

Diss. ETH 5595

**Isolierung und Charakterisierung
des Exosporiums von
Bacillus thuringiensis
und seine Beziehung zum Proteinkristall**

ABHANDLUNG

zur Erlangung
des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

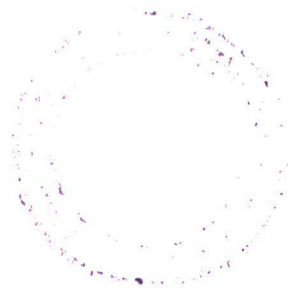
vorgelegt von

PETER SCHERRER
dipl. Natw. ETHZ
geboren am 6. Juni 1947
von Egnach (Kt. Thurgau)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. L. Ettliger, Referent
Prof. Dr. H. Zuber, Korreferent

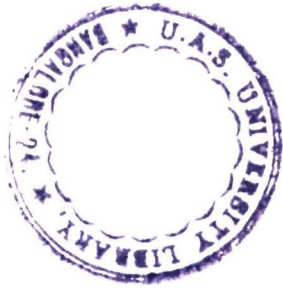
Juris Druck + Verlag Zürich
1975

UNIVERSITY OF MUMBAI
LIBRARY
2000
ADD. NO.
CL. NO.



ISBN 3 260 04081 1

Meinen lieben Eltern



INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	6
2	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1	Organismen	9
2.2	Nährmedien und Züchtungsbedingungen	9
2.3	Gewinnung und Reinigung des Sporenmateri- als	10
2.3.1	Trennung der Sporen und Kristalle von vegetativen Zellen und Zelltrümmern	11
2.3.2	Trennung der Sporen von den Kristallen	11
2.4	Isolierung des Exosporiums	12
2.5	Dichtebestimmung im Cäsiumchlorid - Gradienten	13
2.6	Bestimmung der Toxinaktivität	14
2.7	Bestimmung des Proteingehaltes	16
2.8	Bestimmung des Trockengewichtes	16
2.9	Extraktionsmittel	16
2.9.1	Universal - Puffer nach ELLIS	16
2.9.2	Mischkombinationen von Harnstoff, Mercaptoäthanol Natriumdextransulfat und Natronlauge	17
2.9.3	Clelands Reagens	17
2.9.4	Glycerin - Natriumdextransulfat - Mercaptoäthanol	17
2.9.5	Phenol - Essigsäure - Wasser	18
2.9.6	Butanol	18
2.9.7	Phenol	18
2.9.8	Extraktion nach Hydrolyse mit Darmsaft	18
2.9.9	Extraktion nach Hydrolyse mit Trypsin	19
2.10	SDS - Gel - Elektrophorese	19
2.11	Elektronenmikroskopie	20
2.12	Methoden zur serologischen Charakterisierung von Proteinen	20
2.12.1	Herstellung von Antiseren	20
2.12.2	Doppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY	22
2.12.3	Quantitative Immunopräzipitation	23
2.13	Exosporium- und Kristallantigenbildung während der Sporulation	23

2.14	Methoden für radioaktive Einbauversuche	25
2.15	Analysen	26
2.15.1	Aminosäurenanalyse	26
2.15.2	Bestimmung von Dipicolinsäure, Phosphor, Kohlenhydraten und Nukleinsäuren	27
2.15.3	Lipide	27
2.15.4	Phospholipide	29
2.16	Alkylierung der SH-Gruppen von Cystein mit ^{14}C -Jodessigsäure	30
2.17	Chemikalien	30
3	RESULTATE	32
3.1	Isolation und Dichtebestimmung der Membranfraktionen	32
3.2	Verteilung des Toxins in den Fraktionen des CsCl - Gradienten	37
3.3	Verteilung des Toxins in den Sporenfraktionen	39
3.4	Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Sporen und den Membranfraktionen F_1 und F_2	41
3.5	Die Proteine der Membranfraktionen F_1 und F_2	46
3.5.1	Extraktion der Membranproteine und deren gelelektrophoretische Charakterisierung	48
3.5.2	Extraktion von aktivem Toxin	52
3.6	Immunologische Charakterisierung der Membranfraktionen F_1 und F_2	53
3.6.1	Quantitative Immunopräzipitation	53
3.6.2	Doppeldiffusionsreaktionen	58
3.6.3	Einfluss der Antiseren auf die Aktivität des Kristalltoxins	63
3.7	Exosporium - und Kristallantigenbildung	65
3.8	Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren	67
3.9	Analyse des Exosporiums	70
3.9.1	Aminosäurenanalyse	71
3.9.2	Die Lipide der Fraktionen F_1 und F_2	73
4	DISKUSSION	75
5	ZUSAMMENFASSUNG	82
6	LITERATUR	83

1 EINLEITUNG

Das wichtigste Bakterium für die biologische Insektenbekämpfung ist Bacillus thuringiensis (ANGUS, 1968 und 1971). Dieser Organismus bildet mehrere gegen Insekten aktive Agenzien, deren Produktion von Stamm zu Stamm variiert und auch von den Kulturbedingungen abhängig ist (DULMAGE, 1970 und 1971; SCHERRER et al., 1973). Die B. thuringiensis-Toxine sind von HEIMPEL (1967) wie folgt bezeichnet worden:

α -Exotoxin, Phospholipase C

β -Exotoxin, ein hitzestabiles Toxin, dessen Struktur und Wirkung im Detail von BOND et al. (1971) und SOMERVILLE (1973) diskutiert wurde

γ -Exotoxin, eine nicht identifizierte Phospholipase

δ -Endotoxin, Toxin des kristallinen Parasporalkörpers

Das δ -Endotoxin zeichnet sich durch seine spezifische Wirkung gegen Lepidopteren aus und scheint keine Wirkung auf andere Organismen zu haben. Das Wirkungsspektrum ist von BURGERJON und MARTOURET (1971) beschrieben worden. Kürzlich wurde jedoch auch eine antitumorale Wirkung des δ -Endotoxins behauptet (PRASAD und SHETHNA, 1974).

B. thuringiensis ist mit B. cereus nahe verwandt (KRIEG, 1968). Einige Stämme von B. thuringiensis und B. cereus haben gemeinsame Sporenantigene, und zudem ist ein Phage bekannt, der zwischen diesen beiden Organismen kreuzreagiert (NORRIS, 1961). Der augenfälligste Unterschied zwischen den beiden Organismen ist der bei B. thuringiensis während der Sporulation neben der Endospore gebildete Parasporalkörper. Dieser Parasporalkörper wurde zuerst von BERLINER (1915) und später von HANNAY (1953) entdeckt. Er besitzt die Form eines rhomboedrischen Kristalls (HANNAY, 1956) und besteht zum grössten Teil, wenn nicht vollständig, aus Proteinen (HANNAY und FITZ-JAMES, 1955; HOLMES und MONRO, 1965). ANGUS (1954 und 1956) demonstrierte den direkten Zusammenhang zwischen dem Proteinkristall und der insektenpathogenen Wirkung. Die

Synthese des Proteinkristalls erfolgt gleichzeitig mit der Sporenbildung und scheint mit dieser gekoppelt zu sein (YOUNG und FITZ-JAMES, 1959). Bei suboptimalen Temperaturen (z. B. 12^o C, SMIRNOFF, 1963) sowie nach Zugabe einer bestimmten Menge Erythromycin (ARESCALDINO, 1969) werden wohl Parasporalkörper, aber keine intakten Sporen gebildet. Ausserdem sind Mutanten bekannt, die Kristalle bilden, ohne den Sporulationszyklus vollständig zu durchlaufen (RIBIER und LECADET, 1973; SOMERVILLE, 1971; LUETHY und ANKWANDA, unpubl.).

Die Bildung des Proteinkristalls beginnt zwischen den Sporulationsstadien (definiert von MURRELL, 1967) II und III (LECADET und DEDONDER, 1971; RIBIER und LECADET, 1973). Der Kristall wird zum grössten Teil "de novo" aus Aminosäuren synthetisiert, die beim Abbau von intracellulären Proteinen während des "protein turnover" der ersten Sporulationsphasen entstehen (MONRO, 1961 a + b).

Die Struktur des Parasporalkörpers wurde im Elektronenmikroskop von LABAW (1964), NORRIS und WATSON (1960), NORRIS (1969 und 1971) sowie von HOLMES und MONRO (1965) durch Röntgendiffraktion eingehend untersucht. Die kristalline Natur ist von allen bestätigt und schliesslich eine Einheitszelle von 47 Å x 120 Å bestimmt worden. Der Kristall liegt mit der Spore zusammen innerhalb des Sporangiums, aber ausserhalb des Exosporiums. Nur bei B. finitimus, als einziger Ausnahme, liegt der Kristall innerhalb des Exosporiums (NORRIS, 1970; SOMERVILLE et al., 1971).

DELAFIELD et al. (1968) und SOMERVILLE et al. (1968 und 1970) zeigten eine biochemische und immunologische Beziehung zwischen Kristallproteinen und einer Proteinfraction, die mit kristalllösenden Reagenzien aus Sporen extrahiert werden konnte. Diese Resultate wurden von LECADET und DEDONDER (1971) und LECADET et al. (1972) bestätigt. Kürzlich gelang es SHORT et al. (1974), Kristallantigene in der Sporenwand und im Exosporium nachzuweisen. Mit kristalllösenden Reagenzien konnte Insektentoxin aus den Sporen von B. thuringiensis und B. cereus extrahiert werden (SOMERVILLE und POCKETT, 1975).

Dünnschnitte durch sporulierende Zellen von B. thuringiensis zeigten, dass der noch nicht vollständig synthetisierte Kristall am Exosporium angelagert ist (SOMERVILLE und JAMES, 1970; SOMERVILLE, 1971). Auch in kristallbildenden sporennegativen Mutanten wird das Exosporium ausgebildet. Es bleibt während der ganzen Kristallsynthese am Kristall angelagert und wird schliesslich lysiert (SOMERVILLE, unpubl.). Ueber die Funktion des Exosporiums, das während der Sporulation innerhalb der Bakterienzelle gebildet wird (HANNAY, 1956; CHAPMAN, 1956; NORRIS und WATSON, 1960) und bei B. cereus einen kristallinen Aufbau der Basalmembran aufweist (GERHARDT und RIBI, 1964), ist sehr wenig bekannt.

Während der Sporulation wurden keine löslichen Antigene gefunden (MONRO, 1961 a); NORRIS, 1969), und die Aufnahme radioaktiver Aminosäuren in die Kristalle erfolgte gleichzeitig mit der Bildung von Kristallantigenen (SOMERVILLE, 1971). ARONSON (1965) fand in sporulierenden Zellen eine membrangebundene RNS-Fraktion. Er nahm an, dass es sich um einen stabilen Messenger für die Synthese der Sporenhülle handelt. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass das Exosporium als Basis für die Zusammenlagerung der Proteineinheiten zum Kristall dient und möglicherweise auch für die Synthese des Kristalls und der Sporenhülle verantwortlich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Exosporium isoliert sowie charakterisiert, ferner seine Zusammensetzung und vor allem die Beziehung zum Kristall und dem Endotoxin geprüft.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Organismen

Als Ausgangsstamm diente Bacillus thuringiensis var. tolworthi Serotyp 9 (S-9). Durch direkte Selektion wurde ein Streptomycin-resistenter Stamm erhalten (SOMERVILLE, 1971) und davon durch Behandlung mit N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin ein akristallogener Stamm mit konventionellen Methoden isoliert. Diese Mutante wird im Weiteren als Bacillus thuringiensis HB 9-1 bezeichnet. Beide Stämme wurden freundlicherweise von H. Somerville, Shell Research, Sittingbourne, England, zur Verfügung gestellt. Die Stämme wurden als Sporen auf Schrägagar (Nähragar Oxoid) bei 4° C aufbewahrt.

2.2 Nährmedien und Züchtungsbedingungen

Alle Medien wurden mit entionisiertem Wasser hergestellt und im Autoklaven während 20 Minuten bei 120° C sterilisiert. Zur Gewinnung des Sporenmateri- als wurde in der Regel Oxoid Nähragar (28 g/1000 ml) mit den Zusätzen von 10 ml 8%igem Calciumchlorid und 10 ml 5%igem Manganchlorid ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) pro Liter verwendet, wobei die Zusätze separat sterilisiert und erst nach dem Abkühlen auf 50° C zugegeben wurden. Dann wurde das Medium in Petrischalen oder Agarflaschen gegossen.

In einzelnen, speziell erwähnten Fällen, wurde das Vollmedium nach YOSTEN und ROGOFF (1969) jedoch mit 0,3 % Glucose (Rogoff-Medium) verwendet. Dabei wurde in Erlenmeyerkolben auf einer rotierenden Schüttelmaschine gezüchtet.

Zur Herstellung von ^{32}P markierten Sporen wurden zu 200 ml Oxoid Nähragar 0,2 ml ^{32}P markiertes Orthophosphat (2 mCi) zugegeben, zusammen autoklaviert und vor dem Giessen in Petrischalen Calciumchlorid und Manganchlorid wie oben erwähnt, beigelegt.

Für das Studium von Sporulationsvorgängen (Antigenbildung, Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren) wurden die Zellen in einem 2-Liter Tischfermenter in einem Liter Medium gezüchtet. Dieses Medium hatte folgende Zusammensetzung (NORRIS, 1969):

	g/l
Lab Lemco broth (Oxoid)	3,2
Pepton (Difco)	4,8
KNO ₃	7,5
Na ₂ SO ₄ · 7H ₂ O	0,16
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0,0017
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,015
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,12
KH ₂ PO ₄	102
KOH	4,95

Das pH betrug 6,1.

Apparat und Methode sind von NORRIS und Mitarbeitern (1970) beschrieben worden. Das Wachstum wurde durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei 660 nm bestimmt.

Alle Medien wurden mit wachsenden Zellen in der späten exponentiellen Phase aus einer mit Sporen angeimpften Vorkultur in "nutrient broth"(Oxoid) beimpft und bei 30⁰ C inkubiert. Die Inkubationszeit im Flüssigmedium betrug 2-3 Tage, auf Nähragar 4-5 Tage.

2.3 Gewinnung und Reinigung des Sporenmaterials

Die sporulierten Zellen wurden mit eisgekühltem 0,02 M K-K-Phosphatpuffer pH 7,1 und 0,01 % Triton X-100 von der Agaroberfläche gewaschen, zentrifugiert (15 Minuten mit 10'000 x g) und 3 x mit Puffer gewaschen. Die folgenden Trennschritte wurden alle mit eiskalten Lösungen im Kühlraum ausgeführt, um das Auskeimen der Sporen zu verhindern.

2.3.1 Trennung der Sporen und Kristalle von vegetativen Zellen und Zelltrümmern

Die Trennung erfolgte in dem von SACKS und ALDERTON (1961) entwickelten 2-Phasensystem X.

10,56 g Polyäthylenglycol 4000 wurden in 30 ml 0,02 M K-K-Phosphatpuffer pH 7,1 mit 0,01 % Triton X-100 aufgelöst, 33,9 ml 3 M K-K-Phosphatpuffer pH 7,1 hinzugefügt und das Volumen mit 0,02 M Phosphatpuffer-Triton auf 90 ml eingestellt. Ca. 2 g Zellen (Nassgewicht) wurden in 10 ml 0,02 M Phosphatpuffer-Triton resuspendiert und zusammen mit dem obigen Gemisch in einem Scheidetrichter kräftig geschüttelt. Die obere Phase enthält die Sporen und Kristalle, die untere vegetative Zellen, Zelltrümmer und keimende Sporen. Die untere Phase wurde entfernt und mit dem gleichen Volumen separat hergestellter unterer Phase die obere 5-10 x extrahiert, bis unter dem Mikroskop keine vegetativen Zellen mehr sichtbar waren. Dann wurde die obere Phase mit 0,02 M Phosphatpuffer-Triton 1:2 verdünnt, zentrifugiert und der Niederschlag 3 x mit 0,02 M Phosphatpuffer-Triton gewaschen. Die Sporen der Mutante HB 9-1 wurden anschliessend noch 3 x mit destilliertem Wasser gewaschen und dann gefriergetrocknet.

2.3.2 Trennung der Sporen von den Kristallen

Diese Trennung wurde im wesentlichen nach der Methode von DELAFIELD et al. (1968) in einem 2-Phasensystem mit Polyäthylenglycol und Natriumdextransulfat durchgeführt.

7,3 g Polyäthylenglycol 6000 wurden in 80 ml 0,02 M K-K-Phosphatpuffer pH 7,1 mit 0,01 % Triton X-100 aufgelöst und mit 1,8 ml 3 M K-K-Phosphatpuffer pH 7,1 und 4 g Natriumchlorid versetzt. Diesem Gemisch wurden zuerst 58 g einer 20 %igen (G/V) wässrigen Natriumdextransulfat 500 - Lösung und anschliessend die in 20 ml 0,02 M Phosphatpuffer-Triton resuspendierten Sporen und Kristalle (ca. 10^9 Sporen/ml) zugegeben und in einem Scheidetrichter kräftig geschüttelt.

Die Polyäthylenglycol - reiche obere Phase enthält ausschliesslich Sporen, die Natriumdextransulfat - reiche untere Phase neben den Proteinkristallen auch noch einen Teil der Sporen. Die obere Phase wurde entfernt und die untere mit der gleichen Menge frischer Polyäthylenglycol - reicher Phase erneut extrahiert. Die beiden oberen Phasen wurden zusammengegeben und zentrifugiert. Das Sediment ergab das Sporenpräparat.

Um ein sporenfrees Kristallpräparat zu erhalten, musste die untere Phase noch 10 - 20 x mit der Polyäthylenglycol - reichen Phase extrahiert werden. Letztere wurde jeweils durch Abzentrifugieren der Sporen gereinigt und erneut verwendet.

Die Sporen- und Kristallpräparate wurden noch 3 x mit 0,02 M Phosphatpuffer - Triton und 3 x mit dest. Wasser gewaschen. Die Kristalle wurden als Suspension in dest. Wasser bei 4⁰ C aufbewahrt; die Sporen gefriergetrocknet und im Exsikkator über Silikagel unter Vakuum aufbewahrt.

2.4 Isolierung des Exosporiums

100 mg (Trockengewicht) gereinigte kristallfreie Sporen wurden in 10 ml eiskaltem 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,1 mit 0,01 % Triton X - 100 resuspendiert und während 1 - max. 2 Stunden mit einer MSE (Measuring and Scientific Equipment, London) Ultraschallsonde mit einer Amplitude von 8 μ beschallt. Dazu brachte man die Suspension in eine Zelle aus rostfreiem Stahl mit Kühlmantel, analog der von der Herstellerfirma MSE erhältlichen Glaszelle. Während der Ultraschallbehandlung wurde mit Hilfe eines Thermozirkulators (Churchill, England) und Aethylenglycol als Kühlflüssigkeit die Temperatur der Suspension auf 0⁰ C konstant gehalten. Die Wirksamkeit der Ultraschallbehandlung überprüfte man im Phasenkontrastmikroskop.

Die Sporen wurden bei 4⁰ C während 10 Minuten mit 2'800 x g in einer "High Speed 25" (MSE) zentrifugiert, das Sediment "low speed pellet" (LSP) mit 0,02 M Phosphatpuffer - Triton resuspendiert und erneut während 20 Minuten mit 1'200 x g zentrifugiert. Die beiden Ueberstände mit den Membranfragmenten wurden zusammengegeben und während einer Stunde

mit 150'000 x g in einer "Superspeed 50" (MSE) zentrifugiert. Der Niederschlag wird als "high speed pellet" (HSP) und der Ueberstand als "high speed supernatant" (HSS) bezeichnet. Der Niederschlag (HSP) von 100 mg Sporen wurde in 1 ml 0,02 M Phosphatpuffer-Triton resuspendiert, während einigen Sekunden mit Ultraschall homogenisiert und je 0,2 ml auf 18 ml eines linearen Cäsiumchlorid-Gradienten von 10 - 50 % (G/G) aufgetragen. Dieser wurde in einem 3 x 20 ml "swing out" Rotor in der Ultrazentrifuge MSE "Superspeed 50" während 16 Stunden mit 50'000 x g bei 4⁰ C zum Gleichgewicht zentrifugiert.

Die Gradienten wurden in einem "ISCO Density Gradient Fractionator", Modell 640 (Instrumentation Specialities Co. Lincoln, Nebraska) in Proben à 1,2 ml aufgetrennt und im Durchlaufverfahren die Absorption bei 280 nm gemessen und mit einem Schreiber aufgezeichnet.

Die Fraktionen mit den Membranfragmenten wurden mit Phosphatpuffer-Triton ca. 1 : 2 verdünnt, während 1 Stunde mit 180'000 x g zentrifugiert und anschliessend noch 3 x mit Phosphatpuffer-Triton gewaschen. Auch hier wurden die Proben mit einigen Sekunden Ultraschall homogenisiert. Die Fraktionen wurden schliesslich in Phosphatpuffer-Triton resuspendiert (1 - 2 mg Protein/ml) und bei -20⁰ C aufbewahrt. Wo Phosphorbestimmungen durchgeführt werden mussten, wurden die Membranfraktionen sinngemäss mit dest. Wasser gewaschen.

2.5 Dichtebestimmung im Cäsiumchlorid-Gradienten

Mit Hilfe eines ABBE "60" Refraktometers Typ Standard (Bellingham und Stanley Ltd., London) wurde der Brechungsindex der Proben bei 25⁰ C bestimmt und die entsprechende Dichte im "Handbook of Biochemistry" abgelesen.

2.6 Bestimmung der Toxinaktivität

Die Toxizität der Präparate bestimmte man als Frasshemmung bei Pieris brassicae Larven, mit der von SOMERVILLE und POCKETT (1975) modifizierten Methode nach COOKSEY (1968).

Blattrondellen (4 cm Durchmesser) wurden aus glatten Kohlblättern (Brassica oleracea) herausgestanzt. Mit 0,02 %iger wässriger Triton X-100 Lösung wurde eine Verdünnungsreihe der zu prüfenden Probe hergestellt. Pro Verdünnung wurden je 2 Rondellen beidseitig benetzt, an der Luft getrocknet und zusammen mit je 4 Larven des 3. Larvenstadiums in kleinen Petrischalen (5 cm Durchmesser) in einem beleuchteten Raum bei 25^o C inkubiert. Als Kontrolle dienten Rondellen, die nur mit 0,02 %iger Triton X-100 -Lösung benetzt worden waren. Nach 1 - 2 Tagen, d. h. sobald die Kontrollrondellen aufgefressen waren, wurde die Menge des übriggebliebenen Kohlblattes direkt mit einem für diesen Zweck in der Laboratoriumswerkstatt (Shell) entwickelten Photometer bestimmt.

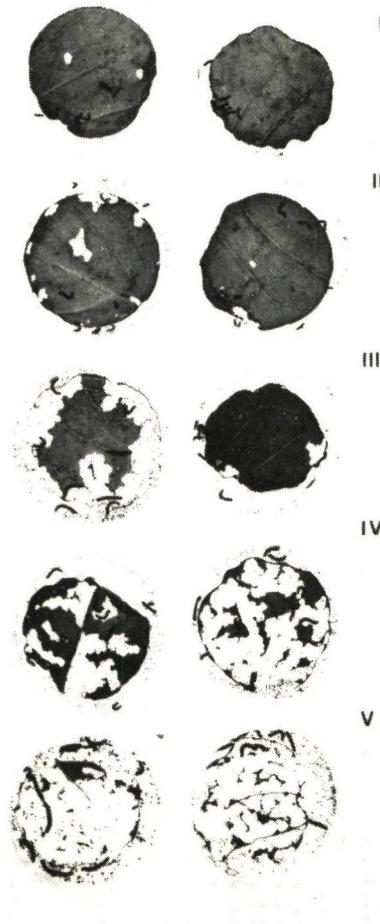
Eine Verdünnungsreihe des Bacillus thuringiensis Präparates E 61 diente als Standard und wurde bei allen Toxintesten parallel mitgeprüft. 1 mg dieses Standardpräparates enthält 1000 toxische Einheiten. Die Resultate wurden als toxische Einheiten pro mg Protein nach folgender Formel berechnet:

$$\text{toxische Einheiten/mg} = \frac{\text{Lc}_{50} \text{ von E 61} \times 1000}{\text{Lc}_{50} \text{ der Probe}}$$

Lc₅₀ ist diejenige Proteinkonzentration einer Lösung (µg/ml), die 50 % Frasshemmung bewirkt. Diese Konzentration (Lc₅₀) wurde graphisch, durch Aufzeichnen des Logarithmus der Proteinkonzentration gegen die entsprechende Frasshemmung, bestimmt.

In Figur 1 ist ein solcher Toxintest gezeigt.





