type and Δ *ompB* (Fig. 1). The expression in *S. typhi* Δ *ompB* resulted in a sixfold reduction in expression for pRO88, and in a general lowering for all constructs. In *E. coli* wild type, there was also an increase in pRO88 expression compared with the longer pRO310 and with the shorter pRO66 constructs, although the highest level attained was one-quarter of that seen in *S. typhi* wild type. Expression in *E. coli* Δ *ompB* was reduced as for the *S. typhi* mutant (Fig. 1).

These observations led us to consider two putative 5' regulatory subregions that determine expression in the wild-type strain: one containing *cis*-elements for negative control between -310 and -88, and one comprising *cis*-acting elements for positive regulation within -88 and -66. In addition, although most expression was dependent on the *ompB* regulatory operon, some *ompB*-independent activity was also seen (Fig. 1). Interestingly, putative OmpR-binding boxes (I-VI) have been identified in both subregions (Figs. 1 and 4) on the basis of newly defined 18 bp regulatory sites (Huang and Igo, 1996; Head *et al.*, 1998).

It is worth noting that we had previously defined the 10 bp boxes from I to V (Fernández-Mora *et al.*, 1995) on the basis of F- and C-type boxes (Rampersaud *et al.*, 1994). Thus, current box I corresponds to old box I plus adjacent bp; box II encompasses previous boxes II and part of III; new box III corresponds to part of old box III and adjacent bp; and box IV encompasses previous boxes IV and V.

OmpS1 can be present at major levels in the outer membrane

To test whether the removal of a portion of the *ompS1* 5' upstream region resulted in an increase in the synthesis of the OmpS1 porin and in its incorporation into the outer membrane as predicted by the *lacZ* fusion studies, the electrophoretic OMP profiles of *S. typhi* cells harbouring pFC63 and pRO269 were compared (Fig. 2, lanes b and

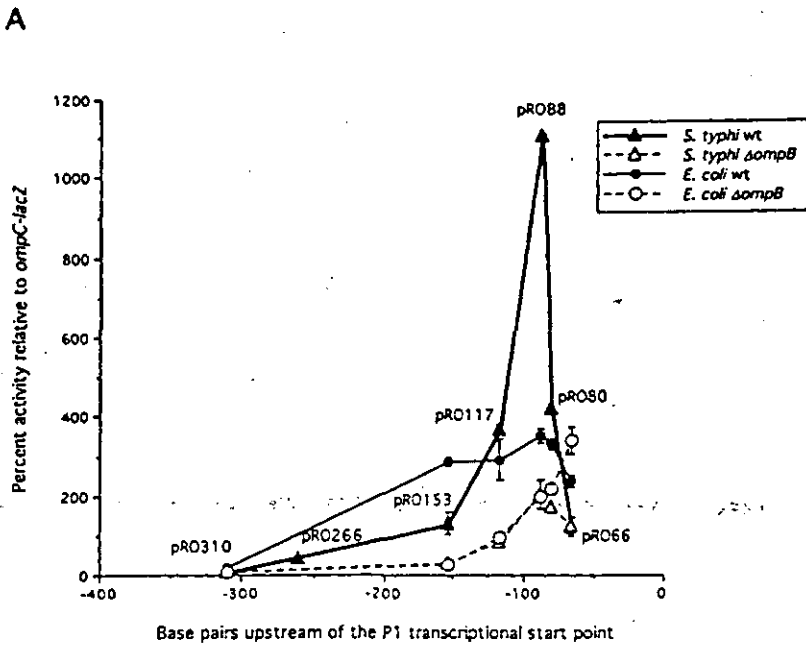
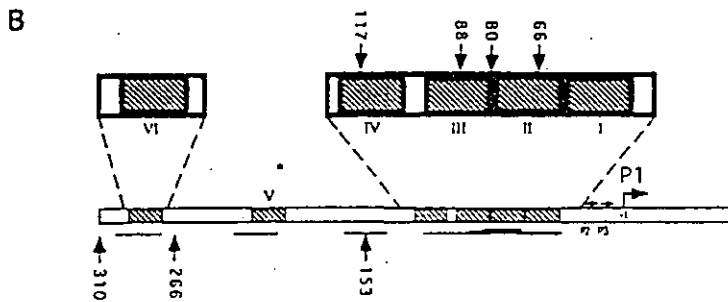


Fig. 1. Expression and 5' upstream regulatory features of *S. typhi* ompS1.
A. Beta-galactosidase specific activity (vertical axis), relative to an equivalent *S. typhi* ompC-lacZ fusion in *S. typhi*, of translational fusions containing varying lengths of the 5' regulatory region of ompS1 (horizontal axis). Determinations were carried out three times in duplicate from cells in the mid-logarithmic phase of growth.
B. Localization of promoters P1, P2 and P3 and of canonical 18 bp binding boxes (I-VI). Numbers signal the end-point of each translational fusion, and the horizontal lines below the bar show the QmpR-protected regions.



c). These plasmids contain 1.4 kb and 269 bp, respectively, upstream of the major transcriptional start-point, apart from the complete *ompS1* structural gene. As shown in Fig. 2, lane b, no OmpS1 was observed that was encoded by PFC63, in spite of the fact that it is a medium-copy plasmid derivative. In contrast, pRO269 encoded an OmpS1 protein that was expressed at a level commensurate with that of the major OmpC and OmpF porins. Interestingly, the presence of OmpS1 was decreased in a Δ ompB strain, although some expression remained (Fig. 2, lane h) in accordance with the *lacZ* fusion studies.

Promoter mapping

Studies by primer extension revealed the presence of three transcriptional start-points, corresponding to a major P1 promoter and to a weaker P2 promoter. A minor P3 constitutive promoter was also observed (Figs 3 and 4). The activity from P1 was OmpR dependent because it was abolished in *S. typhi* Δ ompB. P1 promoter strength increased

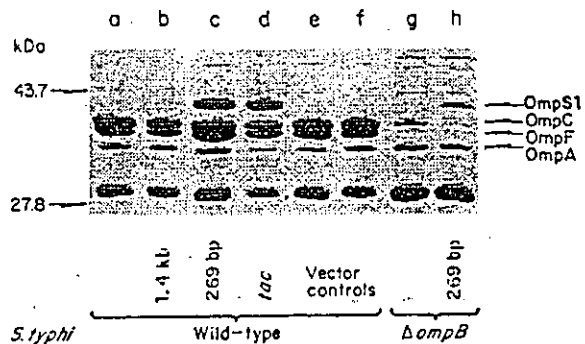


Fig. 2. Expression of the OmpS1 protein. Electrophoretic profile of OMP preparations from wild-type *S. typhi* IMSS-1 harbouring: no plasmid (a); PFC63 (the whole *ompS1* structural gene plus 1.4 kb of the *ompS1* 5' regulatory region in pBR325; Fernández-Mora *et al.*, 1995) (b); pRO269 (the whole *ompS1* structural gene containing 266 bp upstream of the P1 transcriptional start in pBR322) (c); pF2 (an expression construct carrying the *ompS1* structural gene in pBtac1; Fernández-Mora *et al.*, 1995) (d); pBR322 (e) or pBtac1 (f) as vector controls; or from *S. typhi* Δ ompB carrying no plasmid (g) or pRO269 (h).

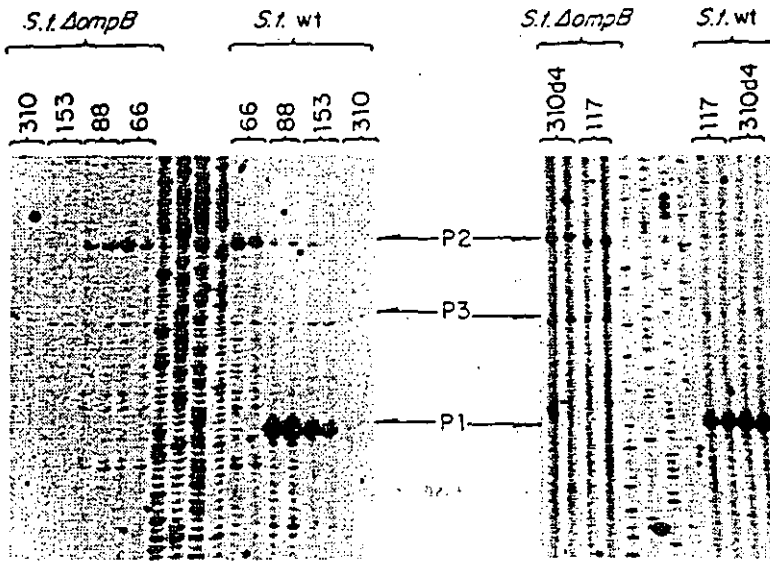


Fig. 3. Promoter mapping in *ompS1*. Primer extension analysis of RNA extracted from either *S. typhi* wild type or *S. typhi* $\Delta ompB$, transformed with a series of pRO *lacZ* fusion plasmids carrying different lengths of the *ompS1* 5' regulatory region (see Figs 1B and 4). Duplicate lanes correspond to cells collected at OD₆₀₀ 0.4 and 0.8, respectively, for each fusion plasmid construct.

in the wild type as the length of the 5' negative-acting regulatory subregion was shortened (pRO310 to pRO88) (Fig. 3), in accord with the *lacZ* fusion studies (Fig. 1). P1 activity was abolished, however, in pRO66 (Fig. 3), in which canonical OmpR-binding box III was deleted together with most of box II, 31 bp upstream of the P1 -35 region. This observation supports the role of boxes II and III in positive regulation. Interestingly, transcription from P2 was most evident when P1 was inactive, i.e. from pRO66 in the wild type and from pRO117, pRO88 and pRO66 in the *S. typhi* $\Delta ompB$ background (Fig. 3). In addition, promoter activity did not vary with the stage of growth.

These results revealed that *ompS1* transcription was regulated by negative and positive mechanisms, which act in a hierarchical way. Our observations are consistent with the notion that binding of an undefined element to sequences upstream from box III (between -310 and -88) hinders transcriptional activity from both P1 and P2. Alternatively, upon removal of this region, or in the absence of this putative negative regulatory element, the binding of OmpR to boxes II and III activates P1 expression and hinders transcriptional activity from P2.

Consensus OmpR-binding boxes and OmpR footprints

We have identified six (I-VI) putative OmpR-binding boxes in the *ompS1* 5' regulatory region (Figs 1 and 4). Thus, a plasmid expressing an OmpR fusion protein tagged with a six-His segment at the N-terminus was constructed (see *Experimental procedures*). This fusion complemented the expression of OmpC and OmpF in an *S. typhi* *ompR*-deficient mutant, indicating that the additional six residues



Fig. 4. Nucleotide sequence of the *ompS1* 5' upstream regulatory sequence. The first Met codon is shown at the bottom end of the sequence. Upstream are the putative ribosome-binding site (RBS), the start-points and putative -10 and -35 regions (Harley and Reynolds, 1987) for the P1, P3 and P2 σ -70 promoters, and the 18 bp OmpR-binding boxes (I-VI). The non-canonical region protected by OmpR is indicated by the non-continuous line above the sequence. The width symbolizes the binding strength (see Fig. 5A and data not shown). The arrows indicate the end-point for each pRO construct; the two d4 arrows show the boundaries of the deletion in pRO310d4.

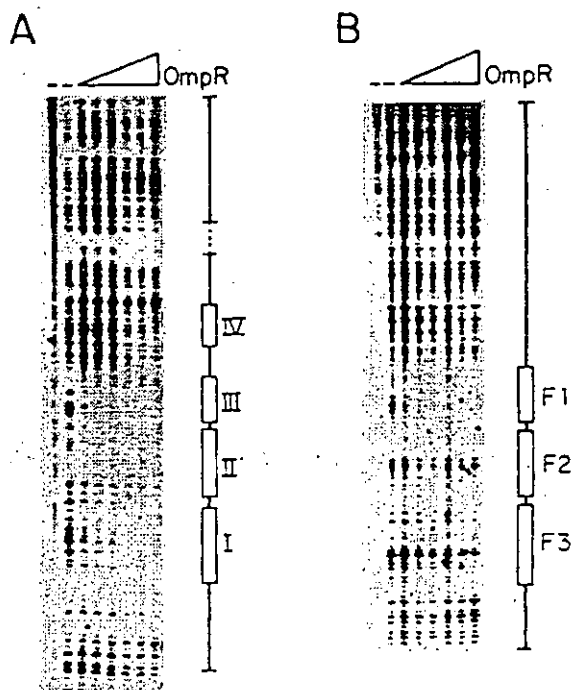


Fig. 5. OmpR footprints on the *S. typhi* *ompS1* 5' regulatory region of plasmid pRO310 (A) and on the *E. coli* *ompF* 5' regulatory region as control (B). The sample in the first lane had no DNase or OmpR added; the samples in the second to last lane contained DNase plus increasing amounts of non-phosphorylated OmpR (0, 0.3, 0.9, 1.8, 3.6, 6.2 and 9.1 μ M). The location of the canonical OmpR-binding boxes and of a non-canonical protected region are shown on the right as boxes and as a discontinuous line respectively.

did not affect OmpR activity (data not shown). In this manner, purified non-phosphorylated OmpR (0.3–8.1 μ M) protected box II by the highest affinity, and also protected part of box III, followed by box I and then by weaker interactions with additional sequences (Figs 4 and 5A). Using the same range of His–OmpR concentrations, protection of the F1, F2 and F3 boxes of *E. coli* *ompF* was obtained, similar to previous observations with non-phosphorylated OmpR (0.67–14.2 μ M) (Fig. 5B; Huang and Igo, 1996). These results further support the role of boxes II and III in the OmpR-dependent activation of P1.

The effect of removing OmpR canonical-binding box IV

To partially test the hypothesis that the –310 to –88 sub-region is involved in negative control, the activity of pRO310d4, a pRO310-derivative lacking 31 nucleotides from –105 to –135 including box IV, was measured and a 10-fold increase in activity was observed over that of plasmid pRO310 (Fig. 6). This activity was higher than that from pRO153 and similar to that of pRO117, but still

Negative and positive regulation in *S. typhi* *ompS1*

lower than the highly expressed pRO88. This behaviour was observed in both *S. typhi* wild type and in the Δ *ompB* derivative (Fig. 6). Nevertheless, as for the other constructs, the activity of pRO310d4 was sixfold lower in *S. typhi* Δ *ompB* in comparison with the wild-type strain. This effect was also seen in another independent construct (not shown).

