

03072

11

24-



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA



Estudio de la regulación de la expresión del gen *ompS1* de *Salmonella typhi*

TESIS

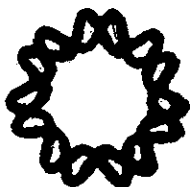
Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Biotecnología

PRESENTA:

Biól. Clara Luz Sampieri Ramírez



Cuernavaca, Morelos

1998

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

26 3507



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUIMICAS**

OF/PMDCB/IBT/030/98

**ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION ESCOLAR
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
P R E S E N T E**

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión del Comité Académico del día 12 de enero de 1998, se aprobó el siguiente jurado de Examen Grado de Maestría en Ciencias, de la BIOL. CLARA LUZ SAMPIERI RAMIREZ, con número de cuenta 9680110-7 y de expediente 30962051 con la tesis titulada " Estudio de la regulación de la expresión del gen ompS1 de Salmonella typhi"

PRESIDENTE	Dr. Edmundo Calva Mercado
SECRETARIO	Dra. Gloria Soberón Chávez
VOCAL	Dr. David René Romero Camarena
SUPLENTE	Dr. Mario Rocha Sosa
SUPLENTE	Dr. Mario Enrique Zurita Ortega

Sin más por el momento me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor. 5 de mayo de 1998

**DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA
COORDINADORA DEL PROGRAMA**

Este trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología, de la UNAM, Departamento de Microbiología molecular en el laboratorio de los Drs. Edmundo Calva Mercado- José Luis Puente García, a partir de enero de 1996 a enero de 1998, bajo la dirección del Dr. Edmundo Calva Mercado. Gracias a la beca de Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACyT), y de la Secretaría de Educación y Cultura (SEC) del estado de Veracruz.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis con especial cariño a:

Mi querido padre, Lucio Victorio Sampieri Gasperín, por conducirme en el camino de la vida en base al ejemplo de su propio tesón, impulso de superación, amor, cultura, constancia, trabajo, lealtad a la familia y apoyo a los demás.

La memoria de mi madre

Clemen, por demostrarme lo que una mujer puede superar cuando existe amor y fé.

Mis adorados hermanos Lucio y Carlos, por llenar de luz y alegría mi vida.

La familia Castillo Guevara, por abrirme las puertas de su cálido hogar.

Cittalli, Gloria y Claudia por su valiosa amistad y apoyo.

Lalo por su gran cariño y paciencia.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de los estudios de maestría y en la elaboración de la tesis, tuve la oportunidad de contar con el apoyo de numerosas personas a las cuales quiero expresar un especial agradecimiento.

De la ciudad de la eterna primavera...

GRACIAS

Dr. Edmundo Calva Mercado por ser un excelente tutor al conducirme en el fascinante mundo de la investigación.

Dr. José Luis Puente García por ser mi cotutor y sincero amigo.

A los integrantes de mi Comité Tutorial y Jurado: Dra. Susana López Charetón, Dr. Mario Soberón Chávez, Dra. Gloria Soberón Chávez, Dr. David René Romero Camarena, Dr. Mario Rocha Sosa y Dr. Mario Enrique Zurita Ortega, por sus valiosas sugerencias y apoyo en el quehacer científico.

A Ricardo, por su paciencia, amistad, apoyo, compañía y ejemplo, en otras palabras por ser mi "jefecito santo".

A Irma y Victor por su amistad y ayuda, así como, por el tiempo que emplearon en aclarar mis dudas, y más que nada por el gran cariño que me brindaron.

También a Clau, Pancho, Rox, Nacho, Martha, Olivia, Toño, Marcos, L. Gabriel, Amapola, Rosalva, Elvira y Doña Leo por ser tan lindos conmigo y por su gran afecto.

A todos mis compañeros de generación por su apoyo y compañía.

Al Instituto de Biotecnología, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría en su seno.

De la ciudad de las flores...

GRACIAS

Lic. Rosario Piña Sánchez por el gran impulso que ha dado a mi vida profesional.

Mtra. Doris García Arguelles y familia por ser un pilar en mi superación, por el inmenso apoyo y cariño recibidos.

Mtro. Arturo Morales Rodríguez, Mtro. Héctor Villegas Mc Kinley y Mtra. Arminda Acosta Vera por el invaluable apoyo recibido en la realización de mis estudios de maestría.

RESUMEN

Estudio de la regulación de la expresión del gen *ompS1* de *Salmonella typhi*

Salmonella typhi (*S.typhi*) es el agente causal de la fiebre tifoidea, una infección sistémica. La membrana externa (ME) protege a *S. typhi* de sales biliares, de enzimas digestivas y le permite escapar de la fagocitosis, entre otras funciones. Uno de los principales componentes de la ME son las proteínas formadoras de poro, llamadas porinas. La síntesis de las porinas está regulada por el sistema de dos componentes EnvZ y OmpR (ambos codificados en el operón *ompB*). EnvZ actúa como una proteína efectora de la osmolaridad del medio externo la cual es una histidin cinasa capaz de fosforilar y desfosforilar a OmpR. OmpR es un activador transcripcional que actúa dependiendo del grado de fosforilación. En nuestro laboratorio, nos encontramos interesados en investigar la función y los mecanismos moleculares que regulan la expresión de las porinas de *S. typhi*. De esta manera fue posible el aislamiento de *ompS1*, un nuevo gen que codifica para una porina minoritaria de *S. typhi*. Estudios previos mostraron que el gen posee, en su región reguladora, 7 dominios con similitud a la secuencia consenso que reconoce OmpR, un dominio con baja similitud a la secuencia que reconoce el regulador global IHF y, por medio de fusiones traduccionales al gen reportero *lacZ*, se ubicó una región en *cis* de control negativo y otra de control positivo. En este trabajo, con la finalidad de investigar el papel del operón *ompB*, se transformó una mutante de *S. typhi* y de *E.coli* carentes de este operón, con las fusiones traduccionales al gen reportero *lacZ* y se observó que la expresión de las fusiones se abatía respecto a las cepas silvestres. Los resultados obtenidos comprobaron que, efectivamente, el gen es dependiente de OmpR para su activación. También se descartó el posible papel que pudiera tener IHF respecto a la regulación de la expresión de *ompS1*; así mismo, se descartaron un conjunto de condiciones ambientales de crecimiento como cambio de osmolaridad, temperaturas extremas, intervalo de pH, presencia de estrés oxidativo, crecimiento en medio para el cultivo de células eucariontes, anaerobiosis, presencia de Polimixina B, choque ácido con y sin adaptación a pH 5.3 fueran capaces de inducir la expresión de *ompS1*.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	7
OBJETIVOS.....	9
MATERIALES.....	10
METODOS.....	16
RESULTADOS.....	22
DISCUSION.....	26
CONCLUSIONES.....	29
FIGURAS.....	30
BIBLIOGRAFIA.....	41
APENDICE.....	48

INTRODUCCION

Salmonella typhi (*S. typhi*) es el agente causal de la fiebre tifoidea (FT). La FT es una infección sistémica que se manifiesta clínicamente por intensos dolores de cabeza, diarrea, fiebre, anorexia y en algunos casos escalofríos, convulsiones y delirio. Las complicaciones más frecuentes son hemorragia intestinal e inflamación del hígado (Calva et al., 1988; Salvers y Whitt, 1994). Por su incidencia de 16 millones de casos anuales, causando cerca de 600,000 muertes, la FT representa un grave problema de salud a nivel mundial (Ivanoff, 1995). De aquí se desprende parte de la importancia que tiene la investigación sobre la biología molecular de *S. typhi*, la cual genera conocimientos que pueden ser de utilidad hacia el desarrollo de vacunas, métodos de diagnóstico y la comprensión de la respuesta inmune y los fenómenos implicados en la interacción hésped-bacteria (Calva et al., 1988).

Generalidades acerca de *S. typhi*

S. typhi es un bacilo patógeno gram-negativo, anaerobio facultativo y no esporulado, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Posee flagelos peritricos, por lo tanto es una bacteria móvil. Dentro de sus características bioquímicas más importantes podemos citar:

- requerimiento de triptófano como factor de crecimiento
- incapacidad para:
 - crecer en medio mínimo*
 - emplear citrato como única fuente de carbono
 - producir gas a partir de glucosa u otros azúcares
 - descarboxilar ornitina
 - fermentar lactosa
- carece de actividades de ureasa, fenilalanina desaminasa, lipasa y ribonucleasa.
- produce catalasa y ácido sulfhídrico (Le Minor, 1984).

Pertenece al serotipo 9,12,d,Vi; esta clasificación se basa en la unidad repetitiva del antígeno somático, también conocido como antígeno O (9,12), el cual forma parte del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa (ME); el antígeno flagelar H (d) y el antígeno capsular Vi (Hook. 1990).

S. typhi es un patógeno exclusivo del hombre, por lo que el conocimiento de la patogenia y los mecanismos moleculares involucrados en la interacción con el huésped no se encuentran totalmente dilucidados, dada la carencia de un modelo animal. El modelo más aceptado para la realización de dichos estudios es el del ratón, huésped natural de *S. typhimurium* dado que esta bacteria produce una infección en el ratón análoga a la FT en el hombre. También se ha recurrido a la investigación de la interacción de *S. typhi* con células en cultivo (Groisman et al., 1990).

Generalidades acerca de la fiebre tifoidea

La FT es una infección adquirida por ingestión de alimentos o agua contaminada con heces fecales de un portador. La enfermedad puede ser fatal, se sabe que aproximadamente el 10% de las personas que no se someten a un tratamiento médico mueren. Lo contrario ocurre con personas expuestas de manera natural al microorganismo, las cuales difícilmente muestran síntomas y pueden ser portadoras de la bacteria por meses e inclusive años después de la colonización (Salysers y Whitt, 1994). La FT es un problema importante de salud pública en muchos países en desarrollo, aunque es difícil estimar el impacto real, debido a que el cuadro clínico puede ser confundido con otras infecciones febriles (Ivanoff, 1995).

El periodo de incubación de *S. typhi* es largo; varía desde 1 semana hasta 1 mes después de la ingestión inicial de la bacteria. Se presume que *S. typhi* entra al cuerpo a través de las células M de las placas de Peyer, pasando al sistema sanguíneo. Una vez allí, es fagocitada por macrófagos, en donde se ha postulado que se multiplica, para invadir después los nódulos linfáticos del mesenterio, el bazo, el hígado y eventualmente la vesícula biliar, para finalmente producir una bacteremia (Calva et al., 1988; Finlay y Falkow, 1989). En la virulencia de la bacteria, participan un gran número de genes, los cuales son regulados por diferentes factores ambientales como pH, anaerobiosis. fuente de

carbono y osmolaridad (Miller, 1991). Los síntomas de la FT probablemente se deban a que el LPS media la liberación de citocinas. Hasta el momento, no se conocen exotoxinas liberadas por *S. typhi*. Para el tratamiento de esta infección, los derivados de quinolonas y cefalosporinas de tercera generación han mostrado ser efectivas, particularmente la ciprofloxacina suministrada por vía oral (Wallace et al., 1993).

Los métodos de diagnóstico de la FT son variados. El más comúnmente usado es el método serológico clásico, la prueba de Widal, consistente en la detección de anticuerpos contra los antígenos O y H de *S. typhi*. Dicha prueba resulta ser poco informativa, sobre todo en áreas endémicas donde de forma natural el título de anticuerpos es alto sin haber infección activa (Edelman y Levine, 1986). Otros métodos consisten en la prueba de inmunoensayo enzimático ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay); hemaglutinación basada en la presencia de anticuerpos contra el antígeno Vi (Macario, 1992); cultivo bacteriológico a partir de muestras de sangre y médula ósea (Hoffman et al., 1986; Edelman y Levine, 1986). En nuestro laboratorio, fue posible la implementación de un ensayo ELISA, para la detección de anticuerpos séricos en la primera semana de la enfermedad, usando preparaciones de proteínas de membrana externa (PME) de *S. typhi* como antígenos (Verdugo et al., 1993). Así mismo, se montó un sistema que permite identificar específicamente a *S. typhi* por medio de un PCR (polymerase chain reaction) a partir de DNA genómico, basándose en la diferencia del tamaño del producto generado o por la amplificación específica de un fragmento de DNA (Calva et al., 1997)

La membrana externa

La ME está separada de la membrana interna (MI) o citoplásmica por una capa de peptidoglicano y el periplasma. El peptidoglicano le confiere a la bacteria morfología celular y rigidez; por su parte, en el periplasma se encuentran polipéptidos, azúcares y proteínas con diversas funciones (Fig. 1) (Verhoef et al., 1979; Nikaido, 1996). La ME protege a la bacteria de agentes nocivos, deteniendo su penetración; permite el paso de nutrimentos y de los productos de desecho (Nikaido y Vaara, 1985). En el caso de las bacterias entéricas, la ME cumple con funciones específicas, como son protección a sales biliares y enzimas digestivas; adicionalmente a los

patógenos les permite el escapar de la fagocitosis; resistencia al complemento; e interacción con anticuerpos, bacteriofagos y células eucariontes.

Componentes de la membrana externa

Lípidos

Los principales lípidos de la ME son los fosfolípidos: fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol y cardiolipina, así como, LPS con una distribución totalmente asimétrica.

El LPS es un molécula de alto peso molecular cargada negativamente; su estructura se divide en tres regiones:

- El lípido A, porción insertada en la ME de carácter hidrofóbico.
- La parte central ("core"), la cual comprende de 8 a 12 unidades de azúcares variables, de carácter hidrofílico.
- El antígeno O, constituido de 3 a 5 unidades de azúcares, se encuentra asociado covalentemente a la parte central, su naturaleza es hidrofílica (Hancock, 1997).

Proteínas

Las proteínas de membrana externa (PME) constituyen casi la mitad de la masa de la membrana por lo que se propone juegan un papel importante en la estabilización de la estructura (Nikaido y Vaara, 1985). Se han reportado entre otras:

A) La lipoproteína de mureína, la cual es un proteína pequeña (7,200 Da) que existe en un gran número, 7×10^5 por célula. Cerca de un tercio de esta proteína se encuentra unida covalentemente a la capa de peptidoglicano.

