

00591
6
A



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Instituto de Biotecnología
Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Elementos reguladores del gen *ompS1*
de *Salmonella typhi***

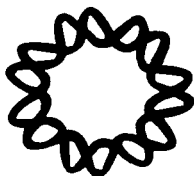
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Mario Alberto Flores Valdez



Cuernavaca, Morelos

Octubre, 2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

B

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo intelectual.
NOMBRE: Mano Alberto Flores Valdez

FECHA: 31 octubre / 2003
FIRMA: [Signature]

La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de vida de todo progreso.

Louis Pasteur

El hombre nunca sabe de lo que es capaz hasta que lo intenta.

Charles Dickens

C

El presente proyecto se realizó en el departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la asesoría del Dr. Edmundo Calva Mercado.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Edmundo Calva Mercado

Dr. Elda Guadalupe Espín Ocampo

Dr. David Romero Camarena

El jurado de tesis estuvo integrado por:

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos

Dr. Edmundo Calva Mercado

Dr. Dimitris Georgellis

Dr. Enrique Merino Pérez

Dr. Mario Soberón Chávez

Dr. Roberto Stock Silberman

Dra. María Brenda Valderrama Blanco

Durante el desarrollo de este trabajo recibí una beca-crédito del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. Registro 113352), y de la Dirección General de Estudios de Postgrado (DGEP) de la UNAM.

6

AGRADECIMIENTOS

A todos aquellas personas, familiares y amigos, con los que he tenido la ocasión de convivir y que han participado de alguna u otra manera en mi formación.

Al Dr. Edmundo Calva Mercado, por haberme brindado la oportunidad y libertad necesaria para ir desarrollando el presente proyecto. Por su tiempo invertido y los buenos ratos de humor brindados.

Al Dr. José Luis Puente García, quien participó activamente con sus consejos y críticas, en la consecución de los objetivos planteados. Gracias en especial, por el apoyo que me brindaste durante las épocas difíciles.

A los SPI: Olivia, Ricardo, Carmen, Irma y Marcos. A los LEE: Karol, Ulises, Víctor H., Nacho, Víctor A., Toño, Pancho y Miryam

Por su amistad, tiempo y valiosas opiniones

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo y Dr. David Romero Camarena, de quienes obtuve siempre buenas ideas para ir consolidando mi proyecto.

A los investigadores que participaron en la crítica y revisión de este escrito, Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos, Dr. Edmundo Calva Mercado, Dr. Dimitris Georgellis, Dr. Enrique Merino Pérez, Dr. Mario Soberón Chávez, Dr. Roberto Stock Silberman y Dra. María Brenda Valderrama Blanco. Sus observaciones sirvieron para mejorar lo realizado.

E

A mi nueva familia, Barba-León: Dr. Eduardo Barba, M. en C. Gloria Tello; Fabiola, Lalo y Alejandro, quien como yo, es un "nuevo" integrante. Gracias por su amistad y sincera hospitalidad, lo mismo que su apoyo tan necesario en algunos momentos.

Mi profundo agradecimiento a cada uno de los miembros de mi familia: a mi padre, Sr. Heliodoro Flores García (finado); a mi madre, Sra. Guadalupe Valdez de Flores, y a mis hermanos, Mirna Gpe. y José Alfredo...ha sido difícil estar lejos de ustedes, y a la vez muy grato encontrarnos de nuevo cada vez. Papá, ya no estarás entre nosotros físicamente para ver las tantas cosas que me faltan por hacer. Espero contar con tu apoyo, como en vida lo demostraste.

Especialmente a ti, Jenny. Soy sumamente afortunado de que estemos juntos. Mi amor para ti y mi eterno agradecimiento por todo lo que significas en mi vida. Espero retribuirte en algo todo lo bueno que me has brindado.

ÍNDICE GENERAL

TEMA	PÁGINA
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi, agente etiológico de la fiebre tifoidea	3
Las porinas, proteínas de membrana externa de bacterias Gram-negativas	4
Regulación de los genes de porinas por el operón <i>ompB</i>	7
El regulador global H-NS	10
Antecedentes	11
Objetivo General y Objetivos Específicos	14
Materiales y Métodos no publicados en el artículo	16
Resultados no publicados en el artículo	21
Discusión	33
Conclusiones	49
Perspectivas	50
Bibliografía	51
Anexo I. Artículo publicado en el <i>J. Bacteriol.</i> (2003). 185:22	

G

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

	PÁGINA
Arreglo de las porinas en la membrana externa	5
Modelo propuesto para la osmorregulación de porinas en <i>E. coli</i>	15
Fig. 1. Predicción de la curvatura intrínseca de la región de -310 pb del gen <i>ompSI</i>	21
Fig. 2. Expresión de <i>ompSI</i> en <i>Salmonella enterica</i>	22
Fig. 3. Papel de la fosforilación de OmpR en la expresión de <i>ompSI</i>	24
Fig. 4. El estado de fosforilación de OmpR afecta su capacidad de unión a <i>ompSI</i>	25
Tabla 1. Constantes de disociación aparentes de OmpR y OmpR-P	25
Fig. 5. La actividad del promotor P1 de <i>ompSI</i> depende de la presencia de OmpR fosforilado en D55	26
Fig. 6. Comparación de la expresión de <i>ompSI</i> versus <i>ompC</i>	28
Fig. 7. Expresión de <i>ompSI</i> en cepas de <i>E. coli</i>	30
Fig. 8. Perfil de digestión con DNasa I de pRO310 en cepas de <i>S. typhi</i>	32
Fig. 9. Representación de diferentes mecanismos de represión	37
Fig. 10. Mapa de las inserciones del marcador de resistencia a kanamicina por el transposón <i>mariner</i>	39
Tabla 2. Proteínas de la familia AraC o H-NS codificadas en el genoma de <i>S. enterica</i> serovar Typhi CT18	42
Fig. 11. Mecanismo propuesto para explicar el bajo nivel de expresión del gen <i>ompSI</i> de <i>S. typhi</i> en condiciones estándar de laboratorio	48

RESUMEN

H-NS resultó el silenciador de la expresión del gen *ompS1* de *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. typhi*). La expresión de la fusión *ompS1-lacZ* pRO310 (fusión de mínima actividad, que representa la máxima represión), fue 10 veces mayor en cepas *hns* respecto a las silvestres. A pesar de este aumento, ni la proteína OmpS1 ni el transcrito correspondiente alcanzaron nivel mayoritario. La reintroducción del gen *hns* en las mutantes correspondientes, restauró los bajos niveles de expresión observados en la silvestre. H-NS interactuó directamente con una región de curvatura intrínseca en *ompS1*, corriente arriba de -88 pb. H-NS impidió la transcripción tanto del promotor activado (P1) como del promotor reprimido por OmpR (P2). La expresión liberada de ambos promotores disminuyó en alta osmolaridad, efecto dependiente de la región corriente arriba de -88 pb, e independiente de OmpR. La eliminación de la región entre -105 y -135 pb, disminuyó la interacción de H-NS y el efecto negativo de la alta osmolaridad. *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli*, presentaron el mismo perfil de aumento de expresión de *ompS1* al recortarse la región reguladora, desde -310 hasta -88 pb, aunque el nivel absoluto en *S. typhi* fue dos veces mayor que en las otras bacterias. En una cepa *hns stpA*, se encontró el máximo nivel de expresión posible en *E. coli*. La sola eliminación de *stpA* no desreprimió a *ompS1*. P1 se activó a través de OmpR fosfato, el cual aumentó 72 veces su afinidad por las cajas de activación, I-II-III, respecto a OmpR. Contrario a OmpK37 de *K. pneumoniae*, que se induce ante la ausencia de OmpK35 y OmpK36, OmpS1 no se indujo en *S. typhi ompC ompF*. Se desconoce el estímulo para la inducción de *ompS1*, pero se proponen posibles efectores para conducir a la eliminación del efecto negativo de H-NS.

ABSTRACT

H-NS was identified as the repressor of *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. typhi*) *ompS1* porin gene expression. *Salmonella hns* mutants derepressed 10-fold the expression of the pRO310 *ompS1-lacZ* fusion (representing minimal activity and maximal repression), with respect to the wild type. Neither the OmpS1 protein nor the corresponding transcript reached major levels, in spite of the 10-fold derepression in the *hns* strains. Reintroduction of the *S.typhi* wild-type *hns* gene in the mutants restored the low-level of expression observed in the wild type. H-NS directly interacted with an upstream statically bent segment of the *ompS1* regulatory region. Both OmpR-dependent (P1) promoter, and OmpR-independent (P2) promoter transcription were silenced by H-NS, and were negatively regulated by high osmolarity, an effect dependent on the region upstream of -88 and independent of OmpR. A deletion, from -105 to -135 bp, with respect to the full length pRO310, resulted in decreased H-NS binding, and no osmoregulation. *S. typhi*, *S. typhimurium*, and *E. coli*, showed the same profile of *ompS1* expression, increasing it while shortening the regulatory region from -310 up to -88 bp, although the absolute level was two-fold higher in *S. typhi* than in the other strains. In an *hns stpA* strain, *ompS1* expression reached its maximal for an *E. coli* strain. In contrast, no derepression was observed in the *stpA* single mutant.

P1 was activated by OmpR phosphate, which enhanced 72-fold its binding affinity for *ompS1* activation boxes I-II-III, with respect to OmpR. In contrast to *K. pneumoniae* OmpK37, which is highly expressed in the absence of the OmpK35 and OmpK36, OmpS1 was not induced in a *S. typhi ompC ompF* strain. The stimuli needed to induce *ompS1* expression, are still unknown, but some potential effectors involved in relieving the H-NS effect are proposed.

INTRODUCCIÓN

***Salmonella enterica* serovar Typhi, agente etiológico de la fiebre tifoidea**

Salmonella enterica serovar Typhi (*S. typhi*) es una enterobacteria Gram-negativa, patógena, intracelular facultativa, que infecta específicamente al ser humano, causándole la fiebre tifoidea (Guthrie, 1992a).

La ruta de infección es a través del tracto gastrointestinal, por ingestión de agua o alimentos contaminados con heces u orina de individuos infectados. Típicamente, la enfermedad resulta evidente luego de una a dos semanas de incubación y se caracteriza por signos y síntomas tales como fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, dolores musculares y diarrea. La infección máxima generalizada ocurre luego de 7 a 10 días (Guthrie, 1992b).

La tasa mundial anual de fiebre tifoidea se estima en 17 millones de casos, de los cuales alrededor de 600 000 resultan fatales (página electrónica de la Organización Mundial de la Salud, <http://www.who.int/inf-fs/en/fact149.html>). Recientemente se han presentado brotes en Asia, Medio Oriente y América Latina, donde las cepas prevalentes son resistentes a cloramfenicol o bien a múltiples antibióticos (<http://www.who.int/inf-fs/en/fact149.html>). Inclusive, el genoma de una de tales cepas resistentes a múltiples antibióticos, la CT18, proveniente de un brote epidémico de Vietnam, ha sido completamente secuenciado (Parkhill *et al.*, 2001); además, recientemente se obtuvo la secuencia completa del genoma de otra cepa, la Ty2 (Deng *et al.*, 2003). En México, la incidencia ha declinado más del 40% desde 1988. En 1996, se presentaron cerca de 10 casos por cada 100, 000 habitantes, con una tasa de mortalidad menor o igual al 1% (Calva y Calva, 1998).

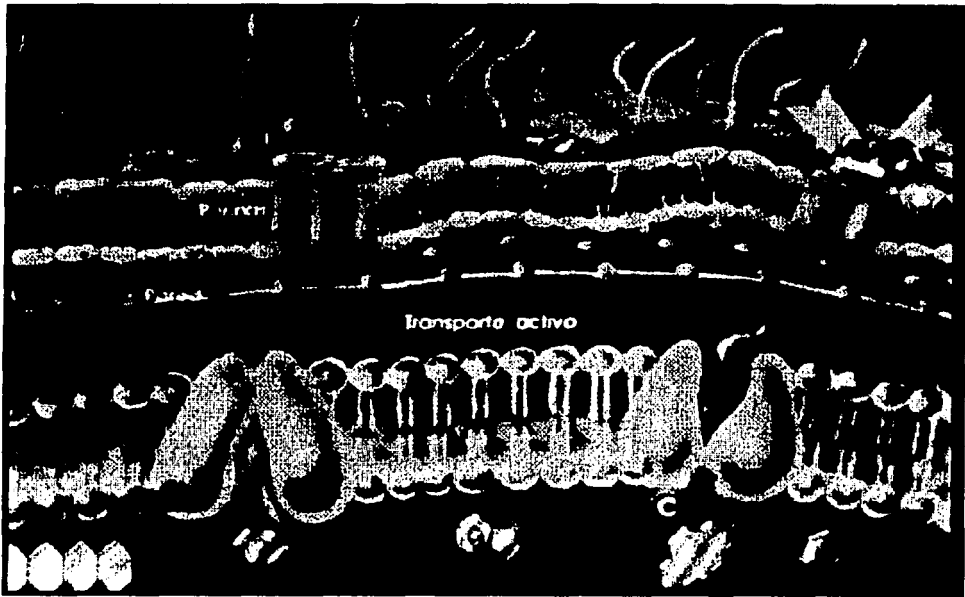
Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) produce en ratones una enfermedad similar a la fiebre tifoidea de humanos. Merced a ello, se han realizado diversos estudios en los que se analiza la relación entre esta bacteria y las células hospedantes. Con ello, se han caracterizado genes que se expresan en mayor abundancia una vez que las bacterias están dentro del ratón, ya sea por las metodologías conocidas como IVI (In Vivo Induced, por sus siglas en inglés) o IVET (In Vivo Expressed Technology) (Mahan *et al.*, 1995; Heithoff *et al.*, 1997). Estudios de la interacción entre la bacteria y células eucariontes en cultivo, han permitido identificar diversas moléculas que la bacteria transloca a la célula eucarionte, moléculas que son responsables de cambios en las vías de transducción de señales (revisado en Zhou y Galán, 2001). Además, se conocen ya algunos de los mecanismos que *Salmonella enterica* spp. utiliza para poder sobrevivir y proliferar dentro de las células hospedantes (revisado en Groisman y Muslin, 2000).

Actualmente, a la puerta de la era genómica y con la secuencia completa de dos cepas de *S. typhi*, la CT18 y Ty2, como una de *S. typhimurium*, la LT2 (Parkhill *et al.*, 2001; McClelland *et al.*, 2001), será cada vez más factible utilizar esta información para explicar en mayor detalle la especificidad de hospedante exhibida por algunos de los miembros de este género, así como los mecanismos que les permiten adaptarse a diferentes nichos o aun modelar de manera distinta su proceso de infección.

Las porinas, proteínas de membrana externa bacterias Gram-negativas

Salmonella typhi, como bacteria Gram-negativa, posee una membrana interna y una externa, separadas por el periplasma. La membrana externa cuenta con macromoléculas lipídicas y proteicas. Dentro de los lípidos se encuentran dos tipos: fosfolípidos y

lipopolisacáridos (LPS). En *Escherichia coli*, *Salmonella* y especies relacionadas, la distribución de estas moléculas es asimétrica, donde los fosfolípidos se orientan hacia el interior, en tanto que los LPS lo hacen hacia el exterior. Dentro de la matriz lipídica se pueden encontrar varias clases de proteínas: la lipoproteína mureína, los canales específicos, los receptores de alta afinidad y las porinas.



Las proteínas de membrana externa de *Escherichia coli* conocidas como porinas, que se expresan principalmente en condiciones estándar de laboratorio son OmpC y OmpF. Además de éstas, PhoE puede llegar a ser mayoritaria en condiciones de ayuno de fosfatos. Como el nombre lo sugiere, las porinas forman poros, a través de los cuales se establece el intercambio de solutos hidrofílicos (nutrimentos y sustancias de desecho) entre la bacteria y el medio que la rodea.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dentro de las propiedades que las porinas, se encontró que proteínas de este tipo, purificadas a partir de *S. typhimurium*, aceleraron *in vitro* la coagulación de sangre humana (DiMicco *et al.*, 2001). Además, en el caso de OmpC, se ha demostrado su participación como receptor de los bacteriófagos Gifsy-1 y Gifsy-2 (Ho y Slauch, 2001), lo que habla de la variedad de funciones que desarrollan estas proteínas en la bacteria. Por otra parte, debido a su gran cantidad de moléculas en la membrana externa (10^5 por célula), las porinas son de las proteínas más abundantes, ya que constituyen hasta el 2% de la proteína total (Nikaido, 1996).

En términos generales, las porinas forman trímeros, con un límite de exclusión de 600 Da. No obstante, existen diferencias entre ellas, como el tamaño de poro (1.16 vs 1.08 nm de OmpF respecto a OmpC) y la ligera selectividad hacia iones (cationes para OmpC y OmpF y, en contraste, aniones para PhoE) (Benz, 1988; Nikaido, 1992; Schultz, 1993).

La cadena polipeptídica de las porinas atraviesa la membrana en 16 ocasiones, como hojas β antiparalelas, y forma una estructura de barril que da lugar al poro. Los segmentos transmembranales están conectados, en el exterior de la bacteria, por asas o vueltas largas, mientras que en lado periplásmico se unen por giros o vueltas cortas. En el caso concreto de OmpF, se definió que la tercera asa externa se pliega hacia dentro del poro y lo obstruye parcialmente. Por otro lado, se ha propuesto que la segunda asa se dobla hacia afuera, para interactuar con el monómero vecino y así estabilizar el trímero (Cowan *et al.*, 1992).

Además de los genes de las porinas mayoritarias, *Escherichia coli* posee genes que codifican para porinas que se expresan a bajos niveles, en condiciones de laboratorio, como son *nmpC* y *ompN* (Prilipov *et al.*, 1998); o cuya expresión se induce cuando la bacteria crece en maltodextrinas, como *ompG* (Misra y Benson, 1989). En *S. typhimurium*, se ha descrito otra gen de porina mayoritaria, *ompD*, a cuya proteína codificada en éste se le ha atribuido la capacidad de formar un complejo exportador de aminos cuaternarias (Santiviago *et al.*, 2002).

En lo que respecta a *Salmonella typhi*, la bacteria que se estudia en nuestro laboratorio, se han clonado y secuenciado los genes que codifican para OmpC, OmpF, PhoE, y las porinas quiescentes OmpS1 y OmpS2 (Puente *et al.*, 1987; Fernández-Mora *et al.*, 1995; Oropeza *et al.*, 1999).

En *Klebsiella pneumoniae* se encuentra otra porina de baja expresión en el laboratorio, codificada por el gen *ompK37* (cuya proteína comparte 71% de identidad y 84.5 % de similitud con OmpS1 de *Salmonella*). Este gen expresa una proteína presente en muestras clínicas aisladas de cepas resistentes a β -lactámicos; pero no en cepas susceptibles a tales antibióticos, las cuales expresan OmpK35 (homóloga de OmpF) y OmpK36 (homóloga de OmpC) como porinas mayoritarias (Doménech-Sánchez *et al.*, 1999).

Regulación de los genes de porinas por el operón *ompB*

El criterio de abundancia de las porinas está dado por la cantidad que se observa una vez que las bacterias se han cultivado en medios de uso común en el laboratorio. Este estudio permitió conocer que factores como el pH, la temperatura, la presencia de sustancias tóxicas o nutrientes, la fase de crecimiento y la osmolaridad, afectan la expresión de las porinas (Pratt *et al.*, 1996).

El mecanismo de regulación de la expresión de los genes de porinas en respuesta a la osmolaridad es el más ampliamente estudiado. En *Escherichia coli*, cuando la osmolaridad es baja se expresa preferentemente OmpF; en tanto, cuando se incrementa la osmolaridad, OmpF se reprime y se sintetiza preferentemente OmpC (Pratt y Silhavy, 1995). Presuntamente, el medio de baja osmolaridad simularía una condición pobre en nutrientes, por lo cual la bacteria tendría alguna ventaja al expresar una proteína de poro más grande, como es OmpF.

La bacteria regula la expresión de sus porinas en respuesta a estímulos ambientales como la osmolaridad, con la participación del operón *ompB* (*ompR-envZ*), que es necesario para la activación de los genes *ompC* y *ompF*, y que se requiere para la osmorregulación recíproca de estos genes en *Escherichia coli* (Sarma y Reeves, 1977; Wurtzel *et al.*, 1982). EnvZ, es la proteína detectora del sistema (450 aminoácidos). Tiene actividad de autocinasa dependiente de ATP, de cinasa para OmpR y fosfatasa de OmpR fosforilado, en donde las funciones enzimáticas residen en su dominio citoplasmático (Roberts *et al.*, 1994). Este dominio se subdivide en el dominio A (aminoácidos 223-289), que contiene el sitio de autofosforilación (His 243), y en el dominio B, donde se une ATP y reside el centro activo de cinasa de OmpR y de autofosforilación (Park *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1998).

OmpR es la proteína reguladora de respuesta (239 aminoácidos). Posee dos dominios, el amino terminal, donde es fosforilada por EnvZ en el Asp 55, y el dominio carboxilo, que le sirve para unirse al DNA, para interactuar consigo misma y con el carboxilo terminal de la subunidad α de la RNA polimerasa (Tate *et al.*, 1988; Tsung *et al.*, 1989; Igarashi *et al.*, 1991; Slauch *et al.*, 1991; Shariff e Igo, 1993).

Diversos estudios demostraron que la fosforilación de OmpR incrementa su afinidad por el DNA (Aiba *et al.*, 1989; Forst *et al.*, 1989; Head *et al.*, 1998). También se conoce que el aumento en la osmolaridad del medio ocasiona incrementos en el nivel de OmpR fosforilado en *Escherichia coli* sin que se conozca si este incremento es producto de un aumento en la cantidad de OmpR o a mayores eventos de fosforilación (Forst *et al.*, 1990). Recientemente, se ha determinado que la producción de OmpR se incrementa por un factor aproximado de 1.8 en condiciones de alta osmolaridad (Cai e Inouye, 2002; Batchelor y Goulian, 2003).

Los datos anteriores han permitido proponer un modelo para explicar la regulación recíproca de la expresión de los genes de las porinas mayoritarias en respuesta a la

osmolaridad, que se muestra en el esquema de la página 15. Así, se postula que cuando la osmolaridad del medio es baja, también lo es el nivel de OmpR fosforilado; condiciones en las que se uniría a sitios de alta afinidad en la región reguladora de *ompF* para activar su transcripción. Cuando la osmolaridad es alta aumentaría entonces la proporción de OmpR fosforilado, de manera que ahora se saturarían los sitios de alta afinidad en *ompF* y habría unión a sitios de baja afinidad en el mismo *ompF* y en *ompC*, conduciéndose a la represión y activación de la transcripción de cada uno, respectivamente (Norioka *et al.*, 1986; Mizuno *et al.*, 1988; Mizuno y Mizushima, 1990; Russo y Silhavy, 1990; Cai e Inouye, 2002). De acuerdo a este modelo, se hace necesaria la presencia de sitios de distinta afinidad para la unión de OmpR fosforilado en *ompF* y *ompC*. Así mismo, sería necesario que OmpR fosforilado tuviera al menos 20 veces más afinidad por la región reguladora de *ompF* que por su contraparte en *ompC*.