Figur 1 Toxintest eines Exosporiumextraktes

Die Membranfraktion F_2 wurde mit Ellispuffer während 2 Stunden bei 37°C extrahiert, anschliessend zentrifugiert und die Toxinwirkung im Ueberstand (280γ Protein/ml) bei den Verdünnungen I: 2 x, II: 10 x, III: 50 x, IV: 250 x und V: 1250 x bestimmt.

UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES
UNIVERSITY LIBRARY
DANGALORE-24

2.7 Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt wurde nach der Methode von LOWRY et al. (1951) bestimmt und zu jeder Bestimmung eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin hergestellt.

Die Bestimmung des Proteingehaltes in den Membranfraktionen erfolgte nach 15 minütigem Kochen in Lowry Reagens D (4 ml D / ml Probe; D = 50 ml 2 % Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH + 1 ml 0,5 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ in dest. Wasser + 1 ml 1 % Kaliumtartrat in dest. Wasser).

Proben in Ellispufer, Harnstoff - Mercaptoäthanol etc. wurden vor der Proteinbestimmung gegen 0,015 M NaHCO_3 dialysiert.

2.8 Bestimmung des Trockengewichtes

0,5 ml der Membranfraktionen (ca. 200 - 500 μg Protein) wurden in vorgetrockneten tarierten Alufolienbechern im Trockenschrank bei 110°C getrocknet und in 18 Stunden Intervallen bis zur Gewichtskonstanz gewogen.

2.9 Extraktionsmittel

Mit den folgenden Lösungsmitteln wurde versucht, Proteine aus den Kristallen, den Sporen und den Membranfraktionen herauszulösen. Dabei wurde eine Proteinkonzentration von ca. 0,5 mg/ml Lösungsmittel angestrebt. Unlösliche Bestandteile entfernte man durch Zentrifugation (20 Minuten mit $40'000 \times g$).

2.9.1 Universal - Puffer nach ELLIS

Der Universalpuffer nach ELLIS (1961) wurde leicht modifiziert und enthält: 0,05 M Na_2CO_3 ; 0,05 M 2 - Amino - 2 - methyl - 1,3 - propandiol; 0,05 M Citronensäure; 0,05 M NaH_2PO_4 . Dazu wurde kurz vor Gebrauch 3,4 ml 2 - Mercaptoäthanol / l (50 mM) zugefügt und mit 1 N NaOH das pH auf 10,3 eingestellt. In diesem Puffer wurden die Proben während 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.9.2 Mischkombinationen von Harnstoff, Mercaptoäthanol, Natriumdextransulfat und Natronlauge

Die Proben wurden in den folgenden Reagenzienkombinationen während
a) 2 Stunden bei 37^o C, b) 20 Minuten bei 100^o C inkubiert, anschliessend
während 20 Minuten mit 20'000 x g zentrifugiert und gegen 0,015 m NaHCO₃
dialysiert. Proben, die später mittels Elektrophorese aufgetrennt wurden,
dialysierte man direkt gegen das Lösungsmittel für Elektrophorese (2.10).

I 8 M Harnstoff - 1 % (G/V) 2-Mercaptoäthanol, pH 8,8 (SOMERVILLE
et al., 1970)

II 8 M Harnstoff - 1 % (G/V) 2-Mercaptoäthanol - 1,5 % (G/V) Natrium-
dextransulfat (SDS) pH 8,8 (SOMERVILLE et al., 1970).

In I und II wurde das pH mit 1 N NaOH auf pH 8,8 eingestellt.

III 3,3 % (G/V) 2-Mercaptoäthanol + 0,3 % SDS in 0,03 M Na-Na-Phosphat-
puffer pH 7,0 (= Lösungsmittel für Elektrophorese, vgl. 2.10)

IV 0,1 N NaOH

V 1 % (G/V) 2-Mercaptoäthanol + 1,5 % SDS in 0,1 N NaOH

2.9.3 Clelands Reagens

Die Proben wurden in 50 µM/ml Dithiothreitol (Clelands Reagens; DTT)
in einer 1 %igen SDS-Lösung, pH 10,5, eingestellt mit 1 N NaOH, während
20 Minuten im Wasserbad gekocht. (ARONSON und FITZ - JAMES, 1968;
CLELAND, 1964).

2.9.4 Glycerin - Natriumdextransulfat - Mercaptoäthanol

Die Membranfraktionen inkubierte man in 0,0625 M Tris-(hydroxymethyl)-
aminomethan-(tris)-Hydrochlorid-Puffer pH 6,8 mit 2 % SDS, 5 % Mer-
captoäthanol, 10 % Glycerin und 0,001 % Bromphenolblau während 15 Min.
bei 100^o C (LAEMMLI, 1970). Bromphenolblau wurde nur beigegeben, wenn
anschliessend der Extrakt mittels Elektrophorese aufgetrennt wurde.

2.9.5 Phenol - Essigsäure - Wasser

Die Extraktion erfolgte nach der Methode von BEAMAN et al. (1971) mit einem Phenol-Essigsäure-Wasser-Gemisch (2 : 2 : 0,5 ; G : V : V) während 1 Stunde bei 37^o C. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugieren abgetrennt und der Ueberstand anschliessend bei 4^o C gegen 0,018 M NaHCO₃ dialysiert.

2.9.6 Butanol

Analog der Methode von MADDY et al. (1972) wurden die Proben in eisgekühltem 2,5 mM Phosphatpuffer pH 8,0 mit 0,5 mM EDTA (Aethylendiamintetraessigsäure) resuspendiert und mit 0,75 fachem Volumen eisgekühltem n-Butanol geschüttelt. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis trennte man die beiden Phasen durch Zentrifugation (5 Minuten bei 22'000 x g). Die untere, wässrige Phase wurde zur Entfernung des restlichen Butanols gegen Eis enthaltenden, verdünnten EDTA-Phosphatpuffer dialysiert.

2.9.7 Phenol

0,6 ml wässrige Membransuspension wurde mit 0,6 g Phenol während 15 Minuten bei 68^o C inkubiert und anschliessend, zur Trennung der beiden Phasen, während 5 Minuten mit 22'000 x g zentrifugiert (MADDY et al., 1972). Die obere, wässrige Phase dialysierte man gegen 0,015 M NaHCO₃, bis alles Phenol entfernt war.

2.9.8 Extraktion nach Hydrolyse mit Darmsaft von *Pieris brassicae*

Darmsaft wurde durch Elektroschockbehandlung von Larven des 5. Larvenstadiums gewonnen.

1 ml Membransuspension (1,5 - 2 mg Protein/ml) wurde in eine doppelwandige Glaszelle einer Autobürette gegeben und mit konz. Natronlauge das pH auf 10 eingestellt. Die Temperatur der Glaszelle wird mit Hilfe eines Thermostats (Churchill, England) auf 30^o C konstant gehalten. Dann wurde die Probe mit 10 µl Darmsaft während 3 Stunden inkubiert.

Mit der Autobürette wurde nach Bedarf 0,025 N NaOH zugegeben, um das pH auf 10,0 konstant zu halten. Unlösliche Bestandteile entfernte man durch Zentrifugation (10 Minuten mit $48'000 \times g$)

2.9.9 Extraktion nach Hydrolyse mit Trypsin

Die Extraktion mit Trypsin erfolgte analog derjenigen mit Darmsaft (2.9.8) in einer Autobürette bei pH 10,0 und 30°C mit $50 \mu\text{g}$ Trypsin pro mg Protein der Probe.

2.10 SDS - Gel - Elektrophorese

Die SDS-Gel-Elektrophorese wurde nach einer modifizierten Methode von SHAPIRO et al. (1967) durchgeführt. Das Gel enthielt zusätzlich noch Harnstoff (HERBERT et al., 1971) und setzte sich wie folgt zusammen: 5 bzw. 7,5 % Cyanogum 41 (Acrylamid); 0,1 % SDS; 0,05 % NNN'N'-Tetramethyläthylendiamin; 4 M Harnstoff (mit Amberlit MB-3 deionisiert) und 0,075 % Ammoniumpersulfat in 1 Liter 0,1 M Na-Na-Phosphatpuffer pH 7,0.

Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen wurden, dialysierte man sie gegen 0,01 M Na-Na-Phosphatpuffer pH 7,0 mit 0,15 M 2-Mercaptoäthanol und 0,1 % SDS (Lösungsmittel für Elektrophorese; SHAPIRO et al., 1967), oder fügte ein 0,5 faches Probevolumen 3 x konzentrierteres Lösungsmittel für Elektrophorese hinzu. Dann verdünnte man die Proben mit gleichem Volumen 0,01 % Bromphenolblau in 15 %iger (G/V) Saccharoselösung. Pro Gel wurden maximal $200 \mu\text{l}$ mit 20 - $50 \mu\text{g}$ Protein aufgetragen. Die Trennung erfolgte in einer Elektrophoreseapparatur mit 8 Röhrchen von $6 \times 100 \text{ mm}$ (Shandon, England) bei 40 V (9,4 mA pro Röhrchen) während 2 - 3 Stunden. Als Elektrophoresepuffer diente ein 0,1 M Na-Na-Phosphatpuffer pH 7,0 mit 0,1 % SDS. Nach der Trennung wurden die Gele aus den Röhrchen herausgenommen, mit Methanol, Wasser und Essigsäure (50 : 40 : 10) während 16 Stunden fixiert und in einer 0,25 %igen wässrigen Coomassie-Brilliantblau-Lösung während 2 Stunden gefärbt. Die Gele entfärbte man mit 5 %iger Essigsäure.

Als Standard wurde bei jeder Auftrennung eine Probe mit Rinderserumalbumin mitgeführt. Zur Bestimmung der Molekulargewichte dienten noch 6 weitere Referenzproteine:

Cytochrom C, Chymotrypsinogen A, Albumin aus Hühnerei, Aldolase, Katalase und Ferritin (Combithek Eichproteine, Boehringer, Mannheim). Die Auswertung der Gele erfolgte mit einem Gilford 240 Spektrophotometer mit Gelscanner bei 620 nm.

2.11 Elektronenmikroskopie

Die Negativ-Färbung der Sporen und Membranbruchstücke erfolgte im Wesentlichen nach der Methode von NORRIS (1971), jedoch mit 1 % an Stelle von 2 % Phosphorwolframsäure pH 7,0 (mit 1 N NaOH eingestellt), auf Formvar überzogenen Kupfergittern.

Für Dünnschnitte wurden die Proben mit 1 % Osmiumtetroxid in Kellenberger - Puffer fixiert (KELLENBERGER et al., 1958) und in Araldit eingebettet (LUFT, 1961). Die Schnitte wurden mit Hilfe eines Huxley Ultramicrotoms hergestellt und mit Uranylacetat (gesättigte Lösung in 50 % Alkohol) und Bleicitrat gefärbt (REYNOLDS, 1963; SOMERVILLE, 1971; SOMERVILLE et al., 1971).

Die Präparate wurden in einem Phillips EM 300 Elektronenmikroskop untersucht.

2.12 Methoden zur serologischen Charakterisierung von Proteinen

2.12.1 Herstellung von Antiseren

Antiseren wurden gegen die folgenden Präparate hergestellt:

- a) Suspension der Membranfraktion F_2 , isoliert aus Sporen der Mutante HB 9-1
- b) Suspension der Membranfraktion F_1 , isoliert aus Sporen des Wildtyps S-9
- c) Suspension der Membranfraktion F_2 , isoliert aus Sporen des Wildtyps S-9
- d) Die Membranfraktion F_2 , isoliert aus Sporen des Wildtyps S-9, wurde mit Ellispuffer (2.9.1) während 2 Stunden bei 37^o C inkubiert und

anschliessend gegen 0,015 M NaHCO₃ dialysiert. Als Immunogen verwendete man sowohl die mit Ellispuffer herausgelösten als auch die unlöslichen Bestandteile der Membran.

- e) Kristalle des Wildtyps S-9 wurden mit Ellispuffer während 2 Stunden bei 37^o C inkubiert, die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt (20 Minuten mit 50'000 x g) und der Ueberstand gegen 0,015 M NaHCO₃ dialysiert. Das Immunogen bildeten die gelösten Proteine.
- f) Die aus den Kristallen isolierte toxische Komponente A (HERBERT et al., 1971).

Die gewonnenen Antiseren werden im Weiteren wie folgt abgekürzt:

- a) anti F₂ HB 9-1
- b) anti F₁ S-9
- c) anti F₂ S-9
- d) anti F₂ S-9 extr.
- e) anti Cry S-9
- f) anti A

Das Antiserum anti Cry S-9 wurde von H. Somerville, das Antiserum anti A von B. Herbert freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Um gute Antikörperbildung im Kaninchen zu erhalten, wurde dem Immunogen jeweils frisch hergestelltes "Freund's complete Adjuvant" (WILLIAMS und CHASE, 1967) beigemischt:

1 mg durch Hitze abgetötete, gefriergetrocknete Mycobacterium tuberculosis, H 37 RV wurden mit 0,3 ml Bayol Oil 55 (Esso Petroleum Co.) in einem Homogenisator zu einer feinen Suspension gemischt. Dann gab man 0,1 ml Arlacel A (Honeywell und Stein) und 0,1 ml Antigen (ca. 300 - 1000 µg Protein) hinzu und mischte das Ganze mit einer Spritze durch mehrmaliges Einziehen und Ausstossen, bis eine cremige Emulsion entstand. Von dieser Emulsion wurden einem weissen Neuseeland - Kaninchen je 0,25 ml in die Muskeln der beiden hinteren Beine, unmittelbar oberhalb der Ferse, eingespritzt. Nach 6 Wochen erfolgte eine 2. Injektion mit einer, zusätzlich noch AlPO₄ enthaltenden Suspension und zwar je 0,2 ml in die beiden Hinterbeine und 0,1 ml in eine Ohrvene. Nach weiteren 7, 9 und 11

Tagen entnahm man durch eine Ohrvene jeweils ca. 30 ml Blut. Das Blut wurde in einem sterilen Glasfläschchen aufgefangen, während einer Stunde bei 37° C inkubiert und anschliessend über Nacht bei 4° C aufbewahrt. Am nächsten Tag konnte durch Zentrifugieren (10 Minuten mit 20'000 x g) das klare Serum gewonnen werden. Die Antiseren wurden bei -20° C aufbewahrt.

2.12.2 Doppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY

OUCHTERLONY, 1948; 1958; CROWLE, 1960.

2 g Ion Agar No. 2 (Oxoid) wurden in 50 ml dest. Wasser aufgelöst, während 5 Minuten im Dampfkochtopf sterilisiert und anschliessend in einem 56° C Wasserbad abgekühlt. Gleichzeitig löste man 0,3 g NaN₃ und 1,65 g Bar-bital-Acetat-Puffer für Elektrophorese (Oxoid) in 50 ml dest. Wasser auf und erwärmte diese Lösung in einem 56° C Wasserbad. Dann wurde die Pufferlösung mit dem Agar vermischt und je 6 - 7 ml auf 5 x 5 cm Glasplatten verteilt. Nach dem Erstarren des Agars stanzte man mit einem Korkbohrer 6 Löcher mit 6 mm Durchmesser in gleichmässigen Abständen um ein Zentralloch mit 7 mm Durchmesser in einem Abstand von 12,5 mm (Zentrum zu Zentrum) und füllte diese mit Antiserum (unverdünnt) resp. Antigenlösungen. Als Antigenlösungen dienten meistens Ellisextrakte oder Andere nach der Dialyse gegen 0,015 M NaHCO₃. Die so präparierten Platten wurden auf einer mit Wasser benetzten Filterpapierrondelle in Petrischalen während 1 - 2 Tagen, bis die Präzipitationslinien gut sichtbar waren, bei 30° C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten über Nacht (ca. 16 Stunden) in physiologische Kochsalzlösung (0,85 % NaCl) gelegt und anschliessend 3 x während ca. 4 - 5 Stunden durch Einlegen in dest. Wasser gewaschen. Dann wurde der Agar mit einem Filterpapier bedeckt und bei 37° C zu einem dünnen Film eingetrocknet. Die Präzipitationslinien färbte man während 1 Minute mit einer gesättigten Lösung von Naphthalin-Schwarz in Essigsäure-Methanol-Wasser (10 : 50 : 40). Dieselbe Lösung ohne Farbstoff diente zur Entfärbung der Platten.

2.12.3 Quantitative Immunopräzipitation

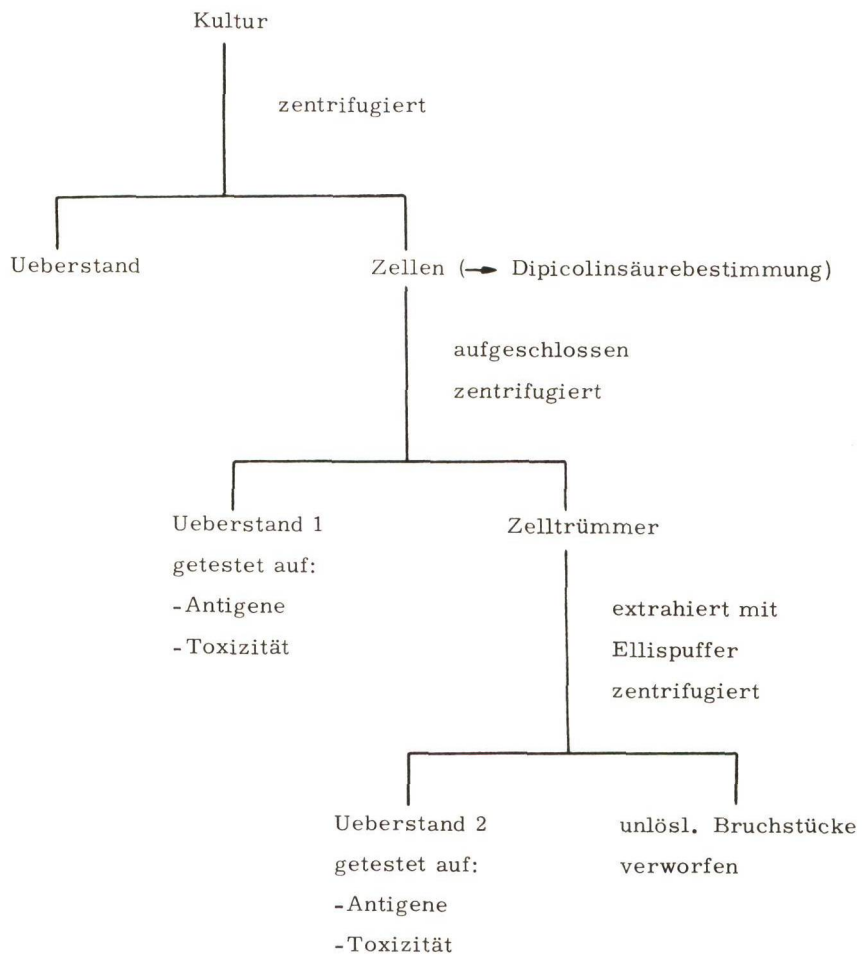
Als Antigenlösungen dienten im allgemeinen die gegen 0,015 M NaHCO_3 dialysierten Ellisextrakte der Proben (2.9.1) und in einzelnen speziell erwähnten Fällen auch gegen NaHCO_3 dialysierte Harnstoff - Mercapto-äthanol - Extrakte (2.9.2; I). Die Immunopräzipitation wurde in einem Totalvolumen von 0,35 ml ausgeführt, bestehend aus 0,1 ml Antiserum; 0,05 ml 0,85 %igem NaCl; einer Reihe von 0, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200 μl Antigenlösung (200 - 500 μg Protein/ml). Auf das Totalvolumen ergänzte man mit 0,015 M NaHCO_3 . Dieses Gemisch wurde während 2 Stunden bei 37° C inkubiert, gefolgt von 2 - 3 Tagen bei 4° C. Nach dieser Zeit wurde das gebildete Präzipitat abzentrifugiert (20 Minuten mit 1000 x g), der Ueberstand mit einer ausgezogenen Pasteurpipette sorgfältig entfernt und anschliessend das Präzipitat 2 x mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Das Protein im Sediment bestimmte man direkt nach der Methode von LOWRY et al. (1951). Die Menge gebildetes Präzipitat, in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge Antigen, wurde graphisch aufgezeichnet.

2.13 Exosporium- und Kristallantigenbildung während der Sporulation

Die Zellen wurden in einem Tischfermenter gezüchtet (2.2). Gleich nach dem Ende des exponentiellen Wachstums wurden in Intervallen Proben à 12,5 ml entnommen, die Zellen abzentrifugiert (15 Minuten mit 30'000 x g) und auf Eis gestellt. Die Fraktionierung dieser Proben erfolgte nach dem Schema in Figur 2.

Die Zellen der einzelnen Proben wurden in je 3 ml 0,02 M K - K - Phosphatpuffer pH 7,0 resuspendiert, davon 1 ml zur Dipicolinsäurebestimmung verwendet und der Rest in einem Braun Homogenisator (Typ 853030) mit ca. 1/3 Volumen Ballotini Glaskügelchen (0,12 mm ϕ) während 5 x 30 Sekunden aufgeschlossen. Dazwischen kühlte man die Proben mit festem Kohlendioxid, welches mit Druck durch ein rostfreies Stahlrohr über den Probenhalter geleitet wurde. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (20 Minuten mit 48'000 x g) und der Ueberstand (Ueberstand 1) mittels

Figur 2 Fraktionierungsschema zur Bestimmung der Antigenbildung während der Sporulation



Doppeldiffusionstest (2.12.2) und Immunopräzipitation (2.12.3) auf Kristall- und Exosporiumantigene geprüft und dessen Toxingehalt mit dem Biotest (2.6) bestimmt. Das Sediment wurde in 2 ml Ellispuffer pH 10,3 (2.9.1) resuspendiert, während 3 Stunden bei 37° C inkubiert und anschliessend die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (20 Minuten mit 48'000 x g). Das Sediment wurde verworfen und im Ellisextrakt (Ueberstand 2) die Toxizität sowie der Anteil an Kristall- und Exosporiumantigenen bestimmt.

2.14 Methoden für radioaktive Einbauversuche

Für das Studium der Aufnahme und des Einbaus von radioaktiv markierten Aminosäuren erfolgte die Züchtung der Zellen in einem Tischfermenter (2.2). Zu den aufgeführten Zeiten wurden Proben à 52,5 ml steril entnommen und davon je 10 ml (P 1), 20 ml (P 2) und 22,5 ml (P 3) in sterile 100 ml Erlenmeyerkolben gebracht. Zu P 1 und P 3 wurden je 0,1 ml einer während 5 Minuten bei 15 psi sterilisierten Mischung von ³⁵S - Cystein (10 µCi/ml, 500 µg/ml) und ³H - Leucin (G) (30 µCi/ml, 500 µg/ml) gegeben.

P 1 inkubierte man auf einer Schüttelmaschine bei 30° C. Nach der Bildung von freien Sporen wurden diese abzentrifugiert, 3 x mit eiskaltem 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,1 und 0,01 % Triton X-100 gewaschen, in 1 ml des gleichen Puffers resuspendiert und die optische Dichte bestimmt. Je 0,1 ml dieser Suspension wurden mit 0,9 ml Ellispuffer während 30 Min. bei 37° C extrahiert, zentrifugiert und der Anteil an markiertem Cys resp. Leu im Extrakt ermittelt.

P 2 und P 3 wurden in einem Schüttelwasserbad bei 30° C inkubiert und aus der radioaktiven Kultur P 3 nach 1, 3, 5, 7 und 10 Minuten Proben à 0,5 ml entnommen, mit 0,5 ml 10 %iger Trichloressigsäure (TCA) mit je 100 µg/ml "kaltem" Leu und Cys vermischt und auf Eis gestellt. Davon wurden 0,5 ml Millipore-filtrierte (Filter HAWP 02500, HA 0,45 µ), 4 x mit 5 % TCA mit je 100 µg/ml Leu und Cys und anschliessend 2 x mit dest. Wasser gewaschen. Die Filterpapierrondellen waren vor dem Gebrauch in 5 % TCA mit "kaltem"

Leu und Cys eingelegt worden. Die Rondellen trocknete man unter einer IR - Lampe und bestimmte die Radioaktivität des Filtrerrückstandes. Aus diesen Resultaten wurden die Aufnahmezeiten für Cystein und Leucin berechnet.

Für "label - chase" Resultate wurden 20 Minuten nach der Zugabe der markierten Aminosäuren, zu den restlichen 20 ml der radioaktiven Kultur P 3 0,5 ml einer sterilen Lösung von "kaltem" L-Leucin (20 mg/ml) und L-Cystein (20 mg/ml) gegeben und die beiden Kulturen P 2 und P 3 zentrifugiert (20 Minuten mit 3000 x g). Der Ueberstand der radioaktiven Kultur wurde durch denjenigen der nicht markierten ersetzt und zusätzlich noch 0,5 ml der "kalten" Leu - Cys - Lösung beigefügt. Anschliessend inkubierte man die resuspendierten Zellen auf einer Schüttelmaschine bei 30° C. Nach abgeschlossener Sporulation wurden die Sporen abzentrifugiert, 2 x mit 0,02 M Phosphatpuffer - Triton gewaschen und analog dem Schema in Figur 3 (3.1) fraktioniert, jedoch ohne die Auftrennung im Cäsiumchlorid-Gradienten. Die resultierenden Fraktionen (intakte Sporen, LSP, LSS, HSP und HSS) wurden im Scintillation counter gezählt.

Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte in einem Intertechnique SL 30 Scintillation counter. Als Szintillationsflüssigkeiten dienten für getrocknete Proben 0,7 % (G/V) Butyl-PBD [2 - (4 - Butyl phenyl) - 5 (4 - biphenyl) - 1,3,4 oxadiazol] in Toluol und für wässrige Proben eine Mischung von 85 g Naphthalin und 8 g Butyl-PBD in 1 Liter Dioxan. Dioxan wurde mit wasserfreiem Aluminiumoxid gereinigt.

2.15 Analysen

2.15.1 Aminosäurenanalyse

Die Proben wurden in 6 N HCl während 16 Stunden bei 110° C in unter Vakuum verschlossenen Ampullen hydrolysiert, anschliessend die Salzsäure in einem Vakuum - Exsikkator mit NaOH - Plätzchen über Silicagel entfernt und die Aminosäuren im Hydrolysat mit einem Technicon NC - 1 Autoanalyzer (lange Kolonne) in einem diskontinuierlichen Gradienten von pH 2,75 bis 5,0 aufgetrennt und bestimmt.

Cyst(e)in wurde durch Oxidation mit Perameisensäure (5 ml 30 % G/G H_2O_2 + 95 ml 98 - 100 %iger Ameisensäure) in Cysteinsäure übergeführt und als solche nach der oben beschriebenen Hydrolyse bestimmt (MILLER und CARPENTER, 1964).

2.15.2 Bestimmung von Dipicolinsäure, Phosphor, Kohlenhydraten und Nukleinsäuren

Die Dipicolinsäurebestimmung erfolgte colorimetrisch nach der Methode von JANSSON et al. (1958).

Die Phosphorbestimmung beruhte auf der Farbbildung hervorgerufen durch die Reduktion des mit Molybdat gebildeten Phosphomolybdat - Komplexes mit Ascorbinsäure (CHEN et al., 1956). Den anorganischen Phosphor extrahierte man mit Trichloressigsäure. Zur Bestimmung des Totalgehaltes an Phosphor war eine Veraschung der Proben notwendig. Standardlösungen mit 1, 2, 4, 6 und 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wurden mit Na_2HPO_4 hergestellt und analog den Proben behandelt. Sämtliche Glaswaren reinigte man vorgängig mit Chromschwefelsäure.

Der Anteil an Kohlenhydraten wurde nach der Hydrolyse der Proben unter Vakuum in 2 N H_2SO_4 während 2 Stunden bei 110°C mit dem Anthron-Reagens bestimmt (HASSID und ABRAHAM, 1957; TOENNIES und KOLB, 1964)

Die Nukleinsäurenbestimmung erfolgte nach der Standardmethode von SCHNEIDER (1957) nach 10-minütiger Extraktion mit 5 %iger Trichloressigsäure in einem kochenden Wasserbad.

2.15.3 Lipide

Der Gesamtbetrag an Lipiden wurde durch Eintrocknung eines Chloroform-Methanol-Extraktes (2 : 1) zur Gewichtskonstanz bestimmt (FOLCH et al., 1957).

Zur Charakterisierung der Lipide wurde eine Totalanalyse der Fettsäuren durchgeführt. Die Fettsäuren wurden durch eine alkalische Hydrolyse der Lipide in den Proben freigesetzt (DITTMER und WELLS, 1969), die nicht

verseifbaren Lipide durch zweimalige Extraktion mit Aether entfernt und die freien Fettsäuren aus dem mit konz. Schwefelsäure angesäuerten Hydrolysat mit Aether extrahiert. Anschliessend wurde die Aetherphase mit Wasser gewaschen und unter Stickstoff eingetrocknet. Die in wenig Aether resuspendierten freien Fettsäuren wurden mit einigen Tropfen Diazomethan in Aether (bis die gelbe Farbe bestehen bleibt) in deren Methylester übergeführt. Die Reaktion erfolgte während 5 Minuten auf Eis. Das überschüssige Diazomethan entfernte man sofort durch Ueberleiten von Stickstoff. Diazomethan wurde nach der Methode von DE BOER und BACKER (1954) aus N-Methyl-N-nitrosotoluol-4-sulfonamid (Diazald) immer frisch hergestellt. Diazomethan kann ca. 1 Woche bei -18°C aufbewahrt werden, verliert jedoch an Reaktionsfähigkeit. Es wurde immer frisch über KOH destillierter Aether verwendet.

Die Methylester der Fettsäuren wurden in Aceton aufgenommen und bei 4°C aufbewahrt. Die Auftrennung der Fettsäuren erfolgte in einer 122 cm langen Glaskolonne 3 cm Durchmesser, gepackt mit 10 % Carbowax 20 M in Chromasorb 102 als Supporter, bei einer konstanten Temperatur von 220°C in einem Gaschromatographen (Hewlett und Packard 402, High Efficiency Gas-Chromatograph), ausgerüstet mit einem Flammendetektor.

Das Packmaterial wurde wie folgt hergestellt: Chromasorb 102 wurde in Chloroform aufgelöst, 10 % des verwendeten Gewichtes von Chromasorb Carbowax 20 M zugegeben und gerührt. Unter ständigem Rühren und Einleiten von Stickstoff entfernte man das Chloroform und trocknete das Material anschliessend in einem Vakuumofen.

Als Trägergas diente Stickstoff (50 ml/Minute). Die Flussraten für Wasserstoff und Luft betragen 45 resp. 50 ml/Minute.

Durch Vergleichen der resultierenden Verzögerungszeiten mit solchen von bekannten Fettsäuremethylestern und der erwiesenen linearen Beziehung zwischen dem Logarithmus der Verzögerungszeit und der Anzahl C-Atome der Fettsäuren konnten die isolierten Fettsäuren identifiziert werden. Als Standards standen die folgenden Fettsäuremethylester zur Verfügung:

C_{12} , C_{14} , C_{16} , C_{18} , C_{18}^- , $C_{18}^=$, C_{20} und C_{22} (käuflich erhältlich bei Lipid Products, South Nutfield, Surrey und Chromatography Services, Birkenhead, Cheshire).

2.15.4 Phospholipide

32 P-markierte Sporen (Herstellung 2.2) wurden aufgearbeitet (2.3) und die Membranfraktionen isoliert (2.4). Die Phospholipide wurden mit Hilfe eines Chloroform-Methanol-Wasser-Gemisches (BLIGH und DYER, 1969) nach der von BERTSCH et al. (1969) beschriebenen Methode extrahiert. Die markierten Sporen und Membranfraktionen wurden in Natrium-Acetat-Puffer pH 4,0 (Endkonzentration 0,1 M) aufgenommen und zu 1 ml dieser Suspension 2,2 ml Methanol und 1 ml Chloroform beigegeben, einige Sekunden mit Ultraschall gemischt und während einer Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der nicht lösliche Teil wurde durch Zentrifugation abgetrennt und erneut in $CHCl_3$: MeOH : H_2O (1 : 2,2 : 1) resuspendiert und zentrifugiert. Die beiden Ueberstände wurden vereinigt und je 0,25 Vol. Chloroform und Wasser zugegeben, kräftig geschüttelt und die beiden Phasen durch Zentrifugation getrennt. Die Phospholipide befanden sich in der unteren Phase. Die obere Phase extrahierte man erneut mit frischer unterer Phase und trocknete die beiden unteren Phasen zusammen unter Stickstoff ein. Der Rückstand wurde noch 4 x mit Aethanol und 2 x mit Aceton gewaschen und jeweils durch Ueberleiten von Stickstoff eingetrocknet. Die Lipide wurden in Chloroform aufgenommen und bei $-18^{\circ}C$ aufbewahrt.

Die Phospholipide wurden durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-Platten (DC - Fertigplatten F - 254, Schichtdicke 0,25 mm, Merck) mit den beiden folgenden Lösungsmittelsystemen (V/V/V) Chloroform - Methanol - Wasser (65 : 25 : 4) und Chloroform - Methanol - Essigsäure (65 : 25 : 8) aufgetrennt und durch Radioautographie (x - Ray Film, Kodak) lokalisiert und mit Hilfe eines Radiochromatogram Scanners (Packard) aufgezeichnet. Zur Identifizierung der isolierten Phospholipide standen die folgenden Marker zur Verfügung : Phosphatidylglycerin (PG), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Sphingomyelin (SPH) und Cardiolipin (CL) (von Lipid Products, South Nutfield, Surrey).

Zur quantitativen Bestimmung wurden die lokalisierten Phospholipide von der Platte abgekratzt und die Radioaktivität nach Zugabe von 10 ml 0,7 % Butyl-PBD in Toluol im Scintillation counter bestimmt.

Der Gesamtanteil an Phospholipiden wurde durch Multiplikation des Phosphorgehaltes im Chloroform - Methanol - Extrakt mit dem herkömmlichen Umrechnungsfaktor von 25 (MATZ et al., 1970) berechnet.

2.16 Alkylierung der SH - Gruppen von Cystein mit ^{14}C - Jodessigsäure

Die Proben mit ca. 1 mg Protein in 0,25 ml Ellispuffer (2.9.1) resp. Harnstoff - Mercaptoäthanol (2.9.2) wurden mit einem Ueberschuss an ^{14}C - markierter Jodessigsäure (0,1 ml; 100 μmol) bei einem pH von 9,0 während einer Stunde bei 30^o C alkyliert (ANFINSEN und HABER, 1961). Dann wurden die Proben zentrifugiert (90 Minuten mit 100'000 x g bei 4^o C), der Ueberstand und das resuspendierte Sediment gegen 0,01 M NaHCO_3 - Lösung dialysiert, mit 6 maligem Wechseln der Vorlage. Vor der Bestimmung der Radioaktivität wurde das Sediment nochmals durch Zentrifugieren (siehe oben) gewaschen.

2.17 Chemikalien

Die verwendeten analysenreinen Reagenzien wurden von den aufgeführten Firmen bezogen. Weiter gereinigte Substanzen sind erwähnt.

Ammoniummolybdat, Ammoniumpersulfat, Cäsiumchlorid, Calciumchlorid, Dikaliumhydrogenphosphat, Kaliumdihydrogenphosphat, Manganchlorid, Natriumacetat, Natriumazid, Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Natriumhydrogenphosphat, Natriumsulfat, EDTA, Harnstoff deionisiert durch langsames Filtrieren durch Amberlit MB - 3, Polyäthylenglycol 4000 und 6000, Saccharose, Triton X-100, Cyanogum 41, NNN'N'-TEMED, Kalilauge, Natronlauge, Ameisensäure, Perchlorsäure, Phosphorwolframsäure, Salzsäure, Trichloressigsäure, Aceton. Aether und Petroläther wurden jeweils frisch über KOH destilliert. Butanol, Phenol, 1,4-Dioxan gereinigt mit

aktiviertem Aluminium, Ascorbinsäure, Leucin und Cystein von BDH Chemical Ltd. Poole, England.

Anthron, Chloroform, Essigsäure, Glycerin, Methanol, Salpetersäure, Schwefelsäure, Silicagel, Toluol, Wasserstoffperoxid von Hopkin und Williams, Essex, England.

Dipicolinsäure, Dithiothreitol, 2-Mercaptoäthanol, Natriumdextransulfat und Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan von Sigma London Chemical Ltd., Kingston-Upon-Thames, Surrey.

Bromphenolblau, Coomassi-Brilliantblau R und Naphthalinschwarz von Edward Gurr Ltd., London.

Trypsin von Boehringer, Mannheim.

Carbowax 20 M von Applied Science Laboratories, Inc. State College, Pennsylvania.

Chromasorb 102 von Johns-Manville, Celite Division, Denver, Colorado.

Naphthalin, Scintillation Chemical, von Koch-Light Laboratories Ltd., Colubrook, Bucks, England.

Butyl-PBD von Intertechnique Ltd., Portslade, Sussex, England.

Rinderserumalbumin (kristallisiert) von Armour, Pharmaceutical Company Ltd., Eastbourne, Sussex, England.

Die radioaktiv markierten Verbindungen ^{32}P -Orthophosphat, ^{35}S -Cystein, ^3H -Leucin, ^{14}C -Jodacetat von Radiochemical Centre Ltd., Amersham, Buckinghamshire, England.

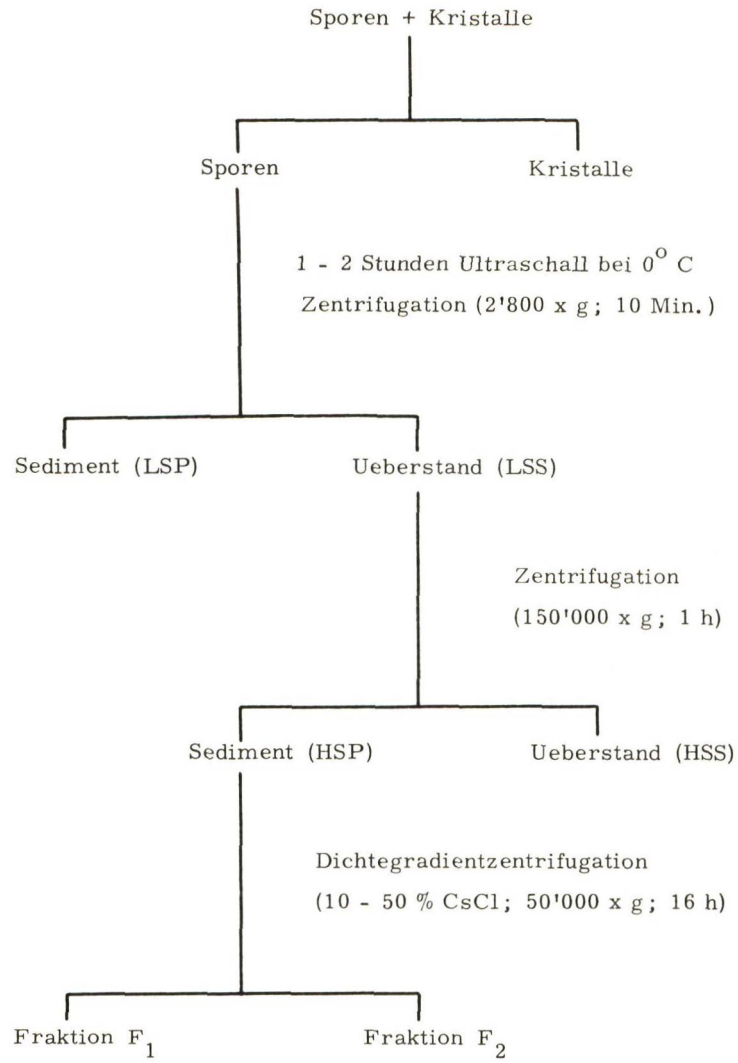
3 RESULTATE

3.1 Isolation und Dichtebestimmung der Membranfraktionen

Figur 3 zeigt das Schema zur Isolation von Membranfraktionen aus den Sporen. Das Sporenpräparat, erhalten nach der 2-Phasen-Extraktion mit Polyäthylenglycol und Natriumdextransulfat in Phosphatpuffer, enthält weniger als 0,1 % Kristalle, bestimmt durch Auszählen im Phasenkontrastmikroskop. Bei B. cereus (BERGER und MARR, 1960) und B. thuringiensis var. finitimus (SOMERVILLE et al., 1971) konnte mit Hilfe von Ultraschall das Exosporium aufgebrochen werden, ohne die Sporen dadurch zu zerstören. Diese Methode wurde hier angewandt, um Fragmente des Exosporiums zu erhalten. Nach 90 - 120 Minuten Ultraschallbehandlung war die Exosporiummembran in fast allen Sporen von B. thuringiensis var. tolworthi abgetrennt. Auch nach dieser Zeit konnten weder im Phasenkontrastmikroskop noch im Elektronenmikroskop (nach Negativfärbung) Veränderungen an den Sporen selbst festgestellt werden. Weniger als 1 % der Sporen begannen zu keimen und verloren ihre Lichtbrechung. Es wurden aber dabei 25 - 30 % der Dipicolinsäure der Sporen freigesetzt.

Beim Versuch, die Membranen mit der French-Press von den Sporen zu trennen (analog der Methode zur Isolierung der Exosporiummembran von B. cereus, GERHARDT und RIBI, 1964) wurden diese wohl gut abgetrennt; dabei begannen aber ca. 30 % der Sporen zu keimen, und zudem wurden 50 % der Dipicolinsäure freigesetzt.

Bei der Trennung der Membranfragmente von den Sporen durch Zentrifugieren bei niedriger Tourenzahl (2800 x g, 10 Minuten) sedimentierte ein grosser Anteil der Membranbruchstücke mit den Sporen. Zwar war es möglich, nach Resuspendierung des Niederschlages und erneuter Zentrifugation (1200 x g, 20 Minuten) die Ausbeute um etwa 1/3 zu verbessern, doch betrug sie noch immer nur ca. 20 - 30 %. Die Ausbeute an Membranfragmenten konnte durch Zentrifugation des Membran-Sporen-Gemisches in einem Saccharosegradienten (10 - 50 % Saccharose; während 1 Stunde



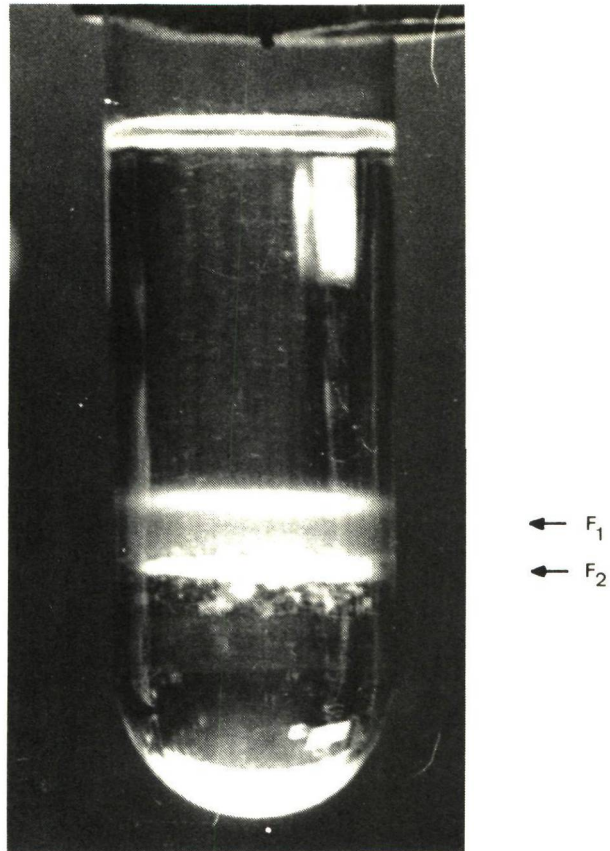
Figur 3 Isolierung der Membranfraktionen aus den Sporen.

mit 1000 x g) verdoppelt werden. Das daraus resultierende Präparat enthielt aber vereinzelt Sporen und wurde deshalb für die Experimente vor-sichtshalber nicht verwendet. Die angegebenen Zentrifugationsbedingungen sind nicht optimiert worden. Es scheint durchaus möglich, bei geeigneteren Bedingungen, die etwa in der gleichen Grössenordnung liegen dürften, eine sporenfreie Membranfraktion mit einer Ausbeute von über 50 % zu erhalten.

Die durch die Differentialzentrifugation erhaltene Membranfraktion (HSP) prüften wir anschliessend in einem Dichtegradienten auf ihre Homogenität. Bei der Zentrifugation in einem linearen Gradienten von 10 - 60 % Saccharose (3 Stunden mit 80'000 x g) sedimentierten die Membranbruchstücke. Ihre Dichte muss also grösser als $1,29 \text{ g/cm}^3$ sein. Aus Zentrifugationsversuchen in gleichen Gradienten aber mit wesentlich kleinerer g - Zahl (12'000 x g) während 10, 20 und 40 Minuten ging hervor, dass alle Teilchen etwa gleich schnell sedimentierten.

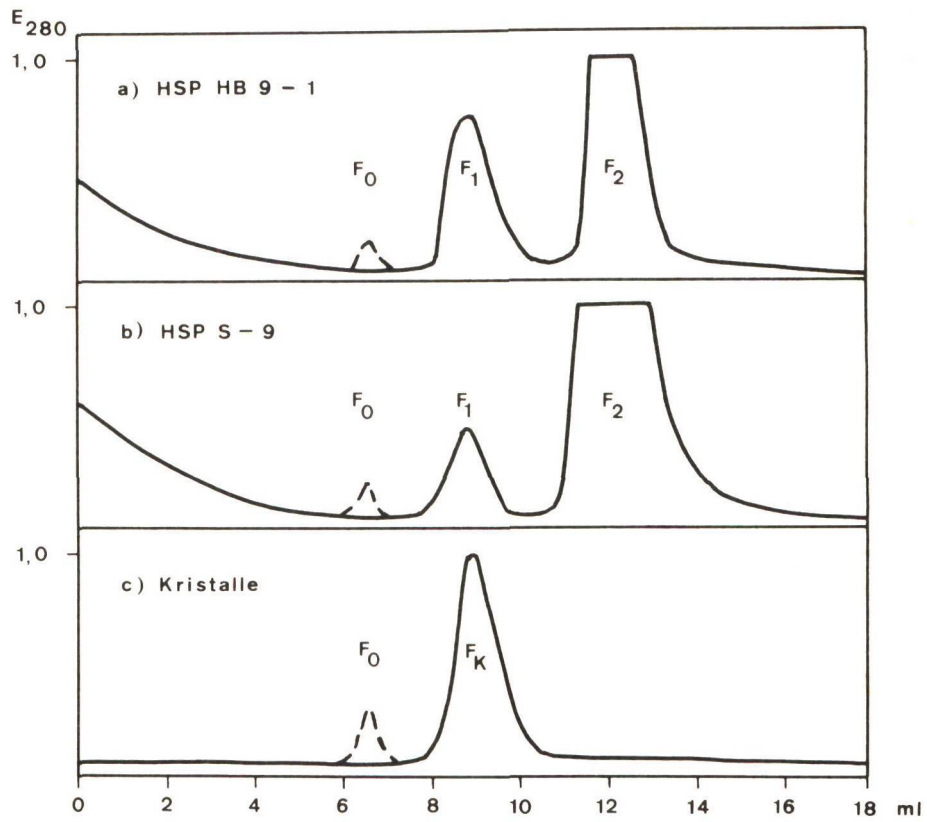
Gradienten mit höherer Dichte wurden mit Cäsiumchlorid (10 - 50 % G/G CsCl) aufgebaut. In diesen Gradienten trennte sich der HSP in 2 deutlich voneinander getrennte Banden auf (Figur 4). Die leichtere Fraktion wird als F_1 und die schwerere als F_2 bezeichnet. Bei der Auftrennung der Gradienten wurde in einer Durchflusszelle die Absorption bei 280 nm gemessen und mit einem Schreiber aufgezeichnet. Figur 5 zeigt den Absorptionsverlauf während der Auftrennung der Gradienten mit a) HSP von B. thuringiensis HB 9-1 (akristallogene Mutante), b) HSP von B. thuringiensis S-9 (Wildtyp) und c) sporenfreiem Kristallpräparat. Die relativen Beträge von F_1 und F_2 variieren. Bei der Mutante HB 9-1 ist der Ertrag an F_1 etwa 4 x kleiner als der von F_2 , beim Wildtyp ist F_1 noch höchstens 1/10 von F_2 . Die Fraktion F_0 konnte nur in den Sporen- und Kristallpräparaten beobachtet werden, die aus der Züchtung von Zellen im Rogoff-Medium hervorgingen. F_0 ist in Ellispuffer unlöslich und gibt auch nach dem Kochen in Lowry-Reagens D keine positive Reaktion.

Die Membranbruchstücke in einem Cäsiumchloridgradienten von den nackten Sporen zu trennen, gelang nicht, da diese Sporen etwa die gleiche Dichte besitzen.



Figur 4 Sedimentation der Membranfraktionen F_1 und F_2 in einem Cäsiumchloridgradienten.

Das Mengenverhältnis von F_1 zu F_2 entspricht nicht demjenigen im HSP. Zur besseren Erkennung von F_1 wurde diese Fraktion im HSP durch Zugabe von bereits isoliertem F_1 ca. 8 fach angereichert.



Figur 5 Verteilung des UV - absorbierenden Materials in einem CsCl-Gradienten nach der Zentrifugation (16 h mit 50'000 x g) einer Suspension von a) HSP HB 9-1 (akristallogene Mutante); b) HSP S-9 (Wildtyp) und c) isolierten Kristallen.

In den Gradienten a) und b) der Figur 5 finden wir UV - absorbierendes nicht partikuläres Material an der Spitze des Gradienten. Es handelt sich möglicherweise um Material (unter Anderem auch Proteine), das während der Gradientenzentrifugation aus den Membranfragmenten herausgelöst wird. In Tabelle 1 sind die Dichten der einzelnen Fraktionen zusammengestellt.

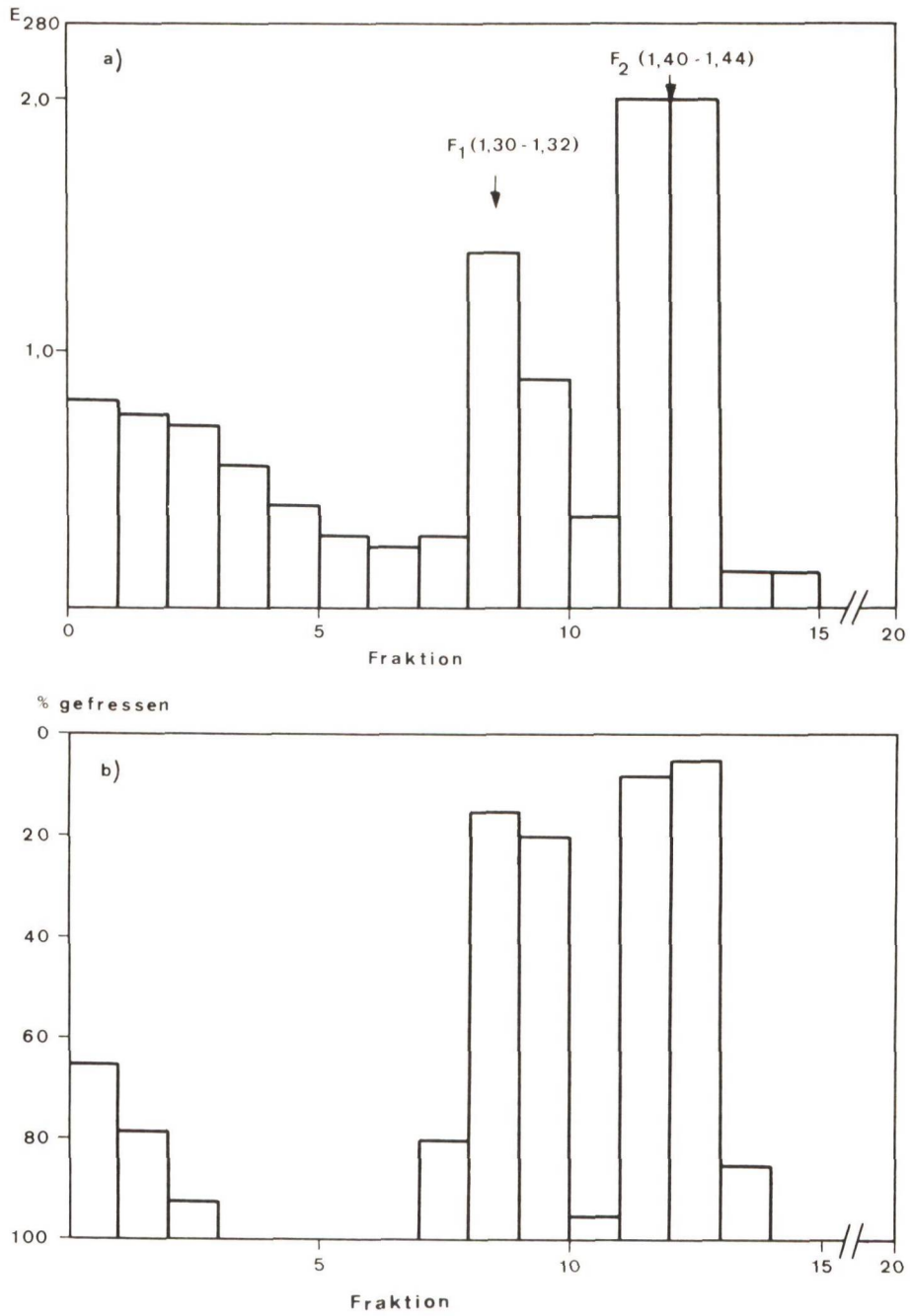
Tabelle 1 Dichte der Fraktionen im CsCl-Gradienten

Fraktion	g/cm^3
F ₁ S-9	1,29 - 1,32
F ₂ S-9	1,40 - 1,45
F ₁ HB 9-1	1,30 - 1,32
F ₂ HB 9-1	1,40 - 1,44
Kristalle	1,29 - 1,32

Die beiden entsprechenden Membranfraktionen des Wildtyps S-9 und der Mutante HB 9-1 unterscheiden sich nicht in ihrer Dichte. Die Dichte der Kristalle ist identisch mit derjenigen der Fraktion F₁.

3.2 Verteilung des Toxins in den Fraktionen des CsCl-Gradienten

Die Fraktionen eines CsCl-Gradienten von HSP S-9 wurden gegen Ellis-puffer pH 10,3 (2.9.1) dialysiert und deren UV-Absorption und Toxizität bestimmt. Für letztere wurden zu je 0,5 ml Probe 0,5 ml 0,02 % Triton X-100 gegeben und je 2 Kohlrondellen darin benetzt. Die Resultate sind in Figur 6 zusammengefasst. Figur 6 a) zeigt die Verteilung des UV-absorbierenden Materials mit Peaks bei F₁ und F₂, sowie absorbierendes nicht partikuläres Material an der Spitze des Gradienten und 6 b) die hervorgerufene Frasshemmung. Die Fraktionen mit F₁ und F₂ sowie die ersten



Figur 6 Verteilung des Toxins im Gradienten
a) Absorption bei 280 nm ; b) hervorgerufene Frasshemmung.

3 Fraktionen des Gradienten zeigten eine toxische Wirkung. Es wurde nicht versucht, das Toxin der einzelnen Fraktionen quantitativ zu erfassen. Der wirkliche Toxingehalt der Fraktionen F_1 und F_2 verglichen mit den ersten Fraktionen des Gradienten ist bedeutend höher als hier zum Ausdruck kommt (praktisch vollständige Frasshemmung).

Da Cäsiumchlorid für Pieris - Larven sehr toxisch ist, kann bei diesem Experiment nicht ausgeschlossen werden, dass die Toxinaktivität von in die Membranen eingelagertem Cäsiumchlorid herrührt. Dieser Versuch wurde deshalb mit den Membranbruchstücken (HSP) aus der nicht toxischen Mutante HB 9-1 wiederholt. In den daraus resultierenden Gradientenfraktionen wurde jedoch keine toxische Aktivität gefunden. Cäsiumchlorid als Verursacher der Toxinaktivität kann somit ausgeschlossen werden.

3.3 Verteilung des Toxins in den Sporenfraktionen

Die bei der Isolierung der Exosporiummembran schrittweise gewonnenen Fraktionen (Figur 3) wurden mit Ellispuffer extrahiert und die Toxizität des Extraktes bestimmt. Die Resultate sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Alle aufgeführten Resultate, mit Ausnahme derjenigen in Klammern (Zahlen in Klammern), wurden aus einem Experiment erhalten, bei dem auch sämtliche Toxinteste zur selben Zeit ausgeführt wurden. Man erhält sonst von Biotest zu Biotest beachtliche Variationen. In der ersten Kolonne sind die toxischen Einheiten aufgeführt, die aus den Fraktionen, ausgehend von 1 mg Sporen (Trockengewicht), extrahiert werden konnten. Die zweite Kolonne zeigt die toxischen Einheiten pro mg extrahiertes Protein (spezifische Toxizität) und die dritte Kolonne den prozentualen Anteil der aus den intakten Sporen extrahierbaren Toxinmenge.

Nach der Ultraschallbehandlung der Sporen, zur Aufbrechung der Exosporiummembran kann mit Ellispuffer bis 50 % mehr Toxin herausgelöst werden. Nach der ersten Zentrifugation zum Abtrennen der Sporen, finden wir fast alles Toxin im "low-speed Pellet" (LSP). Wieviel Toxin davon aus den Sporen selbst und wieviel aus den mitsedimentierten Membranbruchstücken

Tabelle 2 Verteilung des Toxins in den Sporenfraktionen

	toxische Einheiten (mg Sporen) ⁻¹	toxische Einheiten (mg extrahiertes Protein) ⁻¹	% der Anfangs- toxizität
intakte Sporen	600	30'000	100
Sporen nach Ultraschall- behandlung	900	5'000	150
low speed pellet (LSP)	660	10'000	110
low speed supernatant (LSS)	80	360	13
high speed pellet (HSP)	60	630 (3'300)	10
high speed supernatant (HSS)	4	40	1
Fraktion F ₁		(3'000)	
Fraktion F ₂		(2'000)	

herausgelöst wurde, konnte nicht direkt ermittelt werden. Rechnet man jedoch bei der Differentialzentrifugation mit einer Membranausbeute von 20 - 30 %, so müsste etwa die Hälfte des gesamten Sporentoxins in der Exosporiummembran lokalisiert sein.

Der "high-speed Pellet" (HSP) enthält etwa 10 - 20 % des Gesamttoxins. Nur 1 % liegt als lösliches Toxin vor.

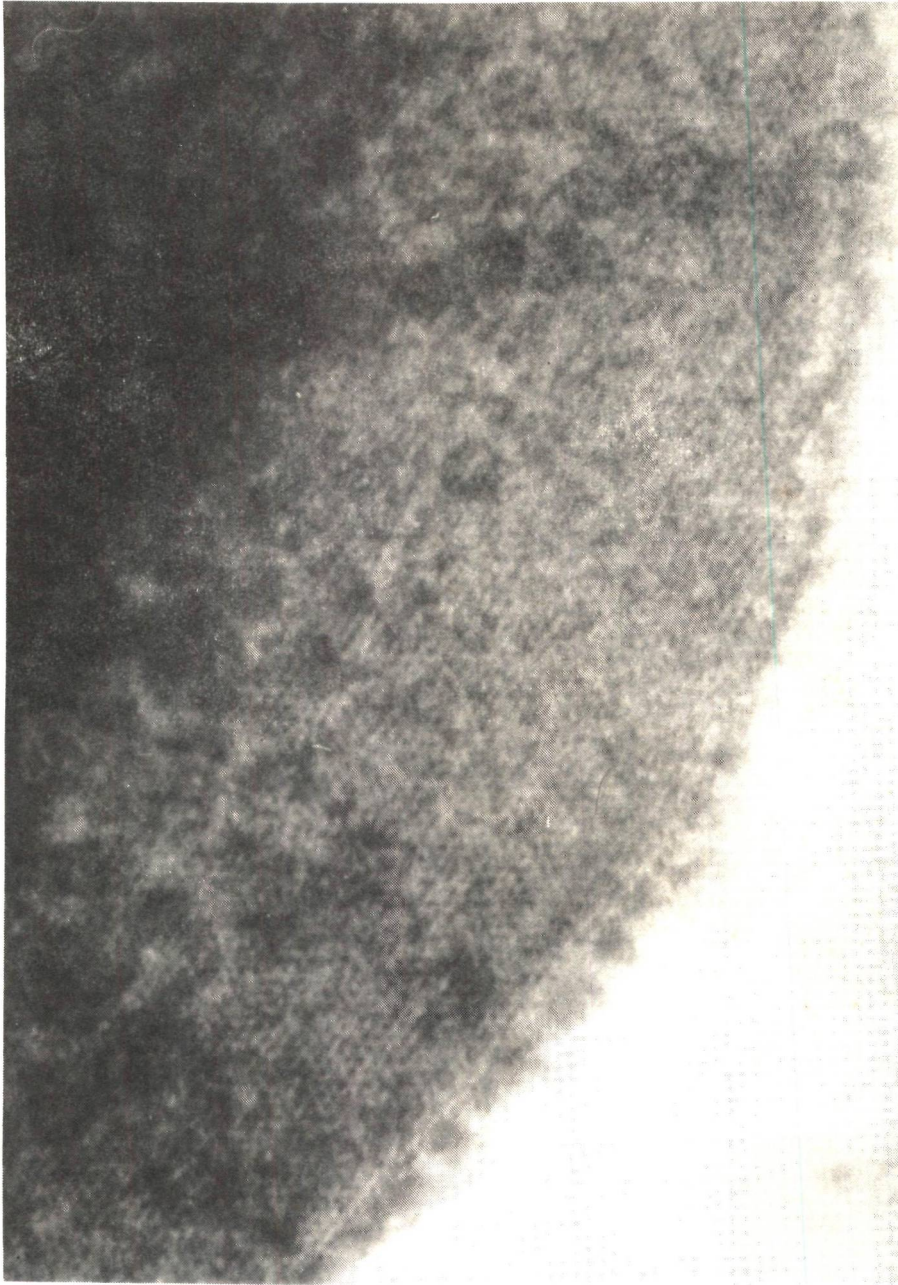
In späteren Experimenten fanden wir im HSP eine ziemlich hohe spezifische Toxinaktivität, die sich gleichmässig auf die Fraktionen F_1 und F_2 verteilte (Zahlen in Klammern). Die spezifische Toxizität von F_1 und F_2 entspricht derjenigen der Kristallextrakte (mit Ellispuffer) von B. thuringiensis S-9 (SOMERVILLE und POCKETT, 1975).

3.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Sporen und den Membranfraktionen F_1 und F_2

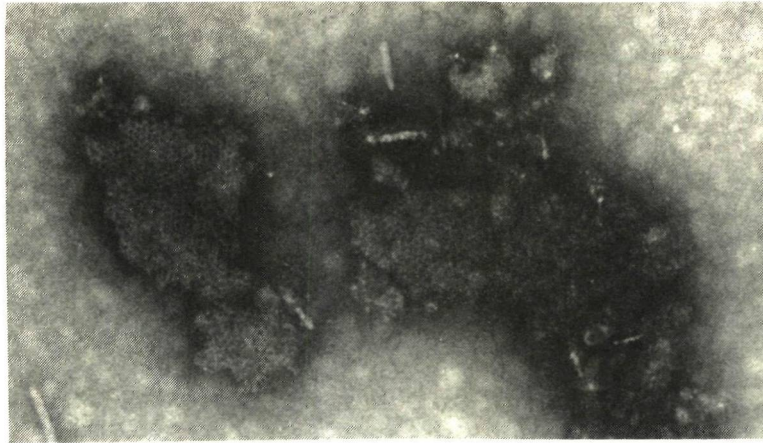
Ziel der elektronenmikroskopischen Arbeiten war ein Vergleich der Kristallstrukturen von Exosporium in ganzen Sporen, Membranfraktionen F_1 und F_2 und Sporenhülle.

Die Figuren 7 - 9 zeigen Aufnahmen von negativ gefärbten Präparaten; Figur 7 einen Teil einer intakten Spore mit dem Exosporium, 8 und 9 die Bruchstücke der Fraktionen F_1 und F_2 . In Figur 7 ist die hexagonale Struktur des Exosporiums gut sichtbar. Diese Struktur finden wir auch wieder in den Fraktionen F_1 und F_2 . Die Gittergrösse von F_1 und F_2 ist aber verschieden. Der Abstand von Punktreihe zu Punktreihe beträgt für F_1 $58 \pm 5 \text{ \AA}$, für F_2 $73 \pm 5 \text{ \AA}$ und die Distanz von Punkt zu Punkt für F_1 $70 \pm 5 \text{ \AA}$, für F_2 $88 \pm 5 \text{ \AA}$. Im Exosporium an intakten Sporen (Figur 7) variiert der Reihenabstand zwischen 68 und 75 \AA . Dies sind Durchschnittswerte gemessen an verschiedenen Präparaten. Eine Ueberlappung der Grenzwerte von F_1 und F_2 wurde nie festgestellt, die beiden Fraktionen scheinen in sich homogen zu sein.

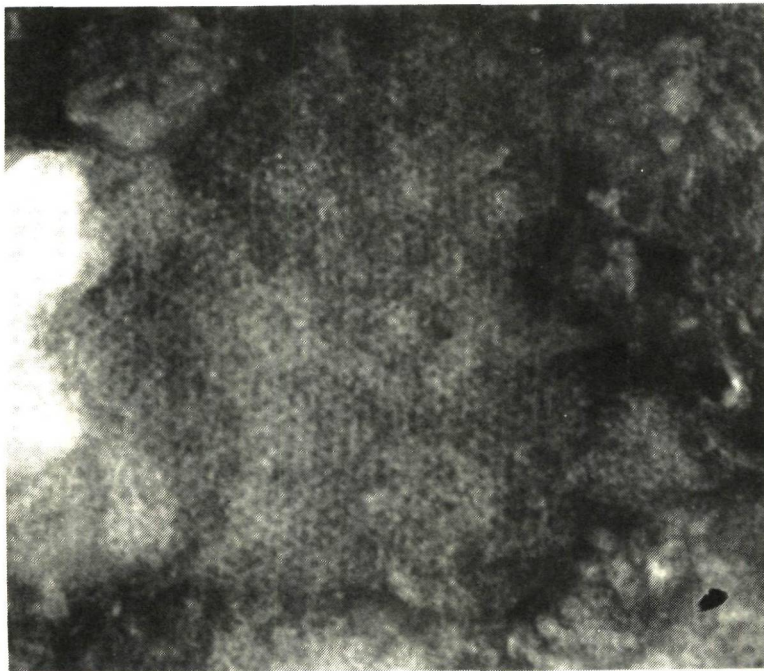
Gleiche Strukturen und Gittergrössen wurden auch in den beiden Fraktionen F_1 und F_2 der kristallnegativen Mutante HB 9-1 beobachtet.



Figur 7 Teil des Exosporiums einer intakten Spore von B. thuringiensis
Vergrößerung: 250'000 x

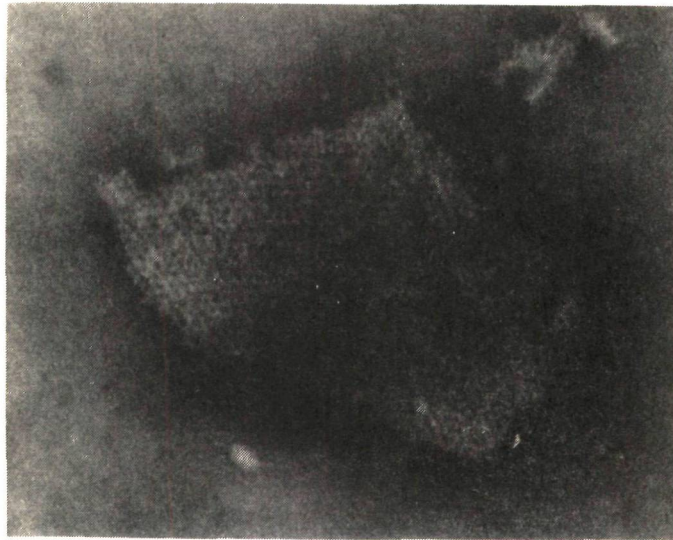


Vergrößerung : 132'000 x

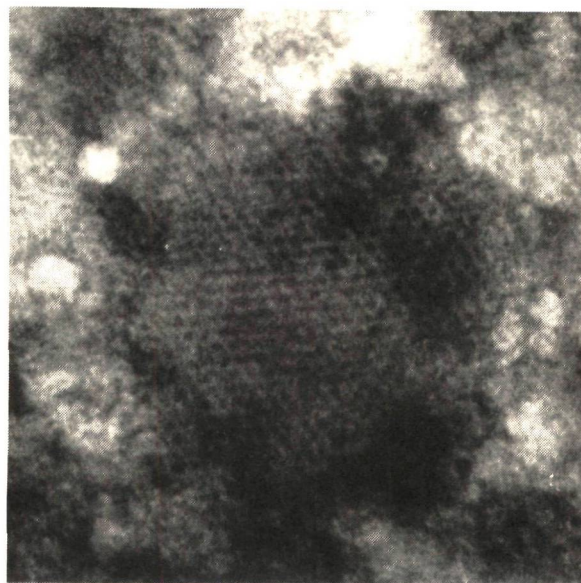


Vergrößerung : 300'000 x

Figur 8 Negativ gefärbte Präparate der Membranfraktion F₁



Vergößerung: 200'000 x



Vergößerung: 240'000 x

Figur 9 Negativ gefärbte Präparate der Membranfraktion F_2

In Tabelle 3 sind die Gittergrößen der Membranfraktionen, der Parasporalkörper und der Sporenhülle miteinander verglichen. Bei diesen Daten handelt es sich um die in Å bestimmten Abstände von Punktreihe zu Punktreihe. Die in der Membranfraktion F_2 ermittelte Gittergröße stimmt etwa mit den im Exosporium an negativ gefärbten intakten Sporen und in gefriergeätzten Präparaten gemessenen Werten überein. Bei der Gefrierätzung (SOMERVILLE, mündliche Mitteilung) ist zu berücksichtigen, dass die Strukturen durch diese Behandlung häufig kleiner werden. Die Gittergröße der Fraktionen F_1 und F_2 unterscheidet sich deutlich von der der Sporenhülle, während die der Fraktion F_2 mit derjenigen der Parasporalkörper übereinstimmt.

Tabelle 3 Die Gittergrößen hexagonaler Strukturen in Präparaten von Bacillus thuringiensis

Präparat	Å
nach Negativfärbung	
Fraktion F_1	54 - 63
Fraktion F_2	68 - 78
Exosporium an Sporen	65 - 75
Parasporalkörper ¹⁾	65 - 80
nach Gefrierätzung	
Exosporium ¹⁾	70 - 75
Sporenhülle ¹⁾	45 - 50

¹⁾ H. SOMERVILLE, mündliche Mitteilung

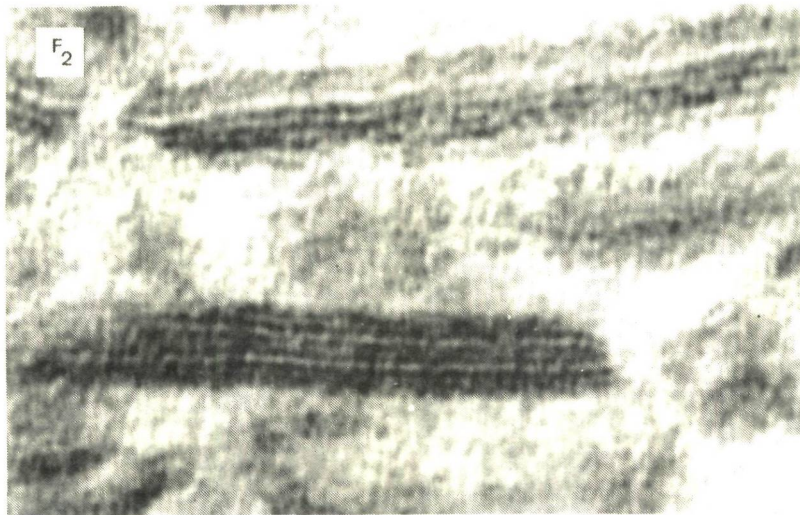
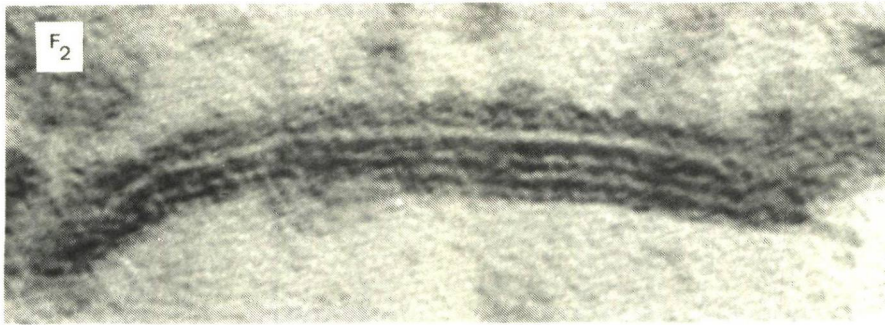
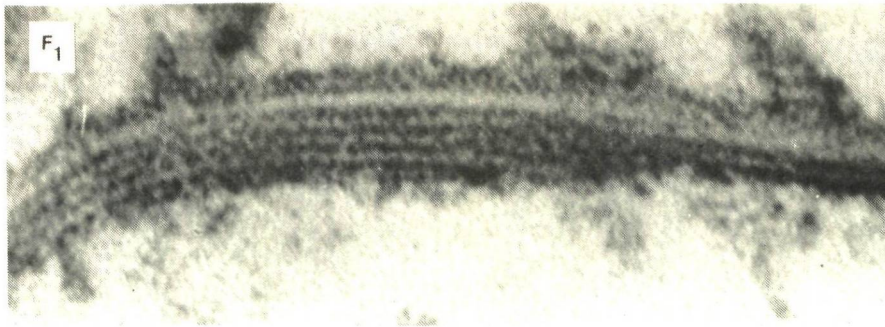
Untersuchungen an Dünnschnitten eingebetteter Proben von F_1 und F_2 zeigen bis zu 7 deutlich unterscheidbare elektronendichte Schichten (Figur 10). Die Gesamtdicke der Membran beträgt 200 - 300 Å. Meistens konnten 3 gleich-grosse elektronendichte Schichten auf jeder Seite einer dickeren, nicht gefärbten Schicht beobachtet werden. Der Abstand zweier elektronendichter Schichten beträgt 40 - 50 Å.

Identische Strukturen sind auch bei den Membranfraktionen der kristall-negativen Mutante beobachtet worden.

Die hexagonale Struktur der Membranfraktionen F_1 und F_2 wird weder durch die Inkubation in reduzierenden Agenzien noch mit proteolytischen Enzymen wie Trypsin, Chymotrypsin und Papain sowie Darmsaft von Pieris brassicae verändert.

3.5 Die Proteine der Membranfraktionen F_1 und F_2

Dissoziierende Lösungsmittel sind zum Abbau der Proteinkristalle von B. thuringiensis geeignet (ANGUS, 1956; COOKSEY, 1968; GLATRON et al., 1972; LECADÉ, 1966 und 1967; SAYLES et al., 1970; SOMERVILLE et al., 1968; TRUEMPI, 1975). Ausserdem ist es möglich, aus Kristall- und Sporenextrakten mit Hilfe serologischer Methoden und einer Acrylamid-Gel-Elektrophorese eine toxische Komponente zu isolieren und zu charakterisieren (DELAFIELD et al., 1968; HERBERT et al., 1971; SOMERVILLE et al., 1968; SOMERVILLE und POCKETT, 1975). Es wurde deshalb versucht, Membranproteine mit gleichen oder ähnlichen Extraktionsmitteln herauszulösen und sie anschliessend mittels SDS-Gel-Elektrophorese aufzutrennen. Die Resultate sollten mit solchen von in den gleichen Lösungsmitteln extrahierten Kristallproteinen von B. thuringiensis verglichen werden. Ferner musste für die serologischen Tests und die Toxinbestimmungen ein geeignetes Lösungsmittel gefunden werden.



Figur 10 Dünnschnitte durch die Membranen der Fraktionen F_1 und F_2
Vergrößerung: 450'000 x

3.5.1 Extraktion der Membranproteine und deren gelelektrophoretische Charakterisierung

Für einige Lösungsmittel sind in Tabelle 4 die extrahierbaren Proteinmengen in % angegeben. Die Bestimmung des Totalgehaltes an Membranprotein wurde wie in 2.7 beschrieben durchgeführt.

Mit 8 M Harnstoff - 1 % Mercaptoäthanol gelang es bei einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37⁰ C, bis zu 40 % der Membranproteine in Lösung zu bringen. Bei der Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 60⁰ C stieg der Anteil an gelöstem Protein nur unwesentlich auf 46 %. Wurde diesem Lösungsmittel noch 1,5 % SDS hinzugefügt, so konnten noch weitere 10 % gelöst werden. Mit dem reduzierenden Puffer nach ELLIS (1961) konnte etwa gleich viel Protein extrahiert werden wie mit Harnstoff - Mercaptoäthanol. Die Werte für Natronlauge waren durchwegs niedriger und lagen um 30 %.

Tabelle 4 Extraktion von Protein aus dem Exosporium (Fraktion F₂) von B. thuringiensis

Lösungsmittel	% gelöstes Protein
Ellispuffer pH 10,3	32 - 40
8 M Harnstoff - 1 % Mercapto- äthanol pH 8,8	a) 37 ⁰ C b) 60 ⁰ C
8 M Harnstoff - 1 % Mercapto- äthanol - 1,5 % SDS pH 8,8	50 - 54
0,1 N Natronlauge	28 - 32

Von den so herausgelösten Membranproteinen drang bei der SDS-Elektrophorese nur ein kleiner Teil in das Gel ein. Der überwiegende Anteil scheint noch so hochmolekular (MG > 300'000) zu sein, dass er vom Gel ausgeschlossen bleibt. Drastischere Inkubationsbedingungen und auch andere Extraktions-

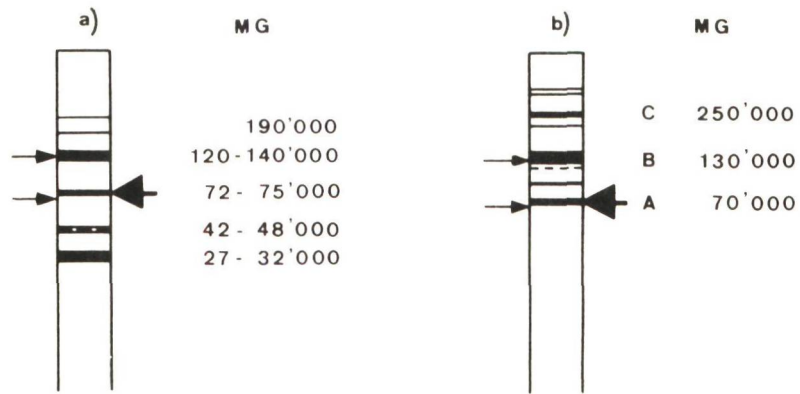
mittel wurden zu Hilfe genommen. Durch Erhitzen des Inkubationsgemisches in einem kochenden Wasserbad während 10 - 20 Minuten konnte das Verhältnis zu Gunsten der eindringenden Proteine verschoben werden. Die besten Resultate erhielten wir schliesslich nach 15 minütigem Kochen der Membranen in :

- I 8 M Harnstoff - 1 % Mercaptoäthanol - 1,5 % SDS; pH 8,8
- II 10 % Glycerin - 5 % Mercaptoäthanol - 2 % SDS in 0,0625 M Tris-puffer pH 6,8
- III 3,3 % Mercaptoäthanol - 0,3 % SDS in 0,03 M Phosphatpuffer pH 7,0

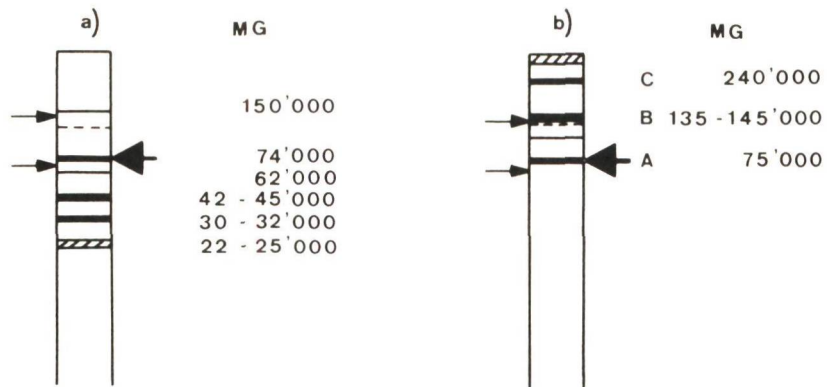
Die Figuren 11 - 13 zeigen die elektrophoretische Auftrennung der mit I - III extrahierten Exosporiumproteine (Fraktion F_2) a) und der Kristallproteine b) in SDS - Gelen. Die dünnen Pfeile markieren die Lage der monomeren (MG = 68'000) resp. dimeren Proteinbande von Rinderserumalbumin.

Die mit den verschiedenen Extraktionsmitteln hergestellten Kristallextrakte zeigen alle im SDS - Gel ein gleiches Bandenmuster, mit den 3 Hauptbanden A, B und C, die einem Molekulargewicht von A = 70'000 - 75'000; B = 130'000 - 150'000 und C = 230'000 - 250'000 entsprechen. Die Proteinbande A ist von HERBERT et al. (1971) als das Kristalltoxin von B. thuringiensis var. tolworthi identifiziert worden. Die extrahierten Exosporiumproteine werden bei der SDS-Gelelektrophorese in 5 - 6 Banden aufgetrennt (Figuren 11 a) - 13 a)). Die Mobilitäten dieser Banden lassen auf Molekulargewichte unter 130'000 schliessen. Bei sämtlichen SDS-Gelen konnte immer wieder eine wenn auch manchmal nur schwache Bande beobachtet werden (dicker Pfeil), die in der gleichen Position läuft wie die A - Bande des Kristalls. Aufgrund dieser Analyse scheint dies die einzige gemeinsame Komponente von Kristall und Exosporium zu sein. Bei dem an der Spitze des Gels aufliegenden färbbaren Material handelt es sich wahrscheinlich um sehr kleine Membranpartikel, die erst nach 1 stündiger Zentrifugation mit 140'000 x g vollständig aus dem Extrakt entfernt werden konnten.

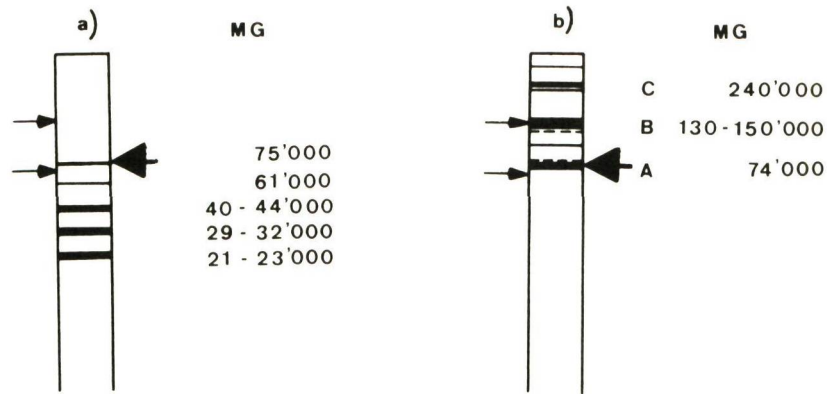
Die extrahierbaren Proteine der Exosporiummembran des Wildtyps und der kristallnegativen Mutante, sowie die der Membranfraktion F_1 unterscheiden sich aufgrund vergleichenden gelelektrophoretischen Untersuchungen nicht.



Figur 11 SDS-Gel-Elektrophorese der in Harnstoff-Mercaptoäthanol-SDS (I) gelösten Exosporiumproteine (a) und Kristallproteine (b)



Figur 12 SDS-Gel-Elektrophorese der in Glycerin-Mercaptoäthanol-SDS (II) gelösten Exosporiumproteine (a) und Kristallproteine (b)



Figur 13 SDS-Gel-Elektrophorese der in Mercaptoäthanol - SDS (III) gelösten Exosporiumproteine (a) und Kristallproteine (b)

Bei der Auftrennung des Trypsinextraktes von F_2 , konnten im SDS-Gel neben der Trypsinbande nur eine weitere schwache Bande gefunden werden, die einem Molekulargewicht von ca. 73'000 entsprach. Diese schien mit derjenigen aus dem Trypsinextrakt von Kristallen des gleichen B. thuringiensis - Stammes übereinzustimmen (SOMERVILLE, unpubl.)

Der Abbau der Exosporiummembran mit Hilfe organischer Lösungsmittel wie Butanol - EDTA in Phosphatpuffer, Phenol und Phenol-Essigsäure-Wasser führte noch zu keinen befriedigenden Resultaten. Einmal musste mit sehr wenig Membranmaterial gearbeitet werden und ausserdem scheint das gewählte Gelsystem für solche Extrakte nicht geeignet zu sein, da vor der elektrophoretischen Auftrennung eine Dialyse der Extrakte gegen NaHCO_3 notwendig war. Bei dieser Dialyse entstand ein Niederschlag, der weder mit Ellispuffer noch mit dem Lösungsmittel für Elektrophorese gelöst werden konnte. Hier müsste ein Gelsystem mit Phenol und Essigsäure als Lösungsvermittler ausgearbeitet werden (WORK, 1964; WORK und WORK, 1969).

3.5.2 Extraktion von aktivem Toxin

Die unter 3.5.1 erwähnten Extrakte wurden gegen 0,015 M NaHCO₃ dialysiert und auf ihre Toxizität geprüft. Die grösste Toxinaktivität wurde im Ellispuffer - Extrakt bestimmt. Die spezifische Aktivität betrug 3000 - 4000 toxische Einheiten/mg Protein. Ausserdem scheint das gelöste Toxin in diesem Puffer stabil zu sein, wurde doch während 48 Stunden bei 4^o C keine messbare Aktivitätsabnahme festgestellt.

Mit 0,1 N Natronlauge und mit 8 M Harnstoff - 1 % Mercaptoäthanol als Extraktionsmittel waren die spezifischen Toxinaktivitäten um 40 - 50 % geringer. Da mit den drei erwähnten Extraktionsmitteln etwa gleich viel Protein aus dem Exosporium herausgelöst wird und nach der Elektrophorese die Bandenmuster in den SDS - Gelen keinen wesentlichen Unterschied zeigen, kann auf eine teilweise Inaktivierung des Toxins geschlossen werden. Mit allen SDS enthaltenden Lösungsmitteln ging die Toxinaktivität vollständig verloren.

Durch die proteolytische Verdauung der beiden Membranfraktionen F₁ und F₂ mit Trypsin und mit Darmsaft von Pieris brassicae konnte aus einer gegebenen Membransuspension gleichviel Toxin herausgelöst werden wie mit Ellispuffer.

Das extrahierte Toxin ist hitzelabil und wird durch 10 minütiges Erhitzen des Extraktes auf 100^o C vollständig zerstört.

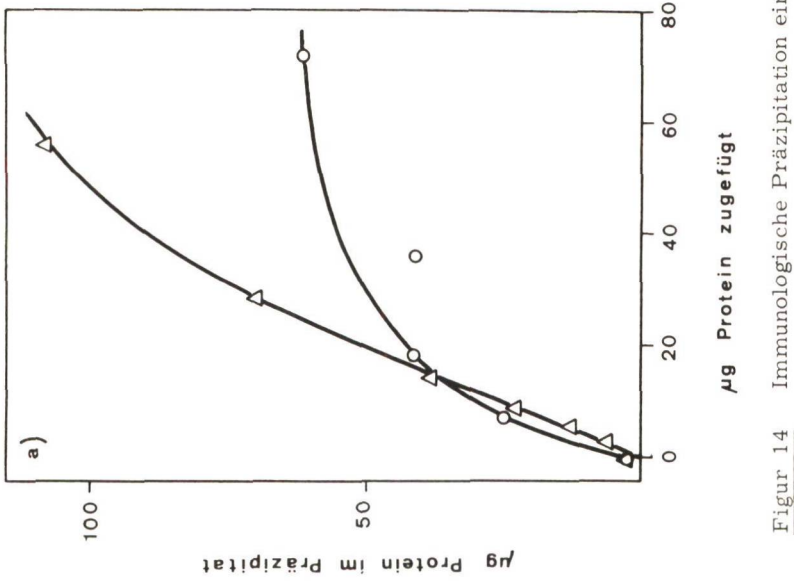
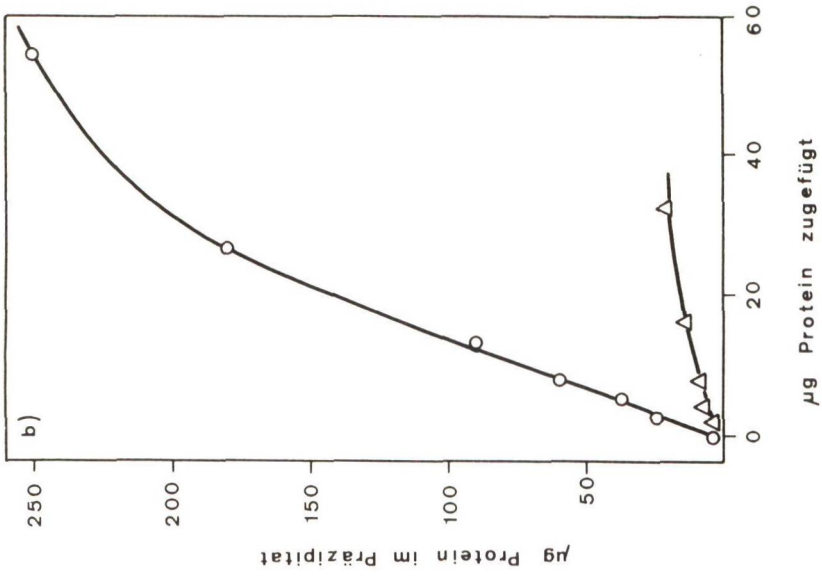
3.6 Immunologische Charakterisierung der Membranfraktionen F₁ und F₂

Mit Hilfe immunologischer Methoden sollte abgeklärt werden, ob das aus dem Exosporium extrahierte Toxin mit dem δ -Endotoxin aus dem Proteinkristall identisch ist und ob noch weitere gemeinsame Komponenten vorhanden sind.

3.6.1 Quantitative Immunopräzipitation

Kristall- und Exosporiumantigene wurden mit Kristall- resp. Exosporiumantiserum präzipitiert und die Menge gebildetes Präzipitat als Protein nach der Methode von LOWRY et al. (1951) bestimmt. Die Figuren 14 - 16 zeigen solche Präzipitationskurven. Auf der x-Achse wurde die Menge Antigen aufgetragen, die zu einer konstanten Menge Antiserum gegeben wurde und auf der y-Achse die Menge Protein im Präzipitat.

In Figur 14 ist das bei der Inkubation des Kristall- resp. Exosporiumextraktes F₂ der Mutante HB 9-1 mit Kristallantiserum (Figur 14 a) und mit Exosporiumantiserum anti F₂ HB 9-1 (Figur 14 b) gebildete Präzipitat aufgezeichnet. Anti F₂ HB 9-1 ist das gegen das Exosporium der kristallnegativen Mutante HB 9-1 gebildete Antiserum. Im Exosporiumextrakt und natürlich auch im Kristallextrakt entstand durch Zugabe von Kristallantiserum ein Präzipitat. Mit dem Exosporiumantiserum anti F₂ HB 9-1 werden hingegen die Kristallantigene nicht, oder nur sehr schwach präzipitiert, während die Exosporiumantigene wie erwartet deutlich ausgefällt werden. In diesem Exosporiumantiserum fehlen also Antikörper gegen Kristallantigene. Da die kristallnegative Mutante HB 9-1 kein Toxin bildet und auch keine Spuren davon im Exosporium gefunden wurden, ist das nicht weiter erstaunlich. Diese Präzipitationsversuche wurden mit dem Antiserum gegen das Exosporium des Wildtyps S-9, anti F₂ S-9, und dem entsprechenden Exosporiumextrakt wiederholt. Daraus resultierten identische Präzipitationskurven wie in Figur 14. Wiederum erhält man eine gute Präzipitation im Exosporiumextrakt mit Kristallantiserum und nur eine schwache im Kristallextrakt mit dem Exosporiumantiserum.



Figur 14 Immunologische Präzipitation eines Exosporiumextraktes der kristallnegativen Mutante und einer Kristalllösung

a) mit Kristallantiserum

b) mit Exosporiumantiserum anti F₂ HB 9-1

△—△ Kristallextrakt, O—O F₂ HB 9-1 Extrakt

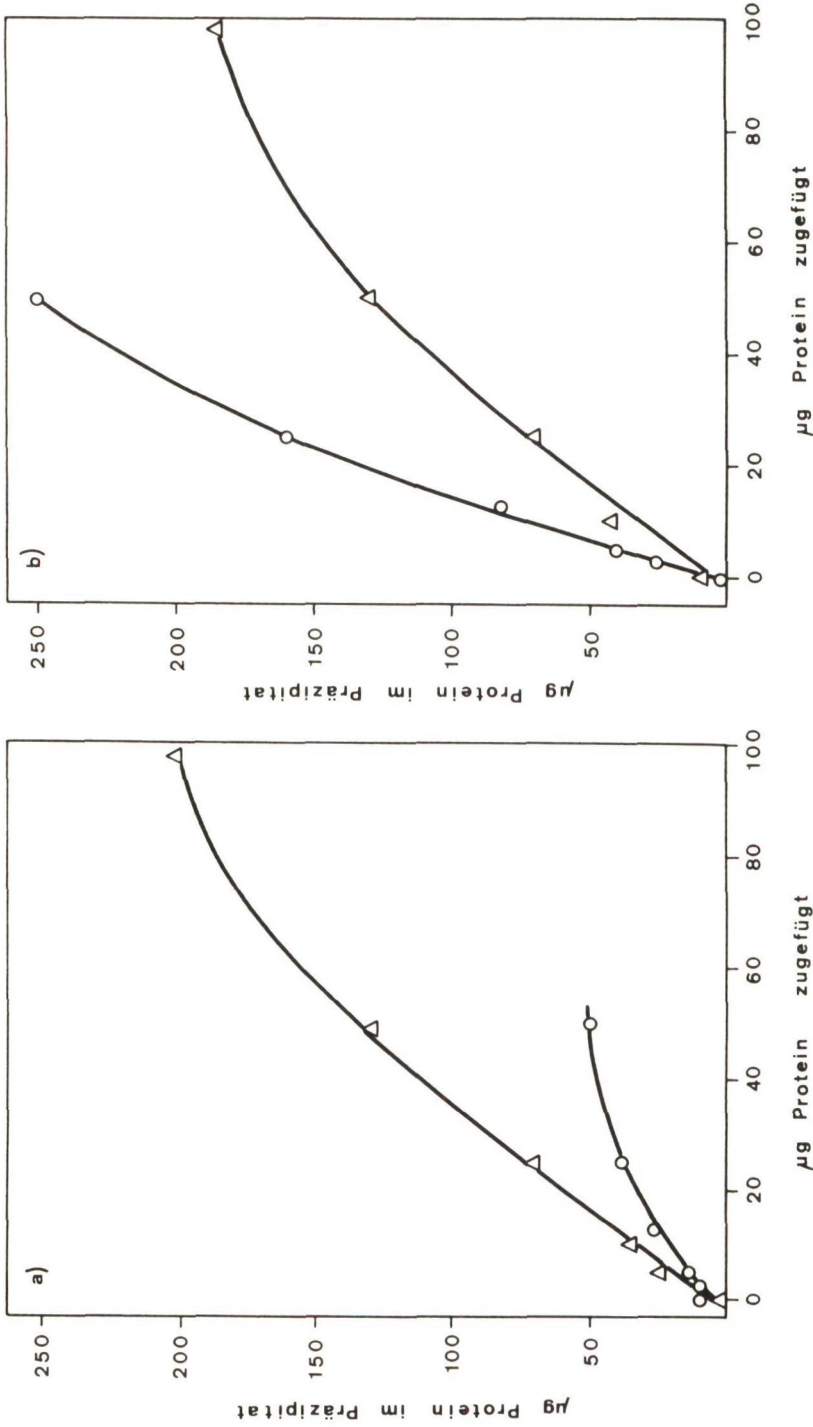
Wird ein Antiserum gegen die mit Ellispuffer extrahierten Proteine des Wildtyp - Exosporiums und den darin unlöslichen Bestandteilen verwendet (anti F₂ S-9 extr., vgl. 2.12.1), erhält man die Präzipitationskurven der Figur 15. Mit diesem Exosporiumantiserum können sowohl Exosporium - als auch Kristallantigene ausgefällt werden (Figur 15 b). Figur 15 a) zeigt die bereits bekannten Präzipitationskurven für den Kristall - resp. Exo - sporiumextrakt mit Kristallantiserum.

Mit dem gegen die Membranfraktion F₁ gebildeten Antiserum anti F₁ S-9 erhält man gleiche Resultate wie mit dem Exosporiumantiserum anti F₂ S-9. F₁ - Antigene können ebenfalls mit Kristall - und Exosporiumantiserum anti F₂ S-9 extr. präzipitiert werden. Daraus resultieren gleiche Präzipitationskurven wie mit F₂ - Antigenen.

HERBERT et al. (1971) isolierten aus einem Kristallextrakt von B. thuringiensis S-9 eine hoch toxische Komponente A. Ein monospezifisches Antiserum gegen dieses Kristallprotein A, anti A, wurde von B. HERBERT freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Im folgenden Experiment wurde geprüft, ob mit diesem monospezifischen Antiserum Exosporiumantigene präzipitiert werden können und umgekehrt, ob das isolierte Protein A mit Exosporiumantiserum reagieren kann. In Figur 16 sind die daraus resultierenden Präzipitationskurven dargestellt. Das Kristallprotein A wird nicht nur mit dem homologen Antiserum anti A und dem Kristallantiserum präzipitiert, sondern auch mit dem Exosporiumantiserum anti F₂ S-9 extr. (Figur 16 a). Zudem können mit dem Antiserum anti A auch Exosporiumantigene präzipitiert werden (Figur 16 b).

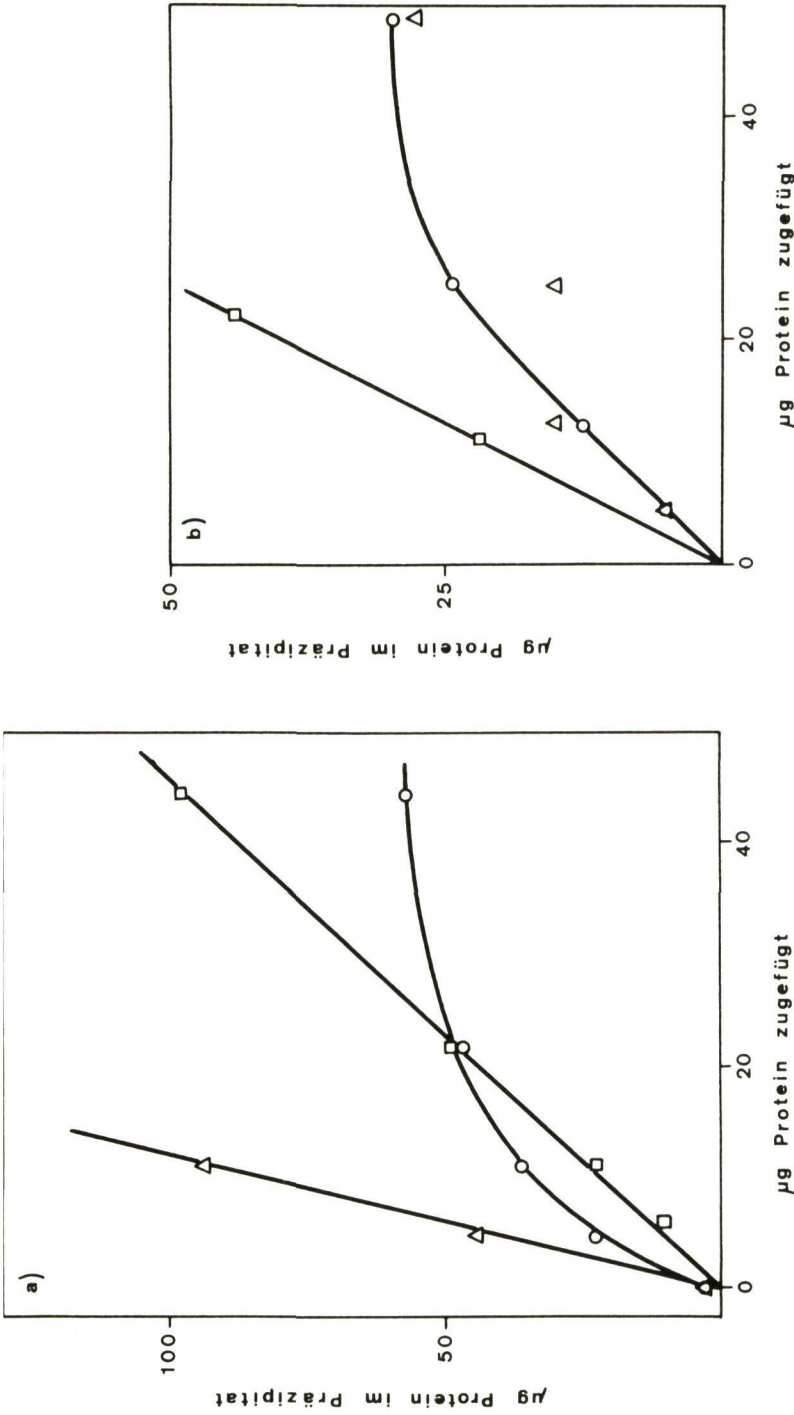
Bei Zugabe gleicher Mengen Kristall - resp. Exosporiumantigene zum Antiserum anti A wird etwa gleich viel Präzipitat gebildet.

Mit normalem Kaninchenserum entstand weder im Kristall - noch im Exosporiumextrakt ein Präzipitat.



Figur 15 Immunologische Präzipitation eines Exosporiumextraktes des Wildtyps S-9 und einer Kristalllösung

- a) mit Kristallantiserum
- △—△ Kristalleextrakt, ○—○ Exosporiumextrakt F₂ S-9
- b) mit Exosporiumantiserum anti F₂ S-9 extr.



Figur 16 Immunologische Präzipitation eines Exosporiumextraktes des Wildtyps, einer Kristalllösung und der isolierten Kristallfraktion A

a) von isolierter Kristallfraktion A mit den Antiseren anti cry Δ — Δ ; anti F₂ S-9 extr. O—O ; anti A \square — \square
 b) von Kristallextrakt Δ — Δ , F₂ S-9 Extrakt O—O , Kristallfraktion A \square — \square mit Antiserum anti A

3.6.2 Doppeldiffusionsreaktionen

Die Doppeldiffusion in zwei Dimensionen hat gegenüber der quantitativen Präzipitation den Vorteil, dass verschiedene Antigene und Antiseren direkt miteinander verglichen werden können. Jedes Antigen-Antikörper-System kann eine eigene Präzipitationslinie bilden, so dass bei Anwesenheit von verschiedenen Antigenen und deren homologen Antikörpern mehrere Linien entstehen können. Manchmal fallen mehrere Linien zusammen. Je nach dem Verlauf dieser Präzipitationslinien können serologisch identische oder partiell identische Antigene in einem Gemisch erkannt werden.

Eine Lösung von Kristallproteinen bildete mit dem homologen Kristallantiserum in Ouchterlony-Platten 3 Präzipitationslinien, A, B und C (Figur 18). Sie enthält somit mindestens 3 verschiedene Antigene. Die 3 Präzipitationslinien lagen manchmal so nahe zusammen, dass sie kaum mehr voneinander unterschieden werden konnten (Figur 17 und 20). Liess man dasselbe Kristallantiserum und einen Exosporiumextrakt (F_2 von S-9) gegeneinander diffundieren, entstand ebenfalls eine Präzipitationslinie (Figur 17 a). Der Verlauf dieser Linie konnte nicht genau ermittelt werden, da sie nur schwach ausgebildet war. Deshalb ist es noch nicht möglich zu sagen, ob dieses mit Kristallantiserum präzipitierte Exosporiumantigen mit einem der drei Kristallantigene identisch ist.

Ein Kristallantiserum wurde mit Exosporiumantigenen absorbiert und in einem Ouchterlony mit einem unbehandelten Kristallantiserum auf die Reaktionsfähigkeit mit einer Kristalllösung geprüft (Figur 18). Durch die Absorption des Kristallantisiums mit den Exosporiumantigenen ging die Reaktionsfähigkeit mit dem Kristallantigen A vollständig verloren (die Präzipitationslinie A fehlt), während diejenige mit den Antigenen B und C unverändert blieb. Die Antikörper gegen das Antigen A sind durch die Exosporiumantigene vollständig absorbiert worden.

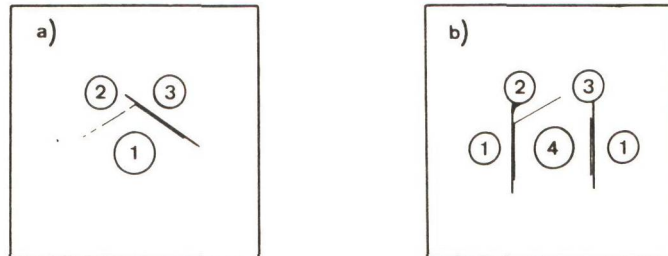
Der Exosporiumextrakt F_2 des Wildtyps S-9 enthält mindestens 3 verschiedene Antigene, die bei der Diffusion gegen Exosporiumantiserum (anti F_2 S-9 extr.) 3 deutlich unterscheidbare Präzipitationslinien bildeten (Figur 19).

Bei der Diffusion eines Kristallextraktes gegen dasselbe Exosporiumantiserum entstand eine einzige Präzipitationslinie (Figuren 17 b und 19). Aus dem Verlauf dieser Präzipitationslinie (Figur 19) geht hervor, dass das präzipitierte Kristallantigen mit dem am schnellsten wandernden Exosporiumantigen serologisch identisch ist. Dass es sich bei diesem gemeinsamen Antigen um das Antigen A handelt, war aufgrund der Resultate des Absorptionsversuches und der Diffusion von Exosporiumantigenen gegen Kristallantiserum zu erwarten und konnte mit Hilfe des monospezifischen Antiserums anti A gezeigt werden (Figur 20). Obwohl sich in diesem Ouchterlony bei der Diffusion der Kristalllösung gegen das Antiserum anti A nur eine etwas diffuse Präzipitationslinie bildete, ist die Homologie mit dem vom Exosporiumantiserum präzipitierten Kristallantigen deutlich sichtbar. Die diffuse Präzipitationslinie von anti A mit dem Antigen A ist auf ein ungünstiges Antigen - Antikörperverhältnis zurückzuführen.

Im Ouchterlony der Figur 20 ist mit dem Exosporiumantiserum und dem Kristallextrakt neben der A - Linie noch eine zweite schwache Linie gebildet worden. Diese konnte nur selten beobachtet werden, und es ist deshalb noch ungewiss, ob es sich hier um ein weiteres gemeinsames Kristallantigen handelt oder um ein Artefakt, das nur bei bestimmten Antigenkonzentrationen auftritt.

Die Reaktionsfähigkeit der beiden Exosporiumantiseren anti F₂ S-9 extr. und anti F₂ HB 9-1 wurde mit einem Kristall - Exosporium - Antigengemisch in einem Ouchterlony verglichen (Figur 21). Sie scheinen sich nur im Vorhandensein der Antikörper gegen das Antigen A zu unterscheiden.

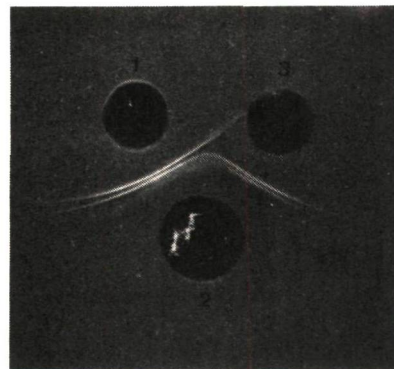
Die beiden Membranfraktionen F₁ und F₂ konnten serologisch nicht voneinander unterschieden werden. Auch die beiden Antiseren anti F₁ S-9 und anti F₂ S-9 scheinen miteinander identisch zu sein.



Figur 17 Präzipitationslinien eines Kristall- und Exosporiumextraktes mit Kristall- und Exosporiumantiserum

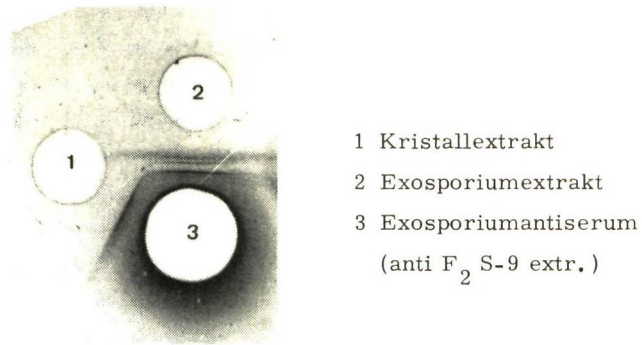
- 1 Kristallantiserum
- 2 Exosporiumextrakt
- 3 Kristallextrakt

- 1 Kristallantiserum
- 2 anti F₂ S-9
- 3 anti F₂ HB 9-1
- 4 Kristallextrakt

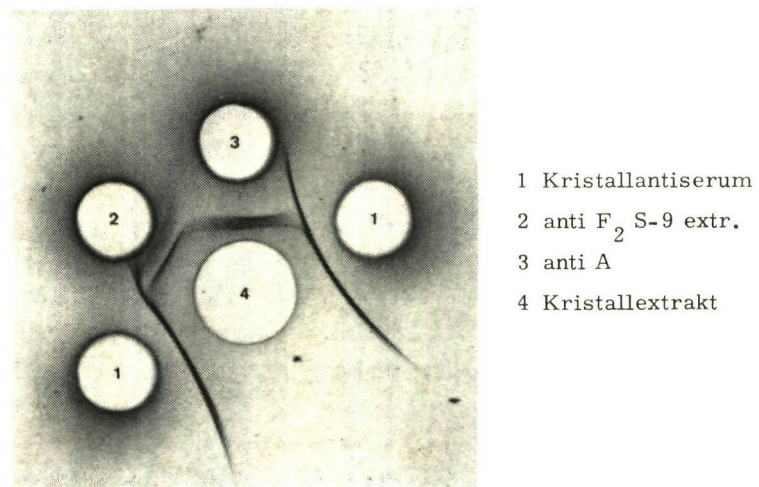


- 1 Kristallextrakt
- 2 Kristallantiserum
- 3 Kristallantiserum absorbiert mit Exosporiumantigenen

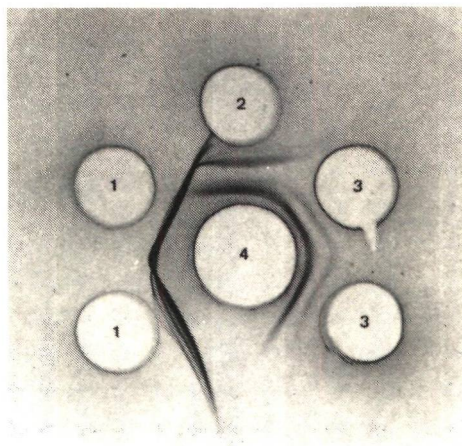
Figur 18 Präzipitationslinien eines Kristallextraktes mit Kristallantiserum und mit dem mit Exosporiumantigenen absorbierten Kristallantiserum



Figur 19 Immunologische Kreuzreaktion eines Kristall- und Exosporium-extraktes



Figur 20 Präzipitationslinien eines Kristallextraktes mit dem monospezifischen Antiserum gegen die Kristallkomponente A, mit dem Kristall- und mit dem Exosporiumantiserum



Figur 21 Präzipitationslinien eines Kristall - Exosporium - Extraktes mit Kristall - und Exosporiumantiserum

- 1 Kristallantiserum
- 2 anti F_2 S-9 extr.
- 3 anti F_2 HB 9-1
- 4 Kristall - Exosporium - Extrakt

3.6.3 Einfluss der Antiseren auf die Aktivität des Kristalltoxins

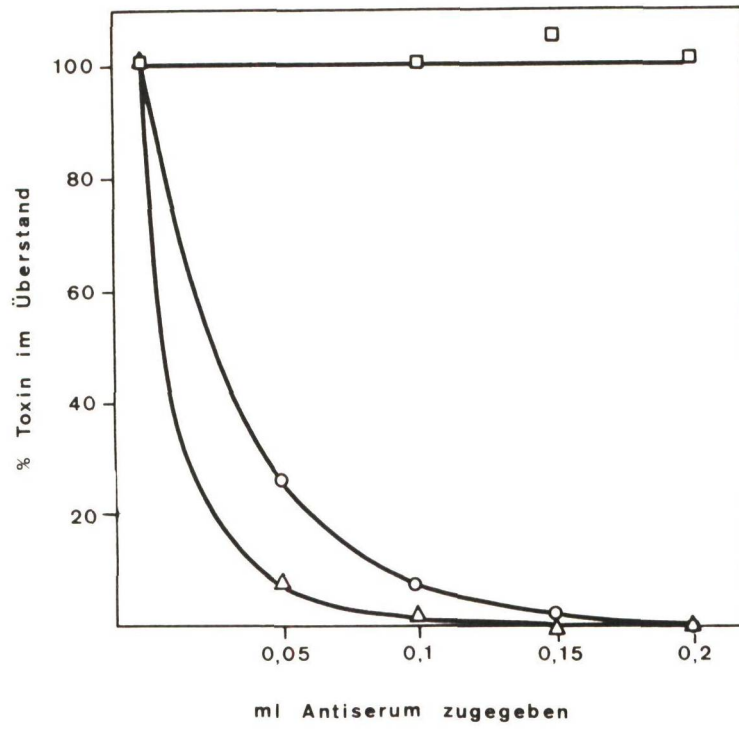
Gereinigte Proteinkristalle von B. thuringiensis S-9 wurden mit Ellispuffer extrahiert, gegen 0,015 M NaHCO₃-Lösung dialysiert und zu je 0,1 ml dieses Kristallextraktes (ca. 0,5 mg Protein/ml) 0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 ml der zu prüfenden Antiseren gegeben. Das Volumen der Proben wurde mit NaHCO₃-Lösung auf 0,4 ml eingestellt. Diese Proben inkubierte man zuerst während 2 Stunden bei 37° C und anschliessend 48 Stunden bei 4° C. Dann wurde das gebildete Präzipitat abzentrifugiert und das Resttoxin im Ueberstand bestimmt.

In Figur 22 ist das Resttoxin in Abhängigkeit der zugegebenen Menge Antiserum aufgetragen. Das Toxin kann nicht nur mit dem Kristallantiserum, sondern auch mit dem Exosporiumantiserum anti F₂ S-9 extr. vollständig präzipitiert werden. Der Titer der Toxinantikörper ist im Kristallantiserum bedeutend höher als im Exosporiumantiserum.

Die toxinpräzipitierenden Antiseren haben zugleich auch eine toxininaktivierende Wirkung. Diese wurde durch die Bestimmung der Toxinaktivität nach zweistündiger Inkubation der Proben mit Antiserum bei 37° C festgestellt. Mit dem Antiserum gegen das Exosporium der kristallnegativen Mutante HB 9-1 konnte weder Kristalltoxin noch Exosporiumtoxin präzipitiert bzw. inaktiviert werden.

Das Exosporiumtoxin lässt sich sowohl mit Exosporiumantiserum anti F₂ S-9 extr. als auch mit Kristallantiserum präzipitieren bzw. inaktivieren.

Normales Kaninchenserum hatte keinen Einfluss auf die Toxinaktivität.



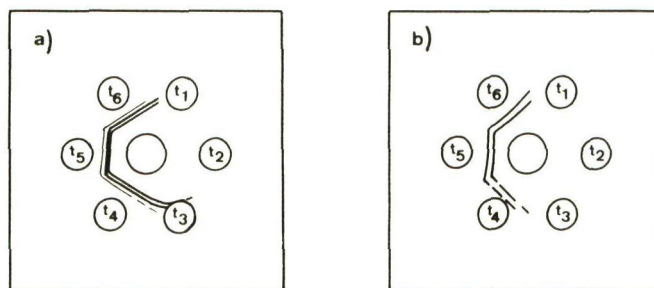
Figur 22 Inaktivierung des Toxins eines Kristallextraktes durch Präzipitation mit den Antiseren anti cry \triangle — \triangle , anti F₂ S-9 extr. \circ — \circ und anti F₂ HB 9-1 \square — \square

3.7 Exosporium - und Kristallantigenbildung

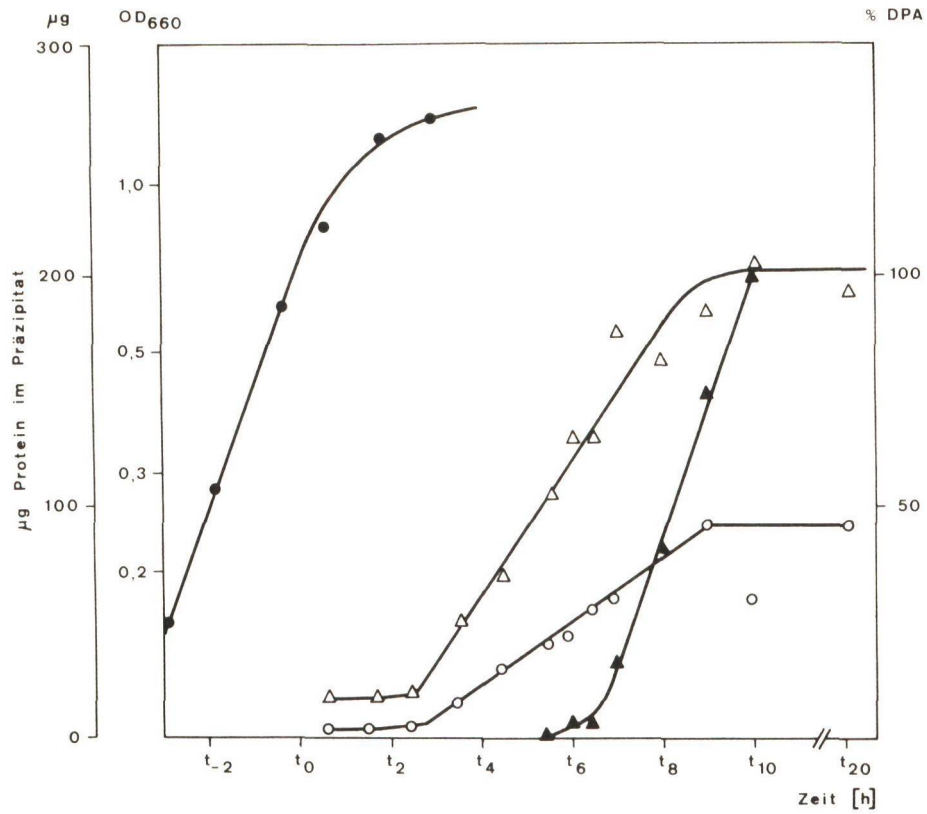
Die Exosporium- und Kristallantigene wurden in Proben einer sporulierenden Kultur durch Immunodoppeldiffusion und quantitativ durch Immunopräzipitation bestimmt (Versuchsordnung vgl. 2.13). Mit Hilfe des Exosporiumantiseraums der kristallnegativen Mutante konnten die Exosporium- und Kristallantigene separat ermittelt werden. Die Zeitwerte sind auf das Ende der exponentiellen Wachstumsphase (t_0) bezogen und als t_x (x = Stunden nach t_0) angegeben.

Bei der Doppeldiffusion konnten die ersten Kristallantigene zur Zeit t_4 (Figur 23 a) beobachtet werden. Die Exosporiumantigene sind zur Zeit t_4 nur sehr schwach und erst bei t_5 gut sichtbar (Figur 23 b).

Die nach Zugabe von Exosporium- resp. Kristallantiserum in den Proben gebildete Menge Präzipitat ist in Figur 24 aufgetragen. Ausserdem ist die Wachstumskurve (OD bei 660 nm) und die gebildete Dipicolinsäure (DPA, in %) aufgezeichnet. Die Exosporium- und Kristallantigene wurden zwischen t_3 und t_4 (entspricht etwa der Sporulationsphase II - III) entdeckt und erreichten ihr Maximum zur Zeit $t_9 - t_{10}$. Die Synthese für den Kristall und das Exosporium dauert ca. 6 Stunden und scheint einen gleichen Verlauf zu nehmen. In einem Experiment wurde gleichzeitig ein Biotest durchgeführt, der zeigte, dass auch das Toxin zur selben Zeit gebildet wird.



Figur 23 Bildung der Kristallantigene (a) und der Exosporiumantigene (b) während der Sporulation



Figur 24 Bildung der Kristall- und Exosporiumantigene während der Sporulation

- △—△ µg Präzipitat mit Kristallantiserum
- µg Präzipitat mit Exosporiumantiserum
- ▲—▲ Dipicolinsäure (DPA), ●—● OD₆₆₀

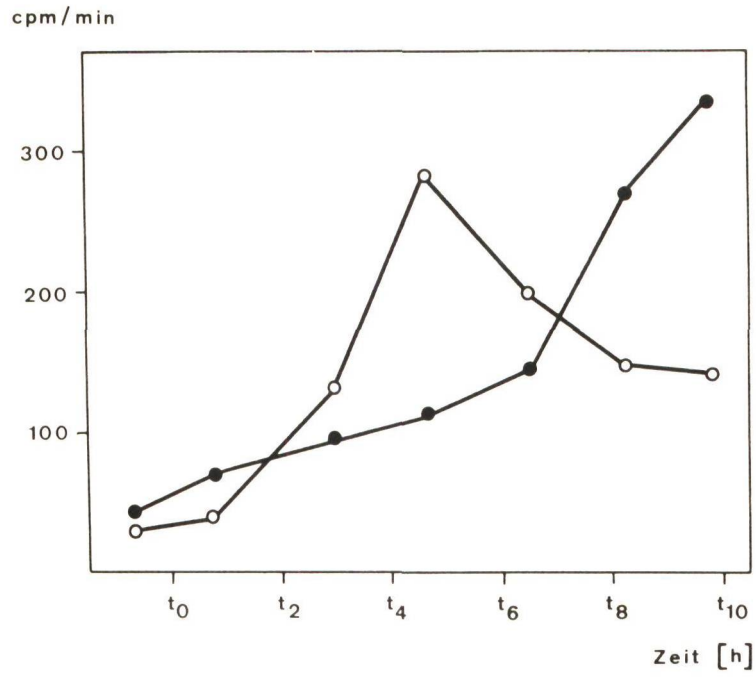
3.8 Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren

Während der Sporulation wurden die Aufnahme­raten für ^{35}S - markiertes Cystein und ^3H - markiertes Leucin in ganze Zellen (vgl. 2.14) miteinander verglichen (Figur 25). Bei diesem Experiment ist die Sporulation bei 28°C durchgeführt worden. Die Exosporium - und Kristallantigene wurden auch hier gleichzeitig synthetisiert (Experiment nicht gezeigt). Die Synthese begann aber ca. 80 Minuten später als bei dem in Figur 24 gezeigten Experiment mit einer Züchtungstemperatur von 30°C .

Die Aufnahme­rate für Leucin entsprach der von SOMERVILLE (1971) gefundenen und zeigte ein Maximum zwischen t_3 und $t_{6,5}$. Die Aufnahme­rate für Cystein stieg während der Zeit von t_0 - $t_{6,5}$ nur leicht, erhöhte sich dann aber zwischen $t_{6,5}$ und t_{10} stark. Für Leucin und Cystein erhalten wir also deutlich verschiedene Aufnahme­raten. Die ersten Exosporium - und Kristallantigene wurden bei diesem Experiment zur Zeit t_5 gefunden und erreichten ihr Maximum bei t_{11} .

Mit Hilfe der "label - chase" Technik wurde die Aufnahme von Cys und Leu in die Membranfraktion (HSP) und in die lösliche Fraktion (HSS) verfolgt (Tabelle 5). Der Einbau von radioaktiv markiertem Leu in den HSP ist etwa 5 x grösser zur Zeit $t_{6,5}$ als zur Zeit $t_{0,8}$, während in all diesen Proben etwa gleichviel markiertes Cys eingebaut wurde. Zwischen $t_{6,5}$ und t_{10} erhöhte sich der Einbau von Cys in den HSP um das 10 fache, während Leu nur verdoppelt wurde. Radioaktives Cystein wird also viel später aufgenommen als Leucin.

Der HSS repräsentiert nur eine der löslichen Fraktionen der Sporen, da die Ultraschallbehandlung unter Bedingungen ausgeführt wurde, die nur das Exosporium von den meisten Sporen trennte, ohne die Sporen aufzubrechen.



Figur 25 Aufnahme von ^3H - Leucin und ^{35}S - Cystein durch eine sporulierende Kultur von B. thuringiensis

- Aufnahmerate für ^3H - Leucin
- Aufnahmerate für ^{35}S - Cystein

Tabelle 5 Einbau von ^3H - Leucin und ^{35}S - Cystein in die Membranfraktion HSP und in die lösliche Fraktion HSS während der Sporulation

Zeit [h]	spezifische Aktivität der Fraktionen 10^{-3} x cpm/mg Protein					
	^3H - Leucin			^{35}S - Cystein		
	LSS	HSP	HSS	LSS	HSP	HSS
t 0,8	13,5	2,8	20,8	17,5	7,1	30,0
t 3,0	49,0	11,8	46,0	23,6	8,3	23,7
t 4,5	52,1	14,1	69,1	20,4	6,9	25,8
t 6,5	49,2	13,6	95,0	24,4	8,3	32,4
t 8,0	42,0	12,4	-	40,6	10,8	49,0
t 10,0	120,0	24,4	82,0	17,7	82,0	94,0

3.9 Analyse des Exosporiums

Die Hauptbestandteile der Fraktion F₂ des Exosporiums sind in der Tabelle 6 aufgeführt. Sie ergeben zusammen das ganze Trockengewicht der Membran.

Tabelle 6 Chemische Zusammensetzung des Exosporiums

Analysierte Komponente	% Trockengewicht
Protein a) aus Aminosäurenanalyse	75
b) nach Lowry bestimmt	44
Total Lipide	25
neutrale Lipide	22,5
Phospholipide	2,5
Kohlenhydrate	2
Nukleinsäuren	0
Dipicolinsäure	0
Total Phosphor	0,55
Phosphor in Phospholipiden	0,1
anorganischer Phosphor	0,06
Total	102,55

Das Exosporium besteht vor allem aus Proteinen und Lipiden. Aus der Ausbeute an Aminosäuren bei der Aminosäurenanalyse wurde ein Proteingehalt von 75 % errechnet. Die direkte Proteinbestimmung nach der Methode von LOWRY et al. (1951) ergab lediglich 44 %. Es konnten also nicht alle Proteine mit Lowry - Reagens D (2.7) herausgelöst werden. Der Anteil an Lipiden betrug 25 %. Er setzte sich aus 2,5 % Phospholipiden, berechnet aus dem Phosphorgehalt des Chloroform - Methanol - Extraktes,

und 22,5 % neutralen Lipiden zusammen. Die mit Anthron reagierenden Kohlenhydrate machen im Exosporium 2 % des Trockengewichtes aus, bei den Sporen 3,6 %. Der Phosphorgehalt im Exosporium betrug 0,55 %. Davon wurden 0,1 % im Chloroform - Methanol - Extrakt und 0,06 % als anorganischer Phosphor bestimmt. Im Exosporium konnten keine Nukleinsäuren und keine Dipicolinsäure nachgewiesen werden.

3.9.1 Aminosäurenanalyse

Die Aminosäurenanalyse der beiden hydrolysierten Membranfraktionen F_1 und F_2 ergab nahezu identische Resultate (Tabelle 7). Nur geringe Unterschiede sind im Glutaminsäure-, Glycin- und Histidingehalt festgestellt worden. Beide Fraktionen wiesen einen hohen Gehalt an hydrophoben Aminosäuren (Leucin, Isoleucin, Valin, Phenylalanin und Prolin) auf. Sie ergaben für F_1 35,2 % und für F_2 34,8 %. Bemerkenswert ist der hohe Anteil an Cysteinsäure. Der hohe Anteil an Cystein konnte durch die Alkylierung mit ^{14}C -markierter Jodessigsäure bestätigt werden. Der dabei bestimmte Anteil (Tabelle 8) ist etwas kleiner. Dies kann möglicherweise damit erklärt werden, dass bei den gewählten Bedingungen nicht alle SH-Gruppen alkyliert wurden, oder durch Freisetzen von freiem alkyliertem Cystein.

Die Aminosäurenanalyse der Fraktion F_2 der kristallnegativen Mutante HB 9-1 ist mit der gezeigten nahezu identisch.

Tabelle 7 Aminosäuren - Zusammensetzung der beiden Fraktionen
F₁ und F₂

Die Resultate sind als $\mu\text{mol}/100 \mu\text{mol}$ Aminosäuren der Probe angegeben. Cyst(e)in wurde nach der Oxidation mit Perameisensäure als Cysteinsäure bestimmt.

	F ₁	F ₂
Asparaginsäure	11,7	11,5
Threonin	6,2	5,6
Serin	3,7	3,8
Glutaminsäure	9,0	7,4
Prolin	6,2	6,8
Glycin	6,9	8,8
Alanin	6,2	5,6
Valin	9,7	8,5
Cysteinsäure	6,9	6,8
Methionin	0,7	0,6
Isoleucin	5,5	5,6
Leucin	8,3	7,4
Tyrosin	Spuren	1,2
Phenylalanin	5,5	6,5
Lysin	6,2	6,2
Histidin	2,1	3,2
Arginin	4,8	4,7
	<hr/>	<hr/>
	99,6	100,2
	<hr/>	<hr/>

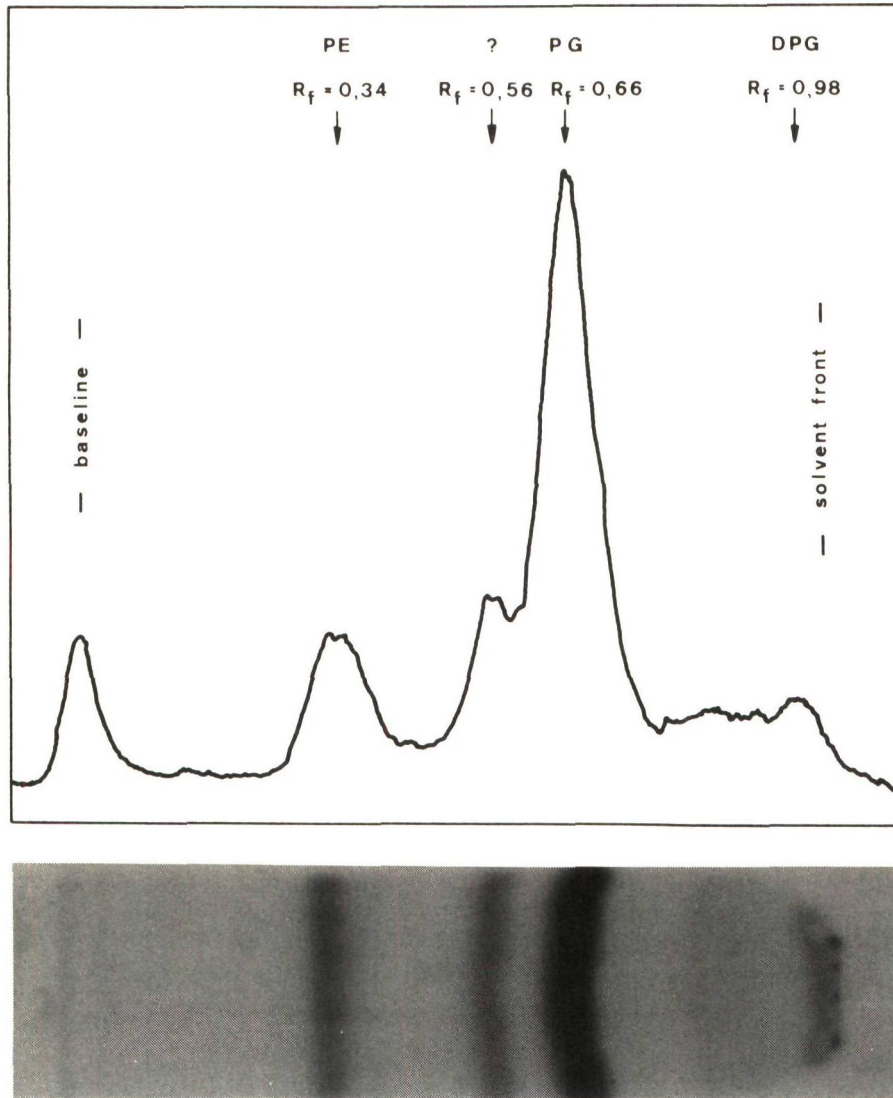
Tabelle 8 Cysteinbestimmung durch Alkylierung mit ^{14}C - Jodessigsäure

Fraktion	Reagens	$\mu\text{mol SH}/$ mg Protein
F ₁ Ueberstand	Ellispuffer	0,17
F ₁ Sediment	Ellispuffer	0,21
F ₂ Ueberstand	Ellispuffer	0,23
F ₂ Sediment	Ellispuffer	0,23
F ₂ Ueberstand	Harnstoff - Mercaptoäthanol	0,17
F ₂ Sediment	Harnstoff - Mercaptoäthanol	0,17

3.9.2 Die Lipide der Fraktionen F₁ und F₂

Die Zusammensetzung der Fettsäuren in den Fraktionen F₁ und F₂ unterscheidet sich nicht. Die Fettsäuren C₁₅, C₁₆, C₁₈ und C₁₈⁻ ergaben zusammen ca. 80 % des totalen Fettsäuregehaltes. Ausser den bereits erwähnten Fettsäuren konnten noch C₁₃, C₁₄, C₁₇ und C₁₇⁻ (zusammen 16 %) bestimmt werden.

Die Phospholipide sind aus den ^{32}P - markierten Membranfraktionen F₁ und F₂ extrahiert und durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennt worden (Figur 26). Als einzige Phospholipide wurden in beiden Fraktionen Phosphatidylglycerin (PG 67 %), Phosphatidylethanolamin (PE 14 %), eine nicht identifizierte Verbindung (17 %) und Spuren von Diphosphatidylglycerin (DPG) gefunden. Bei der unbekanntenen Verbindung könnte es sich um Lyso-phosphatidylethanolamin handeln, das von BULLA und ST. JULIAN (1972) aus Sporen von B. thuringiensis isoliert wurde.



Figur 26 Radiochromatogramm der Phospholipide des Exosporiums (Fraktion F_2)

4 DISKUSSION

Die Versuche zeigen eine hohe Stabilität des Exosporiums. Es lässt sich nur durch drastische Aufschlussmethoden von der Spore trennen. Diese hohe Stabilität ist auch in der Literatur als charakteristische Eigenschaft des Exosporiums beschrieben worden. So waren bei Stämmen von Bacillus cereus einstündige Beschallungszeiten notwendig (BERGER und MARR, 1960).

Bei B. cereus wurde das Exosporium mit Hilfe einer French-Press (GERHARDT und RIBI, 1964) oder mit Ultraschall (BERGER und MARR, 1960) von den Sporen getrennt. Die letztere Methode ist nach unseren Erfahrungen vorzuziehen, weil die Sporen intakt bleiben (vgl. 3.1). Wenn genügend gekühlt wird, kann die Keimung der Sporen und der hieraus resultierende Verlust der Lichtbrechung verhindert werden. Ferner werden bei der Beschallungsmethode höchstens 25 % der Dipicolinsäure (DPA) der Sporen freigesetzt, während beim Aufschliessen mit der French-Press ca. 50 % in die Lösung übergehen (vgl. 3.1). Die DPA scheint im Cytoplasma und in der inneren Vorsporenmembran (IFSM) lokalisiert zu sein (ARONSON und FITZ-JAMES, 1968; GERMAINE und MURRELL, 1973 und 1974; LEANZ und GILVARG, 1973; SCHERRER und GERHARDT, 1972).

In den beiden Membranfraktionen F_1 und F_2 konnte keine DPA nachgewiesen werden. Dies stimmt mit den Resultaten von BERGER und MARR (1960) überein, die zeigen konnten, dass bei B. cereus kein Zusammenhang zwischen der Exosporiummembran und der DPA besteht. Es ist nicht bekannt, welche Veränderung in der Spore notwendig ist, damit Dipicolinsäure austreten kann.

Bei intakten Sporen von B. thuringiensis ist es relativ einfach, durch Negativfärbung das Exosporium im Elektronenmikroskop zu identifizieren, da es die Spore wie eine lose Hülle umgibt. Schwieriger ist es hingegen, genügend stichhaltige Kriterien zur Identifizierung des Exosporiums zu finden, wenn es als Membranfraktion vorliegt. Einmal weisen Sporen-

membranen ähnliche Feinstrukturen auf, und ausserdem besitzt auch die Sporenhülle eine dem Exosporium ähnliche hexagonale Struktur (VAIL und DOUGLAS, 1973; SHORT et al., 1974). Da in früheren Arbeiten die Exosporium - Fragmente nur auf Grund ihrer hexagonalen Struktur identifiziert wurden, muss man sich fragen, ob diese Exosporiumpräparate nicht auch Sporenhüllenfragmente enthielten. Die Aehnlichkeit des Exosporiums und der Sporenhülle zeigte sich auch in vergleichenden serologischen Untersuchungen, wo bei B. thuringiensis in beiden Kristallantigene gefunden wurden (SHORT et al., 1974). Es ist nicht ausgeschlossen, dass noch weitere gemeinsame Komponenten vorhanden sind. Bei unserer Aufschlussmethode konnte keine Veränderung der Spore festgestellt werden. Im Phasenkontrastmikroskop blieb die Lichtbrechung bestehen, und im Elektronenmikroskop konnte zwischen behandelten und unbehandelten Sporen keine Strukturänderung nachgewiesen werden.

Der Anteil der Fraktion F_2 war von Ansatz zu Ansatz ungefähr konstant, während derjenige von F_1 stark variierte. Dies lässt vermuten, dass die beiden Fraktionen aus verschiedenen Teilen der Sporen stammen. Das mengenmässige Verhältnis von $F_1 : F_2$ betrug mindestens 1 : 10.

Die negativ gefärbten Membranbruchstücke der Fraktionen F_1 und F_2 zeigen im Elektronenmikroskop eine ähnliche hexagonale Struktur, jedoch mit unterschiedlicher Gittergrösse. Der Reihenabstand in F_1 betrug $58 \pm 5 \text{ \AA}$, in F_2 $73 \pm 5 \text{ \AA}$. Im Exosporium von intakten Sporen variierte dieser zwischen 65 und 75 \AA . Untersuchungen an gefriergeätzten Sporenpräparaten vom gleichen B. thuringiensis - Stamm (SHORT et al., 1974; SOMERVILLE, unpubl.) zeigten eine hexagonale Struktur im Exosporium, bei einem Reihenabstand von 70 - 75 \AA . Tiefer gelegene hexagonal strukturierte Schichten der Sporenhülle wiesen einen kleineren Reihenabstand von 45 - 50 \AA auf. Die Strukturen von F_1 und F_2 unterscheiden sich also deutlich von der Struktur der Sporenhülle. F_2 scheint die Exosporiumfraktion zu sein. Die Frage nach dem Ursprung von F_1 kann vorläufig nicht beantwortet werden. In ganzen Sporen konnte nie eine Schicht gefunden werden, deren Struktur der Fraktion F_1 entsprochen hätte.

Die hexagonale Struktur des Exosporiums ist auch bei anderen Sporenbildnern beobachtet worden, so z. B. bei B. finitimus (SOMERVILLE et al., 1971; SHORT et al., 1974) mit einem Reihenabstand von 60 - 70 Å in negativ gefärbten Präparaten und von 70 - 80 Å in gefriergeätzten Präparaten. GERHARDT und RIBI (1964) bestimmten im negativ gefärbten Exosporium von B. cereus einen Punkt zu Punkt-Abstand von 68 - 86 Å, was einem Reihenabstand von 59 - 75 Å entspricht. Bei B. megaterium wurde von BEAMAN und Mitarbeitern (1972) einen Punkt zu Punkt-Abstand von 70 Å gemessen. Im Exosporium von Clostridium pasteurianum fanden MACKEY und MORRIS (1972) sowohl bei negativ gefärbten als auch in gefriergeätzten Präparaten zwei unterschiedlich grosse Strukturen. Die Distanz von Punkt zu Punkt betrug 50 Å resp. 100 Å. In einzelnen Präparaten waren beide Strukturgrößen nebeneinander vorhanden.

Dünnschnitte durch eingebettete Membranbruchstücke von F_1 und F_2 zeigen eine lamellenartige Struktur. Es ist jedoch nicht sicher, ob diese durch eine Aneinanderlagerung von Membranbruchstücken während der Präparierung zur Elektronenmikroskopie zustande kam, oder ob wirklich mehrere Schichten in F_1 und F_2 vorhanden sind. Bei früheren elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Dünnschnitten durch ganze Sporen, die nach der gleichen Methode fixiert und eingebettet wurden, konnten - allerdings bei kleinerer Vergrößerung - keine solchen Schichten im Exosporium beobachtet werden (SOMERVILLE, 1971; SOMERVILLE und PILLINGER, unpubl.). Sowohl bei Membranbruchstücken als auch bei Schnitten durch ganze Sporen wurde eine Dicke des Exosporiums von 200 - 300 Å gemessen.

Aehnliche Strukturen wurden im Exosporium anderer Sporenbildner beobachtet. So fanden GERHARDT und RIBI (1964) im Exosporium von B. cereus 3 - 4 elektronendichte Schichten, die etwa 25 Å dick waren und einen Abstand von 50 Å (Zentrum zu Zentrum) aufwiesen. Ausgeprägte lamellenartige Strukturen wurden bei Arten des Genus Clostridium gefunden, z. B. bei C. pasteurianum (MACKEY und MORRIS, 1972) und bei C. botulinum (WALKER, 1970; STEVENSON et al., 1972; STEVENSON und VAUGHN, 1972). Bei C. botulinum konnten im Exosporium bis zu 15 elektronendichte Schichten gezählt werden.

BEAMAN und Mitarbeiter (1972) beobachteten bei B. megaterium planare Einschlüsse, die an der Innenseite des Exosporiums angelagert waren. In Querschnitten wiesen diese eine deutliche Lamellenstruktur auf mit 1 - 20 elektronendichten Schichten in einem Abstand von 55 Å. Ähnliche Einschlüsse sind auch bei B. cereus (GERHARDT und RIBI, 1964) gefunden worden, konnten aber nie in B. thuringiensis festgestellt werden. Wahrscheinlich werden diese Einschlüsse am Exosporium synthetisiert (BEAMAN et al., 1972). Es ist noch nicht erwiesen, ob ein Zusammenhang mit den Parasporalkörpern von B. thuringiensis und vor allem mit B. finitimus besteht, wo der Kristall ja ebenfalls an der Innenseite des Exosporiums gebildet wird.

Die beiden isolierten Membranfraktionen F_1 und F_2 enthalten Toxin mit einer spezifischen Aktivität, die in der gleichen Grössenordnung liegt wie die der Proteinkristalle. Diese Toxinaktivität kann somit nicht von Verunreinigungen mit Kristallen herrühren. Zudem wurden in den beiden Fraktionen nie, weder im Phasenkontrast- noch im Elektronenmikroskop, Kristalle beobachtet. Nach der Ultraschallbehandlung konnte bedeutend mehr Toxin aus den Sporen herausgelöst werden. Es scheint, dass das Toxin nach dieser Behandlung leichter extrahierbar ist. Das Exosporiumtoxin ist wie das Kristalltoxin (SOMERVILLE und POCKETT, 1975) hitzelabil und wird auch in Harnstoff-Mercaptoäthanol und Natronlauge teilweise inaktiviert.

Aus der Verteilung des Toxins in den Sporenfraktionen unter Berücksichtigung der Ausbeute an Membranbruchstücken kann man schliessen, dass mindestens 50 % des gesamten Sporentoxins im Exosporium lokalisiert ist. Das Exosporium ist also nicht der einzige Toxinträger in der Spore. In diese Richtung weisen auch die Resultate von SHORT et al. (1974). Es gelang ihnen, mit ferritinmarkierten Kristallantiseren Kristallantigene in der Sporenhülle elektronenmikroskopisch nachzuweisen.

Aus der immunologischen Charakterisierung geht hervor, dass das Exosporium und der Kristall mindestens ein gemeinsames Antigen besitzen. Gegen dieses Antigen werden sowohl bei der Immunisierung mit Kristall-

als auch mit Exosporiumantigenen Antikörper gebildet. Allerdings war es notwendig, die Exosporiumantigene vorgängig mit Ellispuffer zu extrahieren, da in den Membranbruchstücken andere Determinanten in ihrer Wirkung als Antigene aktiver zu sein scheinen, was sich im Fehlen der entsprechenden Antikörper im Antiserum anti F₂ S-9 manifestiert. Die Absorption der Antikörper anti A aus dem Kristallantiserum mit Exosporiumantigenen weist auf Antigen A als die gemeinsame Komponente hin. Diese Vermutung bestätigen die mit dem monospezifischen Antiserum anti A erhaltenen Resultate. Das Exosporium- und das Kristalltoxin kann mit dem Exosporium- und auch mit dem Kristallantiserum vollständig präzipitiert werden. Somit ist die gemeinsame Komponente Antigen A für die Toxinwirkung in beiden Extrakten verantwortlich. Mit dem Antiserum anti A wird aus dem Kristall- und Exosporiumextrakt etwa die gleiche Proteinmenge ausgefällt. Der prozentuale Toxinanteil scheint im Exosporium- und Kristallextrakt gleich gross zu sein. Dies entspricht den Resultaten des Biotests, bei dem in beiden Extrakten ungefähr die gleiche spezifische Toxinaktivität gefunden wurde.

Die 3 Kristallantigene A, B und C, die auch den 3 Hauptbanden im SDS-Gel entsprechen, sind von NORRIS (1969) in Kristallen des gleichen B. thuringiensis - Stammes gefunden worden. Gleichzeitig stellte er eine hohe toxische Aktivität des Antigens A fest. Dieses Antigen A konnte von HERBERT et al. (1971) isoliert und als die einzige toxische Kristallkomponente identifiziert werden. Letzteres geht auch aus unseren Resultaten hervor. Für das Antigen A wurde bei der SDS-Gelelektrophorese und aus Aminosäureanalysen ein Molekulargewicht von ca. 70'000 bestimmt (B. HERBERT und H. SOMERVILLE, persönliche Mitteilung). Die Endgruppenanalyse deutete auf ein reines Protein hin, das weder mit Trypsin noch mit Darmsaftproteasen von Pieris brassicae weiter abgebaut werden konnte (H. SOMERVILLE, persönliche Mitteilung).

Neben den serologischen Untersuchungen deuten auch die Resultate der SDS-Gelelektrophorese auf die Komponente A als die dem Kristall und Exosporium gemeinsame Komponente hin. Das Bandenmuster der Kristallextrakte im SDS-Gel entspricht den von HERBERT et al. (1971) und SOMERVILLE und POCKETT (1975) gefundenen.

Mit dem Antiserum anti F₂ HB 9-1 gegen das Exosporium der kristallnegativen Mutante konnte die Exosporiumsynthese im Wildtyp S-9 unabhängig von den Kristallantigenen untersucht werden. Die daraus folgenden Resultate zeigen, dass die Exosporium- und Kristallantigene gleichzeitig gebildet werden. Die ersten Kristallproteine sind von LECADÉT und DEDONDER (1971) im gleichen Sporulationsstadium gefunden worden. Die Exosporium- und Kristallsynthese dauert 5 - 6 Stunden und verläuft gleich, d.h. das Verhältnis des Exosporiumproteins zum Kristallprotein ist während der ganzen Synthese konstant. In B. thuringiensis wird das Exosporium zur gleichen Zeit wie der Kristall und vor der Sporenhülle gebildet. Eine ähnliche Sequenz beobachteten MURRELL et al. (1969) und OHYE und MURRELL (1973) in B. cereus. Obwohl die Exosporiumantigene gleichzeitig mit der Kristallsynthese erscheinen, erfolgt die Aufnahme von ³⁵S - markiertem Cystein erst gegen das Ende der Membransynthese. Gleiche Ergebnisse erhielten ARONSON und FITZ - JAMES (1968), die ausgedehnte Einbauversuche mit radioaktiv markierten Aminosäuren in Fraktionen der Sporenhülle bei B. cereus durchführten. Auch die Aufnahmeraten für ³H - Leucin entsprechen während der untersuchten Periode etwa den von ARONSON und FITZ - JAMES (1968) bestimmten.

Das Exosporium besteht hauptsächlich aus Protein und extrahierbaren Lipiden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch Lipoproteine vorhanden sind. Das Exosporium von B. thuringiensis und B. cereus (MATZ et al., 1970) unterscheidet sich vor allem im Polysaccharidgehalt. So bestehen die nach der Methode von GERHARDT und RIBI (1964) isolierten Membranbruchstücke von B. cereus nach MATZ et al. (1970) zu 20 % des Trockengewichtes aus Polysacchariden. Bei B. thuringiensis sind es nur 2 %. Auch weist die Membran in diesen beiden Organismen eine unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung auf. Die Fraktionen F₁ und F₂ von B. thuringiensis enthalten viel Cyst(e)in (6,8 %), wovon 2/3 bei den gewählten Bedingungen alkyliert werden konnten. Einen ähnlich hohen Cysteingehalt fanden KONDO und FOSTER (1967) in der SDS-löslichen parakristallinen Fraktion der Sporenhülle von B. megaterium (8,2 %). Unlösliche Sporenhüllefraktionen enthalten bedeutend weniger Cystein, nämlich 2,3 % bei

B. subtilis (SPUDICH und KORNBERG, 1968) und 3,4 % bei B. cereus (ARONSON und FITZ - JAMES, 1968). Dieser hohe Cystein-Anteil trägt sicher auch zur Schwerlöslichkeit der Membranen bei.

Die Resultate lassen vermuten, dass beide Fraktionen, F_1 und F_2 Bestandteile des Exosporiums sind.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Exosporium von Bacillus thuringiensis wurde durch Ultraschall von den Sporen abgetrennt und mittels Differential- und Gradientenzentrifugation isoliert. Die beiden resultierenden Membranfraktionen F_1 und F_2 wurden im Elektronenmikroskop mit dem Exosporium der intakten Sporen verglichen. Ausserdem wurden vergleichende serologische und gelelektrophoretische Untersuchungen mit den Exosporium- und Kristallproteinen durchgeführt.

Aus den Membranfraktionen F_1 und F_2 , die sich nur in bezug auf ihre Dichte und die Gittergrösse der hexagonalen Struktur unterschieden, konnte ein gegen Pieris brassicae wirksames hitzelabiles Toxin extrahiert werden. Die spezifische Aktivität war mit derjenigen einer Kristalllösung vergleichbar. Dieses Toxin wurde mit Kristallantiserum vollständig inaktiviert. Mit einem gegen das Exosporium gebildeten Antiserum konnte auch das gesamte Kristalltoxin präzipitiert werden. Es zeigte sich, dass das Exosporiumtoxin mit dem Kristalltoxin serologisch identisch ist und wahrscheinlich ebenfalls ein Molekulargewicht von ca. 70'000 besitzt.

Die Synthese des Exosporiums und des Proteinkristalls findet gleichzeitig statt und beginnt zwischen t_3 und t_4 (Zeit in Stunden nach dem Ende der exponentiellen Phase). Sie dauert ca. 6 Stunden. Parallel dazu erfolgt auch die Toxinsynthese.

Das Exosporium ist vor allem aus Proteinen (ca. 75 %) und Lipiden (ca. 25 %) aufgebaut. Die Proteine sind schwer löslich und zeichnen sich durch einen hohen Cysteingehalt (ca. 6,8 % der Aminosäuren) aus. Die Lipide sind aus 90 % neutralen Lipiden und 10 % Phospholipiden zusammengesetzt. Es konnten lediglich 2 % Polysaccharide nachgewiesen werden.

6 L I T E R A T U R

- Anfinsen, C.B. and Haber, E., 1961. Studies on the reduction and reformation of protein disulfide bonds. *J. Biol. Chem.*, 236, 1361 - 1363.
- Angus, T.A., 1954. A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. *Nature*, 173, 545 - 546.
- Angus, T.A., 1956. Association of toxicity with protein-crystalline inclusions of Bacillus sotto Ishiwata. *Can. J. Microbiol.*, 2, 122 - 131.
- Angus, T.A., 1968. The use of Bacillus thuringiensis as a microbial insecticide. *World Rev. Pest Control*, 7, 11.
- Angus, T.A., 1971. Bacillus thuringiensis as a microbial insecticide. In *Naturally Occurring Insecticides*. Jacobsen, M. & Crobsy, D.G., Eds., 463. Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y.
- Arescaldino, I., 1969. Sensibilité différentielle à l'érythromycine de la sporogénèse et de la cristallogénèse de Bacillus thuringiensis. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 269, 1132 - 1135.
- Aronson, A., 1965. Membrane-bound messenger RNA and polysomes in sporulating bacteria. *J. Mol. Biol.*, 13, 92 - 104.
- Aronson, A. and Fitz-James, P., 1968. Biosynthesis of bacterial spore coats. *J. Mol. Biol.*, 33, 199 - 212.
- Beaman, C., Pankratz, S. and Gerhardt, P., 1971. Paracrystalline sheets reaggregated from solubilized exosporium of Bacillus cereus. *J. Bacteriol.*, 107, 320 - 324.
- Beaman, C., Pankratz, S. and Gerhardt, P., 1972. Ultrastructure of the exosporium and underlying inclusions in spores of Bacillus megaterium strains. *J. Bacteriol.*, 109, 1198 - 1209.
- Berger, J.A. and Marr, A.G., 1960. Sonic disruption of spores of Bacillus cereus. *J. gen. Microbiol.*, 22, 147 - 157.
- Berliner, E., 1915. Ueber die Schlafsucht der Mehlmottenraupe (Ephestia kühniella Zell.) und ihren Erreger Bacillus thuringiensis. *Ztschr. angew. Entomol.*, 2, 29 - 56.
- Bertsch, L.L., Bensen, P.P.M. and Kornberg, A., 1969. Biochemical studies of bacterial sporulation and germination. *J. Bacteriol.*, 98, 75 - 81.

- Bligh, E.G. and Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911 - 917.
- Bond, R.P.M., Boyce, C.B., Rogoff, M.H. and Shieh, T.R., 1971. The thermostable exotoxin of Bacillus thuringiensis. In: *Microbial Control of Insects and Mites*. Burges, H.D. and Hussey, N.W., Eds., 275 - 303. Academic Press, New York and London.
- Bulla, L.A. and St. Julian, G., 1972. Lipid metabolism during bacterial growth and sporulation: Phospholipid pattern in Bacillus thuringiensis and Bacillus popilliae. In: *Spores V*, Halvorson, H.O., Hanson, R. and Campbell, L.L., Eds., 191 - 196. American Society for Microbiology, Washington D. C.
- Burgerjon, A. and Martouret, D., 1971. Determination and significance of the host spectrum of Bacillus thuringiensis. In: *Microbial Control of Insects and Mites*. Burges, H.D. and Hussey, N.W., Eds., 305 - 325. Academic Press, New York and London.
- Chapman, G.B., 1956. Electron microscopy of ultra-thin sections of bacteria. II. Sporulation of Bacillus megaterium and Bacillus cereus. *J. Bacteriol.*, 71, 348 - 355.
- Chen, P.S., Toribara, T.Y. and Warner, H., 1956. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.*, 28, 1756 - 1758.
- Cleland, W.W., 1964. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH-groups. *Biochem.*, 3, 480 - 482.
- Cooksey, K.E., 1968. Purification of a protein from Bacillus thuringiensis toxic to larvae of Lepidoptera. *J. Biochem.*, 106, 445 - 455.
- Crowle, A.J., 1960. *Immunodiffusion*. Academic Press, New York and London.
- De Boer, T.J. and Backer, H.J., 1954. A new method for the preparation of diazomethane. *Rec. Trav. Chim.*, 73, 229 - 234.
- Delafield, F.P., Somerville, H.J. and Rittenberg, S.C., 1968. Immunological homology between crystal and spore protein of Bacillus thuringiensis. *J. Bacteriol.*, 96, 713 - 720.
- Dittmer, J.C. and Wells, M.A., 1969. Quantitative and qualitative analysis of lipids and lipid components. In: *Methods in Enzymology*, Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., Vol. 14, 493, Academic Press, New York and London.

- Dulmage, H. T., 1970. Production of the spore δ -endotoxin complex by variants of Bacillus thuringiensis in two fermentation media. J. Invertebr. Pathol., 16, 385 - 389.
- Dulmage, H. T., 1971. Production of δ -endotoxin by eighteen isolates of Bacillus thuringiensis, serotype 3, in 3 fermentation media. J. Invertebr. Pathol., 18, 353 - 358.
- Ellis, D. A., 1961. A new universal buffer system. Nature, 191, 1099 - 1100.
- Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 266, 497 - 509.
- Gerhardt, P. and Ribi, E., 1964. Ultrastructure of the exosporium enveloping spores of Bacillus cereus. J. Bacteriol., 88, 1774 - 1789.
- Germaine, G.R. and Murrell, W.G., 1973. Effect of dipicolinic acid on the ultraviolet radiation resistance of Bacillus cereus spores. Photochem. Photobiol., 17, 145 - 154.
- Germaine, G.R. and Murrell, W.G., 1974. Use of ultraviolet radiation to locate dipicolinic acid in Bacillus cereus spores. J. Bacteriol., 118, 202 - 208.
- Glatron, M.F., Lecadet, M.M. and Dedonder, R., 1972. Structure of the parasporal inclusions of Bacillus thuringiensis Berliner. Characterization of a repetitive subunit. Europ. J. Biochem., 30, 330 - 338.
- Hannay, C.L., 1953. Crystalline inclusions in aerobic sporeforming bacteria. Nature, 172, 1004.
- Hannay, C.L., 1956. Inclusions in bacteria. Symposium Soc. Gen. Microbiol. 6th, 318 - 340.
- Hannay, C.L. and Fitz-James, P., 1955. The protein crystals of Bacillus thuringiensis Berliner. Can. J. Microbiol., 1, 694 - 710.
- Hassid, W.Z. and Abraham, S., 1957. Chemical procedures for analysis of polysaccharides. In: Methods in Enzymology, Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., Vol. 3, 34 - 36. Academic Press, New York and London.
- Heimpel, A.M., 1967. A critical review of Bacillus thuringiensis Berliner and other crystalliferous bacteria. Annu. Rev. Entomol., 12, 287.

- Herbert, B.N., Gould, H.J. and Chain, E.B., 1971. Crystal protein of Bacillus thuringiensis var. tolworthi. Subunit structure and toxicity to Pieris brassicae. Europ. J. Biochem., 24, 366 - 375.
- Holmes, K.C. and Monro, R.E., 1965. Studies on the structure of parasporal inclusions from Bacillus thuringiensis. J. Mol. Biol., 14, 572 - 581.
- Janssen, F.W., Lund, A.J. and Anderson, L.E., 1958. Colorimetric assay for dipicolinic acid in bacterial spores. Science, 127, 26 - 27.
- Kellenberger, E., Ryter, A. and Séchaud, J., 1958. Electron microscope studies of DNA-containing plasms. II. Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleosids in different physiological states. J. Biophys. Biochem. Cytol., 4, 671 - 678.
- Kondo, M. and Foster, J.W., 1967. Chemical and electron microscope studies of fractions prepared from coats of Bacillus spores. J. Gen. Microbiol., 47, 257 - 271.
- Krieg, A., 1968. A taxonomic study of Bacillus thuringiensis Berliner. J. Invertebr. Pathol., 12, 366 - 378.
- Labaw, L.W., 1964. The structure of Bacillus thuringiensis Berliner crystals. J. Ultrastruct. Res., 10, 66 - 75.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage P 4. Nature, 227, 680 - 685.
- Leanz, G. and Gilvarg, C., 1973. Dipicolinic acid location in intact spores of Bacillus megaterium. J. Bacteriol., 114, 455 - 456.
- Lecadet, M.M., 1966. La toxine figurée de Bacillus thuringiensis. Dissolution par action du thioglycolate ou de la cystéine. C. r. Acad. Sci., Paris, 262, 195 - 198.
- Lecadet, M.M., 1967. Action comparée de l'urée et du thioglycolate sur la toxine figurée de Bacillus thuringiensis. C. r. Acad. Sci., Paris, 264, 2847 - 2850.
- Lecadet, M.M. and Dedonder, R., 1971. Biogenesis of the crystalline inclusion of Bacillus thuringiensis during sporulation. Europ. J. Biochem., 23, 282 - 294.
- Lecadet, M.M., Chevrier, G. and Dedonder, R., 1972. Analysis of a protein fraction in the spore coats of Bacillus thuringiensis. Comparison with crystal protein. Europ. J. Biochem., 25, 349 - 358.

- Lowry, D.H., Rosenbrough, M., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin-phenol-reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265 - 275.
- Luft, J.M., 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9, 409 - 414.
- Mackey, B.M. and Morris, J.G., 1972. The exosporium of Clostridium pasteurianum. *J. Gen. Microbiol.*, 73, 325 - 338.
- Maddy, A.H., Dunn, M.J. and Kelly, P.G., 1972. The characterization of membrane proteins by centrifugation and gel electrophoresis. A comparison of proteins prepared by different methods. *Biochem. Biophys. Acta*, 288, 263 - 276.
- Matz, L.L., Beaman, T.C. and Gerhardt, P., 1970. Chemical composition of exosporium from spores of Bacillus cereus. *J. Bacteriol.*, 101, 196 - 201.
- Miller, E.L. and Carpenter, K.J., 1964. Availability of sulphur amino-acids in protein foods. I. - Total sulphur amino-acid content in relation to sulphur and nitrogen balance studies with the rat. *J. Sci. Fd. Agric.*, 15, 810 - 820.
- Monro, R.E., 1961 a. Serological studies of the formation of protein parasporal inclusions in Bacillus thuringiensis. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 11, 321 - 331.
- Monro, R.E., 1961 b. Protein turnover and the formation of protein inclusions during sporulation of Bacillus thuringiensis. *Biochem. J.*, 81, 225 - 232.
- Murrell, W.G., 1967. The biochemistry of the bacterial endospore. *Adv. Microbiol. Physiol.*, 1, 133 - 251.
- Murrell, W.G., Ohye, D.F. and Gordon, R.A., 1969. Cytological and chemical structure of the spore. In: *Spores IV*, Campbell, L.L., Ed., American Society for Microbiology, Bethesda, 1 - 19.
- Norris, J.R., 1961. Bacteriophages of Bacillus cereus and of crystal-forming insect pathogens related to Bacillus cereus. *J. Gen. Microbiol.*, 26, 167.
- Norris, J.R., 1969. Macromolecule synthesis during sporulation of Bacillus thuringiensis. In: *Spores IV*, Campbell, L.L., Ed., American Society for Microbiology, Bethesda, 45 - 58.
- Norris, J.R., 1970. Sporeformers as Insecticides. *J. Appl. Bacteriol.*, 33, 192 - 206.

- Norris, J.R., 1971. The protein crystal toxin of Bacillus thuringiensis: Biosynthesis and physical structure. In: Microbial Control of Insects and Mites. Burges, H.D. and Hussey, N.W., Eds., 229 - 246. Academic Press, London and New York.
- Norris, J.R. and Watson, D.H., 1960. An electron microscope study of sporulation and protein crystal formation in Bacillus cereus var. alesti. J. Gen. Microbiol., 22, 744 - 749.
- Norris, J.R., Hewett, A.J.W., Kingham, W.H. and Perry, P.C.B., 1970. In: Automation Mechanisation and Data Handling in Microbiology. Baillie, A. and Gilbert, R.H., Eds., 151. Academic Press, New York and London.
- Ohye, D.F. and Murrell, W.G., 1973. Exosporium and spore coat formation in Bacillus cereus T. J. Bacteriol., 115, 1179 - 1190.
- Ouchterlony, O., 1948. Antigen-antibody reactions in gels. Acta. Path. Microbiol. Scand., 25, 186 - 191.
- Ouchterlony, O., 1958. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy, 5, 1 - 78.
- Prasad, S.S.S.V. and Shethna, Y.I., 1974. Purification, crystallization and partial characterization of the antitumour and insecticidal protein subunit from the δ -endotoxin of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis. Biochim. Biophys. Acta, 363, 558 - 566.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 17, 208 - 212.
- Ribier, J. et Lecadet, M.M., 1973. Etude ultrastructurale et cinétique de la sporulation de Bacillus thuringiensis var. Berliner 1715. Remarques sur la formation de l'inclusion parasporale. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 124, A, 311 - 344.
- Sacks, L.E. and Alderton, G., 1961. Behavior of bacterial spores in aqueous polymer two-phase systems. J. Bacteriol., 82, 331 - 341.
- Sayles, V.B., Aronson, J.N. and Rosenthal, A., 1970. Small polypeptide components of the Bacillus thuringiensis parasporal crystalline inclusion. Biochem. Biophys. Res. Comm., 41, 1126 - 1133.
- Scherrer, R. and Gerhardt, P., 1972. Location of calcium within Bacillus spores by electron probe X-ray microanalysis. J. Bacteriol., 112, 559 - 568.

- Scherrer, P., Lüthy, P. and Trümpi, B., 1973. Production of δ -endo-toxin by Bacillus thuringiensis as a function of glucose concentrations. Appl. Microbiol., 644 - 646.
- Schneider, W.C., 1957. Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. In: Methods in Enzymology III, Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., Eds., 680 - 684. Academic Press, New York and London.
- Shapiro, A.L., Vinuela, E. and Maizel, J.V. Jr., 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem. Biophys. Res. Comm., 28, 815 - 820.
- Short, J.A., Walker, P.D., Thomson, R.O. and Somerville, H.J., 1974. The fine structure of Bacillus finitimus and Bacillus thuringiensis spores with special reference to the location of crystal antigen. J. Gen. Microbiol., 84, 261 - 276.
- Smirnoff, W.A., 1963. The formation of crystals in Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner before sporulation at low temperature incubation. J. Insect. Pathol., 5, 242 - 250.
- Somerville, H.J., 1971. Formation of the parasporal inclusion of Bacillus thuringiensis. Europ. J. Biochem., 18, 226 - 237.
- Somerville, H.J., 1973. Microbial toxins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 217, 93 - 108.
- Somerville, H.J., Delafield, F.P. and Rittenberg, S.C., 1968. Biochemical homology between crystal and spore protein of Bacillus thuringiensis. J. Bacteriol., 96, 721 - 726.
- Somerville, H.J., Delafield, F.P. and Rittenberg, S.C., 1970. Urea-mercaptoethanol-soluble protein from spores of Bacillus thuringiensis and other species. J. Bacteriol., 101, 551 - 560.
- Somerville, H.J. and James, C.R., 1970. Association of the crystalline inclusion of Bacillus thuringiensis with the exosporium. J. Bacteriol., 102, 580 - 583.
- Somerville, H.J., James, C.R., Ruffell, R.N. and Norris, J.R., 1971. The parasporal inclusion of Bacillus finitimus. In: Spore Research 1971. Barker, A.N., Gould, G.W. and Wolf, J., Eds., 193 - 200. Academic Press, London and New York.
- Somerville, H.J. and Pockett, H.V., 1975. An insect toxin from spores of Bacillus thuringiensis and Bacillus cereus. J. Gen. Microbiol., 87, 359 - 369.

- Spudich, J. A. and Kornberg, A., 1968. Biochemical studies of bacterial sporulation and germination. VII. Protein turnover during sporulation of Bacillus subtilis. J. Biol. Chem., 243, 4600 - 4605.
- Stevenson, K.E., Vaughn, R.H. and Crisan, E.V., 1972. Fixation of mature spores of Clostridium botulinum. J. Bacteriol., 109, 1295 - 1297.
- Stevenson, K.E. and Vaughn, R.H., 1972. Exosporium formation in sporulating cells of Clostridium botulinum 78 A. J. Bacteriol., 112, 618 - 621.
- Toennies, G. and Kolb, J.J., 1964. Carbohydrate analysis of bacterial substances by a new anthrone procedure. Analyt. Biochem., 8, 54 - 69.
- Trümpi, B., 1975. Analytische Untersuchungen am δ -Endotoxin von Bacillus thuringiensis. Diss. Nr. 5457 ETHZ.
- Vail, W.J. and Douglas, R.J., 1973. The ultrastructure of Bacillus thuringiensis. Proc. West Virginia Acad. Sci., 45, 1 - 9.
- Walker, P.D., 1970. Cytology of spore formation and germination. J. Appl. Bacteriol., 33, 1 - 12.
- Williams, C. and Chase, M., 1967. Methods in immunology and immunochemistry. I. Preparation of Antigens and Antibodies. Academic Press, New York and London, 205 - 206.
- Work, T.S., 1964. Electrophoretic separation of the proteins of ribosome subunits and of encephalomyocarditis virus. J. Mol. Biol., 10, 544 - 545.
- Work, T.S. and Work, E., 1969. Applicability of starch and acrylamid zone electrophoresis. In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. I, 28. North-Holland Publishing Company, Amsterdam and London.
- Young, I.E. and Fitz-James, P.C., 1959. Chemical and morphological studies of bacterial spore formation. II. Spore and parasporal protein formation in Bacillus cereus var. alesti. J. Biophys. Biochem. Cytol., 6, 483 - 498.
- Yousten, A.A. and Rogoff, M.H., 1969. Metabolism of Bacillus thuringiensis in relation to spore and crystal formation. J. Bacteriol., 100, 1229 - 1236.

DANK

Es ist mir ein Bedürfnis, abschliessend noch ganz herzlich Dank zu sagen

- Herrn Prof. Dr. L. Ettliger für die Anteilnahme an meiner Arbeit und das Vertrauen, das er mir stets entgegengebracht hat
- Herrn Prof. Dr. H. Zuber für die Ratschläge und die Bereitschaft, das Korreferat zu übernehmen
- Herrn Prof. Dr. J. R. Norris dem damaligen Direktor der Borden Laboratories, Shell Research Ltd., Sittingbourne, für das grosszügige Entgegenkommen, Experimente in diesem Labor durchzuführen
- Herrn Dr. H. J. Somerville für die anregenden und klärenden Diskussionen sowie die stetige gute Zusammenarbeit
- Herrn R. Pillinger für die nicht selbstverständliche Hilfe bei den EM - Arbeiten
- und schliesslich noch all denen, die ebenfalls in irgend einer Form zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

LEBENS LAUF

Geboren am 6. Juni 1947 in Rorschacherberg.

- 1954 - 1955 Primarschule in Rorschacherberg / SG
- 1955 - 1960 Primarschule in Davos / GR
- 1960 - 1966 an der Schweizerischen Alpinen Mittelschule in Davos,
Maturität Typus C.
- 1966 - 1970 Studium an der Eidgenössischen Technischen Hochschule
Zürich, Abteilung für Naturwissenschaften.
Diplom als Naturwissenschaftler mikrobiologisch -
biochemischer Richtung im Herbst 1970.
- 1971 - 1975 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Mikrobiologischen
Institut der ETHZ, Ausführung der Promotionsarbeit.
Dazwischen Aufenthalt in den Shell Research Labora-
torien, Sittingbourne, England; Januar - Mai 1973
und September - Juni 1973 / 74.



LEBENS LAUF

Geboren am 6. Juni 1947 in Rorschacherberg.

- 1954 - 1955 Primarschule in Rorschacherberg / SG
- 1955 - 1960 Primarschule in Davos / GR
- 1960 - 1966 an der Schweizerischen Alpinen Mittelschule in Davos,
Maturität Typus C.
- 1966 - 1970 Studium an der Eidgenössischen Technischen Hochschule
Zürich, Abteilung für Naturwissenschaften.
Diplom als Naturwissenschaftler mikrobiologisch -
biochemischer Richtung im Herbst 1970.
- 1971 - 1975 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Mikrobiologischen
Institut der ETHZ, Ausführung der Promotionsarbeit.
Dazwischen Aufenthalt in den Shell Research Labora-
torien, Sittingbourne, England; Januar - Mai 1973
und September - Juni 1973 / 74.