In addition, as expected, activity in *S. typhi* wild type from promoter P1 in pRO310d4 was substantially higher than that in pRO310, and abolished in *S. typhi* Δ *ompB* (Fig. 3). In contrast, activity from P2 was substantially increased in the Δ *ompB* derivative (Fig. 3). These increases in expression appear to be related to the lack of 31 bp in the vicinity of box IV, upstream of box III, and fully support the notion that this region is involved in negative regulation

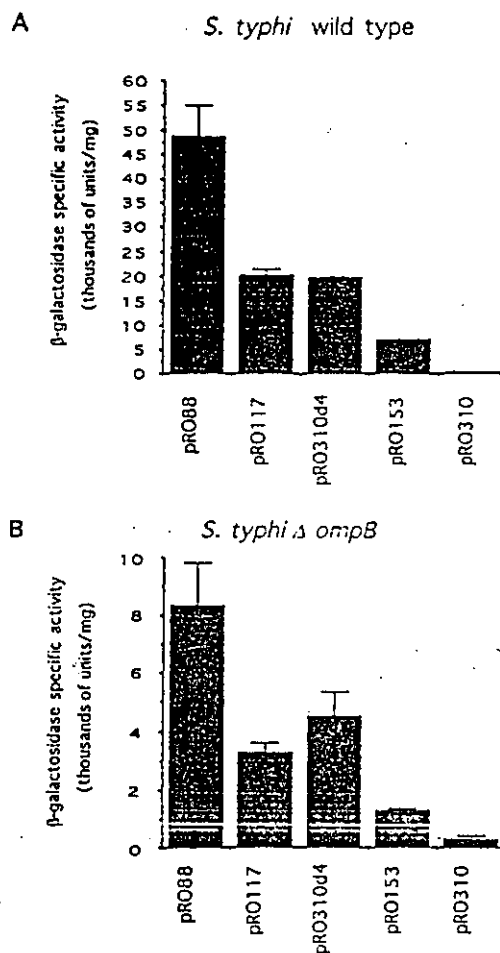


Fig. 6. Activity of the *ompS1* 5' regulatory region devoid of box IV. The β -galactosidase activity of various *ompS1*–*lacZ* translational fusions was determined at mid-logarithmic phase. The pRO plasmids are as described in Fig. 4, and contain the indicated number of bp upstream of the major transcriptional start. pRO310d4 is the pRO310 construct lacking 31 bp, including canonical OmpR-binding box IV. A. Activities in *S. typhi* wild type. B. Activities in *S. typhi* Δ *ompB*.

of *ompS1*, not only in the presence but also in the absence of OmpR. Interestingly, all this occurs without an alteration in P3 promoter activity.

ompS1 expression was not influenced by a set of stress conditions

To explore whether a particular condition could cause induction of the *ompS1-lacZ* fusion in pRO310 (the longest regulatory region resulting in minimal expression) or could modulate the highly expressed *ompS1-lacZ* fusion in pR088, β -galactosidase levels were monitored in wild-type *S. typhi* grown under some conditions that cause stress in bacteria (Abshire and Neidhardt, 1993). In this manner, no effect on the expression of either plasmid was observed at high osmolarity (up to 0.4 M NaCl), under heat (42°C) or cold (25°C) shock, in the presence of hydrogen peroxide (125 or 300 μ M), at a variety pH values (5–8), under acid shock (down to pH 3.3, including an acid tolerance response), in anaerobiosis, or in the presence of polymyxin B (0.625–5 μ g ml⁻¹) (data not shown). It is interesting to note that despite the fact that OmpR was involved in the activation of the major P1 promoter, osmolarity did not affect *ompS1* expression.

Integration host factor did not participate in negative control in *E. coli*

Because integration host factor (IHF) has been implicated in the negative control of the *E. coli ompF* porin gene (Tsui *et al.*, 1988; Huang *et al.*, 1994; Pratt *et al.*, 1996) and a region for the putative binding of IHF has been identified previously in the *ompS1* 5' regulatory sequence upstream of the canonical OmpR-binding box III (Fernández-Mora *et al.*, 1995), now within box III according to the new denominations (Fig. 4), the effect of a known mutation in *E. coli* IHF was tested. Accordingly, fusion plasmids pCL1.4 and pCL310, containing 1.4 kb and 310 bp of the 5' upstream region respectively, were tested in the *E. coli* wild-type strain N99 and in its isogenic derivative K5185 (N99 Δ himA82) (Tsui *et al.*, 1988). The pCL plasmids were derived from the pRO series; they were constructed in pBR325 in order to have a different convenient antibiotic resistance marker (chloramphenicol). No effect was observed from the IHF mutation on the β -galactosidase levels produced by each plasmid (data not shown), consistent with the notion that IHF has no role in the negative control of *ompS1* in *E. coli*.

Presence of *ompS1* in *E. coli*

A 1192 bp sequence with a 74% identity with the *S. typhi ompS1* coding sequence was found in the *E. coli* K-12 genome (substrain MG1655), between bases 2032 073 and

2033 265 (centisome 43; accession no. AE000288) of the sequence obtained in the Blattner laboratory (Blattner *et al.*, 1997). This sequence, however, does not constitute a complete open reading frame: it has a UAG termination codon at a position equivalent to L162 of the 394-amino-acid *S. typhi* OmpS1 protein, and a frameshift at the equivalent Y221. Thus, the identity was obtained with a best fit alignment, using an edited sequence. If *E. coli* coded for an OmpS1 protein, it would have a 78% identity and an 81% similarity to *S. typhi* OmpS1. In the annotated features of the genome sequence, portions of this region were originally reported as having identity with the *S. typhi* or *E. coli ompC* coding sequences.

Moreover, the potential 5' upstream regulatory region in *E. coli* has a 62% identity with its *S. typhi* counterpart, up to box VI. Interestingly, the -10 region, the first transcribed G residue of the P1 promoter and the ribosome-binding site are conserved.

These features are shared with the genome sequence of the *E. coli* K-12 substrain W3110, which is being sequenced in Japan (Itoh *et al.*, 1996). Likewise, our own *E. coli* K-12 HB101 laboratory strain contains the same sequence as MG1655. Interestingly, enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) strain 84-289 does not contain the UAG termination codon, instead it has the UUC codon for Gln (data not shown). Moreover, it contains two frameshifts at the equivalent positions for codons 186 and 202 in the *S. typhi* coding sequence. On the contrary, the matching region in *S. typhi-murium* LT2 does not contain a termination codon nor a frameshift, consistent with the notion that it has a functional gene. Both *Salmonella* genes share an 82% identity in this portion, and most differences map in a segment that codes for a putatively exposed loop, between transmembrane domains 7 and 8, in agreement with previous observations for *S. typhi* porins (data not shown; Fernández-Mora *et al.*, 1995; Puente *et al.*, 1995). This is in accordance with our original observation, by DNA hybridization, that the *ompS1* gene is present in several salmonella serotypes (Fernández-Mora *et al.*, 1995).

Discussion

The *S. typhi ompS1* gene codes for an outer membrane protein that has the molecular features of the porin superfamily (Fernández-Mora *et al.*, 1995). The study presented herein focuses on the genetic expression of *ompS1*, illustrating in more detail the fact that it is expressed at much lower levels than the major *S. typhi* OmpC porin as originally observed (Fernández-Mora *et al.*, 1995; Fig. 1).

Our deletion analysis of the 5' upstream regulatory region illustrated that plasmid pRO310, which contains 310 bp upstream of the major P1 transcriptional start point, contains all the regulatory elements to maintain a low level of expression (Fig. 1). Removal of 44 bp from

the regulatory region, to render pRO266, allowed sufficient production of the OmpS1 protein to be detected in an outer membrane protein electrophoretic profile, as shown for pRO269 (Fig. 2). Likewise, a region for positive control was located between -88 and -66, encompassing OmpR-binding boxes II and III (Figs 1, 3 and 4).

Expression occurred from the major P1 OmpR-dependent promoter; nevertheless, expression did occur in the absence of OmpR from a weaker P2 promoter (Figs 1 and 3). In particular, deletion of sequences encompassing box IV and neighbouring residues, from the 310 bp regulatory region, enhanced expression from P1 and P2, although the latter only in the absence of OmpR (Fig. 3). pRO153 still contained elements for negative-regulation of P2 because its expression was increased upon removal of 36 bp to yield pRO117 (Figs 1 and 3). These features were obscured in the wild-type background as P2 activity was hindered by the binding of OmpR (Fig. 3).

Taken together, it seems that there is at least one additional unknown factor involved in negative regulation that acts upon the -88 to -310 region. Thus, the 10-fold increase in expression in pRO310d4, from which box IV was removed, could be due to the deletion of some negative *cis*-acting elements. In addition, this effect might also happen because of a change in distance between boxes V and VI and the transcriptional start-point (Figs 3, 4 and 6). The latter possibility, however, seems harder to envision in a Δ ompB strain. Current research in our laboratory is focusing on defining such a factor. In addition, an *E. coli* Δ himA mutant did not cause an induction in expression, indicating that IHF does not participate in negative regulation as in *E. coli* ompF (Tsui *et al.*, 1988).

It is of interest to note that non-phosphorylated OmpR binds with the highest affinity to box II (Figs 4 and 5), which shares the first two AC residues with the F1/C1 consensus 18 bp OmpR-binding region. Notably, these residues have been implicated in the high affinity of the F1 and C1 regions to both non-phosphorylated OmpR and OmpR-P, compared with the F2, F3, C2 and C3 regions (Huang and Igo, 1996; Head *et al.*, 1998). Although phosphorylation of OmpR essentially increases its affinity for the F1 and C1 boxes (Head *et al.*, 1998) and osmolarity plays a central role in modulating such levels of phosphorylation (Mizuno and Mizushima, 1990; Rampersaud *et al.*, 1994; Pratt *et al.*, 1996), we have observed that either low or high osmolarity had no effect on ompS1 expression, which could be a consequence of the particular characteristics and composition of the OmpR-binding boxes. Clearly, new elements in the OmpR mode of regulation are present for ompS1.

It is an open question whether the low level of expression of OmpS1 is in accord with its unknown physiological role in the cell. In this respect, no effect on expression was observed for a panel of stress conditions, previously tested in *Salmonella* (Abshire and Neidhardt, 1993). This

panel cannot be considered, by any means, to include all types of stress encountered by bacteria inside the host or in the environment, but was rather meant as an initial study.

The presence of a truncated copy of ompS1 in the *E. coli* genome, and the observation that ompS1 is apparently functional in *S. typhimurium*, in addition to the original observation of the presence of ompS1 in 10 different *S. typhi* isolates and in seven other *Salmonella* serotypes (Fernández-Mora *et al.*, 1995) suggests a particular role of OmpS1 in *Salmonella*, and gives rise to speculation on the evolutionary circumstances that caused its loss of function in *E. coli*. The fact that truncation is different in *E. coli* K-12 from that in enterohaemorrhagic *E. coli* is indicative of different evolutionary pathways. In this respect, it has been observed that *Neisseria gonorrhoeae* has a porA porin pseudogene, whereas *Neisseria meningitidis* has a functional allele that might confer a selective advantage (Feavers and Maiden, 1998).

It is fascinating to dwell upon the question of how *S. typhi* evolved a complex regulatory mechanism in order to keep a tight negative control on ompS1 expression that would allow, under derepression, very high levels of activity and a rapid response capacity. In addition, functional studies on the OmpS1 protein should reveal an insight into the biological role of porin paralogues in *Salmonella*.

Experimental procedures

Recombinant DNA techniques

DNA manipulations were performed according to standard protocols (Sambrook *et al.*, 1989). Oligonucleotides used for amplification by polymerase chain reaction (PCR) were purchased from BioSynthesis or provided by the Oligonucleotide Synthesis Facility at our Institute. PCR reactions were performed using AmpliTaq (Perkin Elmer), according to the manufacturer's instructions. Restriction and modification enzymes were used according to the manufacturer's instructions (Boehringer Mannheim, New England Biolabs or Gibco BRL).

Bacterial culture and suspension

Bacteria were grown in medium A (containing per litre: 7 g of nutrient broth, 1 g of yeast extract, 2 g of glycerol, 3.7 g of K_2HPO_4 , and 1.3 g of KH_2PO_4) (Kawaji *et al.*, 1979). Cells were collected for protein and β -galactosidase determinations at the mid-logarithmic phase of growth at 37°C. When needed, 12 μ g ml⁻¹ tetracycline or 30 μ g ml⁻¹ of kanamycin were used. Cells were collected by centrifugation and were washed twice with 1x Z buffer (0.06 M Na_2HPO_4 , 0.04 M NaH_2PO_4 , 0.01 M KCl, 0.001 M $MgSO_4$, pH 7). After centrifugation, the bacterial pellet was resuspended in 1 ml of Z buffer. When appropriate, stress conditions during growth were generated as described previously (Abshire and Neidhardt, 1993). The same procedures were used for the growth and handling of *E. coli* wild-type strain N99 and in its isogenic derivative K5185- Δ himA82.

