

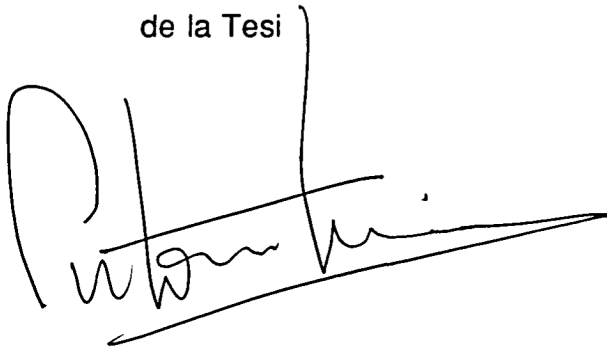
UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE BIOLOGIA

**LES MUTACIONS *hha* I *hap*: INCREMENT DE  
L'EXPRESSION DE PROTEÏNES HETERÒLOGUES  
CLONADES A *Escherichia coli***

Vist-i-plau del Director

de la Tesi



**Dr. Antonio Juárez Giménez**

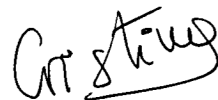
Memòria presentada per

**Cristina Madrid Xufre**

per optar al Grau de

Doctor en Ciències

Biològiques



Barcelona, Novembre de 1992

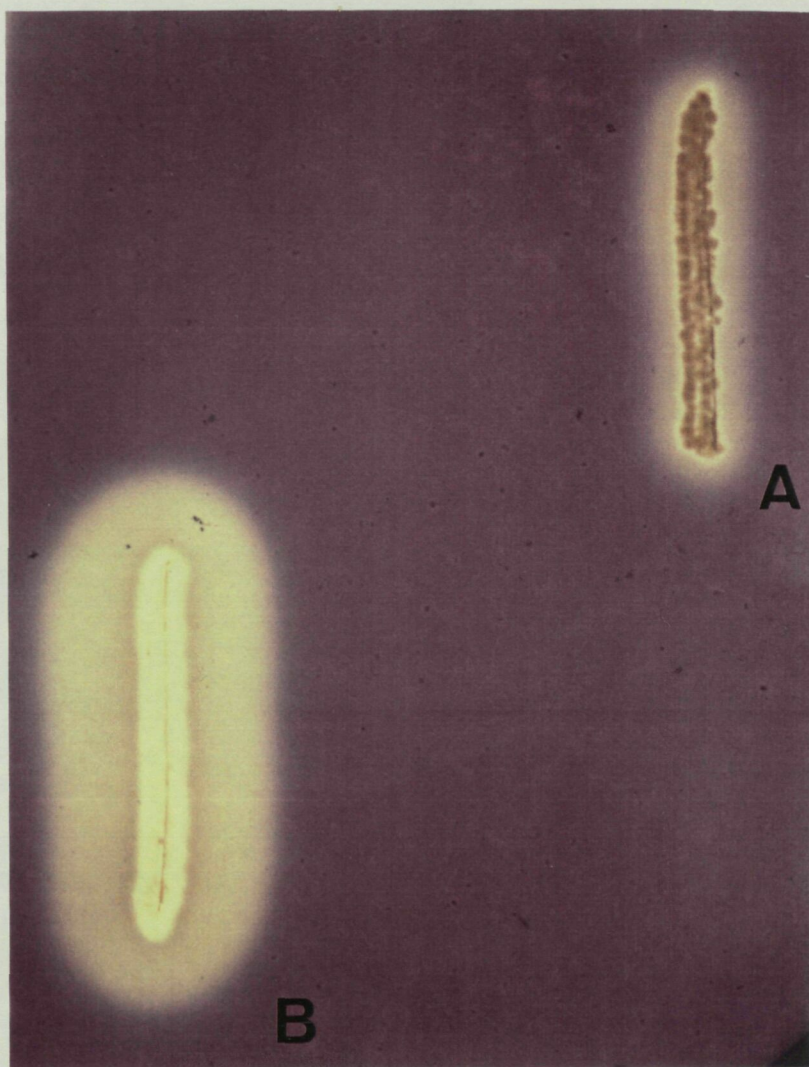
### 3.4.7 Pleotropia de la mutació *hap-9*. Expressió d'una endoglucanasa de *Bacillus polymyxa* a la soca CM209.

Donades les característiques de la mutació *hap-9* pel que fa a l'expressió de l'aerolisina, proteïna heteròloga a *E.coli*, es va plantejar l'estudi de l'efecte d'aquesta mutació sobre l'expressió d'una altra proteïna heteròloga a *E.coli*, per determinar si també era afectada per la mutació, i si l'efecte era similar. Es va estudiar l'expressió a la soca CM209 d'una endoglucanasa de *Bacillus polymyxa* clonada en un vector multicòpia, el plàsmid pBP47 (Tc').

L'activitat externa d'aquesta proteïna pot ser fàcilment detectada en plaques de LB suplementades amb carboximetilcel.lulosa (CMC) al 0,5%. Aquest substrat és degradat per l'endoglucanasa, i els halos de degradació es poden posar de manifest per tinció de la placa amb Roig Congo (Materials i mètodes, 2.14.4). Es van sembrar en estria en una única placa les soques 5K (pBP47) i CM209 (pBP47) i es van incubar a 37°C. El revelat de les plaques va mostrar que la soca CM209 (pBP47) presenta un halo de degradació de CMC molt superior a 5K (pBP47) (Figura 3.4.14), fet que suggeria que la mutació de la soca CM209 també afectava l'expressió de l'endoglucanasa clonada.

Aquest resultat es va confirmar en assajos de l'activitat carboximetilcel.lulàsica (CMCàsica) de l'endoglucanasa en fraccions externes i internes de 5K (pBP47) i CM209 (pBP47) de cultius en fase estacionària. L'activitat, mesurada com a alliberament de glucosa (Materials i mètodes, 2.14.4), és similar a les fraccions internes de les dues soques. En canvi, per les fraccions externes, la soca CM209 (pBP47) presenta una activitat molt superior a la de la soca parental (Taula 3.4.5).

**Figura 3.4.14** Halos de degradació de CMC produïts per les soques 5K (pBP47) (A) i CM209 (pBP47) (B).



**Taula 3.4.5** Unitats d'activitat CMCàsica a fraccions externes i internes corresponents a cultius en fase estacionària de les soques 5K (pBP47) i CM209 (pBP47).

Fracció	5K (pBP47)	CM209 (pBP47)
Interna	3,1	2,9
Externa	0	2,9

### 3.4.8 Relació entre la mutació *hap-9* i els gens *tolQRAB*.

La cotransducció de marcadors ens va permetre mapar la mutació *hap-9* al minut 16,7 del mapa de lligament del cromosoma d'*E.coli*. En conseqüència, es va revisar la 8<sup>ena</sup> edició del mapa de lligament d'*Escherichia coli* (Bachmann, 1990), per tal d'analitzar quins gens són els que es troben mapats entre els minuts 16,5 i 17. Els gens censats entre aquests minuts són els següents (Bachmann, 1990; Webster, 1991):

- . *suc*: metabolisme del succinat.
- . *cyd*: citocrom d.
- . *tol Q:(fii)* tolerància a les colicines del grup A i a la infecció per bacteriòfags filamentosos de DNA de cadena senzilla, hipersensibilitat a SDS, DOC, EDTA i determinats antibiòtics.
- . *tolR*: les mateixes característiques que *tolQ*.
- . *tolA*: (*excC*, *lky*) tolerància a les colicines del grup A i a la infecció per fags filamentosos de DNA de cadena senzilla. Hipersensibilitat a SDS, DOC, EDTA i determinats antibiòtics. Alliberament de proteïnes periplasmàtiques al medi extern.
- . *tolB*: tolerància a colicines E2, E3, A i K. Hipersensibilitat a SDS, DOC, EDTA i determinats antibiòtics. Alliberament de proteïnes periplasmàtiques al medi extern.
- . *nadA*: proteïna A de la quinolinat sintetasa.
- . *lysT*: lisina tRNA.
- . *valT*: valina TRNA.
- . *aroG*: DAHP sintetasa.
- . *phxB*: adsorció de  $\phi$ X174.
- . *gal*: metabolisme de la galactosa.

La descripció bibliogràfica d'aquests gens no ens va fer sospitar que cap d'ells estigués relacionat amb la mutació *hap-9*, a excepció dels gens *tolQRAB*, ja que mutacions en aquests gens estan relacionades amb la tolerància a colicines del grup A, la tolerància a la infecció per bacteriòfags filamentosos i amb múltiples efectes pleotròpics. Entre ells, cal destacar l'alliberament al medi de proteïnes periplasmàtiques (mutants "leaky"), característica que, pel que fa referència a l'expressió de l'aerolisina, també presenta la soca CM209.

#### **3.4.8.1 La soca CM209 és tolerant a les colicines A i E1.**

Donades les característiques de les mutacions en els gens *tolQRAB* respecte a la tolerància presentada davant l'efecte de les colicines de la classe A, i la possible relació entre mutacions en aquests gens i la mutació *hap-9*, es va provar la resistència o sensibilitat de la soca CM209 a diferents colicines.

Es van utilitzar les colicines E1 i A, del grup A, que segueixen el patró de translocació *tolQRAB*, i dues colicines de la classe B (G i D), que segueixen un altre patró de translocació, dependent de TonB (Pattus *et al.*, 1990).

El test de sensibilitat a les colicines anomenades anteriorment (Materials i mètodes, 2.7) va mostrar que la soca CM209 és insensible a les colicines del grup A utilitzades (E1 i A), mentre que la soca parental 5K, utilitzada com a control, és sensible, tal com caldria esperar d'una soca d'*E.coli* que no tingui cap mutació afectant la sensibilitat a colicines. Pel que fa a les colicines de la classe B, les dues soques són sensibles (Taula 3.4.6). Es va fer el mateix test amb les colònies revertents al fenotip hemolític parental (Hly+) obtingudes de la transducció de *Tn10* des de les soques NK6033 i N3030 a la soca CM209. Com era d'esperar, la reversió al fenotip hemolític Hly+ va acompanyada d'una

reversió al fenotip de sensibilitat a les colicines propi de la soca parental (Taula 3.4.6). La insensibilitat a les colicines del grup A de la soca CM209 no pot ser denominada resistència, ja que aquest terme es reserva per mutacions que afecten els gens que codifiquen pels receptors de les colicines. El receptor de la colicina E1 és la proteïna BtuB (Mock i Pugsley, 1982), codificada pel gen *btuB*, mapat al minut 90 del mapa de lligament d'*E.coli*, i el receptor de la colicina A està format per aquesta mateixa proteïna, associada al lipopolisacàrid i a la proteïna OmpF (Chai *et al.*, 1982). La insensibilitat a les colicines E1 i A de la soca CM209 correspondria a una de les mutacions anomenades tolerants, causades per alteració en algun dels passos implicats entre l'adsorció de la colicina i l'efecte sobre la seva diana cel.lular.

**Taula 3.4.6** Sensibilitat a les colícines A, E1, G i D mostrada per diferents soques.

SOCA	COLICINA			
	A	E1	G	D
5K	-	-	-	-
CM209	+	+	-	-
CM209 x NK6033*	-	-	-	-
CM209 x N3030*	-	-	-	-

+: creixement en presència de la colicina.

-: absència de creixement en presència de la colicina.

\*: clons derivats de la soca CM209 que han revertit al fenotip parental després de la transducció del gen salvatge *hap-9* des de les soques NK6033 i N3030.

