

Abteilung Biologie der Ruhr-Universität Bochum  
Arbeitsgruppe Biochemie der Mikroorganismen

UNTERSUCHUNGEN VON RIBOSOMALER RNS  
WÄHREND WUCHS UND SPORULATION  
VON BACILLUS SUBTILIS

Diplomarbeit von  
Christiane Lengelsen  
aus Altena

Sommersemester 1974

## INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	3
MATERIAL UND METHODEN	5
1 Bakterien	5
2 Flüssigkulturmedium und Wachsbbedingungen	5
3 Puffer	6
4 Zentrifugationen	6
5 Aufarbeitung von Ribosomen	7
5.1 Isolierung von Ribosomen	7
5.2 NH <sub>4</sub> Cl-Waschen von Ribosomen	8
5.3 Isolierung ribosomaler Untereinheiten	8
6 Aufarbeitung von RNS	9
6.1 RNS-Isolierung	9
6.2 Isolierung von 16S- und 23S-RNS	10
7 Aufarbeitung ribosomaler Proteine	10
8 Polyacrylamidgelelektrophorese	11
8.1 Herstellung der Gele	11
8.2 Elektrophoresebedingungen	11
8.3 Auswertung	12
9 Messung der optischen Dichte	12
9.1 Versuchsanordnung	12
9.2 Auswertung	13
10 Messung der optischen Rotationsdispersion	13
RESULTATE	14
1 Isolierung von 16S- und 23S-RNS	14
2 Polyacrylamidgelelektrophorese	15
3 Messung der optischen Dichte bei pH-Änderung	17
3.1 RNS-Titration	17
3.1.1 Unfraktionierte Zell-RNS	17
3.1.2 23S-RNS	19
3.1.3 16S-RNS	19
3.1.4 Basetitrationen von verschiedenen pH-Werten an aufwärts	19
3.2 Titration von Ribosomen	19
3.2.1 Rohe Ribosomen	23
3.2.2 Gewaschene Ribosomen	23
3.2.3 Untereinheiten	23
3.3 Titration von Protein	26
4 ORD-Untersuchungen	27
4.1 Gewaschene Ribosomen	27
4.2 Unfraktionierte Zell-RNS	30
DISKUSSION	32
ZUSAMMENFASSUNG	41
LITERATUR	42

## ABKÜRZUNGEN

DNS	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
G-Faktor	ribosomale Translokase
GTPase	Guanosintriphosphatase
OD	Optische Dichte
rOD	relative Optische Dichte
ODE	Menge Substanz, die in 1 ml gelöst, eine OD von 1 hervorruft
ORD	Optische Rotations-Dispersion
poly A	Polyadenylsäure
poly C	Polycytidylsäure
poly G	Polyguanylsäure
RNS	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RNS-Polymerase	DNS-abhängige Ribonucleinsäurepolymerase
r-RNS	ribosomale Ribonucleinsäure
16S-RNS	Ribonucleinsäure der 30S-Ribosomenuntereinheit
23S-RNS	Ribonucleinsäure der 50S-Ribosomenuntereinheit
m-RNS	messenger-Ribonucleinsäure
t-RNS	transfer-Ribonucleinsäure
Lysin-t-RNS	mit Lysin beladene transfer-Ribonucleinsäure
S und V	sporulierend und vegetativ
S	Svedberg-Einheiten ( $10^{-13}$ s)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
$\lambda$	Wellenlänge

## EINLEITUNG

Gegen Ende der vegetativen, exponentiellen Wachstumsphase, beim Übergang in die stationäre Phase beginnt *Bacillus subtilis* Endosporen zu bilden. Während der Sporulation, eines zellulären Differenzierungsvorganges, laufen nacheinander verschieden regulierte Vorgänge ab. Einige Enzyme werden abgebaut, andere neu synthetisiert. Gleichzeitig werden morphologische Veränderungen der Zelle sichtbar. Die Sequenz der einzelnen Sporulationsschritte ist noch weitgehend unbekannt<sup>1</sup>.

Regulationsmechanismen des vegetativen Wachstums wie z.B. die  $\beta$ -Galaktosidase-Regulation bei *Escherichia coli*<sup>2</sup> sind aufgeklärt, die Regulation der Sporulation jedoch nicht. Sie erfolgt entweder auf der Ebene der Transkription oder der Translation. Modifizierungen der Transkriptionsspezifität der RNS-Polymerase wurden nachgewiesen<sup>3</sup>. Im Translationsapparat sind bislang nur Unterschiede im Elektrophorese- und Säulenchromatogrammmuster der ribosomalen Proteine aus vegetativen und sporulierenden Zellen gefunden worden<sup>4,5</sup>.

Die Versuche der vorliegenden Arbeit sollten klären, ob weitere Unterschiede zwischen Ribosomen aus vegetativen und sporulierenden Zellen von *Bacillus subtilis* zu finden sind und in welcher Fraktion (RNS oder Protein) sie auftreten. Als Methode bot sich die Untersuchung molekularer Hysteresen bei Säure-Basetitration an.

Ein bekanntes Hysterese-Phänomen ist der Magnetisierungs-De-magnetisierungszyklus des Weicheisens, bei dem die magnetische Polarisierung der magnetischen Feldstärke nachhinkt. Aber auch in Biopolymeren konnten Hysteresen nachgewiesen werden. In ribosomaler RNS aus *Escherichia coli* wurden sie durch Messung der optischen Dichte in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht<sup>6</sup>. Die molekulare Grundlage für die Ausbildung von Hystereseschleifen sind hier langlebige metastabile Zustände. Diese können z.B. durch Bindungen zwischen je zwei Adeningruppen in poly A entstehen; in poly G wird eine spontan aggregierende Konformation durch gepaarte Guanindoublets bzw. Guanintriplets bis zu sehr hohen Temperaturen beibehalten, selbst wenn poly C in der Probe vorhanden ist<sup>7</sup>. Da nun metastabile Konformationen sowohl in Nucleinsäuren als auch in Proteinen auftreten, sind sie auch in komplexen Biopolymeren wie Ribosomen denkbar.

Konformationsänderungen äußern sich makroskopisch in der optischen Dichte bzw. der optischen Rotationsdispersion. In Proben von ribosomaler RNS, ribosomalem Protein und ganzen Ribosomen wurde deshalb die optische Dichte in Abhängigkeit vom pH-Wert im UV-Bereich gemessen. Durch Bestimmung der optischen Rotationsdispersion wurde kontrolliert, ob die Proben nach der Titration wieder in ihrer Ausgangskonformation vorlagen.

## MATERIAL UND METHODEN

### 1 BAKTERIEN

In allen Versuchen wurde mit Zellen des Marburgstammes Nr. 60015<sup>8</sup> von *Bacillus subtilis* gearbeitet. Die Ernte vegetativer Zellen erfolgte bei einer optischen Dichte (578 nm) von 0,7. Sporulierende Zellen wurden 3 Stunden nach dem Übergang des exponentiellen Wachstums in die stationäre Phase geerntet.

### 2 FLÜSSIGKULTURMEDIUM UND WUCHSBEDINGUNGEN

Nutrient Sporulation Medium (NSM): 8 g Nutrient Broth (NB) [d.h. 3 g trockener Fleischextrakt und 5 g tryptisch verdaute Peptone aus Casein (Merck, Darmstadt)] pro Liter aqua dest. wurden autoklaviert und nach Abkühlen mit Metallen supplementiert.

Endkonzentrationen der Metalle in NSM:

0,7mM	CaCl <sub>2</sub>
1 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,5mM	MnCl <sub>2</sub>
1 μM	FeCl <sub>3</sub>

20 l-Kolben mit NSM wurden mit *B.subt.* angeimpft, im 37<sup>0</sup>C-Wasserbad inkubiert und durch Filterkerzen mit Pressluft belüftet. Bei zu starker Schaumbildung erfolgte Zugabe von Antischaummittel ( Siliconemulsion SE 2 von Wacker-Chemie, München).

Alle 30 min wurde die Trübung bei 578 nm gemessen. Im gewünschten Wachstadium wurden die Zellen schnell abgekühlt und durch Zentrifugation geerntet.

## 3 PUFFER

Puffer 1:           10 mm Imidazol-HCl pH 7,3  
                   30 mm KCl  
                   10 mm Mg-Acetat  
                   0,5 mm Na<sub>3</sub>-EDTA  
                   6 mm β-Mercaptoäthanol

Puffer 2: Puffer 1 + 10 % (w/v) Glycerin

Puffer 3: Puffer 1 + 50 % (w/v) Glycerin

Puffer 4: Dialysepuffer

                  10 mm Tris-HCl pH 7,2  
                   1 mm Mg-Acetat  
                   100 mm NH<sub>4</sub>Cl  
                   6 mm β-Mercaptoäthanol  
                   1 mm Na<sub>3</sub>-EDTA

Puffer 5:           50 mm Tris-HCl pH 7,6  
                   10 mm MgCl<sub>2</sub>

Puffer 6:           20 μm Tris-HCl pH 7,5  
                   15 μm NaCl  
                   1,5 μm Na<sub>3</sub>-Citrat

Puffer 7: Elektrophoresepuffer

                  40 mm Tris-Acetat pH 7,2  
                   20 mm Na-Acetat  
                   1 mm Na<sub>3</sub>-EDTA

Puffer 8: Testpuffer

                  99 mm NaCl  
                   1 mm Na-Cacodylat  
                   0,2 mm MgCl<sub>2</sub>  
                   pH 7 durch HCl

Die Puffer 5-8 wurden vor Gebrauch autoklaviert. Alle pH-Werte wurden bei Zimmertemperatur eingestellt.

## 4 ZENTRIFUGATIONEN

Zentrifugationen bei niedriger g-Zahl erfolgten im SS34 Rotor einer RC2-B Sorvall Kühlzentrifuge.

Bei allen anderen Zentrifugationen wurde eine Beckman L3-50 Ultrazentrifuge benutzt.

Rotoren: 60Ti: Festwinkelrotor

Zum Abzentrifugieren von Ribosomen oder Untereinheiten als Niederschlag durch ein Glycerinkissen

SW41 und SW56: Schwingbecherrotoren

Zentrifugieren in linearen Sucrosegradienten, um Substanzen nach ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit zu trennen, oder wie 60Ti

B XIV: (Beckman Ti14) Zonenrotor

Beladen mit equivolumetrischen Gradienten<sup>9</sup>, die durch eine Gradientenpumpe (Beckman Mod.141) hergestellt wurden, zur Isolierung größerer Mengen 16S- bzw. 23S-RNS oder ribosomaler Untereinheiten

## 5 AUFARBEITUNG VON RIBOSOMEN

Alle Aufarbeitungen wurden bei 4°C durchgeführt.

### 5.1 Isolierung von Ribosomen

- a) Zellen 2x in Puffer 1 waschen
- b) in Puffer 2 resuspendieren
- c) in einer Frenchpress bei 150 atü lysieren
- d) 1 h bei 50 000 g zentrifugieren
- e) Überstand im 60Ti-Rotor mit Puffer 3 unterschichtet  
3,5 h bei 180 000 g zentrifugieren
- f) Niederschlag in Puffer 2 resuspendieren, mit Puffer 3 unterschichten und wie e) zentrifugieren
- g) Niederschlag ("rohe Ribosomen") in etwas Puffer 2 re-

suspendieren, so daß die OD bei 260 nm 500-1000 beträgt, und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahren

Vor jeder Weiterverarbeitung wurden die rohen Ribosomen 5 min bei 27 000 g zentrifugiert, um denaturierte Ribosomen zu entfernen.

#### 5.2 $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Waschen von Ribosomen

- a) im SW56-Becher 1 ml Ribosomensuspension mit festem  $\text{NH}_4\text{Cl}$  auf 1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  bringen
- b) 1-2 h langsam schütteln
- c) mit 2,5 ml Puffer 3 unterschichten
- d) 5 h bei 250 000 g zentrifugieren (SW56)
- e) Niederschlag in Puffer 2 mit 1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  resuspendieren
- f) b,c,d und e 2x wiederholen
- g) b,c und d wiederholen

Der Niederschlag wird "gewaschene Ribosomen" genannt.

#### 5.3 Isolierung ribosomaler Untereinheiten<sup>10,11</sup>

- a) gewaschene Ribosomen gegen Puffer 4 dialysieren (6x 4 h gegen 100faches Volumen)
- b) im Zonenrotor (in einem 5-42 %igen Sucrosegradienten in Puffer 4) 4 h 48 000 Upm zentrifugieren
- c) Gradienten in ~80 Fraktionen abtropfen
- d) OD bei 260 nm messen
- e) Gipfel-Fraktionen einsammeln durch Zentrifugation im 60Ti bei 180 000 g über Nacht mit einem Puffer 3-Kissen, das 20 mM Mg-Acetat enthält
- f) Kontrolle der Reinheit der Untereinheiten aus den Gip-

fel-Regionen durch Zentrifugation im analytischen 10-30-%igen linearen Sucrosegradienten in Dialysepuffer (SW56, 2 h, 50 000 Upm, 5°C); abpumpen durch eine Durchflußküvette mit 1 cm Schichtdicke im Gilford Mod.2400 Spektralphotometer (260 nm) bei konstanter Geschwindigkeit (0,5 ml/min durch peristaltische Pumpe)

## 6 AUFARBEITUNG VON RNS

Alle RNS-Aufbereitungen wurden steril durchgeführt, um Abbau durch RNase zu vermeiden.