Construction of translational ompS1-lacZ reporter fusions

The polymerase chain reaction (PCR) was used for amplifying 1.4 kb of the 5' upstream regulatory region of *ompS1* from the original pFC63 plasmid (Fernández-Mora *et al.*, 1995), which contains the structural *ompS1* gene and adjacent regions in a 5.6 kb *Sal*I fragment. The following oligonucleotides were used: one encompassing codons 2–12, which also generates an *Eco*RV site, as described previously (Fernández-Mora *et al.*, 1995), for generating *ompS1-lacZ* fusions; and another (5'-CCTACTCCCGGGCTGCTTCTAATGT-3') that corresponds to the pBR325 vector sequences and generates a *Sma*I site. The amplified region was cloned into the *Sma*I sites of medium-copy number plasmid pMC1871 (Shapira *et al.*, 1983) to give pRO1.4. Alternatively, the 1.4 kb fragment was digested with either *Rsa*I or *Nco*I (the latter was filled in with Klenow polymerase) to clone into the *Sma*I site of pMC1871 and generate pRO600 and pRO521 respectively, which contain 600 and 521 bp upstream of the P1 major transcriptional start-point. Hence, the numerals in the pRO series denote the number of bp contained upstream of the major transcript. pRO521 was used to generate pRO310, pRO266, pRO153, pRO117, pRO88, pRO80 and pRO66, among others, by digesting it with *Eco*RI, carrying out a time-course digestion with *Ba*31, blunt-ending with Klenow polymerase, digesting with *Sac*I and ligating into pMC1871 cut with *Sac*I and *Sma*I. Blue colonies were selected on Xgal in LB plates. Plasmid pRO266 (Fig. 1) corresponds to plasmid pRO326, mentioned in the first publication (Fernández-Mora *et al.*, 1995), because the original nomenclature was based on the position of the first codon and now it relates to the site of the first transcribed nucleotide. In addition, relative to pRO326, pRO266 is missing three nucleotides that were conserved in pRO326 upon regeneration of a *Sma*I restriction site with an oligonucleotide.

Microplate protein determinations

Protein concentrations were determined by the method of Lowry, adapted as a microtitre plate assay as follows. Twenty microlitres of bacterial suspension was treated with 100 µl of reaction mixture, containing 98 µl of a carbonate hydroxide solution (3.4% Na₂CO₃ and 0.17 N NaOH) and 2 µl of a copper tartrate solution (0.85% CuSO₄·5H₂O, 1.7% sodium and potassium tartrate), for 10 min at room temperature, with the subsequent addition of 100 µl of 16.9% (v/v) Folin-Ciocalteu solution for 15 min at room temperature. Absorbance at 620 nm was obtained with a Scanning Autoreader and Microplate Workstation, Ceres 900 C and the KC Jr software set in the end-point mode.

These values were used to adjust the bacterial suspension samples to 0.15–0.30 mg ml⁻¹ for the β-galactosidase assays, and for calculating the specific activity. Each value given represents the average activity, obtained from at least two independent experiments carried out in duplicate.

Microplate β-galactosidase assays

β-galactosidase activity was measured by the method described by Miller (1972), adapted as a microtitre plate assay.

Twenty microlitres of bacterial suspension was treated with 100 µl of lysis mixture [0.22 mg ml⁻¹ lysozyme (Sigma), 0.22% Triton X-100 (Bio-Rad), 1.6x Z buffer and 0.016 M β-mercaptoethanol (Sigma)] for 10 min with shaking at 37°C, followed by addition of 100 µl of substrate solution (1 mg ml⁻¹ *o*-nitrophenyl-β-D-galactoside, ONPG). The rate of each reaction was obtained by recording the change in absorbance at 415 nm, every 5 s, during 3 min with a Scanning Autoreader and Microplate Workstation, Ceres 900 C and the KC Jr software (Bio-Tek Instruments) set in the kinetics mode.

Construction of pRO269

The whole *ompS1* structural gene together with the 5' regulatory sequence; up to 266 bp upstream of the major P1 promoter transcriptional site, were amplified from pFC63 by using previously described oligonucleotides: one that encompasses bp -278 to -253, which generates a *Sma*I site at -269; and another that encompasses nucleotides 1903–1929 of the reported *ompS1* sequence at the 3' terminus (Fernández-Mora *et al.*, 1995; EMBL accession no. X73237). The amplified product was digested with *Sma*I and *Bam*HI and cloned into the *Eco*RV and *Bam*HI sites of pBR322.

OMP purification and electrophoresis

OMPs were prepared as a Triton X-100 insoluble fraction, scaled down to a miniprep level as described previously (Puente *et al.*, 1995). They were separated by polyacrylamide 12% gel electrophoresis and visualized by staining with Coomassie brilliant blue.

Primer extension analysis

Five micrograms of total RNA, isolated using a commercial kit (RNeasy; Qiagen), was linearized at 93°C for 3 min and then slowly cooled down to 42°C to anneal with a ³²P-labelled oligonucleotide complementary to the 5' terminus of the *lacZ* gene (5'-GCCAGGGTTTCCAGTCACGACG-3'). The oligonucleotide primer was extended with reverse transcriptase, and the extended product was collected with a Microcon-10 microconcentrator (Amicon) and analysed by electrophoresis in 8% polyacrylamide/urea gels following established procedures (Barrios *et al.*, 1995).

OmpR purification

The following oligonucleotides were designed for PCR amplification of the *S. typhi ompR* structural gene from pIM25, which carries the *S. typhi ompB* operon (Martínez-Flores *et al.*, 1995; (Martínez-Flores *et al.*) submitted): 5'-CCTTTGGGAGTACAGAGGATCCAAGAGAATTATAAGATC-3' (complementary to the 5' terminus of *ompR*) and 5'-CGCGGCGAGAAGCTTATTCGCCTCATGC-3' (complementary to the 3' terminus). The first introduces a *Bam*HI site such that the initiation codon changes from ATG to ATC and the second introduces a *Hind*III site. After digestion, the PCR product was cloned into expression vector pQE32 (Qiagen), thus allowing the fusion of a six-histidine coding sequence at the 5' terminus.

of *ompR*. The fused protein was produced and purified using a QIAexpressionist commercial kit (Qiagen), under 8 M urea denaturing conditions. The His-OmpR product was extensively dialysed against OmpR storage buffer (Huang *et al.*, 1994), and quantified by the method of Lowry as described before.

DNA footprinting with OmpR

Plasmid pRO310 was used as a template for the PCR amplification of the *ompS1* 5' regulatory region; the ³²P-labelled oligonucleotide complementary to the 5' terminus of the *lacZ* gene, used for primer extension, and an oligonucleotide complementary to pMC1871 were used as primers. Similarly, plasmid pLF11 (Inokuchi *et al.*, 1982) was used for amplification of the *E. coli* *ompF* 5' regulatory 600 bp fragment. Each assay contained 2 × 10⁵ c.p.m. of labelled template, and was performed at room temperature in 40 mM KCl as described previously (Huang *et al.*, 1994). The DNA segments were separated by electrophoresis on an 8% polyacrylamide gel.

Deletion of box IV

Plasmid pRO310 was used as a template for amplification by PCR of a leftward and rightward portion of the *ompS1* 5' upstream regulatory region, upstream and downstream, respectively, of box IV (See Fig. 4). The leftward portion was obtained with an oligonucleotide complementary to the pMC1871 vector sequence, and with an oligonucleotide complementary to the upstream sequence of the deleted fragment (Fig. 4), that introduced an *Xba*I site, which was 5'-GAAT-ATATAGACTACAATTATCATT TTTTATC-3'. The rightward portion was amplified using the oligonucleotide complementary to the 5' terminus of the *lacZ* gene, used for primer extension, plus oligonucleotide 5'-CTTATATATCTAGAAT-TATAAAAACCAAATAG-3', which was complementary to the downstream sequence of the deleted boxes and also introduced an *Xba*I site (Fig. 4). The leftward fragment was digested with *Eco*RI and *Xba*I and the rightward fragment with *Bam*HI and *Xba*I, and they were simultaneously cloned in the pRS414 *lacZ* fusion vector (Simons *et al.*, 1987). From selected blue colonies, a *Sma*I-*Sac*I fragment was cloned into pMC1871. The nucleotide sequence of these, and all constructs used, was verified.

Sequence analysis

The computer-assisted analysis of nucleotide and amino-acid sequences was performed using the GENE WORKS software (IntelliGenetics), and the GAP and FASTA programs (Genetics Computer Group).

DNA sequencing of *ompS1* homologous regions in different bacteria

The DNA segment equivalent to the vicinity of codons L162 and Y221 of the *S. typhi* *ompS1* structural gene were amplified by PCR from different bacteria and sequenced by standard procedures. The 23-mer oligonucleotide used, which was to

the left, was complementary to nucleotides 1030-1053 of the reported sequence (EMBL accession no. X73237), and that to the right was 24-mer complementary to 1404-1428.

Acknowledgements

We acknowledge the undergraduate summer research programme ('Verano de la Investigación Científica') of the Academia Mexicana de Ciencias, especially its director, Dr Saúl Villa-Treviño, for providing R.O. and C.L.S. with the opportunity to initiate a career in science. This research was supported by grants from the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA IN206594 to E.C. and J.L.P.; and PADEP 030324 and 030542 to R.O.); 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, USA. R.O. and C.L.S. were supported by PhD (85798) and MSc (96122) degree fellowships, respectively, from the CONACyT.

References

- Abshire, K.Z., and Neidhardt, F.C. (1993) Analysis of proteins synthesized by *Salmonella typhimurium* during growth within a host macrophage. *J Bacteriol* 175: 3734-3743.
- Aron, L., Faundez, G., González, C., Roessler, E., and Cabello, C. (1993) Lipopolysaccharide-independent radio-immunoprecipitation and identification of structural and *in vivo* induced immunogenic surface proteins of *Salmonella typhi* in typhoid fever. *Vaccine* 11: 10-17.
- Barríos, H., Fischer, H.M., Hennecke, H., and Morett, E. (1995) Overlapping promoters for two different RNA polymerase holoenzymes control *Bradyrhizobium japonicum* *nifA* expression. *J Bacteriol* 177: 1760-1765.
- Benz, R., Schmid, A., and Hancock, R.E.W. (1985) Ion selectivity of gram-negative bacterial porins. *J Bacteriol* 162: 722-727.
- Blattner, F.R., Plunkett, III, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., *et al.* (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453-1461.
- Calderón, I., Lobos, S.R., Rojas, H.A., Palomino, C., Rodríguez, L.H., and Mora, G.C. (1986) Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid infection in humans. *Infect Immun* 57: 2136-2140.
- Chatfield, S.N., Dorman, C.J., Hayward, C., and Dougan, G. (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.
- Dorman, C.J., Chatfield, S., Higgins, C.F., Hayward, C., and Dougan, G. (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.
- Feavers, I.M., and Maiden, M.C.J. (1998) A gonococcal *porA* pseudogene: implications for understanding the evolution and pathogenicity of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* 30: 647-656.
- Fernández-Mora, M., Oropeza, R., Puente, J.L., and Calva,

- E. (1995) Isolation and characterization of *ompS1*, a novel *Salmonella typhi* outer membrane protein-encoding gene. *Gene* 158: 67–72.
- Forst, S., and Inouye, M. (1988) Environmentally regulated gene expression for membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Cell Biol* 4: 21–42.
- Galdiero, F., Tufano, M.A., Sommese, L., Folgore, A., and Tedesco, F. (1984) Activation of complement system by porins extracted from *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 46: 559–563.
- Galdiero, F., L'Ero, G.C., Benedetto, N., Galdiero, M., and Tufano, M.A. (1993) Release of cytokines induced by *Salmonella typhimurium* porins. *Infect Immun* 61: 155–161.
- Hancock, R.E.W. (1987) Role of porins in outer membrane permeability. *J Bacteriol* 169: 929–933.
- Harley, C.B., and Reynolds, R.P. (1987) Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 15: 2343–2361.
- Head, C.G., Tardy, A., and Kenney, L.J. (1998) Relative binding affinities of OmpR and OmpR-phosphate at the *ompF* and *ompC* regulatory sites. *J Mol Biol* 281: 857–870.
- Huang, K.J., and Igo, M.M. (1996) Identification of the bases in the *ompF* regulatory region, which interact with the transcription factor OmpR. *J Mol Biol* 262: 615–628.
- Huang, K.J., Schieberl, J.L., and Igo, M.M. (1994) A distant upstream site involved in the negative regulation of the *Escherichia coli ompF* gene. *J Bacteriol* 176: 1309–1315.
- Inokuchi, K., Mutoh, N., Matsuyama, S.-I., and Mizushima, S. (1982) Primary structure of the *ompF* gene that codes for a major outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* 10: 6957–6967.
- Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., González, C., Moreno, J., et al. (1988) Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12, d, Vi. *Infect Immun* 56: 2953–2959.
- Itoh, T., Aiba, H., Baba, T., Hayashi, K., Inada, T., Isono, K., et al. (1996) A 460 kb DNA sequence of the *Escherichia coli* K-12 genome corresponding to the 40.1–50.0 min region on the linkage map. *DNA Res* 3: 379–392.
- Kawaji, H., Mizuno, T., and Mizushima, S. (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.
- Kuusi, N., Nurminen, M., Saxen, H., and Mäkela, P.H. (1981) Immunization with major outer membrane protein (porin) preparation in experimental murine salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. *Infect Immun* 34: 328–332.
- Lindgren, S.W., Stojiljkovic, I., and Heffron, F. (1996) Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4197–4201.
- Martinez-Flores, I., Bustamante, V.H., Puente, J.L., and Calva, E. (1995) Cloning and characterization of the *Salmonella typhi ompR* and *envZ* genes. *Aspac J Mol Biol Biotechnol* 3: 135–144.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 352–355 and 403–404.
- Mizuno, T., and Mizushima, S. (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.
- Muthukummar, S., and Muthukkaruppan, V.R. (1993) Mechanism of protective immunity induced by porin-lipopolysaccharide against murine salmonellosis. *Infect Immun* 61: 3017–3025.
- Pang, T., Bhutta, Z.A., Finlay, B.B., and Altwegg, M. (1995) Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends Microbiol* 3: 253–255.
- Pickard, D., Jingli, L., Roberts, M., Maskell, D., Hone, D., Levine, M., et al. (1994) Characterization of defined *ompR* mutants of *Salmonella typhi*: *ompR* is involved in the regulation of Vi polysaccharide expression. *Infect Immun* 62: 3984–3993.
- Prait, L.A., Hsing, W., Gibson, K.E., and Silhavy, T.J. (1996) From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 20: 911–917.
- Puente, J.L., Flores, V., Fernández, M., Fuchs, Y., and Calva, E. (1987) Isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. *Gene* 61: 75–83.
- Puente, J.L., Verdugo-Rodríguez, A., and Calva, E. (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.
- Puente, J.L., Juárez, D., Bobadilla, M., Arias, C.F., and Calva, E. (1995) The *Salmonella ompC* gene: structure and use as a carrier for heterologous sequences. *Gene* 156: 1–9.
- Rampersaud, A., Harlocker, S.L., and Inouye, M. (1994) The OmpR protein of *Escherichia coli* binds to sites in the *ompF* promoter region in a hierarchical manner determined by its degree of phosphorylation. *J Biol Chem* 269: 12559–12566.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shapira, S.T., Chou, J., Richaud, F.V., and Casadaban, M.J. (1983) New versatile plasmid vectors for expression of hybrid proteins coded by a cloned gene fused to *lacZ* gene sequences encoding an enzymatically active carboxy-terminal portion of β -galactosidase. *Gene* 25: 71–82.
- Simons, R.W., Housman, F., and Kleckner, N. (1987) Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* 53: 85–96.
- Tsui, P., Helu, V., and Freundlich, M. (1988) Altered osmotic regulation of *ompF* in integration host factor mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170: 4950–4953.
- Tufano, M.A., Berlingieri, M.T., Sommese, L., and Galdiero, F. (1984) Immune response in mice and effects on cells by outer membrane porins from *Salmonella typhimurium*. *Microbiológica* 7: 353–366.
- Verdugo-Rodríguez, A., López-Vidal, Y., Puente, J.L., Ruiz-Palacios, G.M., and Calva, E. (1993) Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12: 248–254.