Si bien dos grupos identificaron la existencia de un sitio de baja afinidad para OmpR en la región reguladora de *ompF*, presuntamente involucrado en la represión asistida por IHF, estudios adicionales han dado evidencia de que la fosforilación de OmpR, si bien resulta en un incremento en su afinidad por el DNA tanto de *ompF* como de *ompC*, la diferencia en tal incremento de afinidad para ambos genes no sería suficiente para explicar el proceso de osmorregulación (Huang e Igo, 1994; Rampersaud *et al.*, 1994; Head *et al.*, 1998).

Inclusive, OmpR sin fosforilar es más afín hacia las cajas de activación en *ompC* que hacia las de *ompF*; en tanto que OmpR fosforilado es sólo 2 veces más afín por las cajas de activación en *ompF* que por las de *ompC*, a la vez que no se pudo obtener una medición de la afinidad de OmpR u OmpR fosforilado hacia la caja involucrada en la represión. En este sentido, se estima que la unión a la presunta caja de represión en *ompF* sería consecuencia de la interacción inicial en otros sitios y su posterior unión a tal sitio (Head *et al.*, 1998). Lo que

si resulta claro es que la región corriente arriba de las cajas de activación en *ompF* son necesarias para la represión en alta osmolaridad (Huang e Igo, 1994; Rampersaud *et al.*, 1994), sin que esté bien establecido si el sitio de baja afinidad interviene efectivamente en la osmorregulación.

En lo que respecta a *Salmonella typhi*, se conoce que OmpC no se osmorregula, aunque su expresión sí depende de OmpR (Puente *et al.*, 1991). Con el fin de esclarecer el papel del operón *ompB* en la expresión de este gen, se aisló este locus y se generó una mutante en *S. typhi* (Martínez-Flores *et al.*, 1995; Martínez-Flores *et al.*, 1999). Experimentos de complementación recíproca con los operones *ompB* de *E. coli* y *S. typhi*, hacia las mutantes de cada cepa, revelaron que para obtener la misma regulación de OmpC respecto a la osmolaridad, era necesario un factor distinto de *ompB* (Martínez-Flores *et al.*, 1999).

El regulador global H-NS (Histone-like Nucleoid Structuring protein)

Un regulador global implicado en la respuesta a cambios en la osmolaridad es la proteína H-NS (Histone-like Nucleoid Structuring protein), que además de ayudar a mantener la estructura del nucleóide bacteriano, ha sido implicada en la respuesta a variedad de estímulos ambientales, tales como el ayuno, cambios de pH y temperatura (Atlung e Ingmer, 1997; Williams y Rimsky, 1997; MacLeod y Johnson, 2001), condiciones que afectan también la expresión de las porinas. El gen *hns* se autorregula, se estimula por la proteína de choque frío CspA y por el regulador global Fis, y su expresión se origina a partir de un solo promotor (Dersch, Schmidt y Bremer, 1993; Johansson y Uhlin, 1999). La proteína codificada en este gen posee 136 aminoácidos y se ha dividido en dos dominios funcionales separados por un conector flexible: un dominio de unión a DNA, situado hacia el extremo carboxilo; otro de

oligomerización, importante para la actividad de represión por parte de H-NS, situado hacia el extremo amino (Esposito *et al.*, 2002).

Las interacciones proteína-proteína que establece H-NS consigo misma son importantes para la regulación por ésta. Además, se ha demostrado que H-NS es capaz de interactuar con su parólogo StpA (Johansson *et al.*, 2001) y que dicha interacción es importante para otorgarle un papel modulador a StpA en la regulación del operón *bgl* de *E. coli* por formas truncadas de H-NS (Free *et al.*, 2001). Recientemente se ha determinado que H-NS presenta interacción con proteínas de la familia Hha/Ymo, colaborando en la regulación de la expresión de la toxina α -hemolisina de *E. coli* (Nieto *et al.*, 2002).

H-NS se encuentra de forma abundante en la célula, ya que se estima que existen alrededor de 20,000 moléculas de esta proteína durante la fase exponencial de crecimiento, las cuales se distribuyen de manera uniforme en el nucleoide. Se sabe que H-NS no posee una gran afinidad por una secuencia específica, y que parece reconocer más bien la estructura formada por trechos ricos en el dinucleótido AT en el DNA (Azam, Hirata e Ishihama, 2000; Dame *et al.*, 2001; Rimsky *et al.*, 2001).

ANTECEDENTES

El estudio de los genes de porinas de *S. typhi* permitió el aislamiento de *ompS1*, gen que bajo el control de su promotor nativo, presentó niveles de expresión muy bajos en medios de cultivo estándar, a pesar de estar dentro de un plásmido de mediano número de copias. En el mismo estudio se comprobó que el gen estructural codifica para una proteína de membrana externa, al poner la región codificante de la proteína bajo el control de un promotor inducible (triptófano-lactosa: *tac*); inclusive, la expresión de *OmpS1* a partir del promotor *tac* fue similar

a la obtenida con el recorte de parte de la región reguladora 5' de *ompS1*, donde se tenían 269 pb de la región reguladora (Fernández-Mora *et al.*, 1995).

Para analizar más en detalle el papel que jugaba la secuencia corriente arriba en la expresión de *ompS1*, se construyó una serie de fusiones traduccionales entre diferentes longitudes de la región reguladora 5' de *ompS1* con el gen reportero *lacZ*, originándose la serie de plásmidos pRO, con la que se logró definir la región mínima que contiene los elementos para mantener el silenciamiento del gen (-310 pb corriente arriba del inicio de la transcripción, identificado en la cepa silvestre), así como delimitar dos grandes zonas de control de la expresión de este gen: una de control negativo (entre -310 pb y -88pb) y otra de control positivo (corriente abajo de -88 pb) (Oropeza *et al.*, 1999).

En este mismo trabajo, se identificaron seis sitios de unión para OmpR, a diferencia de la presencia de tres y cuatro sitios, presentes en *ompC* y *ompF*, respectivamente. Se descubrió que *ompS1* posee dos sitios de inicio de la transcripción, uno dependiente de OmpR (P1) y otro independiente de OmpR (P2).

Debido a la localización de los sitios consenso de -35 y -10 para la interacción con la RNA polimerasa en el promotor P2, que se encuentran incluidos dentro de la caja II de unión para OmpR, P2 sólo se activó en ausencia del operón *ompB*. De este modo, la regulación del gen *ompS1* resultó novedosa en el estudio de los mecanismos que controlan la expresión de genes de porinas, toda vez que el mismo regulador activa la expresión de un promotor, y simultáneamente reprime la expresión de otro en el mismo gen (Oropeza *et al.*, 1999), lo que contrasta aun con el papel propuesto para la represión de *ompF* por OmpR, donde el efecto ocurre sobre un único promotor (Inokuchi *et al.*, 1984).

Por otra parte, con el propósito de definir si alguna de las señales que regulan la expresión de los genes de porinas *in vitro*, afectaba la expresión de *ompS1*, se ensayaron

diferentes modificaciones a un medio de cultivo rico (caldo nutritivo). Así, en dicho medio se experimentaron, por separado, condiciones como alta osmolaridad (0.4 M NaCl), choque térmico (42°C ó 25 °C), estrés oxidativo (H₂O₂, 125 ó 300 µM), cambios de pH (entre 5-8) o choque ácido (hasta 3.3), anaerobiosis o polimixina B (0.625 a 5 µg/mL). Ninguna de ellas afectó el bajo nivel de expresión de *ompS1*, medido a partir de la fusión pRO310 en la cepa silvestre *S. typhi* IMSS-1 (Oropeza *et al.*, 1999).

Recientemente, y a pesar del bajo nivel de expresión de *ompS1*, gracias al análisis por microarreglos de todos los marcos de lectura abierta de *S. enterica*, se determinó que el estrés oxidativo (1mM H₂O₂) disminuye al 50% la expresión de *ompS1* después de 1 hora de la adición del H₂O₂. Una respuesta similar se observó para la expresión de *ompF*, en tanto que la de *ompC* no tuvo cambio significativo (Porwollik *et al.*, 2003). Para *ompF*, la disminución más evidente ocurrió a los 30 minutos, cuando la expresión disminuyó al 20% de la ocurrida en la cepa sin H₂O₂; para *ompS1*, la caída máxima fue cercana al 30% de la cepa no tratada, presentándose este efecto a los 10 minutos (Porwollik *et al.*, 2003).

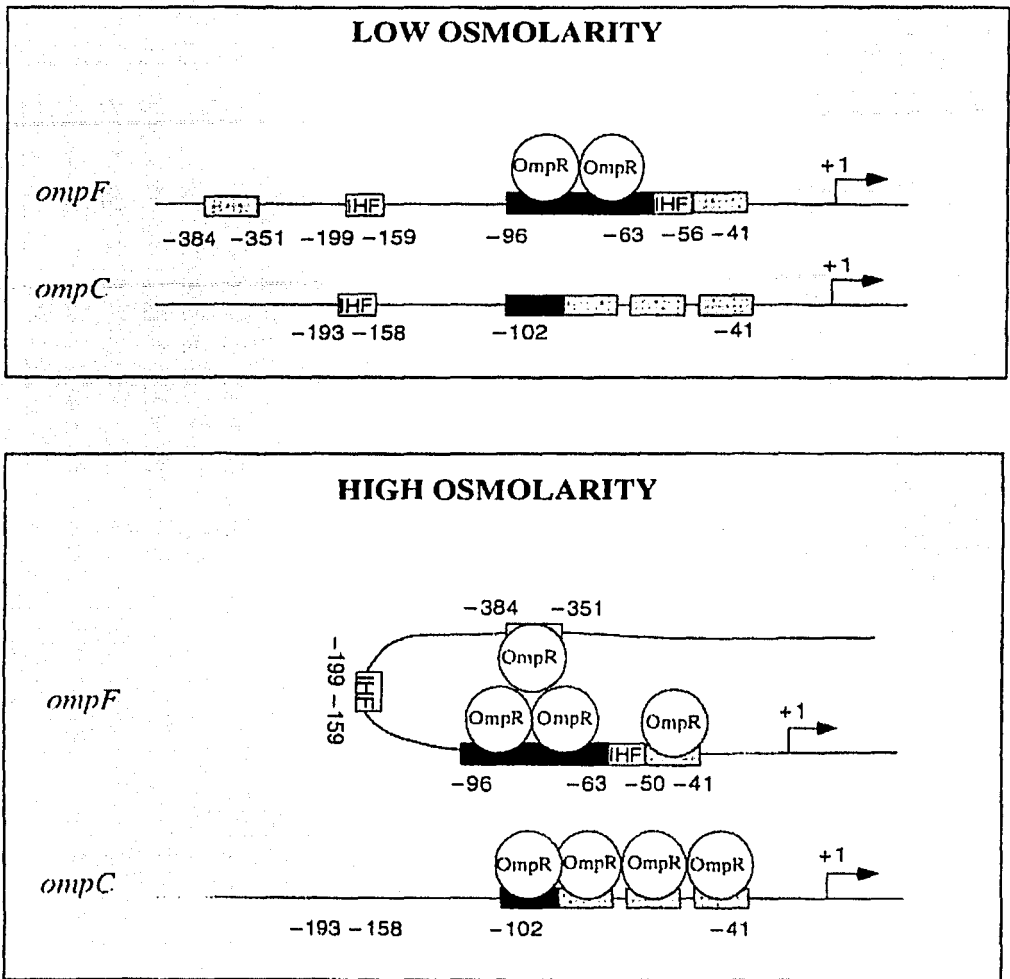
Ahora bien, a pesar de los bajos niveles de expresión de *ompS1*, observados *in vitro*, en las cepas silvestres de *Salmonella enterica*, es probable que la proteína pueda cumplir su función con tales niveles, lo que falta todavía es explorar la búsqueda de una molécula que funcione para contrarrestar el efecto negativo de H-NS. La funcionalidad de OmpS1 durante el ciclo de vida de *Salmonella* se deduce de conocer que la interrupción del gen en *S. typhimurium* disminuye la capacidad de la bacteria para formar biofilms, disminuye el movimiento tipo swarming y resulta en el incremento de la dosis letal media hacia ratones (Toguchi *et al.*, 2000, Mireles *et al.*, 2001, Rodríguez Morales *et al.*, datos no publicados).

OBJETIVO GENERAL

Contribuir en el establecimiento de un modelo de regulación para el gen *ompSI* de *Salmonella typhi*, para tratar de explicar su bajo nivel de expresión en condiciones de crecimiento estándar en el laboratorio.

Objetivos específicos

1. Identificar el o los factores involucrados en la regulación negativa de *ompSI*.
2. Definir la posibilidad de interacción proteína-DNA para el regulador negativo con la región reguladora de *ompSI*, y en su caso, la localización de la misma.
3. Proponer un modelo donde se involucren los factores reconocidos como reguladores del gen *ompSI*.



Regulación transcripcional de *ompC* y *ompF* mediada por OmpR. En condiciones de baja osmolaridad, OmpR-P se une a sitios de alta afinidad en el promotor de *ompF* y activa su transcripción. En alta osmolaridad, OmpR-P se une a sitios de alta y baja afinidad en ambos promotores, lo que activa la transcripción de *ompC* y reprime la de *ompF*. La represión de *ompF* se facilita por el doblamiento en el DNA vía IHF. No se conoce el estado de oligomerización de OmpR-P ni el número de moléculas de OmpR-P que se unen a cada sitio. Las cajas claras simbolizan sitios de baja afinidad, las cajas oscuras representan sitios de alta afinidad para la unión de OmpR (Tomado de Pratt *et al.*, 1996).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A continuación se presentan, como secciones separadas, los materiales y métodos, así como los resultados que no se incluyeron en el artículo publicado (*J. Bacteriol.* 2003. **185**:22). Éste se incluye como la versión de las pruebas de galera, por lo que no se anotan las páginas en las que habrá de aparecer en la revista.

MATERIALES Y MÉTODOS NO PUBLICADOS EN EL ARTÍCULO

Subclonación del gen que codifica para OmpRD55A. Se digirieron los plásmidos pFR29 (que contiene el gen para OmpR D55A) y pMPMA3 (vector, origen de replicación p15A) con las endonucleasas de restricción *XbaI* y *HindIII*. Luego se ligaron ambos fragmentos, y se transformó la ligación en *Escherichia coli* XL-1 Blue (Stratagene). Se seleccionaron las clonas recombinantes por resistencia a carbenicilina (100 µg/mL). Luego, se extrajeron los plásmidos recombinantes por el método de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001) y se caracterizaron por una doble digestión con *XbaI* y *HindIII*.

Ensayos de anisotropía de fluorescencia. Se realizaron esencialmente como está descrito en Head *et al.* (1998). Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, por la titulación de diluciones seriadas de proteína en una solución de unión que contiene: 5mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7.4), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.05% (v/v) Tween-20, 25 µg/ml poly[d(I-C)], 50 µg/ml de albúmina sérica bovina y 2 nM de un oligonucleótido de doble cadena marcado con fluoresceína y que abarca las cajas I-II-III de *ompS1*. El oligo de la cadena sentido (*ompS1aF*), marcado en su extremo 5' con fluoresceína, se alineó con el oligo de la cadena antisentido (*ompS1B*), después de calentarlos a 90°C y dejarlos enfriar lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente. El oligo fluorescente de doble cadena se excitó a 490nm y la emisión se midió a 530nm en un fluorímetro Beacon (PanVera). Las muestras se incubaron por períodos de 30 segundos y se tomaron varias lecturas en intervalos de 10

segundos después de la adición de proteína. Ambos oligos se obtuvieron de Genosys Biotechnologies.

Construcción de la mutante *ΔompR* de *S. typhi*. La eliminación específica e intercambio del gen *ompR* por un gen de resistencia a cloramfenicol se realizó de acuerdo a la estrategia de mutagénesis con productos de PCR descrita por Datsenko y Wanner (2000), realizando la reacción de PCR con los oligonucleótidos ompR5'-P1 (alinea entre +7 a -46 respecto al sitio de inicio de la traducción de *ompR* de *S. typhi*) y ompR3'-P2 (alinea entre +733 a +695 respecto al sitio de inicio de la traducción de *ompR* de *S. typhi*), para obtener el producto mutagénico de PCR a partir del plásmido pKD3. Esta mutante la construyó Marcos Fernández Mora.

Clonación del gen *ompR* silvestre. El gen *ompR* silvestre se amplificó con los oligonucleótidos ompR5'-B y ompR3'-I primers (Tabla 2 del artículo) según lo descrito (Fernández-Mora *et al.*, en preparación). Este producto se digirió con *Bam*HI y se clonó en los sitios *Bam*HI/*Eco*RV del vector pACYC184, para crear el plásmido pFM2000 (Cm^r).

Clonación del gen *hns* silvestre de *Salmonella typhi*. Éste se amplificó por PCR con la enzima Expand (Boehringer Manhein Inc.) y se clonó en el vector pACYC184 (New England Biolabs). Se usó como templado el DNA cromosómico de *S. typhi* IMSS-1, aislado con un estuche comercial (Aqua Pure Genomic DNA Isolation kit, BioRad). Para la amplificación por PCR se utilizaron los oligonucleótidos Lfhns-S (alinea entre -538 a -513 del sitio de inicio de la traducción de *hns* de *S.*) y RRhns-X (alinea entre +630 a + 604 del sitio de término de la traducción) (Tabla 2 del artículo). El fragmento de 1584 pb PCR se digirió y clonó en los sitios *Sal*I / *Xba*I, para originar el plásmido phnsty184.

Eliminación parcial del gen de tetraciclina del plásmido pACYC184. El plásmido pACYC184 se digirió con *Nru*I y *Eco*RV para generar extremos romos y remover el fragmento

entre las posiciones 1679 a 214 (*Tet^r* está entre 1580-227). El plásmido se religó y transformó pro electroporación en *E. coli* MC4100. Los plásmidos que perdieron la resistencia a tetraciclina se caracterizaron por digestión con endonucleasas de restricción. Esto originó el plásmido pACYC184ΔTc.

Construcción de las fusiones traduccionales *ompSI-lacZ* para evaluar el papel de *stpA* en la expresión de *ompSI*. Se subclonó el fragmento *SaI*I de las fusiones traduccionales *ompSI-lacZ* que está en los plásmidos pRO310 y pRO88 en el mismo sitio del vector pACYC184 , para originar los plásmidos pFV5 y pFV4, respectivamente, que portan la fusión en un vector Cm^r.

Construcción de las fusiones transcripcionales *ompSI-cat*. Se amplificaron por PCR con los oligonucleótidos S1B-CAT5 (5'-ggtcgacggatccggggaat-3', alinea entre 3614-3633 en la serie pRO) y S1S-CAT3 (5'- caagcaggtcgacatctttctgttcat-3', alinea en posición variable, dependiendo del pRO utilizado) los fragmentos equivalentes a -310 y -88 pb de *ompSI* a partir de pRO310 y pRO88, respectivamente. Los productos de PCR , al igual que el vector pKK232-8, se digirieron con *Bam*HI/*SaI*I y posteriormente se ligaron. Después de transformar y seleccionar las clonas candidatas, los plásmidos se extrajeron y enseguida se caracterizaron por digestión con *Bam*HI/*SaI*I para luego secuenciarlos. Así, se originaron los plásmidos pKFV310 y pKFV88, respectivamente.

Ensayos de protección a DNasa I in vivo. El proceso consiste en permeabilizar las células bacterianas, que contienen el plásmido con el gen a analizar, para enseguida someterlas a tratamiento con DNasa I. Posteriormente se hace una extracción del DNA plasmídico y éste se somete a amplificación por PCR. Se comparan los patrones obtenidos entre la cepa silvestre y cepas mutantes isogénicas para la proteína a analizar. Se siguen los pasos:

1. Centrifugar 3-5 mL del cultivo de cada cepa en la fase de crecimiento logarítmica. Guardar las pastillas a -20°C hasta reunir todas las muestras.
2. Lavar con 500 μL de PBS 1X pH 7.4 y centrifugar a 10 000 rpm, temperatura ambiente 1 minuto. Luego, resuspender en 100 μL de solución I (sacarosa 150 mM, KCl 80 mM, HEPES 35 mM pH 7.4, MgCl_2 5 mM y CaCl_2 2 mM) con 0.25% de Nonident P-40.
3. Incubar 3 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar 1 minuto a 6500 rpm y decantar el sobrenadante.
4. Añadir 50 μL de solución I con 2 U/ μL de DNasa I a cada tubo y mezclar bien. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 6500 rpm, 1 minuto, y desechar el sobrenadante.
6. Extraer los plásmidos por columna. Resuspender el DNA extraído en 8-10 μL de agua milliQ esterilizada.

Después del proceso de extracción del plásmido, se realiza una reacción de PCR en 10 μL de volumen total, ajustándose las cantidades de cada reactivo como se usa comúnmente.

Amplificación por PCR de los productos de la digestión con DNasa I. Para oligonucleótidos con una T_m cercana a 60°C , el siguiente programa funciona muy bien en un termociclador Perkin Elmer modelo DNA Thermal Cycler 480.

(1) 2 min, 92°C , (2) 1.5 min, 94°C , (3) 3 min, 60°C , (4) 3 min, 70°C (2 ciclos del paso 2 al 4); (5) 1 min, 94°C , (6) 2 min, 58°C , (7) 3 min, 70°C (2 ciclos del paso 5 al 7); (8) 1 min, 95°C , (9) 1.5 min, 56°C , (10) 2.5 min, 70°C (15 ciclos del paso 8 al 10); (11) 1 min, 95°C , (12) 4 min, 57°C , (13) 4 min, 70°C (2 ciclos del paso 11 al 13); (14) 1 min,

94°C, (15) 4 min, 59°C, (16) 4 min, 70°C (2 ciclos del paso 14 al 16); (17) 1 min, 94°C, (18) 4 min, 60°C, (19) 4 min, 70°C (15 ciclos del paso 17 al 19); (20) 10 min, 70°C.