B) Proteínas formadoras de canales específicos, como: LamB receptor del fago λ , canal por

el cual atraviesan maltosa y maltodextrinas; la proteína T6 la cual es receptor del fago T6 forma un canal para nucleósidos, y la proteína ScrY, la cual forma un canal para la entrada de sacarosa a la célula.

C) Proteínas receptoras de alta afinidad que transportan vitaminas y ácidos grasos, entre otros solutos. Existen también proteínas involucradas en importar-exportar otras proteínas y posibles drogas (Nikaido, 1996).

D) Proteínas formadoras de poro, llamadas porinas; éstas se conforman triméricamente de forma estable (Nikaido y Vaara, 1985). Se ha reportado que en *E.coli* OmpC y OmpF (outer membrane protein) son las porinas mayoritarias; existen aproximadamente 10^5 moléculas por cada célula de cada una de estas proteínas (Lugtenberg y Van Alphen, 1983). La síntesis de las porinas está regulada por un sistema de dos componentes, constituido de las proteínas EnvZ y OmpR (Fig. 2), ambas codificadas en el operón *ompB*. EnvZ es una histidina cinasa de 450 aminoácidos (aa) que se localiza en la membrana interna, donde actúa como proteína sensora de la osmolaridad del medio externo; un aumento en la osmolaridad resulta en su autofosforilación en el residuo de H253. OmpR es una proteína soluble de 239 aa que, al ser fosforilada por EnvZ en el residuo de D55, se une al DNA de la región reguladora de los genes *ompC* y *ompF*, modulando su activación. En condiciones de baja osmolaridad *E.coli* sintetiza preferencialmente OmpF, mientras que OmpC no se expresa. En cambio, cuando crece en condiciones de alta osmolaridad, OmpC es expresada preferencialmente, mientras que OmpF se reprime (Van Alphen y Lugtenberg, 1977; Hall y Silhavy, 1981; Slauch, 1989). En *S. typhi*, al contrario que en *E.coli*, OmpC no se reprime en baja osmolaridad, mientras que la síntesis de OmpF sí se osmoregula (Puente et al., 1991). En nuestro laboratorio, nos encontramos interesados en investigar la función y los mecanismos moleculares que regulan la expresión de las porinas de *S. typhi*. De esta forma, se han aislado, caracterizado y secuenciado los genes *ompC*, *ompF*, *phoE* (porina que se expresa en ayuno de fosfatos) y los genes que codifican para las proteínas reguladoras OmpR/EnvZ. Así mismo, se han aislado los genes *ompS1* y *ompS2*, que actualmente son motivo de investigación (Puente et al., 1987; Torres, 1995; Martínez-Flores et al., 1995; Fernández-Mora et al., 1995, Oropeza et al., proyecto de doctorado).

En *E.coli*, la expresión de las porinas mayoritarias puede ser influida, aparte de la osmolaridad, por otros factores como son: la temperatura, condiciones anaeróbicas, el estrés oxidativo, los antibióticos, la presencia de ácidos débiles, el pH, nutrientes y antisentido de RNA (*micF* para el caso de *OmpF*). Así mismo, se ha propuesto que reguladores globales como IHF, Lrp, SoxS y RpoS, participan en dichos procesos (Tsui et al., 1988; Huang et al., 1990; Ramani et al., 1994; Heyde y Portalier, 1987; Pratt et al., 1996; Hancock et al., 1997). En *S. typhi*, se ha reportado que la expresión de las porinas mayoritarias se ve influida por la temperatura y condiciones anaeróbicas (Mora et al., 1992).

Importancia del estudio de las porinas

Las investigaciones acerca de los mecanismos de la regulación genética de porinas de bacterias entéricas, especialmente de *S. typhi*, resultan ser de gran interés para nosotros, por diversos hechos entre los cuales podemos mencionar: la presencia de anticuerpos específicos dirigidos contra ellas en sueros de pacientes con FT, por lo cual resultan ser valiosas para el diagnóstico (Verdugo et al., 1993); el efecto hemolítico que poseen las porinas de *S. typhi* sobre eritrocitos humanos (Calderón et al., 1984); la disminución de la virulencia de mutantes de *S. typhimurium ompC ompF* y *ompR* (Dorman et al., 1989); la capacidad de las porinas de *S. typhimurium* de ser inmunógenos al conferir protección duradera en ratones (Udhayakumar y Muthukkaruppan 1987; Isibasi et al., 1988); la participación de la *OmpC* de *Shigella flexneri* (*S. flexneri*), análoga a *OmpC* de *S. typhi*, en el proceso invasivo (Bernardini et al., 1993) y la participación de las porinas de *S. typhimurium* en la liberación de citocinas y activación del complemento (Galdiero, 1984, 1990, 1993).

ANTECEDENTES

Usando como sonda heteróloga el gen *ompF* de *E. coli*, en nuestro grupo de investigación fue posible el aislamiento de un nuevo gen de *S. typhi*, llamado ahora *ompSI*. *ompSI* codifica para una PME de 373 aa (41 kDa) como producto maduro, con un péptido líder de 21 aa, conteniendo residuos altamente conservados, que han sido implicados en la formación del poro. Los porcentajes de identidad/similitud de la secuencia de aa de OmpSI con otras porinas son: *S. typhi* OmpC 66/78, OmpF 59/65 y PhoE 59/67; *S. typhimurium* OmpF 58/76; *E. coli* OmpC 67/79, OmpF 62/76 y PhoE 62/78. El alineamiento de la secuencia de aa de OmpSI con otras porinas, muestra la presencia de zonas variables que podrían corresponder a las regiones expuestas; así mismo, 16 regiones conservadas, que corresponderían a las 16 tiras β que atraviesan la membrana (Fig. 3). Por análisis de hibridación tipo Southern, se sabe que *ompSI* se encuentra conservado entre las diferentes especies del género *Salmonella*, con excepción de *S. worthington* y *S. arizonae*. Por la secuencia nucleotídica que flanquea al gen, se sabe que *ompSI* no tiene un origen lamboide.

OmpSI, a diferencia de las porinas mayoritarias OmpC y OmpF, es indetectable en preparaciones de PME teñidas con azul de Coomassie, a menos que su expresión esté bajo el control de un promotor fuerte e inducible como *tac* (Fig. 4). En la región reguladora de *ompSI*, se encuentran 7 dominios con similitud a la secuencia consenso que reconoce el activador transcripcional OmpR, distribuidos de una manera única. Así mismo, se localiza una región que dada su similitud y posición se pensó pudiera ser reconocida por el regulador global IHF, ("Integration Host Factor"), (Fig. 5) (Fernández-Mora et al., 1995).

Los resultados de la determinación de la actividad β -Galactosidasa, de fusiones traduccionales, entre fragmentos de distintos tamaños de la región reguladora de *ompSI* y el gen reportero *lacZ*, contenidas en *S. typhi*, sugieren que la región mínima reguladora del gen está comprendida en 310 nucleótidos (nt) corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción del promotor P1: los nt comprendidos entre el 88 y el 310 forman una región en *cis* involucrada en el control negativo, dado que si estos nt se van removiendo la expresión de las fusiones va

aumentando; los comprendidos corriente abajo del nt 88, parecen formar una región en *cis* de control positivo, dado que si estos nt se van removiendo la expresión de las fusiones va disminuyendo (Fig. 5). Este gen al removerle parte de la región reguladora, tiene la capacidad de expresarse hasta 10 veces más que una porina mayoritaria.

Con la finalidad de investigar el papel del operón regulador *ompB*, se transformó una mutante de *S. typhi*, carente de este operón, con un plásmido que expresa a OmpS1 a niveles similares a los de una porina mayoritaria en una cepa silvestre, dado que en él se eliminó parte de la región reguladora que ejerce el control negativo y se conservó la región involucrada en el control positivo, es decir, del nt 269 para abajo. La mutante mostró una disminución en la expresión de las porinas mayoritarias OmpC y OmpF, al igual que de OmpS1, lo cual demostró que el gen *ompS1* es también dependiente de OmpR para su activación (Fig. 4) (Oropeza et al., proyecto de doctorado).

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la regulación de la expresión de *ompS1* en respuesta a los reguladores OmpR, IHF y a algunas condiciones ambientales de crecimiento.

Objetivos específicos

- 1.- Definir el efecto del activador transcripcional OmpR en la expresión de fusiones traduccionales *ompS1-lacZ*.
- 2.- Definir el efecto del regulador global IHF en la expresión de fusiones traduccionales *ompS1-lacZ*.
- 3.- Analizar la regulación de la expresión de *ompS1*, en respuesta a distintas condiciones ambientales de crecimiento, como son: cambio de osmolaridad; intervalo de temperaturas; intervalo de pH; presencia de estrés oxidativo; presencia de polimixina B; crecimiento en medio de cultivo de células eucariontes; anaerobiosis; choque ácido con y sin adaptación a pH 5.3.

MATERIALES

Cepas

Cepa	Características	Referencia
<i>S. typhi</i> IMSS-1	Silvestre, serotipo (9, 12, d, Vi), aislado clínico de México, D.F.	Puente, 1987
<i>S. typhi</i> 81	Derivada de IMSS-1 $\Delta ompB$	Martinez-Flores et al., artículo sometido.
<i>E. coli</i> MC4100	F ⁺ , Δlac , <i>rpsL150</i>	Hall y Silhavy, 1981
<i>E. coli</i> SG480 Δ 900	Derivada de MC4100 $\Delta ompB$	Garret et al., 1985
<i>E. coli</i> N99	Silvestre	Tsui et al., 1988
<i>E. coli</i> K5185 IHF-	Derivada de N99 $\Delta himA82$	Tsui et al., 1988

Plásmidos

Plásmido	Características	Referencia
pMC1871	Vector para fusiones traduccionales al gen reportero <i>lacZ</i>	Miller et al., 1972
pROn	Derivados de pMC1871, en el sitio de <i>SmaI</i> se clonaron fragmentos de diferente longitud de la región reguladora de <i>ompSI</i> . n=número de nt clonados corriente arriba a partir del sitio de inicio de la transcripción de P1.	Oropeza et al., proyecto de doctorado
pBR325	Vector que se utilizó para clonar regiones reguladoras de <i>ompSI</i> fusionadas al gen reportero <i>lacZ</i>	Balbás et al., 1986
pCLn	Derivado de pBR325, en el sitio de <i>PstI</i> , se clonaron fragmentos de diferente longitud de la región reguladora de <i>ompSI</i> fusionadas al gen reportero <i>lacZ</i> . n=número de nt clonados corriente arriba a partir del sitio de inicio de la transcripción de P1.	Este trabajo

Medios de cultivo

Medios líquidos

-Medio de Luria-Bertani (LB)

Extracto de levadura	10 g
NaCl	5 g
Triptona	10 g

Se aforó a un litro con agua, se ajustó el pH a 7.5 con NaOH y se esterilizó.

-Medio nutritivo (MN)

Caldo nutritivo	7 g
Extracto de levadura	1 g
Glicerol	2 ml
K ₂ HPO ₄	3.7 g
KH ₂ PO ₄	1.3 g

Se aforó a un litro con agua y se esterilizó.

-Para el caso de las condiciones ambientales empleadas se añadieron los siguientes reactivos:

Alta osmolaridad: 0.3 M de NaCl

Intervalo de pH: 1M de HCl ó 10N de NaOH.

Presencia de estrés oxidativo: H₂O₂ (J. T. Baker) a una concentración final de 125 µM y 300 µM.

Presencia de polimixina B (Sigma): se agregó, disuelta en agua, a una concentración final de 0.625, 1.25, 2.5, 4, 4.5 y 5 µg/ml (Zaiger y Neidhardt, 1993).

-Medio SOC

Extracto de levadura	0.5%
Tryptona	2 %
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucosa	20 mM

-Medio Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Medio para el cultivo de células eucariontes, para su preparación se siguieron las recomendaciones del proveedor (Gibco BRL), se añadió 1% de LB.

Médios sólidos

Para preparar medios sólidos se agregaron 15 g de bactoagar por cada litro de solución.

Soluciones

-TAE (Tris-Acetatos EDTA) 50X

Trizma base	242 g
Acido acético glacial	57.1 g
EDTA	37.2 g

-Solución de transformación

CaCl ₂	100 mM
MgCl ₂	5 mM
Tris-HCl, pH 7.5	5 mM

-Amortiguador SET (Sacarosa-EDTA -tris) 20 %

Sacarosa	20 %
EDTA	50 mM
Tris-HCl, pH 7.6	50 mM

-Mezcla lítica

NaOH	0.2 N
SDS	1 %

-Colorante azul de bromofenol

Azul de bromofenol	0.25 %
Cianol de xileno	0.25 %
Ficol tipo 400 en agua	15 %

-PBS (amortiguador de fosfatos salino) 10X

NaCl	80 g
Na ₂ HPO ₄	6.1 g
KH ₂ PO ₄	2 g
KCl	2 g

Se aforó a un litro con agua, se ajustó el pH a 7.4.

-Amortiguador Z 5X

K_2HPO_4	40.21 g	
KH_2PO_4	13.8 g	
NaCl	1.9 g	
$MgSO_4$		0.61 g

Se aforó a 500 ml con agua, se ajustó el pH a 7.

Soluciones para la cuantificación de proteínas

-Solución A

$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	0.845 g
-----------------------	---------

Se aforó a 50 ml con agua.

-Solución B

Tartato de Na y K	1.69 g
-------------------	--------

Se aforó a 50 ml con agua.

-Solución C

Na_2CO_3	30.8 g
NaOH	6.16 g

Se aforó a 100 ml con agua.

