

Untersuchungen über die Regulation der Proteinsynthese auswachsender Sporen von *Bacillus subtilis*

Studies on Protein Synthesis of Outgrowing Spores of *Bacillus subtilis*

M. Hecker, A.-M. Dunger, G. Wachlin und F. Mach

Sektion Biologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, DDR-2200 Greifswald, L.-Jahn-Straße 15,
Deutsche Demokratische Republik

Z. Naturforsch. **40c**, 421–426 (1985); eingegangen am 25. Oktober 1984/21. Februar 1985

Bacillus subtilis, Spore Outgrowth, Protein Synthesis, Membrane Proteins

Two-dimensional gel electrophoresis according to O'Farrell [6] was used to study synthesis of membrane bound proteins during outgrowth of *Bacillus subtilis* spores. Three major classes of membrane bound proteins were distinguished, depending on the time of onset and duration of their synthesis: Ia – a great amount of proteins typical of vegetative cells made throughout all stages of outgrowth and vegetative growth; Ib – vegetative proteins synthesized during middle and later outgrowth stages as well as during vegetative growth (sequential activation); II – outgrowth-specific proteins synthesized during early outgrowth but not in vegetative cells. A similar classification was made for total proteins [9].

In a temperature-sensitive mutant defective in early outgrowth the sequential activation of vegetative genes (group Ib) is especially inhibited under restrictive conditions, whereas the synthesis of group Ia-proteins and outgrowth-specific proteins (II) could be detected during early outgrowth stages.

We suggest that the expression of outgrowth genes, whose products might be found among the outgrowth-specific proteins, could be involved in the sequential reactivation of vegetative genes during outgrowth. The vegetative proteins of group Ia (continuous synthesis) are produced throughout growth and differentiation. On the other hand the synthesis of vegetative proteins, group Ib, is switched off during sporulation and switched on during outgrowth. The control mechanisms of the expression of these two groups of vegetative genes during growth and differentiation are discussed.

Einleitung

Wohl kaum ein anderes Differenzierungsprogramm ist heute dank der Untersuchungen von Losick, Doi, Freese und anderen so weitgehend molekularbiologisch analysiert wie die Sporulation von *Bacillus subtilis* [1–3]. Wenn wir auch noch weit von einer molekularen Interpretation dieses nur scheinbar einfachen Differenzierungsprozesses entfernt sind, konnte dennoch gerade an diesem Modellsystem durch gezielten Einsatz molekularbiologischer Methodik der Zusammenhang zwischen differentieller Genexpression und Zelldifferenzierung überzeugend dargestellt werden. Demgegenüber ist unser Wissen über die Regulation der Sporenkeimung noch sehr lückenhaft. Wie die Sporulation sollte auch die Keimung von Sporen als ein Prozeß aufzufassen sein, bei dem mit Einschalten und Ablaufen eines komplexen Genexpressionsprogramms schließlich die dormante Spore in eine wachsende vegetative Zelle umgewandelt wird [4, 5]. Damit kommt

ganz allgemein den Untersuchungen über die molekularen Mechanismen der Keimung von *Bacillus*-Sporen wertvoller Modellcharakter für das Studium der Zelldifferenzierung zu.

Erste Einblicke in dieses Genexpressionsprogramm sind mit Hilfe der hochauflösenden zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese nach O'Farrell [6] erzielt worden, mit der das in einer synchronen Zellpopulation ablaufende Programm der Proteinsynthese untersucht werden kann [5, 7–9]. Da sich die mRNS auswachsender Sporen durch eine für Bakterien typisch kurze Lebensdauer auszeichnet, repräsentiert das Proteinsynthesemuster das Genexpressionsprogramm der Zelle.

Mit der O'Farrell-Technik ist es uns gelungen, eine erste, noch vorläufige Beschreibung dieses Programms vorzunehmen [9]. Die Kardinalfrage, wie die keimende und auswachsende Spore die Eigenschaften der vegetativen Zelle wiedererlangt, sollte in erster Linie durch die Analyse der Expression der für die vegetative Zelle typischen Gene (im folgenden vegetative Gene genannt) zu beantworten sein.