Al producto de PCR se le agrega la mezcla de colorantes para secuencia. Se cuantifican en el contador de centelleo y se ajusta el número de cuentas por minuto (cpm) para cargar el equivalente a 200 000 cpm por carril en un gel secuencia al 8%, que se procesa como se ha descrito para los geles de primer extension.

RESULTADOS NO PUBLICADOS EN EL ARTÍCULO

La región reguladora de *ompSI* presenta curvatura intrínseca. Además de los datos publicados, se incluyen algunos resultados adicionales, dado que podrían ser la base de futuros estudios sobre los mecanismos que regulan la expresión de *ompSI*. En la figura 1 se muestra la predicción de la curvatura intrínseca para la región reguladora de *ompSI*, calculada de acuerdo a los parámetros de Goodsell y Dickerson (1994). La curvatura se calcula como el ángulo (en grados) formado por cada vuelta de hélice (10.5 pb) en el DNA; valores de 10 o más grados por vuelta de hélice predicen una estructura intrínsecamente curva. En este sentido, para la región reguladora de *ompSI* se predicen dos regiones de curvatura intrínseca; una, de aproximadamente 11 grados, situada corriente arriba de la caja IV de OmpR, mientras la segunda, cercana a los 13 grados, se centraría sobre la caja IV de unión para OmpR.

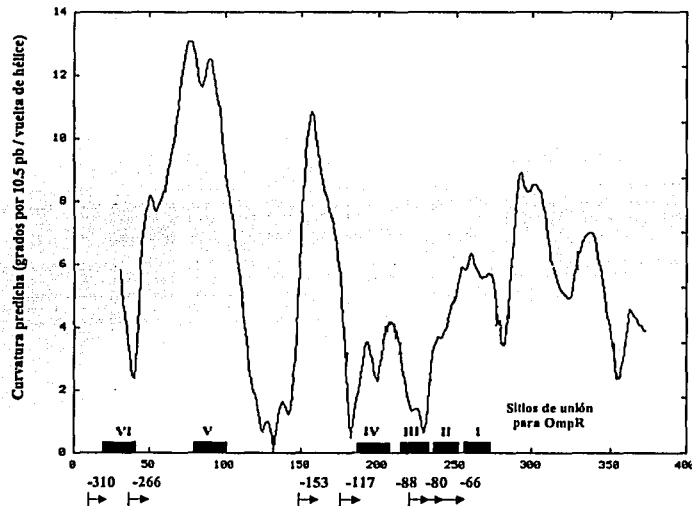


Figura 1. Predicción de la curvatura intrínseca de la región de -310 pb del gen *ompSI*. Las cajas negras representan los sitios de pegado de OmpR. Se muestra la posición relativa de cada una de las fusiones de la serie pRO.

Expresión de *ompS1* en *Salmonella enterica*. En la figura 2 se muestra la comparación del perfil de expresión de las fusiones traducciónales *ompS1-lacZ* entre *S.typhi* IMSS-1 y *S. typhimurium* 14028s. Como se puede apreciar, el nivel de expresión en *S. typhimurium* es la mitad de lo que se observa en *S. typhi*. Como ocurre en *S. typhi*, en *S. typhimurium* se reproduce la liberación de la expresión de *ompS1* conforme se va eliminando la región 5' corriente arriba, hasta alcanzar la máxima expresión el recorte de 88 pb.

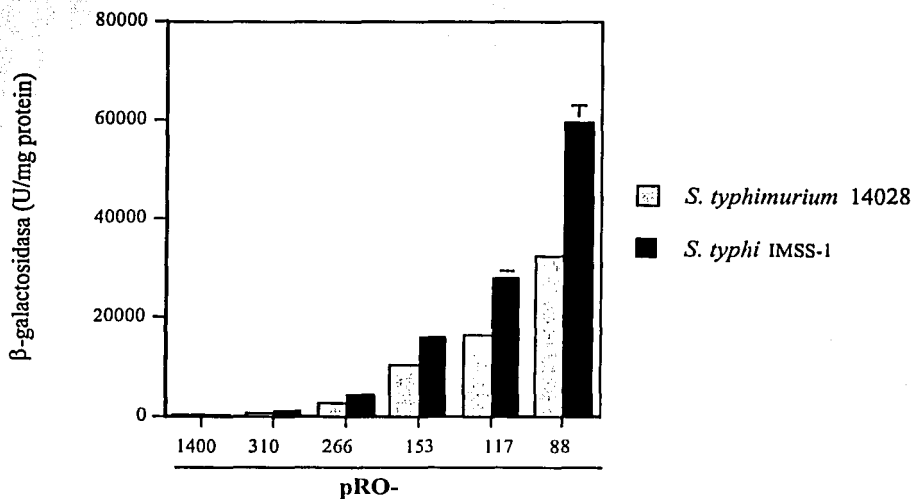


Figura 2. Expresión de *ompS1* en *Salmonella enterica*. Ambas *Salmonellae* son cepas silvestres, transformadas con las fusiones traducciónales de la serie pRO (Oropeza *et al.*, 1999). Los números indican la longitud de la región reguladora corriente arriba del inicio de transcripción de P1. Los resultados que se muestran corresponden a una D.O. $590 \text{ nm} = 0.6$, en medio nutritivo (MN)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

***ompSI* requiere OmpR fosforilado en el aspártico 55 para su expresión óptima.** Se determinó la relevancia del estado de fosforilación de OmpR en la regulación de *ompSI*, dado que en *E. coli*, para los genes *ompC* y *ompF*, se ha postulado que el estado de fosforilación de OmpR determina su osmorregulación. Así, se analizó la expresión de la fusión traduccional pRO88 en cepas de *S. typhi* silvestre y mutante en *ompR*, complementada esta última con el gen *ompR* silvestre o una versión mutante que no se fosforila en el aspártico 55 (OmpRD55A). Los resultados se muestran en la figura 3. En este caso se observa como, al eliminar el gen *ompR*, la expresión de *ompSI* disminuye hasta un 25% de lo observado en la cepa silvestre.

Al introducir el gen *ompR* silvestre en la mutante, la expresión de *ompSI* se restauró al nivel de la observada en la cepa silvestre, en tanto que la introducción de la versión que no se fosforila en el aspártico 55 no complementó la expresión de *ompSI*. En el caso de la fusión traduccional *ompC-lacZ* usada como control, se encontró que su expresión depende enteramente de la presencia del residuo de aspártico en la posición 55.

Para determinar de manera más precisa cómo afecta la fosforilación de OmpR a su capacidad de unión a la región reguladora de *ompSI*, se realizaron ensayos de anisotropía de fluorescencia (Fig 4). En estos experimentos se calculó la constante de disociación aparente de OmpR y OmpR fosforilado hacia las cajas I-II-III de unión de OmpR en *ompSI* (Tabla 1 de esta tesis). Como se observa por los valores reportados en la Tabla 1, la fosforilación de OmpR resulta en un incremento de 72 veces en la afinidad de este regulador por un oligonucleótido que comprende las cajas I-II-III de *ompSI*. Tal incremento es mayor que el de 33 veces medido para *ompF* y el de 3 veces medido para *ompC*.

Para reforzar más la relevancia de la fosforilación de OmpR en la activación del promotor dependiente de éste en *ompSI*, se verificó la identidad de los sitios de inicio de la transcripción afectados en cada caso. Para ello, se extrajo RNA total de las mismas cepas de

donde se analizó la expresión de la fusión traduccional pRO88 (Fig. 3) y se analizó el inicio de la transcripción, utilizando como sonda un oligonucleótido que hibrida en la región 5' del gen *lacZ*.

En la cepa silvestre, se detectó el inicio de transcripción del promotor dependiente de OmpR (P1), mientras que en la cepa carente de *ompR* se detectó sólo el inicio del promotor no activado por OmpR (P2). La introducción de *ompR* silvestre en la mutante, resultó en que la transcripción se originara de nuevo a partir de P1 mayormente, y con algo de expresión de P2, mientras que la presencia de la mutante que codifica la versión de OmpR que no se fosforila en el aspártico 55, no activó la expresión de P1 y si permitió la expresión de P2 (Fig. 5).

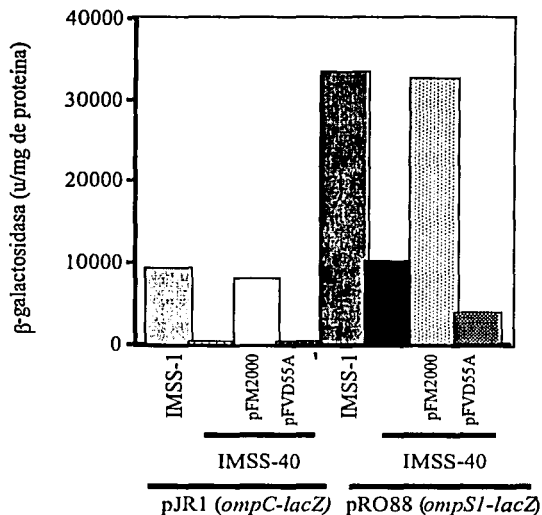
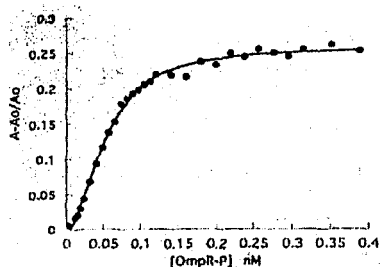
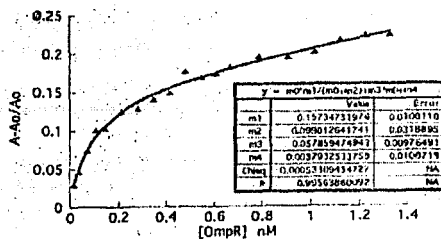


Figura 3. Papel de la fosforilación de OmpR en la expresión de *ompS1*. IMSS-1 es la cepa silvestre de *S. typhi* usada en nuestro estudio; IMSS-40 es su mutante isogénica $\Delta ompR$; pFM2000 es el vector pACYC184 con el gen *ompR* silvestre de *S. typhi* y pFVD55A es el vector pMPMA3 que contiene el gen que codifica para OmpR D55A.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

a



b

Figura 4. El estado de fosforilación de OmpR afecta su capacidad de unión a ompS1. Cinética de unión de (a) OmpR y (b) OmpR fosforilado hacia un oligonucleótido de doble cadena que abarca las cajas I-II-III de ompS1. A₀ es el valor de anisotropía del oligonucleótido sin añadir proteína y A es el valor de anisotropía medido a cada concentración de proteína.

Tabla 1. Constantes de disociación aparentes (K_d) de OmpR y OmpR-P hacia oligonucleótidos que abarcan la región anotada para cada gen.

DNA	OmpR K _d (nM)	OmpR-P K _d (nM)	Aumento de la afinidad por fosforilación
F1-F2-F3 (<i>ompF</i> <i>E. coli</i> , 67bp) ^a	496.5	15.4	33
C1-C2-C3 (<i>ompC</i> <i>E. coli</i> , 70bp) ^a	86.7	31.4	3
I-II-III (<i>ompS1</i> <i>S. typhi</i> , 71bp)	157.3	2.2	72

^a Datos tomados de Head *et al.*, 1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

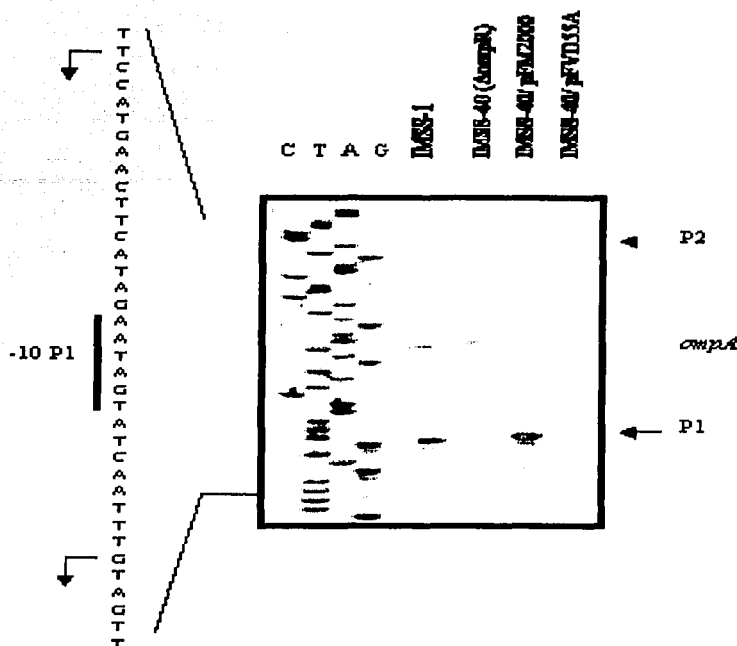


Figura 5. La actividad del promotor P1 de *ompS1* depende de la presencia de OmpR fosforilado en D55. IMSS-1 es la cepa *S. typhi* silvestre, IMSS-40 es la derivada isogénica $\Delta ompR$; pFM2000 es el vector pACYC177 que porta al gen *ompR* silvestre y pFVD55A es el vector pMPMA3 que contiene el gen que codifica OmpR D55A.

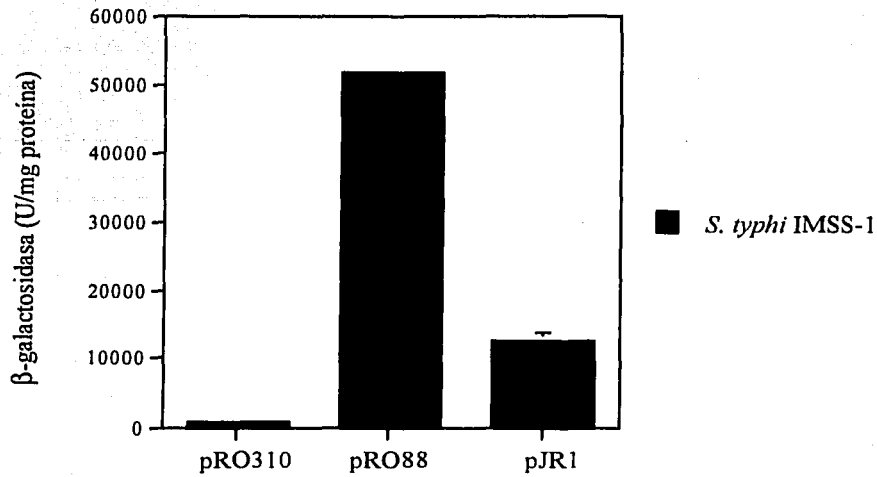
Comparación de la expresión de *ompS1* a partir de fusiones transcripcionales (*ompS1-cat*) y traduccionales (*ompS1-lacZ*). Algo que llamó nuestra atención fue el hecho de que, de acuerdo a los datos de las fusiones traduccionales *ompS1-lacZ* de la serie pRO, la expresión de *ompS1* al interrumpir *hms* en *S. typhi* o *S. typhimurium*, no alcanzaba los niveles de expresión de una fusión *ompC-lacZ*. De esto, se especulaba que OmpS1 podría ser detectado en geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie, a niveles comparables a OmpC. Esto no sucedió (datos no mostrados), lo cual abre la posibilidad a que existan elementos extras involucrados en silenciar la expresión de *ompS1*.

CON
FALLA DE ORIGEN

Debido a la ausencia de OmpS1 en geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie en la mutante de *hms*, se decidió evaluar el comportamiento de fusiones transcripcionales *ompS1-cat* y compararlo con el de las fusiones traduccionales *ompS1-lacZ*. Para ello se construyeron los plásmidos pKFV310 y pKFV88. La secuencia de la región reguladora resultó idéntica para la equivalente a -88 pb, en tanto la fusión transcripcional de -310 *ompS1-cat* presentó un cambio, ya que contiene diez T's en lugar de las nueve T's (entre -242 a -250 de los -310pb). Sin embargo, la adición de una T en el plásmido pKFV310 no afectó su expresión, ya que la fusión pKFV88 se expresa aproximadamente 50 veces más que la pKFV310, conservándose la relación observada entre pRO88 y pRO310 (Fig. 6). La actividad de la nueva fusión de -88 pb de *ompS1* ya no resultó 5 veces más activa que la de *ompC*, como se había propuesto de acuerdo a los niveles de β -galactosidasa, sino que ahora la expresión de ambos genes, medida sólo como transcripción, es esencialmente igual (comparar figura 6A con 6B).

Si bien los datos de las distintas fusiones de *ompS1* difieren en su relación respecto a *ompC*, la comparación entre los niveles de actividad, cuando se tiene la región reguladora completa o recortada son similares. Además, los datos de los experimentos donde se midió la intensidad de inicio de transcripción harían suponer que *ompS1* necesita ser expresado a niveles del recorte de -88pb para poder originar una proteína a nivel conmensurado con OmpC.

A



B

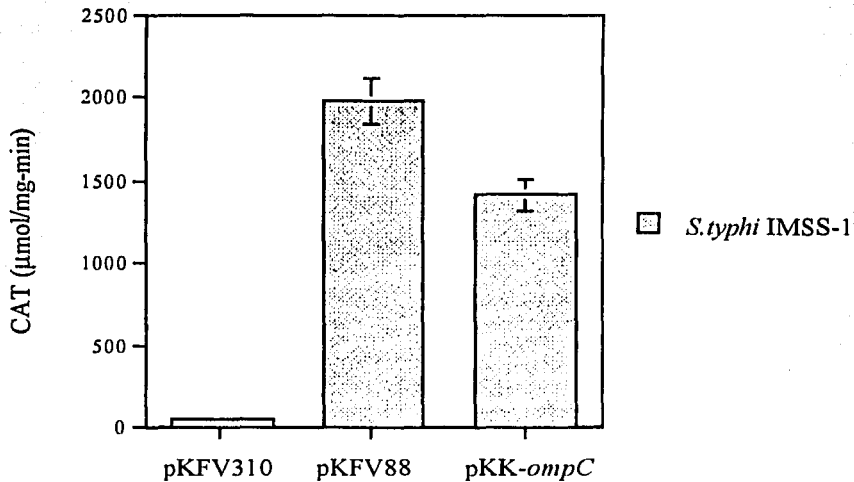


Figura 6. Comparación de la expresión de *ompS1* versus *ompC*. Se muestra la expresión de fusiones (A) traduccionales a *lacZ*, y (B) transcripcionales a *cat*, de *ompS1* y *ompC* en la cepa silvestre *S. typhi* IMSS-1 en medio nutritivo (MN). El número en los pRO y pKFV indica la longitud de la región reguladora de *ompS1* fusionada a *lacZ* y *cat*, respectivamente. pJR1 es el plásmido que porta la fusión traduccional *ompC-lacZ*.

Por otro lado, recientemente se sugirió un papel modulador de la estabilidad del RNAm de *ompF* para StpA, que resultó en que se produzca menos cantidad de OmpF en mutantes dobles *hns stpA* de *E. coli* (Deighan, Free y Dorman, 2000). Por estos datos, se decidió analizar la posibilidad de que StpA estuviera involucrado y de ser así de qué manera, en la regulación de *ompS1*. Para ello se construyeron las fusiones de -310 y -88 pb *ompS1-lacZ* en pACYC184, y se transformaron en cepas de *E. coli* silvestre (MC4100), dos mutantes en *hns* (PD32 y Δhns), *stpA* y *hns stpA*.

Los resultados de esos experimentos se muestran en la figura 7. Aquí se observa como en la doble mutante *hns stpA* de *E. coli*, la expresión de *ompS1* se desreprime a niveles mayores que al interrumpir solamente *hns* o bien eliminar completamente este gen. Contrariamente, la ausencia de *stpA* por sí sola no tiene mayor efecto en la expresión de *ompS1*. La expresión de *ompS1* en la doble mutante alcanza los mismos niveles de la fusión de -88p pb en la cepa silvestre, a la vez de que ya no disminuye su expresión en alta osmolaridad (Fig. 7).

Este resultado se confirmó, al introducir el plásmido pFC63 (Fernández-Mora *et al.*, 1995), que porta al gen *ompS1* bajo el control de 1.1 kb de su propia región reguladora, en las distintas cepas de *E. coli* usadas para medir la expresión de las fusiones. En la cepa silvestre no se observa OmpS1; en la *hns*, OmpS1 ya se detecta en preparaciones teñidas con azul de Coomassie y es más abundante en la doble mutante *hns stpA* (datos no mostrados).

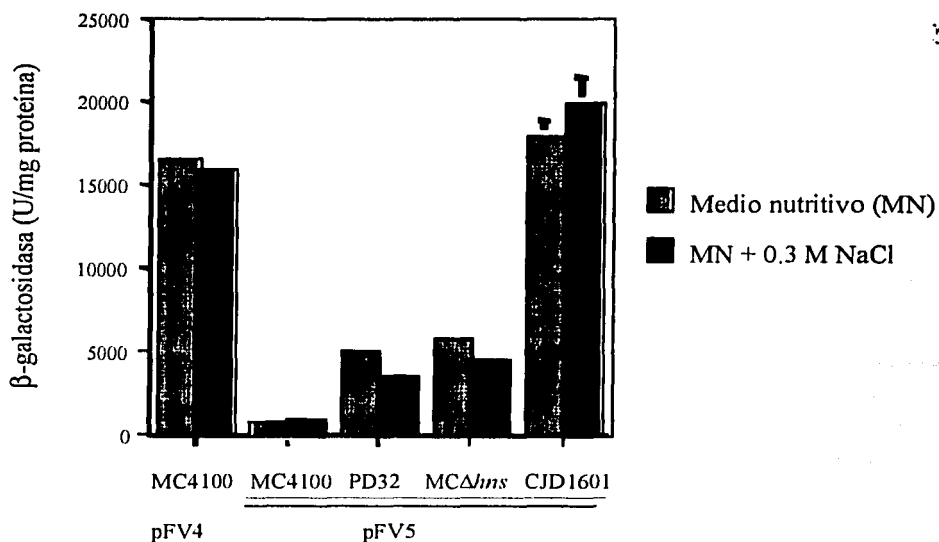


Figura 7. Expresión de *ompS1* en cepas de *E. coli*. MC4100 es la cepa silvestre K-12; PD32 es su derivada isogénica *hns*, con una inserción del gen de resistencia a ampicilina en la posición 206; CJD1601 es la derivada isogénica *hns::206Ap^r Δ*stpA*::Tc^r*. pFV4 es el vector pACYC184 con el fragmento *SaII* de pRO88; pFV5 es el mismo vector con el fragmento *SaII* de pRO310.