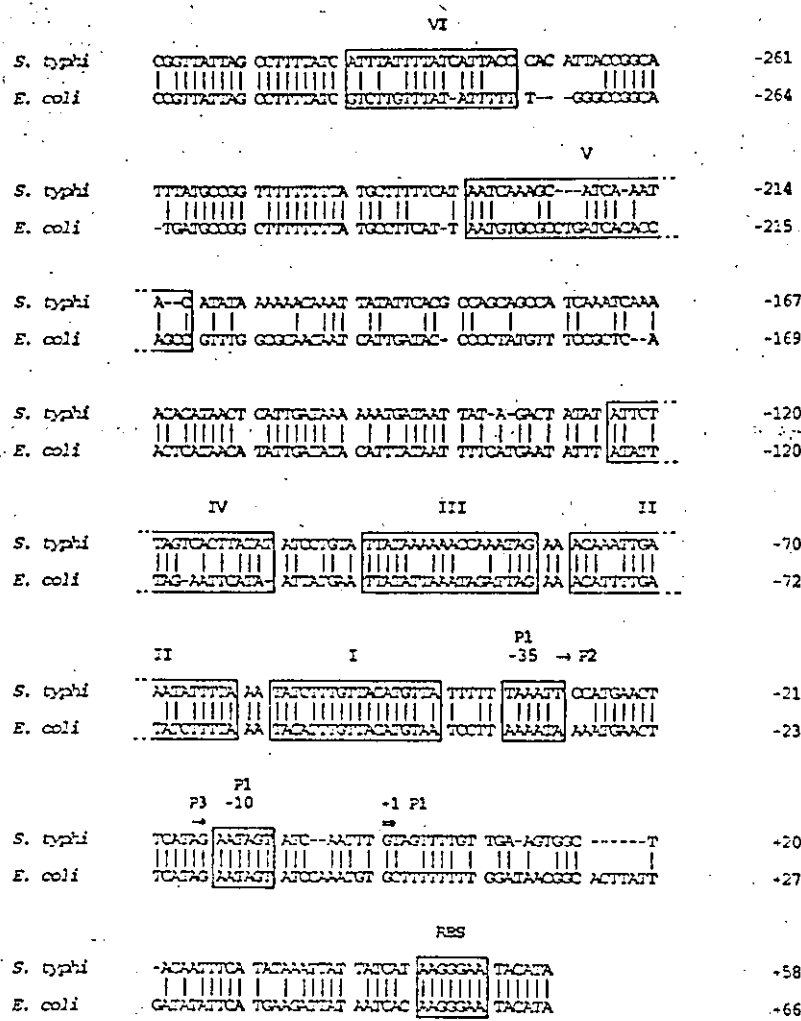


Fig. 3. Alineamiento de la región reguladora de *ompS1* de *S. t.* y su equivalente en *E. c.*, corriente arriba al pseudogen *ompS1*. Las identidades se indican con una línea vertical. Las regiones caracterizadas como importantes para la regulación también están señaladas: seis rectángulos numerados con romanos delimitan las cajas de unión a OmpR, también en rectángulos están las regiones -10 y -35 del promotor P1 y la secuencia de reconocimiento del ribosoma. Las tres flechas indican los sitios de inicio de la transcripción (P1, P2 y P3)

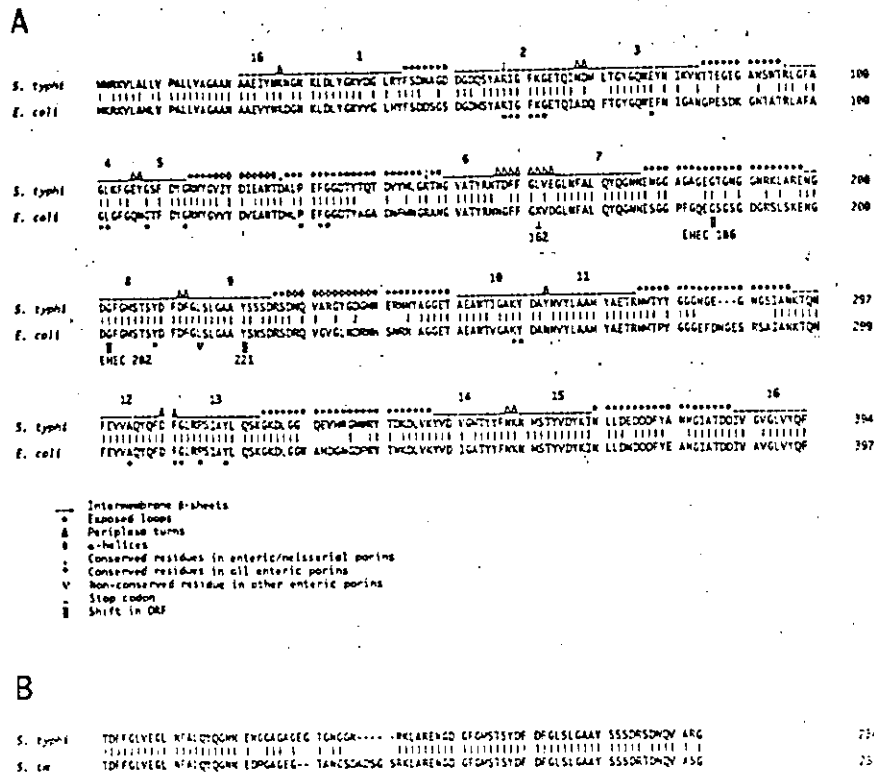


Fig. 4. Alineamiento de la secuencia de aas de OmpS1 con: A) la proteína hipotética deducida a partir del pseudogen *ompS1* de *E. c.* (editada); se ubica también la posición de los cambios en la fase de lectura encontrados en un fragmento de DNA amplificado de EHEC; así como los rasgos conservados en esta familia de proteínas (16 segmentos transmembranales, ocho asas o vueltas largas extracelulares, y ocho giros o vueltas cortas periplásmicas) y otros aas conservados (ver simbología al pie del panel); B) un fragmento de la proteína OmpS1 de *S. tm.* correspondiente a la región donde existen los cambios en los genes de las cepas de *E. c.* estudiadas.

GENE 08889

Isolation and characterization of *ompS1*, a novel *Salmonella typhi* outer membrane protein-encoding gene

(Porin; typhoid fever; restriction-fragment length polymorphism; DNA hybridization)

Marcos Fernández-Mora, Ricardo Oropeza, José Luis Puente and Edmundo Calva

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

Received by F. Bolívar: 14 October 1994; Revised/Accepted: 15 January/18 January 1995; Received at publishers: 28 February 1995

SUMMARY

We have isolated a novel outer membrane protein (OMP)-encoding gene from *Salmonella typhi* (*St*), termed *ompS1*, using the *ompF* gene of *Escherichia coli* (*Ec*) as a heterologous probe. The structural *ompS1* gene codes for an OmpS1 polypeptide that consists of 373 amino acids (aa) in the mature product, with a putative 21-aa leader sequence, containing highly conserved aa residues that have been implicated in pore formation. Mature OmpS1 (41 kDa) is larger than the OmpC, OmpF and PhoE *St* and *Ec* porins. In contrast to the major porins, it is undetectable in Coomassie-stained OMP preparations; although, when *ompS1* was cloned into a high-copy-number plasmid under the control of the inducible *tac* promoter, it was detectable along with major OMPs. The 5' regulatory region of *ompS1* has five putative binding sites for OmpR, a positive transcriptional regulator. The *ompS1* gene shows restriction-fragment length polymorphism (RFLP) among *Salmonellae*.

INTRODUCTION

Salmonella typhi (*St*), the causative agent of typhoid fever (TF), is a major pathogen of man. The study of different aspects of TF, ranging from molecular biology to epidemiology, offers not only the opportunity of making an impact on health biotechnology through the development of new vaccines and diagnostic methods, but also of acquiring an insight into basic biological pro-

cesses involved in the host-bacterium interaction (Calva et al., 1988).

OMP preparations from *St* have elicited active immunity against *S. typhimurium* and *St* (Isibasi et al., 1988). The presence of specific anti-OMP antibodies in the sera of TF patients are of diagnostic value (Verdugo-Rodríguez et al., 1993); and vaccinees with an attenuated live strain, as well as patients with TF, render a cellular immune response to OMPs (Blanco et al., 1993). These observations have led us to study the molecular structure and function of *St* OMPs and their respective genes (Puente et al., 1987; 1989; 1991). In *Escherichia coli* (*Ec*), the *ompC*, *ompF* and *ompA* genes code for major porins OmpC and OmpF, and for the structural major protein OmpA, respectively; there are about 10⁵ porin molecules per cell, forming non-selective pores through which small hydrophilic molecules traverse the outer membrane (Nikaido and Vaara, 1985). The synthesis of these porins is regulated by the products of the *envZ* and *ompR* genes, which comprise the *ompB* operon. Protein EnvZ is a histidine protein kinase that acts as an osmosensor phosphorylating the OmpR protein which, in turn, regulates the transcription of *ompC* or *ompF*. Expression of *Ec ompF* and *ompC* have been extensively studied. *ompF* is

Correspondence to: Dr. E. Calva, Instituto de Biotecnología/UNAM, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62271, Mexico. Tel. (52-73) 11-4900; Fax (52-73) 17-2388; e-mail: ecalva@pbr322.ceingebi.unam.mx

Abbreviations: aa, amino acid(s); BSA, bovine serum albumin; bp, base pair(s); *Ec*, *Escherichia coli*; GCG, Genetics Computer Group (Madison, WI, USA); IHF, integration host factor; IPTG, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; kb, kilobase(s) or 1000 bp; nt, nucleotide(s); oligo, oligodeoxyribonucleotide; OMP, outer membrane protein; *omp*, gene encoding an OMP or an OMP regulator; ORF, open reading frame; PAGE, polyacrylamide-gel electrophoresis; PCR, polymerase chain reaction; PhoE, outer membrane protein E (porin); *phoE*, gene encoding PhoE; RFLP, restriction-fragment length polymorphism; *S.*, *Salmonella*; SD, Shine-Dalgarno (sequence); SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, 0.15 M NaCl/0.015 M Na₃ citrate pH 7.6; *St*, *S. typhi*; TF, typhoid fever; X, any aa; XGal, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside.

expressed preferentially in media of low osmolarity and repressed in high osmolarity; in contrast, *Ec ompC* is highly expressed at high osmolarity and is repressed in low osmolarity (Stock et al., 1989).

In *St*, three major OMPs, OmpC, OmpF and OmpA, are synthesized under standard laboratory conditions (Puentes et al., 1991). Synthesis of OmpF is repressed in high osmolarity, in accordance with what is observed in *Ec*; however, the synthesis of OmpC is not repressed at low osmolarity, in contrast to the regulation in *Ec* (Puentes et al., 1991). Therefore, in order to extend our studies on the structure-function relationship of *St* OMPs, we were interested in isolating the *St ompF* gene, using *Ec ompF* as a heterologous probe. As reported herein, instead of isolating the gene coding for OmpF, another gene was found, that we have termed *ompS1*. This gene codes for a non-major OMP, with a higher molecular mass than the major ones described for *St*. It also has a higher apparent molecular mass than *S. typhimurium* OmpD (Lee and Schnaitman, 1980).

EXPERIMENTAL AND DISCUSSION

(a) Isolation of the *S. typhi ompS1* gene

Hybridization of *St* genomic DNA, from the Mexican reference strain IMSS-1 (Puentes et al., 1987; Isibasi et al., 1988), cleaved with restriction endonuclease *Sall*, rendered a 5.6-kb band with either of the following ³²P-labeled DNA probes: a 934-bp *Pst*I-*Hinc*II fragment from plasmid pJP33 (Tomassen et al., 1982), comprising most of the *Ec ompF* structural gene; a 581-bp *Pst*I-*Pvu*II fragment from plasmid pLF11 (Inokuchi et al., 1982), containing the *Ec ompF* fragment coding for the OmpF N terminus; and a 352-bp *Pvu*II-*Hinc*II fragment from plasmid pLF9 (Inokuchi et al., 1982), comprising the *Ec ompF* fragment coding for the OmpF C terminus. This band was not observed when the pBR325 vector or *Ec ompC*, *ompA* and *phoE*, were used as probes. DNA preparations of pooled phages from an *St* genomic library, built in bacteriophage λ 1059, were screened by Southern blot hybridization, as described before (Puentes et al., 1987), using the *Ec ompF* structural gene as probe. This screening strategy was used to avoid cross-hybridization with the *Ec* bacterial host DNA (Puentes et al., 1987). One recombinant bacteriophage λ FC1, which carried a 5.6-kb *Sall* fragment, was isolated from a single phage plaque from the corresponding hybridization positive phage pool. The 5.6-kb band was subcloned into the *Sall* site of pBR325 to render plasmid pFC63.