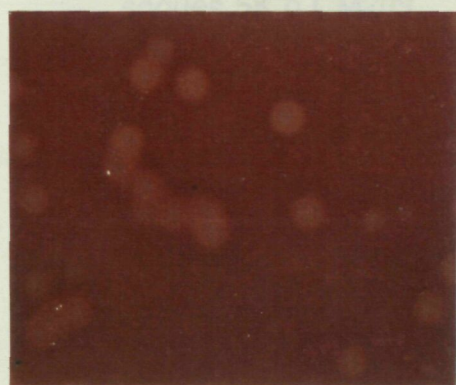
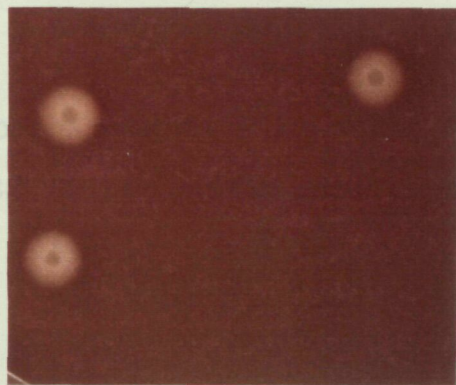
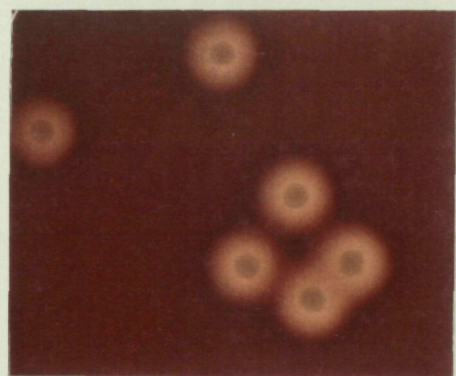
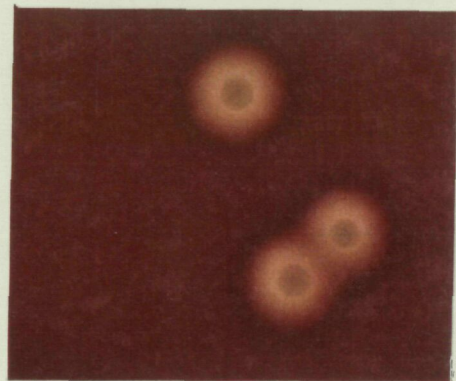


**3.4.8.2 L'expressió de l'aerolisina d'*A. hydrophila* a les soques portadores de mutacions en els gen *tolA* i *tolB* és similar a l'expressió de l'aerolisina a la soca CM209.**

Una vegada determinada la tolerància de la soca CM209 a colícines del grup A, i tenint en compte que, pel que fa a l'expressió de l'aerolisina a la soca CM209, la secreció al medi extern correspondria a un efecte "leaky" (ja que paral·lelament a la seva sortida també ho fan altres proteïnes periplasmàtiques) i que aquesta és una característica d'algunes mutacions en els gens *tolQRAB*, vàrem pensar que una aproximació per esbrinar la relació entre la mutació *hap-9* i mutacions en els gens *tol* descrits a la mateixa localització seria analitzar l'expressió de l'aerolisina a soques amb mutacions en aquests gens.

Es van transformar les soques d'*Escherichia coli* A592 (*tolA*) i A593 (*tolB*) amb el plàsmid pHPC3-700. Les colònies resultants de la transformació, seleccionades en plaques d'agar-sang suplementades amb Tc, mostraven uns halos d'hemòlisi comparables als de la soca CM209, és a dir, molt més grans que els de la soca 5K (pHPC3-700) (Figura 3.4.15).

**Figura 3.4.15** Fenotip hemolític de colònies de les soques 5K (pHPC3-700) (A), CM209 (pHPC3-700) (B), A592 (pHPC3-700) (C) i A593 (pHPC3-700) (D) sobre plaques d'agar-sang.

**A****B****C****D**

Els assajos de valoració de l'activitat hemolítica de l'aerolisina a fraccions cel·lulars obtingudes a partir de cultius en fase estacionària (DO a 600 nm de 1,8) de les soques 5K (pHPC3-700), CM209 (pHPC3-700), A592 (pHPC-700) i A593 (pHPC3-700) (Taula 3.4.7) va permetre concloure que:

- 1) Les soques A592 i A593 presenten escassa activitat hemolítica als compartiments interns, éssent menor que l'activitat mostrada per les soques 5K o CM209.
  
- 2) L'activitat hemolítica a les fraccions externes de les soques A592 i A593 és similar a la de la soca CM209, i en tots tres casos superior a la de 5K.

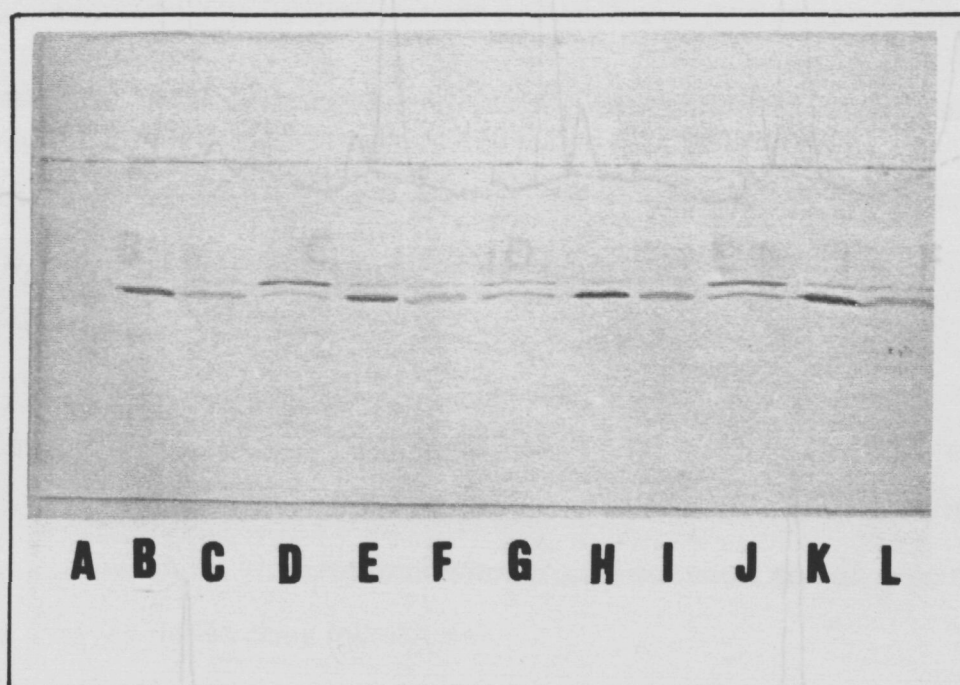
**Taula 3.4.7** Valoració de l'activitat hemolítica corresponent a les fraccions cel·lulars de les soques 5K, CM209, A592 i A593 transformades amb el plàsmid pHPC3-700.

Soca	Externa	Periplasma	Citoplasma
5K (pHPC3-700)	1,22	1374,1	75,87
CM209 (pHPC3-700)	28,71	1029,73	16,02
A592 (pHPC3-700)	23,35	329,01	1,48
A593 (pHPC3-700)	26,98	151,77	3,11

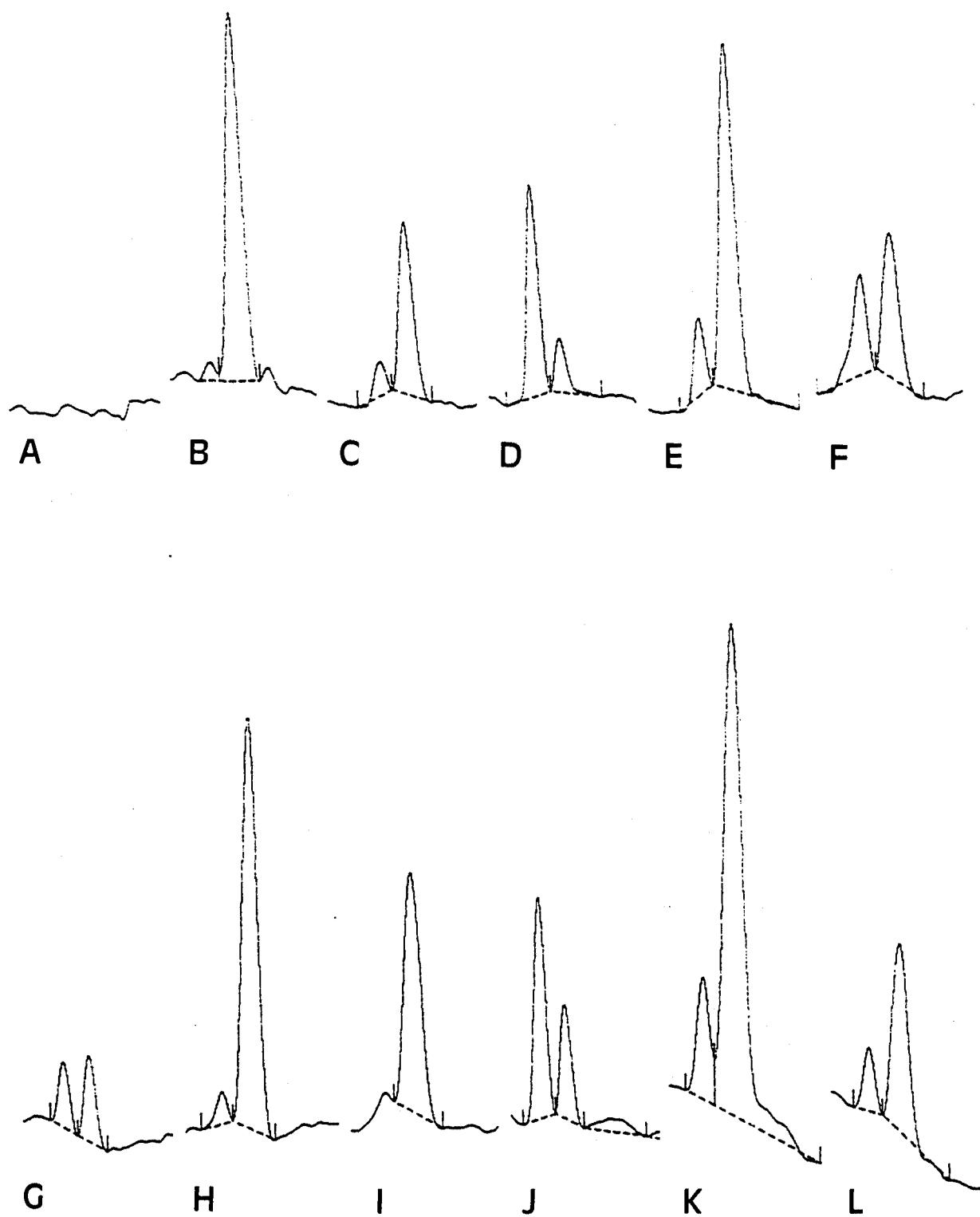
Per una altra banda, la quantificació per immunodetecció i densitometria de l'aerolisina a fraccions obtingudes a partir de cultius en fase estacionària de les mateixes soques (Figura 3.4.16), va mostrar que és possible detectar a les soques A592 i A593 quantitats d'aerolisina equivalents a les de la soca CM209, tant a les fraccions externes com internes (periplasmàtiques i citoplasmàtiques).

La quantificació d'aerolisina en els mutants *tolA* i *tolB* permet concloure que aquestes mutacions tenen un efecte sobre l'expressió de l'aerolisina clonada a pHPC3-700 similar al que causa la mutació *hap-9* de la soca CM209.

**Figura 3.4.16** Immunodetecció d'aerolisina a fraccions cel.lulars corresponents a cultius de 12 hores d'incubació de les soques 5K (pHPC3-700), CM209 (pHPC3-700), A592 (pHPC3-700) i A593 (pHPC3-700). A, B, C: fraccions externa, periplasmàtica i citoplasmàtica de la soca 5K (pHPC3-700); D, E, F: fraccions externa, periplasmàtica i citoplasmàtica de la soca CM209 (pHPC3-700); G, H, I: fraccions externa, periplasmàtica i citoplasmàtica de la soca A592 (pHPC3-700); J, K, L: fraccions externa, periplasmàtica i citoplasmàtica de la soca A593 (pHPC3-700).