La región reguladora de *ompS1* responde de manera diferencial a la digestión con DNasa I *in vivo*. De los resultados anotados en el artículo, se desprende la propuesta de que en condiciones de baja osmolaridad, H-NS estabilizaría una estructura del DNA propia del gen silenciado. Dicha estructura sería también propensa a formarse en alta osmolaridad, lo que eliminaría el requerimiento de H-NS para silenciar al gen en esta condición. Para ahondar al respecto, se comparó el perfil de digestión a DNasa I *in vivo*, del plásmido pRO310, contenido en las cepas de *S. typhi* silvestre (IMSS-1), $\Delta ompR$ (IMSS41), *hns99* (STY *hns99*) y *hns99ΔompR* (STY 9941); esto, después de cultivar a las bacterias en medio nutritivo de baja y alta osmolaridad.

En la Fig. 8 se observan dos patrones de digestión. El primero, corresponde a las muestras extraídas de la cepa silvestre, indistinto respecto a la osmolaridad, mismo que es común a las cepas mutantes en *hns* u *ompR* de alta osmolaridad. El segundo perfil es el que se

TRABAJOS CON
FALLA DE ORIGEN

obtiene en las mutantes sencillas *hns* u *ompR* en baja osmolaridad y en la doble mutante *hns99ΔompR*, independientemente de la osmolaridad.

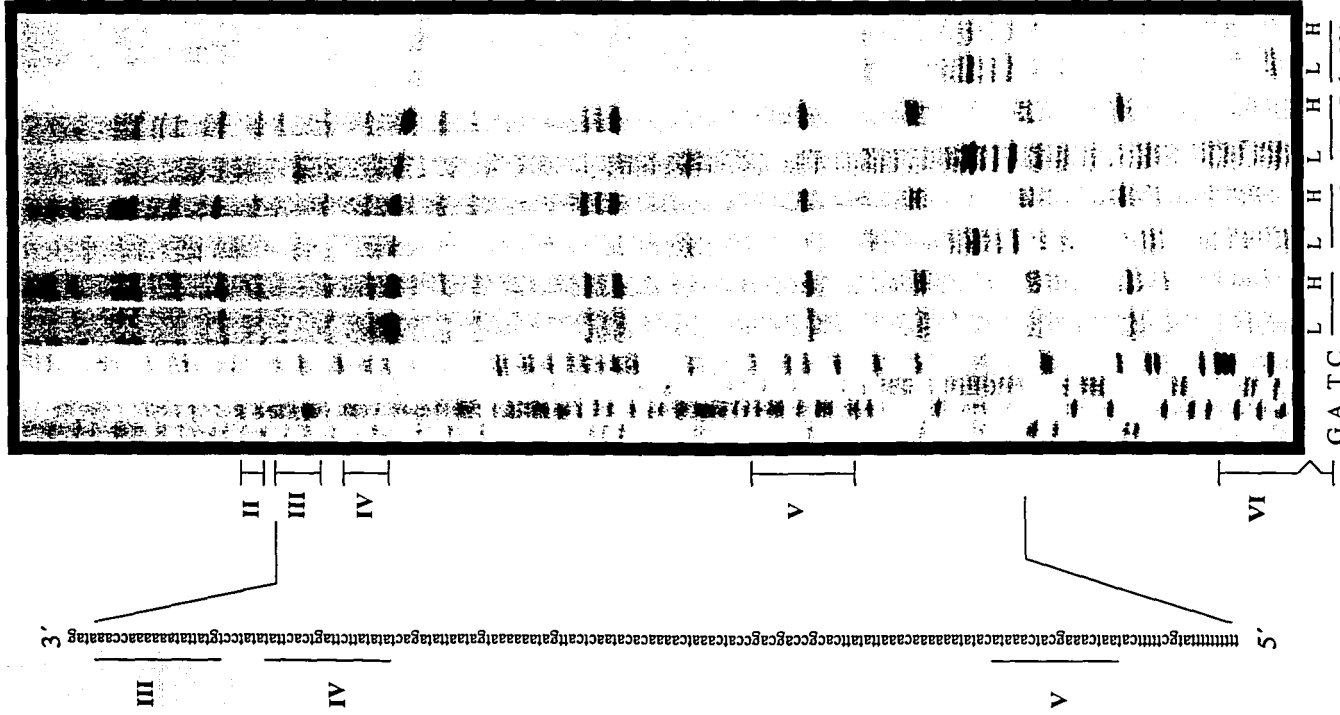


Figura 8. Perfil de digestión con DNasa I de pRO310 extraído de cada cepa indicada, en baja (L) y alta (H) osmolaridad.

DISCUSIÓN

Una aportación de nuestro trabajo fue el determinar que en *S. enterica* serovar Typhimurium, *ompSI* se regula de igual manera a como ocurre en *S. enterica* serovar Typhi (Fig.2 de esta tesis), a la vez de que en mutantes de *hms* en ambas cepas se desreprime la expresión de *ompSI* (Fig. 4 del artículo). En particular, la expresión de todas las fusiones *ompSI-lacZ* en *S. typhimurium* resultó ser de 50% respecto a la observada para *S typhi*. Esto permite predecir la existencia de un factor responsable de tal diferencia en los niveles de expresión, aún entre cepas de *S.enterica*, de acuerdo a lo propuesto para explicar las diferencias entre *S. typhi* y *E. coli* (Oropeza *et al.*, 1999).

En lo que toca a la activación de la expresión de *ompSI*, demostramos que el gen requiere de OmpR fosforilado en el aspártico 55 para poder activar el promotor dependiente de OmpR (P1), así como para reprimir el promotor independiente de OmpR (P2) (Figs. 3 y 5 de esta tesis). Por otra parte, la incapacidad de activación de P1 por la proteína mutante OmpR D55A, abre interrogantes sobre sus propiedades de unión, ya que la proteína silvestre sin fosforilar sí es capaz de unirse al DNA en ensayos de anisotropía de fluorescencia, inclusive con una afinidad intermedia entre *ompC* y *ompF* (Tabla 1).

Se encontró que el incremento en la afinidad de OmpR fosforilado (respecto a OmpR) hacia las cajas de activación (I-II-III) de *ompSI* fue mayor que el correspondiente a las cajas de activación de los genes *ompC* y *ompF* (Tabla 1 y Fig. 4 de esta tesis). La relevancia de este hallazgo a nivel fisiológico permanece como una interrogante, sobre todo al considerar que aun en las mutantes con interrupción en el gen *hms* no es posible observar OmpS1 en geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. Posiblemente se trate de la influencia de factores aún por descubrir, que mantienen al gen *ompSI* apagado mientras la bacteria permanezca en

condiciones de laboratorio. Así, parece evidente que la expresión de las porinas OmpC y OmpF le resulta más ventajosa a la bacteria cuando se encuentra en un medio de laboratorio. Sería necesario analizar el perfil de expresión de las proteínas de membrana externa al eliminar los genes *ompC* y *ompF*, dado el antecedente de la expresión de porinas quiescentes en ausencia de las porinas mayoritarias en *Klebsiella pneumoniae* (Doménech-Sánchez *et al.*, 1999).

En este sentido, la Dra. Alejandra Vázquez construyó una doble mutante $\Delta ompC \Delta ompF$ de *S. typhi*, de la cual se evaluó el perfil de expresión de proteínas de membrana externa. Al cultivar esta doble mutante en medio nutritivo de baja o alta osmolaridad, no se detectó OmpS1 en geles de SDS-PAGE al 12% (datos no mostrados). Este resultado refuerza la idea de la estricta regulación negativa ejercida sobre *ompS1*, ya que aún la ausencia de *ompC* y *ompF* no resulta en una condición suficiente para aumentar la expresión de OmpS1 hasta el mismo nivel de las porinas mayoritarias.

Con la construcción de fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, demostramos que la expresión de *ompS1* alcanza niveles comparables a la de *ompC* sólo cuando al primer gen se le ha removido toda la región de control negativo. Esto contrasta con las 5 veces que se sugería *ompS1* superaba a *ompC*, por los resultados con las fusiones traduccionales (Fig. 6 de esta tesis). Esto confirma la observación de los experimentos de primer extensión, donde es necesario tener 50 veces más RNA total para observar una intensidad similar en los inicios de transcripción de ambos genes (Fig. 6 del artículo). Los mismos experimentos de primer extensión nos mostraron que H-NS interviene en el silenciamiento de ambos promotores de *ompS1*, el dependiente (P1) e independiente de OmpR (P2).

Evidentemente, la bacteria puede alterar la expresión de sus porinas (entre otros genes) gracias a mecanismos derivados de la transferencia de la señal ambiental detectada, hacia el

DNA, para conducir a la expresión de los genes necesarios para adaptarse a la nueva situación. Así, se puede suponer que en cada condición que la bacteria encuentre, ésta deberá recurrir a mecanismos que le permitan controlar de manera general y simultánea la expresión de toda una serie de genes, que utilizará cuando le sea necesario. En este sentido, se conoce como diversos genes que son regulados por condiciones ambientales, responden de manera variable a la interrupción del regulador global H-NS (Hommais *et al.*, 2001). En lo que toca a la regulación de los genes de porinas, ya se había determinado la influencia represora de la transcripción de *ompC* por H-NS y Lrp (Ferrario *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 1996).

Demostramos que la proteína nucleóide, reguladora global, H-NS, interviene en el silenciamiento de la expresión de *ompSI* en condiciones estándar de laboratorio (Figs. 2, 4-6 del artículo). Así mismo, demostramos que esta proteína interacciona de manera directa con la subregión del DNA involucrada en la regulación negativa de *ompSI* (Fig. 3 del artículo), y donde la secuencia entre -105 y -135 pb, que abarca la caja IV de OmpR, es necesaria para una total interacción de H-NS con *ompSI* (Fig. 7 del artículo). Precisamente, al eliminar esta región, la expresión de *ompSI* no se ve afectada significativamente, ni por la interrupción de *hns*, ni por cambios en la osmolaridad o la presencia o ausencia de OmpR (Fig. 7 del artículo); lo que enfatiza la noción del estricto requerimiento de una estructura propensa a mantener el bajo nivel de expresión de *ompSI*.

Dentro de los mecanismos propuestos para explicar la represión de la transcripción, es posible identificar 3 procesos, que se esquematizan en la Fig. 9. H-NS se ha involucrado en la inhibición de la transcripción por impedimento estérico, como para el gen *proU* (Lucht *et al.*, 1994); de manera alterna, H-NS puede intervenir como una molécula participante en la inhibición del desalojo de la RNA polimerasa, como en el promotor P1 de *rrnB* (Schroder *et al.*, 2000; Rojo, 2001).

En *ompSI*, la región identificada como necesaria para el silenciamiento del gen por H-NS no traslapa las regiones de reconocimiento de la RNAP. De hecho, las cajas propuestas de -35 y -10 del promotor P2 se localizan 24 y 44 nucleótidos corriente abajo de -88pb, región donde H-NS no afectó la expresión de *ompSI*; en tanto que las cajas propuestas de -35 y -10 de P1 están a 51 y 71 nucleótidos corriente abajo de -88. Estos datos, sin embargo, no descartan la posibilidad de que H-NS pudiera intervenir en cualquiera de los pasos descritos en la figura 10.

Por otra parte, debido a la posición donde se insertó el marcador de resistencia por el transposón en las mutantes en *hms* de *Salmonella* (Fig. 10), surge la posibilidad de que se produjera una forma truncada de H-NS, como se ha descrito en otros casos. A esta proteína truncada se le ha atribuido la capacidad de participar en la represión del promotor de *bgl* en *E.coli*, asistida por la proteína StpA, por interacción de la región entre los aminoácidos 60-100 de H-NS con StpA (Free *et al.*, 2001; Johansson *et al.*, 2001). Inclusive, tal interacción es importante *per se* para la estabilidad de StpA, ya que en cepas *hms*, StpA es degradada más rápidamente por la proteasa Lon (Johansson y Uhlin, 1999). Esta mayor tasa de degradación respecto a la que ocurre en la cepa silvestre podría explicar, al menos parcialmente, porqué la expresión de *stpA* se aumenta en cepas *hms* (Sonnenfield *et al.*, 2001).

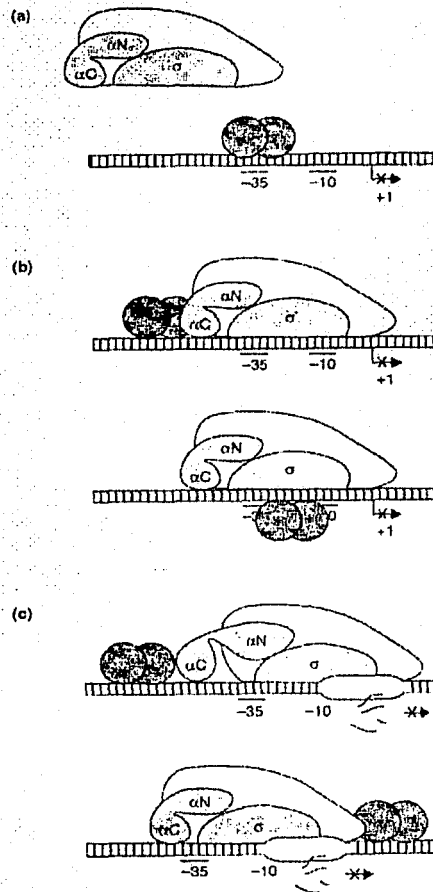


Figura 9. Representación de diferentes mecanismos de represión. El represor se representa como una molécula pequeña, dimérica. La RNA polimerasa (RNAP) se muestra como una enzima de varias subunidades. (a) Represión por impedimento estérico, por inhibición de la unión de la RNAP; (b) inhibición de la transición de complejo cerrado a complejo abierto, permitiéndose la unión de la RNAP pero con inhibición de la separación del DNA en la región de iniciación; (c) inhibición del desalajo en el promotor, donde se pueden formar complejos abiertos y transcritos abortivos; sin embargo, el escape de la RNAP se bloquea ya sea por contacto directo con un inhibidor unido corriente arriba o por colisión con el represor unido corriente abajo (Tomado de Rojo, 2001).

La operación conjunta de H-NS y StpA también se ha observado como un requisito en la activación de la expresión del regulón de maltosa en *E.coli* (Johansson *et al.*, 1998).

De acuerdo a nuestros resultados en *E. coli*, *ompSI* también se vería reprimido por StpA, sea por estabilización de formas truncadas de H-NS como se ha reportado para el locus *bgl* (Free *et al.*, 2001), o bien por participación directa en ausencia de H-NS, como lo sugiere el dato de la liberación de la expresión de *ompSI* en la cepa Δhns , cuyo nivel es menor que el observado en la cepa *hns stpA* (Fig.7). En este sentido, se ha comprobado que StpA tiene afinidad por blancos similares a los de H-NS y que es expresada mayormente en cepas *hns* de *E. coli* (Sonnenfield *et al.*, 2001).

Este dato permite sugerir que en *E. coli*, *ompSI* está sujeto a un control de la expresión similar al ya reportado para el operón *bgl*, donde formas truncadas de H-NS requieren de StpA como modulador para continuar con su actividad represora (Free *et al.*, 2001; Johansson *et al.*, 2001). En este sentido, la regulación por StpA sobre *ompSI* sería en todo caso secundaria a la de H-NS, pero del mismo tipo que para *bgl*, es decir, de represor, en contraste a lo sugerido para *ompF* (Deighan, Free y Dorman, 2000). Si el caso ocurre en *S. typhi* es materia de estudios posteriores, donde será necesaria la construcción de una cepa doble mutante *hns stpA*, además de evaluar la posible interacción de StpA con la región reguladora de *ompSI*.

El hallazgo de que la proteína nucleoide H-NS intervenga en el silenciamiento de *ompSI* no arroja mucha luz, en primera instancia, sobre el papel que esta porina podría desempeñar, más aún si se considera que en *E.coli*, H-NS regula a cerca del 5% de los genes, de donde un tercio de ellos tiene que ver con la fisiología de la cubierta celular y su estructura (Hommais *et al.*, 2001). Además, la cantidad de esta proteína no varía significativamente entre las fases exponencial y estacionaria (Azam *et al.*, 1999), aunque un estudio sugiere que H-NS se acumula en fase estacionaria (Dersch, Schmidt y Bremer, 1993).

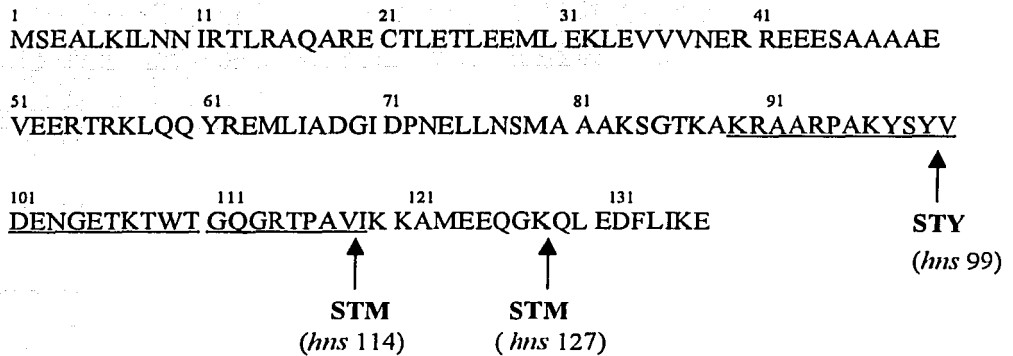


Figura 10. Mapa de las inserciones del marcador de resistencia a kanamicina por el transposón *mariner* en la secuencia deducida de aminoácidos del marco de lectura abierta del gen *hms* de *S. typhi*. El dominio de unión a DNA se localiza entre los aminoácidos 89-120. Las flechas indican el codón para el residuo aminoácido interrumpido en cada mutante. STY = *S. typhi*, STM = *S. typhimurium*.

Ahora bien, resulta evidente la falta de activación de *ompS1* a un nivel que permita su detección de la misma manera que las porinas mayoritarias. Ante esto, surge la pregunta de cuál será la condición particular que conduzca a su expresión y si se llega a expresar a niveles altos como OmpC y OmpF, o cuál podría ser el regulador responsable de eliminar el efecto de H-NS.

A este respecto, existen varios ejemplos, entre ellos los de la familia AraC, que parecen desplazar a H-NS de sus genes blanco, como el regulador CfaD sobre el operón de fimbrias CFA/ I (Jordi *et al.*, 1992) y Rns sobre genes de pili CS1 (Murphree, Froehlich y Scott, 1997), ambos en *E. coli* enterotoxigénica, o bien ToxT sobre *ctx*, el gen de la toxina del cólera en *V. cholerae* (Yu y DiRita, 2002). Otros son VirF en *S. flexneri* (Tobe *et al.*, 1993) y UreR en *P. mirabilis* (Coker, Bakare y Mobley, 2000).

Por otra parte, no únicamente reguladores de la familia AraC pueden intervenir en la desrepresión de genes afectados por H-NS. Tal es el caso del gen *pap* de pili-adhesina de *E.*

coli, donde se ha sugerido la participación de cAMP-CRP como antirepresor de H-NS (Forsaman *et al.*, 1992), o para el promotor temprano del bacteriófago Mu, donde IHF desestabiliza la unión de H-NS con el DNA (van Ulsen *et al.*, 1996). Un ejemplo que en particular llama la atención es el de la participación de un miembro de la familia del mismo H-NS, el regulador Ler de *E. coli* enteropatógena, que antagoniza la represión mediada por H-NS sobre los genes del sistema de secreción tipo III de esta bacteria (Bustamante *et al.*, 2001). En la lista diversa encontramos aún un par de represores típicos, Lac y λ , que al unirse a un promotor modificado de *bgl*, liberan del silenciamiento provocado por H-NS (Caramel y Schnetz, 1998).

Así, como se puede apreciar, existe una gran variedad de reguladores que naturalmente liberan de la represión ejercida por H-NS. Para el caso de *ompS1*, al no haberse definido todavía la señal en el laboratorio que pudiera conducir a su expresión, dificulta el poder asociar un regulador específico responsable de actuar como antirepresor.

En este sentido, una alternativa útil a explorar sería el construir un banco del genoma de *S. typhi*, a partir del cual se pudiera sobre-exresar el presunto antirepresor, o bien ensayar con alguna de las condiciones en que se induce la expresión de alguno de los miembros de la familia AraC o H-NS, en búsqueda de que alguno de ellos actúe de manera similar a lo que ocurre para otros genes como ya se ha citado.

En este respecto, al realizar una comparación con las proteínas codificadas en el genoma completo ya secuenciado de la cepa de *S. typhi* CT18, o con la de los plásmidos que porta esta misma cepa (Parkhill *et al.*, 2001, comparación hecha en la página electrónica del centro Wellcome Trust- Sanger Institute), se encuentran varios miembros de la familia AraC, como se puede ver en la Tabla 2 de esta tesis. En esta misma tabla se enumeran las proteínas similares a H-NS, en cuyo caso se encontró un homólogo en uno de los plásmidos de la

bacteria, en tanto que en su cromosoma las únicas proteínas con similitud significativa son H-NS y StpA, cuyo papel parece ser más bien de represor (NOTA: valores de probabilidad menores en la Tabla 2 indican mayor similitud entre la secuencia reportada y la proteína prototipo de la familia).

Para buscar al presunto regulador responsable de eliminar el efecto negativo de H-NS sobre *ompS1*, se puede evaluar ya sea alguna de las condiciones que induce la expresión de los miembros de la familia AraC, o bien ensayar con el gen candidato encontrado en el plásmido de virulencia, del cual carece nuestra cepa. Sin embargo, por otro lado, vale la pena no perder de vista la posibilidad de que aún expresándose en niveles tan poco abundantes, OmpS1 pueda cumplir una función con tales niveles, toda vez que la interrupción del gen en *S. typhimurium* ha demostrado interferir con procesos varios como la formación de biofilms, el movimiento tipo swarming y la infectividad hacia ratones (Toguchi *et al.*, 2000, Mireles *et al.*, 2001, Rodríguez Morales *et al.*, datos no publicados).

Un hecho de particular relevancia en la regulación de *ompS1*, resultó de que al interrumpir el gen *hms* en cepas de *Salmonella enterica*, *ompS1* ahora se ve osmorregulado, donde su expresión se ve disminuida al cultivar la bacteria en un medio de alta osmolaridad, de manera similar a lo observado con *ompF* en *Escherichia coli* (Fig. 4 del artículo). Así, de primera instancia podría pensarse que *ompS1* podría estar sujeto a un doble control de regulación negativa, a saber: (a) primero por la interacción de H-NS con la región de control negativa, lo que lleva al silenciamiento de su expresión en condiciones de laboratorio; y (b) por disminuir su expresión en condiciones de alta osmolaridad, quizá de manera similar al modelo descrito para *ompF* con intervención de OmpR e IHF (Slauch *et al.*, 1988; Forst *et al.*, 1989; Lan e Igo, 1998). El papel de IHF en la regulación de *ompS1* ya había sido previamente descartado (Oropeza *et al.*, 1999).