(b) The *ompS1* gene: 5' regulatory features

The nt sequence of a 1938-bp fragment, containing *ompS1*, was obtained. A single ORF of 1182 nt was iden-

tified and predicted to encode a 394-aa polypeptide (43 206 Da), containing a putative 41 120-Da mature protein. A putative SD sequence (AGGGA), 8 bp upstream from the ATG start codon, and a 21-aa signal peptide sequence, similar to that found in the *Ec ompF* and in the *Ec* and *St ompC* genes, were also identified (Fig. 1).

The osmoregulation of the *Ec ompF* and *ompC* genes is mediated by the transcriptional activator OmpR, by binding to two different DNA consensus domains, termed Fa through Fd and Ca to Cd boxes (Rampersaud et al., 1994). In the upstream promoter region of *ompS1*, there are five boxes, termed I to V (Figs. 1 and 2), with nt sequence similarity to the *Ec* OmpR-binding F and C boxes. Box I, located at nt -100 to -109 from the first codon, has a 90% similarity with the consensus sequence for the F-type domains located at the 5' upstream regulatory regions of the *ompF* and *ompC* genes (Rampersaud et al., 1994). In the same manner, boxes II and III, at nt -121 to -130, and -131 to -140, respectively, share 90% similarity with the consensus sequence of the C-type domains, also located at the 5' upstream regulatory regions of *ompC* and *ompF*. Boxes IV and V, located further upstream (nt -162 to -171, and -170 to -179, respectively), have a lesser degree of similarity, 60 and 50%, respectively, with the consensus sequence for the F-type boxes.

Whether any of these boxes has a role in expression is a matter of current research, although one observation has been made. A portion of the *ompS1* 5' regulatory region, from nt -326 to nt +13, encompassing the first four codons of the leader sequence, was fused to the reporter *Ec lacZ* gene. This portion was obtained by PCR, using the oligos shown in Fig. 1. The amplified product was cleaved at the furthest upstream portion with *Sma*I and at the structural gene portion with *Eco*RV, and cloned into the *Sma*I site of fusion vector pMC1871 (Shapira et al., 1983) to render plasmid pRO326. The proper nt sequence and orientation of the cloned fragment was corroborated by nt sequence analysis. When plasmid pRO326 was introduced into *Ec* MC4100 (Δ *argF-lac*), it produced blue colonies when plated on XGal, and white colonies upon introduction into *Ec* MH1160 (MC4100 *ompB101* (*ompR1*); OmpF⁻/OmpC⁻) (Hall and Silhavy, 1981). This indicates that the *ompB* operon is indeed involved in the expression of *ompS1* in *Ec*, probably by interaction of OmpR with one or several of the putative binding boxes. Boxes I to V in *ompS1* are neither distributed as the C-type nor the F-type boxes in *ompC* and *ompF* (Fig. 2). The -10 and -35 regions, of the putative *P1* promoter in *ompS1*, do not overlap any putative OmpR-binding box. The same is true for the functional *P* promoter in *Ec ompB* and for the *P1* promoter of *Ec ompC*, which function in the

```

323  TATGATACCACATTACCGGCATTTATGCGGTTTTTTTTATGCTTTTTTCATAATCAAAGCATCAAATACATATAAAAAACAATTAT
      GGG
413  ATTCACGCCAGCAGCCATCAAAATCAAACACATAACTCATTGATAAAAAATGATAATTATAGACTATATATTTTACTCCATATATATC
      II IV
503  CTGTATTATAAAAAACAAATAGAACAAATGAAATATTGAAATATCTTTTACATTTTATTTTTAAATCCATGAACCTCATAGA
      II II I
593  ATAGTATCAATTTGTAGTTTTGTTGAAGTGGCTACATATTCATATAAATTTATTCATATAGGATACATAATGAACAGAAAAGTTCTGG
      -35 P2 -10 P2 -35 P1 -10 P1 A-A-C
      -10 P1 SD M N R K V L A
683  CACTGCTTGTCCCGCGTTATTAGTGGCAGCGCAGCAAATCGCGCTGAAATTTATAATAAAAATGGCAACAACTCGACCTGTACGGCA
      L L V P A L L V A G A A N A A E I Y N K N G N K L D L Y G K
      -1 +1

```

Fig. 1. The 5' regulatory nt sequence of the *St ompS1* gene (EMBL accession No. X73237). The -21 to -1 aa correspond to the leader peptide, with aa residue +1 being the N terminus of the putative mature protein. At the 5' upstream region, boxes I through V, correspond to putative OmpR-binding sites; the wavy line to a motif for an IHF-binding domain; the upward brackets to the -35 and -10 regions of the *P1* and *P2* putative *ompS1* promoters; and the box for the SD. Primers corresponding to nt 326 and 352 of the 5' portion, and to nt 666 and 695, encoding a fragment of the leader peptide, were used for amplifying the regulatory region that was then fused to *lacZ*.

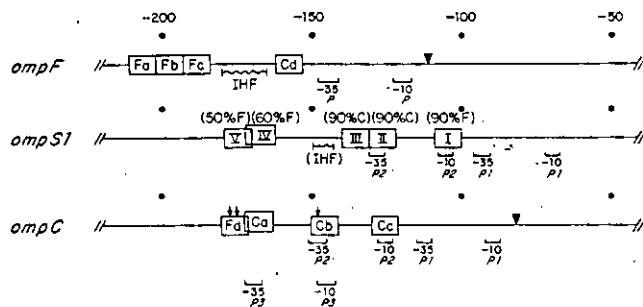


Fig. 2. Schematic representation of the binding domains for the OmpR transcriptional regulator, represented as boxes, at the 5' upstream regulatory region of the *Ec ompF* and *ompC* and the *St ompS1* genes. The negative coordinates are with respect to the first nt of the start codon. On the *ompF* and *ompC* genes, the solid inverted triangles indicate the localization of the first transcribed nt, and the F-type and C-type boxes are indicated. The putative binding domains in *ompS1* are numbered I to V, and in parentheses is their percent homology with the F or the C-type box consensus sequence. The downward arrows above *ompC* indicate the sites of nt differences, within the boxes, between the *ompC* genes in *Ec* and *St*. The -10 and -35 regions of various promoters, as well as the IHF-binding domains, are also indicated. The nt sequence analysis was performed using the GENE WORKS software (IntelliGenetics, Mountain View, CA, USA); and a program developed to search for σ^{70} promoters, based on the statistical algorithm proposed by Mulligan et al. (1984), written in Turbo C language for IBM PC computers by Dr. Enrique Merino (Instituto de Biotecnología, UNAM). The putative OmpR-binding boxes were assigned according to the F-box and C-box consensus sequences (Rampersaud et al., 1994).

presence of OmpR (Norioka et al., 1986). Interestingly, both the *P2* promoter of *ompC* and the putative *P2* promoter in *ompS1* overlap OmpR-binding domains. Clearly, an insight is needed on the binding properties of OmpR to the 5' region of *ompS1*.

An integration host factor (IHF)-binding site motif appears between boxes III and IV of *ompS1* (Figs. 1 and 2). IHF has been proposed to be involved in the regulation of *Ec ompF*, with a binding site between boxes Fc and Cd (Fig. 2; Tsui et al., 1988; Slauch and Silhavy, 1991). This site is contained within a more extensive region that has recently been proposed as one of the two IHF-binding sites involved in negative regulation (Huang et al., 1994). Experiments are underway to better comprehend the mechanisms that promote *ompS1* expression.

(c) The OmpS1 protein

The percent identity/similarity, in parentheses, of the aa sequence of OmpS1 with aa sequences from other porins is: *St ompC* (66/78) and PhoE (59/77); *S. typhimurium* OmpF (58/76); *Ec ompC* (67/79), OmpF (62/76), PhoE (62/78), and NmpC (63/77); bacteriophage PA-2 Lc (65/79). These values were obtained using the GAP program of the GCG, with the default parameters.

The alignment of the OmpS1 aa sequence with that of various porins shows that variable (loop) and conserved (β -strand) regions are present in OmpS1; the latter encompassing 16 regions that have been proposed to be membrane-spanning strands (Jeanteur et al., 1991; Fig. 3). Interestingly, OmpS1 is the longest of the compared porins. On the other hand, NmpC and Lc are coded by genes contained in related lambdoid phages, and the *nmpC* gene contains an IS5 insertion near its 3' end (Blasband et al., 1986). In this respect, the nt sequences flanking the *ompS1* structural gene have no apparent homology with lambdoid DNA or insertion elements; thus, *ompS1* appears not to be of a similar origin as *lc* and *nmpC*.

OmpS1 contains residues Arg³⁷, Arg⁷⁵, Asp¹⁰⁶ and Arg¹²⁶, which are conserved in enterobacterial PhoE, OmpC, OmpF, NmpC and bacteriophage PA-2 Lc (marked by downward arrows in Fig. 3). It has been reported that mutations in the corresponding residues of *Ec ompF* and OmpC modify pore permeability allowing larger molecules to diffuse across the pore (Benson et al., 1988; Misra and Benson, 1988). One protein segment, located between Ala¹³¹ and Ala¹⁴⁸ in the OmpS1 sequence, is highly conserved. It is possible that this segment may play a role in the incorporation of the proteins into the outer membrane, since insertion of a four-aa segment, between Ile¹⁴² and Asp¹⁴³ of the PhoE porin, can interfere with this process depending upon the nature of the inserted residues (Bosch and Tommassen, 1987).

In addition, OmpS1 shares three segments which are strikingly similar among the enterobacterial porins. They consist of residues from Gly²³⁶ to Ala²⁴⁷, from Val²⁸⁰ to Ser²⁹² and from Val³²⁶ to Ser³³⁷ (Fig. 3). They have been

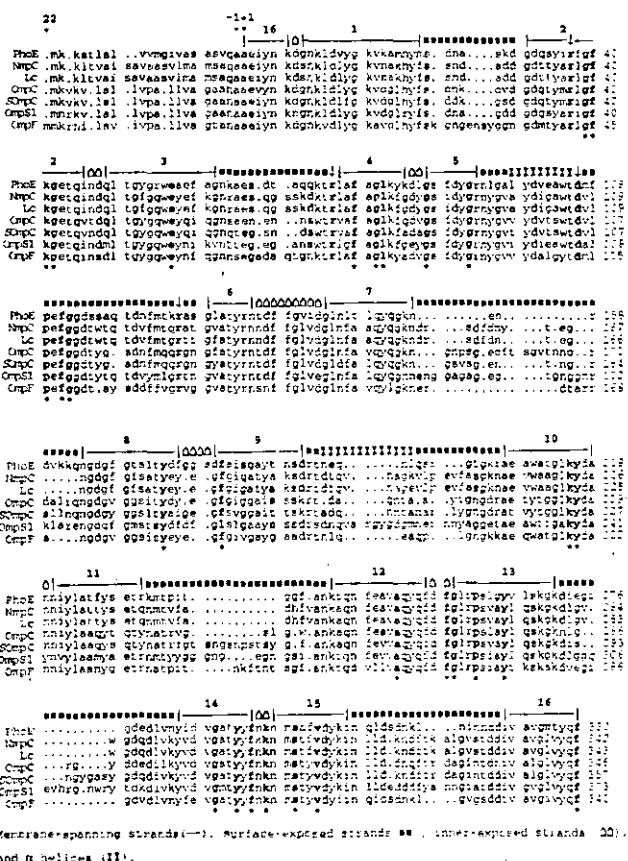


Fig. 3. Alignment of the OmpS1 aa sequence with that of porins. The deduced membrane-spanning strands, surface-exposed strands, inner-exposed strands and α helices, are according to the crystal structures proposed by Cowan et al. (1992). Aligned sequences are: PhoE, NmpC, Lc, OmpC and OmpF of *Ec*; and OmpC (SompC) and OmpS1 of *St*; they were all retrieved from the EMBL Sequence Database. The conserved aa residues among enteric porins (|); and among enteric/neisserial porin subfamilies (bold and *), are shown. Version 7-UNIX (Copyright, 1991) of the Sequence Analysis Software Package (GCG) was used for multiple alignments, performed with the PILEUP application (Gap weight, 1.0; Gap length weight, 0.1).

proposed to form part of the contact regions between monomers involved in trimer formation, a step required for pore constitution. Such an assignment is supported by the fact that the thermal stability of porin heterotrimers is similar to that of porin homotrimers, suggesting that the structures of monomer-monomer contact are highly conserved (Jap and Walian, 1990).

Another consensus aa sequence pattern was identified in OmpS1, from aa 324 to 340 at the C terminus. It spans two putative transmembrane β strands, consisting of [LIVMFY]-X(2)-G-X(2)-Y-X-F-X-K-X(2)-S-[STA]-[LIVMFY]-V; where the brackets group the possible aa residue at a single position, X is any aa residue, and in parentheses the number of repeats is shown. It is shared by several porins, namely: enterobacteriaceae PhoE, OmpC, OmpF, NmpC; and by *Neisseria* PI.A and *Neisseria* PI.B. This pattern is included in the GCG MOTIFS program (version 7.0).

Codon usage was essentially as that described for *St* and *Ec ompC* (Puente et al., 1989).