**Figura 3.4.16** (continuació) Anàlisi densitomètrica corresponent a la immunodetecció anterior.



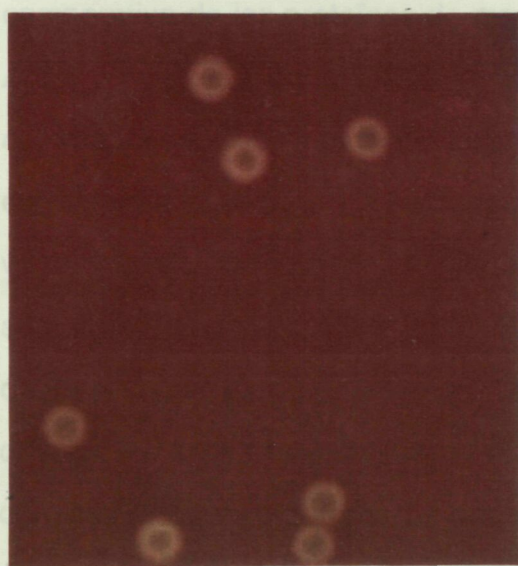
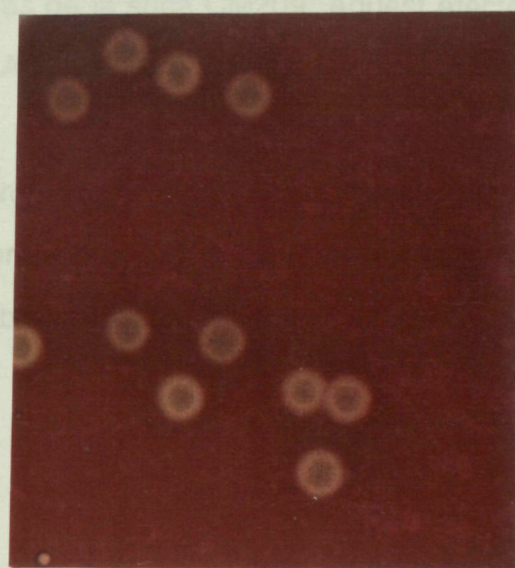
### 3.4.8.3 Les mutacions *tolA* i *tolB* no afecten l'expressió d'hemolisina codificada pel plàsmid pANN202-312.

Ja que coneixíem que la mutació *hap-9* no afecta l'expressió de l'hemolisina d'*E.coli* clonada al plàsmid pANN202-312, vàrem decidir comprovar també si les mutacions *tolA* i *tolB* hi tenien algun efecte. Per això, es van transformar les soques A592 i A593 amb el plàsmid pANN202-312 per tal de confirmar que mostraven el mateix fenotip hemolític que la soca CM209 (pANN202-312), és a dir, que l'expressió d'hemolisina clonada a pANN202-312 no es veia afectada per la mutació. El fenotip de les colònies resultants de la transformació, seleccionades sobre plaques d'agar-sang suplementades amb cloramfenicol, va confirmar que cap de les dues mutacions afectava l'expressió de l'hemolisina, mostrant un fenotip similar al de les soques 5K (pANN202-312) i CM209 (pANN202-312) (Figura 3.4.17).

Cal tenir present que les mutacions *tolA* i *tolB* produeixen efectes d'alliberament de proteïnes periplasmàtiques al medi, i que l'hemolisina d'*E.coli* no segueix una via de secreció dependent d'una seqüència senyal, sinó que és directa a través de les dues membranes.



**Figura 3.4.17** Fenotip de colònies de les soques 5K (A), CM209 (B), A592 (C) i A593 (D) transformades amb el plàsmid pANN202-312, sobre plaques d'agar-sang.

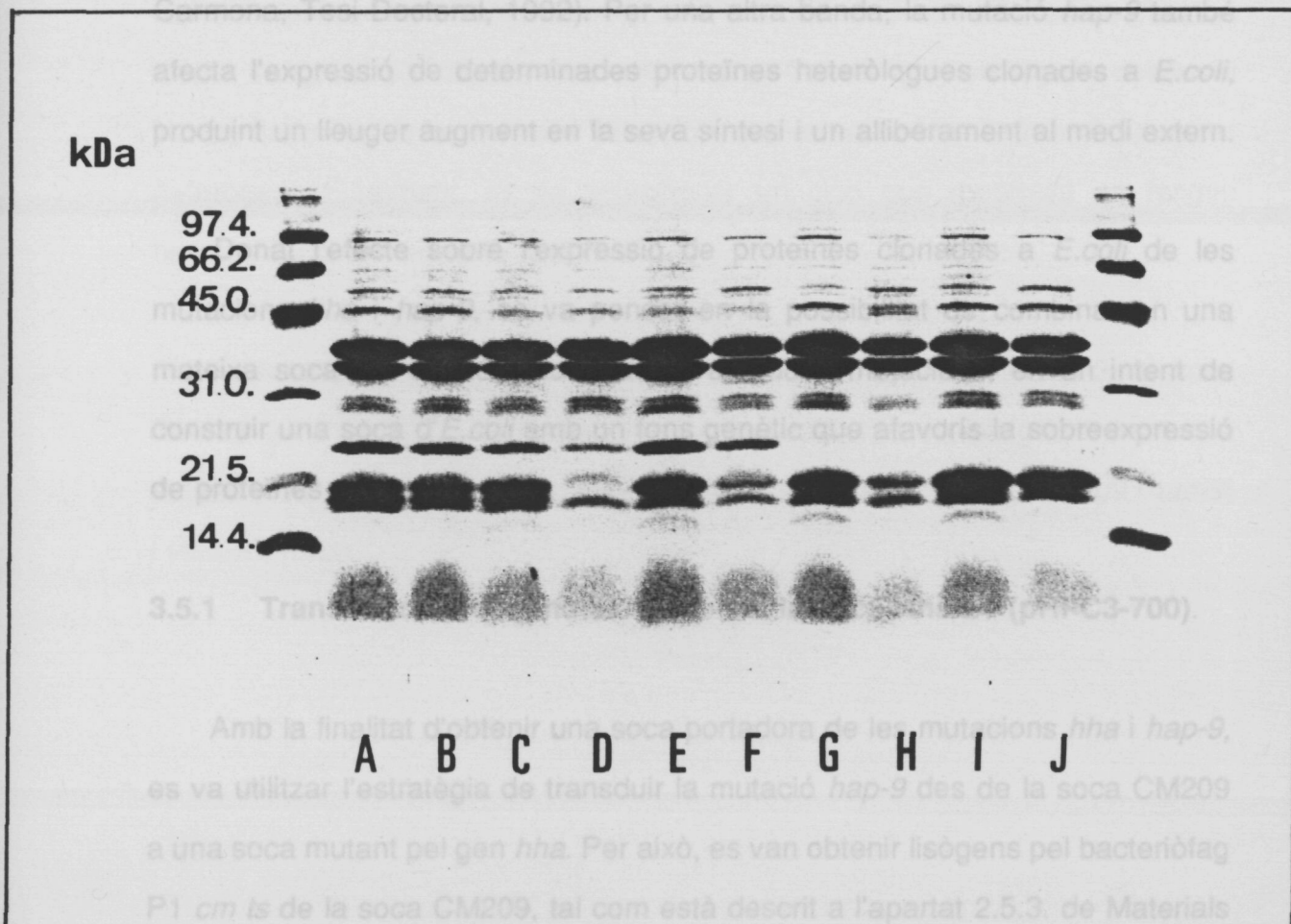
**A****B****C****D**

#### 3.4.8.4 Anàlisi comparativa dels patrons de membrana externa de les soques CM209, A592 i A593.

Dins el conjunt d'estudis dirigits a comprovar la relació entre la mutació *hap-9* i mutacions en els gens *tol*, es va decidir realitzar també una anàlisi comparativa de les proteïnes de membrana externa de les soques 5K, CM209, A592 i A593. La comparació entre els patrons de proteïnes de membrana externa, obtingudes a partir de cultius de les soques anteriorment anomenades en diferents condicions de cultiu (presència/absència del plàsmid pHPC3-700), va permetre determinar que hi ha una diferència clara entre la soca CM209 i les soques A592 (*tolA*) i A593 (*tolB*). En ambdós mutants *tol* s'observa la manca d'una proteïna d'aproximadament 25 kDa, que és present a les preparacions obtingudes a partir de cultius de les soques CM209 o 5K. A més a més, és observable que els patrons de proteïnes de membrana externa de les soques A592 i A593 també presenten l'efecte produït per l'expressió de l'aerolisina clonada al plàsmid pHPC3-700 sobre determinades proteïnes de baix pes molecular, que s'havia observat en el cas de la soca CM209. Aquest efecte és especialment clar en el cas de la soca A592 (Figura 3.4.18).

Tant l'expressió de l'aerolisina d'*Aeromonas hydrophila* als mutants *tol*, com les propietats de la soca CM209, suggereixen que la mutació *hap-9* és deguda a una inserció del transposó Tn5 en el bloc de gens *tolQRA*.

**Figura 3.4.18** Anàlisi electroforètica en SDS-PAGE al 15% de les proteïnes de membrana externa de diferents soques obtingudes en diferents condicions (soques curades o transformades amb pHPC3-700). A: 5K; B: 5K (pHPC3-700); C i E: CM209; D i F: CM209 (pHPC3-700); G: A592; H: A592 (pHPC3-700); I: A593; J: A593 (pHPC3-700).



### **3.5 OPTIMITZACIÓ DE L'EXPRESSIONI DE PROTEÏNES CLONADES A *E.coli*. CONSTRUCCIÓ D'UNA SOCA *hha hap-9*.**

La mutació *hha* afecta l'expressió de l'hemolisina i d'altres proteïnes clonades a *Escherichia coli*, provocant un augment en la síntesi citoplasmàtica de la proteïna en qüestió (Nieto *et al.*, 1991; Nieto, Tesi Doctoral, 1991; Carmona, Tesi Doctoral, 1992). Per una altra banda, la mutació *hap-9* també afecta l'expressió de determinades proteïnes heteròlogues clonades a *E.coli*, produint un lleuger augment en la seva síntesi i un alliberament al medi extern.

Donat l'efecte sobre l'expressió de proteïnes clonades a *E.coli* de les mutacions *hha* i *hap-9*, es va pensar en la possibilitat de combinar en una mateixa soca els efectes produïts per ambdues mutacions, en un intent de construir una soca d'*E.coli* amb un fons genètic que afavorís la sobreexpressió de proteïnes clonades.

#### **3.5.1 Transducció de la mutació *hap-9* a la soca Hha-2T (pHPC3-700).**

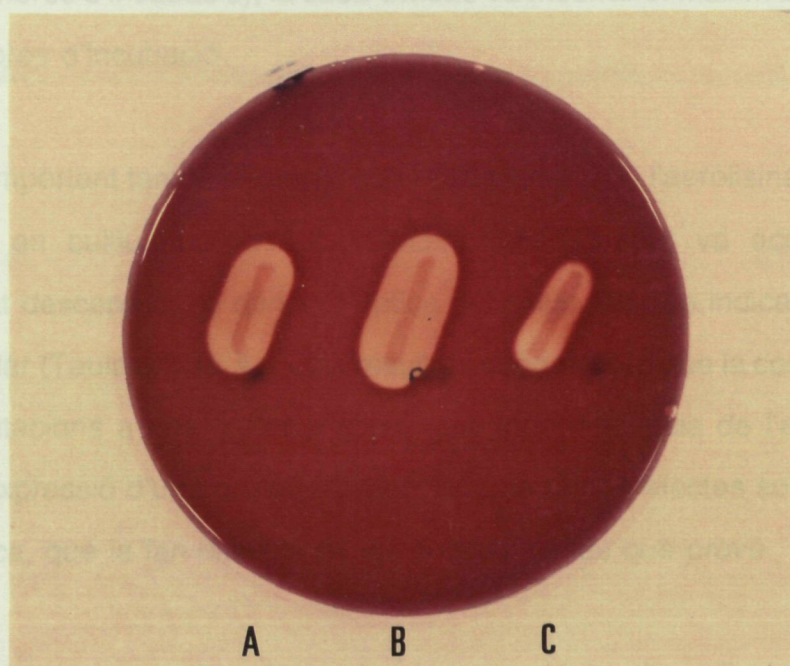
Amb la finalitat d'obtenir una soca portadora de les mutacions *hha* i *hap-9*, es va utilitzar l'estratègia de transduir la mutació *hap-9* des de la soca CM209 a una soca mutant pel gen *hha*. Per això, es van obtenir lisògens pel bacteriòfag P1 *cm ts* de la soca CM209, tal com està descrit a l'apartat 2.5.3. de Materials i mètodes. Després d'obtenir el corresponent lisat, aquest es va utilitzar per infectar una soca *hha*, la soca *E.coli* Hha-2T (pHPC3-700). La transducció sobre la soca receptora transformada amb el plàsmid pHPC3-700 permetia la selecció sobre plaques d'agar-sang, ja que les colònies de la soca Hha-2T (pHPC3-700) desenvolupen halos d'hemòlisi en agar-sang més tard que els que es poden observar en colònies de la soca CM209 (pHPC3-700). Es van seleccionar les

colònies resultants de la transducció sobre plaques d'agar-sang suplementades amb Tc (marcador de pHPC3-700), Ap (marcador de la mutació *hha-2*, obtinguda per inserció de Mud1) i Km (marcador de la mutació *hap-9*, obtinguda per inserció de Tn5).