Tabla 2. Proteínas de la familia AraC o H-NS codificadas en el genoma de *S. typhi* CT18Tipo AraC

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Smallest Sum Probability	
		P(N)	N
<i>araC</i> STY0121, arabinose operon regulatory protein 123055:...	1434	9.7e-149	1
STY2241 <i>pocR</i> , pdu/cob regulatory protein PocR 2070973:207...	180	3.3e-14	1
<i>yijO</i> STY3756, putative AraC-family transcriptional regula...	140	2.7e-09	1
STY4463 <i>soxS</i> , regulatory protein SoxS 4349095:4349418 rev...	96	2.4e-06	1
STY0624 <i>ramA</i> , transcriptional activator RamA 623134:62347...	93	5.2e-06	1
<i>rhaR</i> STY3824, L-rhamnose operon transcriptional activator...	112	5.4e-06	1
<i>rob</i> STY4933, right origin-binding protein 4794279:4795148...	109	1.3e-05	1
STY1393 putative transcriptional regulator 1345254:134610...	107	2.0e-05	1
STY4496 <i>meIR</i> , melibiose operon regulatory protein 4386314...	106	3.2e-05	1
<i>xy1R</i> STY4136, xylose operon regulatory protein 3999540:40...	107	3.7e-05	1
STY1142 <i>hpaA</i> , 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase oper...	104	5.1e-05	1
STY4118 putative transcriptional regulator 3982461:398327...	102	7.0e-05	1
<i>marA</i> STY1541, multiple antibiotic resistance protein MarA...	86	0.00083	1

Ninguno con alta probabilidad en los plásmidos pHCM1 ó pHCM2

Tipo H-NSEn el cromosoma

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Smallest Sum Probability	
		P(N)	N
<i>hns</i> STY1299, DNA-binding protein (histone-like protein H1...	412	5.6e-48	2
<i>stpA</i> STY2920, DNA-binding protein StpA 2800121:2800522 re...	195	6.9e-22	2

En el plásmido pHCM1

pHCM1.178ac putative DNA-binding protein 131457:131861 reverse MW:15181

Score = 229 (85.7 bits), Expect = 5.3e-29, Sum P(2) = 5.3e-29
Identities = 43/79 (54%), Positives = 55/79 (69%)

```

Query:      57 KLQQYREMLIADGIDPNELLNSMAAAKSGTKAKRAARPAKYSYVDENGETKTWTGQGRTP 116
           K++  R++++ DGIDP ELL+S +A      K R RPAKY Y D NGETKTWTGQGRTP
Sbjct:      57 KIESLRQLMLEDGIDPEELLSSFSAKSGAPKKVREPRPAKYKYTDVNGETKTWTGQGRTP 116

Query:      117 AVIKKAMEEQGKQLEDFLI 135
           + + +E GK L+DFLI
Sbjct:      117 KALAEQLEA-GKTLDDFLI 134

```

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En este sentido, se ha demostrado el papel de la región 5' corriente arriba de -238pb de *ompF* en su regulación negativa, así como la participación de tal secuencia en la osmorregulación de este gen (Huang *et al.*, 1994; Rampersaud *et al.*, 1994). En este sentido, *ompSI* también requiere de la secuencia corriente arriba, en este caso de -88pb, para su regulación negativa por H-NS en baja osmolaridad y regulación negativa por alta osmolaridad en ausencia de H-NS.

Demostramos que *ompSI* puede ser osmorregulado al interrumpir el gen *hms* y de modo independiente de OmpR, y que dicha osmorregulación depende de la presencia de la región corriente arriba de -88 pb (Figs. 5-8 del artículo). Se ha propuesto un papel de H-NS como sensor de temperatura y osmolaridad, toda vez que se observó una disminución de la formación de complejos DNA-H-NS al incrementar la temperatura por encima de 32°C, o bien al aumentar la concentración de KCl en la reacción (Amit *et al.*, 2003). En nuestro caso, el papel de H-NS como sensor de temperatura pudiera descartarse, toda vez que H-NS retarda la región reguladora de *ompSI* con igual eficiencia a temperatura ambiente y a 37°C (Fig. 3 del artículo).

Por otro lado, la función de H-NS como sensor de osmolaridad no resulta tan clara para la regulación de *ompSI*, desde el momento en que dicha condición mimetiza la presencia de H-NS respecto a la expresión; esto es, de acuerdo a lo reportado, el incremento en la osmolaridad disminuye la interacción de H-NS con el DNA (Amit *et al.*, 2003). Sin embargo, nuestros resultados muestran que al eliminar la posible interacción de H-NS con *ompSI*, el aumento en la osmolaridad ya no resulta en la disminución de la expresión de este gen de porina.

Por otra parte, al relacionar la expresión de *ompSI* en presencia o en ausencia de OmpR, en baja contra alta osmolaridad, resulta evidente que ambos promotores comparten el mecanismo de regulación negativa asociado al mismo DNA. En este sentido, la presencia intacta de la región de control negativo es necesaria tanto para el silenciamiento completo por

H-NS, como para la formación de una estructura tal que en alta osmolaridad resulta en la disminución de la expresión de *ompSI* (Fig. 7 del artículo). Inclusive, el papel de una estructura intrínseca del DNA en la regulación de *ompSI* se ve reforzado por el hallazgo de una región de curvatura intrínseca dentro de la zona de control negativo (Fig. 8 del artículo).

En un estudio donde se comparó la curvatura promedio del DNA en diferentes genomas, se encontró que la región reguladora de genes presentes en bacterias termófilas muestra en promedio mayor curvatura intrínseca que la región codificante de los mismos; dato que no se reproduce para organismos hipertermófilos y que lleva a los autores a proponer un papel funcional adaptativo para la curvatura del DNA, determinado por una presión selectiva por la temperatura (Bolshoy y Nevo, 2000).

Si bien, en primera instancia, los patrones de digestión del pRO310 por DNasa I *in vivo*, donde se observa el requerimiento de la presencia de H-NS o bien de OmpR en condiciones de alta osmolaridad para reproducir el patrón observado en la cepa silvestre, abrirían lugar a albergar dudas respecto a la formación de la multicitada estructura silenciada independientemente de OmpR, esto bien podría reflejar que aún cuando se produzca la conformación silenciada en alta osmolaridad, por la ausencia de la unión de dichas proteínas, el DNA queda susceptible a la degradación por DNasa I de manera similar e independiente de la osmolaridad.

Para regular al gen *ompSI*, resulta notorio que la bacteria emplea mecanismos estrictos de carácter global para mantener la baja expresión del gen *ompSI*. Así lo indican nuestros resultados, que se resumen en el esquema de la Fig. 11. Ahí, se muestra como la unión del regulador global H-NS, que tiene un efecto negativo sobre gran variedad de genes, daría una base para mantener los bajos niveles de expresión de *ompSI* (11A). Al eliminar el efecto de H-NS se produciría la desrepresión en condiciones de baja osmolaridad (11B).

Una vez que se ha logrado liberar la expresión del gen, existe al menos otro paso de regulación negativa, ahora cuando se encuentra una situación de alta osmolaridad (11C); ya sea por la unión de un posible regulador negativo adicional, o bien por posibles alteraciones mediadas por la curvatura intrínseca del DNA en la región de control negativo (11D). Esto ocurre tanto sobre el promotor dependiente de OmpR, como el independiente de OmpR.

En el caso de OmpR, si bien ejerce un efecto negativo al impedir la expresión del promotor independiente de él, no parece jugar el mismo papel en el fenómeno de regulación negativa mediada por aumento en la osmolaridad, toda vez que aún en ausencia de OmpR se presenta dicho efecto. Para activar la expresión del promotor dependiente de OmpR (P1), éste debe poseer el residuo de aspartato en la posición 55, toda vez que el cambio a alanina conduce al abatimiento de la expresión de P1.

Nuestros resultados respecto a la regulación de *ompSI* abren lugar al replanteamiento del papel que juega OmpR en la represión de *ompF* en condiciones de alta osmolaridad, basado en los siguientes argumentos:

1. *ompF* ya no se reprime en alta osmolaridad al eliminar la región corriente arriba de -238 pb. Se identificó en esta región un sitio de baja afinidad (caja F4; entre -384 a -354 pb) para OmpR, de donde, para verificar su relevancia fisiológica, se le insertaron 22 pb en esta caja, dando como resultado la pérdida de osmorregulación (Huang *et al.*, 1994). Sin embargo, al hacer esta interrupción, se altera así mismo la secuencia intrínseca del DNA, que puede tener relevancia en la regulación por superenrollamiento o por la unión de algún otro factor que pudiera interactuar en la vecindad de esta caja de OmpR.
2. En un estudio similar, se demostró que la unión de OmpR parece proceder de manera jerárquica, con la unión a la caja involucrada en la represión (F4) en último lugar.

(Rampersaud *et al.*, 1994) En este trabajo se hicieron mutaciones puntuales en la caja F4, y por ensayo en una mutante *ompF* (*envZ473*) argumentan que tiene efecto en la regulación negativa, porque observaron un cambio de colonias blancas a colonias rosas en agar MacConkey. Cabe remarcar que la cepa silvestre, con esta misma versión mutante de F4, también produce colonias rosas en el mismo medio. Además, no aciertan a analizar si estas mutaciones en la caja F4 liberan a *ompF* de la osmorregulación.

1. Estudios con cepas de *E. coli* que producen versiones mutantes de OmpR o EnvZ han tratado de correlacionar el aumento en los niveles de OmpR fosforilado como un evento importante en la regulación negativa de *ompF*, lo que relaciona esto con el incremento en la osmolaridad del medio (Slauch *et al.*, 1988; Lan e Igo, 1998). Aquí la interrogante surge en por qué la misma cepa de *E. coli*, con mutaciones que inactivan al operón *ompB* (*envZ::Tn10* ó $\Delta(\textit{ompR envZ})$), cultivadas en el mismo medio (LB) y complementadas con un vector que porta al gen *ompR* en un plásmido del mismo origen de replicación (ColE1, pBR322) no producen el mismo perfil de proteínas de membrana externa. Además, mutantes que escapan a la osmorregulación resultan mapear en las cajas de activación F1 ó F2 (Slauch y Silhavy, 1991).
4. En este mismo sentido, cuando se ha tratado de adjudicar un papel represor a OmpR fosforilado en la osmorregulación de *ompF*, éste ha venido dado por un incremento en la afinidad de OmpR-P por la región reguladora de *ompF* (Forst *et al.*, 1989). Cabe mencionar que lo que se ha observado ha sido, en efecto, el incremento en la afinidad, pero por las cajas de activación (F1-F2-F3), ya que una medición sobre la caja F4 no ha sido posible (Head *et al.*, 1998).
5. Recientemente se ha demostrado, en *E. coli*, como la relación de la expresión de *ompC/ompF*, medida a partir de fusiones a las proteínas cian fluorescente y amarilla

fluorescente, respectivamente, no varía al modular la concentración de OmpR o EnvZ en un rango que va 1/3 a 3 veces la concentración de ambos respecto a la presente en la cepa silvestre (Batchelor y Goulian, 2003). Este mismo estudio y otro independiente han llevado a conocer que el incremento en la osmolaridad resulta en un aumento en la cantidad de EnvZ y OmpR cercano a 1.8 veces, respecto a la cantidad presente en la cepa crecida en baja osmolaridad (Cai e Inouye, 2002; Batchelor y Goulian, 2003). Así, el incremento de EnvZ y OmpR dado por la alta osmolaridad no afectaría la expresión de los genes de porinas.

De todo lo anterior, se desprende la idea de la pertinencia de reexaminar el escenario de la regulación de los genes de porinas, sobre todo en lo que toca al fenómeno de represión de la porina mayoría OmpF en condiciones de alta osmolaridad; lo que puede ser evaluado en un contexto que permita tener la activación del gen vía OmpR y retomar las mutantes con cambios puntuales en la caja presuntamente involucrada en la represión (Rampersaud *et al.*, 1994). Hoy, varios años después el contexto de este estudio, vemos que no ha sido analizada de manera que se demuestre contundentemente la intervención de esta secuencia en la regulación negativa, con el peso que se le ha atribuido a lo largo de este tiempo.

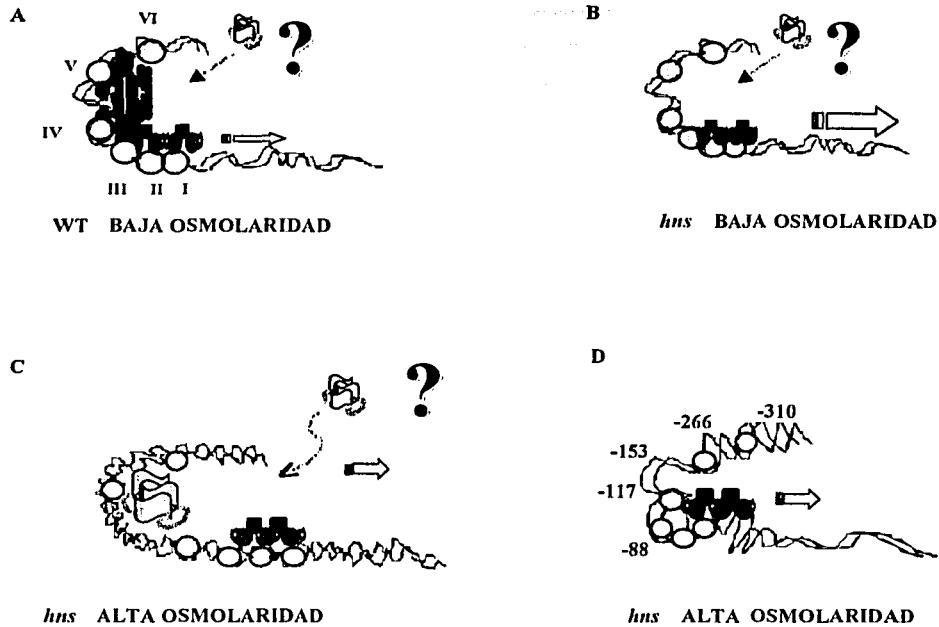


Figura 11. Mecanismo propuesto para explicar el bajo nivel de expresión del gen *ompS1* de *S. typhi* en condiciones estándar de laboratorio. H-NS se uniría a la región de control negativo y formaría un complejo de baja expresión (A). Al eliminarse el efecto de H-NS se liberaría la expresión de *ompS1* (B); que es sujeta nuevamente a control negativo en alta osmolaridad ya sea por la unión de un posible regulador negativo adicional (C), o por cambios en la estructura del DNA iniciados a partir de la región de curvatura intrínseca (D). Para activar al promotor dependiente de OmpR se requiere que éste posea el residuo de aspartato en la posición 55.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

1. H-NS regula negativamente la expresión del gen *ompS1* de *Salmonella enterica*, ya que silencia la transcripción de los promotores dependiente e independiente de OmpR, por unión directa y específica a la región corriente arriba de -88 pb. Esta región presenta curvatura intrínseca, y su integridad se requiere para la interacción de H-NS con *ompS1*.
2. La liberación de la expresión de *ompS1* le confiere regulación negativa por alta osmolaridad, independientemente de la presencia o ausencia del regulador OmpR. Esta regulación negativa depende de la presencia e integridad de la región corriente arriba de -88pb.
3. La mutación de *hns* en *S. enterica* o la interrupción simultánea de los genes *ompC* y *ompF* no liberan la expresión de OmpS1 a niveles mayoritarios.
4. En *Escherichia coli* MC4100, StpA parece jugar un papel accesorio a H-NS en la regulación negativa de *ompS1*, como se ha propuesto para el operón *bgl* en esta bacteria.
5. La expresión del promotor dependiente de OmpR requiere que éste posea un residuo aspártico en la posición 55.

PERSPECTIVAS

1. Identificar el factor responsable de los diferentes niveles de expresión de *ompSI*, ocurridos entre *S. enterica* serovar Typhi y *S. enterica* serovar Typhimurium.
2. Buscar otros elementos involucrados en la falta de producción de OmpSI a niveles mayoritarios.
3. Buscar al presunto regulador que elimina el efecto de silenciamiento de H-NS sobre *ompSI*.
4. Definir si existe alguna condición *in vitro* que induzca la expresión de *ompSI*, a un nivel suficiente para observar la proteína codificada por este gen a niveles mayoritarios.
5. Analizar la posibilidad de regulación negativa por alta osmolaridad para *ompF*, independientemente de OmpR, para replantear el modelo de osmorregulación de los genes de porinas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aiba, H., Nakasai, F., Mizushima, S., 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: 14090-14094.
- Atlung, T., Ingmer, H. (1997). H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol. Microbiol.* 24:7-17.
- Amit, R., Oppenheim, A.B., Stavans, J. (2003). Increased bending rigidity of single DNA molecules by H-NS, a temperature and osmolarity sensor. *Biophys. J.* 84: 2467-2473.
- Azam, T.A., Hiraga, S., and Ishihama, A. (2000). Two types of localization of the DNA-binding proteins within the *Escherichia coli* nucleoid. *Genes Cells* 5:613-626.
- Azam, T.A., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S., Ishihama, A. (1999). Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bact.* 181:6361-6370.
- Batchelor, E., Goulian, M. (2003). Robustness and the cycle of phosphorylation and dephosphorylation in a two-component regulatory system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 691-696.
- Benz, R. (1988). Structure and function of porins from Gram-negative bacteria. *Annu.Rev.Microbiol.* 42:359-393.
- Bolshoy, A., Nevo, E. (2000). Ecologic genomics of DNA: upstream bending in prokaryotic promoters. *Genome Res.* 10:1185-1193.

- Bustamante, V.H., Santana, F.J., Calva, E., Puente, J.L. (2001). Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol. Microbiol.* 39: 664-678.
- Cai, S.J., Inouye, M. (2002). EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 277: 24155-24161.
- Calva, E. y Calva, J.J. (1998). Country report: Typhoid fever and other Salmonellosis in Mexico. *Medical Journal of Indonesia.* 7 (S1):17-19.
- Caramel, A., Schnetz, K. (1998). Lac and λ repressors relieve silencing of the *Escherichia coli* *bgl* promoter: Activation by alteration of a repressing nucleoprotein complex. *J.Mol.Biol.* 284: 875-883.
- Coker, C., Bakare, O.O., Mobley, H.L.T. (2000). H-NS is a repressor of the *Proteus mirabilis* urease transcriptional activator gene *ureR*. *J. Bacteriol.* 182: 2649-2653.
- Cowan, S.W. Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R.A., Jansonius, J.N., Rosenbauch, J.P. (1992). Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature.* 358: 727-733.
- Dame, R.T., Wyman, C., Goosen, N. (2001). Structural basis for preferential binding of H-NS to curved DNA. *Biochimie.* 83:231-234.
- Deng, W., Liou, S.R., Plunkett, G. III, Mayhew, G.F., Rose, D.J., Burland, V., Kodoyianni, V., Schwartz, D.C. and Blattner, F.R. (2003). Comparative Genomics of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Strains Ty2 and CT18. *J. Bacteriol.* 185: 2330-2337.
- Dersch, P., Schmidt, K., Bremer, E. (1993). Sintesis of the *Escherichia coli* K-12 nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is subjected to growth-phase control and autoregulation. *Mol. Microbiol.* 8:875-889.

Di Micco, B., Metafora, S., Colonna, G., Carteni, M., Ragone, R., Macalello, M.A., Di Micco, P., Baroni, A., Catalanotti, P., and Tuffano, M.A. (2001) Porins from *Salmonella typhimurium* accelerate human blood coagulation *in vitro* by selective stimulation of thrombin activity: implication in septic shock DIC pathogenesis. *J. Endotoxin. Res.* 7:211-217.

Doménech-Sánchez, A., Hernández-Alles, S., Martínez-Martínez, L., Benedi, B.J., and Alberti, S. (1999) Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in beta-lactam antibiotic resistance. *J Bacteriol.* 181:2726-2732.

Esposito, D., Petrovic, A., Harris, R., Ono, S., Eccleston, J.F., Mbabaali, A., Haq, I., Higgins, C.F., Hinton, J.C.D., Driscoll, P.C., and Ladbury, J.E. (2002). H-NS oligomerization domain structure reveals the mechanism for higher order self-association of the intact protein. *J. Mol. Biol.* 324:841-850.

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

Ferrario M., Ernsting B.R., Borst D.W., Wiese D.E. 2nd, Blumenthal R.M., 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.* 177:103-113.

Forsman, K., Sondén, B., Göransson, M., Uhlin, B.E. (1992). Antirepression function in *Escherichia coli* for the cAMP-cAMP receptor protein transcriptional activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 9880-9884.

Forst, S.A., Delgado, J., Inouye, M. (1989). DNA-binding properties of the transcription activator (OmpR) for the upstream sequences of *ompF* in *Escherichia coli* are altered by *envZ* mutations and medium osmolarity. *J. Bact.* 171:2949-2955.

Forst, S., Delgado, J., Rampersaud, A., Inouye, M. (1990). In vivo phosphorylation of OmpR, the transcription activator of the *ompF* and *ompC* genes in *Escherichia coli*. *J. Bact.* 172: 3473-3477.

Free, A., Dorman, C.J. (1997). The *Escherichia coli stpA* gene is transiently expressed during growth in rich medium and is induced in minimal medium and by stress conditions. *J. Bacteriol.* 179:909-918.

Free, A., Porter, M.E., Deighan, P., Dorman, C.J. (2001). Requirement of the molecular adapter function of StpA at the *Escherichia coli bgl* promoter depends upon the level of truncated H-NS protein. *Mol. Microbiol.* 42:903-918.

Guthrie, R.K. (1992a) Taxonomy and grouping of *Salmonella*. pp.23-24. En: *Salmonella*. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida, E.E.U.U.

Guthrie, R.K. (1992b) Salmonellosis-The infection-.pp. 41-60. En: *Salmonella*. CRC Press.

Groisman, E.A. y Mouslim, C. (2000). Molecular mechanisms of *Salmonella* pathogenesis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 13:519-522.

Head, C., Tardy, A., 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.

Heithoff D.M., Conner C.P., Hanna P.C., Julio S.M., Hentschel U., Mahan M.J. (1997) Bacterial infection as assessed by in vivo gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 934-939.

Ho T.D., Slauch J.M. (2001). OmpC is the receptor for Gifsy-1 and Gifsy-2 bacteriophages of *Salmonella*. *J. Bacteriol.* 183:1495-1498.

Hommais, F., Krin, E., Laurent-Winter, C., Soutourina, O., Malpertuy, A., Le Caer, J.P., Danchin, A., Bertin, P. (2001). Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol Microbiol.* 40:20-36.

http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_typhi/blast_server.shtml.

