

# Synthese von Hitzeschockproteinen nach einer Aminosäure- und Sauerstofflimitation in *Bacillus subtilis* relA<sup>+</sup>- und relA-Stämmen

Synthesis of Heat Shock Proteins during Amino Acid or Oxygen Limitation in *Bacillus subtilis* relA<sup>+</sup> and relA

M. Hecker, A. Richter, A. Schroeter, L. Wölfel und F. Mach

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

Z. Naturforsch. **42c**, 941–947 (1987); received December 29, 1986

*Bacillus subtilis*, Stringent Control, Heat Shock proteins

Some of the presumable heat shock proteins will be produced in *Bacillus subtilis* in response to different environmental conditions, e.g. heat shock, amino acid limitation or oxygen limitation. During amino acid limitation or during oxygen limitation the relA<sup>+</sup> strain is able of synthesizing this set of proteins but the relA strain is not. We suggest that the accelerated rate of the synthesis of some heat shock proteins depends on the induction of the stringent response because the (p)ppGpp production does not occur in the relA strain during amino acid or oxygen limitation. On the other hand the relA strain can produce heat shock proteins under heat stress. Therefore different mechanisms must be responsible for the expression of this set of genes during heat and other stress stimuli.

It can be supposed that in *B. subtilis* the (p)ppGpp-dependent stringent control is a central defense reaction against different adverse environmental conditions and furthermore, that the synthesis of "stress" proteins as an essential component of the stringent response is part of a general adaptation mechanism under non-growing conditions.

## Einleitung

Die Mehrzahl der Bakterien lebt überwiegend unter Bedingungen, die nur sehr niedrige Wachstumsraten ermöglichen. Im Laufe der Evolution haben sich verschiedene Strategien herausgebildet, die es den Bakterien gestatten, solche Zeiträume zu überleben. Zum Verständnis der Physiologie der Mikroorganismen ist es ganz allgemein notwendig, tiefere Einblicke in diese „defensiven Strategien“ zu erlangen, zu denen bei *Bacillus subtilis* neben der Sporulation auch die „stringent response“ oder die Hitzeschockantwort zählen [1].

Zellen von *Bacillus subtilis* bilden wie andere Organismen eine Reihe von Proteinen, wenn sie einem kurzzeitigen Hitzeschock ausgesetzt werden [2, 3]. Ein Teil dieser vermutlichen Hitzeschockproteine ist auch nachzuweisen, wenn experimentell eine Aminosäurelimitation hervorgerufen wird [4]. In der vorliegenden Arbeit soll der Zusammenhang zwischen der (p)ppGpp-abhängigen „stringent control“ und der Synthese von Hitzeschockproteinen bei *Bacillus subtilis* eingehend studiert werden.

---

Sonderdruckanforderungen an M. Hecker.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen  
0341-0382/87/0700-0941 \$ 01.30/0

## Ergebnisse

### Induktion einer „stringent control“ durch Norvalin

Nach Zugabe von Norvalin kann in *B. subtilis* IS58 (relA<sup>+</sup>, trp, lys) eine Akkumulation von (p)ppGpp nachgewiesen werden, die in seinem „relaxed“ kontrollierten Partner IS56 (relA, trp, lys) ausbleibt. Parallel dazu wird nur im Stamm IS58 (relA<sup>+</sup>) die Synthese stabiler RNA, gemessen als [<sup>3</sup>H]Uridininkorporation im Dauermarkierungsexperiment, ausgeschaltet (Abb. 1). Damit ist gezeigt, daß Norvalin eine „stringent control“ auslöst (siehe auch [5]).

Norvalin bewirkt eine Wachstumshemmung in beiden Stämmen, während der [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau ganz besonders in *B. subtilis* relA<sup>+</sup> eingeschränkt ist, woraus zu schlußfolgern ist, daß auch die DNA-Synthese einer „stringent control“ unterliegt (siehe [6, 7]). Untersuchungen zum Mechanismus der Norvalineinwirkung ergaben, daß das Aminosäureanalogon die Aktivitäten der Leucyl- und Isoleucyl-tRNA-Synthetasen drastisch hemmt, während die Aktivität der Valyl-tRNA-Synthetase nur wenig beeinflußt wird (Abb. 1).