Insgesamt konnten zwei Hauptgruppen vegetativer Gene unterschieden werden: Unmittelbar mit

Sonderdruckanforderungen an Dr. M. Hecker.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341–0382/85/0500–0421 \$ 01.30/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Beginn der Sporenkeimung wird eine Vielzahl vegetativer Gene exprimiert, während eine zweite Gruppe erst später, offensichtlich nach einer durch das Programm vorgegebenen Sequenz eingeschaltet wird. Daneben sind Proteine nachzuweisen, die ausschließlich (oder vorrangig) in frühen Phasen der Keimung gebildet und in späteren Stadien sowie in vegetativen Zellen nicht mehr nachweisbar sind [9]. Unter diesen keimungsspezifischen Proteinen sollten u. a. Produkte der von Galizzi und Mitarbeitern postulierten „outgrowth“-Gene zu vermuten sein [10–12], die die Regulation der Keimung und damit die Kontrolle der sequentiellen Reaktivierung vegetativer Gene übernommen haben [9]. In einer vorläufigen Mitteilung [8] haben wir diese Hauptgruppen bereits beschrieben, wenn auch die Unterschiede nicht so deutlich ausgeprägt waren, da mit der seinerzeit verwendeten Methodik die ganz frühen Proteinsynthesen noch nicht erfaßt worden waren.

Galizzi und Mitarbeiter haben eine Reihe von *Bacillus*-Mutanten isoliert, die einen temperaturabhängigen Block in der Keimphase aufweisen, andererseits aber im vegetativen Wachstum nahezu unbeeinflusst bleiben [10–12]. Die Autoren vermuten, daß in diesen Mutanten Gene verändert sind, deren Produkte für das Einschalten ganz bestimmter Schritte im Genexpressionsprogramm der auswachsenden Spore benötigt werden. Nach unseren bisherigen Vorstellungen sollte unter restriktiven Bedingungen in erster Linie die Expression der sequentiell aktivierbaren vegetativen Gene betroffen sein [9].

In der vorliegenden Arbeit sollten diese Vorstellungen durch die Einbeziehung membrangebundener Proteine sowie durch die Analyse einer Mutante mit einem temperatursensitiven Block in der Keimungsphase [10] geprüft und erweitert werden.

Ergebnisse

Die unterschiedliche Kinetik der Synthese von vegetativen und keimungsspezifischen Proteinen in *Bacillus subtilis* ts 33–6 während der Sporenkeimung ist in Abb. 1 zusammengefaßt [aus 9]. Danach unterscheiden wir eine unmittelbar mit Keimungsbeginn einsetzende, kontinuierlich verlaufende Synthese vegetativer Proteine (Gruppe Ia) von Genprodukten, die erst im Zuge des Auswachsens gebildet werden (Gruppe Ib). Den vegetativen Genprodukten stehen Proteine gegenüber, deren Synthese auf die frühe Keimungsphase beschränkt bleibt und die als

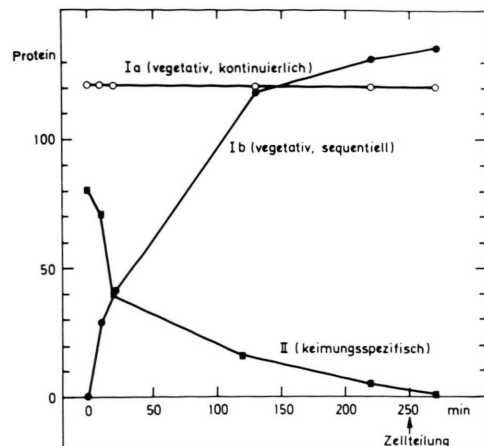


Abb. 1. Proteinsynthese in auswachsenden Sporen von *Bacillus subtilis* ts 33–6 [aus 9].

Die Einteilung in die drei Hauptgruppen Ia (vegetative Proteine, kontinuierliche Synthese), Ib (vegetative Proteine, Einschaltung der Synthese sequentiell) und II (keimungsspezifische Proteine) wurde nach visueller Auswertung der entwickelten Röntgenfilme vorgenommen.

Ordinate: Anzahl der auf den 2D-Gelen sichtbaren Protein-„spots“. Keimungsphase: –10–0 min. Im Phasenkontrastmikroskop verdunkelte Sporen = t_0 . Die Zellteilung erfolgte nach 250 min (30 °C, Standkultur).