### 6.1 RNS-Isolierung

- a) 15 g Zellen (Feuchtgewicht) in 30 ml Puffer 5 suspendieren
- b) Zellen unter 150 atü Druck in einer Frenchpress aufbrechen, und das Lysat in Kolben mit 60 ml 90 %igem Phenol tropfen lassen, das mit Puffer 5 gesättigt ist
- c) Emulsion 1 h bei 4°C rühren lassen
- d) 10 min bei 50 000 g zentrifugieren
- e) Überstand + 50 ml Phenol  
Phenolphase + 30 ml Puffer 5  
beides schütteln und bei 50 000 g 10 min zentrifugieren
- f) wässrige Phasen vereinigen
- g) + 0,1 Volumen steriles 20 %iges Na-Acetat pH 5
- h) + 2,5 Volumen 95 %iges Äthanol
- i) Niederschlag bei 4°C stehen lassen
- j) bei 12 000 g abzentrifugieren
- k) Niederschlag in 50 ml Puffer 5 resuspendieren

## 1) DNasebehandlung

50 ml + 0,5 mg DNase (Worthington, Grade 1) bei 37°C  
 30 min inkubieren  
 + 50 ml Phenol schütteln  
 10 min bei 50 000 g zentrifugieren  
 h und i wiederholen  
 Niederschlag über Nacht bei 4°C stehen lassen  
 bei 12 000 g abzentrifugieren  
 Niederschlag in sterilem aqua dest. resuspendieren  
 zu je 100 ODE gefriertrocknen

n) durch RNS-(Orcin) und DNS-(Diphenylamin)Tests Ver-  
 unreinigung der RNS durch DNS feststellen<sup>12,13</sup>

## 6.2 Isolierung von 16S- und 23S-RNS

Die Trennung der verschiedenen RNS-Arten erfolgte durch  
 Gradientenzentrifugation<sup>9</sup>. Es wurden lineare Sucrosegradienten  
 von 7-16% im Schwingbecherrotor (SW41) verwendet. Die Zentri-  
 fugationen dauerten 5 h bei 40 000 Upm. (Abgepumpt wurde wie in  
 5.3.f)

Für größere Aufarbeitungen wurde ein equivolumetrischer  
 Zonengradient mit 10-50%igem Glycerin in Puffer 6 verwendet.  
 Die Gipfelfractionen wurden gegen aqua dest. dialysiert und an-  
 schließend lyophilisiert.

## 7 AUFARBEITUNG RIBOSOMALER PROTEINE

bei 4°C

- a) Suspension gewaschener Ribosomen in Puffer 2 + 0,1  
 Volumen 1M MgCl<sub>2</sub>-Lösung
- b) + 2 Volumen Eisessig
- c) 45 min bei 4°C inkubieren
- d) 10 min bei 50 000 g zentrifugieren
- e) Niederschlag in 67% Eisessig + 30 mM MgCl<sub>2</sub> waschen

(5 min bei 50 000 g)

- f) Überstand gegen Wasser dialysieren (10x 2 h gegen 200-faches Volumen)
- g) Retendat lyophilisieren

## 8 POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE <sup>14</sup>

### 8.1 Herstellung der Gele

- a) Glasröhrchen (0,5 cm Durchmesser) von innen mit Dichlordimethylsilan überziehen (Oberfläche wird hydrophob, so daß Benetzung vermieden wird.)
- b) am unteren Ende der Röhrchen 10 %iges Gel 0,5 cm hoch polymerisieren (Die sehr weichen 3 %igen Gele werden so während der Elektrophorese festgehalten.)
- c) 5 ml Stammlösung (15 % Acrylamid und 0,75 % Bisacrylamid in Puffer 7) mit 19,8 ml Puffer 7 mischen
- d) durch Wasserstrahlvakuum entlüften
- e) + 0,02 ml TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin)
- f) + 0,2 ml frische wäßrige 10 %ige Ammoniumpersulfatlösung
- g) vorsichtig mischen
- h) Mischung 9 cm hoch in die Röhrchen füllen und 20 min polymerisieren lassen

Die Gele enthielten so 3 % Acrylamid und 0,15 % Bisacrylamid.

### 8.2 Elektrophoresebedingungen

Elektrophoresepuffer war Puffer 7. Um Verunreinigungen zu entfernen, wurden die unbeladenen Röhrchen 1 h mit 2,5 mA/Röhrchen ( $5,5\text{V}/\text{cm}^2$ ) vorlaufen gelassen. Das Auftragen der Proben

erfolgte in Puffer 7 + 10 % Sucrose in einem Volumen nicht größer als 100  $\mu$ l. Für die Hauptbanden reichten 20  $\mu$ g RNS aus. Bei der Suche nach Bruchstücken wurden die Gele 5fach überladen. Elektrophorese erfolgte bei 4<sup>0</sup>C und 2,5 mA/Röhrchen 120-180 min lang.

### 8.3 Auswertung

Sofort nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele in einer Spezialküvette im Gilford Mod.2400 Spektralphotometer ausgemessen ( $\lambda=260$  nm, Vorschub 2 cm/min, Schreibervorschub 2 cm/inch).

## 9 MESSUNG DER OPTISCHEN DICHTE

### 9.1 Versuchsanordnung

Proben von RNS, Ribosomen oder Protein wurden in Puffer 8 auf eine optische Dichte (260 nm) von  $\sim 0,75$  eingestellt. 5-50 ml wurden im Thermostaten bei 25<sup>0</sup> C inkubiert und in Schritten von  $\sim 0,5$  pH-Einheiten mit 0,1 M HCl titriert. Jeweils 10 min nach Zugabe der HCl wurde die OD bei 260 nm und 1 cm Schichtdicke der Küvette gemessen. Bei niedrigen pH-Werten werden extreme OD-Werte erhalten. Jedoch zerfallen die Proben sehr leicht, wenn sie auch nur ein wenig zu stark angesäuert werden. Nicht zerstörte Proben wurden ebenfalls in Schritten von 0,5 pH-Einheiten mit 0,1 M NaOH auf pH 8-10 gebracht. Von dort erfolgte erneutes Ansäuern, um zu kontrollieren, auf welchem Weg ein zweiter Zyklus verläuft. Alle Schritte wurden steril durchgeführt.

## 9.2 Auswertung

Um vergleichbare Kurven zu erhalten, wurden alle Werte auf eine Ausgangs-OD von 1 bezogen. Die Verdünnungen durch HCl und NaOH wurden berechnet und berücksichtigt. Die relative OD wurde gegen die pH-Werte aufgetragen. Sie wurde bestimmt nach der Formel:

$$rOD = \frac{\text{gemessene OD} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{OD bei pH 7}}$$

## 10 MESSUNG DER OPTISCHEN ROTATIONSDISPERSION

a) Einstellen der OD bei 260 nm und pH~7 auf ~1

1. Messung

b) mit HCl auf ein pH kleiner als 3 bringen

2. Messung

c) mit NaOH auf pH~10 titrieren und mit HCl neutralisieren

3. Messung

Bei allen drei Messungen wurden Spektren von 400–200 nm mit einem Spektralarimeter Cary 60 aufgenommen. Unter Berücksichtigung der Verdünnung wurde die spezifische Drehung in 5 nm Schritten berechnet nach der Formel:

$$[\alpha]_{\lambda} = \frac{\alpha}{d \times g}$$

$[\alpha]_{\lambda}$  = spezifische Drehung

$\alpha$  = gefundener und korrigierter Drehwinkel

$d$  = Schichtdicke in dm (0,05)

$g$  = Konzentration in g/ml

Die spezifische Drehung wurde gegen die Wellenlänge aufgetragen.

## RESULTATE

### 1 ISOLIERUNG VON 16S- bzw. 23S-RNS

Die Trennung der 16S- und 23S-RNS von der übrigen Zell-RNS erfolgte durch Zonenzentrifugation (10-50 % Glycerin in Puffer 6, 16 h bei 48 000 Upm). Einen typischen Gradienten zeigt Abb.1.

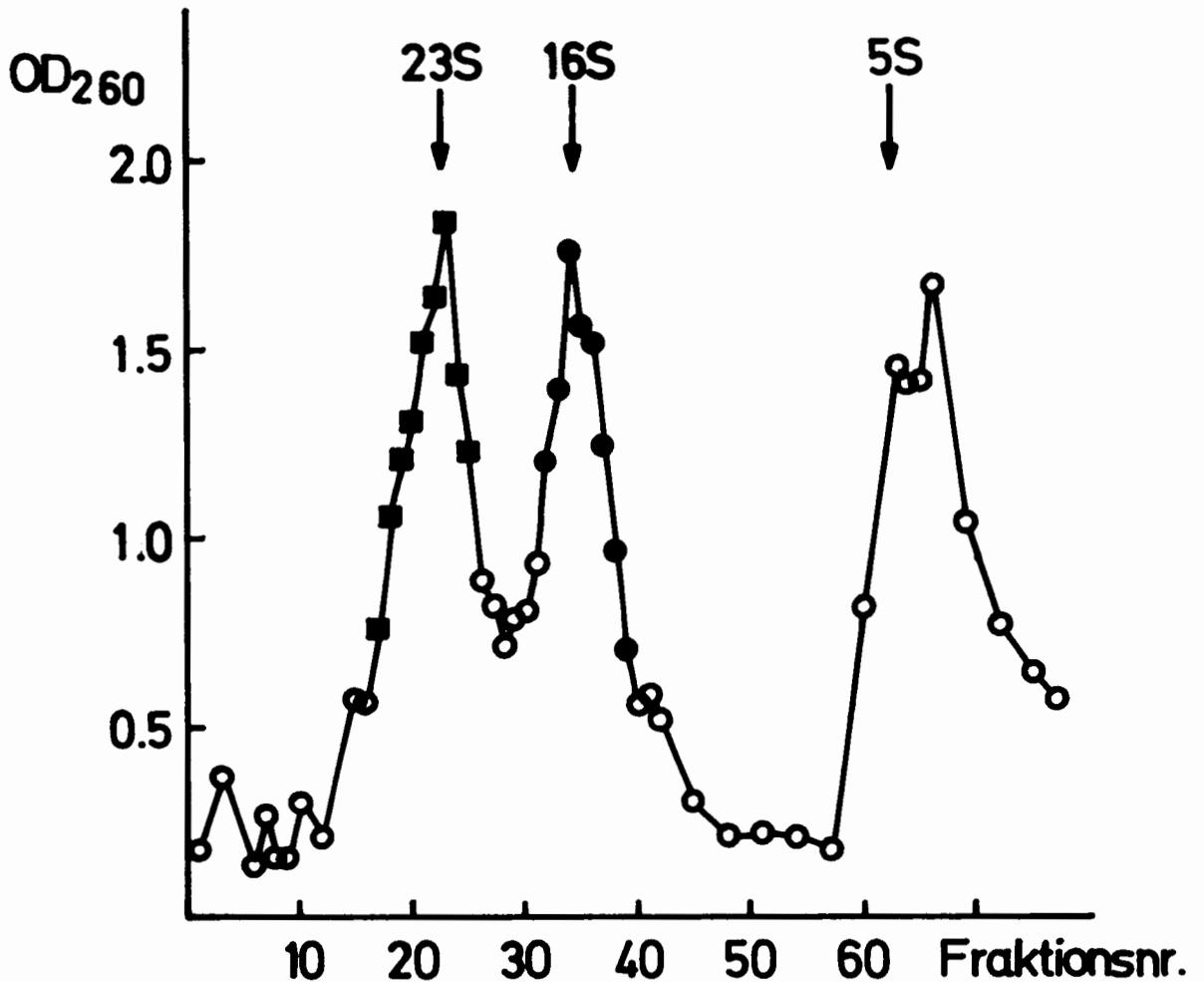


Abb. 1 Fraktionierung von RNS aus sporulierenden Zellen in einem equivolumetrischen Zonengradienten

- eingesammelte 23S-RNS-Fractionen
- eingesammelte 16S-RNS-Fractionen

Die Reinheit der Fraktionen aus den Gipfeln wurde durch Polyacrylamidgelelektrophorese überprüft (Abb.2 und 3).

## 2 POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE

Alle Gele zeigten, daß 23S-, 16S- und 5S-RNS sowohl vor einer Titration als auch danach nur in ungespaltener Form vorlagen. Abb.3 zeigt Schreiberkurven von Gelen unfraktionierter RNS, die 180 min lang elektrophoriert waren. In beiden Kurven sind deutlich 23S-, 16S-, 5S- und 4S-RNS-Banden zu erkennen. Abb.2 stellt die Molekulargewichte in Abhängigkeit von der Wanderungstrecke dar. Auch die aus titrierten Ribosomen isolierte RNS zeigte 23S-, 16S- und 5S-Gipfel. Bruchstücke waren auch hier nicht zu sehen.