Del conjunt de colònies resultants de la transducció, es van seleccionar aquelles que presentaven un fenotip més hemolític i es van aïllar sobre plaques d'agar-sang, per tal d'observar-ne el fenotip. Cal dir que, en alguns casos, el fenotip hemolític de les colònies seleccionades es va mostrar extraordinàriament heterogeni. Finalment, es va seleccionar un clon que mostrava un fenotip homogeni i molt hemolític (Figura 3.5.1).

El fenotip en plaques d'agar-sang d'aquest mutant *hha hap-9*, la soca CM329 (pHPC3-700), suggeria que la producció d'aerolisina era superior en aquest mutant que en cadascuna de les dues soques parentals, CM209 (*hap-9*) i Hha-2T (*hha*).

**Figura 3.5.1** Fenotip hemolític sobre agar-sang de les soques CM209 (pHPC3-700) (A), CM329 (pHPC3-700) (B), i Hha-2T (pHPC3-700) (C).



### 3.5.2 Valoració de la producció d'aerolisina de la soca CM329 (pHPC3-700).

La valoració en assajos líquids de l'activitat hemolítica externa de la soca CM329 (pHPC3-700), comparada amb la mostrada per la soca CM209 (pHPC3-700), va permetre comprovar que les dues soques presenten diferent cinètica pel que respecta a la producció d'aerolisina al medi extern. Mentre que, tal com ja s'ha referit anteriorment, la màxima activitat hemolítica externa presentada per la soca CM209 (pHPC3-700) es detecta a la fase estacionària (aproximadament a les 12 hores d'incubació), la soca CM329 va mostrar el màxim d'activitat a més de 22 hores d'incubació.

És important també destacar que l'alliberament de l'aerolisina al medi extern detectat en cultius de la soca CM329 (pHPC3-700) va acompanyat d'un important descens de la densitat òptica del cultiu, fet que indica l'existència de lisi cel.lular (Taula 3.5.1). Aquests resultats suggereixen que la combinació de les dues mutacions a una mateixa soca, amb independència de l'efecte específic sobre l'expressió d'una proteïna heteròloga, té també efectes sobre la fisiologia de la soca, que la fan diferent de les soques de les que prové.

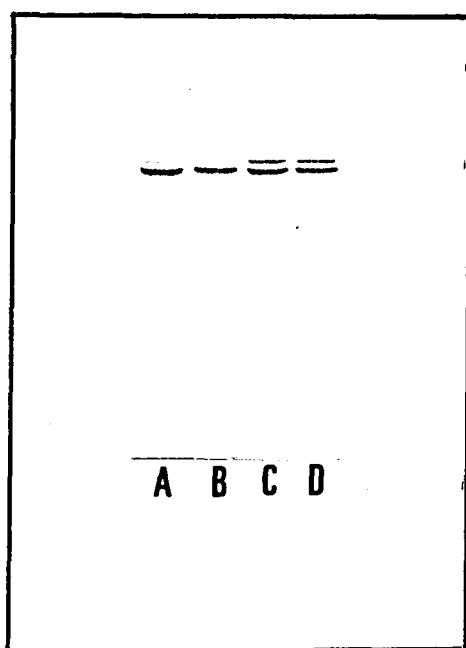
També es va analitzar la producció intracel.lular d'aerolisina de les soques CM209 (pHPC3-700) i CM329 (pHPC3-700), mitjançant la immunodetecció d'aquesta proteïna a extractes intracel.lulars totals obtinguts a partir de cultius en fase estacionària (DO a 600nm de 1,8). Els resultats obtinguts (Figura 3.5.2), permeten determinar que la quantitat d'aerolisina present als extractes de la soca CM329 és lleugerament superior a la present als extractes corresponents a la soca CM209, tenint en compte la suma de les dues formes de la proteïna.

**Taula 3.5.1** Unitats d'activitat hemolítica externa (unitats Hly) i densitat òptica (DO 600nm) de cultius de les soques CM209 (pHPC-700) i CM329 (pHPC3-700).

CM209 (pHPC3-700)		CM329 (pHPC3-700)	
DO 600nm	Unitats Hly	DO 600nm	Unitats Hly
2,27	108,44	2,18	0
2,25	134,96	2,35	0
2,43	148,76	2,31	0
2,44	267,21	2,05	61,95
2,47	289,47	1,8	137,92



**Figura 3.5.2** Immunodetecció d'aerolisina a extractes intracel·lulars de les soques CM209 (pHPC3-700) (A i B) i CM329 (pHPC3-700) (C i D).

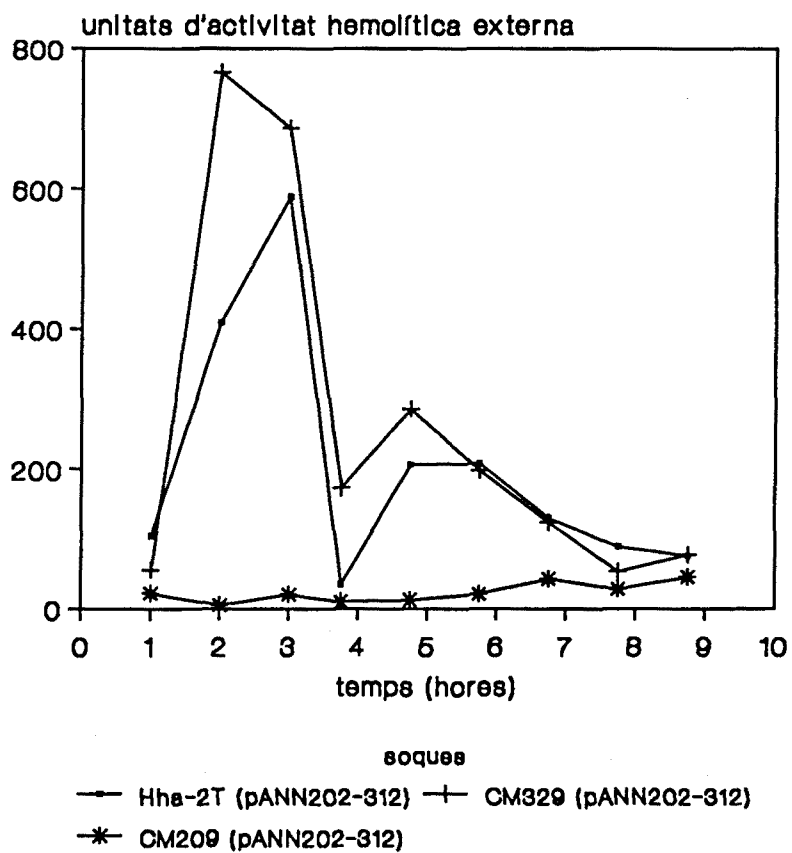


### **3.5.3 La soca CM329 expressa l'hemolisina clonada al plàsmid pANN202-312 seguint un comportament equivalent al de la soca Hha-2T.**

Com a caracterització complementària de la soca CM329, es va analitzar també la producció d'hemolisina d'*E.coli* codificada pel plàsmid pANN202-312. La transformació de la soca CM329 lliure de DNA plasmídic amb el plàsmid pANN202-312 va produir transformants amb el fenotip hemolític propi de la soca Hha-2T (pANN202-312).

La valoració en assajos líquids de l'activitat externa de l'hemolisina va permetre confirmar que la soca CM329 mantenia l'efecte sobre l'expressió de l'hemolisina propi de la mutació *hha* (Figura 3.5.3). Aquest fet es correlaciona amb l'observació ja esmentada de que la mutació *hap-9* no afecta de manera significativa l'expressió de l'alfa-hemolisina d'*E.coli*.

**Figura 3.5.3** Valoració de l'activitat hemolítica externa corresponent a cultius de les soques Hha-2T (pANN202-312), CM329 (pANN202-312) i CM209 (pANN202-312).



## **4 Discussió**

Els experiments d'hibridació de tipus "Southern" utilitzant sondes marcades del gen *hha*, contra DNA cromosòmic d'*Escherichia coli*, han possibilitat la detecció d'un únic senyal d'hibridació. Tant la utilització d'una sonda de 300 pb, corresponent específicament al gen *hha*, com la utilització de sondes de 1,7 i 5,6 Kb, han proporcionat els mateixos resultats. Per tant, es pot afirmar que els resultats obtinguts prèviament en intentar transduir la mutació *hha* de la soca Hha-3, seleccionant pel marcador de Tn5*phoA* (transposó amb el qual havia estat obtinguda la mutació), en que només el 10% dels transductants resistents a la kanamicina mostraven fenotip Hha<sup>-</sup> (Godessart *et al.*, 1988), no es poden atribuir al fet que el gen *hha* estigui flanquejat per seqüències repetides, al menys pel que fa a distàncies d'aproximadament 3 Kb des de cadascun dels seus extrems. Per tant, la baixa freqüència de lligament entre els dos marcadors és probablement deguda a la transducció de transposicions de Tn5 al genoma del bacteriòfag P1, fenomen que ja ha estat descrit anteriorment (Berg *et al.*, 1983).

Per hibridació de tipus "Southern" es va intentar també inicialment la detecció del gen *hha* a diferents espècies bacterianes de la família *Enterobacteriaceae*. Tan sols en el cas de la soca C3 de *Klebsiella pneumoniae* es va detectar un senyal positiu. Aparentment, aquests resultats assenyalaven una distribució molt restringida del gen *hha* a diferents enterobactèries.

El descobriment de que la proteïna YmoA de *Yersinia enterocolitica* (Cornelis *et al.*, 1991) presenta un grau d'homologia molt elevat amb la proteïna Hha d'*E.coli*, ens va induir a utilitzar les sondes del gen *hha* per tal d'intentar la detecció del gen *ymoA* mitjançant hibridacions de tipus "Southern". Cap de les soques de *Y.enterocolitica* analitzades va donar senyal positiu amb les sondes utilitzades. Tot i que els resultats obtinguts amb altres enterobactèries suggerien

que el gen *hha* és gairebé exclusiu d'*E.coli*, l'observació de que, malgrat l'homologia entre les proteïnes Hha i YmoA, no es detectin senyals d'hibridació entre les sondes del gen *hha* i el DNA cromosòmic de diferents soques de *Y. enterocolitica*, fa pensar que possiblement una proteïna equivalent a Hha també pot existir en altres enterobactèries, però que la degeneració del codi genètic pot haver causat que la seqüència de nucleòtids dels gens que codifiquin per aquestes proteïnes sigui prou diferent com per no donar resultats positius d'hibridació en les condicions d'astringència utilitzades.

A més a més, també es va utilitzar la tècnica de la PCR per tal de completar els estudis sobre la distribució del gen *hha* a la família *Enterobacteriaceae*. La utilització d'uns "primers" específics de la seqüència del gen *hha* tan sols va proporcionar l'amplificació desitjada amb les diferents soques d'*E.coli* utilitzades (excepte amb una, la soca Aberdeen 1064), amb la soca C3 de *K.pneumoniae* i amb una de les soques de *Y.enterocolitica*, la soca Y754. Aquests resultats confirmen els obtinguts anteriorment, i posen de manifest que possiblement la variabilitat en la seqüència de nucleòtids dels gens *hha* i *ymoA* és la responsable de que en experiències d'hibridació no es detectin senyals, i si que es pugui detectar amplificació per PCR, ja que aquesta tècnica requereix menys regions d'elevada homologia. Es va decidir dissenyar uns "primers" del gen *ymoA* que es corresponguessin amb les seqüències de màxima homologia de nucleòtids entre el gen *ymoA* i el gen *hha*, amb la finalitat de disposar d'un sistema que permetés la detecció d'ambdós gens. La utilització d'aquests "primers" només va donar amplificació pel gen *ymoA* de *Y.enterocolitica*. Aquests resultats permeten suposar que la família de proteïnes representada per les proteïnes Hha d'*E.coli* i YmoA de *Y.enterocolitica* està segurament present a moltes altres enterobactèries. Malgrat que no sigui possible detectar senyals d'hibridació o d'amplificació, sembla clar que aquest fet no implica

necessàriament que altres microorganismes no sintetitzin una proteïna equivalent.