Die durch Norvalin ausgeübte Wachstumshemmung kann durch Zugabe von Leucin bzw. Isoleucin teilweise aufgehoben werden (nicht gezeigt). Damit dürfte die Induktion der „stringent control“ durch



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 digitized 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.

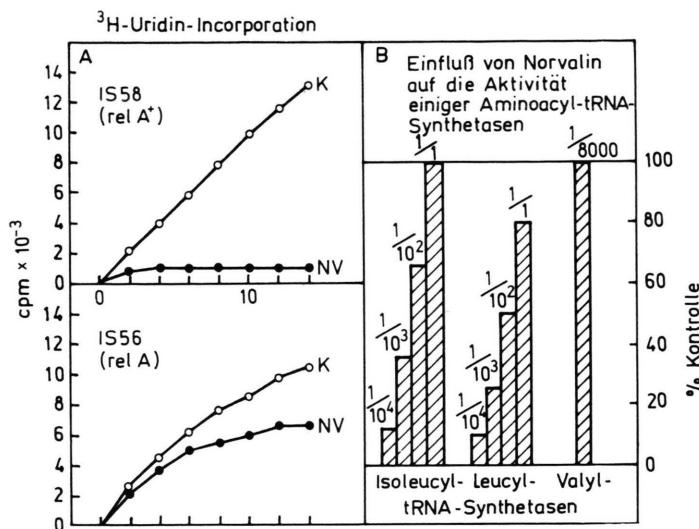


Abb. 1. Induktion einer „stringent control“ in *Bacillus subtilis* durch L-Norvalin.

(A) Einfluß von Norvalin auf die [ $^3$ H]Uridinincorporation; 0 bis 14 min.

## (B) Einfluß von Norvalin auf die Aktivität ausgewählter Aminoacyl-tRNA-Synthetasen.

(A) L-Norvalin (Zugabe zu logarithmisch wachsenden Zellen zum Zeitpunkt 0 Min.) verhindert in *B. subtilis* IS58 (relA<sup>+</sup>) die [<sup>3</sup>H]Uridinincorporation (Dauermarkierungsexperiment), während die RNA-Synthese in *B. subtilis* IS56 (relA) trotz Norvalinzugabe fortgesetzt wird. Parallel dazu tritt nur in den mit Norvalin behandelten Zellen von *B. subtilis* IS58 verstärkt (p)ppGpp auf (nicht gezeigt).

(B) L-Norvalin hemmt die Aktivität der Isoleucyl- und Leucyl-tRNA-Synthetasen in *B. subtilis* (gemessen als Beladung der tRNA mit [<sup>14</sup>C]L-Isoleucin bzw. [<sup>14</sup>C]L-Leucin in Gegenwart und Abwesenheit von L-Norvalin), die der Valyl-tRNA-Synthetase wird in den gewählten Norvalinkonzentrationen nicht beeinflusst. Enzymaktivität angegeben in % der Kontrolle (ohne L-Norvalin). Verhältnisse von Isoleucin/Leucin/Valin zu Norvalin 1:0 (Kontrolle), 1:100, 1:1000, 1:8000 bzw. 1:10000. Im Inkubationsansatz (insgesamt 100 µl) sind 4 nmol L-Isoleucin, L-Leucin oder L-Valin enthalten.

Norvalin auf eine verminderte Bereitstellung von Leucyl- bzw. Isoleucyl-tRNA zurückzuführen sein, wobei offen bleibt, ob diese alleinig durch die Hemmung der Aktivität der Leucyl- bzw. Isoleucyl-tRNA-Synthetasen ausgelöst wird oder ob zudem noch eine Beeinflussung der Leucin- bzw. Isoleucinbiosynthese in Erwägung zu ziehen ist.

*Proteinsyntheseprogramm nach Induktion einer „stringent control“ durch Norvalin*

Nach Behandlung der Zellen von *Bacillus subtilis* relA<sup>+</sup> bzw. relA mit Norvalin wird in beiden Stämmen eine Hemmung der [<sup>35</sup>S]L-Methionininkorporation ausgelöst. Um einen Einblick in die Synthese einzelner Proteine nach Norvalineinwirkung zu erhalten, wurden die mit [<sup>35</sup>S]L-Methionin markierten Proteine im zweidimensionalen System nach O'Farrell [8] aufgetrennt. Dabei konnte in *B. subtilis* IS58 (relA<sup>+</sup>) eine durch Norvalin ausgelöste Stimulation der Synthese verschiedener Proteine auf dem zweidimensionalen Gel beobachtet werden, die in *B. subti-*