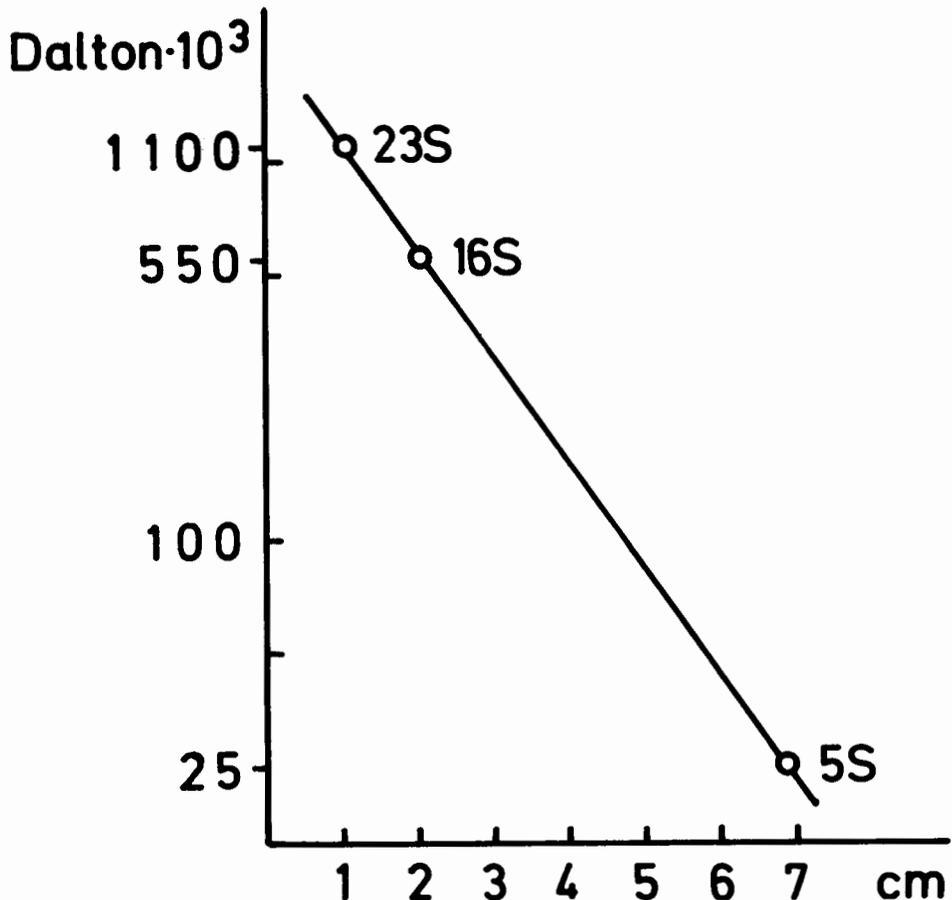
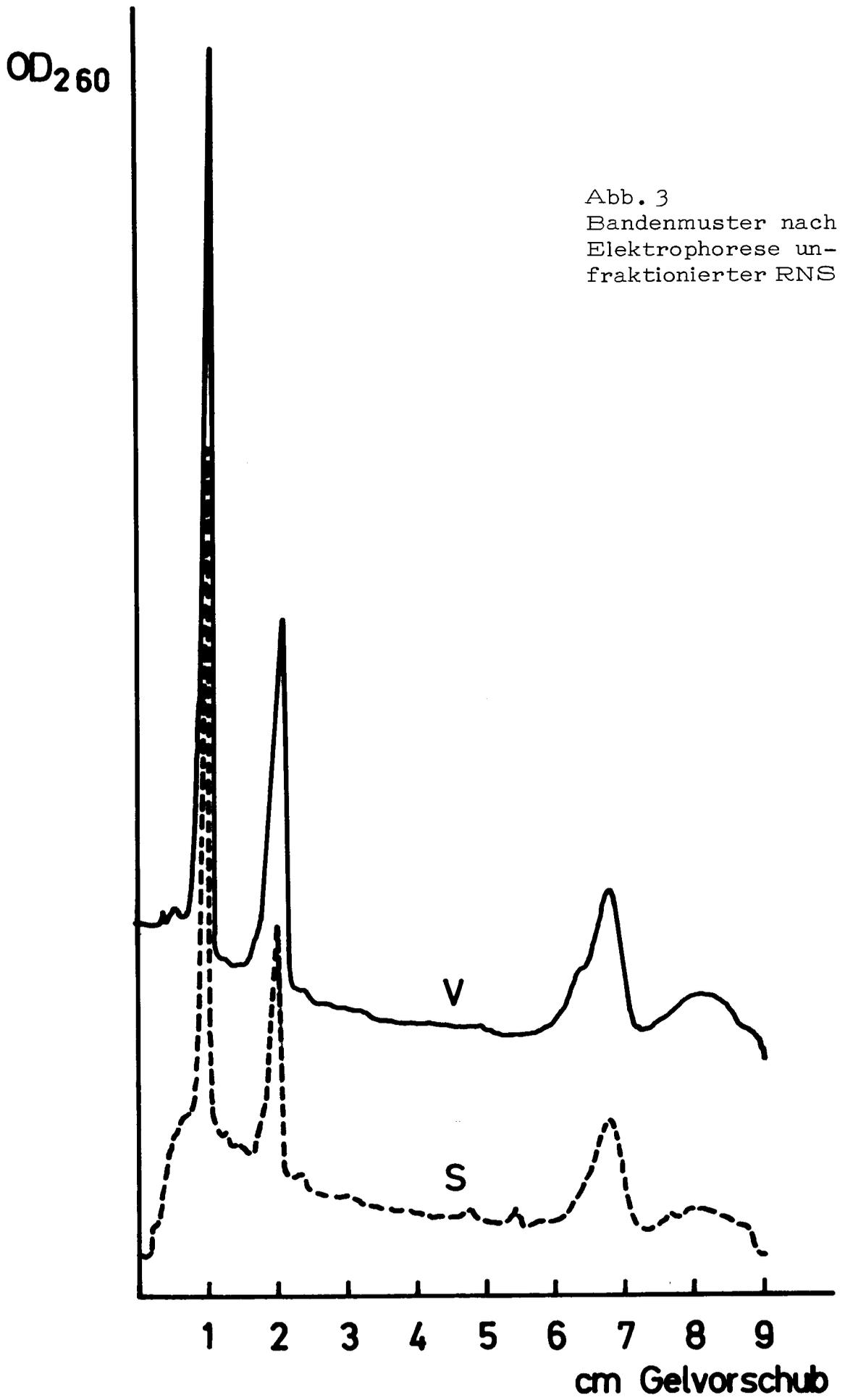


Abb. 2 Molekulargewichte der ribosomalen RNS aus sporulierenden Zellen in Abhängigkeit von der Wanderungstrecke in der Elektrophorese



### 3 MESSUNG DER OPTISCHEN DICHTE (260 nm) BEI pH-ÄNDERUNG

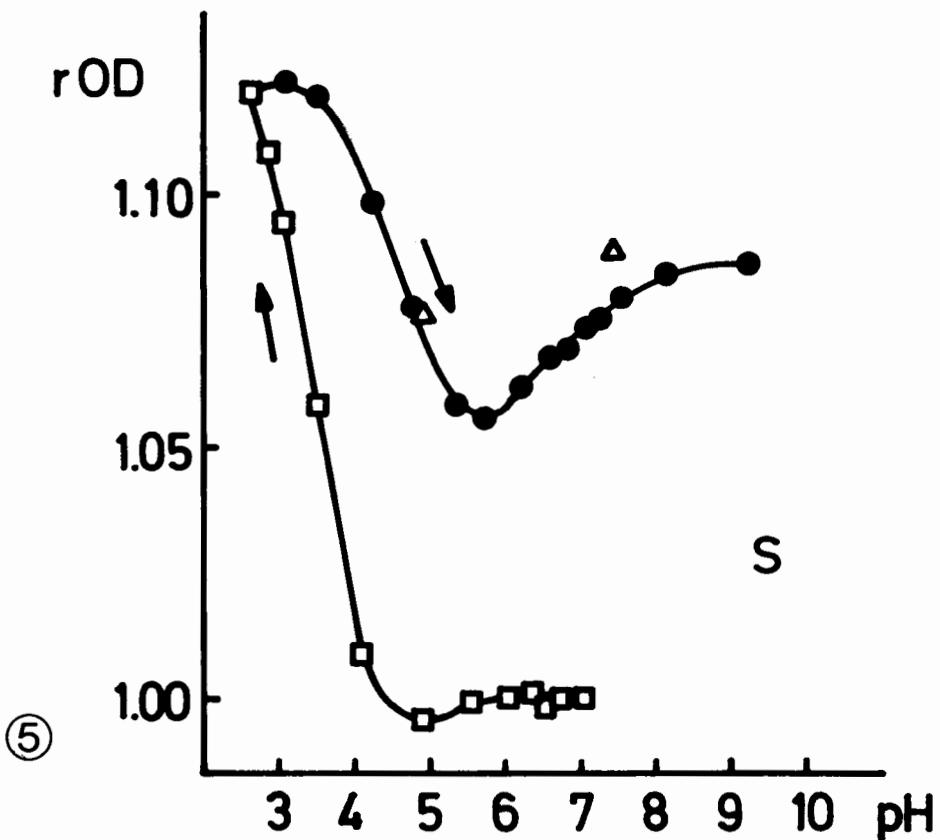
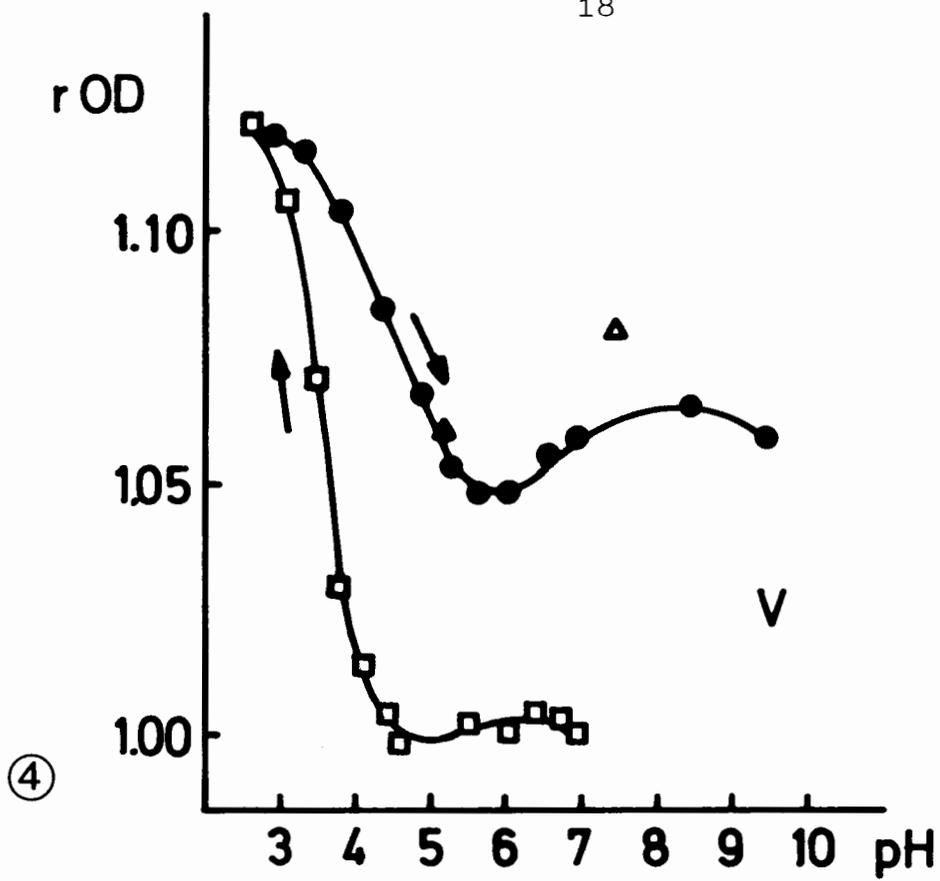
Alle Werte einer Säuretitation liegen auf einer bei niedrigem pH-Wert ansteigenden Kurve; wird darauf eine Base zugegeben, so findet man eine zweite mit der ersten nicht identische Kurve. Bei einer echten Hysterese kehrt die Kurve wieder zu ihrem Ausgangspunkt zurück, so daß eine Hystereseschleife entsteht. Der Zyklus kann beliebig oft wiederholt werden. Die OD-Werte nach Säurezugabe liegen stets auf dem "Säureast" der Schleife, die OD-Werte nach Basezugabe auf dem "Baseast". Das System hat ein Gedächtnis für die Richtung, in der die Titration erfolgt. Diese Richtung ist nicht umkehrbar. Eine Hystereseschleife wird nur in einem begrenzten pH-Bereich ausgebildet; außerhalb dieses Bereiches verlaufen Säure- und Baseast auf einer gemeinsamen Kurve.

Wie kinetische Experimente zeigten, war 1 min nach Zugabe von HCl bzw. NaOH zu den Proben keine Änderung der OD mehr festzustellen. Die angegebene Wartezeit von 10 min reichte also aus, um konstante Werte zu erhalten. Alle Versuche wurden mehrfach durchgeführt und je ein repräsentatives Beispiel ausgewählt für die Abbildungen.

#### 3.1 RNS-Titration

Basetitrationen ergaben Kurven, die bei höherer OD als der Säureast lagen (Abb.4 bis 9). Diese Kurven kehrten nicht zu ihrem Ausgangspunkt zurück.

3.1.1 Unfraktionierte Zell-RNS: Die Kurven der gesamten RNS aus vegetativen (Abb.4) und sporulierenden Zellen (Abb.5) liefen fast identisch. Eine zweite Säuretitation ergab Werte, die



Säure-Basetitration von unfraktionierter RNS

Abb. 4 RNS aus vegetativen Zellen

Abb. 5 RNS aus sporulierenden Zellen

□ OD nach Säurezugabe

● OD nach Basezugabe

△ OD bei zweiter Säuretitration

auf dem Baseast lagen.

3.1.2 23S-RNS: Zwischen 23S-RNS aus vegetativen (Abb. 6) und sporulierenden Zellen (Abb.7) besteht kein signifikanter Unterschied in der Änderung der OD während der Säure- bzw. Basezugabe. Eine zweite Säuretitation verläuft wie bei der gesamten RNS auf dem Baseast.

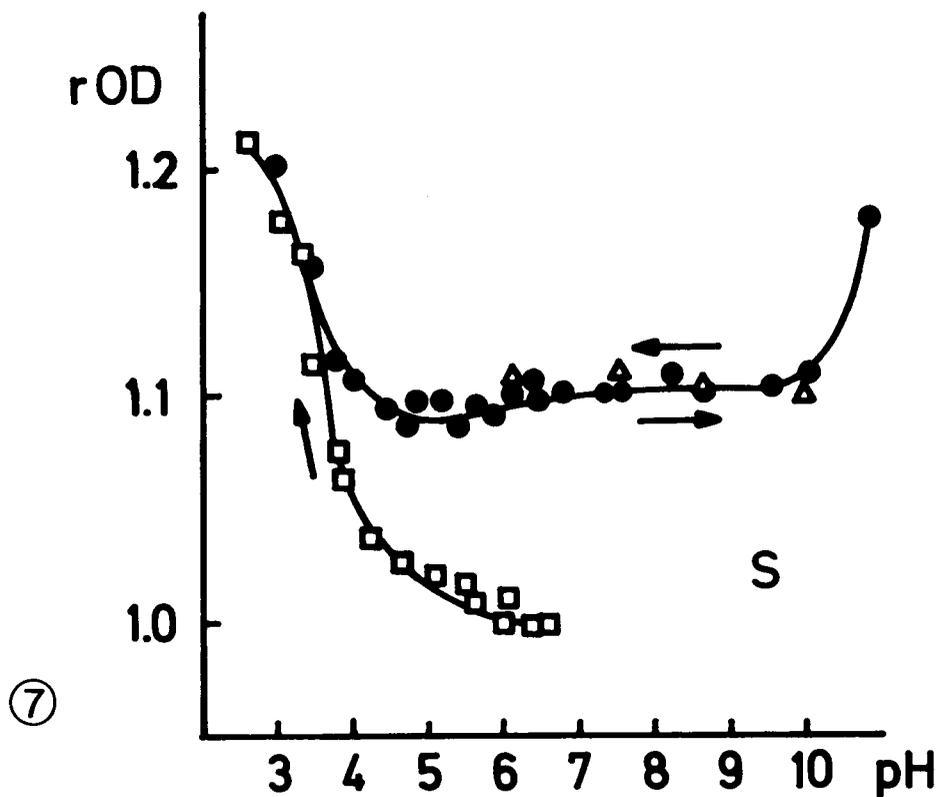
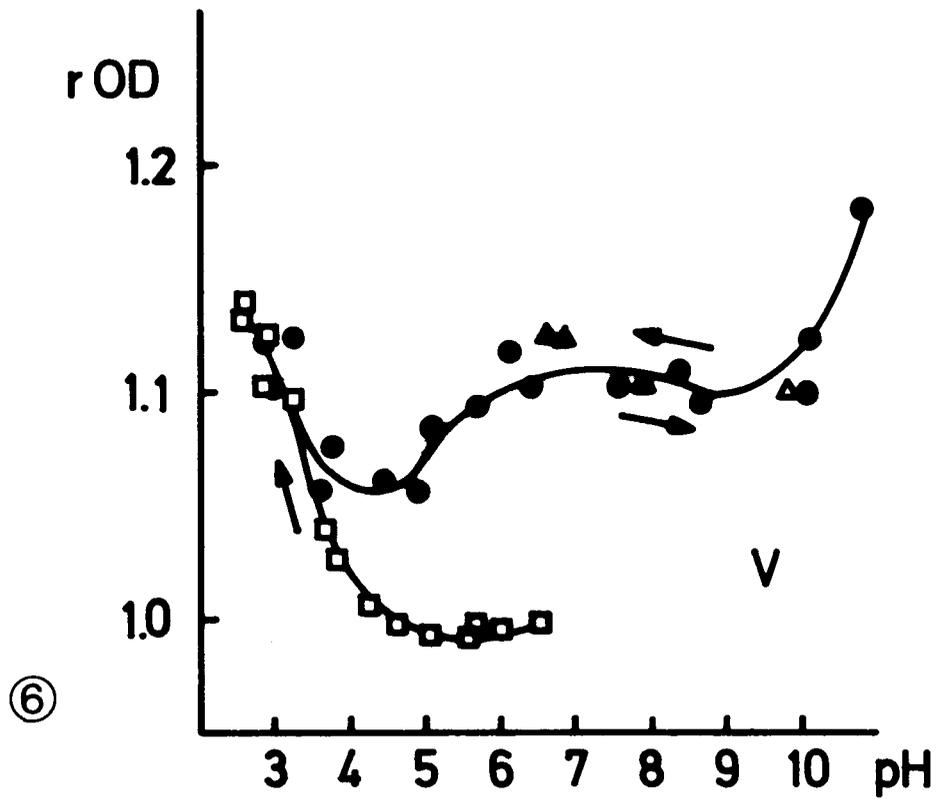
3.1.3 16S-RNS: Auch hier findet man zwischen 16S-RNS aus vegetativen (Abb.8) und sporulierenden Zellen (Abb.9) keine deutlichen Unterschiede. Im Gegensatz zu anderen RNS-Titrationskurven liegen die Werte bei einer zweiten Säurezugabe auf einer Kurve höherer OD.

Durch Ansäuern wird die OD von 23S- und 16S-RNS nicht so stark erhöht wie bei unfraktionierter RNS.

3.1.4 Basetitration von verschiedenen pH-Werten aufwärts: Um auszuschließen, daß eine Hysterese (wie z.B. in ribosomaler RNS von *Escherichia coli*<sup>6</sup>) in den vorliegenden Versuchen verhindert wird, weil die Proben zu stark angesäuert waren, wurden Proben von RNS bis zu verschiedenen pH-Werten mit Säure versetzt und von dort mit Base zurücktitriert. Wie Abb.10 zeigt, laufen die daraus resultierenden Baseäste parallel zueinander.

### 3.2 Titration von Ribosomen

Im Gegensatz zur RNS wurden bei der Titration von intakten Ribosomen vollständige Hysteresezyklen erhalten. War eine Probe noch nicht genügend angesäuert und die Base wurde zu früh zugegeben, so lagen die OD-Werte noch auf dem Säureast. Man muß also bis zu extremen pH-Werten titrieren, um überhaupt

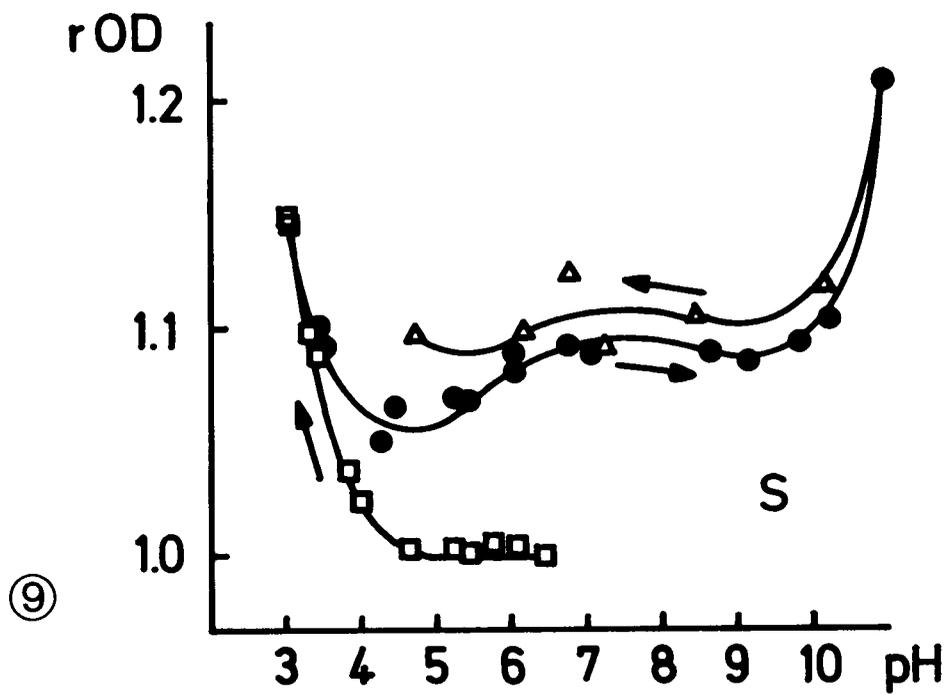
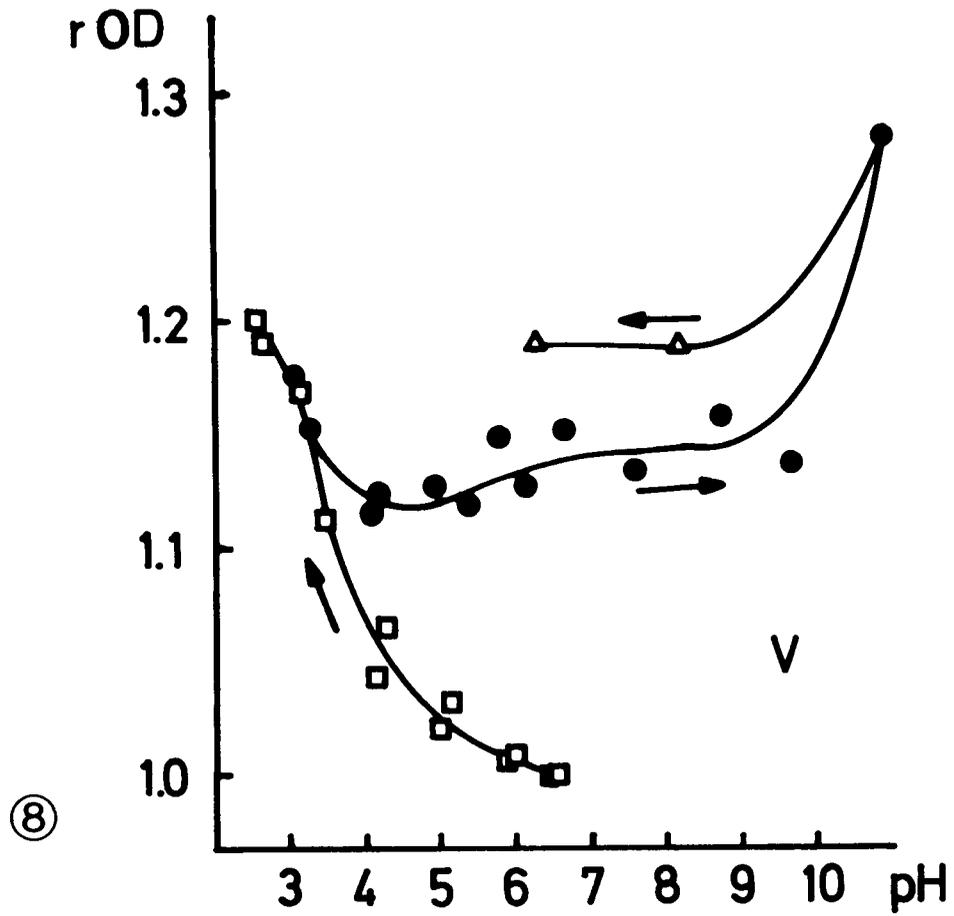


Säure-Basetitration von 23S-RNS

Abb. 6 RNS aus vegetativen Zellen

Abb. 7 RNS aus sporulierenden Zellen

Symbole wie Abb. 4



Säure-Basetitration von 16S-RNS  
 Abb. 8 RNS aus vegetativen Zellen  
 Abb. 9 RNS aus sporulierenden Zellen  
 Symbole wie Abb. 4

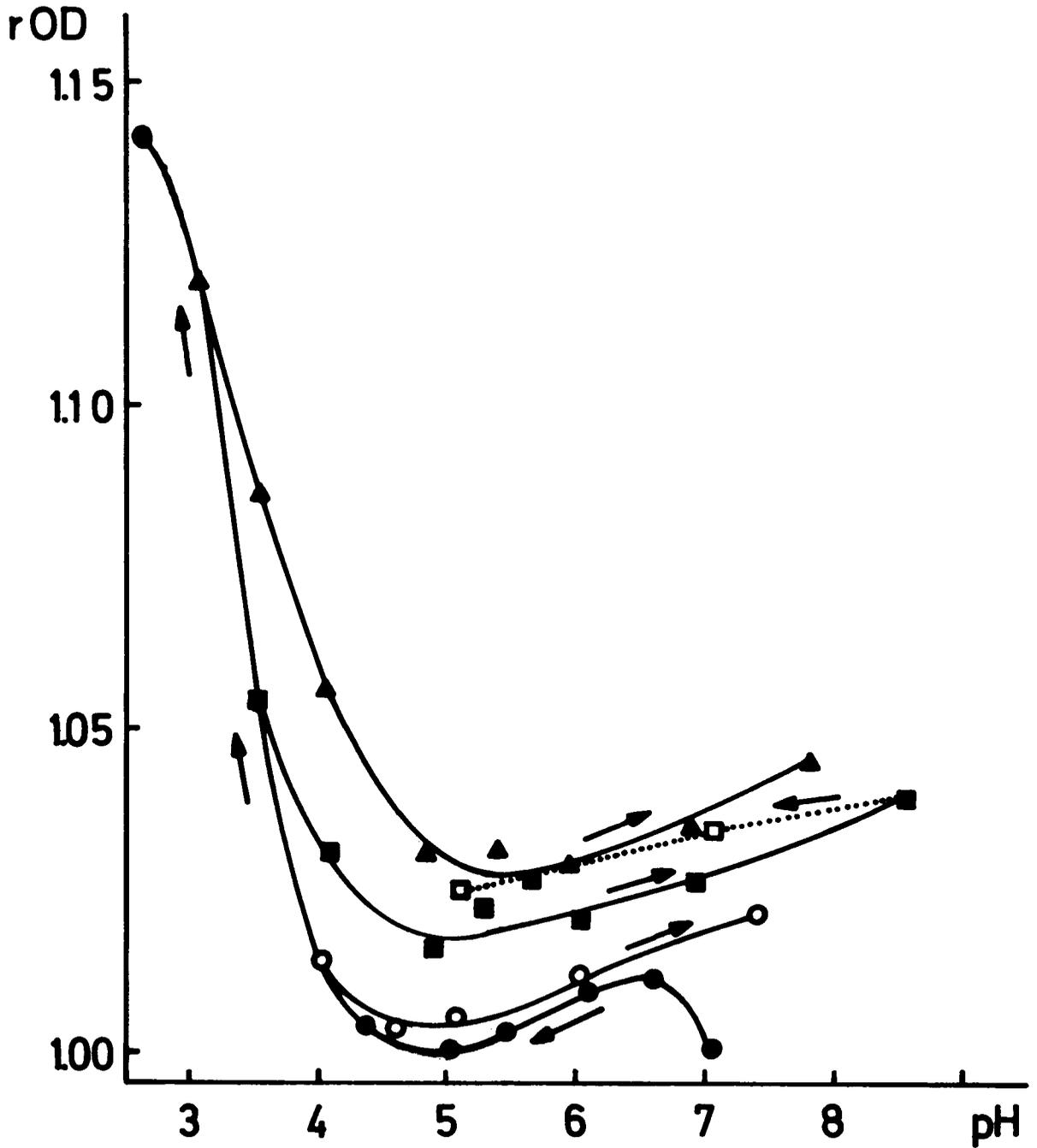


Abb. 10 Säure-Basetitration von unfraktionierter RNS aus sporulierenden Zellen mit Basezugabe von verschiedenen pH-Werten an

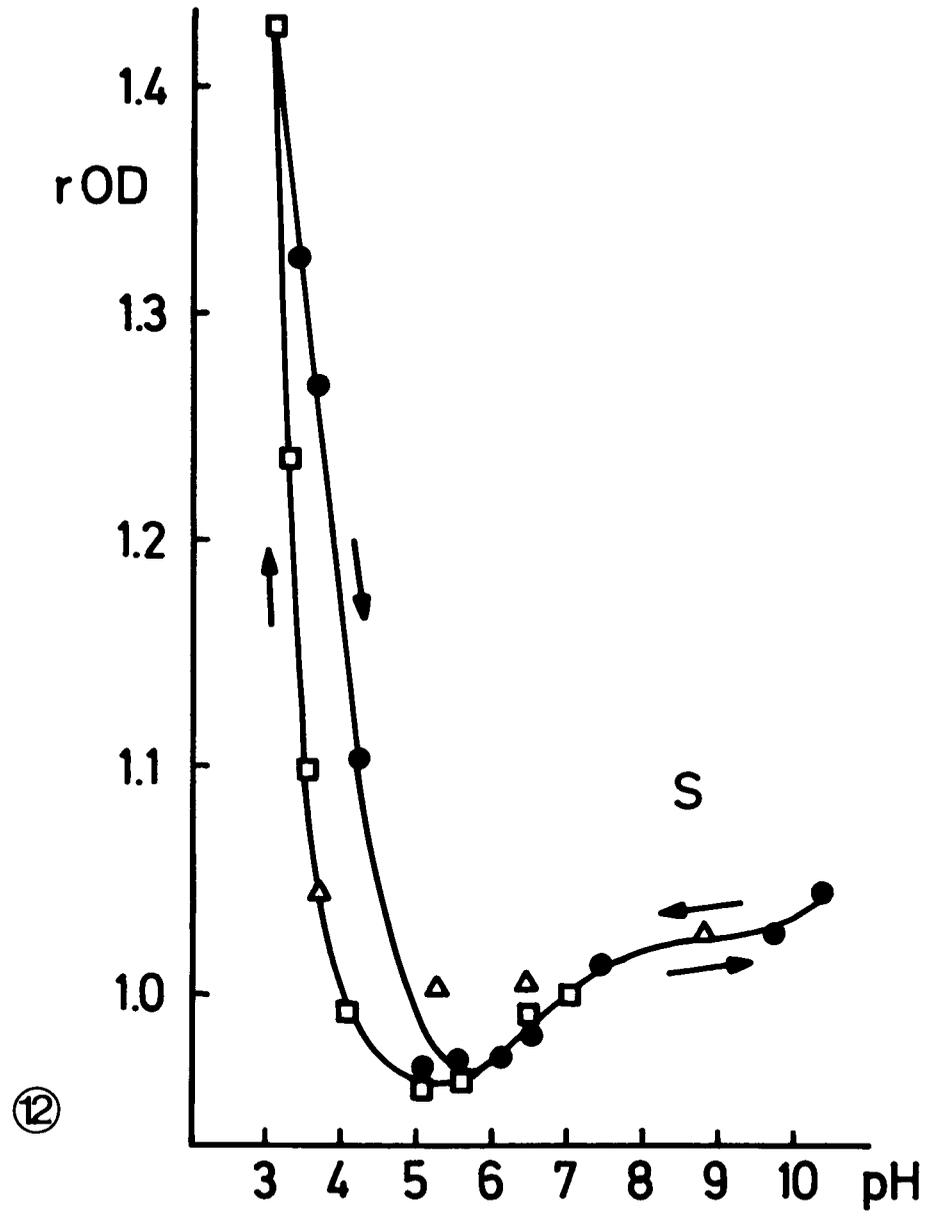
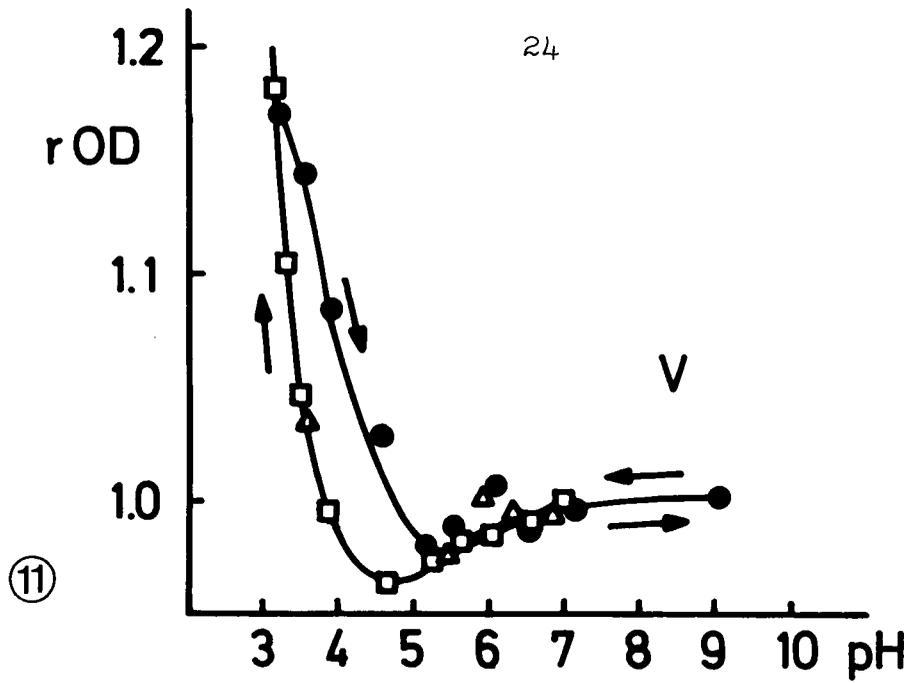
- Säureast
- Baseast ab pH 4,0
- Baseast ab pH 3,6
- △ Baseast ab pH 3,1
- zweite Säuretitation zum Baseast ab pH 3,6

Hystereseschleifen zu erhalten<sup>7</sup>.

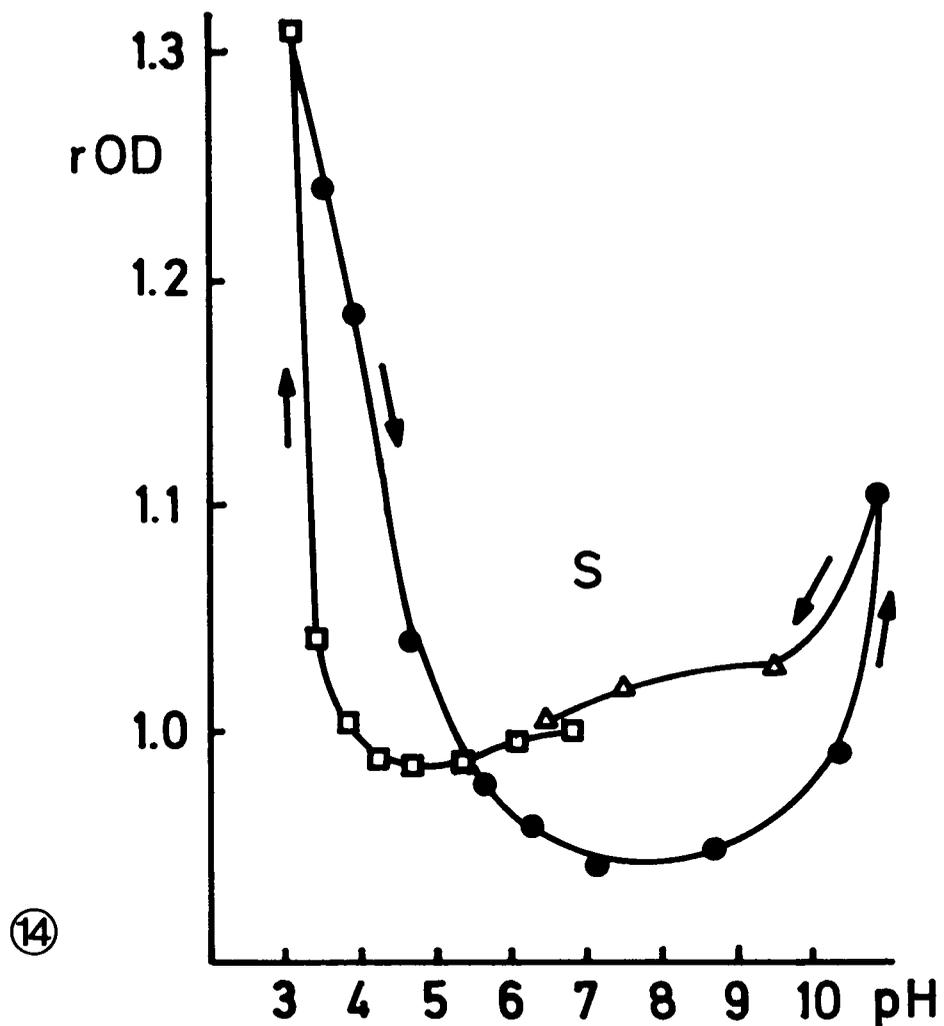
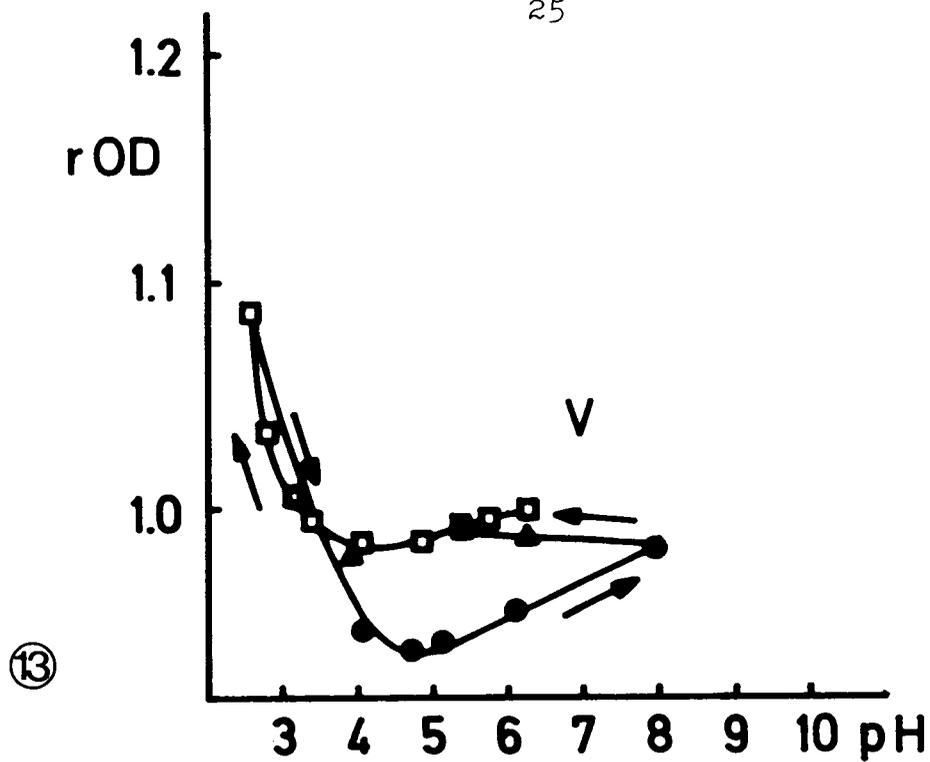
3.2.1 Rohe Ribosomen: Bei der Titration von rohen Ribosomen wurden einfache Hystereseschleifen gefunden, die zwischen pH 3 und pH 6 lagen. Oberhalb und unterhalb dieser Werte können Säure- und Baseast nicht unterschieden werden. Die OD wurde bei Ribosomen aus sporulierenden Zellen während der Säurezugabe wesentlich stärker erhöht (Abb.12) als bei Ribosomen aus vegetativen Zellen (Abb.11). Eine zweite Säuretitration verlief bei beiden Ribosomenarten wieder auf dem Säureast.

3.2.2 Gewaschene Ribosomen: Eine extreme OD war hier leichter einzustellen als bei rohen Ribosomen. Im Gegensatz zu diesen wurden bei gewaschenen doppelte Hystereseschleifen gefunden. Bei vegetativen Ribosomen (Abb.13) lag die erste zwischen pH 2,6 und pH 3,5, die zweite zwischen pH 3,5 und pH~9. Die Hystereseschleifen der Ribosomen aus sporulierenden Zellen wurden zwischen pH 3 und pH 5,5 bzw. pH 5,5 und pH 10,5 ausgebildet (Abb.14) und umschlossen so einen größeren pH-Bereich und wesentlich größere OD-Änderungen als die Schleifen von Ribosomen aus vegetativen Zellen.

3.2.3 Untereinheiten: 30S- und 50S-Untereinheiten wurden durch Zonenzentrifugation isoliert. Sie waren jedoch so empfindlich, daß sie beim Ansäuern zerstört wurden, bevor die OD genügend angestiegen war, um eine Base titration beginnen zu können. Die OD sank plötzlich ab.



Säure-Basetitration von rohen Ribosomen  
 Abb. 11 Ribosomen aus vegetativen Zellen  
 Abb. 12 Ribosomen aus sporulierenden Zellen  
 Symbole wie Abb. 4



Säure-Basetitration von gewaschenen Ribosomen  
 Abb. 13 Ribosomen aus vegetativen Zellen  
 Abb. 14 Ribosomen aus sporulierenden Zellen  
 Symbole wie Abb. 4

## 3.3 Titration von Protein

Die OD-Änderungen nach Titration von ribosomalem Protein äußerten sich bei Säurezugabe in einer OD-Abnahme anstelle der Zunahme bei RNS oder Ribosomen (Abb. 15).

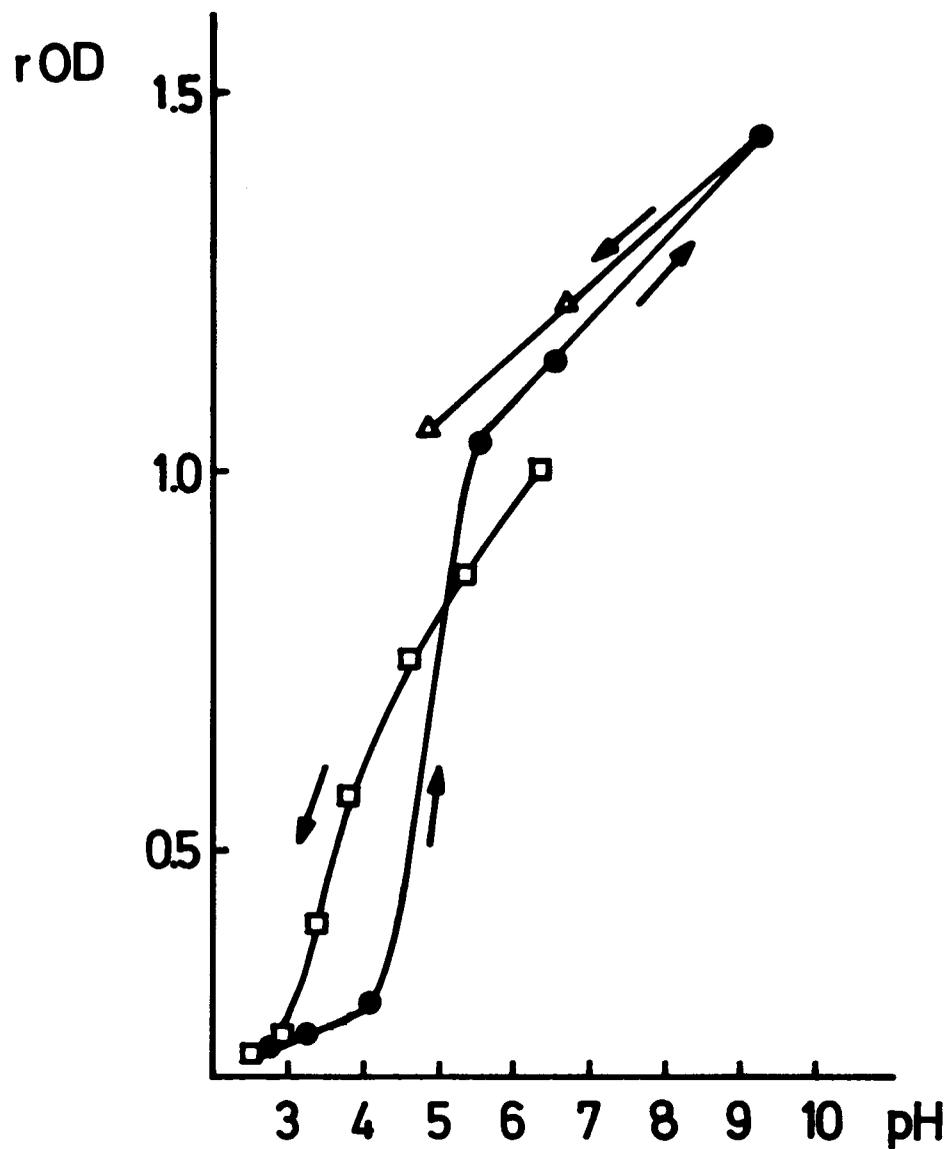


Abb. 15 Säure-Basetitration vom Protein roher Ribosomen aus vegetativen Zellen

Symbole wie Abb. 4

#### 4 ORD-UNTERSUCHUNGEN

Die Erhöhung der OD bei niedrigem pH-Wert spiegelt sich in der Verkleinerung des Drehwinkels von polarisiertem Licht wider. Alle Proben zeigten im ORD-Spektrum um pH 7 eine Kurve mit "Cotton-Effekt" (einem Extremum für positiven und einem für negativen Drehwinkel). Bei Titration auf pH 2,5-2,6 wurde der Cotton-Effekt aufgelöst, um bei Rücktitration (über pH 10,5 auf pH 7) wieder aufzutreten. Die Extrempunkte der Ausgangskurven lagen bei:

218 nm (negativer Drehwinkel)  
 250 nm (negativ)  
 280 nm (positiv für RNS) bzw.  
 285 nm (positiv für Ribosomen)

Der Schnittpunkt der Kurve mit der Abszisse lag bei 265 nm für titrierte RNS und bei 268 nm für titrierte Ribosomen. An dieser Stelle, an der  $[\alpha]_{\lambda} = 0$  ist, absorbieren die Proben am stärksten. Bei größeren Wellenlängen als 400 nm war kein Drehwinkel mehr zu finden.

##### 4.1 Gewaschene Ribosomen

Bei Titration von Ribosomen aus vegetativen Zellen von pH 6,9 auf pH 2,5 wurde der Drehwinkel am stärksten verkleinert (Abb. 16). Jedoch blieb der Verlauf der Kurve ähnlich. Bei Rücktitration über pH 10,5 auf pH 6,7 wurde der Cotton-Effekt vollständig wieder hergestellt.

Dasselbe geschah auch bei Ribosomen aus sporulierenden Zellen (Abb. 17), die von pH 6,9 auf pH 2,6 und über pH 10,5 wieder auf pH 7,1 titriert wurden, jedoch lief hier die Kurve bei

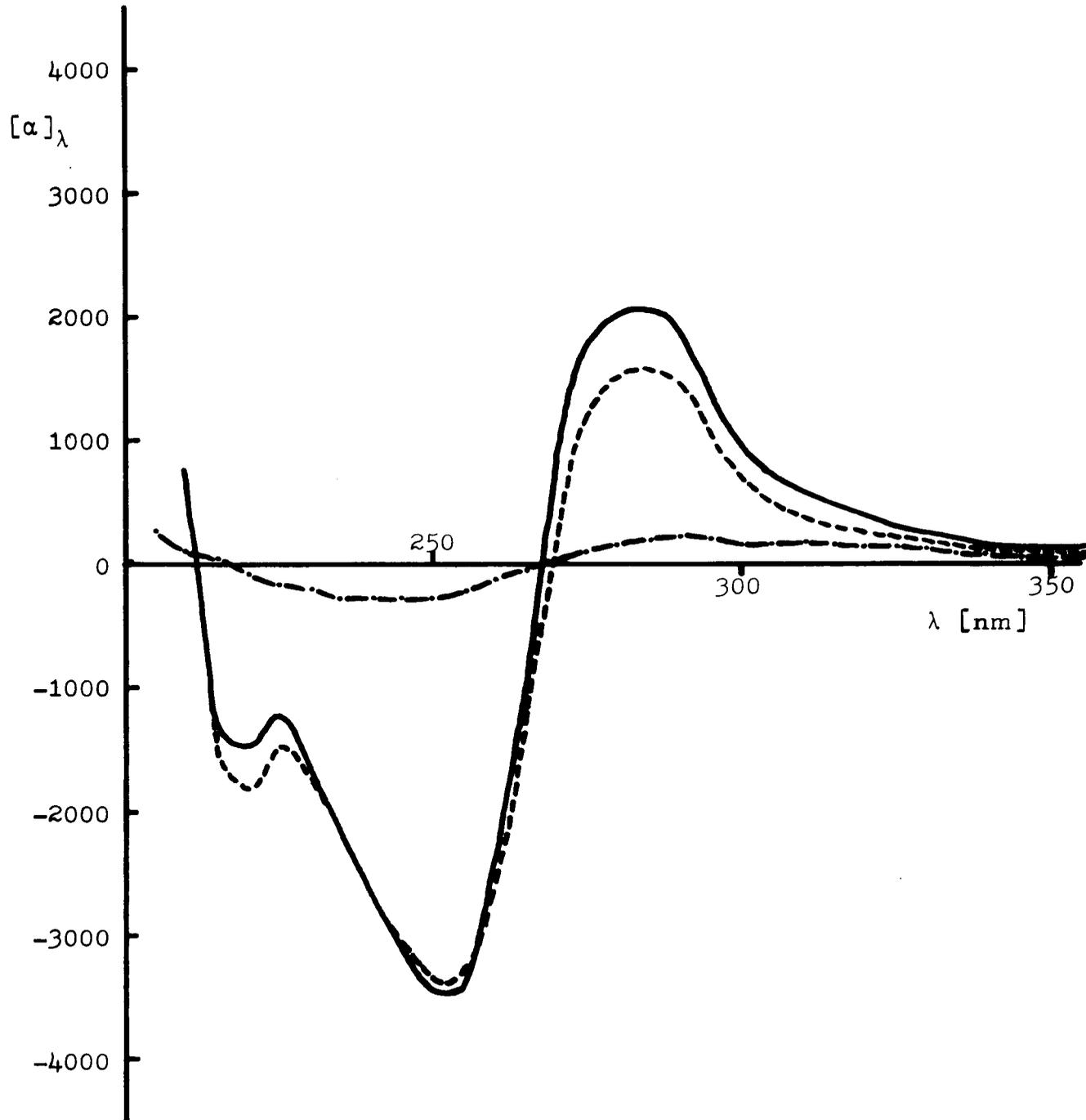


Abb. 16 ORD-Kurven von gewaschenen Ribosomen aus vegetativen Zellen

- Kurve bei pH 6,9
- · - Kurve bei pH 2,5
- - - Kurve bei pH 6,7 nach Titration über pH 10,5

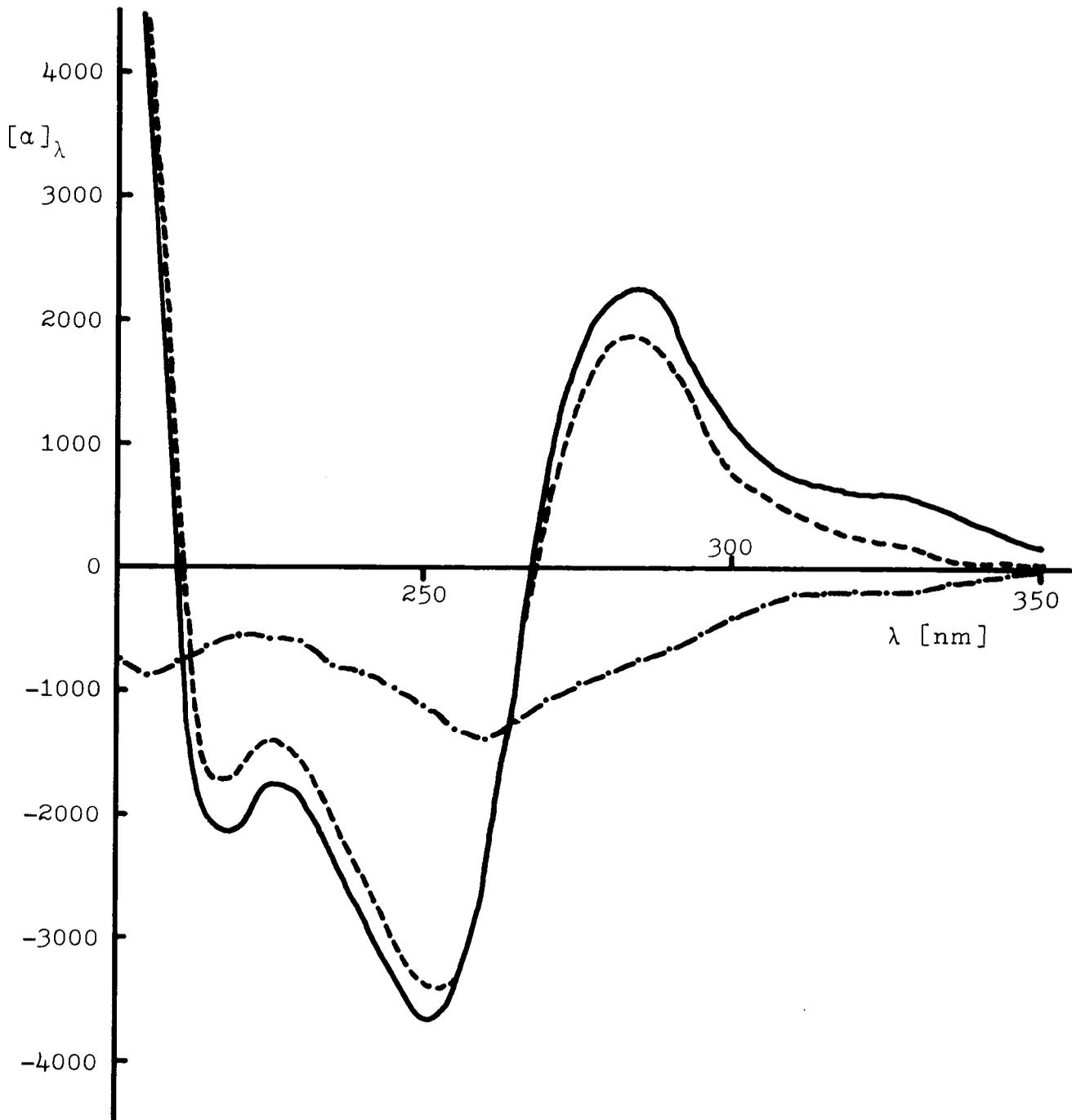


Abb. 17 ORD-Kurven von gewaschenen Ribosomen aus sporulierenden Zellen

- Kurve bei pH 6,9
- · - Kurve bei pH 2,6
- - - Kurve bei pH 7,1 nach Titration über pH 10,5

pH 2,6 anders. Sie hatte zwei Extrema für negativen Drehwinkel bei 205 nm und 260 nm und näherte sich dann ohne ein Extremum für einen positiven Drehwinkel asymptotisch der Abszisse.

#### 4.2 Unfraktionierte Zell-RNS

RNS zeigte einen deutlich höheren Gipfel als die Ribosomen bei 280 nm (Abb. 18) Bei Titration von pH 6,6 auf pH 2,6 entstand eine Kurve mit zwei Extrema für negativen Drehwinkel bei 220 nm und 255 nm und einem dritten mit positivem Drehwinkel bei 300 nm. Die Kurve für eine über pH 10,6 auf pH 6,8 zurücktitrierte Probe enthielt zwar die gleichen Extrema, war aber nicht mit der Ausgangskurve bei pH 6,6 identisch.

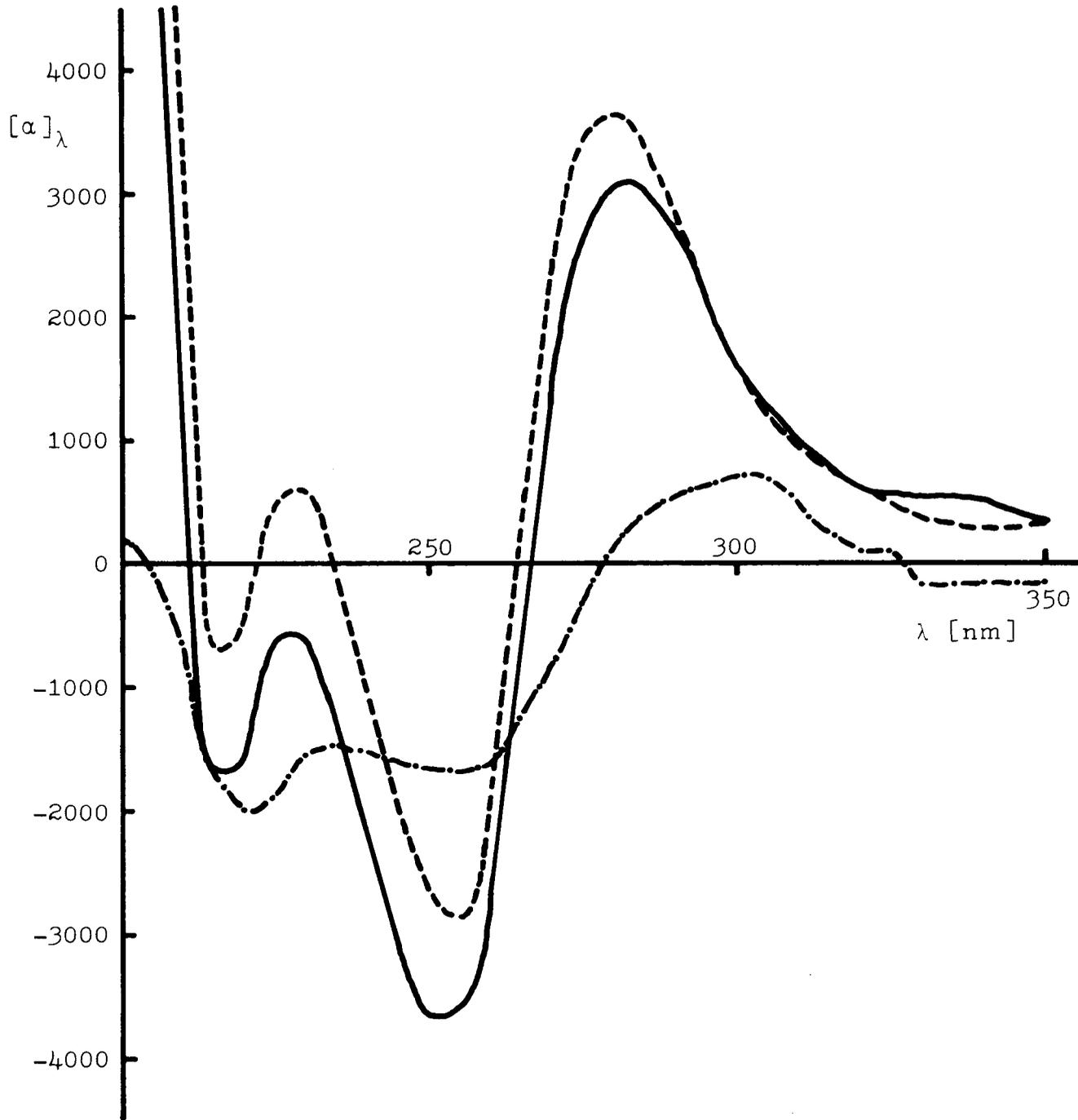


Abb. 18 ORD-Kurven von unfraktionierter RNS aus sporulierenden Zellen

- Kurve bei pH 6,6
- Kurve bei pH 2,6
- - - Kurve bei pH 6,8 nach Titration über pH 10,6

## DISKUSSION

Regulationen der Sporulation sind auf der Ebene der Transkription und der Translation denkbar. Unterschiede in der Transkriptionsspezifität der RNS-Polymerase sind gefunden worden<sup>3</sup>. Eine Änderung im Translationsmechanismus kann durch Modifizierung von ribosomaler RNS, ribosomalen Proteinen, Faktoren, m-RNS und t-RNS erfolgen. Solche Veränderungen kommen während der Sporulation tatsächlich vor. So sind die Bildung eines Langzeitmessengers in *Bacillus cereus*<sup>15</sup> und die Modifizierung von Lysin-t-RNS in *Bacillus subtilis*<sup>16</sup> beschrieben worden. Wie Elektrophoresen und Säulenchromatographien der ribosomalen Proteine zeigen<sup>4,5</sup>, treten auch am Ribosom selbst Veränderungen auf. Sporulierende Zellen sind resistent gegen Fusidinsäure. Wird in vitro die Aktivität der G-Faktor abhängigen, am Ribosom lokalisierten GTPase gemessen, so findet man, das die Ribosomen aus sporulierenden Zellen - im Gegensatz zu denen aus vegetativen Zellen - ebenfalls resistent gegen das Antibiotikum sind. Die Resistenz tritt auf beim Übergang vom Wuchs zur Sporulation, sie entsteht also durch eine meßbare Änderung der Ribosomen<sup>5</sup>.

Die Versuche dieser Arbeit sollten zeigen, ob durch Messen der molekularen Hysterese in Abhängigkeit vom pH-Wert weitere Unterschiede zwischen Ribosomen aus vegetativen und sporulierenden Zellen von *Bacillus subtilis* erkennbar sind.

## RNS-Titration:

Da RNS den größten Teil des Ribosoms ausmacht, wurden zunächst RNS-Proben titriert, um festzustellen, ob sich isolierte RNS aus vegetativen Zellen von der aus sporulierenden Zellen unterscheidet. Alle Säure-Basetitrationen zeigen keine prinzipiellen Unterschiede. Es treten im Gegensatz zu *Escherichia coli* keine echten Hystereseerscheinungen auf. Die Säureäste steigen wie bei einer Hystereseschleife an, die Baseäste liegen bei wesentlich höherer OD und kehren nicht auf das Ausgangsniveau zurück (Abb.19).

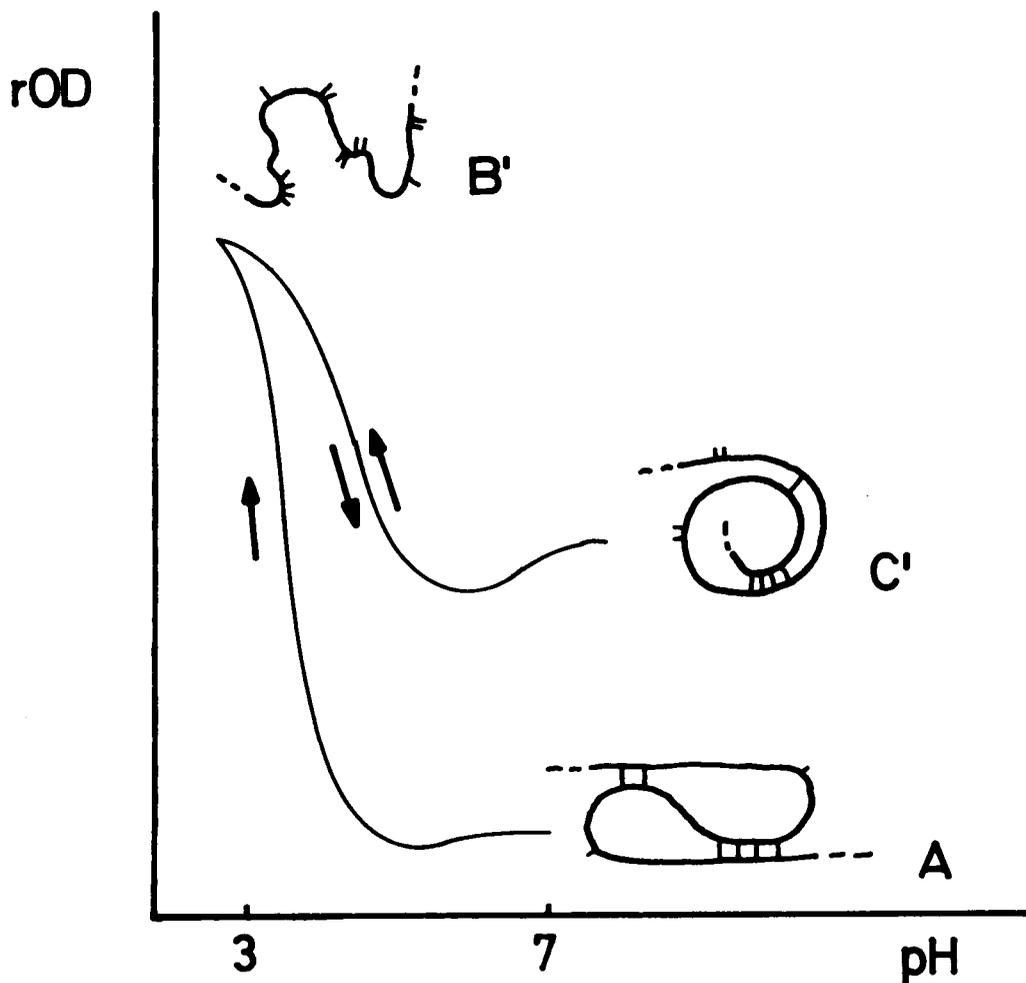


Abb. 19: Modell zur Titration von RNS

Um auszuschließen, daß diese OD-Unterschiede darauf beruhen, daß die RNS während der Versuche abgebaut wird, wurden von allen RNS-Proben (später auch von isolierter RNS aus Ribosomen) vor und nach den Versuchen Polyacrylamidgelelektrophoresen angefertigt. Es wurden keine Bruchstücke gefunden. RNasekontamination lag also, falls überhaupt vorhanden, in vernachlässigbarer Menge vor.

In r-RNS aus *E.coli* ist der Säureast eine Gleichgewichtskurve, auf der beliebig auf und ab titriert werden kann, solange ein extremer pH-Wert nicht überschritten wird<sup>7</sup>. Darüberhinaus werden in RNS aus *E.coli* - im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit - vollständige Hysteresesyklen gefunden<sup>6</sup>. Der höhere Baseast bei Titration von RNS aus *B.subtilis* konnte zustande kommen, weil der extreme pH-Wert für diese RNS zu niedrig war. RNS-Proben wurden deshalb von verschiedenen Punkten des Säureastes aus, bevor ein extremer pH-Wert erreicht war, mit Base titriert. Die resultierenden Baseäste laufen parallel zueinander (Abb. 10) und kehren nicht zum Ausgangspunkt zurück. Also ist der Säureast in RNS aus *B.subtilis* keine Gleichgewichtskurve, sondern es werden bei Säurezugabe von Anfang an kontinuierlich Konformationen irreversibel zerstört, so daß der Ausgangswert nicht wieder erreicht werden kann. Die Sekundärstruktur von RNS aus *E.coli* ist säurestabiler als die aus *B.subtilis*. Ein Grund für diesen Unterschied kann die Bildung von metastabilen Zuständen (Strukturen durch Bindung zwischen je zwei Guanin- oder je zwei Adenin-Gruppen) sein. Solche sind für isolierte RNS aus *E.coli*

im Gegensatz zu der aus *B.subtilis* bekannt<sup>6</sup>.

Die OD bei Titration von RNS aus *B.subtilis* nimmt auf dem Baseast mit steigendem pH-Wert ab. Eine zweite Säuretitation verläuft entlang des Baseastes. So stellt der Säureast eine Denaturierungskurve dar, in der die ursprüngliche Konformation (symbolisiert durch A in Abb. 19) in die denaturierte Form B' überführt wird. Ein Teil der Konformation wird dabei irreversibel verändert. Der Baseast ist dann eine Denaturierungs-Renaturierungskurve (Gleichgewichtskurve) zwischen Form B' und C'. Bei Basetitration wird nur ein Teil der ursprünglichen Konformation wiederhergestellt, und neue Bindungen können geschlossen werden.

Im Titrationsverhalten von unfraktionierter RNS aus vegetativen und sporulierenden Zellen sind keine Unterschiede zu erkennen. Es könnte jedoch sein, daß die gesuchten Differenzen in dem verwendeten RNS-Gemisch durch das Verhalten anderer als der ribosomalen RNS-Arten, z.B. t-RNS oder m-RNS, überdeckt wurden. Um dies auszuschließen, wurden 16S- und 23S-RNS isoliert und titriert.

Es ergibt sich, daß die Säureäste der Titration von 16S- und 23S-RNS flacher sind und nicht so hoch ansteigen wie die von unfraktionierter Zell-RNS, was bedeutet, daß diese beiden ribosomalen RNS-Arten stabiler gegen Säure sind als die übrigen RNS-Arten. 23S-RNS läßt sich bei wiederholten Titrationsen wie die unfraktionierte RNS auf dem Baseast auf und ab titrieren. 16S-RNS zeigt jedoch bei erneuter Säuretitation ansteigende OD-Werte, die höher als der Baseast liegen. In diesem Abschnitt der

Versuche ist die 16S-RNS labiler als andere RNS-Arten. Da zwischen 16S-RNS aus vegetativen und sporulierenden Zellen bzw. 23S-RNS aus vegetativen und sporulierenden Zellen keine bemerkenswerten Unterschiede festgestellt werden können, ist anzunehmen, daß der RNS-Anteil der Ribosomen nach Isolation gleich ist. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit genetischen Untersuchungen an 16S- und 23S-RNS<sup>17</sup>.

Ribosomentitration:

Isolierte r-RNS zeigt keine Hysterese. Deshalb wurden in weiteren Versuchen ganze Ribosomen auf die Bildung metastabiler Bindungen hin getestet. Die Titration von Ribosomen ergibt vollständige Hystereseschleifen (Abb. 20), die entweder durch die Konfiguration der RNS im Ribosom oder durch den Proteinanteil des Ribosoms hervorgerufen werden.

Bei Säure-Basetitration von ribosomalen Proteinen werden ganz andere OD-Änderungen erhalten als bei Titration von Ribosomen oder ribosomaler RNS (Abnahme bei Säurezugabe, Abb. 15). Außerdem ist der Extinktionskoeffizient bei 260 nm von RNS größer als der von Protein, so daß bei dieser Wellenlänge mit größerer Wahrscheinlichkeit die Änderungen der RNS-Konformation gemessen werden.

Im Ribosom weist die RNS eine andere Tertiärstruktur auf, als wenn sie frei vorliegt. Sie ist unter Einwirkung von Proteinen so gefaltet, daß metastabile Zustände hervorgerufen werden können (vergl. Abb. 20). Auf dem Säureast können durch Anwesenheit der Proteine langlebige metastabile Bindungen wie x-x in Sche-

ma B von Abb. 20 geschlossen werden, so daß die ursprüngliche Konformation wieder - im Gegensatz zu der bei reiner RNS - erreicht werden kann. Der Unterschied zwischen Ribosomen aus vegetativen und sporulierenden Zellen resultiert dann daraus, daß RNS in verschiedenen Ribosomen in unterschiedlichen, durch Proteine induzierten Konformationen vorliegt.

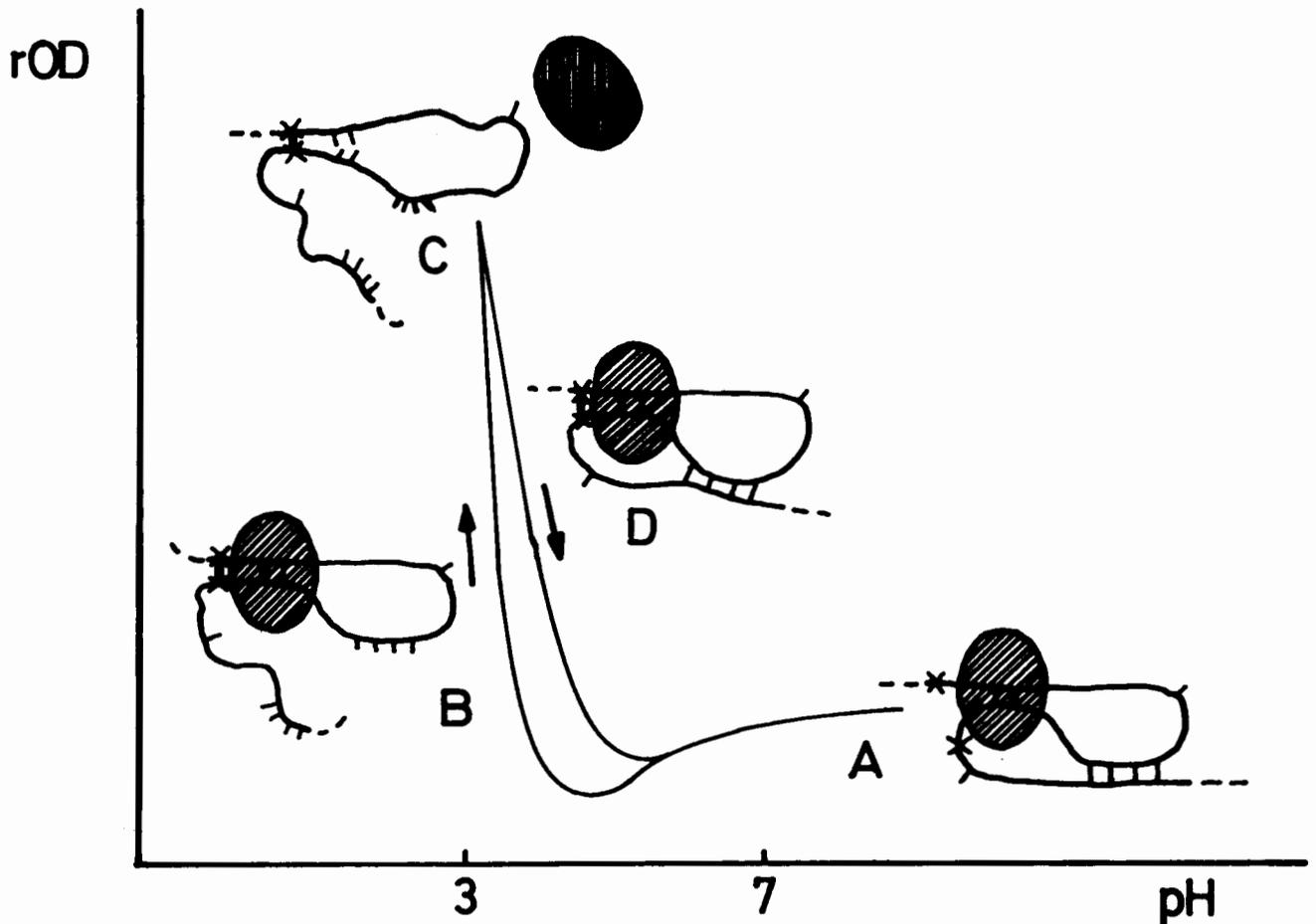


Abb. 20: Modell zur Titration von Ribosomen

Sowohl gewaschene als auch rohe Ribosomen aus sporulierenden Zellen zeigen eine größere OD-Änderung als vegetative Ribosomen, d.h. sie sind labiler. Gewaschene Ribosomen aus vegetativen Zellen lassen sich sogar bis zu niedrigeren pH-Werten titrieren. Rohe Ribosomen zeigen eine einfache, gewaschene eine doppelte Hysterese-

schleife. Durch das Abwaschen einiger Faktoren (Proteine) können Stellen der r-RNS frei werden, die neue metastabile Zustände entwickeln können und so eine zweite Schleife hervorrufen. Ein "Grenz-pH-Wert" ließ sich bei gewaschenen Ribosomen leichter einstellen als bei rohen, was darauf zurückzuführen sein mag, daß in rohen Ribosomen einige weniger fest ans Ribosom gebundene Proteine bei zu niedrigem pH-Wert aus dem Ribosom dissoziieren und so ein plötzliches Absinken der OD hervorrufen (analog zur Titration der Proteine).

Das gleiche Phänomen findet man bei der Titration isolierter Untereinheiten noch bevor die OD hoch genug angestiegen ist. Eventuell sind die Untereinheiten nach ihrer Isolation so verändert, daß einige Proteine leichter abdissoziieren können.

Es gibt keinen Zweifel, daß metastabile Zustände in Ribosomen vorhanden sind. Außerdem sind diese Metastabilitäten unterschiedlich in Ribosomen aus vegetativen und sporulierenden Zellen. Die Konformationsänderungen sind jedoch nicht so gestaltet wie die in r-RNS von *E.coli*. Dort verzögern sie die Renaturierung. In RNS von *B.subtilis* ist die OD schon nach wenigen Minuten eingestellt im Gegensatz zu der bei *E.coli*, die auf dem Baseast mehrere Stunden benötigt<sup>6</sup>.

#### ORD-Messung:

Die ORD-Untersuchungen spiegeln bei niedrigem pH-Wert die Auflösung und nach Rücktitration die Wiederherstellung von Strukturen wider. Wie die Spektren zeigen, liegen bei niedrigem pH-

Wert unterschiedliche Konformationen in Ribosomen aus vegetativen und sporulierenden Zellen vor.

Analog zur OD-Messung werden nach Rücktitration von Ribosomen die Ausgangskurven zurückerhalten, bei RNS jedoch nicht. Der höhere Gipfel der RNS bei 280 nm (Abb. 18) ist darauf zurückzuführen, daß der Extinktionskoeffizient einer reinen RNS-Lösung größer ist als der einer RNS-Protein-Mischung. Bei niedrigem pH-Wert ergeben ORD-Messungen von RNS und Ribosomen aus sporulierenden Zellen und Ribosomen aus vegetativen Zellen verschiedene Kurven. Es ist anzunehmen, daß sich hier die unterschiedlichen metastabilen Zustände widerspiegeln.

ÜBERSICHT (Vergleich von E.coli mit B.subtilis)

	RNS (E.coli)	RNS (B.subtilis)	Ribosomen (B.subtilis)
Ausbildung einer Hystereseschleife	+	-	+
Art des Säureastes	Gleichgewichtskurve (reversibel)	Denaturierungskurve (irreversibel)	Gleichgewichtskurve (reversibel)
irreversible Änderungen der Konformation	-	+	-
Art des Baseastes	Grenzkurve mit Metastabilitäten	Gleichgewichtskurve	Grenzkurve mit Metastabilitäten
Verlauf weiterer Titrations nach Ablauf eines ganzen Titrationszykluses	auf der ersten Schleife	auf dem Baseast auf und ab	auf der ersten Schleife
Einstellzeit für konstante OD-Werte auf dem Baseast	mehrere Stunden	1 Minute	1 Minute

## ZUSAMMENFASSUNG

Bei verschiedenen pH-Werten wurde die OD von Suspensionen ribosomaler RNS und ganzer Ribosomen gemessen.

1. Die Struktur von ribosomaler RNS wird durch niedrigen pH-Wert zerstört.
2. Isolierte RNS aus vegetativen und sporulierenden Zellen von *B.subtilis* ist gleich.
3. Titrations von Ribosomen ergaben Hystereseschleifen, weil die Konformation der RNS durch Anwesenheit der Proteine stabilisiert wird.
4. Die Konformation der RNS aus Ribosomen von vegetativen und sporulierenden Zellen ist verschieden. Vegetative ribosomale RNS ist stabiler.
5. Rohe und  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -gewaschene Ribosomen ergeben unterschiedliche Hysteresekurven, weil die Struktur der ribosomalen RNS durch Abwaschen einiger Proteine verändert wird.

ORD-Spektren von ribosomaler RNS und gewaschenen Ribosomen wurden aufgenommen.

1. Die Konformation der RNS wird durch niedrigen pH-Wert irreversibel verändert.
2. Ribosomen aus vegetativen und sporulierenden Zellen haben unterschiedliche Strukturen bei niedrigem pH-Wert.

## LITERATURVERZEICHNIS

- 1 J.M.Sterlini, J.Mandelstam :  
Commitment to sporulation in *Bacillus subtilis* and its relationship to development of Actinomycin resistance  
*Biochem.J.* 113 , 29-37 (1969)
- 2 W.Epstein, J.R.Beckwith :  
Regulation of gene expression  
*Ann.Rev.Biochem.* 37 , 411-436 (1968)
- 3 R.Losick, A.L.Sonenshein :  
Change in the template specificity of RNA polymerase during sporulation of *Bacillus subtilis*  
*Nature* 224 , 35-37 (1969)
- 4 Y.Kobayashi :  
Ribosomal changes occurring during bacterial sporulation  
*Coll.int.CNRS sur la regulation de la sporulation microbienne* 227 , 107-108 (1973)
- 5 P.Fortnagel, R.Bergmann :  
Alteration of the ribosomal fraction of *Bacillus subtilis* during sporulation  
*Biochim.Biophys.Acta* 299 , 136-141 (1973)
- 6 A.Revzin, E.Neumann, A.Katchalsky :  
Metastable secondary structures in ribosomal RNA-molecular hysteresis in the acid-base titration of *E.coli* ribosomal RNA  
*J.Mol.Biol.* 79 , 95-114 (1973)
- 7 E.Neumann :  
Molekulare Hysterese und ihre kybernetische Bedeutung  
*Angewandte Chemie* 85 , 430-444 (1973)
- 8 E.Freese, P.Fortnagel :  
Analysis of sporulation mutants  
*J.Bacteriol.* 94 , 1957-1969 (1967)
- 9 B.v.d.Zeijst, H.Bult :  
Equivolumetric glycerol and sucrose gradients for B-XIV and B-XV zonal rotors  
*Eur.J.Biochem.* 28 , 463-474 (1972)

- 10 P.Spitnik-Elson :  
A new approach to the fractination of ribosomal protein  
FEBS Letters 7 , 214-216 (1970)
- 11 R.Miskin, A.Zamir, D.Elson :  
Inactivation and reactivation of ribosomal subunits : The  
peptidyl transferase actifity of the 50S subunit of E.coli  
J.Mol.Biol. 54 , 355-378 (1970)
- 12 S.Zamenhof :  
Preparation and assay of deoxyribonucleic acid from animal  
tissue  
Methods in Enzymology Vol. 3 , 696-704 (1957)
- 13 G.Ashwell :  
Colorimetric analysis of sugars  
Methods in Enzymology Vol. 3 , 73-105 (1957)
- 14 D.H.L.Bishop, J.R.Claybrook, S.Spiegelman :  
Elektrophoretic separation of viral nucleic acids on polyacryl-  
amide gels  
J.Mol.Biol. 26 , 373-387 (1967)
- 15 A.I.Aronson :  
Characterization of messenger RNA in sporulating Bacillus  
cereus  
J.Mol.Biol. 11 , 576-588 (1965)
- 16 R.A.Lazzarini, E.Santangelo :  
Medium dependent alteration of lysin transfer ribonucleic acid  
in sporulating Bacillus subtilis cells  
J.Bacteriol. 94 , 125-130 (1967)
- 17 H.L.Bishop, R.H.Doï :  
Genetic similarity between the ribosomal RNA from spores  
and vegetative cells of Bacillus subtilis  
Biochim.Biophys.Acta 169 , 278-280 (1968)

### Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Dr.D.Jeckel für die Bereitstellung der ORD-Anlage und bei Herrn Prof.Dr.P.Fortnagel für die Überlassung des Themas herzlich bedanken.