-Solución D

Solución A	1 ml
Solución B	1 ml
Solución C	98 ml

-Solución E

Folin	11.83 ml
Agua	70 ml

Soluciones para la microdeterminación de la actividad β -Galactosidasa

-Solución A

Amortiguador Z 5X	32.67 ml
β -Mercaptoetanol	114 μ l
se aforó 95.6 ml con agua	
Tritón 10%	2.2 ml
Lisozima 12 mg/ml	2.2 ml

-Solución B

O-Nitrofenil β D-Galactopiranosido (ONPG) 0.099 gr
(Sigma)

Se aforó a 100 ml con agua.

Antibióticos

Antibiótico	Proveedor	Concentración empleada
Estreptomicina (Str)	Sigma	30 μ g/ml
Kanamicina (Km)	Boehringer mannheim	30 μ g/ml
Tetraciclina (Tc)	Boehringer mannheim	12 μ g/ml
Cloranfenicol (Cm)	Sigma	20 μ g/ml

Enzimas de restricción

*Pst*I (BioLabs), *Ssp*I (BioLabs), *Bam*HI (Boehringer mannheim)

Otras enzimas

β -Galactosidasa (Boehringer mannheim), RNasa A (Boehringer mannheim)

Otros reactivos

Albúmina bovina (Sigma), Placas de ELISA (Costar)

MÉTODOS

Purificación de DNA de plásmido (Maniatis, 1982)

- 1.- Se inoculó la cepa transformada con el plásmido que se deseaba purificar, en 5 ml de LB conteniendo el antibiótico correspondiente. Se incubó toda la noche a 37°C, con agitación.
- 2.- Se concentró el cultivo en tubos Eppendorf de 1.5 ml.
- 3.- Se resuspendió la pastilla en 1 ml de amortiguador SET.
- 4.- Se centrifugó 1 min a 12k rpm; se tiró el sobrenadante y se resuspendió en 150 µl de amortiguador SET.
- 5.- Se agregaron 30 µl de RNasa (10 mg/ml) y 400 µl de mezcla lítica. Se mezcló, se incubó a 4°C por 15 min.
- 6.- Se agregaron 300 µl de acetato de amonio pH 7.5, se mezcló y se incubó una hora a 4°C.
- 7.- Se centrifugó 10 min a 12k rpm, se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo.
- 8.- Se añadieron 200 µl de fenol y se agitó con la mano 3 minutos.
- 9.- Se añadieron 200 µl de alcohol isoamílico-cloroformo y se agitó con la mano 3 minutos.
- 10.- Se centrifugó 10 min a 12k rpm, se pasó la fase acuosa a un tubo limpio.
- 11.- Se repitió del paso 8 al 10.
- 12.- Se añadieron 500 µl de isopropanol, se agitó. Se incubó 30 min a 4°C.
- 13.- Se centrifugó 10 min a 12k rpm y se desechó el sobrenadante.
- 14.- Se lavó dos veces con 800 µl de etanol al 70%, se centrifugó 10 min a 12k rpm cada vez.
- 15.- Se secó la pastilla al vacío y se resuspendió en 30 µl de agua tridestilada.
- 16.- Se revisó la presencia de DNA plasmídico en un gel de agarosa al 1% (Bio-Rad). El DNA obtenido se almacenó a -20°C.

Electroforesis en geles de agarosa

Las preparaciones de DNA se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%. La electroforesis se realizó en solución amortiguadora TAE 1X y se corrió a 100 volts. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio 0.5 µg/ml, y el DNA se visualizó con luz ultravioleta de onda corta en un transiluminador (Stratagene). Se tomaron fotografías con una cámara tipo Eagle Eye Still Video System (Stratagene).

Digestión de DNA con enzimas de restricción

Las condiciones para las reacciones fueron las recomendadas por los proveedores.

DNA	100 a 500 ng
Amortiguador (10X)	1X
Enzima	1 unidad/µg de DNA
Agua	la necesaria

Para la incubación de las digestiones se siguieron las recomendaciones del proveedor.

Transformación de células por CaCl₂ (Maniatis, 1982)

a) Preparación de células competentes.

- 1.- Se inoculó la cepa a transformar en 5 ml de LB con el antibiótico correspondiente.
- 2.- Se incubó toda la noche a 37°C con agitación.
- 3.- Se inocularon 200 µl del cultivo de toda la noche en 50 ml de LB.
- 4.- Se incubó 3 horas aproximadamente a 37°C en agitación.
- 5.- Se pasó el cultivo a tubos estériles de 50 ml.
- 6.- Se centrifugó 10 min a 10k rpm a 4°C.
- 7.- Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 20 ml de la solución de transformación fría.

8.- Se centrifugó 10 min a 10k rpm a 4°C.

9.- Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 20 ml de solución de transformación fría.

10.- Se incubó en hielo, por 1 hora.

11.- Se centrifugó 10 min a 6k rpm a 4°C.

12.- Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 2 ml de solución de transformación.

b) Transformación

1.- En tubos Eppendorf de 1.5 ml, se colocaron 200 µl de células competentes y de 50 a 100 ng de DNA del plásmido a transformar.

2.- Se incubó 45 min en hielo.

3.- Se agregó a cada tubo 1 ml de medio SOC y se incubó 1 hora a 37°C con agitación.

4.- Se sembró por extensión en cajas con LB sólido con el antibiótico adecuado.

5.- Se incubó toda la noche a 37°C.

6.- Se seleccionaron las colonias que crecieron para extraer DNA de plásmido y digerir con enzimas de restricción.

Curva de crecimiento bacteriano

1.- A partir de un glicerol se inoculó la cepa deseada en 5 ml de MN, con el antibiótico adecuado. Se incubó 12 horas a 37°C con agitación.

2.- De este cultivo se reinocularon 25 µl en 5 ml de MN, con el antibiótico adecuado. Se incubó 12 horas a 37°C con agitación.

3.- Se reinocularon 50 µl en un matraz con 50 ml de MN, con el antibiótico adecuado. Se incubó 12 horas a 37°C con agitación.

4.- Se centrifugó por 10 min a 10k rpm.

5.- Se ajustó la densidad óptica (DO) a 1.8 a una longitud de onda de 600 nm, resuspendiendo en PBS 1X, leyendo en un espectrofotómetro (Beckman Du 650).

6.- Se inoculó 1:500 en matraces de 250 ml con 100 ml de MN.

7.- Se determinó la DO del cultivo cada hora.

8.- Las muestras se procesaron como sigue:

- a) En tubos Eppendorf se centrifugó por 4 min a 12k rpm a 4°C.
- b) Se aspiró el sobrenadante con una bomba al vacío.
- c) Se añadió 1 ml de amortiguador Z 1X.
- d) En un vortex, se agitó fuertemente hasta deshacer la pastilla.
- e) Se repitieron los pasos a-d dos veces más.

9.- Las muestras, debidamente etiquetadas, se guardaron a -70°C, para su posterior cuantificación proteica y actividad β -Galactosidasa.

Para los muestreos de las condiciones ambientales, se realizó lo siguiente:

En cambio de osmolaridad, temperaturas extremas e intervalo de pH, la bacteria creció desde un principio en cada condición y se tomaron muestras por duplicado a una DO (600nm) de 0.4.

En las que correspondieron a estrés oxidativo, presencia de polimixina B y choque ácido, se esperó a que la bacteria creciera a una DO de 0.4 y se agregó el agente. En el caso del estrés oxidativo se tomaron muestras por duplicado antes y 60 minutos después de agregar H₂O₂. Para el caso de polimixina B se tomaron muestras por duplicado antes y 30, 45, 60, 75 minutos después del tratamiento. Para el choque ácido, se tomaron muestras por duplicado antes y a los 30, 40, 60 y 70, minutos después de cambiar el pH a 3.3.

En el caso de choque ácido, con adaptación a pH 5.3, se esperó que la bacteria llegara a una D.O. de 0.2, se cambió el pH de 7.3 a 5.3, se esperó a que creciera a una DO de 0.4, y entonces se cambió el pH de 5.3 a 3.3. Las muestras, por duplicado, se tomaron a DO 0.2; DO 0.4 y a 30, 40, 60 y 70 minutos después de cambiar el pH a 3.3.

Cuantificación de proteínas en placas de ELISA

(Martínez-Flores., et al artículo sometido)

- 1.- Las muestras se resuspendieron en 300-500 μ l de amortiguador Z IX, según el tamaño de la pastilla.
- 2.- Se colocaron 20 μ l de la muestra problema y del control (0.2 mg/ml de albúmina bovina), por duplicado, en sus pozos respectivos.
- 3.- Con una octapipeta, se añadieron 100 μ l de la solución D, se mezcló con la misma y se incubó la placa por 10 minutos a temperatura ambiente con agitación.
- 4.- Con una octapipeta se añadió 100 μ l de la solución E, se mezcló con la misma y se incubó la placa 30 minutos a temperatura ambiente, con agitación.
- 5.- Se leyó la placa en un lector de microplaca programado, en este caso el Ceres 900C (Bio-Tek instruments, inc).
- 6.- Se ajustaron las muestras entre 0.15 y 0.3 mg/ml, diluyendo o concentrando.

Microdeterminación de la actividad de β -Galactosidasa en placas de ELISA

(Martínez-Flores., et al artículo sometido)

- 1.- Una vez ajustada la muestra por proteínas, se procedió a la determinación de la actividad. Se colocaron 20 μ l de la muestra problema y del control (6000 unidades de actividad β -Galactosidasa) por duplicado, en sus pozos respectivos.
- 2.- Se añadieron, con una octapipeta, 100 μ l de la solución A, se incubó en un agitador horizontal Belly Dancer (Stovall, life science inc) con velocidad de agitación de 4 a 37°C por 5 minutos.

3.- Se añadieron, con una pipeta multicanal, 100 μ l de la solución B, la cual antes de usarse se mantuvo a 28°C.

4.- Se procedió a la lectura de la placa, en el lector de microplaca programado.

5.- La actividad específica se obtuvo dividiendo la cantidad de proteína entre las unidades de actividad β -Galactosidasa.

RESULTADOS

Papel de OmpR en la regulación de *ompSI*

Para tratar de definir con más detalle, el papel que pudiera tener el activador transcripcional OmpR, en la regulación de *ompSI*, elegimos 6 fusiones traduccionales representativas *ompSI-lacZ*, es decir, aquellas fusiones que corresponden a los diferentes niveles a los cuales se expresa el gen a medida que se elimina su región reguladora. Cuantificamos su expresión en cuatro fondos genéticos: *S. typhi* IMSS-1, *S. typhi* 81, *E. coli* MC4100 y *E. coli* SG480Δ900 (Fig. 6).

Los resultados muestran que, para el caso de *S. typhi* IMSS-1, se puede ubicar una región en *cis* de control negativo entre los nt 88 al 310, la cual comprendería las cajas propuestas de unión a OmpR IV-VII; y del nt 88 para abajo se puede definir una región en *cis* de control positivo, que abarcaría las cajas propuestas de unión a OmpR I-III, estos datos confirman las observaciones hechas con anterioridad (Oropeza et al., proyecto de doctorado). Por otro lado, en el fondo de *S. typhi* 81, la expresión de las fusiones consideradas como más activas, pRO117, pRO88 y pRO80 disminuye considerablemente mostrando que, efectivamente, el operón *ompB* se encuentra implicado en activar la expresión de *ompSI*. Cabe señalar que la expresión de las fusiones pRO88 y pRO80, en el fondo mutante para *ompB*, se mantiene a niveles similares a los de una porina mayoritaria, lo cual sugiere la existencia de un sistema de regulación adicional o complementario a OmpR actuando sobre *ompSI*. De hecho, sabemos de la existencia de sitios de inicio de la transcripción alternos al promotor dependiente del efecto activador de OmpR (Oropeza et al., proyecto de doctorado). Proponemos que, la transcripción para las fusiones pRO117, pRO88 y pRO80, en el fondo mutante para *ompB*, proviene de los promotores independientes de OmpR (P2 y P3) (Oropeza et al., proyecto de doctorado).

Obtuvimos resultados semejantes en *E. coli* MC4100, y su mutante para *ompB*, es decir, la expresión de las fusiones mas activas: pRO153 , PRO117, pRO88 y pRO88, se abate

considerablemente en el fondo mutante, lo cual apoyaría el hecho de que OmpR juega un papel de control positivo sobre la expresión de *ompSI*.

Al comparar la expresión de las fusiones en los fondos silvestres, *S. typhi* IMSS-1 y *E. coli* MC4100, se observó que los niveles de la expresión de las fusiones pRO153 y pRO88 fueron considerablemente más bajos en *E. coli* MC4100 y que, por el contrario, la fusión pRO66 tiene niveles de expresión mayores en *E. coli* MC4100 que en *S. typhi* IMSS-1. A pesar de ello, el patrón general de la curva es similar en ambas bacterias.

Papel de IHF en la regulación de *ompSI*

Debido a la posición del motivo con similitud a la secuencia consenso para IHF, en la región reguladora de *ompSI*; a los reportes de mutantes en IHF de *E. coli* que no pueden reprimir OmpF en alta osmolaridad y a los experimentos de protección in vitro por IHF sobre la región reguladora de *ompF* que permitieron ubicar dos secuencias de reconocimiento, una de las cuales es similar a la caja propuesta en la región reguladora de *ompSI* (Tsui, 1988; Pratt, 1996). Supusimos que este regulador global estuviera cooperando para formar una horquilla represora, como lo que se ha propuesto para *ompF* que involucrara el contacto de las cajas proximales (I, II y III) y distales para OmpR. Para investigar esto, decidimos construir dos fusiones equivalentes a la pRO1400 y pRO310, con diferente resistencia a antibiótico, de tal manera que nos permitiera rastrearlas en *E. coli* N99 y su derivado *E. coli* K5185 IHF-, mutante para IHF. Así construimos las fusiones traduccionales: pCL1400 y pCL310; la primera contiene todos los elementos en *cis* involucrados en el control negativo de *ompSI* y la segunda posee la región mínima reguladora, que mantiene niveles similares de expresión a la más larga (pCL1400).