„keimungsspezifische“ Proteine bezeichnet werden (Gruppe II). Ein vorläufiger Vergleich der Proteinsynthesemuster auswachsender Sporen und sporulierender Zellen zeigt, daß im Zuge der Sporulation insbesondere die Synthese der zur Gruppe Ib gehörenden vegetativen Proteine abgeschaltet wird, während die Proteine der Gruppe Ia (kontinuierliche Synthese!) auch in der sporulierenden Zelle gebildet werden.

Eine ganz ähnliche Einteilung in diese drei Hauptgruppen gilt nicht nur für die löslichen Proteine, sondern auch für die Membranfraktion (Abbn. 2 und 3).

Werden die Sporen nach der Keimung im Minimalmedium inkubiert, das lediglich die spezifischen Keimungsstimulanzen enthält, können sie sich aufgrund der unzureichenden Versorgung mit Nährstoffen nicht vollständig in Stäbchen umwandeln [13]. Auch diese Sporen sind entgegen älteren Auffassungen [4, 13] in der Lage, bereits in den frühesten Keimungsstadien eine Vielzahl von Proteinen, die für die vegetative Zelle typisch sind (insgesamt wurden 77 vegetative Proteine der Gruppe Ia gezählt), zu bilden.

Eine Hemmung der Keimung in einem ganz bestimmten Stadium läßt sich bei den temperatursensi-

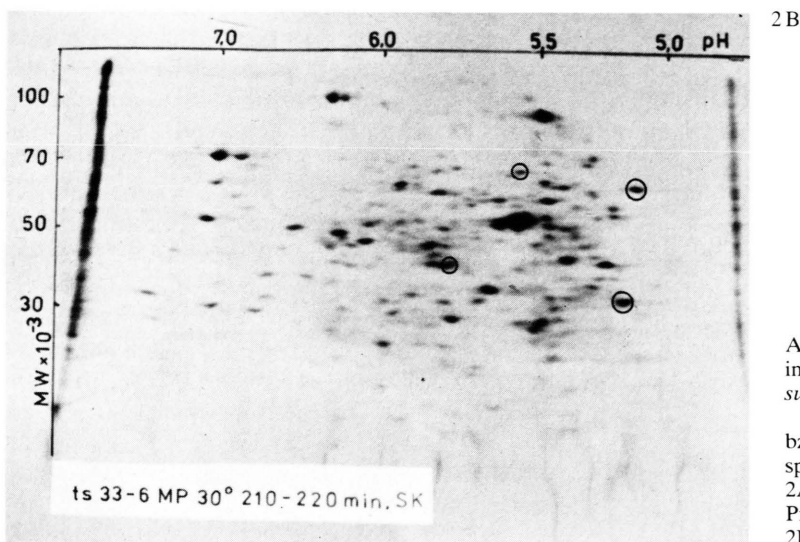
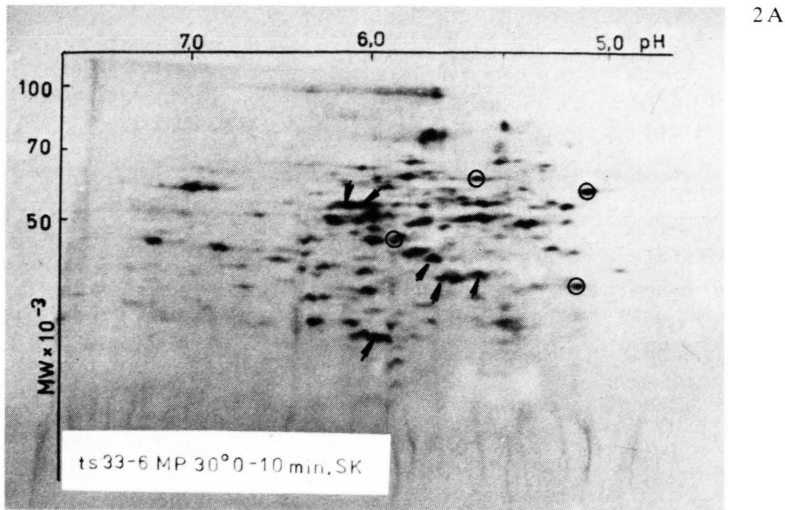


Abb. 2. Synthese von Membranproteinen in auswachsenden Sporen von *Bacillus subtilis* ts 33-6, 30 °C Standkultur.

Markierungszeit 0-10 min (Abb. 2A) bzw. 210-220 min (Abb. 2B). Keimungsspezifische Proteine (II) wurden in Abb. 2A mit Pfeilen gekennzeichnet, einige Proteine der Gruppe Ia in Abb. 2A und 2B eingekreist.