<http://www.who.int/inf-fs/en/fact149.html>.

Huang, K.J., Schieberl, J.L., Igo, M.M. (1994). A distant upstream site involved in the negative regulation of the *Escherichia coli ompF* gene. *J. Bacteriol.* 176:1309-1315.

Igarashi, K., Hanamura, A., Makino, K., Aiba, H., Mizuno, T., Nakata, A., 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.* 88:8958-8962.

Inokuchi, K., Furukawa, H., Nakamura, K., and Mizushima, S. (1984). Characterization by deletion mutagenesis in vitro of the promoter region of *ompF*, a positively regulated gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 178: 653-668.

Johansson, J., Dagberg, B., Richet, E., Uhlin, B.E. (1998). H-NS and StpA proteins stimulate expression of the maltose regulon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180:6117-6125.

Johansson, J., Uhlin, B.E. (1999). Differential protease-mediated turnover of H-NS and StpA revealed by a mutation altering protein stability and stationary-phase survival of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:10776-10781.

Johansson, J., Eriksson, S., Sondén, B., Wai, S.N., Uhlin, B.E. (2001). Heteromeric interactions among nucleoid-associated bacterial proteins: localization of StpA-stabilizing regions in H-NS of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183:2343-2347.

Jordi, B.J.A.M., Dagberg, B., de Haan, L.A.M., Hamers, A.M., van der Zeijst, B. A.M., Gastar, W., Uhlin, B.E. (1992). The positive regulator CfaD overcomes the repression mediated by

histone-like protein H-NS (H1) in the CFA/ I fimbrial operon of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 11:2627-2632.

Lan, C.Y., Igo, M.M. (1998). Differential expression of the OmpF and OmpC porin proteins in *Escherichia coli* K-12 depends upon the level of active OmpR. *J. Bacteriol.* 180: 171-174.

Lucht J.M., Dersch, P., Kempf, B., and Bremer, E. (1994). Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled *proU* operon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 269:6578-8.

MacLeod, S.M., Johnson, R.C. (2001). Control of transcription by nucleoid proteins. *Curr.Opin.Microbiol.*4:152-159.

Mahan M.J., Tobias J.W., Slauch J.M., Hanna P.C., Collier R.J., Mekalanos J.J. (1995) Antibiotic-based selection for bacterial genes that are specifically induced during infection of a host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:669-673.

Martinez-Flores, I., Bustamante, V.H., Puente, J.L., Calva, E. (1995). Cloning and characterization of the *Salmonella typhi ompR* and *envZ* genes. *As. Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 3:135-144.

Martinez-Flores, I., Cano, R., Bustamante, V.H., Calva, E., Puente, J.L. (1999). The *ompB* operon partially determines differential expression of OmpC in *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181:556-562.

McClelland M., Sanderson K.E., Spieth J., Clifton S.W., Latreille P., Courtney L., Porwollik S., Ali J., Dante M., Du F., Hou S., Layman D., Leonard S., Nguyen C., Scott K., Holmes A., Grewal N., Mulvaney E., Ryan E., Sun H., Florea L., Miller W., Stoneking T., Nhan M., Waterston R., Wilson R.K. (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature.* 413:848-852.

- Mireles, J. R. II, Toguchi, A, Harshey, R. M.. (2001). *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J Bacteriol.* **183**: 5848-5854.
- Misra, R., 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**: 4105-4111.
- Murphree, D., Froechlich, B., Scott, J.R. (1997). Transcriptional control of genes encoding CS1 pili: negative regulation by a silencer and positive regulation by Rns. *J. Bact.* **179**: 5376-5743.
- Nieto, J.M., Madrid, C., Miquelay, E., Parra, J.L., Rodríguez, S., and Juárez, A. (2002). Evidence of direct protein-protein interaction between members of the enterobacterial Hha/Ymo and H-NS families of proteins. *J. Bacteriol.* **184**:629-635.
- Nikaido, H. (1992). Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Mol. Microbiol.* **6**:435-442.
- Nikaido, H. (1996). Outer membrane. Pp.29-47. En: Neidhart, F.C. (Ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella*. ASM Press. Washington, D.C. E.E.U.U.
- Oropeza, R., Sampieri, C.L., Puente, J.L, Calva, E. (1999). Negative and positive regulation of the non-osmoregulated *ompS1* porin gene in *Salmonella typhi*: a novel regulatory mechanism that involves OmpR. *Mol Microbiol.* **32**:243-252.
- Park, H., Saha, S.K., Inouye, M. (1998). Two-domain reconstitution of a functional protein histidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:6728-6732.
- Parkhill J., Dougan G., James K.D., Thomson N.R., Pickard D., Wain J., Churcher C., Mungall K.L., Bentley S.D., Holden M.T., Sebahia M., Baker S., Basham D., Brooks K., Chillingworth T., Connerton P., Cronin A., Davis P., Davies R.M., Dowd L., White N., Farrar J., Feltwell T., Hamlin N., Haque A., Hien T.T., Holroyd S., Jagels K., Krogh A., Larsen T.S., Leather S.,

- Moule S., O'Gaora P., Parry C., Quail M., Rutherford K., Simmonds M., Skelton J., Stevens K., Whitehead S., Barrell B.G. (2001). Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature*. 413:848-852.
- Pratt, L.A., Silhavy, T.J. (1995). Porin regulation of *Escherichia coli*. Pp. 105-126. En: Hoch, J.A. and Silhavy, T.J. (Eds.) Two component signal transduction. ASM Press. Washington, DC. E.E.U.U.
- Pratt, L.A., Hsing, W., Gibson, K.E., 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.
- Prilipov A., Phale P.S., Koebnik R., Widmer C., Rosenbusch J.P. (1998). Identification and characterization of two quiescent porin genes, *nmpC* and *ompN*, in *Escherichia coli* BE. *J Bacteriol.* 180:3388-3392.
- Porwollik, S., Frye, J., Floread, L.D., Blackmer, F., McClelland, M. (2003). A non-redundant microarray of genes for two related bacteria. *Nucl. Acids. Res.* 31:1869-1876.
- Puente, J.L., Flores, V., Fernández, M. Fuchs, Y., 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., 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.
- Rampersaud, A., Harlocker, S.L., Inoye, 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.
- Rimsky, S., Zuber, F., Buckle, M., Buc, H. (2001). A molecular mechanism for the repression of transcription by the H-NS protein. *Mol.Microbiol.* 45:1311-1323.

- Roberts, D.L., Bennett, D.W., Forst, S.A. (1994). Identification of the site of phosphorylation of the osmosensor, EnvZ, of *Escherichia coli*. *J. Biol.Chem.* 269:8728-8733.
- Rojo, F. (2001). Mechanisms of transcriptional repression. *Curr. Opin.Microbiol.* 4: 145-151.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santiviago C.A., Fuentes J.A., Bueno S.M., Trombert A.N., Hildago A.A., Socias L.T., Youderian P., Mora G.C. (2002). The *Salmonella enterica* sv. Typhimurium *smvA*, *yddG* and *ompD* (porin) genes are required for the efficient efflux of methyl viologen. *Mol Microbiol.* 46:687-698.
- Sarma, V., Reeves, P. (1977). Genetic locus (*ompB*) affecting a major outer-membrane protein in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 132:23-27.
- Schroder, O., and Wagner, R. (2000). The bacterial DNA-binding protein H-NS represses ribosomal RNA transcription by trapping RNA polymerase in the initiation complex. *J Mol Biol.* 298:737-48.
- 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* K12. *J. Bacteriol.* 175:5460-5468.
- Slauch, J.M., Garret, S., Jackson, D.E., Silhavy, T.J. (1988). EnvZ functions through OmpR to control porin gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 170: 439-441.
- Slauch, J.M., Russo, F.D., Silhavy, T.J. (1991). Supsessor mutations in *rpoA* suggest that OmpR controls transcription by direct interaction with the alpha subunit of the RNA polymerase . *J. Bacteriol.* 173:7501-7510.

- Slauch, J.M., Silhavy, T.J. (1991). *cis*-acting *ompF* mutations that result in OmpR-dependent constitutive expression. *J Bacteriol.* 173:4039-4048.
- Sonnenfield, J.M., Burns, C.M., Higgins, C.F., Hinton, J.C.D. (2001). The nucleoid-associated protein StpA binds curved DNA, has a greater DNA-binding affinity than H-NS and is present in significant levels in *hns* mutants. *Biochimie.* 83:243-249.
- Suzuki T., Ueguchi C., Mizuno T. (1996). H-NS regulates OmpF expression through *micF* antisense RNA in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 178:3650-3653.
- Tanaka, T., Saha, S.K., Tomomori, C., Ishima, R., Liu, D., Tong, K.I., Park, H., Dutta, R., Qin, L., Swindells, M.B., Yamazaki, T., Ono, A.M., Kainosho, M., Inouye, M., Ikura, M. (1998). NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ. *Nature.* 396:88-92.
- Tate, S., Kato, M., Nishimura, Y., Arata, Y., 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.* 242:27-30.
- Tobe, T., Yoshikawa, M., Mizuno, T., Sasakawa, C. (1993). Transcriptional control of the invasion regulatory gene *virB* of *Shigella flexneri*: activation by VirF and repression by H-NS. *J. Bacteriol.* 175: 6142-6149.
- Toguchi, A., Siano, M., Burkart, M, Harshey. R. M. (2000). Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 182: 6308-6321.
- Tsung, K., Brissette, R.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.* 264:10104-10109.

van Ulsen, P., Hillebrand, M., Zulianello, L., van de Putte, P., Goosen, N. (1996). Integration host factor alleviates the H-NS-mediated repression of the early promoter of bacteriophage Mu. *Mol. Microbiol.* 21: 567-578.

Williams, R.M., Rimsky, S. (1997). Molecular aspects of the Escherichia coli nucleoid protein, H-NS: a central controller of gene regulatory networks. *FEMS Microbiol. Lett.* 156:175-185.

Wurtzel, E.T., Chou, M.Y., Inouye, M. (1982). Osmoregulation of gene expression. DNA sequence of the *ompR* gene of the *ompB* operon of *Escherichia coli* and characterization of its gene product. *J. Biol. Chem.* 257:13685-13691.

Yu, R.R., DiRita, V.J. (2002). Regulation of gene expression in *Vibrio cholerae* by ToxT involves both antirepression and RNA polymerase stimulation. *Mol. Microbiol.* 43: 119-134.

Zhou, D., Galán, J. (2001). *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes Infect.* 3:1293-1298.

ANEXO I

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Negative Osmoregulation of the *Salmonella ompS1* Porin Gene Independently of OmpR in an *hns* Background

Mario Alberto Flores-Valdez, José Luis Puente, and Edmundo Calva*

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

Received 14 May 2003/Accepted 15 August 2003

The *ompS1* gene encodes a quiescent porin in *Salmonella enterica* serovars Typhi and Typhimurium. By using random mariner transposon mutagenesis, mutations that caused derepression of *ompS1* expression were isolated, one in *S. enterica* serovar Typhi and two in *S. enterica* serovar Typhimurium. All of them mapped in the *hns* gene in the region coding for the carboxy terminus of the H-NS nucleoid protein. The derepressed *ompS1* expression was subject to negative regulation at high osmolarity, both in the presence and in the absence of OmpR. This observation was possible due to the fact that there are two promoters: P1, which is OmpR dependent, and P2, which does not require OmpR for activation (rather, OmpR represses P2). The sequences upstream from position -88, a region previously shown to be involved in the negative regulation of *ompS1*, can form a static bend, and the integrity of this region was required for function and binding of H-NS and for osmoregulation, as determined with gene reporter fusions of different lengths and with a 31-bp deletion mutant. This is consistent with the notion that this region determines a structure required for repression. Hence, *ompS1* shares negative regulation by H-NS with other loci, such as the *bgl* operon and the *ade* gene.

Salmonella enterica serovar Typhi is the etiological agent of typhoid fever in humans (24). Its outer membrane proteins (OMPs) have an important role in triggering the host immune response (15, 21), and *S. enterica* serovar Typhimurium *ompC ompF* double mutants are attenuated for virulence in mice (2). Thus, aside from their roles in the exchange of small molecules and in participating in preserving the bacterial cell shape, the OMPs are relevant to the interaction between a bacterial pathogen and its host.

S. enterica serovar 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 (29). In *S. enterica* serovar Typhi, as in *Escherichia coli*, expression of OmpC and OmpF is under the control of the *ompB* (*ompR-envZ*) locus. The relative levels of expression of OmpC and OmpF in *E. coli* are modulated by changes in osmolarity, which has been proposed to affect the level of phosphorylated OmpR (9, 20, 26). In *S. enterica* serovar Typhi, a shift in osmolarity affects only the expression of OmpF, whereas OmpC is not osmoregulated (17, 29).

Besides genes for the major porins, *E. coli* possesses porin genes that are quiescent under standard laboratory growth conditions, such as those for Lc (1), NmpC, and OmpN (27). In *Klebsiella pneumoniae*, *ompK37* is expressed at low levels under standard laboratory growth conditions but is highly expressed in β -lactam-resistant clinical isolates (6). This gene is 80% identical to *S. enterica* serovar Typhi *ompS2* and to *E. coli* *ompN*. Likewise, serovar Typhi *ompS1* belongs to this group of low-level-expressed porins (8).

In contrast to the *ompC* and *ompF* genes, which contain three and four OmpR-binding sites, respectively, *ompS1* possesses six OmpR-binding sites (22) (Fig. 1). *cis*-acting elements up to -310 bp upstream of the OmpR-dependent P1 transcription start site have been described. There is also a P2 promoter, which does not require OmpR for activation but which, however, is repressed in the presence of OmpR. The -310 region contains both positive and negative regulatory elements. Sequences upstream of position -88 are required for negative regulation, and sequences downstream of -88 are required for positive regulation (Fig. 1) (22). Expression of *ompS1* in the *S. enterica* serovar Typhi wild-type strain IMSS-1 was not affected by a shift in osmolarity or by other stress growth conditions that can affect porin expression, such as changes in pH and temperature (22).

The wide porin repertoire in *Salmonella* raises new questions regarding their function and regulation. In the present work, we report that the H-NS nucleoid protein is a repressor of *ompS1*. Previous studies on porin regulation reported that H-NS binds to the intergenic region of the *ompC-micF* genes, repressing them transcriptionally and interfering with the post-transcriptional negative regulation of *ompF* translation via *micF* (37). Moreover, another nucleoid protein, HU, has been found to affect the levels of OmpF (23).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and recombinant DNA techniques. The relevant bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. DNA manipulations were performed according to standard protocols (33). Oligonucleotides used for amplification by PCR were provided by the Oligonucleotide Synthesis Facility at our Institute and are listed in Table 2. PCRs were performed with Expand (Boehringer Mannheim Inc.) or with *Taq* DNA polymerase, according to the instructions by the manufacturer. The one-step mutagenesis procedure described by Datsenko and Wanner (3) for bacterial chromosomal genes was used to generate gene deletions and replacements for antibiotic resistance markers.

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, México. Phone: (52) (777) 329-1645. Fax: (52) (777) 313-8673. E-mail: ecalva@ibt.unam.mx.

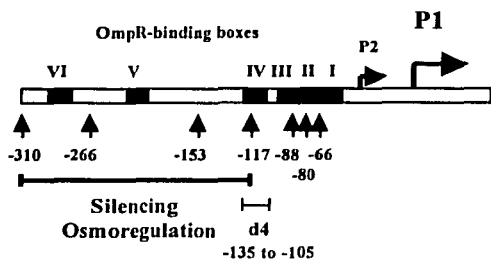


FIG. 1. The *S. enterica* serovar Typhi *ompS15'* upstream regulatory region. The P1 OmpR-dependent promoter, the P2 OmpR-repressed promoter, and the six OmpR-binding boxes (I to VI), as described previously (22), are shown. The number of base pairs upstream of the P1 transcriptional start, as contained in the *ompS1-lacZ* fusions (22), is indicated throughout the region. The long horizontal bar delimits the region required for silencing and osmoregulation. The d4 bar shows the 31-bp deletion from -135 to -105.

Bacterial culture and enzymatic assays. Bacteria were grown in nutrient broth (low osmolarity) or nutrient broth plus 300 mM NaCl (high osmolarity) at 37°C and collected at mid-logarithmic phase. The culture conditions and microplate protein and β -galactosidase assays were as previously described (22).

Random transposon mutagenesis. The *S. enterica* serovar Typhi IMSS-1 and *S. enterica* serovar Typhimurium 14028 wild-type strains were conjugated with *E. coli* SM10 λ *phf*FD1 harboring the *mariner* transposon (Km^r) (32). They were then grown in Luria-Bertani broth (containing, per liter, 10 g of peptone, 5 g of yeast extract, and 10 g of NaCl) or SOC broth (containing, per liter, 20 g of tryptone, 5 g of yeast extract, 0.5544 g of NaCl, 0.1864 g of KCl, 1.2038 g of

TABLE 2. Primers used

Primer	Sequence*
LFhns-S	5'-caaaaatacGtcgaCttgcttaaaggc-3' (<i>SaI</i> site)
RRhns-X	5'-cgattactAgacgaatagagccga-3' (<i>XbaI</i> site)
Mar3-2	5'-cggggactatcagccaacctgtat-3'
S1B-CAT5	5'-ggtgcagggatccgggaat-3'
S1S-CAT3	5'-caagcaggtgcacatctttctgtcat-3'
<i>ompS1</i> -PE	5'-ttgctgcctgcactaataac-3'
<i>ompA</i> -PE	5'-ttgctgcctgcatcatccaa-3'
310b-1	5'-tagctttatcattattttatc-3'
310b-2	5'-atgagttaigtgtttgattga-3'
310b-3	5'-caaagcatcaatacatataaaaa-3'
310b-4	5'-tgctttattggtttttataaac-3'
310b-7	5'-attcttagtcaactatatactctgtattat-3'
310b-8	5'-aataitagtaccctcaacaaaac-3'

* Uppercase letter indicate changes in the primer sequence with respect to the wild type, designed to introduce restriction enzyme sites.

MgSO₄, 0.9522 g of MgCl₂ and 3.2 g of glucose). They were then subcultured in fresh medium and incubated at 37°C with shaking until they reached mid-logarithmic growth phase. Cells were collected by centrifugation and washed once with 1× phosphate-buffered saline (containing, per liter, 8.0 g of NaCl, 0.61 g of Na₂HPO₄, 0.2 g of KH₂PO₄, and 0.2 g of KCl and adjusted to pH 7.4). They were then resuspended in 1× phosphate-buffered saline and plated onto SOC agar for incubation at 37°C overnight. Mutants derived from this conjugation were scraped and resuspended in 0.9% NaCl, plated on MacConkey agar (containing, per liter, 1.5 g of casein peptone, 17.0 g of gelatin peptone, 1.5 g of meat peptone, 10.0 g of lactose, 1.5 g of bile salts, 5.0 g of NaCl, 13.5 g of agar, 0.03 g of neutral red, and 0.001 g of crystal violet [pH 7.2]), and incubated overnight at 37°C. When needed, 12 μ g of tetracycline per ml or 25 μ g of kanamycin per ml was used.

Localization of the *mariner* transposon insertion site in the *Salmonella mu-*

TABLE 1. Relevant bacterial strains and plasmids used

Strain or plasmid	Genotype and/or relevant markers	Reference or source
<i>E. coli</i> strains		
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT gal (dcm) (lon) hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) met(DE3)</i>	Novagen
DH5 α	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Δ(lacZYA-argF)U169 ϕ80ΔlacZΔM15</i>	Invitrogen
SM10 λ <i>pir</i>	<i>thi thr leu tonA lacY supE recA RP4-2-Tc::Mu λpir</i>	18
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Δ(lac-pro) [F'<i>proAB lacT^r lacZΔM15 Tn10</i>]</i>	Stratagene
<i>S. enterica</i> serovar Typhi and Typhimurium strains		
IMSS-1	9, 12, d, VI serotype; reference clinical strain	28
IMSS-41	IMSS-1 Δ <i>ompR::Cm^r</i>	This study
STY <hns99< h=""></hns99<>	IMSS-1 <i>hns99::Km^r mariner</i>	This study
STY9941	STY <hns99 <math="">\Delta<i>ompR::Cm^r</i></hns99>	This study
ATCC 14028s	Wild-type <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	American Type Culture Collection
STM <hns114< h=""></hns114<>	ATCC 14028s <i>hns114::Km^r mariner</i>	This study
STM <hns127< h=""></hns127<>	ATCC 14028s <i>hns127::Km^r mariner</i>	This study
Plasmids		
pACYC184	Vector for cloning of <i>S. enterica</i> serovar Typhi <i>hns</i> , p15A; Tc ^r Cm ^r	New England Biolabs
pACYC184 Δ Tc	pACYC184 containing a <i>NruI-EcoRV</i> deletion within the tetracycline resistance gene	This study
phnsty184	Vector pACYC184 carrying <i>S. enterica</i> serovar typhi wild-type <i>hns::Cm^r</i>	This study
pKD46	oriR101ts, λ Red recombinase system under <i>paraB</i> promoter; Ap ^r	3
pKD3	pANTS γ derivative containing an FRT-flanked Cm ^r gene from pSC140	3
pMC1871	Vector pBR322 carrying a promoterless <i>E. coli lacZ</i> gene; Tc ^r	35
pT6HNS	Vector pMPM-T6M carrying the <i>E. coli hns</i> gene fused to His ₆ under pBAD promoter	V.H. Bustamante et al., unpublished results

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

tants. Bacterial genomic DNA was isolated by using a commercial kit (Aqua Pure genomic DNA isolation kit; Bio-Rad) and digested with either *Bam*HI, *Kpn*I, or *Sal*I. The fragments were cloned into pUC18 or pUC19 vector and selected for Km^r colonies. Clones containing from 1.2 to 4 kb of Insert were selected for sequencing. The DNA sequence near the 3' end of the site of insertion of the *mariner* transposon was determined with the Thermosequase kit (United States Biochemicals), according to the instructions of the manufacturer, or at the sequencing facility at our institute by using the Mar3-2 primer (Table 2). The sequences obtained were compared with those currently available at the National Center for Biotechnology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) by using N-Blast or T-BLAST-X (National Institutes of Health) with the default parameters. The computer-assisted analysis of nucleotide and amino acid sequences was performed with the GENE WORKS (IntellicGenetics), DNA Strider 1.0 (CEA France), Amplify 1.2 (University of Wisconsin), and OLIGO 4.0 (National Biosciences Inc.) software. Graphics were constructed with Cricket Graph-III version 1.0.1 (Computer Associates International, Inc.), and radioactive gels were developed and analyzed with a Phosphor-Imager (Molecular Dynamics).