L'intent d'obtenir la mutació *hha* a la soca HB101 (pANN202-312), amb la intenció de disposar d'una soca amb genotip *recA* portadora de la mutació *hha*, ha conduït a la caracterització d'un interessant fenomen que fa referència a la utilització del transposó Tn5 com a element mutagènic: l'aparició de clons no productors d'hemolisina entre la descendència dels mutants *hha* que s'havien obtingut per mutagènesi amb Tn5. Aquest fet ha portat a la caracterització d'un fenomen de transposició secundària de Tn5 després de la seva inserció inicial en el gen *hha*. És important aquí recordar el fet de que, un cop inserat al genoma bacterià, Tn5 és normalment estable, i que la seva utilització com a agent mutagènic a *E.coli* no ha conduït fins ara a la descripció de fenòmens de transposició secundària (De Bruijn, 1987; De Bruijn i Lupski, 1984), a excepció d'un cas prèviament publicat (Harayama *et al.*, 1979). La inestabilitat de les insercions de Tn5 en el gen *hha* seria la causa de l'aparició de transposicions a altres localitzacions. Les insercions del transposó en els gens *hly* del plàsmid pANN202-312 són la causa de l'aparició de clons no productors d'hemolisina. L'anàlisi de la cinètica de creixement demostra que aquests clons no productors d'hemolisina creixen més ràpidament que els mutants *hha*, fet que justificaria la seva ràpida aparició. La hipòtesi de que la inestabilitat de Tn5 en el gen *hha* porta a la selecció de clons no productors d'hemolisina, suggereix que transposicions des del gen *hha* a altres localitzacions cromosòmiques també serien positivament seleccionades, sempre i quan la transposició secundària restaurés la funció del gen *hha* i no causés altres mutacions letals o amb desavantatges selectius. Aquestes transposicions han estat posteriorment trobades i caracteritzades (C. Badenas i A. Juárez, resultats no publicats).

Pel que fa a la raó de la inestabilitat de Tn5 a mutants *hha*, és important destacar que el superenrotllament del DNA afecta la transposició de Tn5 (Isberg i Syvaenen, 1985), i que la proteïna Hha està relacionada amb el grau de superenrotllament del DNA (De la Cruz *et al.*, 1992). Per tant, la inactivació de la proteïna Hha podria ser la causa primària de la inestabilitat de Tn5 en el gen *hha*, degut a alteracions topològiques en el DNA, seleccionant-se fenòmens de transposició que presentin algun avantatge selectiu. És també important destacar el fet que la freqüència d'obtenció de mutants *hha* en mutagenitzar la soca HB101, de  $10^{-3}$ , contrasta amb la baixa freqüència obtinguda en mutagenitzar la soca 5K (de  $5 \times 10^{-5}$ ; A. Juárez, comunicació personal). Recentment ha estat descrit que, en determinades circumstàncies, la proteïna RecA incrementa la transposició de Tn5 (Kuan *et al.*, 1991). Com a hipòtesi per explicar la baixa freqüència d'obtenció de mutants *hha* a la soca 5K, després de mutagenitzar amb Tn5, cal considerar la inestabilitat de les insercions en aquest gen, potenciada pel genotip *recA*<sup>+</sup>, fet que conduiria a la ràpida desaparició de clons amb fenotip Hly+++ (fenotip hemolític dels mutants *hha*). Una certa inestabilitat, però en un fons genètic *recA*, possibilitaria que després de la mutagènesi es detectessin clons Hly+++ , ja que clons amb altres fenotips encara no haurien desplaçat a les cèl.lules superproductores d'hemolisina.

En la recerca referent a l'expressió de proteïnes heteròlogues a *E.coli* i la problemàtica de la degradació proteolítica de les proteïnes expressades, un dels temes que encara no està totalment resolt és el número de proteases intracel.lulars d'*E.coli* que són responsables d'aquesta degradació. Tot i que fa ja alguns anys que es coneix que el producte del gen *lon* és una proteasa intracel.lular implicada en els processos de degradació de proteïnes "anormals" a *E.coli* (Gottesman, 1990), se'n sap molt poc sobre altres proteases solubles que han estat descrites fins ara (Miller, 1987). La dificultat per seleccionar



fenotips mutants per altres endoproteases d'*E.coli*, en el cas que aquestes mutacions no siguin letals per la cèl.lula, ha estat sens dubte una de les principals raons que ha contribuït a la manca d'informació de la que actualment es diposa sobre aquest tema. L'estratègia desenvolupada en aquest treball, basada en la preparació de microcultius, fraccionament cel.lular i anàlisi de la degradació proteolítica d'una proteïna heteròloga mitjançant tècniques d'electroforesi i immunodetecció, s'ha mostrat vàlida per tal de realitzar un "screening" ràpid en la recerca de mutants amb alteracions en els processos proteolítics intracel.lulars. Motius de prioritats i el volum de treball necessari per tal de detectar mutacions que afectin a algun gen que codifiqui per una proteasa, van aconsellar deixar tan sols la tècnica posada a punt i no dedicar més esforços a la localització d'aquests mutants. Malgrat tot, és destacable el fet que es van poder localitzar mutants que mostraven una activitat proteàsica augmentada, fet que demostra la validesa de l'estratègia utilitzada.

La recerca de mutacions que causin un increment de l'expressió de proteïnes heteròlogues a *E.coli* ens ha conduït a la identificació de dos gens, anomenats *hap-6* i *hap-9*, que estan implicats en la regulació de l'expressió de l'aerolisina d'*Aeromonas hydrophila* AH2 a *E.coli*. S'ha pogut demostrar que ambdues mutacions, de localització cromosòmica, no corresponen a mutacions en el gen *hha*, que a la seva vegada també modifica l'expressió d'aquesta toxina a *E.coli* (Nieto *et al.*, 1987). El principal efecte que les dues mutacions van presentar sobre l'expressió de l'aerolisina va ser l'alliberament al medi de cultiu d'aquesta toxina que normalment s'acumula a l'espai periplasmàtic quan és expressada a *E.coli* (Chakraborty *et al.*, 1986; Howard i Buckley, 1986). Aquest alliberament al medi extern no es va poder considerar una autèntica secreció, ja que en ambdós casos també es va detectar al medi extern la presència d'altres proteïnes periplasmàtiques d'*E.coli*, com la fosfatasa alcalina o la  $\beta$ -lactamasa.

L'efecte de les mutacions *hap* correspon al fenotip de mutants "leaky", que es caracteritzen per l'alliberament al medi extern de proteïnes periplasmàtiques. A més a més de l'alliberament al medi extern d'una part de l'aerolisina acumulada al periplasma, s'ha posat de manifest que les soques portadores d'alguna de les dues mutacions presentaven un lleuger increment de la síntesi de la toxina. La caracterització genètica de les dues mutacions, que s'havien obtingut per inserció del transposó Tn5, va mostrar que es tractava de mutacions que afectaven gens diferents. En un cas la mutació es va localitzar al minut 16,7 del cromosoma d'*E.coli* (*hap-9*) i en l'altre a la regió situada entre els minuts 40 i 50 (*hap-6*). En ambdós casos es va poder detectar un 100% de lligament entre la transducció del marcador de resistència del transposó (Km) i el fenotip Hap<sup>-</sup>.

El mapatge fi de la mutació *hap-9* de la soca CM209 va permetre localitzar la inserció de Tn5 al minut 16,7 del cromosoma d'*E.coli*, regió en la que també es troben mapats els gens *tolQRAB*. Les mutacions en aquest bloc de gens causen tolerància a les colicines del grup A i a l'entrada de DNA de bacteriòfags filamentosos, a més de causar efectes pleotròpics, entre els quals cal destacar l'alliberament de proteïnes periplasmàtiques al medi extern (fenotip "leaky"). Tenint en compte que l'efecte de la mutació *hap-9* sobre l'expressió de l'aerolisina és degut a una mutació de tipus "leaky", va ser necessari comprovar si aquesta mutació corresponia a una mutació en el bloc de gens *tolQRAB*. Les dades obtingudes sobre la tolerància de la soca CM209 a les colicines, i l'expressió de l'aerolisina a soques amb mutacions *tolA* o *tolB*, suggereixen de manera clara que la mutació *hap-9* és una mutació *tol*. A més a més, el fet que la soca CM209 sigui tolerant a la colicina E1, permet descartar la possibilitat que la mutació *hap-9* sigui una mutació en el gen *tolB*, ja que mutacions en aquest gen causen tolerància a les colicines A, E2, E3 i K, però sensibilitat a la colicina

E1 (Webster, 1991). Aquest fet suggereix que la mutació *hap-9* correspon a una inserció en el bloc *tolQRA*.

La hipòtesi de que la soca CM209 conté una inserció en el bloc de gens *tolQRA* està també en concordància amb el fet que la mutació *hap-9* és pleotròpica, ja que afecta l'expressió d'una endoglucanasa de *Bacillus polymyxa*. En aquest cas, la mutació *hap-9* és responsable tant de l'alliberament al medi extern d'una fracció de l'enzim acumulat al periplasma, com d'un moderat augment en la seva síntesi.

El mecanisme molecular pel qual les mutacions en els gens *tolQRAB* afecten el fenotip de cèl·lules d'*E.coli* no està encara totalment esbrinat. Ha estat descrit que hi ha mutacions en els gens *tol* que mostren un fenotip "leaky", alliberant diferents proteïnes periplasmàtiques al medi extern (Fognini-Lefebvre i Portalier, 1984; Lazzaroni i Portalier, 1981; Webster, 1991), però el nombre de proteïnes alliberades és diferent d'un mutant a l'altre. A més a més, s'ha observat que mutacions independents dins el mateix cistró poden conduir a diferents efectes fenotípics (Fognini-Lefebvre *et al.*, 1987). Pel que fa a l'expressió de l'aerolisina d'*A. hydrophila* a *E.coli*, els resultats obtinguts en aquest treball demostren que tant el mutant *hap-9*, obtingut per nosaltres, com mutants *tolA* o *tolB* d'*E.coli*, alliberen al medi extern una part de la toxina que s'acumula al periplasma i causen un moderat increment de la seva síntesi. Aquests resultats concorden amb altres prèviament obtinguts en analitzar l'efecte de les mutacions *tol* sobre l'expressió d'una proteïna periplasmàtica d'*E.coli*, la  $\beta$ -lactamasa. A més de causar l'alliberament al medi extern, també es va poder detectar en aquest cas un moderat increment de la seva síntesi en aquests mutants (Lazzaroni i Portalier, 1984). Aquests resultats, juntament amb els obtinguts en aquest treball, posen de manifest de manera clara que les

mutacions *tol* no només causen l'alliberament al medi de proteïnes periplasmàtiques, sinó que també afecten la seva síntesi. Com a hipòtesi per tal d'explicar aquest fet, es podria pensar que l'acumulació d'una proteïna a l'espai periplasmàtic pot reprimir d'alguna manera la seva síntesi i, per tant, la reducció de la seva concentració en aquest compartiment cel·lular podria causar un moderat augment de la seva síntesi degut a que no es produeix la repressió.