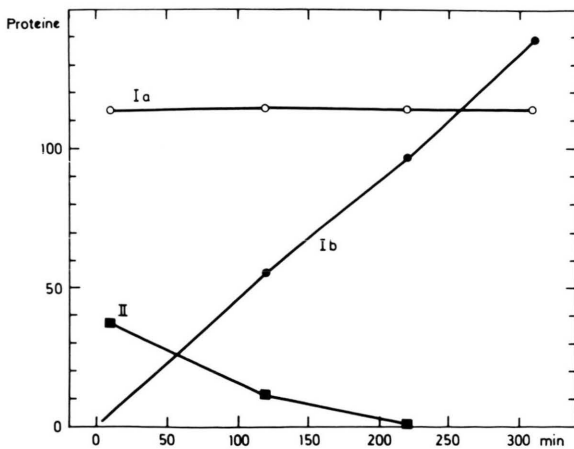


Abb. 3. Synthese von Membranproteinen in auswachsenden Sporen von *Bacillus subtilis* ts 33-6.

Die Einteilung in die drei Hauptgruppen Ia (vegetative Proteine, kontinuierliche Synthese), Ib (vegetative Proteine, Einschalten der Synthese sequentiell) und II (keimungsspezifische Proteine) wurde nach visueller Auswertung der entwickelten Röntgenfilme (siehe Abb. 2) vorgenommen. Die erste Zellteilung erfolgte nach 250 min (30 °C, Standkultur).

tiven Mutanten erreichen, die von Galizzi und Mitarbeitern isoliert worden sind. Für diese Untersuchungen wurde die Mutante von *Bacillus subtilis* PB 2427 (ts-gsp0-81), deren Sporen sich bei 47 °C nicht mehr in Stäbchen umwandeln können, ausgewählt [10].

Pulsmarkierungsexperimente zeigten, daß der Einbau von ^3H -Uridin als Maß für die Transcription bei Anzucht der Stämme unter restriktiven Bedingungen schnell und drastisch abfällt [Abb. 4, siehe auch 10]. Der Block wirkt sich bereits nach 20 min. aus. Die zweidimensionale gelelektrophoretische Analyse der Translationsprodukte brachte die erwarteten Resultate: In frühen Keimungsstadien treten auch unter restriktiven Bedingungen neben einer

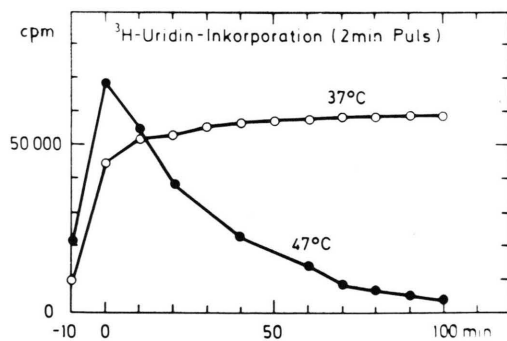


Abb. 4. ^3H -Uridin-Einbau nach 2 min Pulsmarkierung in auswachsenden Sporen von *Bacillus subtilis* PB2427 unter permissiven (37 °C) und restriktiven (47 °C) Bedingungen (siehe experimenteller Teil).

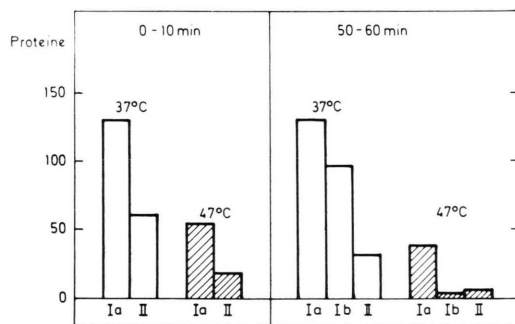


Abb. 5. Proteinsynthese in der frühen Keimphase von *Bacillus subtilis* PB2427 unter permissiven (37 °C) und restriktiven (47 °C) Bedingungen.

Die Einteilung der ausgezählten radioaktiv markierten Proteine in die Gruppen Ia, Ib und II wurde anhand der Röntgenfilme (0–10 min, 50–60 min) vorgenommen.

- Ia – vegetative Proteine, kontinuierliche Synthese.
- Ib – vegetative Proteine, sequentielle Synthese.
- II – keimungsspezifische Proteine.