Cloning of the wild-type *S. enterica* serovar Typhi *hns* gene. The wild-type *S. enterica* serovar Typhi *hns* gene was amplified by PCR with Expand (Boehringer Mannheim Inc.) and cloned into the pACYC184 vector (New England Biolabs). Briefly, *S. enterica* serovar Typhi IMSS-1 genomic DNA was used for PCR amplification with L.Fhns-S (annealing from position -538 to -513 of the serovar Typhi *hns* translational start site) and RRhns-X (annealing from position +630 to +604 of the serovar Typhi *hns* translational termination site) primers (Table 2). The 1,584-bp PCR fragment was digested and cloned into the *Sal*I and *Xba*I sites of pACYC184, giving phnsty184. The identity of the cloned fragment was verified by sequencing.

Purification of H-NS His-tagged protein. Purification of His₆-tagged H-NS protein was performed with Ni-nitrilotriacetic acid resin (QIAExpress; Qiagen) according to the instructions of the manufacturer and the modifications established by V.H. Bustamante et al. (unpublished results). Briefly, *E. coli* BL21(DE3) carrying the pT6HNS plasmid (Table 1) was grown to mid-logarithmic phase. L-(+)-Arabinose (Sigma-Aldrich) was added to a final concentration of 0.1%, and the bacteria were incubated for 3 h at 30°C and 250 rpm. Cells were then pelleted by centrifugation, resuspended in urea buffer (8 M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0]), and disrupted by sonication. The suspension was centrifuged, and the supernatant was filtered through an Ni-nitrilotriacetic acid agarose column (QIAExpress; Qiagen); the column was washed with urea buffer at pH 8.0 and urea buffer at pH 6.0, and finally the bound protein was eluted with urea buffer at pH 4.5. Fractions containing purified His₆-tagged H-NS protein were selected after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and loaded into a Slide-A-Lyzer 10K cassette (Pierce) for extensive dialysis, first in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)-10 mM MgCl₂-20% glycerol-0.5 M NaCl-0.1% Triton X-100-4 M urea and then in the same buffer containing 1 M urea instead of 4 M urea. Finally, dialysis was done in 30 mM Tris-HCl (pH 7.5)-10 mM MgCl₂-20% glycerol-240 mM NaCl-0.1% Triton X-100-3 mM EDTA.

Electrophoretic mobility shift assays. We conducted PCRs that generated *ompS1* products encompassing the length of the regulatory region harbored in representative *ompS1-lacZ* fusions of the pRO series (22), using those plasmids as templates and with oligonucleotide primers S1B-CAT5 (annealing from position 6 to 25 in the pRO plasmid series) and SIS-CAT3 (annealing from position 425 to 398 in pRO310, position 268 to 241 in pRO153, and position 203 to 176 in pRO88). The sites of primer annealing are with respect to the *Pst*I site at the beginning of the *lacZ* reporter gene. These fragments and the enteropathogenic *E. coli* (EPEC) *ler* regulatory and structural gene fragments (100 ng of each), used as positive and negative controls, respectively (Bustamante et al., unpublished results), were mixed with increasing concentrations of His-tagged H-NS in the presence of 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 80 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM dithiothreitol, and 10% glycerol. They were incubated 20 min at 37°C and then separated by electrophoresis in 6% polyacrylamide gels in 1 × Tris-borate-EDTA buffer. The DNA bands were visualized by staining with ethidium bromide.

Analysis of DNA static curvature. The BEND-IT software, from the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology website (http://www.icgeb.org/dna/bend_it.html), was used to identify regions of potential intrinsic curvature. The curvature is calculated as a vector sum of dinucleotide geometries by using the BEND algorithms of Goodsell and Dickerson (11) and is expressed as degrees per helical turn (10.5°/helical turn = 1°/bp). In addition, the mobility of PCR fragments of 152 or 153 bp was analyzed by 8% PAGE at room temperature and at 4°C in 0.5 × Tris-borate-EDTA. The PCR fragments were amplified with primer pairs 310b-1 (annealing from position -303 to -280)-310b-2

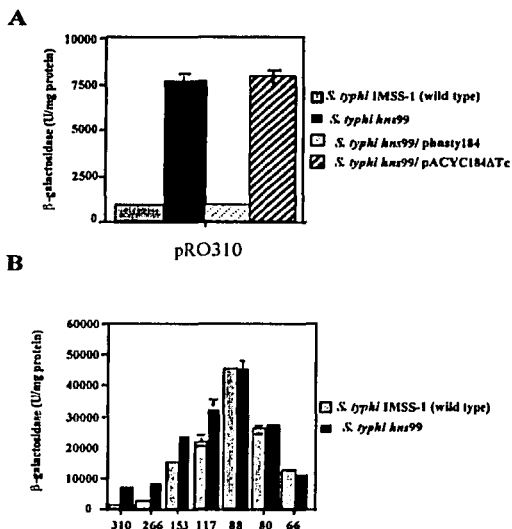


FIG. 2. Derepression of *S. enterica* serovar Typhi *ompS1* in an *hns* background. Bars indicate the specific β-galactosidase activity. (A) Expression in the *S. enterica* serovar Typhi wild-type strain and in the isogenic *hns99* derivative. Complementation was with cloned *S. enterica* serovar Typhi wild-type *hns* or with the pACYC184ΔTc vector. (B) Expression from reporter fusions of different lengths in the *S. enterica* serovar Typhi wild-type strain and in the *hns99* derivative. Numbers indicate the length of the *ompS1* regulatory region fused to *lacZ*, as depicted in Fig. 1. Results are the averages and standard deviations from three independent experiments. An absence of error bars indicates that the standard deviation was too small to be shown.

(-154 to -176), 310b-3 (-226 to -203)-310b-4 (-76 to -101), and 310b-7 (-124 to -95)-310b-8 (+27 to +4) (Table 2; see Fig. 8A).

Primer extension analysis. One microgram of total RNA (for *ompA*) or 50 μg of total RNA (for *ompS1*, in two reaction mixtures with 25 μg each), isolated by using commercial kits (RNeasy [Qiagen] or High Pure RNA isolation kit [Roche]) was denatured at 90°C for 3 min and then slowly cooled to 45°C. The RNA was annealed with [³²P]ATP-labeled *ompA*-PE (annealing from position +3 to -24 with respect to the *S. enterica* serovar Typhi *ompA* translational start site) or *ompS1*-PE (annealing from +57 to +35 with respect to the serovar Typhi *ompS1* translational start site). The oligonucleotide primers were extended with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase at 37°C for 2 h, and the extended products were collected with a Microcon-30 microconcentrator (Amicon) and analyzed by electrophoresis in urea-8% polyacrylamide gels.

RESULTS

Interruption of the *Salmonella hns* gene results in derepression of *ompS1* expression. We used random transposon mutagenesis to identify putative negative effectors of *ompS1* expression. Briefly, *E. coli* SM10 λ *pirpFD1* (harboring the *mariner* transposase; Km^r) was conjugated with the wild-type strain *S. enterica* serovar Typhi IMSS-1 or *S. enterica* serovar Typhimurium 14028 transformed with the *ompS1-lacZ* fusion pRO310. This construct has the longest fused regulatory region (Fig. 1) and had the lowest β-galactosidase activity in both wild-type strains with respect to shorter constructs (22) (Fig. 2B). It produced white colonies on MacConkey Indicator

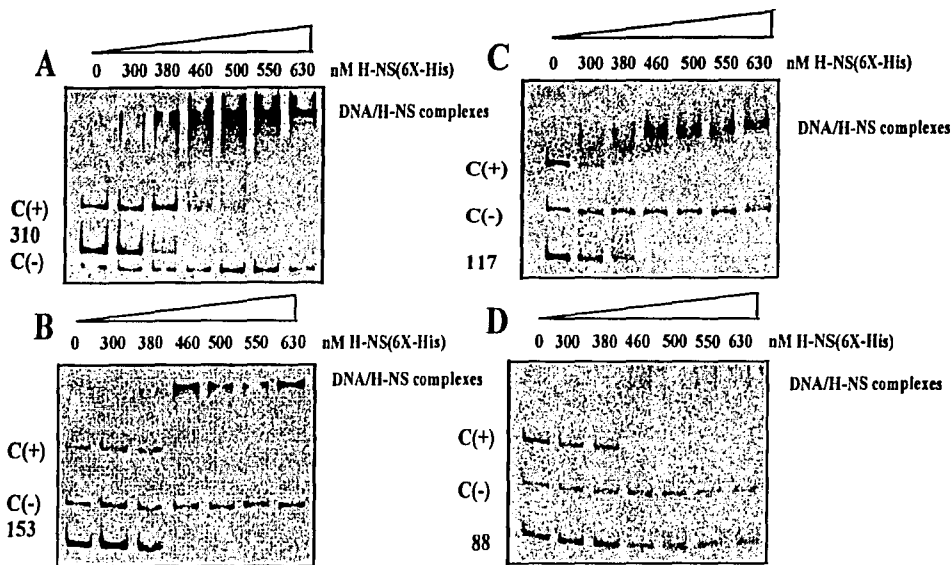


FIG. 3. Binding of H-NS to the *ompS1* upstream regulatory region. Electrophoretic mobility shift assays were carried out with the *ompS1* regulatory region (100 ng), using His_C-tagged H-NS at the indicated concentrations. C(+), is the EPEC *ler* regulatory region, used as a positive control; C(-), EPEC *ler* coding region, used as negative control. 310 (A), 153 (B), 117 (C), and 88 (D), fragments of the *ompS1* regulatory region encompassing the indicated length as shown in Fig. 1. The complexes were separated on 6% polyacrylamide gels.

plates. From approximately 18×10^3 Km^r serovar Typhi mutants and 80×10^3 Km^r serovar Typhimurium mutants, we were able to isolate one serovar Typhi and two serovar Typhimurium red colonies on MacConkey plates. β -Galactosidase assays on cultured samples of these mutants (Fig. 2A; see Fig. 4A) showed a 10-fold derepression of *ompS1* expression compared to that in the wild-type strains.

The DNA flanking the Km^r marker from the mutants was cloned, and the interrupted gene in all three events was identified as *hns*. All of the insertions mapped at or near the region coding for the DNA-binding domain (amino acids 89 to 119 of the 137-residue protein) (5, 7). In *S. enterica* serovar Typhi, the resistance marker inserted into the codon for amino acid 99, and in *S. enterica* serovar Typhimurium, the insertions were in codons 114 and 127 of H-NS. Thus, these mutations were designated *hns99*, *hns114*, and *hns127*, respectively.

In order to further strengthen the evidence for a role of H-NS in *ompS1* expression, we transformed either a plasmid bearing the wild-type *S. enterica* serovar Typhi *hns* gene or the pACYC184 Δ Tc vector plasmid into the mutants. Expression of cloned *hns* was under the control of ca. 500 bp of its own regulatory region, and the clone does not contain any flanking gene upstream or downstream. Upon complementation, *ompS1* expression was restored to low levels close to those observed in the wild-type strain (Fig. 2A). Such complementation was not observed with the pACYC184 Δ Tc vector plasmid.

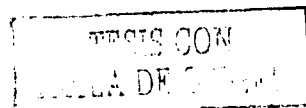
We also analyzed the length of the *ompS1* regulatory sequence needed for the effect by H-NS. The fusions containing

between bp -310 and -117 (Fig. 1) were positively affected by interruption of *hns*, whereas fusions from -88 and downstream were not affected by the *hns* interruption (Fig. 2B). Thus, the region upstream of position -88 was required for negative regulation by H-NS.

The shorter the fusions, the higher was the activity in both the wild-type and *hns* backgrounds, in agreement with the notion that as the fusions are shortened, there is a gradual release of an appropriate structure for repression.

H-NS binds to the upstream regulatory region of *ompS1*. In order to test whether H-NS directly interacted with the *ompS1* regulatory region, we conducted electrophoretic mobility shift assays with PCR fragments encompassing the regulatory region contained in four representative *ompS1-lacZ* fusions (Fig. 3). We were able to detect binding of H-NS to the fragments spanning bp -310, -153, and -117 upstream of the P1 promoter (Fig. 3A to C). In contrast, with a -88 upstream fragment, no shift in mobility was observed (Fig. 3D). All fragments contained 21 bp into the structural gene on their 3' end. These data were consistent with the results of *ompS1* expression, where fusions upstream of bp -88 were derepressed in *Salmonella hns* strains (Fig. 2B).

Osmoregulation of *ompS1* expression in *Salmonella hns* mutants. In the *S. enterica* serovar Typhi IMSS-1 wild-type strain, the low level of *ompS1* expression was not affected by changes in osmolarity (22). Nevertheless, we decided to test the effect on the derepressed *ompS1* activity in the *hns* background in response to osmolarity. Indeed, the derepressed *ompS1* expression was osmoregulated, as it decreased at increasing osmolar-



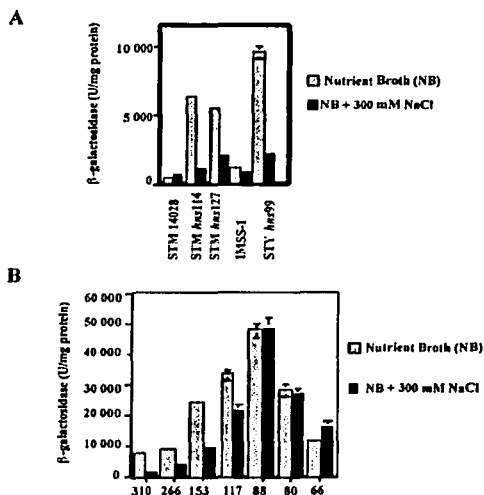


FIG. 4. Osmoregulation of *ompS1* in *Salmonella hns*. (A) Expression in *S. enterica* serovar Typhimurium (STM) and in *S. enterica* serovar Typhimurium (STM) wild-type strains and in their isogenic *hns* derivatives, as assessed with the bp -310 *lacZ* reporter fusion, at low (NB) and high (NB + 300 mM NaCl) osmolarities. (B) Expression in *S. enterica* serovar Typhi *hns99* of *ompS1-lacZ* fusions of different lengths (as shown in Fig. 1) at low and high osmolarities. Error bars indicate SD.

ity in both *S. enterica* serovar Typhimurium and *S. enterica* serovar Typhi (Fig. 4A). This osmoregulation was gradually abolished upon deletion of the region upstream of position -88 . The decrease in expression varied, as it ranged from nearly fourfold in the -310 fusion (ca. 8,000 U of β -galactosidase in low-osmolarity medium versus ca. 1,900 U in high-osmolarity medium) to less than twofold in the -117 fusion (from ca. 32,000 U to ca. 20,000 U), with no effect in the -88 and shorter fusions (Fig. 4B). This dependence on the length of the regulatory region was similar to that observed for the derepressing effect in the *hns* background (Fig. 2B).

Since OmpR is required for osmoregulation of the *ompC* and *ompF* major porin genes (26), we tested whether osmoregulation of *ompS1* in the *hns* mutants was dependent on OmpR: this was possible because there is a P2 promoter that does not require OmpR for activation (22) (Fig. 1). Expression of *ompS1* was derepressed in *S. enterica* serovar Typhi 9941 (*hns99* Δ *ompR* double mutant) (Fig. 5) with respect to the *ompR* strain, and it also decreased at high osmolarity, i.e., even in the absence of OmpR. Fusions containing from bp -310 and up to bp -117 diminished their expression at high osmolarity, whereas no decrease in expression was seen with the -88 construct (Fig. 5). The pattern of expression was remarkably similar to that obtained in the presence of OmpR (Fig. 4B). Indeed, the decrease in expression ranged from almost fourfold in the -310 fusion (ca. 4,100 U of β -galactosidase in low-osmolarity medium versus ca. 1,100 U in high-osmolarity medium) to less than twofold in the -117 fusion (from ca.

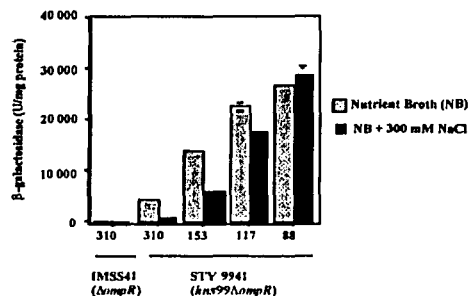


FIG. 5. Osmoregulation in *S. enterica* serovar Typhi 9941 (*hns99* Δ *ompR*). Expression of the *ompS1-lacZ* fusions of different lengths in *S. enterica* serovar IMSS-41A *ompR*, and STY9941 *hns99* Δ *ompR* at low (NB) and high (NB + 300 mM NaCl) osmolarities is shown. The number below each bar indicates the length of the *ompS1* regulatory region fused to *lacZ*. Error bars indicate SD.

22,000 to 17,000 U) (Fig. 5). Hence, the region upstream of bp -88 was also determinant for osmoregulation in the absence of OmpR, as it was for H-NS binding and silencing (Fig. 2 to 4). Again, these data are consistent with the proposal that the upstream region determines an appropriate structure for repression, which occurs at high osmolarity in the absence of H-NS or at both low and high osmolarity in the presence of H-NS.

The identity of the promoters affected by the *hns* interruption was addressed by primer extension analysis (Fig. 6). The expression of chromosomal *ompS1* was not detected in the *S. enterica* serovar Typhi wild-type strain, and transcription from the P1 OmpR-dependent promoter was indeed derepressed in the *hns99* mutant. This activity was lower at high osmolarity. In the double *hns99* Δ *ompR* mutant, the OmpR activation-independent P2 promoter was derepressed, as no activity was detected in a Δ *ompR* mutant, and its activity was lower at high osmolarity. Furthermore, *ompA* transcriptional activity was not affected either by the genetic background or by changes in osmolarity. It is worth noting that the promoter strength for P1 was less than 2% the level for *ompA*, even under derepression in the *hns* background. This was based on the densitometric scan of the autoradiogram and taking into account that the total amount of RNA used to detect the transcriptional start sites for *ompS1* was 50 μ g, whereas for *ompA* it was only 1 μ g. Moreover, P2 showed one-half of the promoter strength of P1 under derepression in the *hns99* Δ *ompR* background (Fig. 6). These results on the activity of the native chromosomal genes reflect the differences in activity observed with the *lacZ* fusion studies (Fig. 4B and 5).

Deletion of a region from bp -135 to -105 results in loss of osmoregulation in *Salmonella hns*. In order to further verify the role of the *ompS1* upstream regulatory region in negative regulation, we analyzed the expression of a *lacZ* fusion containing the bp -310 region with a deletion of 31 bp (from -135 to -105), the pRO310d4 fusion (Fig. 1) (22). We measured expression of the pRO310d4 fusion in *S. enterica* serovar Typhi IMSS-1 (wild type) and in its isogenic Δ *ompR* (IMSS-41), *hns*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

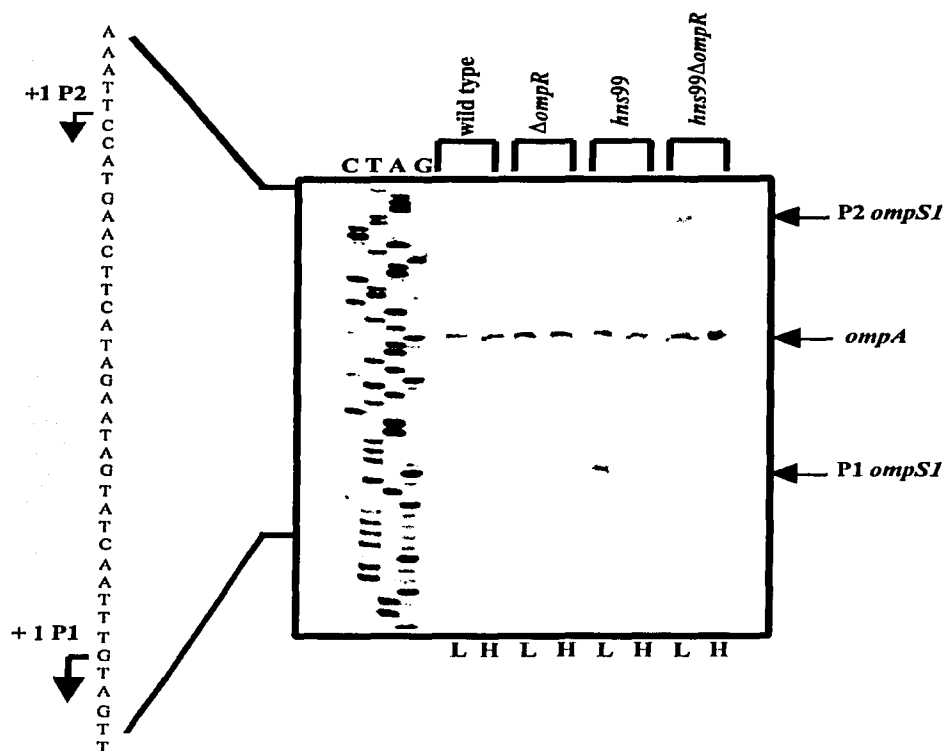


FIG. 6. *ompS1* chromosomal promoter activity at low (L) and high (H) osmolarities in *S. enterica* serovar Typhi strains, as assessed by primer extension. IMSS-1 is the wild-type strain, IMSS-41 is the isogenic $\Delta ompR$ derivative, *hns99* is the isogenic transposon mutant, and STY9941 (*hns99* $\Delta ompR$) is the isogenic double mutant. The DNA ladder sequence for *ompS1* is shown on the left. The bands corresponding to the transcriptional start sites of the OmpR-dependent P1 promoter, the P2 OmpR-repressed promoter, and the *ompA* gene are marked. The amounts of total RNA used were 50 μ g for the *ompS1* transcriptional start site and 1 μ g for *ompA*.

(*hns99*), and *hns99* $\Delta ompR$ (STY9941) mutants (Fig. 7A). As observed previously (22), the mere deletion of this region results in a 20-fold increase in activity in the wild type. Moreover, no osmoregulation was observed in the *hns99* or *hns99* $\Delta ompR$ background, in contrast to that seen with pRO310 (Fig. 4 and 5). Even though some increase was observed in the *hns* strains, this effect was much lower than the 10-fold observed for pRO310 (Fig. 2A and 5).

The notion that the integrity of the -310 region is needed for full H-NS binding and thus derepression in an *hns* background was also shown by electrophoretic mobility shift assays with H-NS. As can be seen in Fig. 7B, the deletion from position -135 to -105 resulted in a lowering of the affinity of H-NS compared to the full -310 region.