Una característica destacable de la mutació *hap-9*, és que afecta la composició proteica de la membrana externa. La presència del plàsmid pHPC3-700 a la soca CM209 provoca importants variacions en el patró proteic d'aquesta estructura quan s'analitza per SDS-PAGE. Aquestes variacions no s'obtenen quan s'analitzen extractes obtinguts de la mateixa soca lliure del plàsmid. Aquest fet suggereix que la sortida de l'aerolisina al medi extern interfereix amb la incorporació d'alguns components proteics a la membrana externa. L'anàlisi del nivell al qual es bloqueja aquesta incorporació pot ajudar a entendre millor els mecanismes pels quals les proteïnes de membrana externa s'incorporen a aquesta estructura. Pel que fa a l'absència de la proteïna LamB a la membrana externa de la soca CM209, cal recordar que alguns autors han descrit aquest efecte en mutants *tolA* (Lazzaroni *et al.*, 1986), encara que aquest efecte va ser observat quan els mateixos autors creien que la mutació que havien descrit, *lkyB*, era diferent de mutacions en els gens *tol*, precisament degut a aquesta observació en els patrons de membrana externa. Posteriorment, però, no es troba en la bibliografia cap altre al·lusionament a aquest efecte descrit. L'anàlisi conjunta per SDS-PAGE de les proteïnes de membrana externa de les soques CM209 (*hap-9*), A592 (*tolA*) i A593 (*tolB*), va posar de manifest que, excepte pel que respecta a una proteïna d'aproximadament 24 kDa, la composició proteica és la mateixa, i la presència del plàsmid pHPC3-700, que codifica per l'aerolisina, provoca efectes equivalents. Aquest fet és especialment clar amb la soca A592.

La manca observada per la proteïna d'aproximadament 24 kDa als patrons de les soques A592 i A593, cal atribuir-lo, més que a un efecte de les mutacions sobre la composició de la membrana externa, a que procedeixen d'una soca diferent d'*E.coli*, i la manca d'aquesta proteïna deu ser específica d'aquesta soca.

Una vegada caracteritzada la mutació *hap-9*, va ser possible transduir-la a la soca Hha-2 d'*E.coli*, obtenint-se d'aquesta manera la soca CM329, que acumula les mutacions *hha* i *hap-9* en el seu genoma. Aquest fet posa de manifest, en primer lloc, que la combinació de les dues mutacions en una mateixa cèl.lula no afecta la seva viabilitat. A més a més, l'anàlisi de la producció d'aerolisina sobre plaques d'agar-sang va suggerir que la soca CM329 (pHPC3-700) incrementava notablement aquesta producció al medi extern respecte cadascuna de les soques originals (Hha-2 i CM209). La quantificació d'aquesta producció mitjançant la valoració de l'activitat hemolítica al medi extern, va permetre determinar que les soques CM209 (pHPC3-700) i CM329 (pHPC3-700) segueixen cinètiques diferents pel que fa a la presència d'activitat hemolítica al medi extern. Els valors d'aquesta activitat no reflecteixen la diferència que es pot observar en la mida dels halos d'hemòlisi en plaques d'agar-sang. És important, però, destacar que l'activitat hemolítica tan sols reflecteix l'aerolisina activa, i que el medi on es desenvolupa el cultiu, medi líquid o medi sòlid, podria tenir alguna influència sobre la sensibilitat o inactivació d'aquesta toxina. Per una altra banda, l'anàlisi per immunodetecció de la producció interna d'aerolisina suggereix que la quantitat d'aquesta proteïna és lleugerament superior als extractes de la soca CM329 (pHPC3-700) que als de la soca CM209 (pHPC3-700).

És important assenyalar que la construcció de la soca CM329 demostra que és possible combinar diferents mutacions per tal d'optimitzar l'expressió de proteïnes heteròlogues clonades a *E.coli*. Malgrat tot, la utilització d'una soca

d'aquestes característiques amb la finalitat de produir proteïnes heteròlogues implica necessàriament diferents problemes, com per exemple la toxicitat que pot produir a la cèl.lula la sobreproducció de determinades proteïnes. La utilització de vectors d'expressió amb promotors induïbles podria evitar part d'aquests problemes, al poder-se induir la síntesi de la proteïna d'interès en un punt determinat de la corba de creixement. A més a més, caldria dur a terme un estudi de les condicions de cultiu més adequades, de la compartimentació de la proteïna expressada i de l'estabilitat d'aquesta.

## **5 Conclusions**

- 1 Els experiments d'hibridació de tipus "Southern" demostren que hi ha una sola còpia del gen *hha* al cromosoma d'*Escherichia coli*.
- 2 La utilització d'una sonda del gen *hha* en experiments d'hibridació de tipus "Southern" ha possibilitat la detecció d'homologies per aquest gen al genoma de *Klebsiella pneumoniae* C3, però no al d'altres enterobactèries.
- 3 La utilització de la tècnica de la PCR, utilitzant uns "primers" específics del gen *hha*, ha donat senyals d'amplificació per totes les soques d'*E.coli* analitzades, excepte una. I també per *Klebsiella pneumoniae* C3 i per *Yersinia enterocolitica* Y754.
- 4 El fet que malgrat l'elevada homologia entre les proteïnes Hha d'*E.coli* i YmoA de *Y.enterocolitica* no s'hagin pogut trobar senyals de detecció pel gen *hha* a la majoria de soques de *Y.enterocolitica* analitzades, suggereix que la família de proteïnes representada per les proteïnes Hha i YmoA pot trobar-se àmpliament extesa, malgrat no es corresponguin amb una homologia de nucleòtids.
- 5 Tot i que és acceptat que les insercions del transposó Tn5 al genoma d'*E.coli* són estables, les insercions d'aquest transposó en el gen *hha* de la soca HB101 mostren una marcada inestabilitat. Un cop insertat en el gen *hha*, s'han pogut detectar transposicions secundàries als gens *hly* del plàsmid pANN202-312.



- 6 S'han pogut identificar dues mutacions, diferents d'*hha*, que incrementen l'expressió de proteïnes heteròlogues a *E.coli*. S'ha correlacionat una d'aquestes mutacions, *hap-9*, amb una inserció de Tn5 en el bloc de gens *tol/QRA*.
- 7 S'ha pogut comprovar que l'efecte de la mutació *hap-9* sobre l'expressió de l'aerolisina d'*Aeromonas hydrophila* implica un alliberament al medi extern d'una part del contingut intracel·lular, i un moderat augment de la síntesi d'aquesta proteïna.
- 8 S'ha comprovat que l'efecte de les mutacions *tolA* i *tolB* sobre l'expressió de l'aerolisina d'*Aeromonas hydrophila* és similar al causat per la mutació *hap-9*.
- 9 Quan, per efecte de mutacions de tipus "leaky", algunes proteïnes periplasmàtiques són alliberades al medi extern, la seva síntesi s'incrementa moderadament.
- 10 L'expressió de l'aerolisina a la soca CM209 (*hap-9::Tn5*) altera la composició proteica de la membrana externa.
- 11 S'ha construït una soca portadora de les mutacions *hha* i *hap-9*, CM329, amb la finalitat d'optimitzar l'expressió de proteïnes heteròlogues a *E.coli*.
- 12 L'anàlisi de l'expressió de l'aerolisina d'*Aeromonas hydrophila* a la soca CM329 suggereix que es produeix un moderat increment de l'expressió, respecte la soca CM209.

## **6 Bibliografia**

- AUSUBEL, F.M. 1984. Regulation of nitrogen fixation genes. *Cell* **37**, 5-6.
- BACHMANN, B.J. 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, Edition 8. *Microbiological Reviews* **54** (2), 130-197.
- BAKER, T.A., GROSSMAN, A.D., GROSS, C.A. 1984. A gene regulating heat shock response in *Escherichia coli* also affects proteolysis. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA* **81**, 6779-6783.
- BALBÁS, F., SOBERON, X., MERINO, E., ZURITA, M., LOMELI, H., VALLE, F., FLORES, N., BOLÍVAR, F. 1986. Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives. A review. *Gene* **50**, 3-40.
- BALBÁS, P., BOLÍVAR, F. 1990. Design and construction of expression plasmid vectors in *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology* **185**, 15-37.
- BELASCO, J.G., HIGGINS, C.F. 1988. Mechanisms of mRNA decay in bacteria: a perspective. *Gene* **72**, 15-24.
- BERG, C.M., GRULLON, C.A., WANG, A., WHALEN, W.A., BERG, D.E. 1983. Transductional instability of Tn5-induced mutations: generalized and specialized transductions of Tn5 by bacteriophage P1. *Genetics* **105**, 259-261.
- BERGER, H., HACKER, J., JUÁREZ, A., HUGHES, C., GOEBEL, W. 1982. Cloning of chromosomal determinants encoding hemolysin production and mannose-resistant hemagglutination in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **152**, 1241-1247.
- BERNSTEIN, A., ROLFE, B., ONODERA, K. 1972. Pleiotropic properties and genetic organization of the *tolA*, *B* locus of *E.coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **112** (1), 74-83.
- BIRNBOIM, H.C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in enzymology* **100**, 143-154.

BISHAI, W.R., MIYANOHARA, A., MURPHY, J.R. 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of three fragments of diphtheria toxin truncated within fragment B. *Journal of Bacteriology* **169** (4), 1554-1563.

BLANCO, A., JUÁREZ, A., PASTOR, F.I.J. 1991. Overproduction of a *Clostridium cellulolyticum* endoglucanase by mutant strains of *E.coli*. *FEMS Microbiology Letters* **81**, 221-226.

BOLÍVAR, F., BACKMAN, K. 1979. Plasmids in *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods in Enzymology* **68**, 145-167.

BOURDINEAUD, J.P., BOULANGER, P., LAZDUNSKI, C., LETELLIER, L. 1990. *In vivo* properties of colicin A: channel activity is voltage dependent but translocation may be voltage independent. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences. USA* **87**, 1037-1041.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.

BUCK, M., MILLER, S., DRUMMOND, M., DIXON, R. 1986. Upstream activator sequences are present in the promoter of nitrogen fixing genes. *Nature* **320**, 374-378.

BULMER, M. 1987. Coevolution of codon usage and transfer RNA abundance. *Nature* **325**, 728-730.

CAMPRUBÍ, S., TOMAS, J., MUÑOZA, F., MADRID, C., JUÁREZ, A. 1990. Influence of lipopolysaccharide on external hemolytic activity of *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae*. *Current Microbiology* **20**, 1-3.

CARMONA, M. 1992. La proteína Hha: una nueva familia de proteínas que modulan la expresión génica en bacterias alterando la topología del ADN. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona.

- CAVARD, D., LAZDUNSKI, C. 1981. Involvement of BtuB and OmpF proteins in binding and uptake of colicin A. *FEMS Microbiology Letters* **12**, 311-316.
- CLEWELL, D.B. 1972. Nature of ColE1 plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol. *Journal of Bacteriology* **110** (2), 667-676.
- COHEN, S., CHAN, A., HSU, L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA* **69**, 2110-2114.
- COLLMER, A., SCHOEDEL, C., ROEDER, D.L., RIED, J.L., RISSLER, J. 1985. Molecular cloning in *Escherichia coli* of *Erwinia chrysanthemi* genes encoding multiple forms of pectate lyase. *Journal of Bacteriology* **172**, 1217-1224.
- CORNELIS, G.R., SLUITERS, C., DELOR, I., GELB, D., KANIGA, K., LAMBERT DE ROUVROIT, C., SORY, M-P., VANOOTEGHEM, J-C., MICHIELS, T. 1991. *ymoA*, a *Yersinia enterocolitica* chromosomal gene modulating the expression of virulence functions. *Molecular Microbiology* **5**, 1023-1034.
- COWING, D.W., BARDWELL, J.C.A., CRAIG, E.A., WOOLFORS, C., HENDRIX, R. GROSS, C.A. 1985. Consensus sequence for *Escherichia coli* heat shock promoters. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA* **82**, 2679-2683.
- CRAMER, W.A., DANKERT, J.R., URATANI, Y. 1983. The membrane channel-forming bacteriocidal protein, colicin E1. *Biochimica et Biophysica Acta* **737**, 173-193.
- CROSA, J.H., HODGES L.L. (1981). Outer membrane proteins induced under conditions of iron limitation. *Infection and Immunity* **31**, 223-227.
- CHAI, T-J., WU, W., FOULDS, J. 1982. Colicin A receptor: role of two *Escherichia coli* outer membrane proteins (OmpF protein and *btuB* gene product) and lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology* **151** (2), 983-988.