Vielzahl vegetativer Proteine der Gruppe Ia (kontinuierliche Synthese) keimungsspezifische auf (II), wenn auch bedeutend weniger als unter permissiven Bedingungen.

Mit fortschreitender Keimung wird neben der Anzahl auch die Syntheserate vegetativer Proteine (Ia) drastisch vermindert, zudem unterbleibt die sequentielle Aktivierung vegetativer Gene (Ib) nach dem Block mehr oder weniger vollständig (Abb. 5). Zusätzlich treten bei 47 °C vermutliche Hitzeschockproteine auf [14], die in der vorliegenden Arbeit jedoch unberücksichtigt blieben.

Diskussion

Die Wiederaufnahme der Proteinsynthese in keimenden Sporen von *Bacillus subtilis* zeigt einen hochgradig geordneten Verlauf. Nach unseren gelelektrophoretischen Analysen lassen sich insbesondere keimungsspezifische (II), kontinuierlich synthetisierte vegetative (Ia) und sequentiell aktivierte vegetative Proteine (Ib) unterscheiden [9, vgl. Abb. 1]. Diese Einteilung gilt auch für membrangebundene Proteine, wenn auch bedeutend weniger Proteine der keimungsspezifischen Gruppe II zuzuordnen sind. Die sequentielle Aktivierung vegetativer Gene (Ib) dürfte für die Umwandlung der Spore in eine vegetative Zelle von großer Bedeutung sein. Schließlich erlangt die auswachsende Spore dadurch Schritt für Schritt die für vegetative Zellen typischen Leistungen zurück. Nach unserer Auffassung sollte in den Mutantensporen nach dem Keimungsblock die sequentielle Aktivierung vegetativer Gene (Ib) unterbleiben, eine Annahme, die sich experimentell erhärten ließ, die jedoch durch eine exakte kinetische Analyse verschiedener Mutanten bewiesen werden müßte [siehe auch 12]. Es ist wahrscheinlich, daß die Produkte der „outgrowth“-Gene das zeitlich geordnete Einschalten vegetativer Leistungen veranlassen, wobei über die molekularen Mechanismen bisher nur Hypothesen formuliert werden können. So ist nach neuen Untersuchungen [vgl. Übersichten bei 1, 2] anzunehmen, daß die Sporen in frühen Keimungsphasen noch über Sigma-Faktoren verfügen, die für sporulierende Zellen charakteristisch sind. Ein entscheidender Mechanismus, der die sequentielle Aktivierung vegetativer Gene (Ib) erklären könnte (sicher nicht der alleinige!), ist im Austausch sporenspezifischer Sigma-Faktoren gegen den Sigma-Faktor der vegetativen RNS-Polymerase (Sigma

55) zu vermuten. Allerdings erhebt sich an dieser Stelle die Frage, wie eine Vielzahl vegetativer Gene (Ia) dennoch bei Keimungsbeginn, vermutlich in Abwesenheit des vegetativen Sigma-Faktors, zur Expression gelangen kann. Dabei gilt es zu berücksichtigen, daß bei weitem nicht alle Synthesen vegetativer Proteine während der Sporulation abgeschaltet werden [15–17]. Diese Proteine werden offensichtlich nicht nur für den vegetativen Zellzyklus, sondern auch für die Zelldifferenzierung benötigt. Wir nehmen daher an, daß die vegetativen Gene der Gruppe Ia kontinuierlich während des Wachstums- und Differenzierungszyklus zur Expression gelangen, während die der Gruppe Ia im Zuge der Sporulation abgeschaltet werden und erst nach Ablauf keimungsspezifischer Ereignisse (z.B. Austausch der Sigma-Faktoren) wieder transkribiert werden.

Die Sigma-Faktoren der sporulierenden Zelle erkennen andere Promotoren als die für die vegetative Zelle typischen [siehe 1, 2]. Es erhebt sich die Frage, wie Promotoren vegetativer Gene (Ia) von der RNS-Polymerase sporulierender Zellen erkannt werden können [vgl. 1]. Zur Beantwortung dieser Frage sollte u.a. geprüft werden, ob die kontinuierlich exprimierten vegetativen Gene über zwei verschiedene Promotoren verfügen, die entweder von der RNS-Polymerase sporulierender oder vegetativer Zellen erkannt werden, während die sequentiell aktivierten vegetativen Gene nur den Promotor mit hoher Affinität zum Sigma-Faktor der vegetativen Zelle aufweisen könnten (vgl. Abb. 6, siehe auch [1, 18]).