Los resultados (Fig. 7) mostraron que las dos fusiones, en ambos fondos se expresan de manera similar; este hecho aunado a la evidencia de que OmpR en experimentos de "footprinting" in vitro, protege parte de lo que sería la secuencia de reconocimiento de IHF (Oropeza et al., proyecto de doctorado), nos lleva a concluir que IHF en las condiciones probadas no tiene un papel regulador en la expresión de *ompSI*.

Análisis de la regulación de la expresión de *ompSI* en distintas condiciones ambientales

Dado que, por medio de las fusiones, se determinó que el gen tiene la capacidad de expresarse a niveles similares a los de una porina mayoritaria y al hecho de que la proteína posee las señales necesarias para exportarse a la membrana externa, nos interesó saber si en alguna condición en especial, a la cual naturalmente se enfrenta la bacteria, fuera capaz de causar la inducción de *ompSI* por *S. typhi*. De esta manera, elegimos un conjunto de condiciones de estrés, que consideramos representativas.

Así, *S. typhi*, conteniendo las fusiones pRO1400 y pRO310, se creció en diferentes condiciones ambientales, en medio MN, como fueron: cambio de osmolaridad, temperaturas extremas de 25°C y 42°C, intervalo de pH5-pH8 y presencia de estrés oxidativo. Por otro lado, se llevó a cabo el crecimiento en medio para el cultivo de células eucariontes (DMEM) y en medio LB en la condición de anaerobiosis. Se tomaron muestras por duplicado, en la mitad de la fase exponencial, (DO 0.4), y se determinó la expresión de las fusiones. Los resultados (Fig. 8) muestran que ninguna de estas condiciones induce la expresión de *ompSI*. Con fines comparativos analizamos la expresión de la fusión más activa, pRO88, en alta y baja osmolaridad; los resultados indican que el nivel de expresión es similar en las dos condiciones, lo cual nos podría indicar que el grado de fosforilación de OmpR no altera de manera significativa la expresión de *ompSI*.

Otra de las condiciones que decidimos evaluar, fue la presencia de la Polimixina B, antibiótico de naturaleza catiónica que simula el efecto causado por las defensinas, producidas por los macrófagos (Groisman et al., 1992; Zaiger y Neidhardt, 1993; Miller y Gunn, 1996). De esta manera, se creció a *S. typhi* en MN, con las fusiones pRO1400 y pRO310, en diferentes concentraciones de Polimixina B, después de llegar a una DO de 0.4 (Tiempo 0). Posteriormente, tomamos muestras por duplicado, a los tiempos a los cuales se ha reportado ya se puede observar efectos en la inducción de genes que se regulan por la presencia de la Polimixina B, en el medio de cultivo. Los resultados mostraron (Fig. 9) que no se causó la inducción de *ompSI* por *S. typhi*.

Las otras dos condiciones que evaluamos, fueron el choque ácido, con y sin adaptación a pH

5.3, ya que se ha reportado, la inducción de distintas proteínas en las dos condiciones (Foster, 1992). De esta forma, a *S. typhi* conteniendo las fusiones antes mencionadas, crecida en MN a una DO de 0.4, se le dio un choque ácido cambiando el pH a 3.3, y cuantificamos la expresión del gen reportero, por duplicado, a los tiempos recomendados por la literatura, los resultados mostraron (Fig. 10) que la expresión de *ompSI*, bajo estas condiciones, no cambió considerablemente, observamos resultados semejantes en la condición de choque ácido, con adaptación a pH 5.3 (Fig. 11).

DISCUSION

La investigación en torno a *ompSI* de *S. typhi*, ha generado resultados novedosos que hasta el momento no pueden ser explicados en su totalidad por el modelo tan general y simplista del mecanismo molecular del sistema de dos componentes (EnvZ-OmpR). A pesar de que OmpR es uno de los activadores transcripcionales de la familia de los dos componentes más estudiado hasta el momento. Un modelo basado unicamente en los niveles de fosforilación de OmpR resulta insuficiente para explicar la regulación de la expresión de *ompSI*. Dado que, sólo uno de los tres promotores de *ompSI*, P1 el más fuerte, es totalmente dependiente de OmpR para su activación (Oropeza et al., proyecto de doctorado) y que el cambio de osmolaridad, que a su vez modifica los niveles de fosforilación de OmpR no afecta el patrón de expresión de *ompSI*.

El mecanismo de regulación de la expresión de *ompSI* es complejo, al cual necesariamente debemos añadir la participación de un factor adicional a la proteína reguladora OmpR, hasta el momento desconocido. Este factor, pensamos participa en la regulación de la transcripción a partir de los promotores P2 y P3. Esta transcripción es independiente a OmpR y es la que observamos en los fondos mutantes para *ompB* de *S. typhi* y *E.coli* la cual, en algunas fusiones, es mayor a la de una porina mayoritaria (*ompC*). Actualmente este factor está siendo buscado en un banco de mutantes de *S. typhi* con transposón. Esta investigación tiene como objetivo llegar a contestar preguntas como: ¿cuál es y qué características posee este factor? ¿a qué señales responde? ¿en qué procesos fisiológicos está relacionado?.

ompSI seguramente se debe expresar en una condición particular, pensamos que si la bacteria necesitara unicamente en niveles basales a la proteína OmpS1 bastaría con tener una región reguladora con un promotor débil, aunque esta suposición queda abierta hasta que se

concluya la investigación en el campo de *ompSI*, pensamos que no es de esta manera dado que la proteína tiene las señales necesarias que le permiten colocarse en la membrana externa y a que su región reguladora es compleja y relativamente grande (310 nt) con una distribución única de cajas de unión de OmpR; posee una región en *cis* de control positivo y una de control negativo; presenta tres promotores y por medio de fusiones es capaz de tener una expresión diez veces más que una porina mayoritaria (*ompC*). Dicha condición de expresión hasta el momento es desconocida, ya probamos una batería de condiciones de crecimiento relacionadas con el proceso infeccioso (estrés oxidativo, anaerobiosis, presencia de Polimixina B, choque ácido, etc), faltaría probar condiciones de crecimiento combinadas, por ejemplo, alta osmolaridad combinada con presencia de estrés oxidativo y condiciones metabólicas, por ejemplo, cambiar en el medio de cultivo la fuente de nitrógeno.

Continuando con las investigaciones de este gen, en el laboratorio se está trabajando para obtener una mutante carente de *ompSI*, se estudiará si existe algún efecto de esta mutante en relación a los procesos de interacción con células epiteliales en cultivo (Rodríguez et al., proyecto de maestría).

Es muy interesante el hecho de que las porinas en general resulten ser canales sin una marcada selectividad y que se expresen en situaciones particulares, de esta manera, se ha propuesto que la porina *phoE*, se expresa en crecimiento de ayuno de fosfatos y tiene una ligera preferencia en general a los aniones. Las porinas mayoritarias *ompC* y *ompF* se expresan de manera diferencial con el cambio de la osmolaridad y tienen una ligera preferencia a los cationes. Entonces preguntas como las que siguen es muy interesante abordar: ¿por qué se presenta una gran diversidad de porinas, que resultan ser muy parecidas entre sí? (ver Fig. 3) ¿qué características reúnen por las cuales la bacteria ha conservado estos genes? ¿cuál sería el papel de las porinas minoritarias en la fisiología bacteriana? ¿existen porinas minoritarias que en condiciones especiales puedan llegar a ser las porinas mayoritarias?. Todas estas preguntas se complican más, si agregamos el hecho de la regulación diferencial que se presenta del gen *ompC*

en *S. typhi* y *E. coli*: tratándose de genes equivalentes la *ompC* de *E. coli* se osmoregula, en cambio *ompC* de *S. typhi* no se osmoregula, a pesar de que *OmpR* es idéntica en ambos fondos genéticos. Este hecho sin duda, crea la necesidad de ampliar el panorama en lo que se refiere a los modelos que intenten explicar los mecanismos moleculares por los cuales se regulan la expresión de las porinas.

CONCLUSIONES

- 1.- OmpR es un regulador positivo de la expresión de *ompSI*, sin embargo se obtiene expresión en el fondo mutante para *ompB* (*ompR/envZ*). En trabajo paralelo se ha identificado un promotor P1, dependiente de OmpR, y dos promotores alternos que son independientes del efecto activador de OmpR.
- 2.- El regulador global IHF, en las condiciones probadas, no regula la expresión de *ompSI*.
- 3.- Ninguna de las condiciones ambientales de crecimiento probadas, inducen la expresión de *ompSI*.

FIGURAS

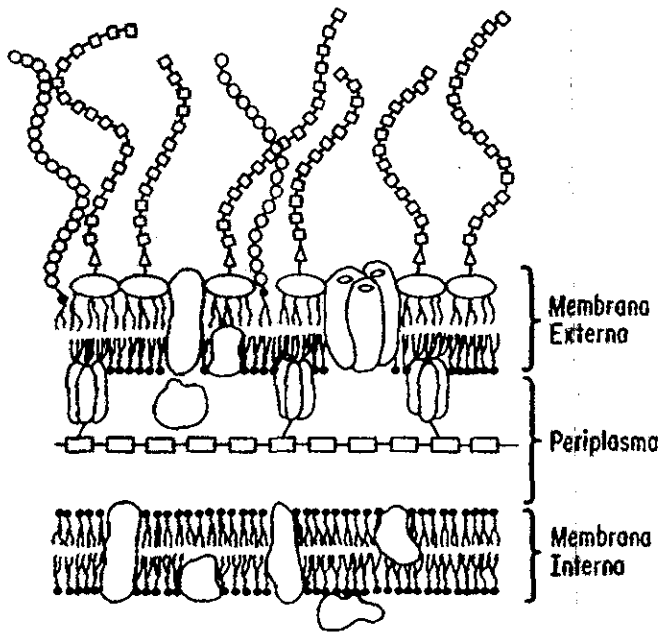
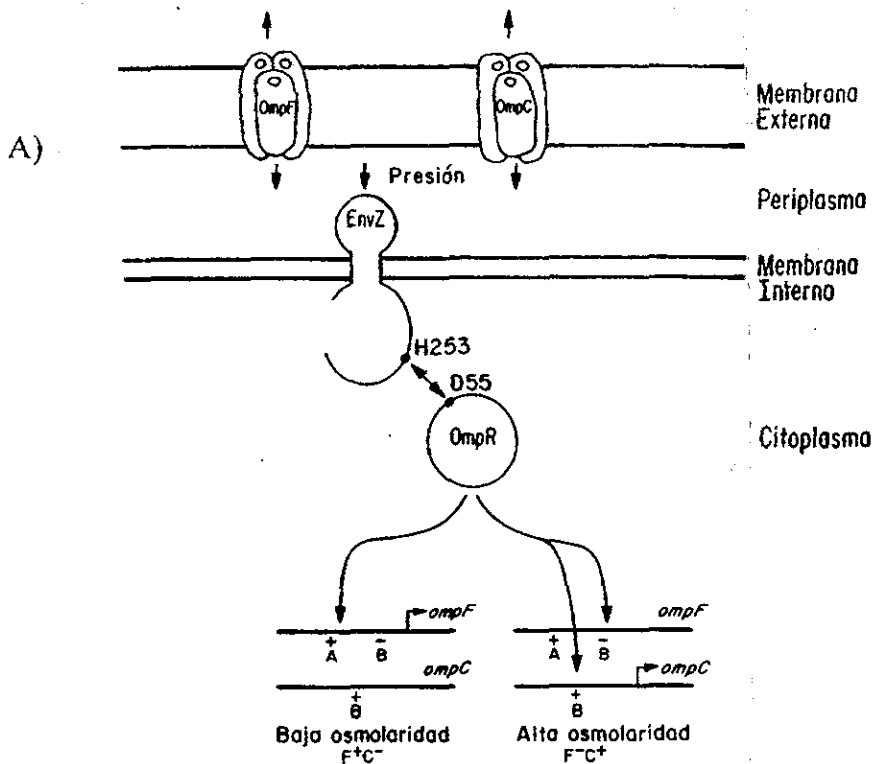


Fig. 1 Envoltura celular de las bacterias Gram negativas (Modificado de Rick y Silver, 1996).



B)

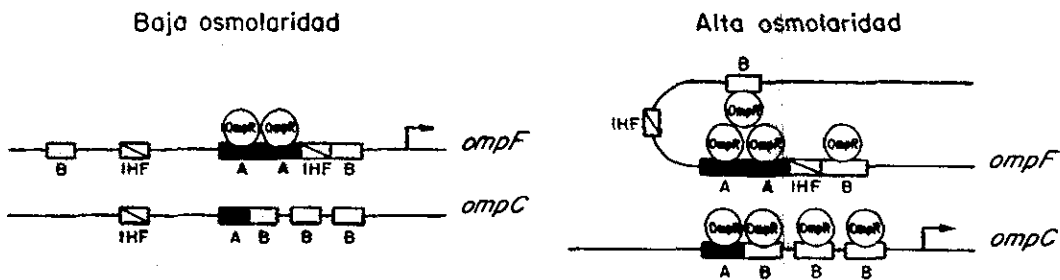


Fig. 2 A) Modelo simplificado de la regulación de la expresión de las porinas mayoritarias para *E. coli*. A Cajas alta afinidad, B Cajas baja afinidad, + Activación del gen, - Represión del gen, ° Grupo fosfato.

B) Modelo de la interacción de OmpR y doblamiento del DNA, implicada en la regulación de las porinas mayoritarias para *E. coli*. A Cajas alta afinidad, B Cajas baja afinidad (Modificado de Pratt et al., 1996).