(d) Presence of OmpS1 in OMP preparations

Although the OmpS1 protein has homology to porins (Fig. 3), such as OmpC and OmpF (Nikaido and Vaara, 1985), its presence in the *St* outer membrane could not be ascertained by Coomassie blue-staining of an OMP electrophoretic profile (Fig. 4B, lane d). This might reflect that OmpS1 is poorly expressed or incorporated into the outer membrane, when the cells are grown in standard

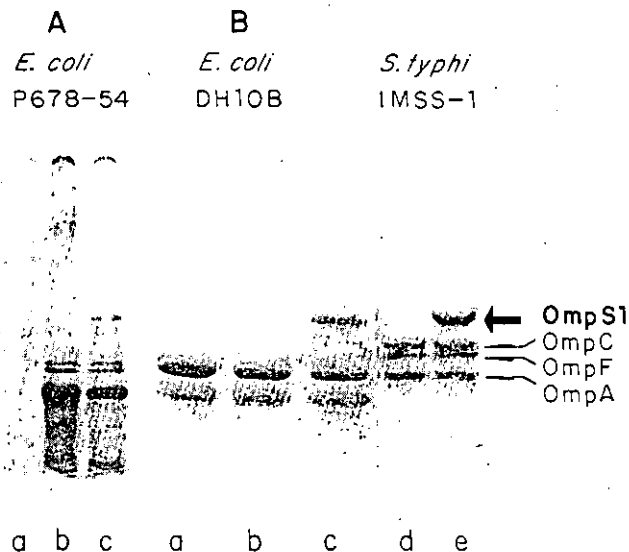


Fig. 4. Synthesis of the OmpS1 protein. (A) Autoradiograph of the electrophoretic pattern of ^{35}S -labeled proteins produced in minicells of *Ec* strain P678-54. Lanes: a, no plasmid; b, vector plasmid pBR325; c, recombinant plasmid pFC63. (B) Electrophoretic pattern of Coomassie-brilliant-blue-stained OMP preparations from: *Ec* DH10B, containing no plasmid (lane a), recombinant plasmid pAc2 containing the *St ompS1* insert in the opposite orientation to the P_{tac} promoter in plasmid vector pBac1 (lane b), or recombinant plasmid pF2 containing the *St ompS1* gene in the proper orientation with respect to the P_{tac} promoter (lane c); or from *St* IMSS-1, containing no plasmid (lane d), or plasmid pF2 (lane e). Methods: The *Ec* minicell-producing strains were grown in 2x yeast tryptone extract. Minicells were purified by centrifugation through 20% sucrose gradients, pulse-labeled with 10 μCi of [^{35}S]methionine (> 1000 Ci/mmol; Dupont-NEN, Boston, MA, USA) for 30 min at 37°C, and then analyzed by 0.1% SDS-12% PAGE at 20 mA for 6 h; the gel was dried and exposed to X-ray film. The structural gene was amplified by PCR using an oligo (nt 607-637) of the 5' upstream region, and another (nt 1903-1929) at the 3' end of the gene; they included a *Bam*HI site that kept the SD sequence and the start codon at an optimal distance from the upstream regulatory sequences of expression plasmid pBac1 (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany). The ampicillin-resistant colonies were selected and screened for *ompS1*. Two recombinant plasmids, pE2 and pF2 (with inserts in the opposite and proper orientation, respectively), were obtained upon transformation of *Ec* DH5 α -F'lacI $^{\phi}$. Constructions were ascertained by nt sequence analysis. *Ec* DH10B and *St* IMSS-1 were grown in M9 medium, supplemented with casamino acids, or in nutrient broth, respectively. OmpS1 synthesis was induced with 1 mM IPTG. OMP preparations were obtained and analyzed by 0.1% SDS-12% PAGE, as described previously (Puente et al., 1995).

laboratory conditions. We are currently investigating the reason for this phenomenon.

In order to determine if *OmpS1* was indeed an OMP, it was expressed in *St* and *Ec* under the control of a strong promoter, using the following strategy. The structural gene was amplified by PCR, using one oligo starting, from left to right, 10 nt downstream from the putative -10 *P1* region; and another one spanning, from right to left, several nt in the non-translated 3' portion. The product was subcloned into the *Bam*HI restriction site of multicopy expression plasmid p*Btac1*, to generate plasmid pF2. Upon transformation into *St* or *Ec*, and induction with IPTG, pF2 directed the synthesis of a protein product which was detectable in the OMP preparations as a band of 41 kDa, similar to that estimated from the deduced *OmpS1* aa sequence (Fig. 4B, lanes c and e). No expression was seen when the PCR product was cloned in the inverted orientation with respect to the *tac* promoter (Fig. 4B, lane b). Furthermore, a 41-kDa protein, coded by plasmid pFC63, can be visualized in minicells by ³⁵S-labeling (Fig. 4A, lane c).

(e) Hybridization of *ompS1* to DNA of other Salmonellae

To learn if *ompS1* was also present in other clinical isolates of *St* and in other *Salmonella* serotypes, DNA was prepared from several prototype strains, digested with restriction endonucleases and examined by Southern blot hybridization. A ³²P-labeled 1182-bp fragment, corresponding exactly to structural *ompS1*, obtained from plasmid pF2 by digestion with *Bam*HI, as well as a 863-bp ³²P-labeled *Sau*3AI fragment, from the inner portion of the structural gene, were used as probes.

All tested *Salmonella* strains hybridized with *ompS1*, under conditions of high stringency, except *S. arizonae*. RFLP was observed in *S. gallinarum* FVA-1 and *Salmonella* sp. group D, with restriction enzyme *Sal*I; and in *S. gallinarum* FVA-1, *S. typhimurium* LT2, *Salmonella* sp. group C, and *Salmonella* sp. group D, with restriction enzyme *Sau*3AI (Table I).

The conservation of *ompS1* in other Salmonellae raises the question about the role of other porins, aside from the known major ones. In this respect, interestingly, experiments at lower stringency have allowed the identification and isolation of novel *St* genomic DNA fragments, containing sequences similar to *ompS1*. One of these sequences was determined and found to code for a new gene, now termed *ompS2* (M.F.-M., J.L.P. and E.C., data not shown).

(f) Conclusions

(1) We have cloned *ompS1*, a novel structural gene that codes for an *St* OMP.

(2) In *St*, *OmpS1* is present in OMP preparations at much lower levels than the major OMPs, such as *OmpF*

TABLE I

Hybridization of the *St ompS1* gene with DNA of other Salmonellae

Strain ^a	Source ^b	Hybridization fragments (kb)	
		<i>Sal</i> I ^c	<i>Sau</i> 3AI ^d
<i>St</i> IMSS-1	(1)	5.6	0.86
<i>St</i> Ty2	(2)	5.6	0.86
<i>St</i> Ty404	(3)	5.6	0.86
<i>St</i> 2d	(4)	5.6	0.86
<i>St</i> 11j	(4)	5.6	0.86
<i>St</i> 2530	(4)	5.6	0.86
<i>St</i> 3042	(4)	5.6	0.86
<i>St</i> MK12	(5)	5.6	0.86
<i>St</i> MK20	(5)	5.6	0.86
<i>St</i> MK29	(5)	5.6	0.86
<i>Sa</i> INN-1	(5)	-	-
<i>Sg</i> FVA-1	(6)	18.8	0.6
<i>Sp</i>	(8)	5.6	0.86
<i>Sim</i> LT2	(7)	5.6	2.0
<i>S</i> sp. C group	(5)	5.6	2.0
<i>S</i> sp. D group	(6)	18.8	0.70
<i>S</i> sp. E group	(5)	5.6	N.D.

^a Abbreviations for strains are: *St*, *S. typhi*; *Sa*, *S. arizonae*; *Sg*, *S. gallinarum*; *Sp*, *S. pullorum*; *Sim*, *S. typhimurium*; *S* sp., *Salmonella* species.

^b The strains were obtained from: (1) Mexican reference strain (Isibasi et al., 1988); (2) American Type Culture Collection, No. 19430; (3) biphasic (d: z66) Indonesian isolate (3083/82) from Dr. L. Le Minor, Service des Enterobacteries, Institut Pasteur, Paris; (4) monophasic (d:-) (2d, 2530, 3042) and (j:-) (11j) Indonesian isolates, Stanford University/USNAMRU-2; (5) reference clinical isolates from the Instituto Nacional de la Nutrición, Mexico, kindly provided by M. Bobadilla; (6) reference strain from the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Mexico; (7) original wild-type Herzberg strain (SL937) from Dr. B.A.D. Stocker, Stanford University, USA; (8) American Type Culture Collection, No. 10398-A.

^c The whole structural gene (1182 bp) was used as probe.

^d The inner 863-bp fragment of *ompS1* was used as probe.

Symbol - indicates no hybridization signal; N.D., not done.

Methods: DNA biochemistry was done following standard procedures (Sambrook et al., 1989). Prehybridization of DNA on Southern blots was in 50% formamide/5 × SSC/10 × Denhardt's solution (1 × : 0.02% Ficoll, 400/0.02% polyvinylpyrrolidone 360/0.02% BSA)/50 mM Tris-HCl pH 7.5/0.1 mg per ml sonicated salmon-sperm DNA at 42°C for 2 h. Hybridization with radioactive probes (1 × 10⁸ cpm/μg) was for 16 h, at 42°C. Washes were carried out twice in 1 × SSC/0.1% SDS, and then once in 0.1 × SSC/0.1% SDS at 50°C.

and *OmpC*, under the conditions tested. There is, however, the possibility that this gene is expressed at higher levels only under extreme conditions, not yet found or explored.

(3) The *OmpS1* aa sequence is clearly related to those of porins from Enterobacteriaceae, which leads to the notion that *OmpS1* most likely also forms pores in the outer membrane.

(4) There are five putative, uniquely distributed, *OmpR*-binding domains in the 5' regulatory region of *ompS1*. The *OmpR* transcriptional regulator appears to be involved in *ompS1* expression in *Ec*.

(5) Nt sequences similar to *St ompS1* are present in most *Salmonella* isolates tested, except in *S. arizonae*. RFLP was observed in some *Salmonellae*.

(6) The presence of gene *ompS1* in *Salmonellae* opens many questions regarding its role in nature and about its expression in response to the physicochemical parameters of various microenvironments.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Leon Le Minor, Miriam Bobadilla and Bruce A.D. Stocker for their gift of strains; Myriam Ortiz for keeping and handling of the bacterial strain collection, and Eugenio López and Paul Gaytán for oligo synthesis. Plasmids pLF9 and pLF11 were kindly provided by S. Mizushima, University of Nagoya, Japan; and pJP33 by Jan Tommassen, State University, Utrecht, The Netherlands. Research was supported by grants from The Rockefeller Foundation, USA (RF91080#126), from the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-IN204191); and by an International Research Scholar Award (to E. Calva) from the Howard Hughes Medical Institute (No. 75191-527102). R.O. was supported by an undergraduate scholarship from the Mexican Academy for Scientific Research ("Verano y Residencia Anual de la Investigación Científica").

REFERENCES

- Benson, S.A., Occi, J.L.L. and Sampson, B.A.: Mutations that alter the pore function of the OmpF porin of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* 203 (1988) 961-970.
- Blanco, F., Isibasi, A., González, C.R., Ortiz, V., Paniagua, J., Arreguin, C. and Kumate, J.: Human cell-mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. *Scand. J. Infect. Dis.* 25 (1993) 73-80.
- Blasband, A., Marcotte, W.R. and Schnaitman, C.A.: Structure of the *lc* and *nmpC* outer membrane porin protein genes of lambdaoid bacteriophage. *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 12723-12732.
- Bosch, D. and Tommassen, J.: Effects of linker insertions on the biogenesis and functioning of the *Escherichia coli* outer membrane pore protein PhoE. *Mol. Gen. Genet.* 208 (1987) 485-489.
- Calva, E., Puente, J.L. and Calva, J.J.: Research opportunities in typhoid fever: epidemiology and molecular biology. *BioEssays* 9 (1988) 173-177.
- Cowan, S.W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Paupit, R.A., Jansonius, J.N. and Rosenbusch, J.P.: Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* 358 (1992) 727-733.
- Hall, M.N. and Silhavy, T.J.: The *ompB* locus in the regulation of the major outer membrane porin proteins in *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* 146 (1981) 23-43.
- Huang, K., Schieberl, J.L. and Igo, M.M.: A distant upstream site involved in the negative regulation of the *Escherichia coli ompF* gene. *J. Bacteriol.* 176 (1994) 1309-1315.
- Inokuchi, K., Mutoh, N., Matsuyama, S.-i. and Mizushima, S.: Primary structure of the *ompF* gene that codes for a major outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 10 (1982) 6957-6967.
- Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., González, C., Moreno, J. and Kumate, J.: Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *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. *Q. Rev. Biophys.* 23 (1990) 367-403.
- Jeanteur, D., Lakey, J.H. and Pattus, F.: The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction. *Mol. Microbiol.* 5 (1991) 2153-2164.
- Lee, D.R. and Schnaitman, C.A.: Comparison of outer membrane porin proteins produced by *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 142 (1980) 1019-1022.
- Misra, R. and Benson, S.A.: Genetic identification of the pore domain of the OmpC porin of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 170 (1988) 3611-3617.
- Mulligan, M.E., Hawley, D.K., Entriken, R., and McClure, W.R.: *Escherichia coli* promoter sequences predict in vitro RNA polymerase selectivity. *Nucleic Acids Res.* 12 (1984) 789-800.
- Nikaido, H. and Vaara, M.: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49 (1985) 1-32.
- 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.
- 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., 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., 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.
- Puente, J.L., Juárez, D., Bobadilla, M., Arias, C.F. and Calva, E.: The *Salmonella ompC* gene: structure and use as a carrier of heterologous sequences. *Gene* 156 (1995) 1-9.
- Rampersaud, A., Harlocker, S.L. and Inouye, M.: The OmpR protein of *Escherichia coli* binds to sites in the *ompF* promoter region in a hierarchical manner determined by its degree of phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 12559-12566.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Shapira, S.K., Chou, J., Richaud, F.V. and Casadaban, M.J.: New versatile plasmid vectors for expression of hybrid proteins coded by a cloned gene fused to *lacZ* gene sequences encoding an enzymatically active C-terminal portion of β -galactosidase. *Gene* 25 (1983) 71-82.
- Slauch, J.M. and Silhavy, T.J.: *cis*-acting *ompF* mutations that result in OmpR-dependent constitutive expression. *J. Bacteriol.* 173 (1991) 4039-4048.
- Stock, J.B., Ninfa, A.J. and Stock, A.M.: Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* 53 (1989) 450-490.
- Tommassen, J., Van der Ley, P., Van der Ende, A., Bergmans, H. and Lugtenberg, B.: Cloning of *ompF*, the structural gene for an outer membrane pore protein of *Escherichia coli* K12: physical localization and homology with the *phoE* gene. *Mol. Gen. Genet.* 185 (1982) 105-110.
- Tsui, P., Helu, V. and Freundlich, M.: Altered osmoregulation of *ompF* in integration host factor mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170 (1988) 4950-4953.
- Verdugo-Rodríguez, A., López-Vidal, Y., Puente, J.L., Ruiz-Padillas, 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) 248-254.