*lis* IS56 (relA) nicht so deutlich zu verzeichnen war (Abb. 2). Auf der anderen Seite sind nur wenige Proteine auf den zweidimensionalen Gelen sichtbar, deren Synthese relA-abhängig spezifisch ausgeschaltet wird (nicht gezeigt). Ein ganz ähnliches Bild ergibt sich, wenn die „stringent control“ durch Zugabe von Serinhydroxamat induziert wird, woraus abzuleiten ist, daß die verstärkte Synthese einiger Proteine wirklich durch die „stringent control“ und nicht spezifisch durch das Aminosureanalogon Norvalin ausgelöst wird (Abb. 2).

Der Vergleich mit dem Proteinsyntheseprogramm nach kurzzeitiger Hitzeeinwirkung zeigte, daß die Mehrzahl der nach Aminosäurehunger mit erhöhter Rate synthetisierten Proteine zu den vermutlichen Hitzeschockproteinen zu rechnen ist (Abb. 2 und 3).

### *Proteinsyntheseprogramm nach Induktion einer „stringent control“ durch Sauerstofflimitation*

Verhindert man in logarithmisch wachsenden Zellen von *B. subtilis* die weitere Sauerstoffzufuhr (z. B.

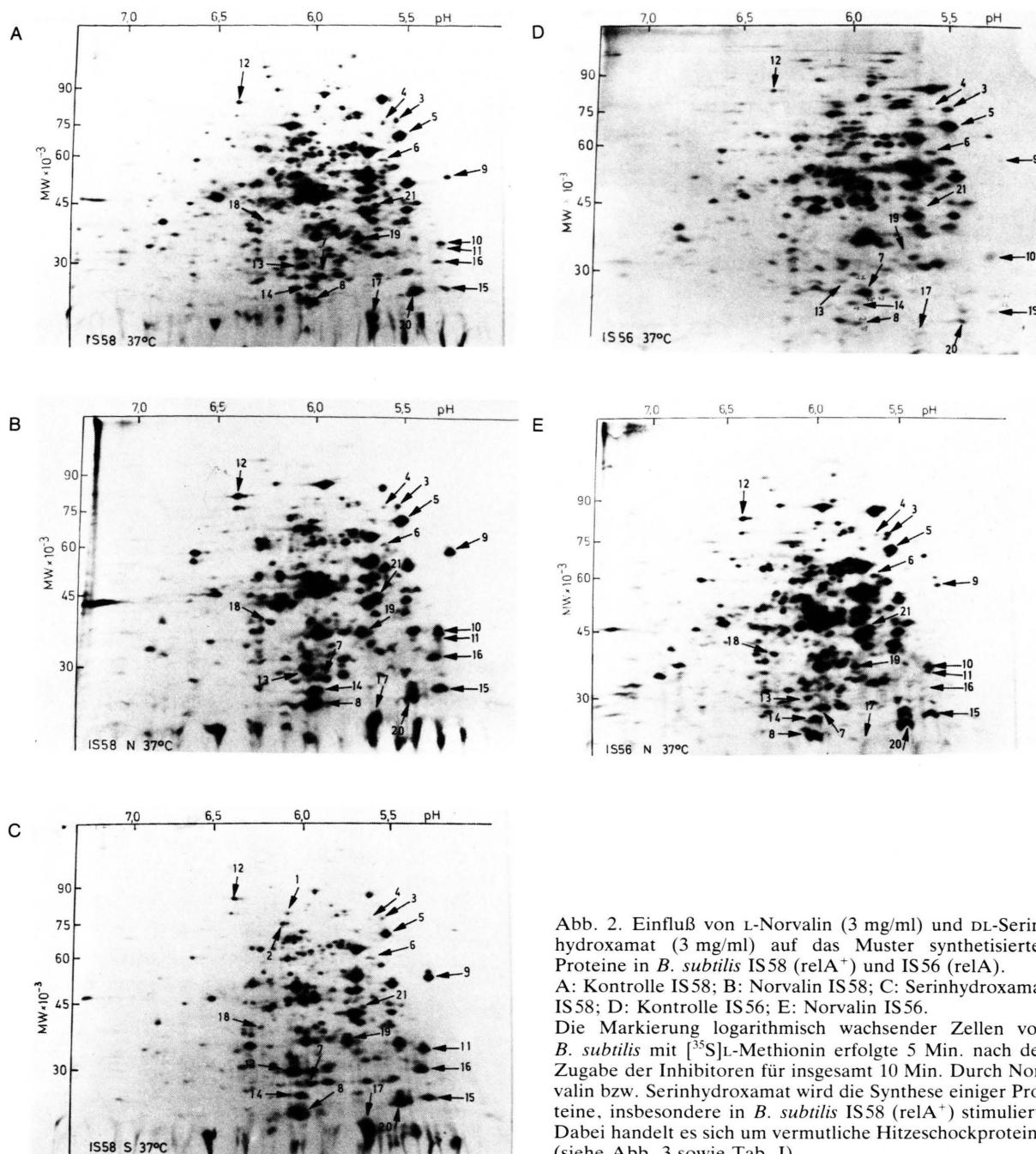
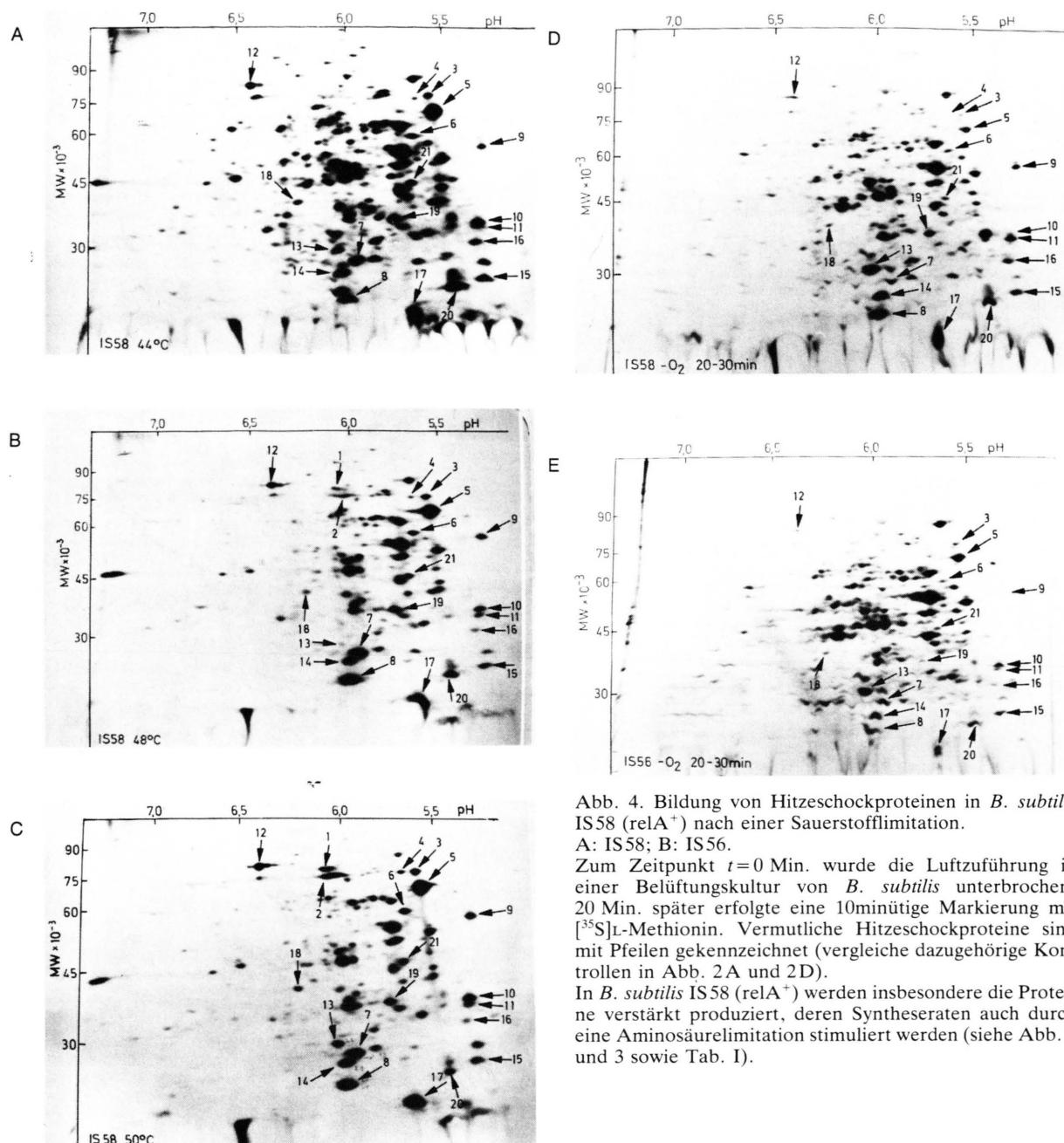


Abb. 2. Einfluß von L-Norvalin (3 mg/ml) und DL-Serinhydroxamat (3 mg/ml) auf das Muster synthetizierter Proteine in *B. subtilis* IS58 (relA<sup>+</sup>) und IS56 (relA). A: Kontrolle IS58; B: Norvalin IS58; C: Serinhydroxamat IS58; D: Kontrolle IS56; E: Norvalin IS56. Die Markierung logarithmisch wachsender Zellen von *B. subtilis* mit [<sup>35</sup>S]L-Methionin erfolgte 5 Min. nach der Zugabe der Inhibitoren für insgesamt 10 Min. Durch Norvalin bzw. Serinhydroxamat wird die Synthese einiger Proteine, insbesondere in *B. subtilis* IS58 (relA<sup>+</sup>) stimuliert. Dabei handelt es sich um vermutliche Hitzeschockproteine (siehe Abb. 3 sowie Tab. I).

durch Abstellen der Luftzufuhr in einer Belüftungskultur bzw. durch Einleiten von Argon), reagiert der Stamm IS58 (relA<sup>+</sup>) mit einer sofortigen Bildung von (p)ppGpp, während sein „relaxed“ kontrollierter Partner dazu nicht fähig ist.

Damit lässt sich in *B. subtilis* auch durch eine Sauerstofflimitation die relA-abhängige „stringent control“ auslösen. Unmittelbar nach dem Belüftungsstop werden in beiden Stämmen die Wachstumsprozesse eingestellt und die Inkorporation von



Die Markierung der bei 37 °C wachsenden Zellen mit [<sup>35</sup>S]L-Methionin erfolgte 5 Min. nach dem „temperature shift up“ für insgesamt 10 Min. Vermutliche Hitzeschockproteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Unter diesen sind solche, deren Synthese sowohl durch Hitzeschock als auch durch Aminosäurelimitation verstärkt wird (ausge-

Abb. 4. Bildung von Hitzeschockproteinen in *B. subtilis* IS58 (relA<sup>+</sup>) nach einer Sauerstofflimitation.

A: IS58; B: IS56.

Zum Zeitpunkt  $t=0$  Min. wurde die Luftzuführung in einer Belüftungskultur von *B. subtilis* unterbrochen. 20 Min. später erfolgte eine 10minütige Markierung mit [<sup>35</sup>S]L-Methionin. Vermutliche Hitzeschockproteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet (vergleiche dazugehörige Kontrollen in Abb. 2A und 2D).

In *B. subtilis* IS58 (relA<sup>+</sup>) werden insbesondere die Proteine verstärkt produziert, deren Syntheseraten auch durch eine Aminosäurelimitation stimuliert werden (siehe Abb. 2 und 3 sowie Tab. I).

wählte Beispiele bei Nr. 7, 8, 14, 17), während andere wiederum alleinig nach einer Hitzebehandlung intensiver gebildet werden (z.B. 1–5, siehe auch Tab. I).

[<sup>3</sup>H]Uridin in RNA drastisch reduziert (Hecker et al., in Vorbereitung).

Während die Syntheserate vegetativer Proteine nach und nach abfällt, läßt sich wiederum insbesondere im zur (p)ppGpp-Synthese befähigten Stamm IS58 (relA<sup>+</sup>) eine Stimulation der Synthese solcher Proteine verzeichnen, die auch nach Aminosäurelimitation auf den zweidimensionalen Gelen mit erhöhter Markierung auffallen und die wir als Hitzeschockproteine angesprochen haben (Abb. 4).

Proteine, die nur nach O<sub>2</sub>-Limitation und nicht nach Aminosäurelimitation mit erhöhter Intensität produziert werden, konnten bei *B. subtilis* nicht gefunden werden (vgl. dagegen die Situation bei *E. coli*-Zellen, die bei einer Sauerstofflimitation auf einen anaeroben Energiestoffwechsel umschalten können) [siehe 9].

In der Tab. I sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

## Diskussion

Für das Verständnis der Physiologie einer Bakterienzelle ist die Kenntnis der Strategien, die sich in Anpassung an die wachstumsbegrenzenden oder überlebensgefährdenden Milieufaktoren herausgebildet haben, von erstrangiger Bedeutung [1]. Wir

haben zwei solcher Milieufaktoren herausgegriffen, die ohne Zweifel auch für die Ökophysiologie von *Bacillus* entscheidend sind: Die unzureichende Versorgung mit Aminosäuren und die Sauerstofflimitation. Gerade der O<sub>2</sub>-Mangel könnte für *Bacillus* als aerobes, im Boden lebendes Bakterium ein solcher wachstumsbegrenzender Milieufaktor sein, der adaptive Strategien geradezu „herausgefördert“ hat, wie u.a. Untersuchungen über die Bildung von cAMP insbesondere bei Sauerstoffmangel belegen [10].

Wir konnten zeigen, daß die Sauerstofflimitation darüber hinaus eine „stringent control“ bewirkt. Offensichtlich wird bei *Bacillus subtilis* die „stringent control“ in Beantwortung ganz unterschiedlicher physiologischer Belastungssituationen eingeschaltet, da auch ein Mangel an Aminosäuren oder Glucose die (p)ppGpp-Bildung auslöst [11].

Über die molekularen Mechanismen der „stringent control“ liegen insbesondere für *Escherichia coli* wesentliche Befunde vor (siehe Übersichten bei [1, 12, 13]), während über *Bacillus subtilis* in diesem Zusammenhang nur wenig bekannt ist. Ganz allgemein könnte man die Bedeutung von ppGpp für die hungernde Zelle von *E. coli* darin sehen, daß dieses

Tab. I. Zusammenfassende Darstellung vermutlicher Hitzeschockproteine in *B. subtilis* (siehe Abb. 2, 3 und 4). Einfluß von erhöhter Temperatur, Serinhydroxamat (S), Norvalin (NV) sowie einer Sauerstofflimitation. Intensität der Synthese individueller Proteine von – bis +++++.

Protein-nummer	<i>B. subtilis</i> IS58 (relA <sup>+</sup> )					<i>B. subtilis</i> IS56 (relA)				
	Kontr. 37 °C	44 °C	48 °C	50 °C	S 37 °C	NV 37 °C	O <sub>2</sub> -L. 37 °C	Kontr. 37 °C	NV 37 °C	O <sub>2</sub> -L. 37 °C
1	–	–	+	+++	(+)	–	–	–	–	–
2	–	–	++	+++	+	–	–	–	–	–
3	+	+++	+++	+++	(+)	+	+	+ (+)	+	(+)
4	(+)	(+)	(+)	++	–	(+)	(+)	(+)	(+)	–
5	+++	+++++	+++++	+++++	++	++++	++	+++	+++	++
6	+	++	++	++	+	(+)	+ (+)	+	+	+
7	+ (+)	++++	++++	++++	+ (+)	+++	+++	+ (+)	+++	+
8	++	++++(+)	++++	++++	++++	+++++	+++	(+)	++ (+)	+
9	+	+ (+)	+ (+)	+ (+)	++	++ (+)	+ (+)	–	+	–
10	+	++ (+)	++ (+)	++	–	+++	–	(+)	+ (+)	+
11	(+)	++	++	(+) ++	++	++ (+)	–	(+)	(+)	(+)
12	+	++ (+)	++ (+)	++ (+)	+	+ (+)	+ (+)	(+)	+	(+)
13	+ (+)	++ (+)	(+)	++ (+)	++	++ (+)	++ +	(+)	+	++ (+)
14	+ (+)	++++	++++	++++	++	++++	++ +	+	++	++ (+)
15	+	+++	++	+ (+)	+ (+)	+++	++	(+)	++	+
16	+	++	(+)	(+)	++ (+)	++ (+)	++	–	(+)	(+)
17	+++	+++++	++++	+++++	+++++	+++++	+++++	(+)	–	+
18	(+)	++	+	(+)	+	+	–	+ (+)	(+)	(+)
19	++	+++	++ (+)	++	++ (+)	++ (+)	++ (+)	–	+	–
20	+ (+)	++++	++	+	++ (+)	++	++	+	++	+
21	+	++	++	++	(+)	++ (+)	+	(+)	+	(+)

Alarmon am Abschalten von für Wachstum und Vermehrung typischen Leistungen beteiligt ist, während es auf der anderen Seite Mechanismen auslöst, die dem durch ppGpp angezeigten Mangel entgegenwirken können. Darüber hinaus ist in jüngster Zeit gezeigt worden, daß ppGpp auch in die Regulation der Synthese der Hitzeschockproteine eingreift [14, 15].

In der vorliegenden Arbeit wurde deutlich gemacht, daß in *B. subtilis* einige der vermutlichen Hitzeschockproteine (siehe [4]) keinesfalls ausschließlich nach einer Temperaturerhöhung verstärkt synthetisiert werden, sondern auch in Beantwortung einer Sauerstoff- bzw. Aminosäurelimitation. Diese Reaktion erfolgt wahrscheinlich in Abhängigkeit von der „stringent response“, da die „relaxed“ kontrollierte Mutante weder zur (p)ppGpp-Bildung noch zur massiv verstärkten Synthese dieser Proteine befähigt ist. Es kann vermutet werden, daß auch durch Glucoselimitation, die im Experiment sehr einfach durch Zugabe von  $\alpha$ -Methylglucosid zu erzeugen ist, eine ähnliche zellphysiologische Reaktion auftritt (in Vorbereitung).

Damit scheint in der (p)ppGpp-abhängigen „stringent control“ offensichtlich ein zentrales „Verteidigungssystem“ der Zelle vorzuliegen, in dem ganz unterschiedliche extrazelluläre Signale zur Synthese von (p)ppGpp zusammengeführt werden, das dann eine gleiche oder ähnliche Zellantwort auslöst. Nach unserer Kenntnis bewirkt diese (p)ppGpp-abhängige Zellantwort bei *Bacillus subtilis* neben einer Abschaltung der Synthese neuer Ribosomen bzw. DNA [5, 7] sowie einer Einschaltung der Sporulation über eine Erniedrigung des zellulären GTP-Spiegels [16] insbesondere auch die verstärkte Produktion vermutlicher Hitzeschockproteine. Es ist sehr wahrscheinlich, daß diese bei physiologischen Belastungssituationen gebildeten „Streßproteine“ bei der Adaptation an wachstumsbegrenzende Faktoren eine wesentliche Schutzfunktion übernommen haben. Offensichtlich werden diese Proteine immer dann gebildet, wenn das Überleben gefährdet ist, ganz gleich, ob die Zelle unter Sauerstoff-, Glucose- bzw. Aminosäuremangel „leidet“ oder ob sie einem oxidativen bzw. einem Hitzestress (siehe [4]) ausgesetzt ist. Man sollte erwarten, daß auch Hitzeschockproteine als Sofortantwort auf ungünstige Bedingungen in frühesten Sporulationsstadien gebildet werden. Es könnte sich dabei um Proteine handeln, denen eine ganz allgemeine, die Integrität der Zelle und ihrer Membransysteme stabilisierende Funktion

zukommt. Damit liegt hier ein Prototyp für eine überlappende Signalsequenz oder für eine globale Kontrolle vor (siehe [1, 17]), bei der ganz unterschiedliche extrazelluläre Signale über teilweise gemeinsame (Mangel an O<sub>2</sub>, Aminosäuren, Glucose) oder auch getrennte Wege (z.B. Aminosäuremangel und Hitze) bis zum gleichen Regulon geführt werden.

Die molekularen Mechanismen, die dieser komplexen Genregulation bei *Bacillus* zugrunde liegen, sind noch weitgehend unbekannt. Es ist an der Zeit, die Rolle alternativer Sigmafaktoren der RNA-Polymerase, die für *Bacillus subtilis* lang bekannt sind, auch bei der Einschaltung des Hitzeschockregulons im Detail zu studieren (siehe [3]).

## Experimenteller Teil

Für die Untersuchungen kamen die von *Bacillus subtilis* Marburg 168 abgeleiteten Stämme IS58 (*relA<sup>+</sup>*, *trp*, *lys*) sowie IS56 (*relA*, *trp*, *lys*) zur Anwendung. Beide Stämme wurden in synthetischem Medium nach Sterlini und Mandelstam [18] bei 37 °C in Schüttel- bzw. Belüftungskulturen angezogen. Nach Erreichen einer optischen Dichte (500 nm) von 0,5 schloß sich die weitere Behandlung an (siehe Abb. 2, 3 und 4; entweder Umsetzen in erhöhte Temperatur, die Zugabe von 3 mg/ml L-Norvalin bzw. von 3 mg/ml DL-Serinhydroxamat oder ein Stop der Luftzufuhr bei Belüftungskulturen).

Im Anschluß daran erfolgte die Markierung mit 7 µCi/ml [<sup>35</sup>S]L-Methionin (Amersham, spez. Aktivität 1300 Ci/mmol). Nach 10 Min. wurden die [<sup>35</sup>S]L-Methionininkorporation durch Zugabe von L-Methionin (40 µg/ml) und Chloramphenicol (100 µg/ml) abgebrochen, die Probenextrakte nach Aufschluß der sedimentierten und gewaschenen Zellen durch Ultraschall gewonnen und wie bei O'Farrell [8] beschrieben aufgetrennt. Nach Trocknung und Fluorographie der Gele schloß sich die visuelle Auswertung an.

Der Nachweis der <sup>3</sup>H-Uridininkorporation sowie die Bestimmung der Aktivität der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen wurden wie bei Hecker et al. [19, 20] beschrieben durchgeführt.

## Dank

Dr. D. Dubnau (New York) danken wir für die Überlassung der *B. subtilis*-Stämme IS58 und IS56, Herrn H. Kroll aus unserer Arbeitsgruppe für die Mitarbeit an einigen Experimenten.

- [1] M. Hecker und W. Babel (Herausgeber): Physiologie der Mikroorganismen. Die Zelle, ihr Ökosystem und die molekularen Mechanismen der Adaptation. Gustav Fischer-Verlag, Jena, im Druck (1987).
- [2] U. N. Streips und P. W. Polio, *J. Bacteriol.* **162**, 434 (1985).
- [3] J. A. Todd, T. J. P. Hubbard, A. A. Travers und D. J. Ellar, *FEBS Letters* **188**, 209 (1985).
- [4] A. Richter und M. Hecker, *FEMS Microbiol. Letters* **36**, 69 (1986).
- [5] B. R. Belitskie und R. S. Shakulov, *Mol. Biologija* **14**, 1343 (1980).
- [6] M. Hecker und A. Schroeter, *Z. Allg. Mikrobiol.* **24**, 57 (1984).
- [7] S. J. Seror, F. Vannier, A. Levine und G. Henckes, *Nature* **321**, 709 (1986).
- [8] P. J. O'Farrell, *J. Biol. Chem.* **250**, 4007 (1975).
- [9] M. W. Smith und F. C. Neidhardt, *J. Bacteriol.* **154**, 336 (1983).
- [10] H. Mach, M. Hecker und F. Mach, *FEMS Microbiol. Letters* **22**, 27 (1984).
- [11] T. Nishino, J. Gallant, P. Shalit, L. Palmer und T. Wehr, *J. Bacteriol.* **140**, 671 (1979).
- [12] J. Gallant, *Ann. Rev. Genet.* **13**, 393 (1979).
- [13] M. Cashel, *Ann. Rev. Microbiol.* **29**, 301 (1975).
- [14] A. D. Grossman, W. E. Taylor, Z. F. Burton und C. A. Gross, *J. Mol. Biol.* **186**, 357 (1985).
- [15] F. C. Neidhardt, R. A. Van Bogelen und V. Vaughn, *Ann. Rev. Genet.* **18**, 295 (1984).
- [16] E. Freese, E. B. Freese, E. R. Allen, Z. Olempska-Bear, C. Orrego, A. Varma und H. Wabiko, in: *Molecular Biology of Microbial Differentiation*. American Soc. Microbiol. (J. A. Hoch und P. Setlow, ed.), p. 194 (1985).
- [17] S. Gottesman, *Ann. Rev. Genet.* **18**, 415 (1984).
- [18] J. M. Sterlini und J. Mandelstam, *Biochem. J.* **113**, 29 (1969).
- [19] M. Hecker, A. Schroeter und F. Mach, *Molec. Genet.* **190**, 355 (1983).
- [20] M. Hecker, H. Mach und F. Mach, *Biochem. Physiol. Pflanzen* **174**, 597 (1979).