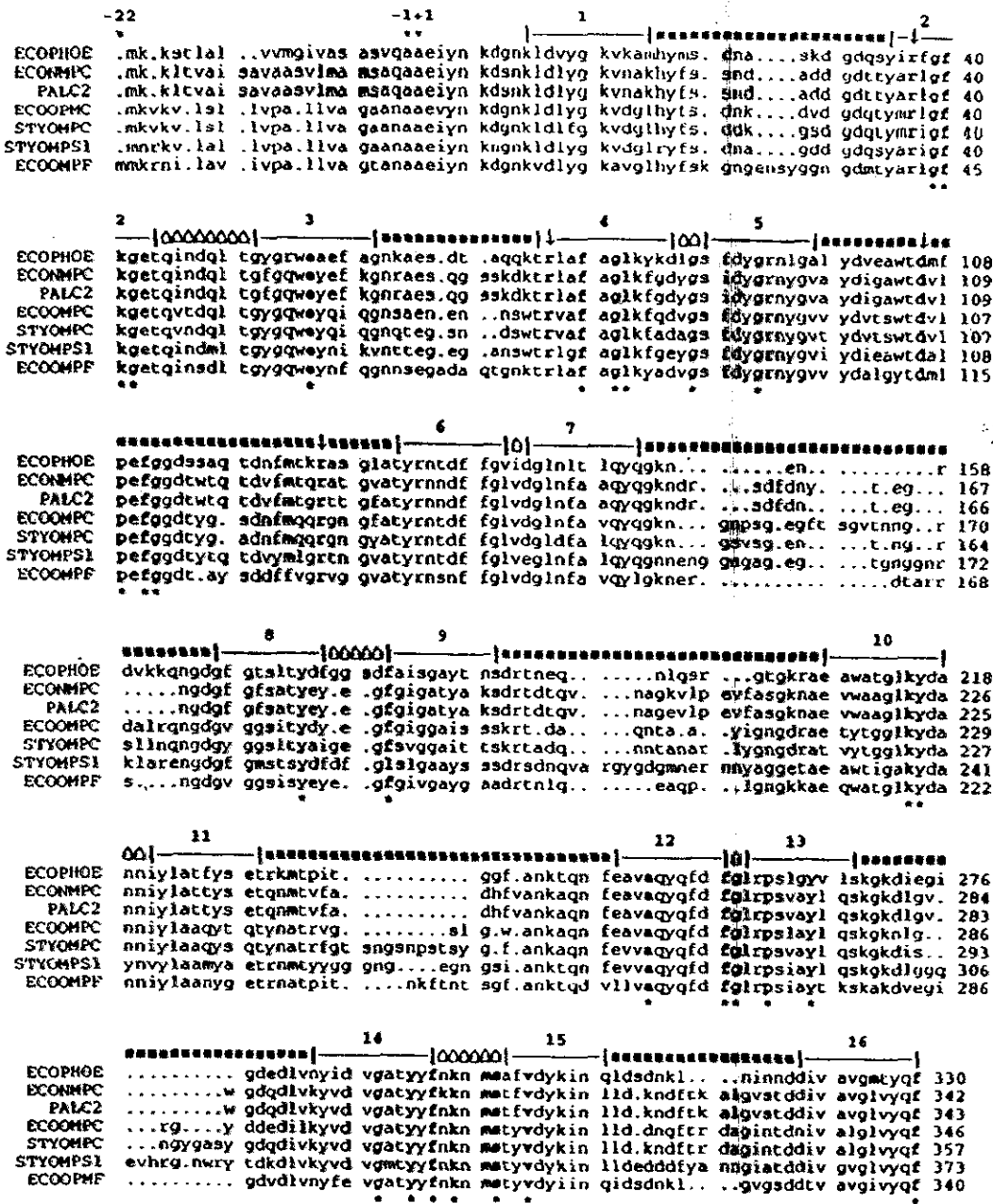


Fig. 3 Alineamiento de la secuencia de aa de OmpS1 con otras porinas.

— Tiras β-Intermembranales
■ Superficie expuesta
◊ Vueltas hacia el periplasma
X Hélices α
↓ Residuos conservados en todas las porinas de bacterias entericas/neisseriales
* Residuos conservados en todas las porinas de bacterias entericas (Fernández-Mora et al., 1995)

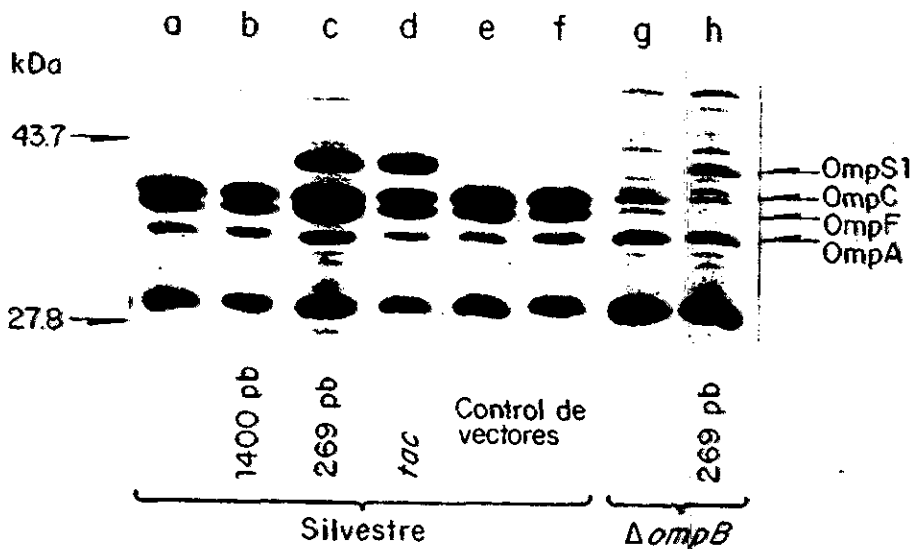
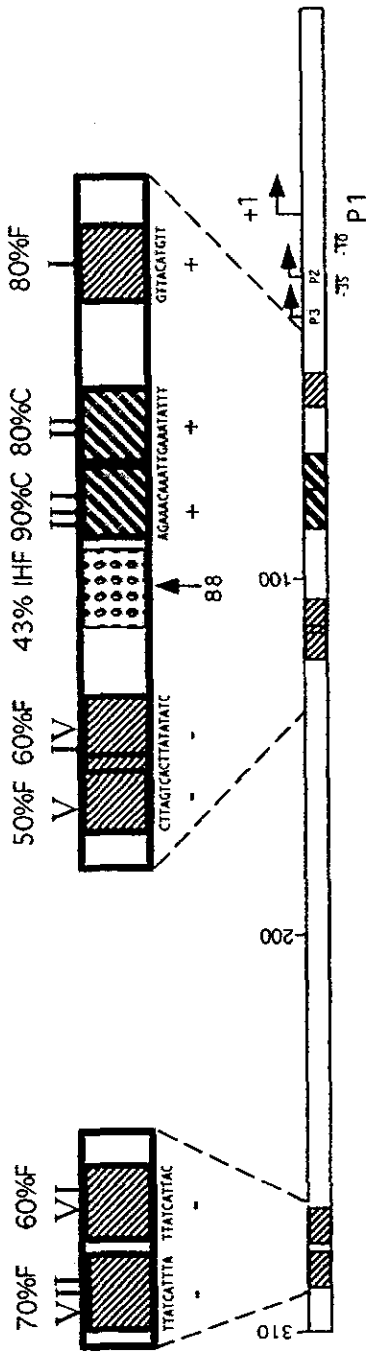


Fig. 4 Patrón electroforético de preparaciones de PME de *S. typhi* IMSS-I (a-f) y de *S. typhi* 81 (g-h) transformadas con diferentes construcciones: a) sin plásmido; b) plásmido con 1400 nt corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción de P1; c) plásmido con 269 nt corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción de P1; d) plásmido con el promotor de *tac* fusionado al gen estructural de *ompS1*; e, f) plásmidos controles; g) sin plásmido y h) plásmido con 269 nt corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción de P1.

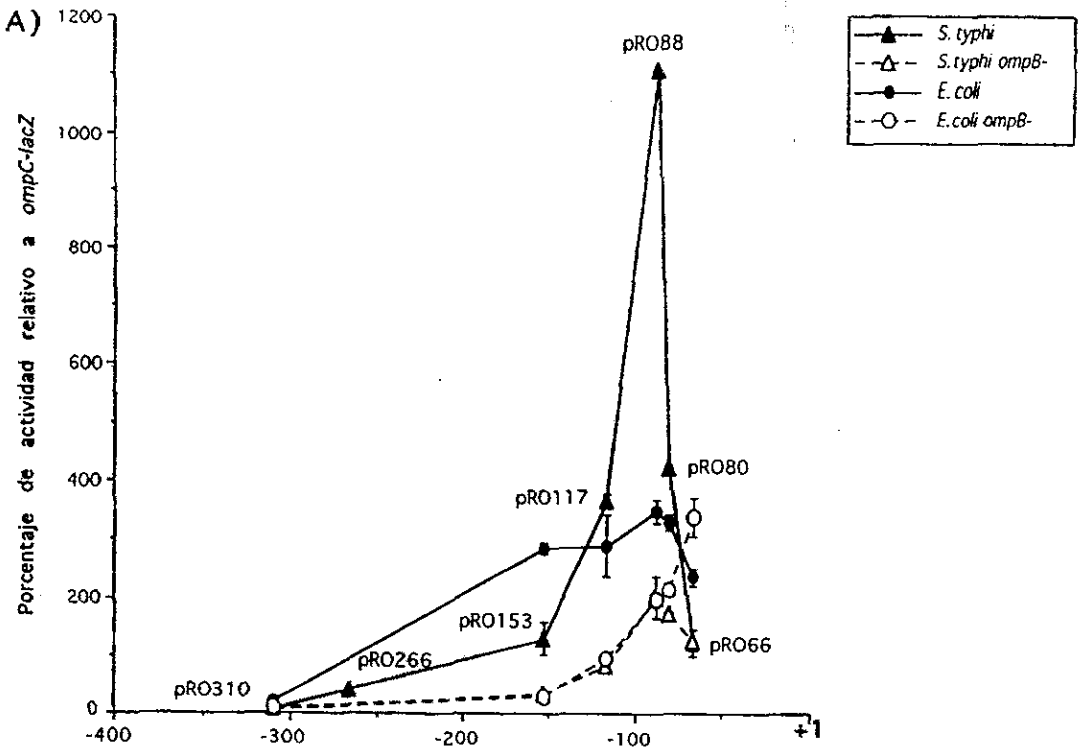


Secuencias consenso

Tipo F: TTTACATTTT

Tipo C: TGAA-CAT-T

Fig. 5 Región reguladora de *ompS1*, distribución de los dominios con similitud a la secuencia consenso reportada para *OmpR*. + Región propuesta en *cis* de control positivo, - Región propuesta en *cis* de control negativo, P Sitios de inicio de la transcripción de los promotores correspondientes.



B) Nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción

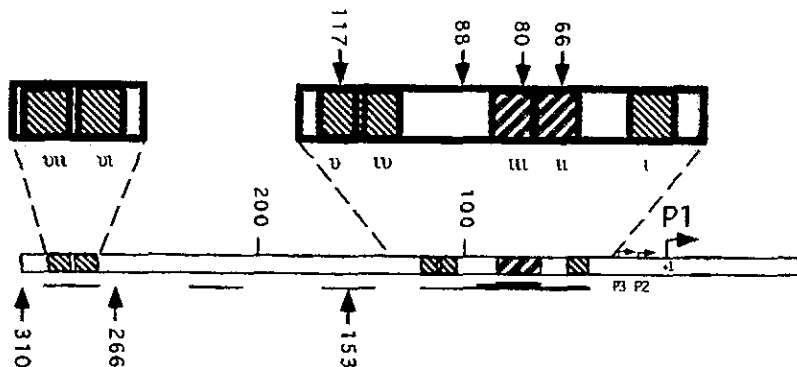


Fig. 6 A) Expresión de fusiones traducciónales *ompSI-lacZ* en cuatro fondos genéticos. Los datos se grafican tomando como 100% la actividad específica de la fusión *ompC-lacZ*.

B) Región reguladora de *ompSI* indicando la posición de cada fusión, respecto a las cajas propuestas de unión de OmpR y la ubicación de los promotores. El grosor de la línea inferior corresponde a las regiones protegidas por OmpR en "footprinting" in vitro (Oropeza et al., proyecto de doctorado).

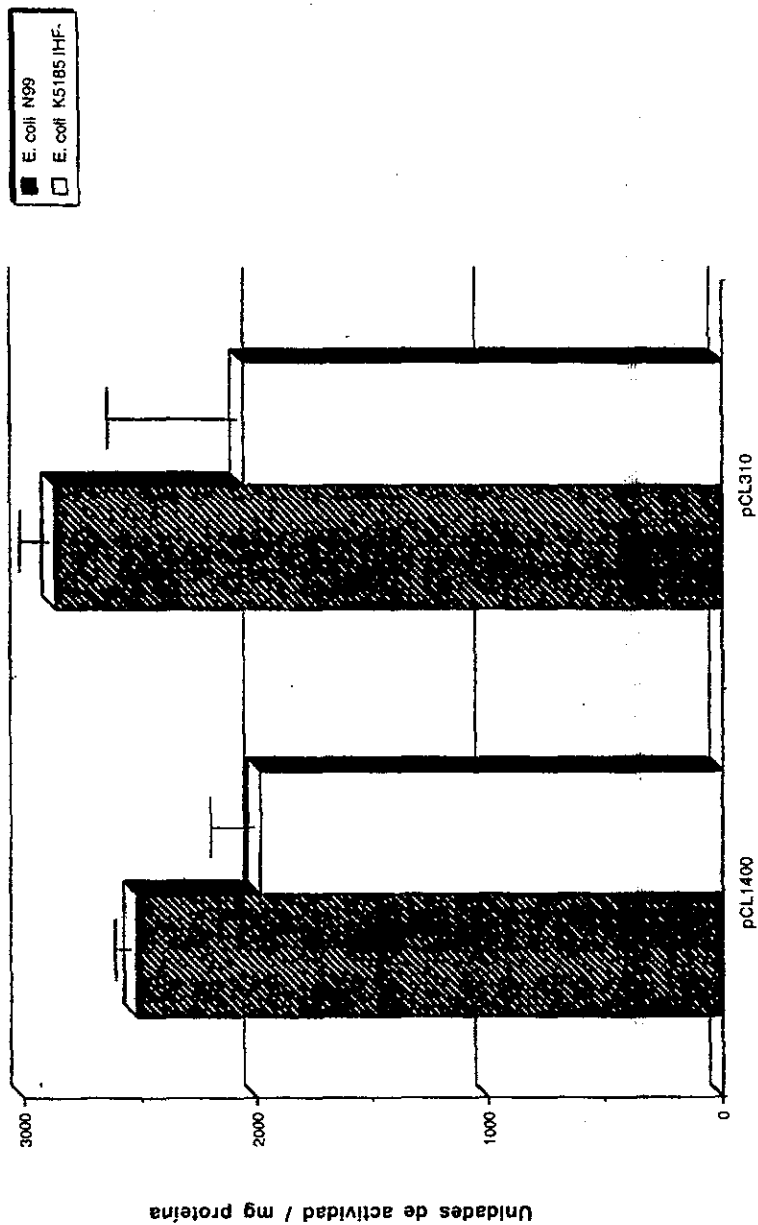


Fig. 7 Expresión de las fusiones pCL1400 y pCL310 en los fondos de *E. coli* N99 y *E. coli* K5185 IHF-.

