

4 Methoden

4.1 Aufbewahrung und Anzucht von Bakterien

4.1.1 Aufbewahrung der Mikroorganismenstämme

Zur Aufbewahrung der Mikroorganismenstämme wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde eine ausgeglühte Impföse voll Kolonien von einer frischen Übernacht-Plattenkultur in 1 ml DB-Mix resuspendiert und bei -70 °C eingefroren.

4.1.2 Anzucht von *E. coli*-, *B. subtilis*- und anderen Bakterienzellen sowie Hefen

Die Kultivierung der Bakterienzellen erfolgte, sofern nicht anders angegeben, in LB-Medium bei Temperaturen von 28 und 37 °C. Gegebenenfalls wurde dem Medium Antibiotikum zugesetzt. *B. subtilis*-Zellen wurden in Landy-Medium (Landy et al., 1948) kultiviert, dem zusätzlich 0,1 % Hefeextrakt und 2 mg/l Phenylalanin zugegeben wurden. (Vollenbroich et al., 1993). Hefezellen wurden in YPD-Medium bei 28 °C inkubiert.

4.2 Methoden zur Isolierung, Analyse, Amplifikation und Rekombination von DNA

4.2.1 DNA-Isolierung

4.2.1.1 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA

A. Analytische Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse nach *Birnboim*

Zur Mini-Plasmid-Präparation wurde entweder 1 ml einer Übernachtkultur pelletiert und in 100 µl Puffer P1 resuspendiert oder eine sterile Impföse voll Kolonien wurde direkt in 100 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen durch Zugabe von 200 µl Lysispuffer P2 und weiterer Inkubation für 5 min lysiert. Durch Zugabe von 150 µl eiskaltem Neutralisationspuffer P3 wurde der Ansatz neutralisiert, die chromosomale DNA und die Proteine wurden dabei präzipitiert. Zur vollständigen Präzipitation und Neutralisation wurde der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert. Das entstandene Präzipitat wurde bei 4 °C mit 13000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand im Verhältnis 1:1 mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Nach kurzer Zentrifugation zur Phasentrennung wurde die obere wässrige Phase mit 1 ml -20 °C kaltem absoluten Ethanol für mindestens 30 min bei -20 °C gefällt, für 30 min bei 4 °C abzentrifugiert und mit -20 °C kaltem 70 % Ethanol gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde bei 37 °C getrocknet und in ca. 50 µl bidest. Wasser gelöst.

B. Analytische Isolierung von Plasmid-DNA nach dem *Qiagen Plasmid Mini Handbook*

Zunächst wurde das Bakterienpellet aus 1 ml Übernachtskultur oder eine Impföse voll Kolonien in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Lysispuffer P2 wurde der Ansatz vorsichtig durchmischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 300 µl eiskalter Neutralisationspuffer P3 zugesetzt und für 5 min auf Eis inkubiert, wobei wiederum Proteine und chromosomale DNA präzipitiert wurden. Nach 10 min Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit (Tischzentrifuge 13000 rpm) wurde der plasmidhaltige Überstand abgenommen und auf eine mit 1 ml QBT-Puffer equilibrierte Qiagen-tip 20-Säule aufgegeben (*gravity flow*). Die Säule wurde den Herstellerangaben entsprechend viermal mit 1 ml QC-Puffer gewaschen und anschließend mit 0,8 ml QF-Puffer eluiert. Durch Zugabe des 0,7 fachen Volumens Isopropanol zum Eluat wurde die Plasmid-DNA ausgefällt, die mit 1 ml -20 °C kaltem Ethanol gewaschen und abschließend luftgetrocknet wurde. Das getrocknete Pellet wurde in ca. 50 µl bidest. Wasser gelöst und einer analytischen Agarose-Gelelektrophorese unterworfen.

4. 2. 1. 2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA im präparativen Maßstab erfolgte entsprechend den Empfehlungen des *Qiagen Plasmid Purification Handbook* nach dem *Qiagen Midi and Maxi Protocols*.

4. 2. 1. 3 Analytische Isolierung prokaryotischer chromosomaler DNA

Bei der Isolierung chromosomaler DNA im analytischen Maßstab wurden entweder das Pellet aus 2 ml einer frischen Übernachtskultur oder eine Impföse voll Kolonien einer ebenfalls frischen Übernachts-Plattenkultur in 0,5 ml TE-Puffer (20:1) resuspendiert und gewaschen. Für die weitere Aufarbeitung wurde jeweils ein Zehntel der in 4. 2. 1. 4 angegebenen Volumina der entsprechenden Lösungen eingesetzt.

Alternativ erfolgte die Isolierung genomischer DNA aus *B. subtilis*-Zellen an *Qiagen*-DNeasyTM-Mini-Säulen nach den Empfehlungen des Herstellers (*Qiagen DNeasyTM Tissue Kit Handbook, Protocols for bacteria: B. Isolation of genomic DNA from Gram-positive bacteria*).

4. 2. 1. 4 Präparative Isolierung prokaryotischer chromosomaler DNA

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *Lysobacter spp.*, *E. coli* oder *B. subtilis* wurden je 20 ml einer frischen Übernachtskultur für 10 min bei 8000 rpm (HB4-Rotor) pelletiert und mit

5 ml TE-Puffer (20:1) gewaschen. Das Pellet wurde in einem Corex[®]-Röhrchen in 5 ml TE-Puffer (20:1) resuspendiert und nach Zugabe von 0,5 ml Lysozym (5 mg/ml) für mindestens 30 min bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurde es mit 0,5 ml 10 % SDS versetzt, wobei die Zellwände vollständig zerstört wurden. Die Proben wurden bei 37 °C inkubiert, bis der Lyseprozeß abgeschlossen und die Lösung klar erschien. Danach wurde zur Entfernung der Proteine eine Phenolextraktion durchgeführt, wobei die Lösung mit jeweils 0,5 bis 1 ml einer TE-gesättigten Phenollösung (*Roth*) ausgeschüttelt und für 10 min bei 10000 rpm (HB4-Rotor) abzentrifugiert wurde. Die Phenolextraktion wurde so oft wiederholt, bis die Interphase verschwand. Die obere Phase wurde anschließend drei- bis viermal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, zur Phasentrennung wurden die Proben für 10 min bei 10000 rpm (HB4-Rotor) zentrifugiert. Wenn in der wäßrigen Lösung kein Phenol mehr nachweisbar war (Geruch), wurde die Probe auf 0,2 M NaCl eingestellt und die chromosomale DNA mit dem doppelten Volumen an -20 °C kaltem absoluten Ethanol ausgefällt. Diese wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml -20 °C kalten 70 % Ethanol gewaschen und luftgetrocknet bis kein Ethanol mehr nachweisbar war (Geruch). Abschließend wurde die chromosomale DNA in ca. 500 µl bidest. Wasser aufgenommen und bei 37 °C gelöst.

4. 2. 2 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde sowohl für die Amplifikation bestimmter Genabschnitte für spätere Klonierungen benutzt als auch zum Positivscreening für durchgeführte Klonierungen. In den meisten Fällen wurde die Vent[®]-DNA-Polymerase verwendet, in einigen Ausnahmen jedoch lieferte erst die Taq-DNA-Polymerase ein PCR-Produkt bzw. wurde die Spezifität und/oder Ausbeute an PCR-Produkt erhöht. Das Gesamtvolumen der PCR-Ansätze betrug prinzipiell 100 µl. Für einen Ansatz mit der Vent[®]-DNA-Polymerase wurden in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert:

DNA-Template (chromosomale DNA):	oder	Plasmid- ≤ 1 µg/Reaktion
Hin-/Rückprimer:		je 50 pmol (je 0,5 µM Endkonzentration)
10x <i>ThermoPol</i> -Reaktionspuffer:		10 µl
100 mM MgSO ₄ :		variable Volumina (Endkonzentration 0 bis 6 mM)
Formamid:		7 µl (nur bei MgSO ₄ -Zusätzen)
25 mM dNTP-Mix:		2 µl (Endkonzentration 500 µM) bzw. 4 µl (bei Fragmenten ≥ 5 kb; Endkonzentration 1 mM)
steriles bidest. Wasser:		ad 99 µl
Vent [®] -DNA-Polymerase:		1 µl (2 U)

Für einen Ansatz mit der Taq-Polymerase wurden in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert:

DNA-Template (chromosomale oder Plasmid-DNA):	≤ 1 µg/Reaktion
Hin-/Rückprimer:	je 50 pmol (je 0,5 µM Endkonzentration)
10x <i>Qiagen</i> -PCR-Puffer:	10 µl
5x Q-Solution:	optional 20 µl
25 mM MgCl ₂ :	variable Volumina (Endkonzentrationen bis 6 mM, meist 2 mM)
25 mM dNTP-Mix:	1,5 µl (Endkonzentration 375 µM)
steriles bidest. Wasser:	ad 99 µl
Taq-DNA-Polymerase:	0,5 µl (2,5 U)

Alle Komponenten wurden durch Auf- und Absaugen mit einer Pipette durchmischt, mit 50 µl Paraffinöl überschichtet und kurz zentrifugiert. Die PCR wurde in einem programmierbaren Thermozykler durchgeführt.