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Considero que una parte fundamental de la discusión ya ha sido planteada en la sección de resultados publicados. Sin embargo, deseo profundizar un poco más en los siguientes puntos:

Niveles de regulación de *ompS1*.

Como fue mencionado en la introducción de este trabajo, el gen *ompF* es objeto de regulación postranscripcional por un RNA antisentido que hibrida sobre el RNA mensajero no traducido (líder), el sitio de unión a ribosomas y los primeros codones (Schmidt, et al., 1995). De hecho, se sabe que *micF*, el gen que lo codifica, está ampliamente conservado entre las enterobacterias, incluyendo a *S. t.* (Esterling et al., 1994).

En este estudio recurrimos al uso de fusiones traduccionales que incluyen hasta el cuarto codón de *ompS1* pues, en un principio, todo lo que sabíamos respecto a su regulación era que se expresa en bajos niveles en condiciones de crecimiento en el laboratorio. La comparación de la actividad del gen reportero en las construcciones pRO310 y pRO266 sugirió que buena parte del control ocurre a nivel transcripcional. Supusimos que de ser este el nivel principal de regulación, una construcción similar a la pRO266, pero ahora con el gen estructural *ompS1*, produciría niveles comparables a los de OmpC en la membrana externa, probando ello ser cierto con la construcción pRO269 (Figs 1 y 2 en resultados publicados, artículo 1).

Entonces, aunque los experimentos realizados no estuvieron dirigidos específicamente a evaluar la existencia de posibles mecanismos de regulación postranscripcional, podemos afirmar que la parte más estricta del control de *ompS1* ocurre a nivel transcripcional y además sugerir que es poco probable que exista un mecanismo similar al de *micF-ompF*.

Elementos *trans*-reguladores de *ompS1*.

Una de las conclusiones a las que llegamos es referente a la participación directa del regulador OmpR en el control de *ompS1*. Interesantemente, la primer señal que sugirió esto surgió al buscar secuencias con similitud a esta región reguladora en el banco de genes. Si bien muchos de los datos experimentales obtenidos después apoyaron la idea, el experimento de protección a la digestión con DNasa demuestra el papel directo del regulador (Fig. 5 en

resultados publicados, artículo 1)

Comparando las regiones protegidas entre éste y los genes *ompC* y *ompF*, resulta evidente una distribución similar, por principio, de las cajas de unión a OmpR con sitios de contacto que van desde alrededor de -40 hasta cerca de -100 (Fig. 4 en resultados publicados, artículo 1; Harlocker et al., 1995; Tsung et al., 1989). Una inspección más amplia y detallada comienza a arrojar diferencias, pero es obvio que existen, puesto que los tres genes se expresan de manera distinta.

La similitud en los niveles de actividad del reportero obtenidos en los diferentes fondos genéticos analizados, sugiere que en *E. c.* y *S. t.* existen elementos *trans*-reguladores de *ompS1* que se encuentran conservados. Este hecho es reforzado adicionalmente al considerar que la proteína OmpR es idéntica en ambas bacterias y que *E. c.* posee un pseudogen *ompS1* con una región reguladora aún bastante bien conservada (Figs 3 y 4, de esta tesis). En conjunto, estos resultados validan también, al menos parcialmente, el uso de mutantes de *E. c.* en genes definidos para evaluar su efecto en la regulación de *ompS1*. Apoyados en este razonamiento fue que evaluamos la función de IHF en una cepa de *E. c.*

Una excepción más al papel osmorregulador de locus *ompB*.

Resulta de particular interés el hecho de que en un fondo silvestre de *S. t.*, la osmolaridad no afecte a una construcción de la región reguladora de *ompS1* que se expresa en bajos niveles, como la pRO310, ni a una construcción que se expresa en altos niveles, como la pRO88. Si bien el sistema regulador OmpR/EnvZ ha sido caracterizado ampliamente como capaz de responder a cambios en la osmolaridad, también es cierto que la única excepción en ese sentido, de que tenemos noticia, ocurre precisamente en *S. t.* con el gen *ompC* (Puente et al., 1991). Queda por evaluar si con *ompS1* ocurre lo mismo que con *ompC*, respecto al componente bifactorial que requiere esta conducta para llevarse a cabo (presencia del fondo genético de *S. t.* y del operon *ompB* de *S. t.*) (Martínez-Flores et al., 1999).

Rumbo al modelo de regulación de *ompS1*.

En el estado actual del conocimiento en que nos encontramos, resulta difícil proponer un mecanismo único de regulación para *ompS1*. Hay cosas muy claras y evidentes, sin embargo

otras son más difíciles de explicar.

Sabemos que los elementos *cis*-reguladores están contenidos en un fragmento de 310 nucleótidos hacia arriba del sitio de inicio de la transcripción y que este fragmento se subdivide en una región distal, involucrada en represión, y una proximal con capacidad activadora.

Respecto a los elementos *trans*-reguladores, conocemos a la proteína OmpR; pero la situación se complica cuando encontramos: 1) que ésta tiene cajas de unión distribuidas a lo largo de toda la secuencia, 2) que en el estado desfosforilado (y quizá también como OmpR-P) se une con mayor afinidad a la región de activación y 3) que el gen puede transcribirse a partir de tres promotores sobrelapados, de los cuales dos son regulables.

Considerando nuestros datos experimentales, podríamos proponer que OmpR forma una horquilla represora entre las cajas distales y proximales, la cual mantiene apagado a *ompS1*. Sin embargo este modelo no basta para explicar varios hechos como: a) ¿cuál es la molécula efectora y el estímulo que desreprime a *ompS1* (puesto que la fosforilación de OmpR no parece tener efecto)?, b) ¿por qué las cajas de activación son unidas preferencialmente en nuestro ensayo de protección?, y c) ¿por qué el promotor 2 se desreprime en construcciones cortas y en el fondo $\Delta ompB$? (Figs 3 y 5 en resultados publicados, artículo 1).

Una adecuación a este primer modelo podría postularse en términos de involucrar la existencia de una proteína adicional, con las siguientes características: 1) está activada para unir DNA cuando la bacteria crece en condiciones de laboratorio; 2) es superior (epistática) a OmpR en la cadena que define cuándo expresar a *ompS1*; pero 3) es incapaz de iniciar por sí misma la transcripción a partir del promotor 1, es decir que no puede interactuar con la RNA polimerasa para activar y 4) tiene un papel represor sobre P2, lo cual podría ser una consecuencia de lo anterior.

Así, la presencia de una proteína adicional sería definitiva para la estabilización de la horquilla represora, reforzando las interacciones de OmpR en la región distal con OmpR en la región proximal; mientras que su ausencia ocasionaría que OmpR permanezca unida sólo a la región proximal, por tanto activando la transcripción.

Las diferencias entre este modelo y aquel propuesto para regular a *ompF* son básicas, puesto que los patrones de expresión y las condiciones que los afectan difieren por completo (Huang et al., 1994; Rampersaud et al., 1994; Harlocker et al., 1995).

Repercusiones sobre los postulados del modelo general de regulación y perspectivas.

En términos generales, los resultados obtenidos en este trabajo hacen una aportación importante al conocimiento de la regulación de las porinas, ya que nos dan elementos para cuestionar y evaluar al modelo general de control: durante muchos años éste se ha construido con base en observaciones recabadas a partir de un par de genes, lo que ha contribuido a autolimitar su desarrollo. En este sentido, la realización de estudios más profundos en torno a la regulación de *ompS1* resulta prometedor.

Así, la región reguladora de *ompS1* ofrece una serie de peculiaridades que habrá que explorar con detenimiento. Del análisis de las secuencias reconocidas por OmpR en *ompS1*, respecto al resto de las cajas sobre *ompC* y *ompF*, se pueden hacer las siguientes anotaciones: ninguna posee todos los rasgos definidos como importantes para el reconocimiento (Pratt y Silhavy, 1995; Huang e Igo, 1996; Head et al., 1998), a decir, el par de bases AC en la mitad izquierda para las cajas de alta afinidad (C1 y F1), el par de bases AC en la mitad derecha para el resto de las cajas y la G central conservada en casi todas (con excepción de F4) (Fig. 5 de esta tesis).

Notablemente, el par de nucleótidos de alta afinidad sólo lo tiene la caja II que efectivamente fue la más afin en nuestro ensayo de protección. La G central sólo está en las cajas I, II, IV y V, mientras que el otro par de nucleótidos de la mitad derecha sólo está en las cajas I y IV; así el resto de las cajas sólo tiene una de las dos bases conservadas. Esto hace surgir la pregunta de qué tan afines serán cada una de ellas y en su conjunto, respecto a las cajas F y C.

En contraste, la caja II de alta afinidad está ubicada entre los nucleótidos -71 y -78, mientras que en *ompC* y *ompF* las cajas con esta característica (F1/C1) corresponden a la tercera, ubicadas de -78 a -98.

No obstante lo anterior, la construcción más activa fue la pRO88, la cual incluye hasta la mitad derecha de la caja III; interesantemente, en ella, ésta es la parte más conservada. Resultará importante entonces evaluar si la secuencia silvestre de la caja III es reconocida por completo; si en la construcción pRO88 OmpR protege simultáneamente secuencias nativas de la caja III y secuencia del vector, o si por el contrario sólo se une a media caja; de ser este último el caso, estaría en contraposición a la observación de Harlocker et al. (1995), respecto a que OmpR se une de dos en dos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8			
F1	<u>A</u>	<u>C</u>	T	T	T	T	G	G	T	<u>A</u>	<u>C</u>	A	T	A	T	T	T		
F2	T	C	T	T	T	T	T	G	A	<u>A</u>	<u>C</u>	C	A	A	A	T	C		
F3	T	A	T	C	T	T	T	G	T	A	G	C	A	C	T	T	T	C	
C1	<u>A</u>	<u>C</u>	A	T	T	T	T	G	A	<u>A</u>	<u>C</u>	A	T	C	T	A	T		
C2	G	A	T	A	A	A	T	G	A	<u>A</u>	<u>C</u>	A	T	C	T	T	A		
C3	A	G	T	T	T	A	G	T	A	T	C	A	T	A	T	T	C		
F4	<u>A</u>	<u>C</u>	G	G	A	A	T	A	T	<u>A</u>	<u>C</u>	A	T	T	G	C	A		
I	T	A	T	C	T	T	T	G	T	<u>A</u>	<u>C</u>	A	T	G	T	T	A		
II	<u>A</u>	<u>C</u>	A	A	A	A	T	T	G	A	A	A	T	A	T	T	T	A	
																		66→	
III	T	T	A	T	A	A	A	A	A	A	A	C	C	A	A	A	T	A	G
																			88→
IV	A	T	T	C	T	T	A	G	T	C	<u>A</u>	<u>C</u>	T	T	A	T	A	T	
																			117→
V	A	A	T	C	A	A	A	G	C	A	T	C	A	A	A	T	A	C	
VI	A	T	T	T	A	T	T	T	T	A	T	C	A	T	T	A	C	C	

Fig. 5. Alineamiento de las cajas de unión a OmpR en *ompC* (C1-C3) y *ompF* (F1-F4) de *E. c.* y *ompS1* (I-VI) de *S. t.* Se indican los nucleótidos conservados propuestos como importantes para el reconocimiento DNA-proteína: los pares AC (posiciones 1 y 2, mitad izquierda y derecha) y la G central (posición 8, mitad izquierda); también se indica con flechas el punto en que comienzan algunas de las construcciones empleadas en este estudio (66, 80, 88 y 117).

En este contexto, resulta aún más interesante que dicha activación alcance niveles alrededor de diez veces mayor a los de nuestra construcción control, que lleva la región reguladora de *ompC*. Por el momento, la explicación más sencilla a este hecho es que lo ocasiona la cercanía de las cajas de activación y de alta afinidad a la región promotora. Para otros sistemas, como los promotores dependientes de CAP clase I, se ha demostrado que cuando existe una interacción entre la proteína activadora y el dominio carboxilo terminal de la subunidad α , como es el caso para OmpR, el alejar los sitios de unión vueltas completas de DNA, ocasiona que la capacidad de activar la transcripción se reduzca. (Gaston et al., 1990; Ebright, 1993)

Todo esto hace evidente que el avanzar en el estudio y comprensión de la regulación de *ompSI* y el incorporar los datos obtenidos en el modelo general de regulación de las porinas, permitirá que este aspecto del control genético en bacterias pueda ser explicado, predicho y empleado en aspectos generales biotecnológicos y de ingeniería genética.

BIBLIOGRAFIA.

Aiba, H.; Nakasai, F.; Mizushima, S. y Mizuno, T. (1989) "Evidence for the physiological importance of the phosphotransfer between the two regulatory components, EnvZ and OmpR, in osmoregulation in *Escherichia coli*". J. Biol. Chem. 264(24):14090-4.

Alphen, W. V. y Lugtenberg, B. (1977) "Influence of osmolarity of the growth medium on the outer membrane protein pattern of *Escherichia coli*". J. Bacteriol. 131(2):623-30.

Bäumler, A. J.; Tsolis, R. M.; Ficht, T. A. y Adams, L. G. (1998). "Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*". Infect. Immun. 66(10):4579-87

Benson, S. A.; Occi, J. L. y Sampson, B. A. (1988) "Mutations that alter the pore function of the OmpF porin of *Escherichia coli* K12". J. Mol. Biol. 203(4):961-70.

Benz, R. (1988) "Structure and function of porins from gram-negative bacteria". Annu. Rev. Microbiol. 42:359-93.

Bosch, D.; Leunissen, J.; Verbakel, J.; de Jong, M.; van Erp, H. y Tommassen, J. (1986) "Periplasmic accumulation of truncated forms of outer-membrane PhoE protein of *Escherichia coli* K-12". J. Mol. Biol. 189(3):449-55.

Bosch, D.; Voorhout, W. y Tommassen, J. (1988) "Export and localization of N-terminally truncated derivatives of *Escherichia coli* K-12 outer membrane protein PhoE". J. Biol. Chem. 263(20):9952-7.