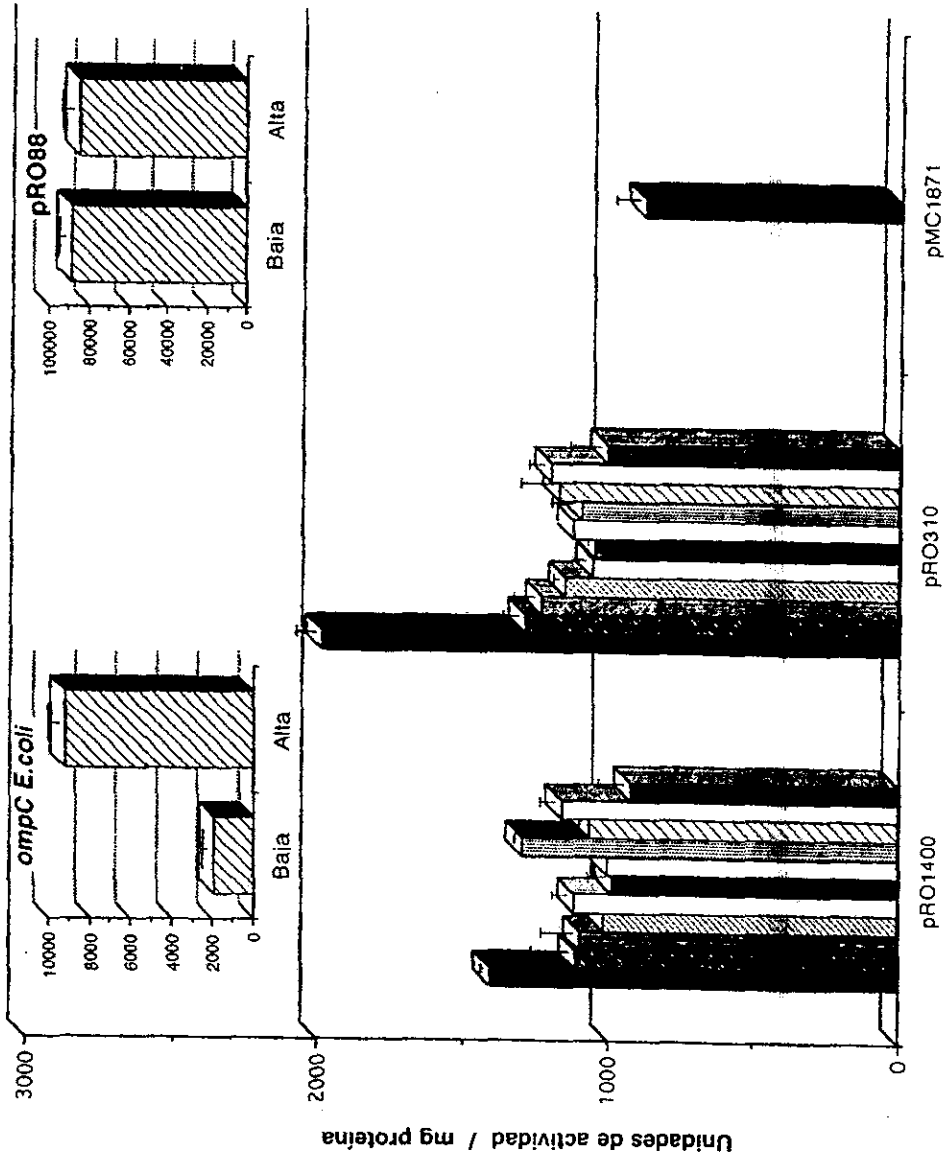
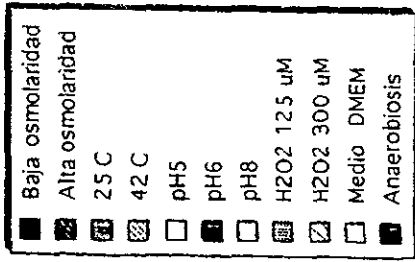


Fig. 8 Expresión de las fusiones pRO1400 y pRO310 en diferentes condiciones ambientales de crecimiento, se muestra la actividad del vector, pMC1871 en *S. typhi* IMSS-1. Con fines comparativos se incluye la expresión de la fusión de *ompC* de *E. coli* en *E. coli* y la de pRO88 en *S. typhi* IMSS-1.

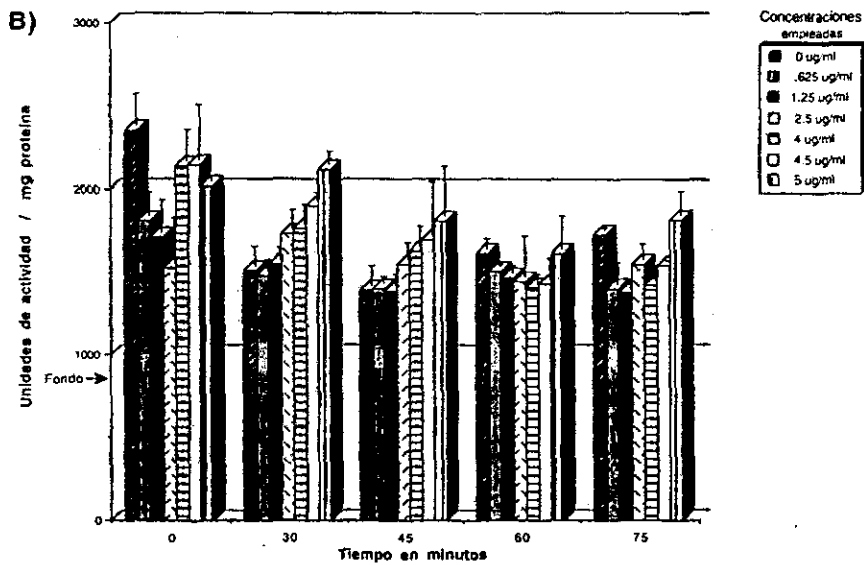
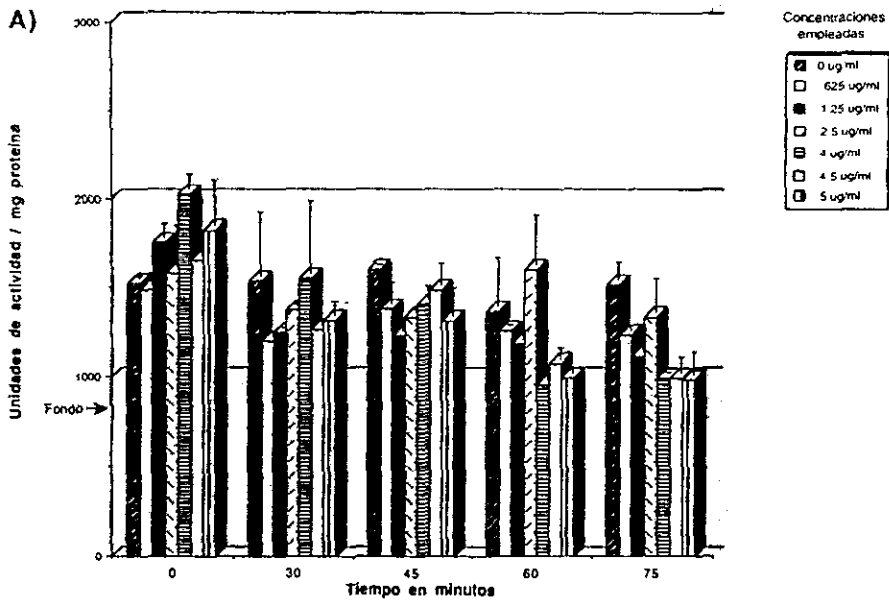


Fig. 9 A) Expresión de la fusión pRO1400 en presencia de Polimixina B en *S. typhi* IMSS-1.
 B) Expresión de la fusión pRO310 en presencia de Polimixina B en *S. typhi* IMSS-1.

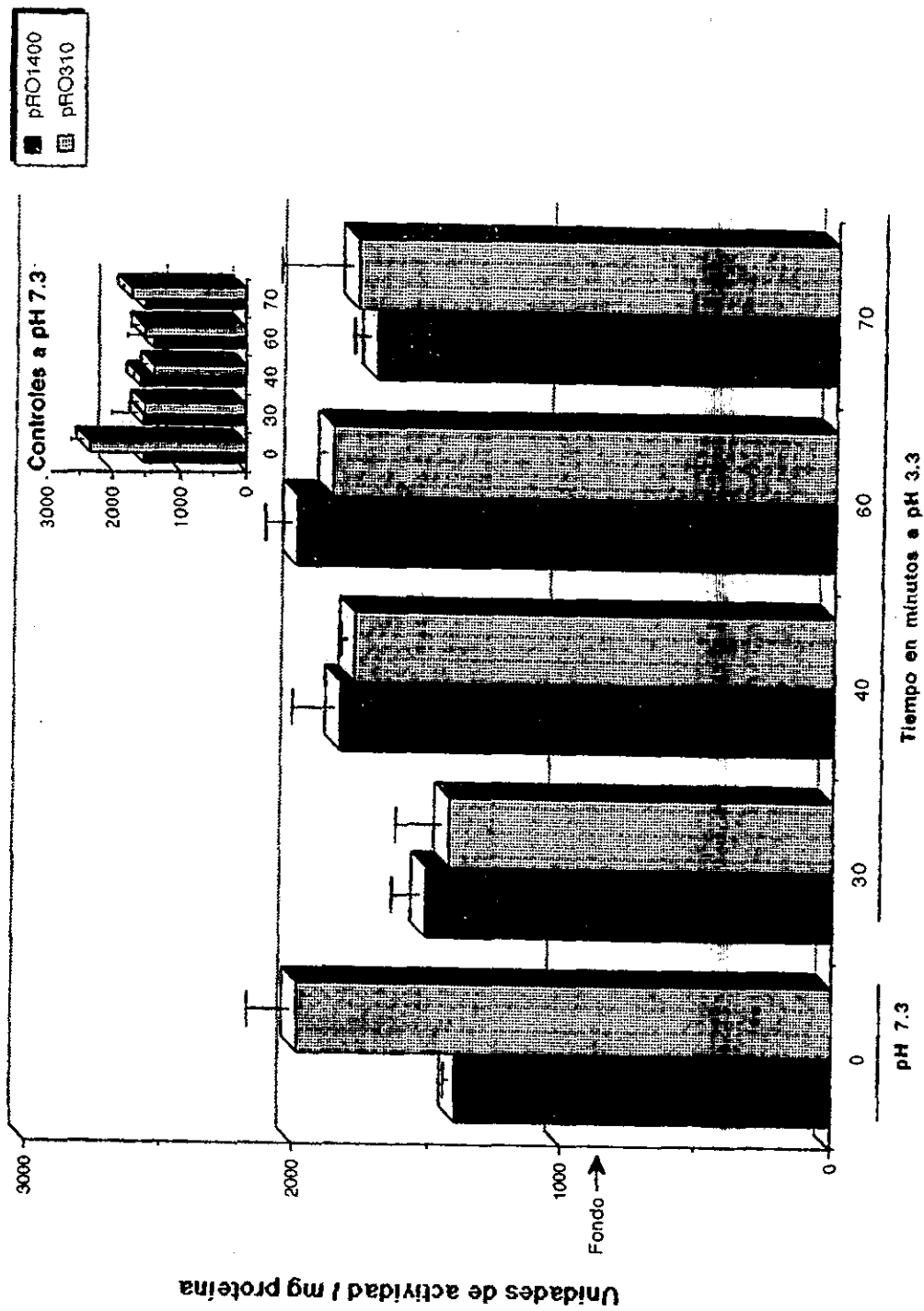


Fig 10 Expresión de las fusiones pRO1400 y pRO310 en condiciones ácidas en *S. typhi* IMSS-1.