Zyklus:	Denaturierung	94 °C	0,5 bis 1 min
	Annealing	42-57 °C	0,5 bis 1 min
	Extension	72 °C	1 min je 1 kb

Nach einem initialen Denaturierungsschritt von 3 bis 5 min bei 94 °C wurde der Zyklus 25 bis 35 mal wiederholt. Beendet wurde die PCR mit einem Polymerisationsschritt von 5 min, um überstehende einzelsträngige Bereiche aufzufüllen. In einem vereinfachten „Hot-Start“ wurde das Programm zunächst gestartet und erst bei Erreichen der initialen Denaturierungstemperatur von 94 °C wurden die PCR-Ansätze in den Thermozykler gestellt. Nach Beendigung der PCR wurde die untere wäßrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 10x DNA-Probenpuffer versetzt. Ein Aliquot von bis zu 10 µl wurde auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen und einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen. Bei Vorhandensein des gewünschten PCR-Produkts wurde dieses nach einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese aus dem Gel eluiert (siehe 4. 2. 5).

4. 2. 3 Restriktion, Ligation und Dephosphorylierung von DNA

Analytische **Restriktions**ansätze wurden meist in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt, präparative Ansätze in einem Volumen von 100 µl. Nach den Angaben des Herstellers (*New England BioLabs*) wurden zu der zu schneidenden DNA pipettiert: 1 bzw. 10 µl (analytisch/präparativ) des vom Hersteller mitgelieferten 10x Reaktionspuffers, falls erforderlich 1 bzw. 10 µl BSA (1 mg/ml) sowie 2 bis 10 U bzw. 20 bis 100 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease. Die Proben wurden, falls nicht anders vom Hersteller angegeben, bei 37 °C für 2 bis 18 h inkubiert. Bei einem Doppelverdau mit zwei Restriktionsenzymen wurde der vom Hersteller vorgeschlagene Reaktionspuffer verwendet,

oder der Verdau wurde sequentiell durchgeführt. Dazu wurde zuerst der Restriktionsverdau mit dem Enzym durchgeführt, dessen Reaktionspuffer die geringere Salz- oder Pufferkonzentration aufwies, nach Zugabe der fehlenden Salz- bzw. Puffermenge wurde der zweite Verdau gestartet.

Für einen **Ligationsansatz** wurden die zu ligierenden Fragmente getrennt geschnitten, auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und aus diesem eluiert. Die Ligation erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 20 µl und enthielt neben den zu ligierenden Fragmenten 2 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer und 2 µl T4-DNA-Ligase (800 U). Die Volumina der zu ligierenden Fragmente wurden dabei so gewählt, daß das Verhältnis von Vektor und zu insertierender DNA 1:2 betrug. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 18 °C inkubiert und anschließend direkt zur Transformation eingesetzt oder bei -20 °C aufbewahrt.

Bei der Konstruktion der Surfactin-Synthetase-Austauschmutanten sollte in einen *AvrII* geschnittenen Vektor ein Insert eingefügt werden, das beidseitig eine *AvrII*-Schnittstelle trug. Um eine Rückligation des Vektors zu verhindern, wurden dessen 5'-Enden vor der Ligation dephosphoryliert. Die **Dephosphorylierung** erfolgte mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) in einem Reaktionsvolumen von 100 µl. Zu der mit *AvrII* geschnittenen und aus dem Agarosegel eluierten DNA wurde entsprechend den Herstellerangaben 10 µl des 10x NEB-Puffers 2 (*New England BioLabs*) gegeben. Durch Zugabe von 100 U CIP wurde die Dephosphorylierung gestartet, und für 18 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 10x DNA-Probenpuffer wurde der Reaktionsansatz ohne weitere thermische Behandlung auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und anschließend aus dem Gel eluiert.

4. 2. 4 DNA-Elektrophorese

4. 2. 4. 1 Agarose-Flachbett-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente sowohl im analytischen als auch im präparativen Maßstab wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit horizontalen Agarosegelen (Dimension 7 x 10 cm) durchgeführt. Für Fragmente ≥ 400 bp wurden 1,0 %ige Agarosegele in 1x TBE-Puffer verwendet, für kleinere Fragmente 1,5 %ige Gele. Nach dem Aufschmelzen der Agaroselösung in der Mikrowelle wurde das für ein Agarosegel benötigte Volumen separat abgenommen, nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C auf 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) eingestellt und in die Apparatur gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde das Gel mit 1x TBE-Puffer überschichtet, und die mit 10x DNA-Probenpuffer versetzten Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 120 V durchgeführt, bis die Farbmarker des DNA-Probenpuffers (Bromphenolblau, Xylencyanol) die erforderliche Trennstrecke zurückgelegt hatten. Die DNA-Banden wurden mit Hilfe eines UV-Transilluminators detektiert und zur Dokumentation fotografiert. Im Falle präparativer Agarosegele wurden die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert.

4. 2. 4. 2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Alternativ zur Agarose-Gelelektrophorese wurde zu analytischen Zwecken eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einer vertikalen Elektrophoresekammer durchgeführt. Für Fragmente zwischen 100 und 1000 bp wurden 4 %ige Polyacrylamidgele in 1x TBE-Puffer (zzgl. 0,6 mM TEMED und 0,05 % APS) verwendet, die zwischen die vorbereiteten Glasplatten (Dimension 13 x 8 cm) gegossen wurden. Die Elektrophorese wurde nach der Probenbeladung bei konstanter Spannung von 75 V für eine Stunde durchgeführt. Zur EtBr-Färbung wurde das Gel in die Färbelösung (0,5 µg/ml EtBr in 1x TBE-Puffer) überführt und für etwa 30 min inkubiert. Detektion und Dokumentation erfolgten analog zur Agarose-Gelelektrophorese.

4. 2. 5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Elution von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen wurde der *JetSorb*[®] *DNA-Extraction Kit (Genomed)* verwendet. Die gewünschten DNA-Banden wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Gemäß dem *JetSorb*[®]-Protokoll wurde anschließend die DNA aus der Agarose gelöst, an Glasmilch gebunden, mehrmals unter Hoch- und Niedrigsalzbedingungen gewaschen und schließlich eluiert.

4. 2. 6 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Da die PCR-Primer-Konzentrationen teilweise erhebliche Unterschiede aufwiesen, wurden deren Konzentrationen routinemäßig kontrolliert, um einheitliche PCR-Bedingungen zu gewährleisten. Für die meisten anderen Anwendungen war eine Bestimmung der DNA-Konzentration nicht nötig, die DNA-Konzentration wurde anhand der Bandenintensitäten im Agarosegel abgeschätzt.

Die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration wurde mit dem *GeneQuant*[®]-*Mikrophotometer (Pharmacia)* durchgeführt, wobei die Elektronik des Photometers nach Einstellung der Meßparameter (ohne Hintergrundkompensierung) aus dem Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm die DNA-Konzentration berechnete. Die DNA-Proben wurden in geeigneter Verdünnung in eine Mikroquarzküvette (Schichtdicke 1,0 cm) pipettiert und die Messung wurde gestartet.

4. 2. 7 Transformation von *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*

4. 2. 7. 1 Herstellung und Transformation elektrokompenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurden 200 ml LB-Medium mit einer frischen Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes 1:200 angeimpft und bei 37 °C im Schüttelinkubator mit 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden durch 10 min Zentrifugation bei 4 °C mit 9000 rpm (GSA-Rotor) in autoklavierten Zentrifugenbechern geerntet und das Bakterienpellet wurde je zweimal mit 100 ml sterilem eiskaltem bidest. Wasser und 10 % Glycerin gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde schließlich in 1 ml sterilem eiskaltem 10 % Glycerin aufgenommen und in Aliquots à 80 µl direkt zur Elektroporation eingesetzt oder bei -70 °C aufbewahrt (Haltbarkeit einige Monate).

Zur Elektroporation wurden luftblasenfrei 80 µl der elektrokompenten *E. coli*-Zellen zu 5 bis 10 µl eines Ligationsansatzes oder 2 bis 3 µl einer Plasmid-Präparation in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 0,1 cm) pipettiert und in den Elektroporator eingesetzt. Der Kondensator wurde aufgeladen (Spannung 1500 V [25 mA, 25 W], Kapazität 50 µF, Ladewiderstand 150 Ω) und über die Küvette mit einem Puls (Dauer 7,5 ms) wieder entladen. Die Zellen wurden sofort in 500 µl LB-Medium mit 10 % Glycerin resuspendiert und für 30 bis 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz in Aliquots zu je 250 µl auf Selektivagarplatten (X-Gal-Platten bzw. LB-Ampicillin-Agarplatten) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Identifikation der positiven Klone erfolgte durch eine Plasmid-DNA-Isolierung mit anschließendem Restriktionsverdau sowie durch Koloniehybridisierung.

4. 2. 7. 2 Herstellung und Transformation Calcium-kompenter *E. coli*-Zellen (nach Ehrlich)

Zur Herstellung Calcium-kompenter *E. coli*-Zellen wurden 200 ml LB-Medium mit einer frischen Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes 1:100 angeimpft und bei 37 °C im Schüttelinkubator mit 200 rpm inkubiert. Bei Erreichen der OD₆₀₀ von 0,1 bis 0,2 wurden die Zellen in autoklavierten Zentrifugenbechern für 10 min bei 4 °C mit 9000 rpm (GSA-Rotor) pelletiert und das Pellet in 20 ml steriler, 4 °C kalter CaCl₂-Lösung (100 mM CaCl₂, 20 % Glycerin) resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, in 1 ml der CaCl₂-Lösung aufgenommen und in Aliquots zu je 100 µl bei -70 °C eingefroren. Die Transformation erfolgte frühestens am darauffolgenden Tag, da die Zellen erst durch die letzte Kältebehandlung zu optimaler Kompetenz gelangen. Die Haltbarkeit der kompetenten Zellen betrug mehrere Monate.

Zur Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen aufgetaut, mit 10 µl Ligationsansatz bzw. 2 bis 3 µl Plasmid-Präparation vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 5 min bei 42 °C wurden die Zellen sofort auf Eis abgekühlt (ca. 5 bis

10 min). Es wurden 500 µl LB-Medium zugegeben und der Transformationsansatz bei 37 °C für 30 bis 60 min unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in Aliquots zu je 250 µl auf Selektivagarplatten (X-Gal-Platten bzw. LB-Ampicillin-Agarplatten) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Positivklone wurden durch Koloniehybridisierung und Plasmid-DNA-Isolierung mit anschließendem Restriktionsverdau identifiziert.

Alternativ wurden *Epicurian Coli*[®] *XL2-Blue Ultracompetent Cells* (*Stratagene*) zur Transformation eingesetzt, um die Transformationsausbeute zu erhöhen. Die Transformationen wurden entsprechend dem Transformations-Protokoll des Herstellers durchgeführt.

4. 2. 7. 3 Herstellung und Transformation von *B. subtilis*-Protoplasten

Zur Herstellung von Protoplasten aus *B. subtilis* ATCC 21332 wurden 50 ml PAB-Medium mit einer frischen Übernachtskultur 1:50 angeimpft und bei 37 °C im Schüttelinkubator mit 200 rpm inkubiert, bis die mittlere *log*-Phase (OD₅₆₀ 0,4 bis 0,5) erreicht wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei Raumtemperatur mit 6000 rpm (HB4-Rotor) pelletiert und mit 5 ml SMMP-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml SMMP-Lösung resuspendiert, mit 200 µl Lysozym-Lösung (5 % in SMMP, sterilfiltriert) versetzt und im Schüttelinkubator bei 37 °C unter sehr schwachem Schütteln (max. 100 rpm) inkubiert. Die Protoplastierung (Kugelform) wurde mikroskopisch kontrolliert, die ersten Protoplasten waren bereits nach 30 min zu erkennen, nach etwa 2 bis 2½ h war die Protoplastierung abgeschlossen. Die Protoplasten wurden für 15 min bei Raumtemperatur mit 3500 rpm (HB4-Rotor) geerntet und äußerst vorsichtig mit 5 ml SMMP-Lösung gewaschen. Das Pellet wurde erneut mit 5 ml SMMP-Lösung durch vorsichtiges Auf- und Absaugen mit einer Gilson-Pipette resuspendiert und in Aliquots zu je 500 µl sofort zur Transformation eingesetzt. Die Haltbarkeit der Protoplasten-Suspension betrug maximal 5 h.

Zur Transformation wurden in einem sterilen Corex[®]-Röhrchen etwa 5 µg Plasmid-DNA in 25 µl Wasser mit dem gleichen Volumen 2x SMM-Lösung verdünnt, 500 µl Protoplasten-Suspension in die Plasmidlösung pipettiert und sofort 1,5 ml 40 % PEG 6000-Lösung (in SMMP) zugegeben und vorsichtig vermischt. Nach der Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur wurde der Ansatz mit 5 ml SMMP-Lösung verdünnt und für 10 min mit 3500 rpm (HB4-Rotor) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die so behandelten Protoplasten wurden in 1 ml SMMP-Lösung aufgenommen und zur phänotypischen Expression im Schüttelinkubator für etwa 2 h bei 30 °C unter sehr schwachem Schütteln (max. 100 rpm) inkubiert. Der Ansatz wurde halbiert und beide Hälften unverdünnt auf DM3-Chloramphenicol-Agarplatten (Cm 7,5 µg/ml) ausplattiert und für 2 d bei 37 °C inkubiert. Zur Identifikation der Integrationsmutanten wurden nach der Isolierung chromosomaler DNA entsprechende Genabschnitte durch PCR amplifiziert und positivverdächtige PCR-Produkte wurden nach der Elution aus dem Agarosegel einem Restriktionsverdau unterworfen.

Die Reversion der Plasmidintegration erfolgte in LB-Medium ohne Antibiotikum. Dazu wurde frisches LB-Medium mit einer Vorkultur der entsprechenden Integrationsmutanten 1:1000 angeimpft und im Schüttelinkubator mit 200 rpm bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde 2x täglich im Verhältnis 1:1000 in frisches LB-Medium passagiert und die Inkubation bei 37 °C fortgesetzt. In regelmäßigen Abständen wurde ein Aliquot entnommen und in verschiedenen Verdünnungen (in LB-Medium) auf nichtselektiven LB-Agarplatten ausplattiert. Chloramphenicol-sensitive Zellen (Cm^S) wurden auf erfolgreiche Reversion getestet (PCR, Restriktionsverdau).

4. 2. 8 Koloniehybridisierung

4. 2. 8. 1 Kolonie-Blotting

Die zu testenden Transformanten wurden auf eine frische LB-Ampicillin-Agarplatte gepickt und über Nacht bei 37 °C bis zu einem Koloniedurchmesser von etwa 1 mm inkubiert. Anschließend wurde ein Nylonrundfilter (*HybondTM-N*, Amersham, 82 mm Durchmesser) auf die Agaroberfläche gelegt und die Orientierung der Kolonien auf der Platte und der Membran mit einer sterilen Nadel markiert. Nach 1 min wurde die Membran von der Platte abgezogen und nacheinander mit der Kolonieseite nach oben je 5 min auf mit folgenden Lösungen getränkte Whatman-Filterpapiere gelegt.

- | | |
|----|--|
| 1. | 10 % SDS |
| 2. | Denaturierungslösung (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) |
| 3. | Neutralisationslösung (0,5 M Tris/HCl pH 7,0; 1,5 M NaCl) |
| 4. | Wiederholung des 3. Schritts mit frisch getränktem Filterpad |
| 5. | 2x SSC |

Die Membran wurde auf ein Filterpapier gelegt und an der Luft getrocknet. Bevor die DNA an der Nylonmembran fixiert wurde, wurde 1 µl einer Positivkontrolle auf die Membran aufgetüpfelt. (Positivkontrolle: DNA mit 0,2 N NaOH für 15 min bei Raumtemperatur denaturieren). Für das UV-Crosslinking wurde die Membran mit der Kolonieseite nach unten für 3 min auf den UV-Transilluminator (312 nm) gelegt. Die Filter konnten nun direkt zur Hybridisierung eingesetzt werden oder wurden zunächst im Dunkeln aufbewahrt.

4. 2. 8. 2 Markierung von DNA mit Digoxigenin

Zur nichtradioaktiven DNA-Markierung mit Digoxigenin wurden sowohl der *DNA Labeling and Detection Kit* mit dem Klenow-Fragment als auch die Terminale Transferase verwendet. Die Reaktionen basieren auf dem Digoxigenin-11-dUTP-Einbau in die DNA-Probe (Klenow-Fragment) bzw. auf der Markierung des 3'-Endes der DNA mit Digoxigenin-11-ddUTP (Terminale Transferase). Die Markierung mit dem Klenow-Fragment wurde in Anlehnung an

das Labeling-Protokoll des Herstellers (*Boehringer Mannheim*) durchgeführt: 100 pmol linearisierte DNA (PCR-Primer bzw. geleluierte PCR-Produkte) wurden mit 2 U Klenow-Enzym (*Amersham*) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Markierung von Oligonukleotiden mit der Terminalen Transferase (*Boehringer Mannheim*) wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl 100 pmol DNA mit 4 µl 5x Reaktionspuffer, 4 µl 25 mM CoCl₂ und 1 µl 1 mM Digoxigenin-11-ddUTP versetzt und die Labeling-Reaktion durch die Zugabe von 25 U Terminale Transferase gestartet. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Nach beiden Markierungsvarianten wurden die Proben mit 30 µl TE-Puffer 10:1 pH 7,5 auf 50 µl verdünnt und direkt zur Hybridisierung eingesetzt bzw. bei -20 °C aufbewahrt.

4. 2. 8. 3 DNA-DNA-Hybridisierung

Die Hybridisierung der Nylonrundfilter erfolgte in Hybridisierungsröhren oder alternativ in Plastikbeuteln. Zunächst wurde die Nylonmembran mit der fixierten DNA mit 50 ml Hybridisierungspuffer in einem Hybridisierungssofen für 1 h bei 68 °C prehybridisiert. Zwischenzeitlich wurde die mit Digoxigenin markierte DNA frisch denaturiert (nur bei doppelsträngiger DNA), indem die Sonde für 10 min bei 95 °C erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt wurde. 25 µl der markierten DNA wurden zu 2,5 ml frischer Hybridisierungslösung gegeben und damit die Membran über Nacht bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurde der Filter gewaschen: zweimal 5 min bei Raumtemperatur mit 50 ml Waschlösung 1 und zweimal 15 min bei 55 °C mit Waschlösung 2. Die Detektion erfolgte mit einem gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper, der wiederum mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war, und wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers (*Boehringer Mannheim*) durchgeführt.

4. 3 Methoden zur Isolierung und Charakterisierung von Proteinen

4. 3. 1 Überexpression von Proteinen in *E. coli*

Zur Überexpression von Proteinen wurde das zu exprimierende Gen in die Expressionsvektoren pMALTM-c2, pQE-30 oder pQE-60 ligiert und das resultierende Plasmid in die *E. coli*-Stämme XL1-Blue oder DH5α (pMALTM-c2) bzw. M15 [pREP4] (pQE-Vektoren) transformiert. Alle drei Expressionsvektoren tragen ein Ampicillinresistenz-Gen *Amp^R*, welches als Selektionsmarker für erfolgreiche Klonierungen genutzt wurde.

Bei dem Vektor pMALTM-c2 liegt die Klonierungsstelle zwischen den Genen *malE* und *lacZα*, die für das Maltose-Bindungs-Protein (MBP) und das α-Peptid der β-Galactosidase kodieren, so daß eine erfolgreiche DNA-Insertion zur Unterbrechung des *lacZα*-Gens führt. Die Insertion eines Gens resultiert in der Expression eines MBP-Fusionsproteins, das α-Peptid der β-Galactosidase wird nicht mehr exprimiert, was wiederum bei der Blau-Weiß-

Selektion auf X-Gal-Platten ausgenutzt wurde. Bei Anwesenheit von β -Galactosidase wird X-Gal unter Bildung eines tiefblauen Farbstoffs gespalten, die Unterbrechung des *lacZ α* -Gens durch eine erfolgreiche Geninsertion wird durch weiße Kolonien angezeigt. Am 5'-Ende des *malE*-Gens befindet sich der starke *P_{tac}*-Promotor, der durch IPTG dereprimiert wird und damit die Expression des MBP-Fusionsproteins induziert.

Charakteristisch für die pQE-Vektoren ist die Kodierung eines Poly(His)₆-tags, der sich am N- (pQE-30) oder C-terminalen Ende (pQE-60) der Klonierungsstelle befindet, und damit die Expression von Poly(His)₆-Fusionsproteinen erlaubt. Beide Systeme befinden sich unter Kontrolle des starken Bakteriophagen-Promotors *P_{T5}*, der ebenfalls durch IPTG dereprimiert wird.

Nach einer Transformation in *E. coli* wurden positive Klone durch Koloniehybridisierung und Plasmid-Präparation mit anschließendem Restriktionsverdau identifiziert; die Transformanten wurden auf Proteinexpression („Miniexpression“) getestet. Dazu wurden je 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 μ g/ml) mit den positivverdächtigen Klonen angeimpft und bei 37 °C im Schüttelinkubator herangezogen. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 wurden die Ansätze mit 0,5 mM IPTG induziert und für weitere 3 h inkubiert. Von jeder Probe wurde ein Aliquot von je 1 ml entnommen, pelletiert und mit 100 μ l 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,0 resuspendiert. Nach Zugabe von 10 μ l 10x SDS-Denaturierungspuffer wurden die Ansätze für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend durch SDS-PAGE analysiert.

Die Proteinexpression im präparativen Maßstab erfolgte sowohl in Schüttelkulturen in 2-l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen als auch in einem 8-l-Fermenter. Dazu wurde frisches LB-Medium mit Ampicillin mit einer frischen Übernachtskultur im Verhältnis 1:100 beimpft. Die Inkubation im Schüttelinkubator wurde bei 200 bis 230 rpm durchgeführt, im Fermenter erfolgte sie unter Zufuhr von steriler Luft bei einer Rührerdrehzahl von ca. 600 rpm. Um eine zu starke Schaumentwicklung zu unterbinden, wurde dem Fermenter Antischaumemulsion (*Serva*) zugesetzt. Die Expression der Synthetasen wurde bei Erreichen der OD₆₀₀ von ca. 0,5 mit 0,5 mM IPTG induziert. Nach weiterer Inkubation für 4 h wurden die Zellen bei 9000 rpm (GS3-Rotor) geerntet und bei -20 °C eingefroren oder sofort zur Proteinreinigung verwendet.

4. 3. 2 Aufschluß von Bakterienzellen

4. 3. 2. 1 Zellaufschluß mittels der French[®] Press

Die frisch pelletierten oder eingefrorenen *E. coli*-Zellen wurden in dem 10-fachen Volumen Aufschlußpuffer bei 4 °C gründlich resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen drei- bis viermal unter Eiskühlung an einer French[®] Pressure Cell Press aufgeschlossen (monomodulare Enzyme bei max. 1000 psi, SrfA-A und bimodulare Enzyme bei max. 700 psi).

B. subtilis-Zellen wurden nach der Zellernte (10 min, 9000 rpm) in Aufschlußpuffer resuspendiert, mit Lysozym (Endkonzentration 0,1 %) versetzt und bei -20°C gelagert. Die

Lyse erfolgte während des Auftauens, anschließend wurden die Zellen an der French[®] Pressure Cell Press (max. 700 psi) schonend aufgeschlossen.

Mit Ausnahme der MBP-Fusionsproteine wurden die Zelltrümmer nach dem Zellaufschluß durch eine Ultrazentrifugation mit 30000 rpm (Ti60-Rotor) für 60 min bei 4 °C abgetrennt, bei den MBP-Fusionsproteinen wurde der Aufschluß mit nur 10000 rpm (SS34-Rotor) für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände (Rohextrakte) wurden sofort weiterverarbeitet. Generell erfolgte die weitere Aufreinigung der Proteine bei 4 °C.

4. 3. 2. 2 Alternativaufschluß von Bakterienzellen mit Lysozym

Insbesondere für die Kristallisationsansätze und die Elektronenmikroskopie von SrfA-A wurde auf den Aufschluß mit der French[®] Pressure Cell Press verzichtet. Die Zellpellets wurden in 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0, 10 mM EDTA resuspendiert, mit 0,25 mg/ml Lysozym versetzt und bei -20 °C eingefroren. Die Lyse erfolgte während des Auftauvorganges. An diese schloß sich sofort die Ultrazentrifugation mit 60000 rpm (Ti60-Rotor) für 2 h bei 4 °C an. Vor der Aufreinigung an einer Ni-NTA-Agarosesäule wurde der Überstand gegen den Ni-NTA-Säulenpuffer dialysiert, um störendes EDTA aus der Proteinlösung zu entfernen.

4. 3. 3 Ammoniumsulfatfällung von Proteinen

Zur Fällung der Proteine wurde feingemörstertes Ammoniumsulfat verwendet. Die Proteinlösung wurde in einem eisgekühlten Becherglas vorgelegt, und das Ammoniumsulfat in kleinen Portionen über einen Zeitraum von ca. 1 h vorsichtig eingerührt. Nach weiterem Rühren für ca. 1 h wurde das Proteinpellet für 30 min mit 30000 rpm (Ti60-Rotor) bei 4 °C ultrazentrifugiert und in einem geeigneten Volumen Puffer (des sich anschließenden Reinigungsschritts) gelöst.

4. 3. 4 Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie

4. 3. 4. 1 Affinitätschromatographie an Dextrin

Bei der Klonierung mit dem pMAL[™]-c2-Vektor entstanden Fusionsproteine, die mit der MBP-Fusionierung eine hohe Affinität zu Maltose erlangten und damit in einer Stufe an Dextrinsäulen gereinigt werden konnten. Zunächst wurde das Dextrin mehrfach mit deionisiertem Wasser gewaschen und nach dem letzten Waschschrift mit Dextrin-Säulenpuffer equilibriert. Im Säulenverfahren wurde der zentrifugierte Rohextrakt auf 0,2 M NaCl eingestellt und auf die bereits gepackte Säule aufgetragen. Alternativ wurde im Batch-Verfahren der Rohextrakt nach der Einstellung auf 0,2 M NaCl zu dem Säulenmaterial gegeben und für 1 h vorsichtig geschüttelt. Erst danach wurde der Protein-Dextrin-Komplex

in die Säule gepackt. Die Säulendimensionen richteten sich nach der aufzureinigenden Proteinmenge, die Säulenvolumina lagen zwischen 20 und 100 ml. Ungebundene Proteine wurden mit 10 Säulenvolumen Dextrin-Säulenpuffer bei einer Fließgeschwindigkeit von ca. 1 ml/min vom Dextrin gewaschen. Anschließend folgte die Elution mit Dextrin-Elutionspuffer, die Fraktionierung wurde manuell durchgeführt. Die Identifizierung MBP-Fusionsprotein-haltiger Proben erfolgte mit dem Bradford-Tüpfeltest und durch SDS-PAGE. Die Proteinlösungen wurden sofort zur Bestimmung der Enzymaktivitäten verwendet oder nach der Einstellung auf 5 bzw. 10 % Glycerin bei -20 °C bzw. -70 °C aufbewahrt.

4. 3. 4. 2 Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose

Bei der Aufreinigung an Ni-NTA-Agarose (*Qiagen*) werden Proteine mit einem N- oder C-terminalen Poly(His)₆-tag spezifisch an Metallchelatoberflächen immobilisiert. Ni-NTA besitzt Nitrilotriacetat (NTA) als Liganden, welcher vier der sechs Koordinationsstellen des Nickel-Ions besetzt, die verbleibenden zwei Stellen können mit den Histidin-Resten des Poly(His)₆-tags interagieren. Das Säulenmaterial wurde vor der Verwendung mit Ni-NTA-Säulenpuffer equilibriert, die Reinigung der Fusionsproteine erfolgte im Batch-Verfahren in Anlehnung an die Empfehlungen des Herstellers. Der ultrazentrifugierte Rohextrakt von einem Liter Anzucht wurde auf 20 mM Imidazol eingestellt, mit 5 ml Ni-NTA-Agarose für 1 h vorsichtig geschüttelt und in den Säulenkörper überführt. Bei einer Flußrate von 1 ml/min wurden die ungebundenen Proteine mit Ni-NTA-Waschpuffer innerhalb 1 h von der Säule gewaschen. Anschließend folgte die Elution mit Ni-NTA-Elutionspuffer. Die Fraktionierung wurde mit einem Fraktionssammler durchgeführt, Fraktionen mit dem Poly(His)₆-Fusionsprotein wurden durch den Bradford-Tüpfeltest und SDS-PAGE identifiziert. Für die enzymatische Charakterisierung wurden Aliquots entnommen und mit 5 bzw. 10 % Glycerin sowie 5 mM DTT bei -70 °C eingefroren, die restliche Proteinlösung wurde nach Einstellung auf 5 mM DTT einer Ammoniumsulfatfällung bei 60 % Sättigung unterzogen, dialysiert und anschließen durch Gelfiltration an Ultrogel[®] AcA 34 (SrfA-A) bzw. Sephacryl[®] S-200 HR (bimodulare Enzyme) weiter aufgereinigt.

4. 3. 5 Proteinreinigung durch Gelperfusionschromatographie

Die Gelperfusionschromatographie wurde an einer BioCAD[™]-Workstation (Software Version 1.24.3), einer speziellen Art der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, mit POROS-Säulenmaterialien durchgeführt. Dieses Material besteht aus kleinen Gelpartikeln, die von einem Netz feiner Poren durchzogen werden und infolge der Erhöhung der aktiven Oberfläche eine effiziente Auftrennung der Proteine bei hoher Auflösung und hoher Geschwindigkeit ermöglichen. In Abhängigkeit der funktionellen Gruppen gibt es Anionen- und Kationenaustauscher-, Affinitäts-, hydrophobe Interaktions- und *Reversed-Phase*-

Materialien. Die Gelperfusionschromatographie wurde hauptsächlich zur Reinigung der monomodularen Poly(His)₆-Fusionsproteine eingesetzt, die Trennung der Proteine für die nachfolgende enzymatische Charakterisierung erfolgte dabei meist in einer Stufe durch Affinitätschromatographie an Metallchelatsäulen (POROS 20 MC). Für die Kristallisation der Glutaminsäure-aktivierenden Module (Srf-M1 und Srf-M1ΔC) wurden die Proteine anschließend durch Anionenaustauschchromatographie an POROS 20 HQ weitergereinigt. Es wurden sowohl analytische Säulen (4,6 mm Durchmesser x 100 mm Länge: 1,67 ml Säulenvolumen) als auch präparative Säulen (22,0 mm Durchmesser x 100 mm Länge: 38,0 ml Säulenvolumen) verwendet.

4. 3. 5. 1 Affinitätschromatographie an Metallchelate

Für die Affinitätschromatographie an Metallchelate wurde POROS 20 MC (20 µm Partikeldurchmesser) verwendet, bei der Imidodiacetat (IDA) als Ligand fungiert. IDA besitzt nur drei koordinative Bindungsstellen, um Metallionen zu binden. Infolgedessen werden die Metallionen während der Beladung mit chelatbildenden Proteinen und auch während der Elution mit Imidazol herausgewaschen. Daher mußte die Metallchelatsäule vor jeder Aufreinigung nach Entfernung der verbliebenen Metallionen neu beladen werden. Die Entfernung der Metallionen erfolgte mit 10 Säulenvolumen Strippinglösung, zur anschließenden Beladung wurden 200 mM NiSO₄ oder 200 mM CuSO₄ eingesetzt. Abschließend wurde die Säule mit MC-Säulenpuffer equilibriert. Der ultrazentrifugierte Rohextrakt des Poly(His)₆-Fusionsproteins wurde sterilfiltriert (0,22 µm) und auf die equilibrierte Säule aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit dem 5- bis 10-fachen Säulenvolumen MC-Säulenpuffer wurde das Protein mit steigender Imidazol-Konzentration in MC-Säulenpuffer eluiert und fraktioniert. Die Identifizierung enzymhaltiger Proben erfolgte mit dem Bradford-Tüpfeltest und SDS-PAGE. Die Proteine wurden entweder durch Anionenaustauschchromatographie an POROS 20 HQ weiter aufgereinigt oder nach Einstellung auf 5 bzw. 10 % Glycerin bei -20 °C aufbewahrt und enzymatisch charakterisiert.

4. 3. 5. 2 Anionenaustauschchromatographie

Die weitere Aufreinigung der Enzyme erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie an dem starken Anionenaustauscher POROS 20 HQ (20 µm Partikeldurchmesser), dessen Funktion durch quarternäre Polyethylenimine bestimmt wird. Die von der Metallchelatsäule eluierte Proteinlösung wurde direkt auf die mit HQ-Säulenpuffer equilibrierte Anionenaustauschersäule aufgetragen und die ungebundenen Proteine mit dem 5- bis 10-fachen Säulenvolumen HQ-Säulenpuffer ausgewaschen. Anschließend wurden die Proteine mit steigender NaCl-Konzentration (bis 500 mM NaCl) eluiert, identifiziert (Bradford-Tüpfeltest, SDS-PAGE) und mit 5 % Glycerin bei -20 °C aufbewahrt.

4. 3. 6 Proteinreinigung durch präparative Gelfiltration

Die Gelfiltration wurde im Anschluß an die Affinitätschromatographie (im Falle der heterolog in *E. coli* exprimierten Proteine) oder direkt mit dem ultrazentrifugierten Rohextrakt (Surfactin-Synthetase und daraus abgeleitete Mutanten) durchgeführt. Enzyme mit Molekulargewichten ≥ 400 kDa (SrfA-A, SrfA-B) wurden an einer Ultrogel[®] AcA 34-Säule (Ausschlußgröße 350 kDa, 320 ml Säulenvolumen) mit einer Flußrate von 0,5 ml/min gereinigt, Enzyme mit Molekulargewichten ≥ 280 kDa an einer Sephacryl[®] S-200 HR-Säule (Ausschlußgröße 250 kDa, 580 ml Säulenvolumen) mit einer Flußrate von 1 ml/min. Als mobile Phase wurde 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 mit 100 mM NaCl und 5 mM DTT verwendet. Aufgrund ihrer Größe eluierten die Synthetasen direkt mit dem Ausschlußvolumen und wurden so von den Verunreinigungen getrennt. Nach der Identifizierung durch Bradford-Tüpfeltest und SDS-PAGE wurden die Proteinlösungen aufkonzentriert und anschließend direkt zur Kristallisation eingesetzt oder auf 5 % Glycerin eingestellt und bei -70 °C aufbewahrt.

4. 3. 7 Dialyse von Proteinlösungen

Störende Salze wurden durch Dialyse aus der Proteinlösung entfernt. Die Dialyse wurde dreimal gegen das 10- bis 20-fache Probevolumen Dialysepuffer für mindestens 1 h bei 4 °C durchgeführt. Dabei war der gewählte Dialysepuffer identisch mit dem Puffersystem der darauffolgenden Reinigungsstufe. Die Präparation der Dialyseschläuche erfolgte durch mehrmaliges Aufkochen mit 1 mM EDTA sowie mit Wasser.

4. 3. 8 Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

Die Proteinlösungen wurden, falls erforderlich, aufkonzentriert. Dazu wurden folgende Konzentratoren verwendet: für monomodulare Enzyme bis 140 kDa *Centrex[®] UF-0,5* bzw. *UF-2 Centrifugal Ultrafilters (Schleicher & Schuell)* sowie *Centriprep[®] (Amicon)* je 30 kDa Ausschlußgröße sowie für Enzyme mit 280 kDa bzw. 400 kDa *Vivaspin 15 concentrator (Vivascience)* mit einer Ausschlußgröße von 100 kDa. Die Ultrafiltrationen wurden entsprechend den Empfehlungen der Hersteller durchgeführt.

4. 3. 9 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) wurde zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht genutzt. Es wurden 7,5 %ige und 10 %ige Trenngelle in den Dimensionen 130 x 80 x 1 mm sowie 170 x 130 x 1 mm verwendet. Das Trenngel wurde aus einer Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (*Rotiphorese[®] Gel 30*) hergestellt und enthielt außerdem 375 mM Tris/HCl-

Puffer pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,6 mM TEMED und 0,05 % APS. Nach der Polymerisation wurde das Trenngel mit dem 4 %igen Sammelgel überschichtet, das sich aus 4 % Acrylamid/Bisacrylamid, 100 mM Tris/HCl-Puffer pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,6 mM TEMED und 0,05 % APS zusammensetzte. Die Proteinproben wurden mit 10x SDS-Denaturierungspuffer im Verhältnis 1:10 versetzt und für 5 min bei 95 °C inkubiert (nur 1 bis 2 min bei SrfA-A und bimodularen Hybridenzymen sowie Proteinen aus *B. subtilis*). Die Proteinlösungen wurden in die Geltaschen des polymerisierten Gels pipettiert und die Elektrophorese in 1x SDS-Laufpuffer bei konstanter Spannung von 170 V durchgeführt bis die blaue Farbfront des SDS-Denaturierungspuffers das untere Pufferreservoir erreichte. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend durch mehrmaliges Aufkochen mit Wasser in der Mikrowelle entfärbt. Bei Bedarf wurde das Gel einer Silberfärbung (Merril et al., 1981) unterzogen, bei der Proteine empfindlicher detektiert werden konnten: Die Proteine wurden unmittelbar nach der Elektrophorese (alternativ auch nach der Coomassie-Färbung) für mindestens 20 min in Fixierlösung fixiert und anschließend für 10 min mit Waschlösung 1 gewaschen. Nach der Inkubation in Färbelösung 1 für maximal 5 min wurde das Gel mit deionisiertem Wasser dreimal je 15 min gründlich gewaschen und in Färbelösung 2 für 30 min inkubiert. Anschließend wurde das Gel je zweimal mit deionisiertem Wasser sowie mit Waschlösung 2 gespült und mit Entwicklerlösung versetzt. Bei gewünschter Bandenintensität wurde das Gel in Stoplösung überführt.

4. 3. 10 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach *Bradford*

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit der Methode nach Bradford (Bradford, 1976), die Kalibrierung wurde mit BSA im Bereich 1 bis 10 µg durchgeführt. In einer Halbmikroküvette wurde die Proteinlösung vorgelegt und mit Bradford-Reagenzlösung auf 1 ml aufgefüllt. Nach der Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen und die Konzentration aus der Kalibrierungsgeraden ermittelt.

Während der Proteinisolierung durch chromatographische Verfahren erfolgte die Identifizierung der Proteinfraktionen durch den **Bradford-Tüpfeltest**: in einer Mikrotiterplatte wurden zu 50 µl vorgelegter Bradford-Reagenzlösung 10 µl der Proteinlösung pipettiert, die Anwesenheit von Protein wurde durch eine Blaufärbung angezeigt.

4. 3. 11 Molekulargewichtsbestimmung von Srf-M1 durch analytische Gelfiltration

Das Molekulargewicht von Srf-M1 wurde durch analytische Gelfiltration an Sephacryl[®] S-400 HR mit dem HiLoad-System (*Pharmacia*) ermittelt. Für dieses Säulenmaterial wird für globuläre Proteine ein Trennbereich von 20 kDa bis 8000 kDa angegeben. Es wurde ein Säulenkörper XK 16/40 (*Pharmacia*) mit einem Säulenvolumen von 80 ml verwendet. Als Laufpuffersystem wurde 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 eingesetzt, die Flußrate betrug

0,9 ml/min. Die Elution der Proteine wurde mit einem UV-Detektor (UV₂₈₀, AU 0,2) detektiert. Zunächst wurde mit 5 mg Dextranblau das Ausschlußvolumen und mit 1 % Aceton das Säulengesamtvolumen ermittelt, anschließend wurde die Säule mit je 5 mg BSA, Aldolase, Katalase, Ferritin und Thyroglobulin kalibriert. Dazu wurden alle Kalibrierungs-substanzen mit 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 in 1 % des Säulenvolumens gelöst. Anschließend wurde das gereinigte und aufkonzentrierte Glutaminsäure-aktivierende Modul Srf-M1 auf die Säule injiziert. Aus dem Elutionsvolumen wurde zunächst der Elutionskoeffizient K_{av} berechnet und daraus das Molekulargewicht bestimmt.

4. 3. 12 Dynamische Lichtstreuung

Die Untersuchungen zur dynamischen Lichtstreuung (DLS) wurden freundlicherweise von Dr. Yannis Georgalis und Dr. Patrick Umbach durchgeführt. Für die Messungen wurden die Lichtstreuoniometer ALV-SP/81 und ALV-SP/86 mit ALV-5000E-Korrelatoren genutzt. Am ALV-SP/86-Goniometer wurde ein Ar⁺-Laser mit einer Wellenlänge $\lambda_0 = 488$ nm verwendet, am ALV-SP/81-Goniometer ein Nd/YAG-Laser mit einer Wellenlänge $\lambda_0 = 532$ nm. Es wurden jeweils 20 Messungen à 30 s mit Streuwinkeln von 15 ° (ALV-SP/81) bis 40 ° (ALV-SP/86) bei konstanter Temperatur von 20 °C durchgeführt, aus denen Mittelwerte gebildet wurden. Die Partikelverteilung wurde mit dem Programm *CONTIN* (Provencher, 1982) berechnet. Die gereinigten und teilweise zurückverdünnten Proteinlösungen wurden unmittelbar vor der Messung durch einen sterilen Sartorius Minisart Filtervorsatz mit einer Porengröße von 0,22 µm (Ø 25 mm) in die Meßküvette filtriert.

4. 4 *In vitro*-Bestimmung enzymatischer Aktivitäten

4. 4. 1 Bestimmung der Enzymaktivitäten der Acetyl-CoA-Synthetase

4. 4. 1. 1 Photometrische Bestimmung der Acylhydroxamatbildung im Hydroxamattest

Die Biosynthese der Carbonsäure-CoA-Konjugate wurde durch die Acylhydroxamatbildung mit Hydroxylamin (Berg, 1962) bestimmt. In einem Reagenzglas wurden vorgelegt: 20 mM Substratcarbonsäure (als Natriumsalz), 5 mM MgATP, 100 mM neutralisiertes Hydroxylamin (pH 6,5), 100 mM MES/HEPES-Puffer pH 6,5 sowie 4 nmol M-AcsL-Protein. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,34 mM Coenzym A gestartet. Das Gesamtvolumen einer Reaktion betrug 1 ml. Nach der Inkubation bei 37 °C für 1 h im Wasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 2,5 % FeCl₃ in 2 M HCl gestoppt. Die Probe wurde kurz zentrifugiert und die Extinktion des Überstandes gegen eine Leerprobe (ohne Substratcarbonsäure) bei 520 nm gemessen. Zur Kalibrierung wurde Acetylphosphat (*Sigma*) verwendet.

4. 4. 1. 2 Radioaktive Bestimmung der Acyladenylatbildung mittels ATP-PP_i-Austausch

Das Prinzip der Reaktion beruht auf der Bildung von radioaktiv markiertem ATP bei der ATP-abhängigen Acyladenylatbildung. Der ATP-PP_i-Austausch wurde in einem Reaktionsvolumen von 200 µl durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthielt: 2 mM Substratcarbonsäure (als Natriumsalz); 2,5 mM MgCl₂; 0,5 mM ATP; 0,1 mM Na₄P₂O₇ (PP_i); 10 mM MES/HEPES-Puffer pH 6,5 sowie 0,11 µCi (≈ 240000 cpm) [³²P]-markiertes PP_i. Durch Zugabe von 50 bis 70 pmol M-AcsL-Protein wurde die Reaktion gestartet und bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl kalter Aktivkohlehaltiger Stoplösung abgebrochen und zur Adsorption von ATP an die Aktivkohle für 10 min auf Eis inkubiert. Die Aktivkohlesuspension wurde über ein Glasfaserfilter GF 92 (*Schleicher & Schuell*) abgesaugt und mit 25 ml Wasser gewaschen. Die Filter wurden mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (*Rotiszint[®] eco plus*) versetzt und sofort die Aktivität mit dem Liquid Scintillation Counter gemessen. Als Leerwert diente ein Reaktionsansatz ohne Substratcarbonsäure.

4. 4. 1. 3 Radioaktive Bestimmung der Acyladenylatbildung durch ATP-Hydrolyse

Im Gegensatz zum ATP-PP_i-Austausch wird bei dieser Reaktion die Spaltung (Abnahme) von radioaktiv markiertem ATP bei der Acyladenylatbildung gemessen. Die Reaktion wurde analog zum ATP-PP_i-Austausch in einem Gesamtvolumen von 200 µl durchgeführt und enthielt: 2 mM Substratcarbonsäure (als Natriumsalz); 2,5 mM MgCl₂; 192,5 nM ATP; 10 mM MES/HEPES-Puffer pH 6,5; 0,11 µCi (≈ 240000 cpm) [³²P]-markiertes ATP sowie 50 bis 70 pmol M-AcsL-Protein. Nach der Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion gestoppt und die Radioaktivität gemessen (siehe ATP-PP_i-Austausch).

4. 4. 1. 4 Dünnschichtchromatographische Bestimmung der Acyladenylatbildung

Die Darstellung der radioaktiv markierten Acyladenylate erfolgte mit [³²P]-markiertem ATP, die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt und enthielt: 20 mM Substratcarbonsäure (als Natriumsalz); 10 mM MgCl₂; 100 mM MES/HEPES-Puffer pH 6,5; 2,7 µCi [³²P]-ATP sowie 350 pmol M-AcsL-Protein. Nach der Inkubation bei 37 °C für 60 min wurde mit 100 µl Tris/HCl-gesättigter Phenollösung (*Roth*) eine Phenolextraktion durchgeführt. Aliquots von je 2 µl wurden auf eine Dünnschicht-Kieselgel 60-Alufolie (*Merck*) aufgetragen und mit den Fließmitteln 1, 2 bzw. 3 als mobile Phase chromatographiert. Nach einer Laufstrecke von 15 cm wurden die DC-Platten getrocknet und gegenüber einem Röntgenfilm für 3 h exponiert.

4. 4. 2 Bestimmung der Enzymaktivitäten der Surfactin-Synthetase-Module

4. 4. 2. 1 Radioaktive Bestimmung der Aminoacyladenylatbildung mittels ATP-PP_i-Austausch sowie durch ATP-Hydrolyse

Die radioaktive Bestimmung der Aminoacyladenylatbildung mittels ATP-PP_i-Austausch sowie ATP-Hydrolyse erfolgte analog zu 4. 4. 1. 2 sowie 4. 4. 1. 3. Anstelle der Carbonsäure wurden 2 mM Substrataminosäure eingesetzt, die Reaktion wurde mit 50 mM MES/HEPES-Puffer pH 6,5 (anstelle 10 mM) abgepuffert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 bis 50 pmol Enzym gestartet und bei 37 °C inkubiert.

4. 4. 2. 2 Thioesterbeladung

Die kovalente Bindung der Substrataminosäuren als Thioester an die Surfactin-Synthetase-Module wurde unter Zuhilfenahme von [¹⁴C]-markierten Aminosäuren detektiert. Der Reaktionsansatz für die Thioesterbeladung enthielt in einem Gesamtvolumen von 250 µl: 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5; 9 mM MgCl₂; 1,8 mM ATP; 0,66 mM EDTA pH 7,5; 1,7 mM DTT; 4 mg/ml BSA; 0,2 mM CoA; 0,25 µM M-Sfp-Protein sowie 25 pmol der zu untersuchenden Synthetase. Durch Zugabe von 0,25 µCi [¹⁴C]-markierter L-Glutaminsäure bzw. L-Leucin wurde die Thioesterbeladung gestartet und bei 30 °C für 45 min inkubiert. Anschließend wurde die Enzymreaktion mit 1 ml 10 %iger Trichloressigsäure gestoppt und zur Proteinpräzipitation für 30 min auf Eis inkubiert. Das präzipitierte Protein wurde für 10 min bei 13000 rpm pelletiert, mit 1 ml 10 %iger Trichloressigsäure gewaschen und in 250 µl 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 für etwa 2 h bei Raumtemperatur gelöst. Nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit wurde die Radioaktivität mit dem Liquid Scintillation Counter gemessen.

4. 4. 2. 3 Dünnschichtchromatographische Bestimmung der Aminosäureadenylatbildung

Die Darstellung der radioaktiv markierten Aminosäureadenylate von Srf-M1, Srf-M4 und SrfA-C erfolgte sowohl mit [α-³²P]-markiertem ATP als auch mit [¹⁴C]-markierten Aminosäuren. Die Reaktion mit [α-³²P]-markiertem ATP enthielt standardmäßig: 20 mM Substrataminosäure; 10 mM MgCl₂; 500 mM MES/HEPES-Puffer pH 6,5; ATP und 2,7 µCi [α-³²P]-ATP (ATP-Endkonzentration 0,5 µM) sowie 20 bis 220 pmol Srf-M1, Srf-M4, SrfA-C. Die Reaktion mit [¹⁴C]-markierten Aminosäuren enthielt: 20 mM Substrataminosäure; 0,5 µM ATP; 10 mM MgCl₂; 500 mM MES/HEPES-Puffer pH 6,5; 2,7 µCi [¹⁴C]-markierte Aminosäure sowie 50 pmol Srf-M1, Srf-M4, SrfA-C. Die Proben wurden analog zu 4. 4. 1. 4 inkubiert, mit Phenol extrahiert, in Aliquots zu je 2 µl auf eine DC-Platte aufgetragen und mit Fließmittel 3 chromatographiert. Nach einer Laufstrecke von

15 cm wurden die DC-Platten getrocknet und gegenüber einem Röntgenfilm exponiert ([α - ^{32}P]-markiertes ATP für 3 h, [^{14}C]-markierte Aminosäuren für 3 Wochen).

4. 5 *In vivo*-Biosynthese von Surfactin und -analoga

4. 5. 1 Isolierung von Surfactin und -analoga

Zur Isolierung der Surfactine aus *Bacillus subtilis* ATCC 21332 und den daraus hergestellten Mutanten wurde im wesentlichen die Methode von Ohno et al. (1992) verwendet. Dazu wurde frisches Landy-Medium mit einer Vorkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 28 bis 30 °C mit 120 rpm im Schüttelinkubator für 3 d inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension mit konzentrierter Salzsäure auf pH 2,0 eingestellt und zur Surfactin-präzipitierung für 1 h bei 4 °C nachgerührt. Das Präzipitat wurde für 20 min bei 4 °C mit 9000 rpm (GS3-Rotor) pelletiert und mit 1/10 des Anzuchtolumens Methanol extrahiert. Die Extraktion des Pellets erfolgte für mindestens 2 h bei Raumtemperatur im Schüttelinkubator mit 250 rpm. Anschließend wurde die Suspension für 10 min mit 10000 rpm (SS34-Rotor) bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Surfactin bzw. die -analoga wurden in einem geeigneten Volumen Methanol aufgenommen, und nach der Entfärbung mit Aktivkohle dünnschichtchromatographisch bzw. massenspektrometrisch charakterisiert.

4. 5. 2 Charakterisierung von Surfactin und -analoga

4. 5. 2. 1 Dünnschichtchromatographie von Surfactin und -analoga

Die Extrakte von 4. 5. 1 wurden auf eine Kieselgel 60-Alufolie (*Merck*) aufgetragen und die DC-Platte mit Fließmittel 4 entwickelt. Nach einer Laufstrecke von etwa 15 cm wurde die Platte luftgetrocknet. Die Detektion erfolgte durch Besprühen mit Wasser und anschließender leichter Erwärmung.

4. 5. 2. 2 MALDI-massenspektrometrische Analyse von Surfactin und -analoga

Die MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-of-Flight)-Spektren wurden freundlicherweise von Dr. Peter Franke (Institut für Biochemie, FU Berlin) aufgenommen. Die Messungen erfolgten an einem Bruker Reflex MALDI-TOF-Gerät mit 337 nm-Stickstoff-Laser und verzögerter Extraktion bei 20 kV Beschleunigungsspannung und 23 kV Reflektorspannung. Für die Messungen wurden sowohl die unter 4. 5. 1 gewonnenen Methanolextrakte als auch intakte *B. subtilis*-Zellen von Plattenkulturen eingesetzt. Die Proben wurden mit dem Matrixmedium (gesättigte Lösung von α -Cyano-4-hydroxymizinsäure in 30 % wäßrigem Acetonitril mit 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v)) vermischt, auf das Target

aufgetragen und nach Lufttrocknung in die Ionenquelle des MALDI-TOF-Instruments gebracht. Im Fall der *B. subtilis*-Mutante R13_{CDM} wurde darüber hinaus ein PSD (Post-Source Decay)-Spektrum aufgenommen, bei der die Fragmentierung metastabiler Ionen auf feldfreier Strecke analysiert wurde.

4. 5. 2. 3 Bestimmung der biologischen Aktivitäten von Surfactin und -analoga

Die Hämolyseaktivität von Surfactin und -analoga wurde auf kommerziell erhältlichen Blutagarplatten (*Merck*) getestet.

Die antibiotische Wirksamkeit wurde exemplarisch an drei verschiedenen Testorganismen geprüft: an dem grampositiven Bakterium *Bacillus licheniformis*, an dem gramnegativen *Escherichia coli*-Stamm DH5 α sowie an der Hefe *Pichia pastoris*. Zur Prüfung der Antibiotika-Aktivität wurde der zu untersuchende *B. subtilis*-Stamm zunächst auf einer mit Zellglasfolie ausgelegten Landy-Agarplatte bei 28 °C preinkubiert. Nach der Überführung der Zellglasfolie auf die vorbereitete Antibiotika-Testplatte wurden diese bei 28 bzw. 37 °C weiter inkubiert. Eine Wachstumshemmung wurde durch Hofbildung angezeigt.

4. 6 Synthese von 3-Hydroxytetradecanoyl-Coenzym A

Die Synthese von 3-Hydroxytetradecanoyl-Coenzym A (β -HA-CoA) erfolgte in einer Zweistufenreaktion. In der ersten Stufe wurde aus DL- β -Hydroxymyristinsäure (β -HA), N-Hydroxysuccinimid (NHS) sowie Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) β -HA-NHS synthetisiert, das in der zweiten Stufe mit Coenzym A-SH zu β -HA-CoA umgesetzt wurde (Hiramoto et al., 1971, Blecher, 1981 in Ullrich et al., 1991).

1. Reaktionsstufe: 33,9 mg NHS (*Sigma*) gelöst in 3 ml Ethylacetat (getrocknet über Molekularsieb 4 A°) und 60,6 μ l DCCI (*Sigma*) bei 45 °C aufgeschmolzen und anschließend in 2 ml Ethylacetat gelöst wurden zu 50 mg β -HA (*Sigma*) gegeben und 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Die milchig, trübe Lösung wurde weiter bei 4 °C über Nacht moderat gerührt. Nach Zugabe von 2 bis 3 Tropfen Eisessig (Pasteurpipette) wurde der Harnstoff-Niederschlag über einen Faltenfilter in ein 30 ml Corex[®]-Röhrchen abgetrennt und mit etwa 3 ml Ethylacetat gewaschen. Die obere organische Phase wurde nacheinander mit 3 ml Wasser, 2 ml 0,5 M NaHCO₃ und 2 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, die Phasentrennung wurde durch jeweils 2 min Zentrifugation mit 7500 rpm (SS34-Rotor) bei 4 °C erreicht. Anschließend wurde die organische Phase mit einer Spatelspitze wasserfreiem Na₂SO₄ versetzt, kurz gevortext und zur Trocknung etwa eine Stunde stengelassen. Nach der Zentrifugation für 5 min mit 9000 rpm (SS34-Rotor) bei 4 °C wurde das Na₂SO₄ zweimal mit je 3 ml Ethylacetat gewaschen und anschließend das Ethylacetat im vorgewogenen Rund-

kolben am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur eingeengt. Abschließend wurde das β -HA-NHS im Exsikkator getrocknet.

2. Reaktionsstufe: Die gesamte Ausbeute an β -HA-NHS (64 mg) wurde in 4 ml THF gelöst und unter Stickstoffzufuhr zu in 2,4 ml 0,67 M NaHCO_3 gelöstem 73,8 mg CoA-SH (*Boehringer*) pipettiert. Die Reaktion wurde abgedunkelt weitere 5 h bei 4 °C nachgerührt (ohne Stickstoffzufuhr). Nach Zugabe von 6 ml 5 %iger HClO_4 wurde die organische Phase am Rotationsverdampfer vorsichtig eingeengt und der Rückstand in 16 ml 5 %iger HClO_4 gelöst. Der Niederschlag wurde zur vollständigen Fällung für 15 min abgedunkelt bei 4 °C stehengelassen, anschließend zentrifugiert (5 min, 7500 rpm, 4 °C) und mit 0,8 %iger HClO_4 gewaschen. Nach kurzem Antrocknen im Exsikkator für 15 min wurde das Produkt mit 4 ml Aceton versetzt und über Nacht abgedunkelt stehengelassen. Zum Abschluß wurde das Pellet abzentrifugiert (5 min, 7500 rpm, 4 °C) und für 30 min im Exsikkator getrocknet. Das Pellet wurde in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml 25 mM KP_i -Puffer pH 5,3 gelöst. Die Konzentration der β -HA-CoA-Lösung wurde photometrisch in einer Halbmikroquarzküvette (Schichtdicke 1,0 cm) bei den Wellenlängen 260 nm und 232 nm bestimmt (Extinktionskoeffizienten: $\epsilon_{260} = 16200$; $\epsilon_{232} = 9100$)

4.7 Kristallisationsansätze

Für die Kristallisationsexperimente, bei denen ich freundlicherweise von Frau Claudia Alings unterstützt wurde, wurde die Dampfdiffusionsmethode im „Hängenden Tropfen“ verwendet. Dabei wurden die Ansätze sowohl manuell (Srf-M1 und Srf-M1 Δ C) als auch mit dem *Cyberlab*-Kristallisationsroboter (SrfA-A) pipettiert. Alle zu kristallisierenden Proteine wurden zu Beginn einem Screening unterzogen, bei dem die 96 Lösungen der „Crystal screens“ CSI und CSII als Kristallisationspartner getestet wurden (Jancarik and Kim, 1991). Zunächst wurde der Rand der Kristallisationsschalen (mit 24 Vertiefungen) gefettet und in jeder Vertiefung jeweils 700 μl der sogenannten Reservoirlösung vorgelegt. Anschließend wurde ein 2 μl -Tropfen Proteinlösung mit dem selben Volumen Reservoirlösung auf einem silikonisierten Deckgläschen vermischt und umgekehrt auf den gefetteten Rand der Vertiefung gelegt, so daß ein geschlossenes System entstand. Die Schalen wurden unmittelbar nach dem Ansetzen unter einem Binokularmikroskop kontrolliert und sofern nicht anders vermerkt bei konstanter Temperatur von 18 °C inkubiert. Die mikroskopische Auswertung der Kristallisationsansätze erfolgte anfangs täglich und später in größer werdenden Abständen.