CHAKRABORTY, T., HUHLE, B., BERGBAUER, H., GOEBEL, W. 1986. Cloning, expression, and mapping of the *Aeromonas hydrophila* aerolysin gene determinant in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **167** (1), 368-374.

DANILEVSKAYA, O.N., GRAGEROV, A.I. 1979. Curing of *Escherichia coli* K12 plasmids by coumermycin. *Molecular and General Genetics* **178**, 233-235.

DAVIES, J.K., REEVES, P. 1975. Genetics of resistance to colicines in *Escherichia coli* K-12: Cross-resistance among colicins of group A. *Journal of Bacteriology* **123** (1), 102-117.

DE BRUIJN, F.J., LUPSKI, J.R. 1984. The use of transposon Tn5 mutagenesis in the rapid generation of correlated physical and genetic maps of DNA segments cloned into multicopy plasmids. A review. *Gene* **27**, 131-149.

DE BRUIJN, F.J. 1987. Transposon mutagenesis to map genes. *Methods in enzymology* **154** 259-263.

DE LA CRUZ, F., CARMONA, M., JUÁREZ, A. 1992. The Hha protein from *Escherichia coli* is highly homologous to the YmoA protein from *Yersinia enterocolitica*. *Molecular Microbiology*, en premsa.

DE VRIES, G.E., RAYMOND, C.K., LUDWING, R.A. 1984. Extension of bacteriophage lambda host range: selection, cloning and characterization of a constitutive lambda receptor gene. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA*. **81**, 6080-6084.

DIAZ, P., JUÁREZ, A. 1991. Increase of hemolysin expression in *Escherichia coli* by cloned DNA sequences of *Serratia marcescens*. *Microbiología* **7**, 74-81.

DI MASI, D.R., WHITE, J.C., SCHAITMAN, C.A., BRADBEER, C. 1973. Transport of vitamin B<sub>12</sub> in *Escherichia coli*: common receptor sites for vitamin B<sub>12</sub> and the E colicins on the outer membrane of the cell envelope. *Journal of Bacteriology* **115** (2), 506-513.

DONOVAN, W.P., KUSHNER, S.R. 1986. Polynucleotide phosphorilase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in *Escherichia coli* K12. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA* **83**, 120-124.

DRLICA, K. 1992. Control of bacterial DNA supercoiling. *Molecular Microbiology* **6(4)**, 425-433.

EGGERTSON, G., SÖLL, D. 1988. Transfer ribonucleic-acid mediated suppression of termination codons in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* **52**, 354-374.

FERRETI, L., HARNIK, S.S., KHORANA, H.G., NASSAL, M., OPRIAN, D.D. 1988. Total synthesis of a gene for bovine rhodopsin. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA* **83**, 599-603.

FILIP, C., FLETCHER, G., WULFF, J.L., ESRHART, C.F. 1973. Solubilization of the cytoplasmic membranes of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. *Journal of Bacteriology* **115**, 717-722.

FILLOUX, A., BALLY, M., BALL, G., AKRIM, M., TOMMASSEN, J., LAZDUNSKI, A. 1990. Protein secretion in Gram-negative bacteria: transport across the outer membrane involves common mechanisms in different bacteria. *The EMBO Journal* **9 (13)**, 4323-4329.

FOGNINI-LEFEBVRE, N., LAZZARONI, J-C., PORTALIER, R. 1987. *tolA*, *tolB* and *excC*, three cistrons involved in the control of pleiotropic release of periplasmic proteins by *Escherichia coli* K-12. *Molecular and General Genetics* **209**, 391-395.

FOGNINI-LEFEBVRE, N., PORTALIER, R. 1984. Isolation and preliminary characterization of  $\beta$ -lactamase excretory mutants of *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiology Letters* **21**, 323-328.

GAREN, A., LEVINTHAL, C. 1960. A fine-structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of *E.coli*. I. Purification and characterization of alkaline phosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta* **38**, 470-483.

GLASER, P., LADANT, D., SELZER, D., PICHOT, F., ULLMAN, A., DAUNCHIN, A. 1988. The calmodium-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertusis*: cloning and expression in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **2**, 19-30.

GODESSART, N., MUÑOJA, F.J., REGUÉ, M., JUÁREZ, A. 1988. Chromosomal mutations that increase the production of plasmid-encoded haemolysin in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* **134**, 2779-2787.

GOEBEL, W., HEDGPETH, J. 1982. Cloning and functional characterization of the plasmid-encoded hemolysin determinant of *E.coli*. *Journal of Bacteriology* **151**, 1290-1298.

GOEDDEL, D.V. 1990. Systems for heterologous gene expression. *Methods in Enzymology* **185**, 3-7.

GOFF, S.A., CASSON, L.P., GOLDBERG, A.L. 1984. Heat shock regulatory gene *htpR* influences rates of protein degradation and expression of the *lon* gene in *Escherichia coli*. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA* **81**, 6647-6651.

GOFF, S.A., GOLDBERG, A.L. 1985. Production of abnormal proteins in *E.coli* stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell* **41**, 587-595.

GOLD, L. 1990. Expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology* **185**, 11-13.

GOLD, L. 1988. Post-transcriptional regulatory mechanisms in *E.coli*. *Annual Reviews of Biochemistry* **57**, 199-233.

GöRANSSON, M., SONDEN, B., NILSSON, P., DEGBERG, B., FORSMAN, K., EMMANUELSSON, K., UHLIN, B.E. 1990. Transcriptional silencing and thermoregulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Nature* **334**, 682-685.



GOTTESMAN, S. 1987. Regulation by proteolysis. A "Escherichia coli and Salmonella typhimurium". (Neidhart, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger, H.E., Eds.) Vol II, pp. 1308-1312. American Society for Microbiology, Washington DC.

GOTTESMAN, S. 1990. Minimizing proteolysis in *Escherichia coli*: Genetic solutions. *Methods in enzymology* **185**, 119-129.

GRAY, G.L., BALDRIDGE, J.S., McKEOWN, K.S., HEYNECKER, H.L., CHANG, C.N. 1985. Periplasmic production of correctly processed human growth hormone in *Escherichia coli*: natural and bacterial signal sequences are interchangeable. *Gene* **39**, 247-254.

GROSSMAN, A.D., STARUS, D.B., WALTER, W.A., GROSS, C.A. 1987. Sigma 32 synthesis can regulate the synthesis of heat shock proteins in *Escherichia coli*. *Genes and Development* **1**, 179-184.

HACKER, J., KNAPP, S., GOEBEL, W. 1983. Spontaneous deletions and flanking regions of the chromosomally inherited hemolysin determinant of an *Escherichia coli* O6 strain. *Journal of Bacteriology* **154** (3), 1145-1152.

HANTKE, K. 1976. Phage T6-colicin K receptor and nucleoside transport in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **70** (1), 109-112.

HARAYAMA, S., TAPIO PALVA, E., HAZELBAUER, G.L. 1979. Transposon-insertion mutants of *E.coli* K-12 defective in a component common to galactose and ribose chemotaxis. *Molecular and General Genetics* **171**, 193-203.

HARDIE, K.R., ISSARTEL, J.P., KORONAKIS, E., HUGHES, C., KORONAKIS, V. 1991. In vitro activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature membrane-targeted toxin requires HlyC and a low molecular-weight cytosolic polypeptide. *Molecular Microbiology* **5** (7), 1669-1679.

HELLER, K.J., KADNER, R.J., GÜNTER, K. 1988. Suppression of the *btuB451* mutation by mutations in the *tonB* gene suggests a direct interaction between TonB and TonB-dependent receptor protein in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Gene* **64**, 147-153.

HESS, J., WELS, W., VOGEL, M., GOEBEL, W. 1986. Nucleotid sequence of a plasmid-encoded hemolysin determinant and comparison with a corresponding chromosomal hemolysin sequence. *FEMS Microbiology Letters* **34**, 1-11.

HINTON, J.D.C, SANTOS, D.S., SEIRAFI, A., HULTON, C.S.J., PAVITT, G.D., HIGGINS, C.F. 1992. Expression and mutational analysis of the nucleoid-associated protein H-NS of *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology* **6** (16), 2327-2337.

HIRSCHAMN, J., WONG, P.K., SEI, K., KEENER, J., KUSTU, S. 1985. Products of nitrogen regulatory genes *ntrA* and *ntrC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription in vivo: evidence that *ntrA* product is a  $\sigma$  factor. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA* **82**, 7525-7529.

HOOPES, B.C., McCLURE, W.R. 1987. Strategies in regulation of transcription initiation. A "Escherichia coli and Salmonella typhimurium" (Neidhart, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger, H.E., Eds.) Vol II, pp. 1231-1240. American Society for Microbiology, Washington DC.

HOWARD, S.P., BUCKLEY, J.T. 1985. Activation of the hole-forming toxin aerolysin by extracellular processing. *Journal of Bacteriology* **163**, 336-340.

HOWARD, S.P., BUCKLEY, J.T. 1986. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the structural gene for the hemolytic toxin aerolysin from *Aeromonas hydrophila*. *Molecular and General Genetics* **204**, 289-295.

INOUE, M. 1988. Antisense RNA: its function and application in gene regulation. *Gene* **72**, 25-34.

ISBERG, R.R., SYVAENEN, M. 1985. DNA gyrase is a host factor required for transposition of Tn5. *Cell* **30**, 9-18.

ISSARTEL, J.P., KORONAKIS, V., HUGHES, C. 1991. Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation. *Nature* **351**, 759-761.

ITAKURA, K., HIROSE, T., CREA, R., RIGGS, A.D., HEYNEKER, H. L., BOLIVAR, F., BOYER, H.W. 1977. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for hormone somatostatin. *Science* **198**, 1056-1063.

JETTEN, A.M., JETTEN, M.E.R. 1975. Energy requirement for the initiation of colicin action in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* **387**, 12-22.

JINKS-ROBERTSON, S., NOMURA, M. 1987. Ribosomes and tRNA. A "Escherichia coli and Salmonella typhimurium" (Neidhart, F. C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger, H.E., Eds.) Vol. II, pp. 1358-1385. American Society for Microbiology, Washington DC.

JUÁREZ, A., HARTLEIN, M., GOEBEL, W. 1984. Study of regulation and transport of hemolysin by using fusion of the  $\beta$ -galactosidase gene (*lacZ*) to hemolysin genes. *Journal of Bacteriology* **160**, 161-168.

JUBETE, Y. 1991. Mecanismos de regulación de la transcripción del operón *hly*. Tesis Doctoral. Universidad de Cantabria.

KING, T.C., SCHLESSINGER, D. 1987. Processing of RNA transcript. A "Escherichia coli and Salmonella typhimurium" (Neidhart, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger, H.E., Eds.). Vol. I, pp. 703-718. American Society for Microbiology, Washington DC.

KLECKNER, N., BENDER, J., GOTTESMAN, S. 1991. Uses of transposons with emphasis on Tn10. *Methods in enzymology* **204**, 139-180.

KLOTSKY, R-A., SCWARTZ, I. 1987. Measurement of *cat* expression from growth-rate-regulated promoters employing  $\beta$ -lactamase activity as an indicator of plasmid copy number. *Gene* **55**, 141-146.

KOHARA, Y., AKIYAMA, K., ISONO, K. 1987. The physical map of the whole *E.coli* chromosome: Application of a new strategy for rapid and sorting of a large genomic library. *Cell* **50**, 495-508.

KONISKY, J. 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annual Reviews of Microbiology* **36**, 125-144.

KORONAKIS, V., CROSS, M., HUGHES, C. 1988. Expression of the *E.coli* hemolysin secretion gene *hlyB* involves transcript antitermination within the *hly* operon. *Nucleic Acids Research* **16**, 4789-4800.

KUAN, C-T., LIU, S-K., TESSMAN, I. 1991. Excision and transposition of Tn5 as an SOS activity in *Escherichia coli*. *Genetics* **128**, 45-57.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

LAZDUNSKI, C.J., BATY, D., GELI, V., CAVARD, D., MORLON, J., LLOUBES, R., HOWARD, S.P., KNIBIEHLER, M., CHARTIER, M., VARENNE, S., FRENETTE, M., DASSEUX, J-L., PATTUS, F. 1988. The membrane channel-forming colicin A: synthesis, secretion, structure, action and immunity. *Biochimica et Biophysica Acta* **947**, 445-464.