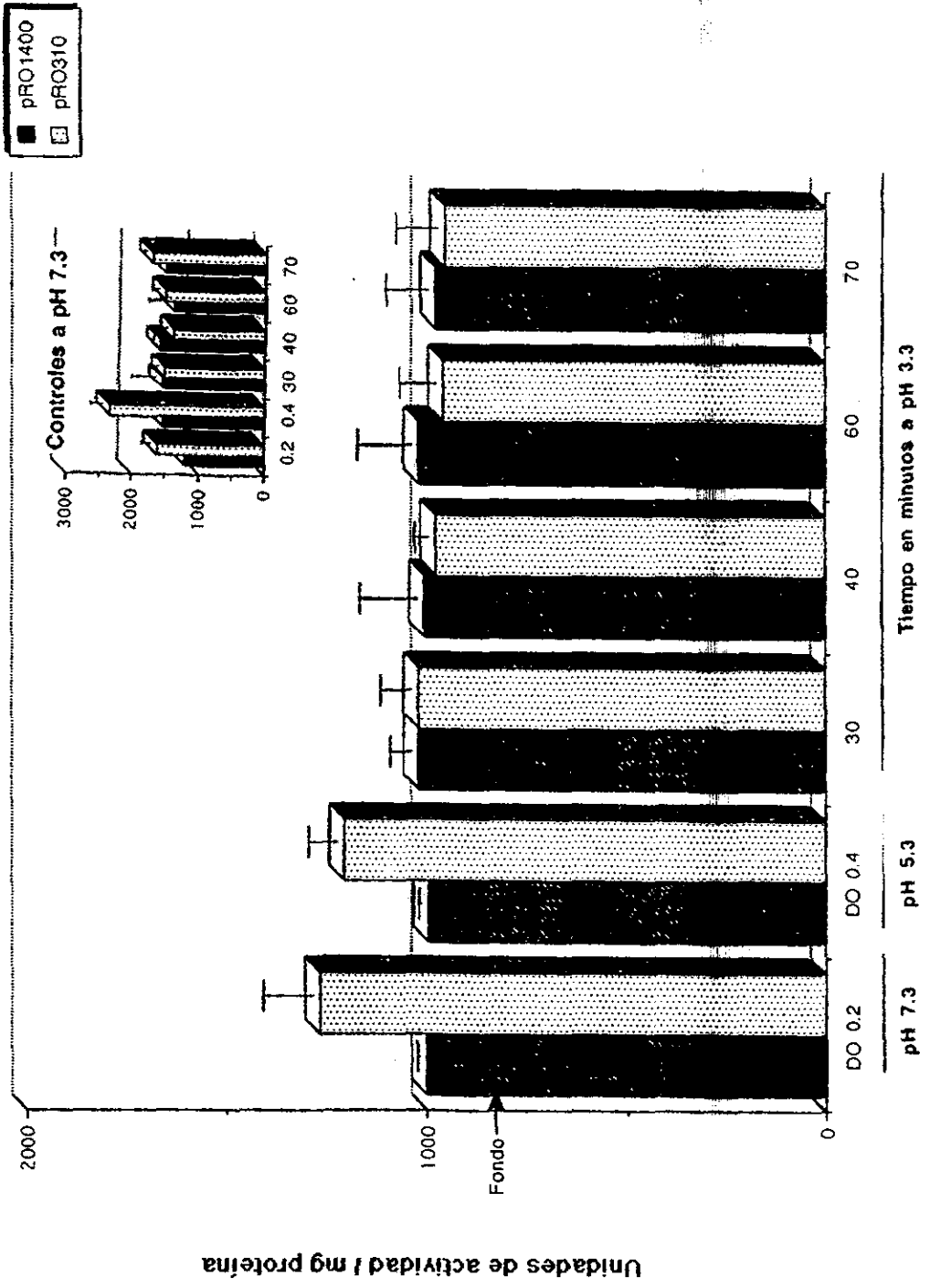


Fig. 11 Expresión de las fusiones pRO1400 y pRO310 en condiciones ácidas adaptadas en *S. typhi* IMSS-1.

BIBLIOGRAFIA

- Balbás, P., Soberón X., Merino, E., Zurita, M., Valle, F., Flores, N. and Bolívar, F.: Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives. *Gene*. 1986; 50: 4-40.
- Bernardini, M.L., Sanna, M.G., Fontaine, P.G. and Sansonetti, J.P.: OmpC is involved in invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* 1993; 61 (9): 3625-3635.
- Calderón, I., Lobos, R. and Mora, G.: The hemolytic effect of *Salmonella typhi* Ty2 porins. *J. Biochem.* 1984; 141: 579-583.
- Calva, E., Puente, J.L. and Calva, J.J.: Research oportunities in typhoid fever: Epidemiology and molecular biology. *Bio Essays*. 1988; 9: 173-177.
- Calva, E., Ordoñez, G. Fernández-Mora, F., Santana, F.J., Bobadilla, M. and Puente, J.L.: Distinctive IS200 insertion between *gyrA* and *rscC* genes in *Salmonella typhi*. *J. of Clin. Microbiol.* 1997, 35 (12): 3048-3053.
- Chatfield, S.N., Dorman, C.Y., Hayward, C. and Dougan, G.: Role of *ompR*-dependent genes in *Salmonella typhimurium* virulence: mutants deficient in both OmpC and OmpF are attenuated in vivo. *Infect. Immun.* 1991; 59: 449-452.
- Dorman, C.J., Chatfield, S., Higgins, C.F., Hayward, C. and Dougan, G.: Characterization of porin and *ompR* mutants of avirulent strain of *Salmonella typhimurium*: OmpR mutants are attenuated in vivo. *Infect. Immun.* 1989; 57: 2136-2140.
- Edelman, R. and Levine, M.M. Summary of an international workshop on typhoid fever. *Reviews of infectios Diseases* 1986; 8 (3): 329-349.

- Fernández-Mora, M., Oropeza, R., Puente, J.L. and Calva, E.: Isolation and characterization of *ompSI*, a novel *Salmonella typhi* outer membrane protein-encoding gene. *Gene*. 1995; 58: 67-72.
- Finlay, B.B. and Falkow, S.: *Salmonella*: as an intracellular parasite. *Mol. Microbiol.* 1989; 3 (12):1833-1841.
- Galdiero, F., Cipollaro de L'ero, G., Benedetto, N., Galdiero, M. and Tufano, M.A.: Release of cytokines induced by *Salmonella typhimurium* porins. *Infect. Immun.* 1993; 61: 155-161.
- Galdiero, F., Tufano, M.A., Galdiero, M., Masiello, S. and Di Rosa, M.: Inflammatory effects of *Salmonella typhimurium* porins. *Infect. Immun.* 1990; 58: 3283-3286.
- Galdiero, F., Tufano, M.A., Sommese, L., Folgore, A. and Tedesco, F.: Activation of the complement system by porins extracted from *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 1984; 46: 559-563.
- Garret, S., Taylor, R. K., Silhavy, T.J. and Berman, M. L.: Isolations and characterization of *ompB* strains of *Escherichia coli* by a general method based on gene fusions. *J. Bacteriol.* 1985; 162: 840-844.
- Groisman, E.A., Field, P.I. and Heffron, F.: Molecular biology of *Salmonella* pathogenesis. En: Iglewski, B.H., Clark, V.L., eds. *Molecular basis of bacterial pathogenesis*. San Diego: Academic Press. 1990; 251-272.
- Groisman, E.A., Parra-López, C., Salcedo, M., Lipps, C.J. and Heffron, F.: Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Sci.* 1992 (89): 11939-11943.

- Gunn, J.S. and Miller, S.: PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J. Bacteriol.* 1996; 178 (23): 6857-6864.
- Hall, M.N. and Silhavy, T.J.: Genetic analysis of the *ompB* locus in *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* 1981; 151: 1-15.
- Hancock, R.: The bacterial outer membrane as drug barrier. *Trends in Microbiology.* 1997; (1): 37-42.
- Heyde, M. and Portalier, R.: Regulation of major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K-12 by pH. *Mol. Gen. Genet.* 1987; 208: 511-517.
- Hoffman, S.L., Edman, D.C., Punjabi, N.H., Lesmana, M., Cholid, A., Sundah, S. and Harahap, J.: Bone marrow aspirate culture superior to streptokinase clot culture and 8 ml 1:10 blood-to-broth culture for diagnosis of typhoid fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1986; 35: 836-839.
- Hook, E.: *Salmonella* species (including typhoid fever). Principles and practice of infectious disease. 1990; 1700-1715.
- Huang, L., Tsui, P. and Freundlich, M.: Integration host factor is a negative effector of in vivo and in vitro expression of *ompC* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1990; 172 (9): 5293- 5298.
- Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., González, C., Moreno, J. and Kumate, J.: Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi*, 9, 12, Vi. *Infect. Immun.* 1988; 56: 2953-2959.
- Le minor, L.: "Genus III. *Salmonella*". En *Bergey's Manual of systematic.* 1984.

- Lugtenberg, B. and Van Alphen, L.: Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1983; 737: 51-115.
- Macario, A. and Conway De Macario E.: Monoclonal antibodies against bacteria. Academic Press. Inc. Orlando Florida. 1992; 3: 48-51.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, F. "Molecular cloning: a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y. 1982.
- Martínez-Flores, I., Bustamante, V.H., Puente, J.L. and Calva, E.: Cloning and characterization of the *Salmonella typhi ompR* and *envZ* genes. *As. Pac. J. Mol. Biotechnol.* 1995; 3 (2): 135-144.
- Martínez-Flores, I., Cano, R., Bustamante, V.H., Calva, E. and Puente J.L.: Role of the functional polymorphism in *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. Artículo sometido. *J. Bacteriol.* 1998.
- Miller, J.H., en *Experiments in Molecular Genetics*. (Cold Spring Harbor, N.Y.) 1972.
- Miller, S.: PhoP/PhoQ: macrophage-specific modulators of *Salmonella* virulence. *Mol. Microbiol.* 1991; 5: 2073-2078.
- Mora, G.C., Barnier, R.A., Toro, C.S. and Asenjo, C.A.: Regulation of *Salmonella typhi* porins en Typhoid Fever. Strategies for 90's. Selected papers from the first Asian-Pacific Symposium on Typhoid Fever. Pang, T., Koh, C.L. and Puthuchery, S.D. eds. World Scientific, Publishing. 1992; 64.
- Nikaido, H. Outer Membrane en *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology. Curtis III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C. et al., eds. ASM press Washington, D.C. 1996. 29-47.

- Nikaido, H. and Vaara, M.: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 1985; 49: 1-32.
- Oropeza, R., Puente, J. L. y Calva E.: Análisis de la regulación de la expresión del gen *ompS1* de *S. typhi*. Proyecto de doctorado en ciencias. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos 1998.
- Pratt, L.A., Hsing, W., Gibson, K.E. and Silhavy, T.: From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of *OmpF* and *OmpC* porins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 1996; 20 (5): 911-917.
- Puente, J.L.: Aislamiento de los genes *phoE* y *gltB* de *Salmonella typhi*. Tesis de licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1987.
- Puente, J.L., Flores, V., Fernández, M., Fuchs, Y. and Calva, E.: Isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. *Gene.* 1987; 61: 75-83.
- Puente, J.L., Verdugo-Rodríguez A. and Calva, E.: Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* *OmpC* is influenced differently by medium osmolarity; dependence on *Escherichia coli* *OmpR*. *Mol. Microbiol.* 1991; 5: 1205-1210.
- Ramani, N., Hedeshian, M. and Freundlich, M.: *micF* antisense RNA has a major role in osmoregulation of *ompF* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1994; 176 (16): 5005-5010.
- Rodríguez, O., Martínez-Flores, I., Puente, J. L. y Calva E.: Papel de las proteínas de membrana externa en la interacción de *S. typhi* con células epiteliales. Proyecto de maestría en ciencias. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos 1998.

- Rick, P. and Silver, R.: Enterobacterial common antigen and capsular polysaccharides en *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology. Curtis III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C. et al., eds. ASM press Washington, D.C. 1996. 104-122.
- Slauch, J. and Silhavy, T.J.: Genetic analysis switch of a that controls porin gene expression in *Escherichia coli* K-12. Mol. Biol. 1989 (210): 281- 292.
- Salyers, A. and Whitt, D."Bacterial pathogenesis a molecular approach".ASM press. Washington, D.C. 1994: 229-243.
- Torres, A.: Genética Molecular del gene *phoE* de *Salmonella typhi*. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos., México. 1995.
- Tsui, P., Helu, V. and Freunlinch M.: Altered osmoregulation of *ompF* in integration host factor mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1988; 170 (10): 4950-4953.
- Udhayakumar, V. and Muthukkarupam V.R.: Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. Infect. Immun. 1987; 55: 816-821.
- Van Alphen, V. and Lugtenberg, B.: Influence of osmolarity of the growth medium on the outer membrane protein pattern of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1977; 131: 623-630.
- Verdugo-Rodríguez, A., López-Vidal, Y., Puente, J.L., Ruíz-Palacios, G.M. and Calva, E.: Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme inunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1993; 12 (4): 249-254.
- Verhoef, C., Lugtenberg, B., Van Boxtel, R., De Graff, P. and Verheij, H.: Genetics and biochemistry of the peptidoglycan-associated proteins b and c of *Escherichia coli* K-12. Mol. Gen. Genet. 1979; 169: 137-146.

Wallace, M.R., Yousiff, A.A., Mahroos, G.A., et al.: Ciprofloxacin versus ceftriaxone in the treatment of multiresistant typhoid fever. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1993; 12: 907-910.

Zaiger, A.K. and Neidhardt, F.C.: Analysis of proteins synthesized by *Salmonella typhimurium* during growth within a host macrophage. *J. Bacteriol.* 1993; 175 (12): 3734-3743.