The 5' region of *ompS1* is intrinsically curved. It has been proposed that H-NS preferentially binds to curved DNA (16) and that negative osmoregulation of *ompF* involves a DNA loop structure (14). Hence, the possibility that the 5' upstream region of *ompS1* might acquire a curved configuration was tested. Three circularly permuted DNA fragments encompass-

ing the upstream regulatory region, present in pRO310, were analyzed by PAGE at 4°C, where curved fragments migrate anomalously compared to at room temperature. The more centered the curvature on a given fragment, the slower the migration (39). As can be seen in Fig. 8C, at 4°C fragment 1 (position -303 to -154) migrated the slowest, fragment 2 (-226 to -76) had an intermediate migration, and fragment 3 (-124 to $+27$) had the fastest migration. In contrast, all three fragments had the same migration at room temperature (Fig. 8B). This is consistent with the presence of a curved region at the center of fragment 1 and close to the center of fragment 2.

The curvatures predicted by analysis *in silico* were more prominent at positions -230 and -149 , having values of 13 and 11°/10.5 bp of helical turn, respectively. This is consistent with the electrophoretic data. The same *in silico* analysis on the *E. coli* *ompF* 5' regulatory region rendered values of 11 and 12, near those for OmpR-binding box F3 and the integration host factor-binding sites, where regions of bent DNA have been postulated (14).

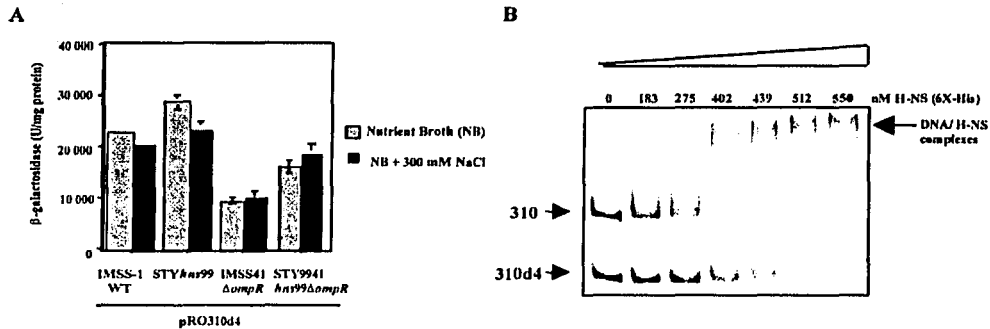


FIG. 7. Effect of the deletion in the *ompS1* regulatory region of 31 bp, from -135 to -105 . (A) Expression of the pRO310d4 fusion in *S. enterica* serovar Typhi IMSS-1 (wild type), IMSS-41 $\Delta ompR$, *hns99*, and STY9941 *hns99* $\Delta ompR$ at low (NB) and high (NB + 300 mM NaCl) osmolarities. Error bars indicate standard deviations. (B) Comparison of the binding of H-NS to PCR fragments representing the -310 and $-310d4$ fusions. The nanomolar final concentrations of His₆-tagged H-NS are indicated at the top of the gel.

DISCUSSION

The *Salmonella ompS1* gene belongs to the porin superfamily. Its function and the *in vitro* signals that lead to the induction of its expression remain unknown so far. Nevertheless, it appears to have a role in the *Salmonella* life cycle, since mutations causing defects in swarming motility and biofilm formation have been found to map in *S. enterica* serovar Typhimurium *ompS1* (19, 38). Moreover, the fact that a serovar Typhimurium *ompS1* mutant is less virulent in mice (O. Rodríguez-Morales et al., unpublished results) points towards a role in pathogenicity. In contrast to the case for the *K. pneumoniae* minor porin OmpK37, which is expressed in the absence of the major porins (6), OmpS1 expression was not enhanced in an *S. enterica* serovar Typhi *ompC ompF* double mutant grown in standard laboratory media (data not shown).

The regulation of *ompS1* shares several features with that of the quiescent *E. coli bgl* operon, which codes for the uptake and utilization of β -glucosides, and with that of a quiescent adenine deaminase gene, *yicP* (*ade*), recently discovered in *E. coli*. First, the mechanisms for their induction in a wild-type background, and thus their putative role in nature, have remained elusive. Second, their expression is negatively affected by the H-NS nucleoid protein; i.e., they are activated when *hns* is mutated. Moreover, derepression of *bgl* has also been observed by deletions in the upstream silencer. Accordingly, integration of insertion elements in the upstream silencer regions has contributed to the derepression of both the *bgl* and *ade* loci (4, 25, 31, 34, 36).

Previously we showed that *ompS1* contains two *cis*-acting regions: one from bp -310 to -88 upstream of the transcriptional start site of the P1 promoter, which is involved in silencing; and other downstream from bp -88 , which is necessary for the positive control of *ompS1* expression (22) (Fig. 1). In order to elucidate the mechanism that maintains a low level of expression of *ompS1*, random transposon mutagenesis was performed in *S. enterica* serovar Typhi and *S. enterica* serovar Typhimurium. We found mutations in *hns* that resulted in the derepression of *ompS1* (Fig. 2A and 4A). All of the transposon insertions mapped to the coding region for the carboxy termi-

nus, at or near the DNA-binding domain. Consistently, in another study, a *TnphoA*-generated mutation in *S. enterica* serovar Typhimurium strain C5 was also found to map at the 3' end of *hns* (12).

In *S. enterica* serovar Typhi, fusions containing sequences upstream of position -88 showed higher levels of expression in the *hns* background with respect to the wild type, whereas those at and downstream of -88 were not affected (Fig. 2B). Moreover, H-NS bound to promoter fragments including sequences up to -117 and further upstream but not to a promoter fragment which includes DNA up to position -88 (Fig. 3). The result that derepression of the -310 construct in *hns99* did not reach the levels attained by the -88 construct and that gradual derepression was observed as the constructs were shortened (Fig. 2B) suggests that the sequences upstream of this position could form a DNA structure that promotes silencing.

In the *S. enterica* serovar Typhi IMSS-1 wild-type strain, *ompS1* expression was not affected by a shift in osmolarity, leading to the proposal that *ompS1* was a nonosmoregulated porin gene (22). The lack of osmoregulation was also observed for *ompS1* with the *lacZ* fusions in wild-type *S. enterica* serovar Typhimurium 14028 (Fig. 4A). However, when *ompS1* expression was derepressed in the *hns* mutants, in either serovar Typhi or serovar Typhimurium, it was negatively regulated in high-osmolarity medium (Fig. 4A). The analysis of *ompS1-lacZ* fusions encompassing different lengths of the regulatory region showed that the negative regulatory region needed for H-NS repression, i.e., upstream of bp -88 (Fig. 2B), was also required for osmoregulation (Fig. 4B). Furthermore, osmoregulation occurred in the absence of OmpR (Fig. 5) and also required this sequence. The ratio of *ompS1* expression at low osmolarity to that at high osmolarity in the *hns99* and *hns99* $\Delta ompR$ strains was almost identical for all of the fusions (Figs. 4B and 5). Hence, both *ompS1* promoters share a common mechanism that leads to lower expression at high osmolarity in the absence of H-NS function. It appears that a repressing structure is formed under these conditions, which is also promoted in the presence of H-NS.

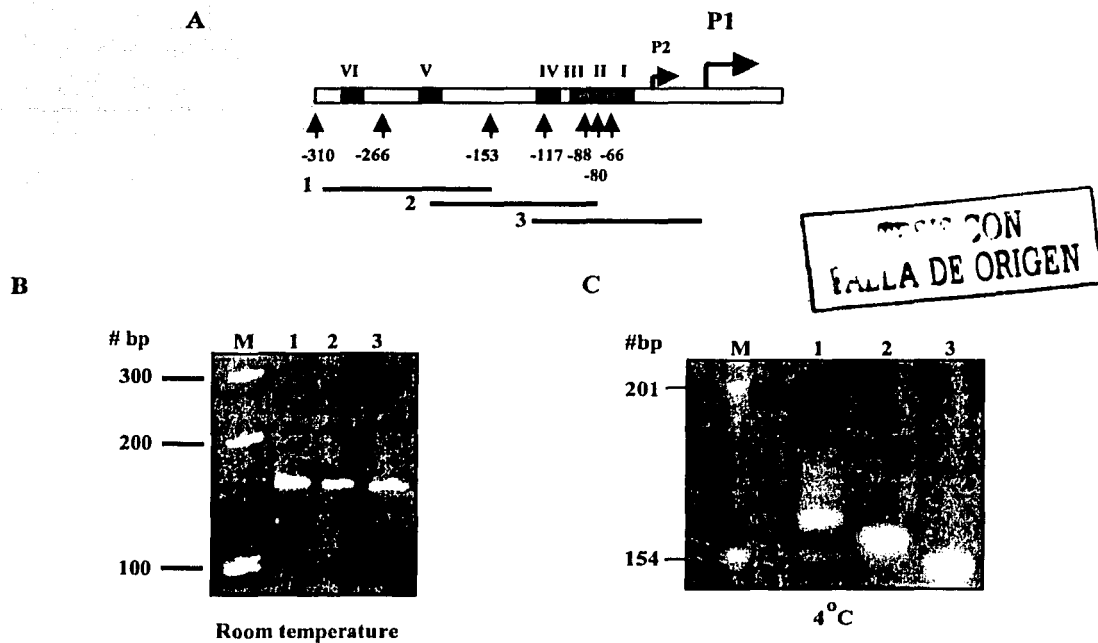


FIG. 8. The *ompS1* 5' upstream region is statically curved. (A) Schematic diagram showing the *ompS1* 5' region. Numbers indicate the length of the regulatory region contained in each *lacZ* fusion. The six OmpR-binding boxes are represented as filled rectangles. Lines 1, 2, and 3, PCR fragments encompassing from -303 to -154 , -226 to -76 , and -124 to $+27$, respectively, of the *ompS1* 5' region. (B and C) PCR fragments 1, 2, and 3 separated by 8% PAGE at room temperature (B) or at 4°C (C). Lanes M, molecular size markers.

As observed with *ompF*, *ompS1* expression decreased at high osmolarity when derepressed in an *hns* strain (Fig. 4B and 5). In this respect, the *ompF* 5' upstream regulatory region has a role in osmoregulation (14, 30). Using the pRO310d4 fusion, which contains the entire bp -310 regulatory region with a 31-bp deletion (from -135 to -105) (Fig. 1), we observed that *ompS1* expression was derepressed 20-fold and was not significantly affected in either the *hns99* or the *hns99* Δ *ompR* mutant; that is, it no longer responded to changes in osmolarity independently of the presence or absence of OmpR (Fig. 7A). Moreover, the binding affinity of H-NS to the 310d4 regulatory region was lower than that observed for the whole -310 region, although it was still higher than that for the -88 region (Fig. 3A and D and 7B). Thus, the integrity of the -310 regulatory region was required for full H-NS repression and osmoregulation. In this regard, the region upstream of bp -88 has an intrinsic curvature, as assessed both in silico and by DNA bending electrophoretic assays (Fig. 8C). Such curvature could determine a structure needed for repression in the presence of H-NS or at high osmolarity in the *hns* background.

Because of the fact that *ompS1* expression in the *Salmonella hns* mutants did not reach the level attained in the shortened, most active pRO88 fusion, the presence of additional negative effectors aside from H-NS cannot be excluded. Thus, we can envision at least three scenarios to explain the negative regu-

lation of *ompS1* expression by high osmolarity. First, as mentioned above, changes in the DNA structure of the regulatory region could hinder expression, possibly by blocking access of the RNA polymerase. Another possibility would occur if H-NS is produced as a stable, truncated protein in our *Salmonella* mutants. In this regard, the participation of the nucleoid protein StpA as an adaptor for truncated H-NS in repressing the expression of the *proU* gene and the *bgl* locus in *E. coli* has been illustrated (10). Hence, the binding of a putative complex formed by truncated H-NS and StpA to the *ompS1* upstream regulatory region could be enhanced at high osmolarity, leading to the observed decrease in *ompS1* expression. Finally, the action of another putative negative effector could be increased at high osmolarity.

Thus, the characterization of the state of the H-NS protein in our mutants, analysis of *ompS1* expression in an *hns stpA* double mutant at both low and high osmolarity, and a search for other negative effectors by mutagenesis in *hns* mutants are experiments that should help in further defining the mechanism involved in the negative regulation of *ompS1* expression.

Hence, our present model to explain the strict negative regulation of *ompS1* implies the initial binding of H-NS at or near the -135 to -105 region, thus allowing the formation of a repressing loop by nucleation of H-NS to the rest of the regulatory region. Such a repressing loop would involve the entire

regulatory region, not only hindering the access of OmpR and thus preventing activation of P1 but also impeding transcription from P2, which otherwise would have been activated once OmpR could not activate P1. At high osmolarity, in the absence of H-NS function, the repressing loop again would be formed by local changes in DNA structure.

It is worth noting that the promoter strength of the native *ompS1* gene on the chromosome is relatively low compared to that of a highly expressed outer membrane protein gene such as *ompA* (Fig. 6). This likely reflects the low abundance of the OmpS1 porin even under derepression in the *hns* strains, an idea that is further confirmed by the lack of detectable OmpS1 in outer membrane protein preparations separated by PAGE and stained with Coomassie brilliant blue (data not shown).

The function of nucleoid-associated proteins, such as H-NS, remains elusive despite extensive efforts towards understanding their physiological role. Moreover, whether osmolarity is a true regulatory signal for *ompS1* in nature or whether it mimics another signal in the environment is an open question. *ompS1* belongs to the pleiotropic H-NS regulatory circuit, where nearly one-third of the genes affected by H-NS are involved in cell envelope physiology and structure, consistent with the notion that genes regulated by H-NS are generally associated with bacterial adaptations to environmental stress (13).

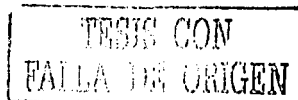
ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Jeannette Barba-León and Víctor Bustamante for helping us with purification of His₆-tagged H-NS and gel mobility shift assays, Rob Edwards for helpful discussions, Marcos Fernández-Mora for constructing the *S. enterica* serovar Typhi IMSS-41 *ΔompR* mutant, Eugenio López-Bustos for oligonucleotide synthesis, Ricardo Oropeza and Linda J. Kenney for helpful discussions and critical reading of the manuscript, Alejandra Vázquez for constructing the *hns99 ΔompR* mutant, and Miryam Villaiba for technical assistance.

M.A.F.-V. was supported by a Ph.D. fellowship (113352) from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and by the PAEP (203336) and DGEF programs of the Universidad Nacional Autónoma de México. J.L.P. is a Howard Hughes International Research Scholar. This work was supported by grants to E.C. from the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA IN229001) and from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico (CONACyT 37738-N).

REFERENCES

- Blasband, A. J., W. R. Marcotte, Jr., and C. A. Schnaitman. 1986. Structure of the *lc* and *nmpC* outer membrane porin protein genes of lambdaoid bacteriophage. *J. Biol. Chem.* 261:12723-12732.
- Chatfield, S. N., C. J. Dorman, C. Hayward, and G. Dougan. 1991. Role of *ompR*-dependent genes in *Salmonella typhimurium* virulence: mutants deficient in both OmpC and OmpF are attenuated in vivo. *Infect. Immun.* 59:449-452.
- Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6640-6645.
- Defez, R., and M. De Felice. 1981. Cryptic operon for beta-galactoside metabolism in *Escherichia coli* K-12: genetic evidence for a regulatory protein. *Genetics* 97:11-25.
- Dersch, P., K. Schmidt, and E. Bremer. 1993. Synthesis of the *Escherichia coli* K-12 nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is subjected to growth-phase control and autoregulation. *Mol. Microbiol.* 8:875-889.
- Doménech-Sánchez, A., S. Hernández-Alles, L. Martínez-Martínez, B. J. Benedi, and S. Alberti. 1999. Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*. Its role in beta-lactam antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* 181:2726-2732.
- Dorman, C. J., C. D. Hinton, and A. Free. 1999. Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria. *Trends Microbiol.* 7:124-128.
- Fernández-Mora, M., R. Oropeza, J. L. Puente, and E. Calva. 1995. Isolation and characterization of *ompS1*, a novel *Salmonella typhi* outer membrane protein-encoding gene. *Gene* 158:67-72.
- Forst, S., and M. Inouye. 1988. Environmentally regulated gene expression for outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:21-42.
- Free, A. M., E. Porter, P. Deighan, and C. J. Dorman. 2001. Requirement for the molecular adapter function of StpA at the *Escherichia coli* *bgl* promoter depends upon the level of truncated H-NS protein. *Mol. Microbiol.* 42:903-917.
- Goodsell, D. S., and R. E. Dickerson. 1994. Bending and curvature calculations in B-DNA. *Nucleic Acids Res.* 22:5497-5503.
- Harrison, J. A., D. Pickard, C. F. Higgins, A. Khan, S. N. Chatfield, T. Ali, C. J. Dorman, C. E. Hormaeche, and C. Dougan. 1994. Role of *hns* in the virulence phenotype of pathogenic salmonellae. *Mol. Microbiol.* 13:133-140.
- Hommals, F., E. Krin, C. Laurent-Winter, O. Soutourina, A. Malpertuy, J. P. LeCaer, A. Danchin, and P. Bertin. 2001. Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol. Microbiol.* 40:20-36.
- Huang, K. J., J. L. Schiebel, and M. M. Igo. 1994. A distant upstream site involved in the negative regulation of the *Escherichia coli* *ompF* gene. *J. Bacteriol.* 176:1309-1315.
- Isibasi, A., V. Ortiz, M. Vargas, J. Paniagua, C. González, and J. Moreno. 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.
- Jordi, B. J. A. M., A. E. Fielder, C. M. Burns, J. C. D. Hinton, N. Dover, D. W. Ussery, and C. F. Higgins. 1997. DNA binding is not sufficient for H-NS-mediated repression of *proU* expression. *J. Biol. Chem.* 272:12083-12090.
- Martínez-Flores, I., R. Cano, V. H. Bustamante, E. Calva, and J. L. Puente. 1999. The *ompB* operon partially determines differential expression of OmpC in *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181:556-562.
- Miller, V. L., and J. J. Mekalanos. 1988. A novel suicide vector and its use in the construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* 170:2575-2583.
- Mireles, J. R., II, A. Toghiani, and R. M. Harshey. 2001. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J. Bacteriol.* 183:5848-5854.
- Mizuno, T., and S. Mizushima. 1990. Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. *Mol. Microbiol.* 4:1077-1082.
- Muthukumar, S., and V. R. Muthukkaruppan. 1993. Mechanism of protective immunity induced by porin-lipopolysaccharide against murine salmonellosis. *Infect. Immun.* 61:3017-3025.
- Oropeza, R., C. L. Sampleri, J. L. Puente, and E. Calva. 1999. Negative and positive regulation of the non-osmoregulated *ompS1* porin gene in *Salmonella typhi*: a novel regulatory mechanism that involves OmpR. *Mol. Microbiol.* 32:243-252.
- Painbeni, E., M. Caroff, and J. Rouviere-Yaniv. 1997. Alterations of the outer membrane composition in *Escherichia coli* lacking the histone-like protein HU. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:6712-6717.
- Pang, T., Z., A. Bhutta, B. B. Finlay, and M. Altwegg. 1995. Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends Microbiol.* 3:53-255.
- Petersen, C., L. B. Møller, and P. Valentin-Hansen. 2002. The cryptic adenine deaminase gene of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 277:31373-31380.
- Pratt, L. A., W. Hsing, K. E. Gibson, and T. J. Silhavy. 1996. From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 20:911-917.
- Prillipov, A., P. S. Phale, R. Koebnik, C. Widmer, and J. P. Rosenbusch. 1998. Identification and characterization of two quiescent porin genes, *nmpC* and *ompN*, in *Escherichia coli* BE. *J. Bacteriol.* 180:3388-3392.
- Puente, J. L., V. Alvarez-Scherer, G. Gosset, and E. Calva. 1989. Comparative analysis of the *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* *ompC* genes. *Gene* 83:197-206.
- Puente, J. L., A. Verdugo-Rodríguez, and E. Calva. 1991. Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* OmpC is influenced differently by medium osmolarity: dependence on *Escherichia coli* OmpR. *Mol. Microbiol.* 5:1205-1210.
- Rampersaud, A., S. L. Harlocker, and M. Inouye. 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.
- Reynolds, A. E., J. Felton, and A. Wright. 1981. Insertion of DNA activates the cryptic *bgl* operon in *E. coli* K-12. *Nature* 293:625-629.
- Rubin, A. J., B. J. Akerley, V. M. Novik, D. J. Lampe, R. N. Husson, and J. J. Mekalanos. 1999. In vivo transposition of *mariner*-based elements in enteric bacteria and mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1645-1650.
- Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schneitz, K. 1995. Silencing of *Escherichia coli* *bgl* promoter by flanking sequence elements. *EMBO J.* 14:2545-2550.
- Shapira, S. K., J. Chou, F. V. Richaud, and M. J. Casadaban. 1983. New



- versatile plasmid vectors of hybrid proteins code by a cloned gene fused to *lacZ* gene sequences encoding an enzymatically active carboxy-terminal portion of β -galactosidase. *Gene* 25:71-82.
36. Singh, J., M. Mukerji, and S. Mahadevan. 1995. Transcriptional activation of the *Escherichia coli* *bgl* operon: negative regulation by DNA structural elements near the promoter. *Mol. Microbiol.* 17:1085-1092.
37. Suzuki, T., C. Ueguchi, and T. Mizuno. 1996. H-NS regulates OmpF expression through *micF* antisense RNA in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178:3650-3653.
38. Toguchi, A., M. Slano, M. Burkart, and R. M. Harshey. 2000. Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 182:6308-6321.
39. Valle, F. 1994. PCR-based method to map the bending locus of DNA molecules. *PCR Methods Appl.* 4:44-45.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- versatile plasmid vectors of hybrid proteins code by a cloned gene fused to *lacZ* gene sequences encoding an enzymatically active carboxy-terminal portion of β -galactosidase. *Gene* 25:71-82.
36. Singh, J., M. Mukerji, and S. Mahadevan. 1995. Transcriptional activation of the *Escherichia coli* *bgl* operon: negative regulation by DNA structural elements near the promoter. *Mol. Microbiol.* 17:1085-1092.
37. Suzuki, T., C. Ueguchi, and T. Mizuno. 1996. H-NS regulates OmpF expression through *micF* antisense RNA in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178:3650-3653.
38. Toguchi, A., M. Siano, M. Burkart, and R. M. Harshey. 2000. Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 182:6308-6321.
39. Valle, F. 1994. PCR-based method to map the bending locus of DNA molecules. *PCR Methods Appl.* 4:44-45.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN