

ŠTUDIJ VPLIVA BELJAKOVINE DegU BAKTERIJE *Bacillus subtilis* NA BIOSINTEZO BACITRACINA PRI BAKTERIJI *Bacillus licheniformis*^{‡‡}

Alenka GROŠEL^{a)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

Delo je prispelo 1999-07-07, sprejeto 1999-11-10.

Received July 07, 1999, accepted November 10, 1999.

IZVLEČEK

Peptidni antibiotiki, ki jih sintetizirajo mnogi mikroorganizmi, so strukturno izredno raznoliki. Med njimi je tudi bacitracin, proizvod bakterije *Bacillus licheniformis*. Teh peptidov ne kodirajo geni; njihova biosinteza poteka s pomočjo peptidnih sintetaz. Raven biosinteze bacitracina pozitivno korelira z ravno sinteze alkalne proteinaze. Naš namen je bil dvigniti raven sinteze poznih encimov in posledično s tem tudi raven biosinteze bacitracina. Celice bakterije *B. licheniformis* BA1 smo transformirali z genom *degU* bakterije *B. subtilis*, za katerega smo menili, da je globalni pozitivni regulator v procesih kompetence in sporulacije. Pričakovali smo, da bo povišana koncentracija beljakovine DegU zvišala raven biosinteze bacitracina. Klone rekombiniranih sevov smo analizirali in jim določili proteolizno aktivnost. Pri dveh klonih produkcijskega seva bakterije *B. licheniformis* BA1 smo ugotovili višjo raven proizvodnje peptidnega antibiotika bacitracina.

Ključne besede: mikrobiologija / bakterije / *Bacillus licheniformis* / *Bacillus subtilis* / antibiotiki / biosinteza / bacitracin / encimi / peptidne sintetaze / molekularna genetika / genska regulacija / DegU

THE INFLUENCE OF *Bacillus subtilis* PROTEIN DegU ON BACITRACIN BIOSYNTHESIS IN *Bacillus licheniformis*^{§§}

ABSTRACT

Peptide antibiotics, which are synthesised by many microorganisms, display a great structural diversity. Among them is bacitracin that is produced by the *Bacillus licheniformis*. These peptides are not coded by genes; their biosynthesis takes place with the aid of peptide synthetases. The biosynthesis level of bacitracin has a positive correlation with the level of alkaline proteinase synthesis. Our aim was to raise the level of late enzymes and consequently also the level of bacitracin biosynthesis. We transformed cells from the *B. licheniformis* BA1 using the gene *degU* of the *B. subtilis*, which we believed to be an overall positive regulator in processes of competence and sporulation. We expected that an increased concentration of protein DegU would raise the level of bacitracin biosynthesis. We analysed the clones of the recombinant strains and found them to have proteolytic activity. In two clones of the bacitracin producer *B. licheniformis* BA1 we ascertained a higher level of production of the peptide antibiotic bacitracin.

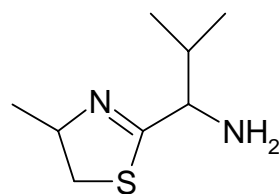
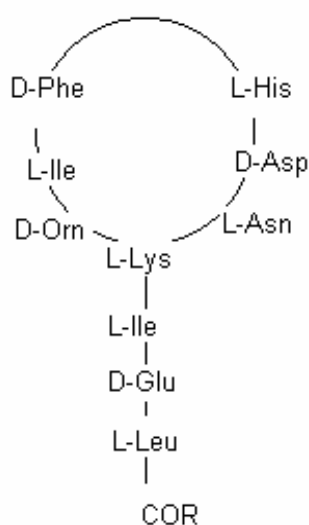
Key words: microbiology / bacteria / *Bacillus licheniformis* / *Bacillus subtilis* / antibiotics / biosynthesis / bacitracin / enzymes / peptide synthetase / molecular genetics / genetic regulation / DegU

^{‡‡}Prispevek je del diplomske naloge (zagovor 10. 06. 1999), mentorica doc.dr. Blagajana Herzog Velikonja.

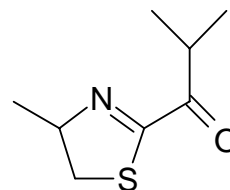
^{§§}The paper is a part of graduation thesis (justification 10. 06. 1999), supervisor: Ass.Prof. Blagajana Herzog Velikonja, Ph.D.

UVOD

Bakterija *Bacillus licheniformis* je mikroorganizem, ki sintetizira peptidni antibiotik bacitracin. Vrsta je dokaj homogena. Celice so ravne paličke in se povezujejo v verižice. Poleg bacitracina sintetizirajo še glutamil polipeptid in levan. V neugodnih pogojih tvorijo endospore. Sinteza bacitracina poteka v fazi, ko se zaključi rast in preden se prične proces sporulacije. V tej fazi se sintetizirajo tudi hidrolizni encimi, njihovo sintezo uravnava mehanizem, v katerega so vpleteni: *degS*, *degU*, *degQ* in *degR*. Beljakovina DegU je regulator odziva. Je aktiven v dveh konformacijah. Zaradi te lastnosti je zanimiv za študij vpliva na biosintezo bacitracina pri bakteriji *Bacillus licheniformis*.



R – pri Bacitracinu A



R – pri Bacitracinu F

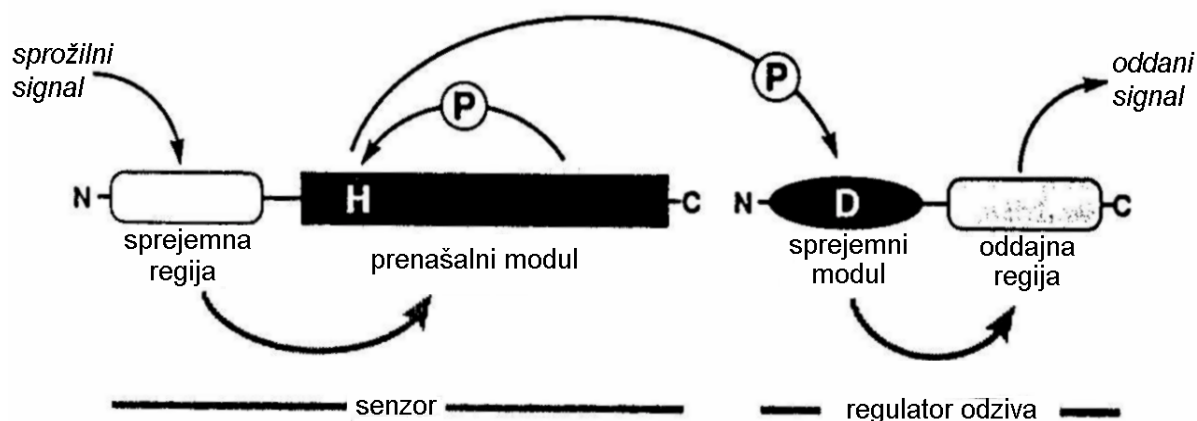
Slika 1. Molekula bacitracina A in F.

Figure 1. Structure of bacitracin A and F molecules (Oka, 1998).

Populacija bakterij *Bacillus licheniformis* v biosinteznem gojišču po izrabi omejujoče komponente (običajno je to vir ogljika ali dušika) in končani fazi rasti preidejo v stacionarno fazo. Med tem prehodom celice sintetizirajo mnoge proizvode kot dodaten vir hranil in za preprečevanje rasti morebitnih tekmecev. Sporulacija je zadnja možnost, ki jo celica izbere. Ključno vlogo pri iniciaciji sporulacije in kompetence imata transkripcijska faktorja ComK za kompetenco in Spo0A za sporulacijo. Prisotna sta že pred pričetkom kompetence ali sporulacije. Izražanje genov za obe beljakovini se poveča v ustreznih pogojih in jo uravnava ena ali več avtoregulatornih zank. Sinteza bacitracina poteka v fazi, ko se zaključi rast in preden se prične proces sporulacije (Azevedo in sod., 1993). Raven biosinteze peptidnega antibiotika bacitracina pozitivno korelira z ravno proizvodnje alkalne proteinaze (Gasparič in sod., 1998).

Sintezo zunajceličnih in znotrajceličnih hidroliznih encimov pri bakteriji *Bacillus subtilis* uravnava mehanizem, ki ga izzove signal (npr. pomanjkanje hranil), vanj pa so vpleteni štirje regulatorni geni: *degS*, *degU*, *degQ* in *degR*. Vplivajo tudi na sposobnost transformacije celic z eksogeno DNK, prisotnost flagelov in proces sporulacije.

Gena *degS* in *degU* tvorita operon. Ta se prepisuje s promotorja, ki ga prepozna σ^A . Promotor se nahaja pred genom *degS*. Beljakovini DegS-DegU tvorita dvokomponentni sistem.



Slika 2. Shema prenosa signala v dvokomponentnem sistemu (Parkinson in Kofoid, 1992).
Figure 2. The "two component" paradigm for sensory signaling via communication modules (Parkinson and Kofoid, 1992).

DegS je histidinska kinaza, ki ima dva aspartatna ostanka (Asp-152 in Asp-168). Ta se povežeta z ATP preko Mg^{2+} iona in sta blizu histidinskega ostanka, ki je verjetno mesto avtofosforilacije. DegS je verjetno citoplazemska beljakovina, ker ne vsebuje nobene hidrofobne regije, odgovorne za povezavo z membrano.

Če se zviša koncentracija DegS, se zviša tudi hitrost defosforiliranja DegU~P, kar pomeni, da ima DegS tudi defosforilacijsko aktivnost. DegU je efektor, ki prav tako vsebuje aspartatne ostanke (Asp-10, Asp-11 in Asp-56) (Parkinson in Kofoid, 1992).

DegU je aktiven v dveh konformacijah:

- fosforiliran inducira izražanje hidroliznih encimov. Fosforilacija bi lahko spremenila konformacijo beljakovine DegU, ki bi lahko deloval kot transkripcijski faktor in se s svojimi regijami za povezavo z DNK vezal pred strukturnimi geni levansaharaze in proteaz. V strukturi DegU beljakovine bi lahko bila dva motiva heliks-obrat-heliks, ki bi omogočala vezavo beljakovine na DNK.
- nefosforiliran sodeluje pri izražanju kompetenčnih genov.

Obe obliki torej delujeta kot pozitivni regulator. Mutante brez ali z okvarjenim *degU* niso sposobne sinteze hidroliznih encimov in kompetence. Sevi, ki niso imeli *degS*, DegU pa se je normalno sintetiziral s promotorja operona, so bili normalno kompetentni, hitrost sinteze hidroliznih encimov pa je bila občutno nižja. Pri sevih, ki nimajo regulatornega sistema *degS-degU*, celice sintetizirajo flagele in sporulirajo. Stvari pa se spremenijo v primeru mutacij *degS(Hy)* in *degU(Hy)*, ko celice lahko sporulirajo v prisotnosti glukoze, vendar pa ne sintetizirajo flagel. Da je temu tako, so dokazali s kloniranjem in izražanjem gena *degU* v bakteriji *Escherichia coli* (Henner in sod., 1988). Regulatorni sistem *degS-degU* in koncentracija saharoze sta odgovorna za izražanje gena *sacB*, ki kodira zunajcelični encim levansaharazo. Pred kodirajočim delom *sacB* je regulatorna regija *sacR*, dolga 400 baznih parov, in zajema promotor in tarčna mesta za specifične in plejotropne regulatorje. Obstajata dve tarčni mesti pred genom *sacB*: prvo je pred promotorjem σ^A , drugo mesto pa je palindromno zaporedje za promotorjem in deluje kot terminator prepisovanja. Isto palindromno mesto pa je tarčno mesto antiterminatorja SacY. Mutacije palindromnega zaporedja povzročijo konstitutivno izražanje *sacB*. Izražanje promotorja je tudi sicer konstitutivno, vendar pa se prepisovanje ustavi pred strukturnim genom, če ni prisotna saharoza. Pod nadzorom DegS-DegU je tudi operon SacY-SacX. SacY je

antiterminator, SacX pa je beljakovina, podobna fosfotransferazam in negativno uravnava izražanje *sacB*. Podobna sta Bgl pri bakteriji *E. coli*. SacY se veže na antiterminatorska zaporedja ribonukleinskih kislin. *In vivo* obstaja v dveh oblikah: fosforiliran in nefosforiliran. Razmerje med oblikama je odvisno od koncentracije saharoze v rastnem mediju. SacX negativno uravnava aktivnost SacY. Na kakšen način, še ni znano. SacX bi lahko bil kinaza, ki bi prenašala fosfatno skupino na SacY (Steinmetz in sod., 1976, Aymerich in Steinmetz, 1987) Ostala dva gena *degQ* in *degR*, ki kodirata manjša polipeptida (46 in 60 aminokislinskih ostankov) sta sicer vpletena v regulacijo pod nadzorom operona DegS-DegU, vendar je njuna vloga še nejasna. Obstaja nekaj dokazov, da izražanje *degQ* uravnava poleg represije z glukozo še dvokomponentni sistem DegS-DegU (Aubert in sod., 1985, Yang in sod., 1986, Kunst in sod., 1988, Stock in sod., 1989, Zukowski in sod., 1990, Msadek in sod., 1990, Tanaka in sod., 1991, Dahl in sod., 1991, Klier in sod., 1992, Idelson in Amster-Choder, 1998) Kljub temu pa koncentracija Spo0A~P še vedno ni dovolj visoka, da bi aktivirala prepisovanje genov *spoII*. Ta vmesna raven koncentracij Spo0A~P in AbrB je verjetno najugodnejša za razvoj kompetence prav zaradi pozitivne in hkrati negativne uravnave z AbrB. Za aktivacijo prepisovanja *spoII* mora koncentracija Spo0A preseči višji prag. Ko se to zgodi, steče prepisovanje genov *spoII*. Kompetenca je zavirana, ker je koncentracija AbrB prenizka in SinR inhibiran s SinI. Visoka koncentracija Spo0A~P se vzdržuje s pozitivno avtoregulatorno zanko (Grossman, 1995).

MATERIAL IN METODE

Bakterijski sevi

sev	genotip	vir
<i>Bacillus licheniformis</i> BA1	produkcijski sev	(KRKA)
<i>Bacillus licheniformis</i> BA1	Km ^R (pBD1834)	(KRKA)

Plazmid

pBD1834 *his, leu, met* (pin40/PCR *degU* (*HindIII*)) (v raziskovalne namene daroval prof. I. Smith)

Protoplaste bakterijskih sevov *Bacillus licheniformis* BA1 smo transformirali s pBD1834. V biosinteznem gojišču smo nato merili biosintezni potencial. Določali smo aktivnost alkalne proteinaze in vsebnost bacitracina.

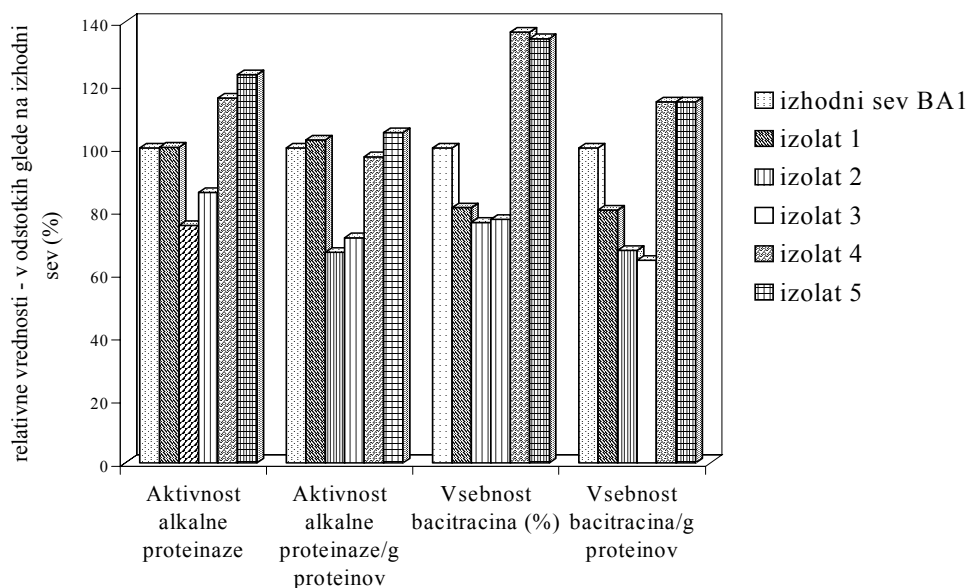
REZULTATI IN DISKUSIJA

Med meritvami biosinteznega potenciala smo dobili obetavne rezultate. Poskuse smo ponovili trikrat.

Celice bakterije *Bacillus licheniformis* BA1 smo uspešno transformirali s plazmidom pBD1834. Kot smo pričakovali, so bile transformirane celice odporne proti antibiotiku kanamicinu. Pri bakteriji *Bacillus subtilis* beljakovina DegU v nefosforilirani konformaciji spodbuja kompetenco, kar posledično povzroči izgubo gibljivosti, celice proizvajajo manj hidrolitičnih encimov in manj avtolizina.

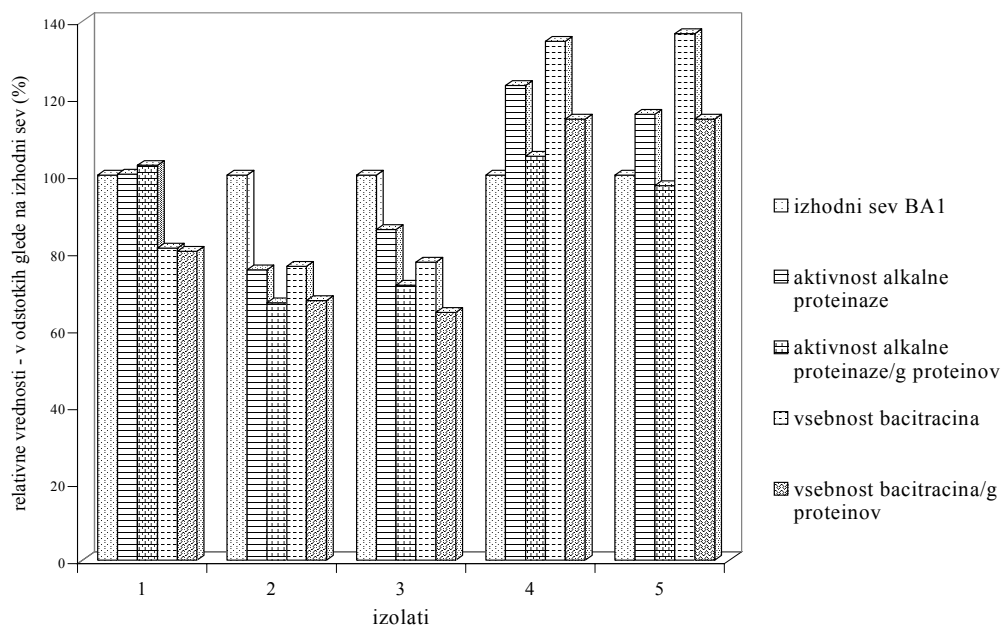
Gojenje sevov v biosinteznem gojišču:

– erlenmajerice



Graf 1. Biosintezni potencial rekombiniranih sevov bakterije *Bacillus licheniformis* BA1 v biosinteznem gojišču (1.sarža).

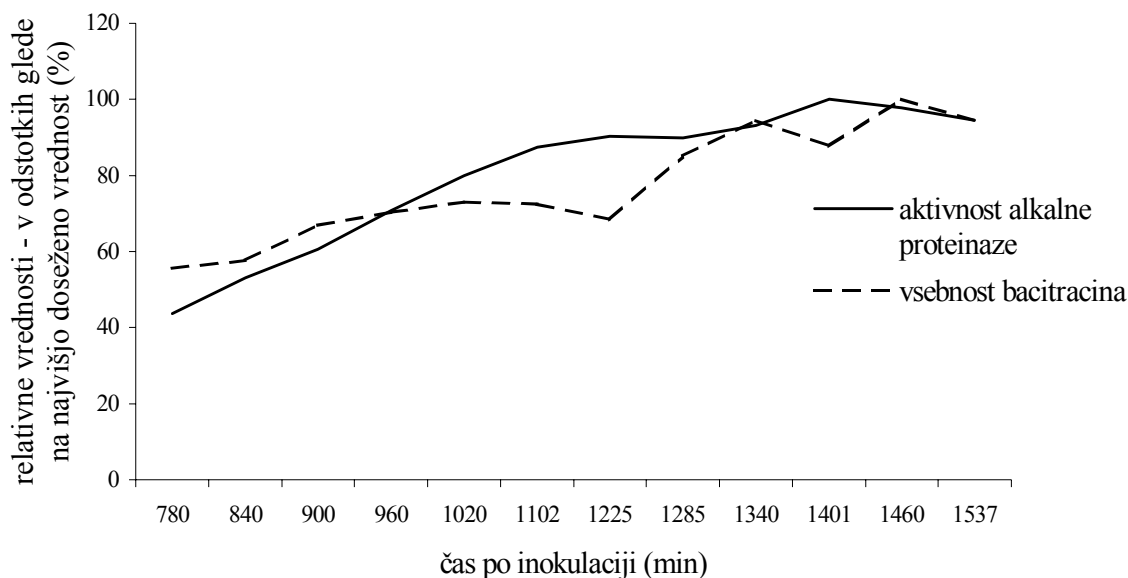
Graph 1. Biosynthesis potential of recombinant strains of *Bacillus licheniformis* BA1 in biosynthetic media (1st batch).



Graf 2. Primerjava biosinteznih potencialov med izolati rekombiniranega seva bakterije *Bacillus licheniformis* BA1 pBD1834 v biosinteznem gojišču (1.sarža).

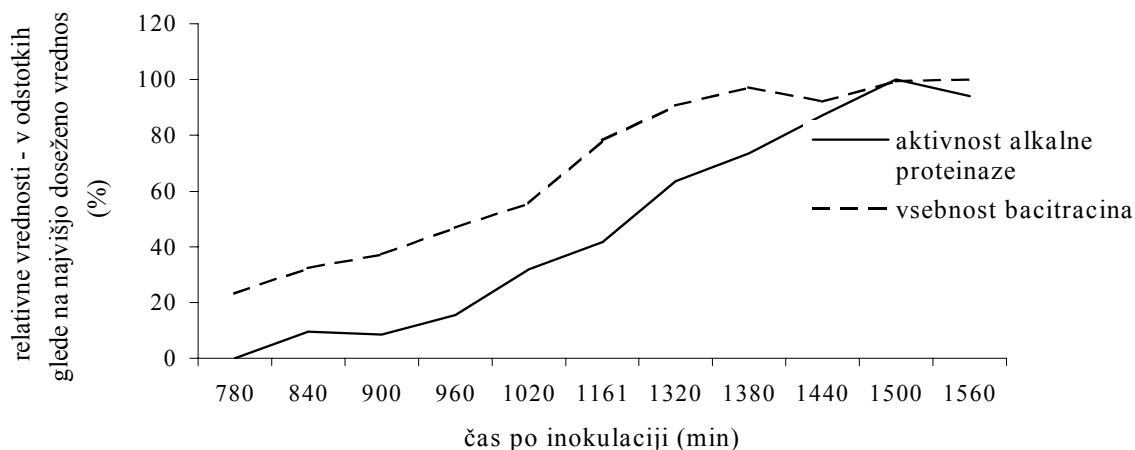
Graph 2. Comparison of biosynthesis potentials of the isolates of *Bacillus licheniformis* BA1 pBD1834 recombinant strain in biosynthetic media (1st batch).

– v bioreaktorju



Graf 3. Biosintezni potencial seva bakterije *B. licheniformis* BA1 v bioreaktorju (1. sarža).

Graph 3. Biosynthesis potential of *Bacillus licheniformis* BA1 strain in bioreactor. (1st batch).



Graf 4. Biosintezni potencial seva bakterije *Bacillus licheniformis* BA1 pBD1834 (izolat 5) v bioreaktorju (1. sarža).

Graph 4. Biosynthesis potential of *Bacillus licheniformis* BA1 pBD1834 recombinant strain (isolate 5) in bioreactor (1st batch).

BIOSINTEZNI POTENCIAL SEVOV BAKTERIJE *Bacillus licheniformis*

V biosinteznem gojišču po gojenju v erlenmajericah

V biosinteznem gojišču so se pokazale razlike med posameznimi izolati. Aktivnost alkalne proteinaze pri bakteriji *B. licheniformis* BA1 pBD1834 je bila pri treh izolatih višja od aktivnosti pri izhodnem sevu, vsebnost bacitracina pa je bila višja le pri dveh izolatih. Ko smo poskus ponovili, smo dobili nižje rezultate pri vsebnosti bacitracina in aktivnosti alkalne proteinaze.

Izjema je bil le izolat št. 5, ki je imel že pri prejšnjih meritvah višje vrednosti. Gen *degU* je na plazmidu pBD1834. Ugotoviti moramo, če se je med gojenjem v biosinteznem gojišču plazmid obdržal v celici brez selekcijskega pritiska, oziroma če se je integriral v kromosom.

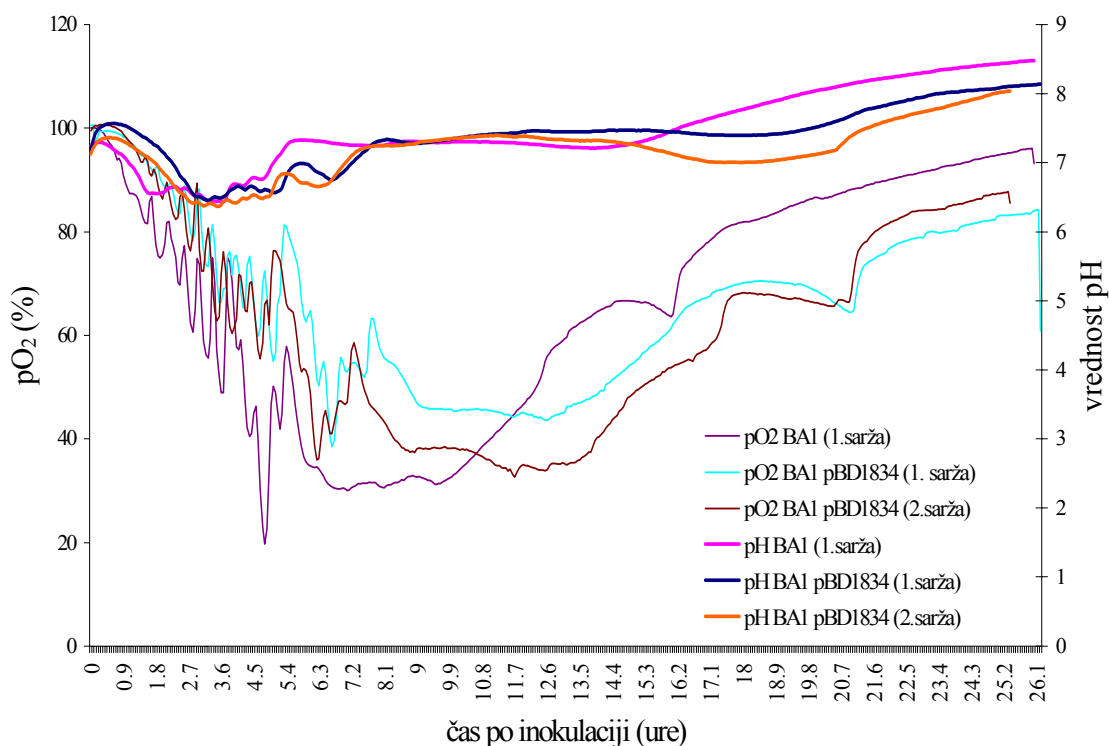
Po gojenju bakterije *B. licheniformis* BA1 pBD1834 izolata 5 v bioreaktorju smo ugotovili, da je bila aktivnost alkalne proteinaze ob istem času v primerjavi z izhodnim sevom nižja, vsebnost bacitracina pa je bila približno enaka. Kot kaže, se biosinteza bacitracina pričela pri rekombiniranem sevu kasneje, vendar pa je bila le-ta intenzivnejša.

Verjetno smo povečali število kopij gena *degU*, s tem pa tudi koncentracijo beljakovine DegU v celici. Le-ta deluje kot globalni regulator. Če je bilo molekul DegU preveč, jih DegS ni mogel fosforilirati. Samo fosforiliran DegU je namreč sposoben inducirati izražanje hidroliznih encimov.

Torej je morala celica pred vstopom v fazo biosinteze bacitracina sintetizirati tudi več beljakovine DegS in s tem povečati njeno koncentracijo v celici in sposobnost fosforiliranja DegU. S tako hipotezo lahko razložimo, zakaj je prišlo do daljše faze lag v primeru rekombiniranih sevov pri gojenju v bioreaktorju in nato do nenadnega povišanja biosinteze bacitracina in večje aktivnosti alkalne proteinaze.

Podoben odziv smo zasledili tudi pri meritvah vrednosti pH in pO₂ med procesom biosinteze v bioreaktorju.

Gen *degU* je v plazmidu pBD1834 in izvira iz bakterije *B. subtilis*. Verjetno ni popolnoma identičen genu *degU*, ki je v kromosomu bakterije *B. licheniformis*. Za verodostojne rezultate bi morali poskus ponoviti s povečanim številom kopij liheniformisovega gena *degU*. Seveda bi morali vzpostaviti tudi zelo stabilen gostiteljski sistem. Tega pa bi lahko vzpostavili z uporabo drugega plazmida, in sicer bi morali uporabiti plazmid, ki je prisoten v celici v večjem številu kopij in se podvaja na način "theta" – brez enovrvičnih intermediatov plazmidne DNK.



Graf 5. Vrednosti pH in pO₂ med procesom biosinteze bacitracina v bioreaktorju.

Graph 5. Values of pH and pO₂ during the biosynthesis of bacitracin in bioreactor.

POVZETEK

Celice bakterije *B. licheniformis* sintetizirajo peptidni antibiotik bacitracin. Njegova sinteza se prične, ko se zaključi rast populacije celic, in pred začetkom faze sporulacije. Biosinteza tega antibiotika pozitivno korelira z ravno sintezo hidroliznih encimov. V uravnavanje le-teh so vpleteni produkti genov *degS*, *degU*, *degR* in *degQ*. Beljakovini DegS in DegU sestavljata dvokomponentni sistem, ki je vpleten v izražanje hidroliznih encimov in izražanje kompetenčnih genov. S transformacijo gena *degU* bakterije *B. subtilis* v celice bakterije *B. licheniformis* smo povečali število kopij tega gena v celicah *B. licheniformis*. Zaradi tega smo pričakovali višjo raven biosinteze bacitracina in poznih encimov.

Celice niso sporulirale in so ohranile gibljivost. Višja koncentracija DegU je povzročila višjo raven biosinteze bacitracina pri izolatih 4 in 5 produkcijskega seva bakterije *B. licheniformis* BA1, kjer je bila vsebnost bacitracina tudi 140%, v primerjavi z izhodnim sevom.

Študije vpliva beljakovine DegU na biosintezo bacitracina bomo nadaljevali z izolacijo mutiranih sevov bakterije *B. licheniformis*, ki nimajo gena *degU*. Uporabili bomo plazmid z večjim številom kopij na celico; celice *B. licheniformis* bomo transformirali z lastnim genom *degU*. V takem sistemu bomo pomnožili gen *degU* in ustvarili mutante *Hy* s pomočjo produktov PCR.

ZAHVALA

Zahvaljujem se delovnemu mentorju **dr. Alešu Gaspariču** za nesebično pomoč, dragocene napotke in predloge v zvezi s praktično izvedbo diplomske naloge in za kritične pripombe vsebinske narave, ki so mi pomagale pri oblikovanju končne oblike diplomskega dela.

VIRI

- Aubert, E./ Klier, A./ Rapoport, G. Cloning and Expression in *Escherichia coli* of the Regulatory *sacU* Gene from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 161(1985), 1182-1187.
- Aymerich, S./ Steinmetz, M. Cloning and Preliminary Characterization of the *sacS* Locus from *Bacillus subtilis* Which Controls the Regulation of the Exoenzyme Levansucrase. *Molecular & General Genetics*, 208(1987), 114-120.
- Azevedo, E. C./ Rios, E. M./ Fukushima, K./ Campos-Takaki, G. M. Bacitracin Production by a New Strain of *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 42(1993), 1-7.
- Claus, D./ Berkeley, R. C. W. Genus *Bacillus* Cohn 1872. V: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Eds.: Krieg, N. R./ Holt, J. G.). Baltimore, London, Williams & Wilkins, 1(1984), 1104-1133.
- Dahl, M. K./ Msadek, T./ Kunst, F./ Rapoport, G. Mutational Analysis of the *Bacillus subtilis* DegU Regulator and its Phosphorylation by the DegS Protein Kinase. *Journal of Bacteriology*, 173(1991), 2539-2547.
- Dubnau, D. Genetic Competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiological Reviews*, 55(1991), 395-424.
- Feher, V. A./ Tzeng, Y./ Hoch, J. A./ Cavanagh, J. Identification of Communication Networks in Spo0F: a Model for Phosphorylation-induced Conformational Change and Implications for Activation of Multiple Domain Bacterial Response Regulators. *FEBS Letters*, 425(1998), 1-6.
- Gasparič, A./ Grošel, A./ Dular, T./ Sladič, G./ Radež, I./ Mandič Mulec, I. The Influence of *Bacillus subtilis* Proteins DegU, SinR and SinR on Bacitracin Biosynthesis in *Bacillus licheniformis*. *Zb. Biotehniške fak. Univ. v Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika*, 72(1998), 37-42.
- Glenn, A. R./ Mandelstam, J. Sporulation in *Bacillus subtilis* 168. Comparison of Alkaline Phosphatase from Sporulating and Vegetative Cells. *Biochemical Journal*, 123(1971), 129-138.
- Grossman, A. D. Genetic Networks Controlling the Initiation of the Sporulation and the Development of Genetic Competence in *Bacillus subtilis*. *Annual Review of Genetics*, 29(1995), 477-508.
- Hahn, J./ Luttinger, A./ Dubnau, D. Regulatory Inputs for the Synthesis of ComK, the Competence Transcription Factor of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 21(1996), 763-775.
- Henner, D. J./ Yang, M./ Ferrari, E. Localization of *Bacillus subtilis* *sacU*(*Hy*) Mutations to Two Linked Genes with Similarities to the Conserved Prokaryotic Family of Two-Component Signalling Systems. *Journal of Bacteriology*, 170(1988), 5102-5109.

- Idelson, M./ Amster-Choder, O. SacY Transcriptional Antiterminator from *Bacillus subtilis*, is Regulated by Phosphorylation *in vivo*. *Journal of Bacteriology*, 180(1998), 660-666.
- Ishihara, H./ Hara, N./ Iwabuchi, T. Molecular Cloning and Expression in *Escherichia coli* of the *Bacillus licheniformis* Bacitracin Synthetase 2 Gene. *Journal of Bacteriology*, 17(1989), 1705-1711.
- Klier, A./ Msadek, T./ Rapoport, G. Positive Regulation in the Gram-positive Bacterium: *Bacillus subtilis*. *Annual Review of Microbiology*, 46(1992), 429-459.
- Konz, D./ Klens, A./ Schörgendorfer, K./ Marahiel, M. A. The Bacitracin Biosynthesis Operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: Molecular Characterization of Three Multi-modular Peptide Synthetases. *Chemistry & Biology*, 4(1997), 927-937.
- Kunst, F./ Debarbouille, M./ Msadek, T./ Young, M./ Mauel, C./ Karamata, D./ Klier, A./ Rapoport, G./ Dedonder, R. Deduced Polypeptides Encoded by the *Bacillus subtilis* *sacU* Locus Share Homology with Two-component Sensor-Regulator Systems. *Journal of Bacteriology*, 170(1988), 5093-5101.
- Lowry, O. H./ Rosebrough, N. H./ Farr, A.L./ Randall, R. J. Protein Measurement with the Folin phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1951), 265-275.
- Marahiel, M. A./ Stachelhaus, T./ Mootz, H. D. Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chemical Reviews*, 97(1997), 2651-2673.
- Mootz, H. D./ Marahiel, M. A. Biosynthetic Systems for Nonribosomal Peptide Antibiotic Assembly. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1(1997), 543-551.
- Msadek, T./ Kunst, F./ Henner, D./ Klier, A./ Rapoport, G./ Dedonder, R. Signal Transduction Pathway Controlling Synthesis of a Class of Degradative Enzymes in *Bacillus subtilis* and Analysis of Mutations in *degS* and *degU*. *Journal of Bacteriology*, 172(1990), 824-834.
- Oka, H. Bacitracins. *Journal of Chromatography A*, 812(1998), 35-52.
- Parkinson, J. S./ Kofoid, E. C. Communication Modules in Bacterial Signaling Proteins. *Annual Review of Genetics*, 26(1992), 71-112.
- Pavli, V./ Sokolić, M. Comparative Determination of Bacitracin by HPLC and Microbiological Methods in some Pharmaceuticals and Feed Grade Preparations. *Journal of Liquid Chromatography*, 13(1990), 303-318.
- Perego, M. A Peptide Export-import Control Circuit Modulating Bacterial Development Regulates Protein Phosphatases of the Phosphorelay. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 94(1997), 8612-8617.
- Prágai, Z./ Holczinger, A./ Sík, T. Transformation of *Bacillus licheniformis* Protoplasts by Plasmid DNA. *Microbiology*, 140(1994), 305-310.
- Promega, Instructions for use LambdaGEM[®] - 12 Xho I Half -Site Arms Plus Packagene[®] System. 1989, Cat.#B2110, Technical Bulletin, 77, 1-16.
- Promega, Wizard[™] DNA Clean-Up System, Cat.#A7280, Instructions for use.
- Sambrook, J./ Fritsch, E.F./ Maniatis, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), 1-38.
- Schneider, A./ Marahiel, M. A. Genetic Evidence for a Role of Thioesterase Domains, Integrated in or Associated with Peptide Synthetases, in Non-ribosomal Peptide Biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Archives of Microbiology*, 169(1998), 404-410.
- Simon, D./ Chopin, A. Construction of a Vector Plasmid Family and Its Use for Molecular Cloning in *Streptococcus lactis*. *Biochimie*, 70(1988), 559-566.
- Stein, T./ Vater, J./ Kruft, V./ Otto, A./ Wittmann-Liebold, B./ Franke, P./ Panico, M./ McDowell, R./ Morris, H. R. The Modular Carrier Model of Nonribosomal Peptide Biosynthesis at Modular Multienzymatic Templates. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(1996), 15428-15435.
- Steinmetz, M./ Kunst, F./ Dedonder, R. Mapping Mutations Affecting Synthesis of Exocellular Enzymes in *Bacillus subtilis*. *Molecular & General Genetics*, 148(1976), 281-285.
- Stock, J./ Ninfa, A. J./ Stock, A. M. Protein Phosphorylation and Regulation of Adaptive Responses in Bacteria. *Microbiological Reviews*, 53(1989), 450-490.
- Tanaka, T./ Kawata, M. Cloning and Characterization of *Bacillus subtilis* *iep*, which has Positive and Negative Effects on Production of Extracellular Proteases. *Journal of Bacteriology*, 170(1988), 3593-3600.
- Tanaka, T./ Kawata, M./ Mukai, K. Altered Phosphorylation of *Bacillus subtilis* DegU Caused by Single Amino Acid Changes in DegS. *Journal of Bacteriology*, 173(1991), 5507-5515.
- Von Döhren, H./ Keller, U./ Vater, J./ Zocher, R. Multifunctional peptide Synthetases. *Chemical Reviews*, 97(1997), 2675-2705.
- Yang, M./ Ferrari, E./ Chen, E./ Henner, D. J. Identification of the Pleiotropic *sacQ* Gene of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 166(1986), 113-119.
- Zukowski, M. M./ Miller, L./ Cosgwell, P./ Chen, K./ Aymerich, S./ Steinmetz, M. Nucleotide Sequence of the *sacS* Locus of *Bacillus subtilis* Reveals the Presence of Two Regulatory Genes. *Gene*, 90(1990), 153-155.