APENDICE

97TH GENERAL MEETING

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY

MIAMI BEACH • MAY 4-8, 1997

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



- H-123. Mutational Analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* TrnR Transcriptional Regulator. J.E. KUEMMERLE and CLAY FUQUA. Department of Biology, Trinity Univ., San Antonio, TX.
- H-124. Evidence of Physical Interaction between the PvdS Protein of *Pseudomonas aeruginosa* and the Core RNA Polymerase. L. LEONI, V. DE LORENZO, and P. VISCA.*
- H-125. Role of Human Cytomegalovirus Immediate-Early 2 Protein in Transcriptional Activation of the *c-jun* Promoter. C. G. PARK,* T. H. HAN, E. S. HWANG, J. W. PARK, Y. H. KOOK, and C. Y. CHA. Seoul Natl. Univ. Coll. Med., Seoul, Korea.
- H-126. Molecular Cloning and Characterization of *ireA*, a New GATA Factor Encoding Gene of *Aspergillus nidulans*. K. ANGERMAYR,* G. STOFFLER, H. HAAS. Univ. of Innsbruck, Innsbruck, Austria.
- H-127. A 14 kD Non-Lux Protein Whose Production is Positively Regulated by Autoinducer in *Vibrio fischeri*. S. M. CALLAHAN* and P. V. DUNLAP. Univ. of Maryland Biotechnology Inst., Cr. of Marine Biotechnology, Baltimore, Md.
- H-128. Identification of Fur (Ferric Uptake Regulation) Binding Genes in *Escherichia coli*. Identification of Fur Binding Genes in *Escherichia coli*. S. WEE,* M. S. OH, and S. H. CHAI. Hallym Univ.
- H-129. A Genetic Approach to Search for a Gene that Encodes a Regulatory Factor. C. THOMAS,* S.S. GOLDEN. Texas A&M Univ., College Station.
- H-130. Characterization of D108 Ner mutants. D. L. FORTIN, and M. S. DUBOW. McGill Univ., Montreal, Canada.
- H-131. The Molecular Basis for the Specificity of FimE Recombinase in the Phase Variation of Type 1 Fimbriae of *Escherichia coli*. H. D. KULASEKARA,* and J. C. BLOMFIELD. Bowman Gray Sch. of Med., Winston-Salem, N.C.
- H-132. Characterization of the *Salmonella typhi omp2* and *ompF* Genes. M. FERNANDEZ-MORA,* J. L. PUENTE and E. CALVA. Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Cuernavaca, Mexico.
- H-133. *Salmonella typhi ompS1* Gene Regulation. R. OROPEZA, C. L. SAMPIERI, J. L. PUENTE and E. CALVA.* Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Cuernavaca, Mexico.
- H-134. Autogenous Repression of Transcription by the *Salmonella typhimurium pvdA* Gene Product In Vivo. S. GORT* and S. MALOY. Univ. of Illinois, Urbana.
- H-135. A Flexible Partnership: the cAMP Receptor Protein Changes Sequence Specific DNA Recognition by the CytR Repressor, a Highly Flexible LacI Member. H. PEDERSEN, B. H. KALLIPOLITIS, C.I. JORGENSEN, M. NORREGAARD-MADSEN, H.H. KRISTENSEN and* P. VALENTIN-HANSEN. Odense Univ., Denmark.
- K-75. Characterization and Expression of the Gluconate Subsidiary System (GntII) in *Escherichia coli*. G. BAUSCH,* N. PEEKHAUS, T. BLAIS and T. CONWAY. The Ohio State Univ., Columbus.
- K-76. HybD Decreased the In Vivo Stability of Hydrogenase-2 in *Escherichia coli*. C. S. LIN,* M. W. LU, H. F. WU, and J. K. LIU. Natl. Sun Yat-sen Univ., Kaohsiung, Taiwan.
- K-77. Reconsideration on the Production and the Consumption of Acetate in *Escherichia coli*. S. STIN, D. CHANG, and J. PAN. Korea Res. Inst. of BioSci. BioTech, Taejeon, South Korea.
- K-78. Regulation of Transcription by Protocatechuate in *Achromobacter*. A. SEGURA, D.A. D'ARGENIO and L. N. ORNSTON. Yale Univ., New Haven, Conn.
- K-79. Genetic and Physiological Interactions Associated with Transport of Aromatic Compounds in *Achromobacter*. D. A. D'ARGENIO, A. SEGURA, P. V. BUNZ, W. M. COCO and L. N. ORNSTON. Yale Univ., New Haven, Conn.
- K-80. Use of Mismatch Repair Mutants to Recover Genes from Environmental Isolates. D. M. YOUNG, J. A. MEDEIROS, and L. N. ORNSTON. Yale Univ., New Haven, Conn.
- K-81. *Achromobacter* PcaK is a Multispecificity Active Facilitator of Aromatic Acid Transport. W. M. COCO* and L. N. ORNSTON.
- K-82. Identification of an Internal Promoter within the Operon Containing 2-Oxoglutarate Dehydrogenase and Dihydroxyipsoamide Succinyl Transferase Genes in *Brucella abortus*: A Possible Explanation for the Differential Expression of these Genes. L. BOSCHIOLO, S.L. CRAVERO,* E. CAMPOS, A. ARESSE and O. ROSSETTI. CICV-DTA, Castelar, Argentina.
- K-83. Further Examination of the Effects of In Vivo Expression of S-Adenosylmethionine Hydrolase on Regulation of Genes in the Methionine Regulon. S. PALEGER,* S. K. RECEVEUR, K. D. MANSFIELD, and J. A. HUGHES. Hanover Coll., Hanover, IN.
- K-84. Effects of Point Mutations in the Promoter Region of the *pts* Operon of *Streptococcus salivarius*. S. THOMAS, A. ROY, M. FRETTE, and C. VADEBONCOEUR*. Universite Laval, Quebec, Canada.
- K-85. In Vivo Expression of S-Adenosylmethionine Hydrolase Increases Export of S-Methylthioribose from *Escherichia coli*. M. D. HATTON,* J. SIMMONS, and J. A. HUGHES. Hanover Coll., Hanover, Ind.
- K-86. Cloning and Characterization of *edf* and *adg* from *Rhodobacter capsulatus*. X. ZHANG* and T. CONWAY. The Ohio State Univ., Columbus.
- K-87. Molecular Genetic Characterization of the *gntF* Gene, Encoding the High Affinity Gluconate Transporter in *Escherichia coli*. N. PEEKHAUS,* C. BAUSCH, and T. CONWAY. The Ohio State Univ., Columbus.
- K-88. Vitamin K2 Biosynthesis: Overexpression, Purification, and Properties of the Bifunctional Enzyme Encoded by the *menD* Gene. O. KWON,* D. K. BHATTACHARYYA, C. PALANIAPPAN, and R. MEGANATHAN. Northern Illinois Univ., DeKalb.
- K-89. Anaerobic Transcription of a Vitamin K₂ (menaquinone) Biosynthetic Gene Cluster. D. M. STEVENSON,* R. MEGANATHAN, and M. E. S. HUDSPETH. Northern Illinois Univ., DeKalb.
- K-90. Regulation of Coenzyme Q (Ubiquinone) Biosynthetic Genes *ubiC* and *ubiA* in *Escherichia coli*. M. DRUCE-HOFFMAN,* O. KWON, and R. MEGANATHAN. Northern Illinois Univ., DeKalb.
- K-91. Evaluation of the Promoter Activities of the *hemM5'* Upstream Regions in *Escherichia coli*. Y. PENG,* C. S. RUSSELL, and S. D. COSLOY. Cornell Univ. Med. Coll. Ithaca, N.Y., and City Coll. of City Univ. of New York, New York.
- K-92. ATP Synthase Mutations in *Salmonella typhimurium* Prevent Hydrogen Sulfide Production. K. C. SASAHARA* and E. L. BARRETT. Univ. of California, Davis.
- K-93. Characterization of Mutations in *purI* Eliminating Purine but not Thiamine Synthesis in *Salmonella typhimurium*. J. L. ZILLES* and D. M. DOWNS. Univ. of Wisconsin, Madison.

144-K. Poster Session
Genetic and Biochemical Regulation
of Metabolic Pathways

Tuesday, 12:45 p.m.

Halls B and C

- K-72. Genetic and Physiological Characterization of the *fur* Gene of *Pseudomonas* sp. K.C. D. B. KNAEBEL, T. A. LEWIS, P. R. AUSTIN, and R. L. CRAWFORD. Clarkson Univ., Potsdam N.Y., and Univ. of Idaho, Moscow.
- K-73. Cloning and Sequence Analysis of Genes Encoding the Gluconate Permease and Gluconokinase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. P. W. HAGER,* A. COVERT-RINALDI, W. H. WALLACE, and P. V. PHIBBS, JR. East Carolina Univ., Sch. of Med., Greenville, N.C.
- K-74. The Elongation Factor Tu of *Pseudomonas aeruginosa*: Complex Formation With Nucleoside Diphosphate Kinase. S. MUKHOPADHYAY, S. SHANKAR, and A. M. CHAKRABARTY. Univ. of Illinois, Chicago.

Molecular Genetics OF Bacteria AND Phages



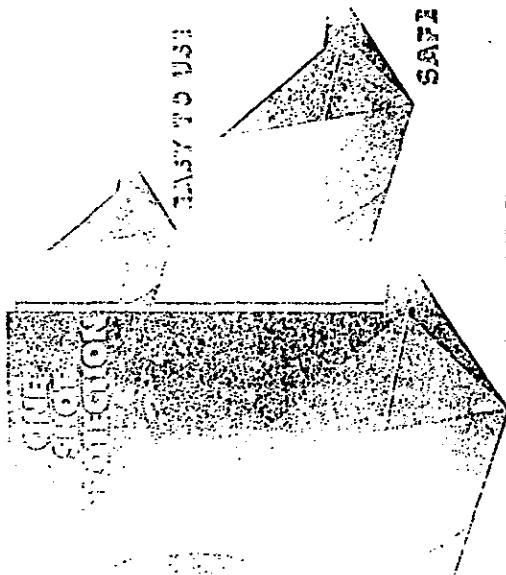
**UNIVERSITY OF WISCONSIN-MADISON
MEMORIAL UNION AUGUST 8-10, 1997**

AUTHOR INDEX

- Portnoy, D. A., 70
 Postma, P., 18
 Pradel, E., 197
 Praituan, W., 184
 Price, C. W., 12
 Prüss, M., 47
 Puente, J., 117
 Puente, J. L., 176
 Py, B., 23
 Rabibadana, S., 183
 Raffaello, M., 198
 Raina, S., 103, 127, 128, 199
 Raivio, T. L., 200
 Rajendrakumar, G. V., 136
 Rajman, L. A., 201
 Rao, L., 202
 Ratliff, M., 22
 Read, E. K., 63
 Reches, M., 88
 Record, M. T. Jr., 60, 198
 Reed, W., 203
 Reisenauer, A., 204
 Reiss, J. M., 205
 Reiter, K., 43
 Reitzer, L., 210
 Renberg, S. K., 206
 Reznikoff, W. S., 93, 114, 156, 190,
 238, 241
 Richter, C., 32
 Rietsch, A., 25
 Roberts, C., 50
 Roberts, G. P., 212
 Roberts, J., 50
 Rodionov, O., 82
 Ross, W., 11, 41, 101, 106, 135
 Rothman-Denes, L. B., 48, 72
 Rüngeling, E., 207
 Rybehin, V. N., 228
 Ryder, A., 50
 Ryding, J., 6
 Saecker, R. M., 60, 198
 Sakagami, K., 145
 Salgado, H., 98
 Salyers, A., 112, 213
 Salyers, A. A., 80
 Sampieri, C. L., 176
 Sanford, D., 214
 Santos, J. M., 208
 Sarkar, N., 52
 Savery, N., 42
 Sawitzke, J. A., 83
 Schechter, L., 209
 Schefke, B., 153
 Schierle, C., 99
 Schifferli, D., 133
 Schlax, P. E. Jr., 198
 Schleif, R. F., 131, 203, 223
 Schneider, B., 210
 Schumann, W., 15
 Schweder, T., 16
 Schwedock, J., 2
 Schyns, G., 45
 Sektas, M., 91, 235
 Shan, Q., 113, 171, 211
 Shapiro, L., 14, 204, 216
 Sharp, M., 4, 100
 Shelver, D., 212
 Shen, B., 10
 Shimamoto, N., 62
 Shipman, J., 213
 Shoemaker, N., 112
 Siegel, H. A., 80
 Siegele, D., 49, 175
 Silhavy, T. J., 20, 26, 125, 140, 149,
 200, 205
 Singh, J., 214
 Sitailo, L. A., 215
 Sitnikov, D., 7
 Skerker, J., 216
 Skurnik, M., 193
 Slater, H., 76
 Slater, S., 148
 Smith, D., 24
 Sonenshein, A. L., 126, 177
 Squires, C., 10
 Squires, C. L., 10, 107, 222, 243

AMERICAN REFERENCE TYPHOID VACCINATION

WATSON



PROTECTIVE

Highly purified Vi polysaccharide for optimal performance

Form 11 - 001/11/1987 (REVISED) (GROUP 1) (1987)

PROTECTIVE

INDICATIONS

CONTRAINDICATIONS

PREPARATION FOR USE

DR. DANIELE MIGNELUX COMMUNICAT



Third Asia-Pacific Symposium on Typhoid Fever and Other Salmonellosis

Abstract book

Darmstadt, Bali-Indonesia
December 8-10, 1997

Hosted by:
Indonesian Society for Microbiology
(Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia)

S2-1

NOVEL PORIN GENES AND MODES OF PORIN REGULATION IN *Salmonella typhi*

Irma Martínez-Flores, Ricardo Grepeza, Roxana Cano, Clara L. Sampieri, José Luis Puentes and Edmundo Calva, Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca, Morelos, Mexico.

S. typhi ompS1 constitutes a novel porin gene. It has seven putative OmpR-binding boxes and three promoters. Our current model for expression contemplates activation of transcription, from P1, by OmpR-binding to boxes II and III (C-type, low affinity), whereas boxes I and IV-VII would be involved in negative regulation. The fact that *ompS1* expression increases more than 100-fold upon removal of the cis-acting elements, and that this level is more than 10-fold higher than that for *ompC*, which codes for a major porin, raises interesting questions on its role and regulation in nature.

The analysis of the expression of *S. typhi* and *E. coli* *ompC-lacZ* fusions, in cross-complementation experiments with either the *S. typhi* or *E. coli* *ompB* (*ompR*ien⁺) operators, in either *S. typhi* or *E. coli* *ompB* backgrounds, showed that both *S. typhi* and *E. coli* *ompC* are not regulated by osmolarity when they are under the control of *S. typhi* *ompB* in *S. typhi*. Interestingly, in an *S. typhi* background, both genes are downregulated under *E. coli* *ompB*. In contrast, in *E. coli*, they are both osmoregulated under *S. typhi* or *E. coli* *ompB*. Thus, the lack of osmoregulation of *S. typhi* *ompC* expression, is determined both by the *S. typhi* *ompB* operon and by other unknown factors present in *S. typhi*.