Bosch, D. y Tommassen, J. (1987) "Effects of linker insertions on the biogenesis and functioning of the *Escherichia coli* outer membrane pore protein PhoE". Mol. Gen. Genet. 208(3):485-9

Calva, E. y Calva, J. J. (1998) "Country report: Typhoid fever and other Salmonellosis in Mexico". Medical Journal of Indonesia. 7 (S 1): 17-19

Cowan, S. W.; Schirmer, T.; Rummel, G.; Steiert, M.; Ghosh, R.; Pauptit, R. A.; Jansonius, J. N. y Rosenbusch, J. P. (1992) "Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins". Nature. 358(6389):727-33.

Drasar, B. S. y Barrow, P. A. (1985). "The intestinal flora in diarrhoea and malabsorption". pp. 42-58. En: Aspects of Microbiology. Intestinal Microbiology. ASM press. Washington, D. C. EE. UU.

Ebright, R. H. (1993) "Transcription activation at Class I CAP-dependent promoters". Mol. Microbiol. 8(5):797-802.

Esterling, L. y Delilhas, N. (1994) "The regulatory RNA gene *micF* is present in several species of gram-negative bacteria and is phylogenetically conserved". Mol. Microbiol. 12(4):639-46.

Fernandez-Mora, M; Oropeza, R.; Puente, J. L. y Calva, E. (1995) "Isolation and characterization of *ompS1*, a novel *Salmonella typhi* outer membrane protein-encoding gene". Gene. 158(1):67-72.

Ferrario, M.; Ernstring, B.R.; Borst, D.W.; Wiese, D. E. 2nd.; Blumenthal, R. M. y Matthews, R. G. (1995) "The leucine-responsive regulatory protein of *Escherichia coli* negatively regulates transcription of *ompC* and *micF* and positively regulates translation of *ompF*". J. Bacteriol. 177(1):103-13.

Forst, S.; Comeau, D.; Norioka, S. e Inouye, M. (1987) "Localization and membrane topology of EnvZ, a protein involved in osmoregulation of OmpF and OmpC in *Escherichia coli*". J. Biol. Chem. 262(34):16433-8.

Forst, S.; Delgado, J.; Rampersaud, A. e Inouye, M. (1990) "In vivo phosphorylation of OmpR, the transcription activator of the *ompF* and *ompC* genes in *Escherichia coli*". J. Bacteriol. 172(6):3473-7.

Forst, S. e Inouye, M. (1988) "Environmentally regulated gene expression for membrane proteins in *Escherichia coli*". Annu. Rev. Cell. Biol. 4:21-42.

Galan, J. E. (1996) "Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells". Mol. Microbiol. 20(2):263-71.

Gaston, K.; Bell, A.; Kolb, A.; Buc, H. y Busby, S. (1990) "Stringent spacing requirements for transcription activation by CRP". Cell. 62(4):733-43.

Guthrie, R. K. (1992a) "Taxonomy and grouping of *Salmonella*". pp. 23-4. En: *Salmonella*. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida, EE. UU.

Guthrie, R. K. (1992b). "Salmonellosis - The Infection". pp. 41-60. En: *Salmonella*. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida, EE. UU.

Hall, M. N. y Silhavy, T. J. (1981) Genetic analysis of the *ompB* locus in *Escherichia coli* K-12". J. Mol. Biol. 151(1):1-15

Harlocker, S. L.; Bergstrom, L. e Inouye, M. (1995) "Tandem binding of six OmpR proteins to the *ompF* upstream regulatory sequence of *Escherichia coli*". J. Biol. Chem. 270(45):26849-56.

Harrison-McMonagle, P.; Denissova, N.; Martinez-Hackert, E.; Ebright, R. H. y Stock, A. M. (1999) "Orientation of OmpR monomers within an OmpR:DNA complex determined by DNA affinity cleaving". J. Mol. Biol. 285(2):555-66.

Head, C.G.; Tardy, A. y Kenney, L. J. (1998) "Relative binding affinities of OmpR and OmpR-phosphate at the *ompF* and *ompC* regulatory sites". J. Mol. Biol. 281(5):857-70.

Huang, K. J. e Igo, M. M. (1996) "Identification of the bases in the *ompF* regulatory region, which interact with the transcription factor OmpR". J. Mol. Biol. 262(5):615-28.

Huang, K. J.; Schieberl, J. L. e Igo, M. M. (1994) "A distant upstream site involved in the negative regulation of the *Escherichia coli ompF* gene". J. Bacteriol. 176(5):1309-15.

Igarashi, K.; Hanamura, A.; Makino, K.; Aiba, H.; Aiba, H.; Mizuno, T.; Nakata, A. e Ishihama, A. (1991) "Functional map of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: two modes of transcription activation by positive factors". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88(20):8958-62.

Igo, M. M.; Ninfa, A. J. y Silhavy T. J. (1989) "A bacterial environmental sensor that functions as a protein kinase and stimulates transcriptional activation". Genes Dev. 3(5):598-605.

Igo, M. M. y Silhavy, T. J. (1988) "EnvZ, a transmembrane environmental sensor of *Escherichia coli* K-12, is phosphorylated in vitro". J. Bacteriol. 170(12):5971-3

Jair, K. W.; Martin, R. G.; Rosner, J. L.; Fujita, N.; Ishihama, A.; Wolf R. E. Jr.; (1995) "Purification and regulatory properties of MarA protein, a transcriptional activator of *Escherichia coli* multiple antibiotic and superoxide resistance promoters". J. Bacteriol. 177(24):7100-4.

Jap, B.K. y Walian, P. J. (1990) "Biophysics of the structure and function of porins". Q. Rev. Biophys. 23(4):367-403.

Jeanteur, D.; Lakey, J. H. y Pattus, F. (1991) "The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction". Mol. Microbiol. 5(9):2153-64

Jin, T. e Inouye, M. (1994) "Transmembrane signaling. Mutational analysis of the cytoplasmic linker region of Taz1-1, a Tar-EnvZ chimeric receptor in *Escherichia coli*". J. Mol. Biol. 244(5):477-81

- Kondo, H.; Nakagawa, A.; Nishihira, J.; Nishimura, Y.; Mizuno, T. y Tanaka, I. (1996) "*Escherichia coli* positive regulator OmpR has a large loop structure at the putative RNA polymerase interaction site" *Nat. Struc. Biol.* 4 (1): 28-31.
- Li, Z. y Demple, B. (1994) "SoxS, an activator of superoxide stress genes in *Escherichia coli*. Purification and interaction with DNA". *J. Biol. Chem.* 269(28):18371-7
- Martinez-Flores, I; Bustamante, V. H.; Puente J. L. y Calva, E. (1995) "Cloning and characterization of the *Salmonella typhi* *ompR* and *envZ* genes" *AsPac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 3: 135-144
- Martinez-Flores, I; Cano, R.; Bustamante, V. H.; Calva, E. y Puente J. L. (1999) "The *ompB* operon partially determines differential expression of OmpC in *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* 181(2):556-62.
- Martinez-Hackert, E. y Stock, A. M. (1997a) "The DNA-binding domain of OmpR: crystal structures of a winged helix transcription factor". *Structure.* 5(1):109-24.
- Martinez-Hackert, E. y Stock, A. M. (1997b) "Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors". *J. Mol. Biol.* 269(3):301-12.
- Miller, S. I. (1991) "PhoP/PhoQ: macrophage-specific modulators of *Salmonella* virulence?". *Mol. Microbiol.* 5(9):2073-8.
- Misra, R. y Benson, S. A. (1988) "Genetic identification of the pore domain of the OmpC porin of *Escherichia coli* K-12". *J. Bacteriol.* 170(8):3611-7.
- Misra, R. y Benson, S. A. (1989) "A novel mutation, *cog*, which results in production of a new porin protein (OmpG) of *Escherichia coli* K-12". *J. Bacteriol.* 171(8):4105-11.
- Mizuno, T.; Kato, M.; Jo, Y. L. y Mizushima, S. (1988) "Interaction of OmpR, a positive regulator, with the osmoregulated *ompC* and *ompF* genes of *Escherichia coli*. Studies with wild-type and mutant OmpR proteins". *J. Biol. Chem.* 263(2):1008-12.
- Mizuno, T. y Mizushima, S. (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(7):1077-82.
- Nikaido, H. (1996). "Outer membrane". pp 29-47. En: Neidhart, F. C. (Ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella*. ASM press. Washington, D. C. EE. UU.
- Nikaido, H. (1992) "Porins and specific channels of bacterial outer membranes". *Mol.*

Microbiol. 6(4):435-42.

Norioka, S.; Ramakrishnan G.; Ikenaka, K. e Inouye, M. (1986) "Interaction of a transcriptional activator, OmpR, with reciprocally osmoregulated genes, *ompF* and *ompC*, of *Escherichia coli*". J. Biol. Chem. 261(36):17113-9.

Pang, T.; Levine, M. M.; Ivanoff, B.; Wain, J. y Finlay, B. B. (1998). "Typhoid fever--important issues still remain". Trends Microbiol. 6(4):131-3

Park, H.; Saha, S. K. e Inouye, M. (1998) "Two-domain reconstitution of a functional protein histidine kinase". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95(12):6728-32.

Pratt, L. A. y Silhavy, T. J. (1995a). "Porin regulon of *Escherichia coli*". pp. 105-126. En: Hoch, J. A. y Silhavy, T. J. (Eds.) Two-component signal transduction. ASM press. Washington, D. C. EE. UU.

Pratt, L. A.; Hsing, W.; Gibson, K. E. y Silhavy, T. J. (1996) "From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*". Mol. Microbiol. 20(5):911-7.

Pratt L. A. y Silhavy, T. J. (1995b) "Identification of base pairs important for OmpR-DNA interaction". Mol. Microbiol. 17(3):565-73

Puente, J. L.; Flores, V.; Fernandez, M.; Fuchs, Y. y Calva, E. (1987) "Isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*". Gene. 61(1):75-83.

Puente, J.L. Verdugo-Rodriguez, A. y Calva, E. (1991) "Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* OmpC is influenced differently by medium osmolarity; dependence on *Escherichia coli* OmpR". Mol. Microbiol. 5(5):1205-10.

Ramani, N.; Huang, L. y Freundlich, M. (1992) "In vitro interactions of integration host factor with the *ompF* promoter-regulatory region of *Escherichia coli*". Mol. Gen. Genet. 231(2):248-55.

Rampersaud, A.; Harlocker, S. L. e Inouye, M. (1994) "The OmpR protein of *Escherichia coli* binds to sites in the *ompF* promoter region in a hierarchical manner determined by its degree of phosphorylation". J. Biol. Chem. 269(17):12559-66.

Richter-Dahlfors A. A. y Finlay, B. B. (1998) "*Salmonella typhimurium* interactions with host cells". Medical Journal of Indonesia. 7 (S1): 65-73.

Roberts, D. L.; Bennett, D. W. y Forst, S. A. (1994) "Identification of the site of

phosphorylation on the osmosensor, EnvZ, of *Escherichia coli*". J. Biol. Chem. 269(12):8728-33.

Rosenshine, I. y Finlay, B. B. (1993) "Exploitation of host signal transduction pathways and cytoskeletal functions by invasive bacteria". Bioessays. 15(1):17-24

Russo, F. D. y Silhavy, T. J. (1991) "EnvZ controls the concentration of phosphorylated OmpR to mediate osmoregulation of the porin genes". J. Mol. Biol. 222(3):567-80

Sarma, V. y Reeves, P. (1977) "Genetic locus (*ompB*) affecting a major outer-membrane protein in *Escherichia coli* K-12". J. Bacteriol. 132(1):23-7.

Schmidt, M.; Zheng, P. y Delihias, N. (1995) "Secondary structures of *Escherichia coli* antisense *micF* RNA, the 5'-end of the target *ompF* mRNA, and the RNA/RNA duplex". Biochemistry. 34(11):3621-31.

Schultz, G. E. (1993) "Bacterial porins: structure and function" Curr. Opin. Cell Biol. 5: 701-707.

Sharif, T. R.; Igo, M. M. (1993) "Mutations in the alpha subunit of RNA polymerase that affect the regulation of porin gene transcription in *Escherichia coli* K-12". J. Bacteriol. 175(17):5460-8.

Slauch, J. M. y Silhavy, T. J. (1989) "Genetic analysis of the switch that controls porin gene expression in *Escherichia coli* K-12". J. Mol. Biol. 210(2):281-92.

Slauch, J. M.; Russo, F. D. y Silhavy, T. J. (1991) "Suppressor mutations in *rpoA* suggest that OmpR controls transcription by direct interaction with the alpha subunit of RNA polymerase". J. Bacteriol. 173(23):7501-10.

Tanaka, T.; Saha, S. K.; Tomomori, C.; Ishima, R.; Liu, D.; Tong, K. I.; Park, H.; Dutta, R.; Qin, L. et al. (1998) "NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ". Nature. 396(6706):88-92.

Tate, S.; Kato M.; Nishimura, Y.; Arata, Y. e Mizuno, T; (1988) "Location of DNA-binding segment of a positive regulator, OmpR, involved in activation of the *ompF* and *ompC* genes of *Escherichia coli*". FEBS Lett. 242(1):27-30.

Tokishita, S.; Kojima, A.; Aiba, H. y Mizuno, T. (1991) "Transmembrane signal transduction and osmoregulation in *Escherichia coli*. Functional importance of the periplasmic domain of the membrane-located protein kinase, EnvZ". J. Biol. Chem. 266(11):6780-5.

Tsung, K.; Brissette, R. E. e Inouye, M. (1989) "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(17):10104-9.

Waukau, J. y Forst, S. (1992) "Molecular analysis of the signaling pathway between EnvZ and OmpR in *Escherichia coli*". J. Bacteriol. 174(5):1522-7

Wurtzel, E.T.; Chou, M. Y. e Inouye, M. (1982) "Osmoregulation of gene expression. I. DNA sequence of the *ompR* gene of the *ompB* operon of *Escherichia coli* and characterization of its gene product". J. Biol. Chem. 257(22):13685-91.

Yang, Y. e Inouye, M. (1991) "Intermolecular complementation between two defective mutant signal-transducing receptors of *Escherichia coli*". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88(24):11057-61