Unsere gelelektrophoretische Analysen gestatten nur einen ersten vorläufigen Einblick in das Genex-

pressionsprogramm auswachsender Sporen. Die gezielte und detaillierte Untersuchung verschiedener Mutanten, die in frühen, mittleren und späten Phasen des Auswachsens defekt sind, sollte eine Einordnung und biochemische Charakterisierung verschiedener Keimungsstadien ermöglichen, wie sie für die sporulierende Zelle seit langer Zeit bekannt sind [19]. Damit wäre ein Einblick in ein Differenzierungs-geschehen möglich, bei dem die Spore durch die Wirkung von Regulatorproteinen Schritt für Schritt in einer durch das Differenzierungsprogramm vorgegebenen Sequenz die für vegetative Zellen typischen Leistungen wiedererlangt.

Experimenteller Teil

Für die Untersuchungen kamen *Bacillus subtilis* SB19 ts 33–6 [20] sowie die Mutante PB2427 (his B2 trpC2 gsp0–81) mit einem Block in der Auswachsungsphase bei 47 °C [10] zur Anwendung. Die bei 65 °C für eine Stunde in Aqua dest. aktivierten Sporen gelangten in ein Minimalmedium (0,6% KH₂PO₄, 1,4% K₂HPO₄, 0,2% (NH₄)₂SO₄, 0,01% MgSO₄), das neben allen proteinogenen Aminosäuren (je 50 µg/ml) 0,5% Glucose, 0,05% L-Alanin und 0,05% Adenosin enthielt (komplettes Medium, siehe [8]). Nach 10 min. waren 95% der Sporen im Phasenkontrastmikroskop verdunkelt und gekeimt (= t₀, Keimungsphase –10–0 min). Die Sporen von PB2427 wurden bei 37 °C (permissive Bedingungen) bzw. bei 47 °C (restriktive Bedingungen) weiter inkubiert (zur ausführlichen Beschreibung der Mutanten siehe unter [10]). Unmittelbar nach erfolgter

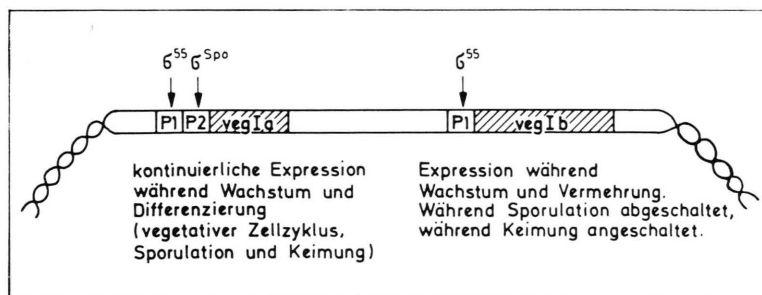


Abb. 6. Modellvorstellungen zur Expression vegetativer Gene der Gruppen Ia und Ib während Wachstum und Differenzierung von *Bacillus subtilis*.

Nach unseren Vorstellungen enthalten die vegetativen Gene-Ia mindestens zwei verschiedene Promotoren, die entweder den Sigma-Faktoren der RNS-Polymerase vegetativer oder sporulierender Zellen erkennen können. Dadurch wäre eine kontinuierliche Expression dieser Gene während Wachstum und Differenzierung gewährleistet. Die Expression vegetativer Gene-Ib, die nur von der RNS-Polymerase vegetativer Zellen erkannt werden (1 Promotor), würde erst nach Austausch der Sigma-Faktoren in der frühen Keimungsphase möglich.

Keimung (0–10 min) sowie nach 50 min (50–60 min) erfolgte die Markierung der auswachsenden Sporen mit 4 µCi/ml [³⁵S-L-]Methionin (Amersham, spez. Aktivität 1300 Ci/mmol) für 10 min. Nach Zugabe von Chloramphenicol (50 µg/ml) wurde der Methionin-Einbau abgebrochen, die Proteinextrakte wurden nach Aufschluß der sedimentierten Zellen durch Ultraschall und Zentrifugation gewonnen und wie bei O'Farrell [6] beschrieben im zweidimensionalen System aufgetrennt [8]. Die getrockneten Gele wurden fluorographisch ausgewertet. Die Einteilung der Proteine in die Gruppen Ia, Ib und II (vgl. Einteilung) erfolgte nach visueller Auswertung der entwickelten Röntgenfilme [siehe 9].