LAZZARONI, J.C., FOGNINI-LEFEBVRE, N., PORTALIER, R.C. 1986. Effects of *lkyB* mutations on the expression of *ompF*, *ompC* and *lamB* porin structural genes in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiology Letters* **33**, 235-239.

LAZZARONI, J.C., PORTALIER, R.C. 1981. Genetic and biochemical characterization of periplasmic-leaky mutants of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **145** (3), 1351-1358.

LEVENGOD, S.K., BEYER, W.F.Jr., WEBSTER, R.E. 1991. Tol A: A membrane protein involved in colicin uptake contains an extended helical region. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA* **88**, 5939-5943.

LEVENGOOD, S.K., WEBSTER, R.E. 1989. Nucleotide sequence of the *tolA* and *tolB* genes and localization of their products, components of a multistep translocation system in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **171** (12), 6600-6609.

MACKMAN, N., NICAUD, J-M., GRAY, L., HOLLAND, I. B. 1985. Genetical and functional organization of the *Escherichia coli* haemolysin determinant 2001. *Molecular and General Genetics* **201**, 282-288.

MADRID, C., MUÑOZA, F., JUÁREZ, A. 1990. Occurrence of secondary transpositions of Tn5 upon Tn5 mutagenesis in *Escherichia coli*. *Current Microbiology* **21**, 273-275.

MAGASANIK, B. 1989. Gene regulation from sites near and far. *The New Biology* **1**, 247-251.

MARMUR, J. (1961), A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of Molecular Biology* **3**, 208-218.

MARTÍNEZ, E., DE LA CRUZ, F. (1988). Transposon Tn21 encodes a RecA-independent site specific integration system. *Molecular and General Genetics* **211**, 320-335.

MATSUZAWA, H., USHIYAMA, S., KOYAMA, Y., OHTA, T. 1984. *Escherichia coli* K-12 *tolZ* mutants tolerant to colicins E2, E3, D, Ia, and Ib: defect in generation of electrochemical proton gradient. *Journal of Bacteriology* **160** (2), 733-739.

MAURELLI, A.T., SANSONETTI, P.J. 1988. Identification of a chromosomal gene controlling temperature-regulated expression of *Shigella* virulence. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA* **85**, 2820-2824.

McCARTHY, J.E.G., GUARLEZI, C. 1990. Translational control of prokaryotic gene expression. *Trends in Genetics* **6**, 78-85.

McCLURE, W.R. 1985. Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. *Annual Reviews of Biochemistry* **54**, 171-204.

MERINO, S., BENEDÍ, V.J., TOMAS, J.M. 1989. *Aeromonas hydrophila* with moderate virulence. *Microbios* **159**, 165-173.

MILLER, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

MILLER, C.G. 1987. Protein degradation and proteolytic modification. A "Escherichia coli and Salmonella typhimurium" (Neidhart, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger, H.E., Eds), Vol. I, pp. 680-691. American Society for Microbiology, Washington DC.

MOCK, M., PUGSLEY, A.P. 1982. The BtuB group Col plasmids and homology between the colicins they encode. *Journal of Bacteriology* **150** (3), 1069-1076.

MULLER, D., HUGHES, C., GOEBEL, W. 1983. Relationship between plasmid and chromosomal hemolysin determinants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **153**, 846-851.

MURPHY, J.R., WILLIAMS, D.P., BACHA, P., BISHAI, W., WATERS, C., STROM, T.B. 1989. Cell receptor specific targeted toxins: genetic construction and characterization of an interleukin 2 diptheria toxin-related fusion protein. *Journal of Receptor Research* **1**.

NAGEL DE ZWAIG, R., LURIA, S.E. 1967. Genetics and physiology of colicin-tolerant mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **94** (4), 1112-1123.

NAU, C.C., KONISKY, J. 1989. Evolutionary relationship between the TonB-dependent outer membrane transport proteins: nucleotide and amino acid sequence of the *Escherichia coli* colicin I receptor gene. *Journal of Bacteriology* **171** (2), 1041-1047.

NICAUD, J.M., MACKMAN, N., GRAY, L., HOLLAND, I.B. 1985. Characterization of HlyC and mechanism of activation and secretion of hemolysin from *E.coli* 2001. *FEBS Letters* **187**, 339-344.

NIETO, J.M., TOMAS, J., JUÁREZ, A. 1987. Secretion of an *Aeromonas hydrophila* aerolysin by a mutant strain of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **48**, 413-417.

NIETO, J.M., CARMONA, M., BOLLAND, S., JUBETE, Y., DE LA CRUZ, F., JUÁREZ, A. 1991. The *hha* gene modulates hemolysin expression in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **5**, 1285-1293.

NIETO, J.M. 1991. Clonado y caracterización del gen *hha*, que modula la expresión de la alfa-hemolisina en *Escherichia coli*. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona.

NILSSON, G., BELASCO, J.G., COHEN, S.N., VON GABAIN, A. 1984. Growth rate dependent regulation of mRNA stability in *Escherichia coli*. *Nature* **312**, 75-77.

NOMURA, M., GOURSE, R., BAUGHMAN, G. 1984. Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. *Annual Reviews of Biochemistry* **53**, 75-117.

OKAMOTO, K. 1975. Requirement of heat and metabolic energy for the expression of inhibitory action of colicin K. *Biochimica et Biophysica Acta* **389**, 370-379.

ORSKOV, I., ORSKOV, F., JANN, B., JANN, K. 1977. Serology, chemistry and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriological Reviews* **41** (3), 667-710.

PATTUS, F., MASSOTE, D., WILMSEN, H.U., TSERNOGLOU, D., TUCKER, A., PARKER, M.W. 1990. Colicins: prokaryotic killer-pores. *Experientia* **46**, 180-192.

PETERSEN, C. 1992. Control and functional mRNA stability in bacteria: multiple mechanisms of nucleolytic and non-nucleolytic inactivation. *Molecular Microbiology* **6** (277-282).

PLATT, T. 1986. Transcription termination and regulation of gene expression. *Annual Reviews of Biochemistry* **55**, 339-372.

PRUSS, G.J., DRLICA, K. 1989. DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell* **56**, 521-523.

PUGSLEY, A.P., OUDEGA, B. 1987. Methods for studying colicins and their plasmids. A "Plasmids, a practical approach". K. G. Hardy Ed. IRL Press. Oxford. Washington DC.

PUGSLEY, A.P. 1984a. The ins and outs of colicins. Part I: Production, and translocation across membranes. *Microbiological Sciences* **1** (7), 168-175.

PUGSLEY, A.P. 1984b. The ins and outs of colicins. Part II. Lethal action, immunity and ecological implications. *Microbiological Sciences* **1** (8), 203-205.

PUGSLEY, A.P. 1988. Protein secretion across the outer membrane of Gram-negative bacteria. A "Protein transfer and organelle biogenesis" (Das, R.C., Robbins, P.W., Eds) pp.607-652. Academic Press Inc., Orlando, FL.

RANDALL, L.L., HARDY, S.J.S. 1984. Export of protein in bacteria. *Microbiological Reviews*. **48**, 290.

REEVES, P. 1965. The bacteriocins. *Bacteriological Reviews* **29** (1), 24-45.

REITZER, L.J., MAGASANIK, B. 1986. Transcription of *glnA* in *E.coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. *Cell* **45**, 785-792.

RIOTTOT, M.M., FOURNIER, J.M., JOUIN, H. 1981. Direct evidence for the involvement of capsular polysaccharide in the immunoprotective activity of *Klebsiella pneumoniae* ribosomal preparations. *Infection and Immunity* **31**, 71-77.



- ROBERTS, D., HOOPEES, B.C., McCLURE, W.R., KLECKNER, N. 1985. IS10 transposition is regulated by DNA adenine methylation. *Cell* **43**, 117-130.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. 1989. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- SCHRAMM, E., MENDE, J., BRAUN, V., KAMP, R.M. 1987. Nucleotide sequence of the colicin B activity gene *cba*: Consensus penpapeptide among TonB-dependent colicins and receptors. *Journal of Bacteriology* **169** (7), 3350-3357.
- SHARP, P.M., BULMER, M. 1988. Selective differences among translation termination codons. *Gene* **63**, 141-145.
- SHAW, K.J., BERG, C.M. 1979. *Escherichia coli* K-12 auxotrophs induced by insertion of the transposable element Tn5. *Genetics* **92**, 741-747.
- SIMONS, R.W., KLECKNER, N. 1988. Biological regulation by antisense RNA in prokaryotes. *Annual Reviews of Genetics* **22**, 567-600.
- SPIRO, R.G. 1966. Analysis of sugars found in glycoproteins. *Methods in enzymology* **8**, 3-26.
- STRATHDEE, C.A., LO, R.Y.C. 1987. Extensive homology between the leucotoxin of *Pasterurella hemolytica* A1 and the alfa-hemolysin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **155**, 3233-3236.
- SUN, T-P., WEBSTER, R.E. 1986. *fii*, a bacterial locus required for filamentous phage infection and its relation to colicin tolerant *tolA* and *tolB*. *Journal of Bacteriology* **165**, 107-115.
- SUN, T-P., WEBSTER, R.E. 1987. Nucleotide sequence of a gene cluster involved in entry of E colicins and single-stranded DNA of infecting filamentous bacteriophages into *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **169** (6), 2667-2674.

- TEATHER, R.M., WOOD, P.J. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology* **43**, 777-780.
- TOMAS, J.M., JOFRE, J.T. 1985. Lipopolysaccharide-specific bacteriophage for *Klebsiella pneumoniae* C3. *Journal of Bacteriology* **162** (3), 1276-1279.
- VOGEL, M., HESS, J., THEN, I., JUÁREZ, A., GOEBEL, W. 1988. Characterization of a sequence (*hlyR*) which enhances synthesis and secretion of hemolysin in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics* **212**, 76-84.
- VON GABAIN, A., BELASCO, J.G., SCHOFFEL, J.L., CHANG, A.C.Y., COHEN, S.N. 1982. Decay of mRNA in *Escherichia coli*: investigation of the fate of specific segments of transcripts. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA* **80**, 653-657.
- WAGNER, W., VOGEL, M., GOEBEL, W. 1984. Transport of hemolysin across the outer membrane of *E.coli* requires two functions. *Journal of Bacteriology* **154**, 200-210.
- WANDERSMAN, C., DELEPELAIRE, P. 1990. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA* **87**, 4776-4780.
- WANNER, B.L. 1986. Novel regulation mutants of the phosphatase regulon in *E.coli* K-12. *Journal of Molecular Biology* **191**, 39-58.
- WAY, J.C., DAVIS, M.A., MORISATO, D., ROBERTS, D.E., KLECKNER, N. 1984. New Tn10 derivatives for transposon mutagenesis and for construction of *lacZ* operon fusions by transposition. *Gene* **32**, 369-379.
- WEBSTER, R.E. 1991. The *tol* gene products and the import of macromolecules into *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **5** (5), 1005-1011.

- WILIAMS, D.C., VAN FRANK, R.M., MUTH, R.M., BURNETT, J.P. 1982. Cytoplasmatic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins. *Science* **215**, 687-689.
- WILIAMS, P., LAMBERT, P.A., BROWN, M.R.W., JONES, R.J. 1983. Role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *Journal of General Microbiology* **129**, 2181-2191.
- WU, T.T. 1966. A model for three-point analysis of random general transduction. *Genetics* **54**, 405-410.
- YAGER, T.D., VON HIPPEL, P.H. 1987. Transcription elongation and termination in *Escherichia coli*. A "Escherichia coli and Salmonella typhimurium" (Neidhart, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger, H.E., Eds.). Vol. II, pp. 1241-1275. American Society for Microbiology, Washington DC.
- YANOFSKY, C. 1981. Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature* **289**, 751-758.
- YOUNG, R.A., DAVIS, R.W. 1983. Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA* **80**, 1194.







UNIVERSITAT DE BARCELONA

Divisió de Ciències Experimentals  
i Matemàtiques

Facultat de Biologia