Zur Gewinnung der Membranfraktion wurden die Zellsedimente in folgendem Puffer aufgenommen: 0,01 M Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM MgCl₂, 1 mM Phenylmethansulfonylfluorid, 50 µg/ml Pankreas-RNase. Nach Ultraschallaufschluß und dreiminütiger Zentrifugation bei 5000 × g wurde der Überstand 1 h bei 70000 × g zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen des Sediments mit 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH

7,4 und erneuter Ultrazentrifugation erfolgte die Aufnahme in Lysiummedium (9,5 M Harnstoff, 2% (v/v) Nonidet-P40, 1,6% (v/v) Ampholines pH 5–7, 0,4% (v/v) Ampholines pH 3,5–10 und 5% (v/v) Mercaptoethanol), in dem die Membranen 30 min bei Zimmertemperatur geschüttelt wurden. Aliquote Teile der nach Zentrifugation erhaltenen Überstände wurden wie bei O'Farrell [6] beschrieben durch Isoelektrofokussierung und SDS-Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt.

Zum Nachweis der [³H]Uridininkorporation wurden zu bestimmten Zeiten je 100 µl der Suspension bei 37 °C bzw. 47 °C auswachsender Sporen entnommen, mit 1 µCi/ml [³H]Uridin (Prag, 11,9 Ci/mmol) für 2 min pulsmarkiert und der Einbau des [³H]Uridins in Trichloressigsäure-fällbare Substanzen wie bei Hecker [21] beschrieben gemessen.

Danksagung

Herrn Dr. A. Galizzi von der Universität Pavia (Italien) danken wir für die Bereitstellung der Mutante PB2427.

- [1] R. Losick, *Spores* **VIII**, 48 (1981).
- [2] R. H. Doi, In: *The Molecular Biology of the Bacilli*, p. 71. Academic Press, New York 1982.
- [3] E. Freese, In: *The Bacterial Spore*, **Vol. 2**, p. 101. Academic Press, London 1984.
- [4] P. Setlow, *Spores* **VIII**, 13 (1981).
- [5] M. Hecker, *Z. Allg. Mikrobiol.* **23**, 517 (1983).
- [6] P. H. O'Farrell, *J. Biol. Chem.* **250**, 4007 (1975).
- [7] H. B. Mullin and J. N. Hansen, *Spores* **VIII**, 246 (1981).
- [8] G. Wachlin und M. Hecker, *Z. Allg. Mikrobiol.* **22**, 495 (1982).
- [9] M. Hecker, G. Wachlin, A.-M. Dunger, and F. Mach, *FEMS Microbiol. Letters* **25**, 57 (1984).
- [10] A. M. Albertini and A. Galizzi, *J. Bacteriol.* **124**, 14 (1975).
- [11] A. M. Albertini, M. L. Baldi, E. Ferrarri, E. Isnenghi, M. T. Zambelli, and A. Galizzi, *J. Gen. Microbiol.* **110**, 351 (1979).
- [12] A. M. Albertini and A. Galizzi, *J. Gen. Microbiol.* **128**, 247 (1982).
- [13] A. Torriani and C. Levinthal, *J. Bacteriol.* **94**, 176 (1967).
- [14] G. Wachlin und M. Hecker, *Z. Allg. Mikrobiol.* **24**, 397 (1984).
- [15] T. Linn and R. Losick, *Cell* **8**, 103 (1976).
- [16] M. D. Yudkin, H. Boschwitz, Y. Lorch, and A. Keynan, *J. Gen. Microbiol.* **128**, 2165 (1982).
- [17] H. G. Rhaese, A. Reichenbach, and G. Stammering, *Eur. J. Biochem.* **139**, 593 (1984).
- [18] P. Z. Wang and R. H. Doi, *J. Biol. Chem.* **259**, 8619 (1984).
- [19] P. J. Piggot and J. E. Coote, *Bacteriol. Rev.* **40**, 908 (1976).
- [20] F. Mach und H. Engelbrecht, *Z. Allg. Mikrobiol.* **10**, 383 (1970).
- [21] M. Hecker, *Z. Allg. Mikrobiol.* **22**, 529 (1982).