

**Funktionelle Charakterisierung
der Zellwandproteine AmiC2 und SepJ_N und
ihre Bedeutung für die Vielzelligkeit des
filamentösen Cyanobakteriums
Nostoc punctiforme ATCC 29133**

Dissertation

der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Josef Lehner
aus Illertissen

Tübingen
2012

Tag der mündlichen Prüfung:

07.12.2012

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

PD Dr. Iris Maldener

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Karl Forchhammer

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Sonderzeichen.....	IX
A Zusammenfassung.....	1
B Einleitung.....	2
B.1 Das Cyanobakterium <i>Nostoc punctiforme</i> ATCC 29133	2
B.2 Zelldifferenzierung in <i>N. punctiforme</i>	3
B.2.1 Heterozysten	3
B.2.2 Hormogonien.....	4
B.2.3 Akineten	5
B.3 Peptidoglycan durchstoßende Strukturen in filamentösen Cyanobakterien	6
B.4 Zell-Zell-Kommunikation in filamentösen Cyanobakterien	7
B.5 Die Morphogenese der Bakterien	8
B.5.1 Formgebung und Stabilität durch das bakterielle Exoskelett.....	8
B.5.2 Formgebung durch das bakterielle Cytoskelett	9
B.6 Peptidoglycan	9
B.6.1 Die Struktur des Peptidoglycans	9
B.6.2 Die Synthese des Peptidoglycans	11
B.6.3 Wachstum und Teilung des Mureinsacculus.....	12
B.6.4 Mureinabbau durch Hydrolasen	14
B.6.4.1 N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidasen.....	15
B.6.4.2 Regulation der N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidasen	17
B.7 Septum-lokalisiertes SepJ-Protein	17
C Zielstellung.....	18
D Material und Methoden.....	19
D.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide.....	19
D.2 Chemikalien und Geräte	21
D.2.1 Verwendete Kits	22
D.2.2 Verwendete Datenbanken und öffentliche Archive	22
D.2.3 Verwendete Software und öffentliche Programme	22

D.3	Puffer und Reagenzien.....	23
D.4	Kultivierungsmethoden	26
D.4.1	Medien zur Anzucht von <i>Anabaena</i> PCC 7120 und <i>N. punctiforme</i> Zellen	26
D.4.2	Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	27
D.4.3	Verwendete Antibiotika	27
D.4.4	Anzucht	28
D.4.4.1	Anzucht von Cyanobakterien.....	28
D.4.4.2	Anzucht von <i>E. coli</i>	28
D.4.4.3	Spezielle Kultivierungsmethoden zur Induktion spezifischer Zelldifferenzierung.....	29
D.5	Molekularbiologische Methoden.....	29
D.5.1	Isolierung der Gesamt-DNA aus <i>N. punctiforme</i>	29
D.5.2	Isolierung der Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	30
D.5.3	Isolierung der Gesamt-RNA aus <i>N. punctiforme</i>	30
D.5.4	Zelldichtebestimmung.....	30
D.5.5	Bestimmung der Chlorophyllmenge bei <i>N. punctiforme</i>	31
D.5.6	Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten.....	31
D.5.7	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA bzw. RNA	31
D.5.8	Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	32
D.5.9	Ligation von DNA-Fragmenten	32
D.5.10	Herstellung von Insertionsmutanten in <i>Nostoc punctiforme</i>	32
D.5.10.1	Triparentale Konjugation	33
D.5.11	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen.....	34
D.5.11.1	Transformation von elektrokompenten <i>E. coli</i> Zellen	35
D.5.12	Polymerase Kettenreaktion.....	35
D.5.12.1	Amplifikation von DNA	35
D.5.12.2	Relative RNA-Bestimmung mittels RT-PCR	36
D.5.13	Mureinpräparation für transmissionselektronenmikroskopische Zwecke.....	37
D.6	Mikroskopie.....	38
D.6.1	Negativkontrastierung und TEM von gereinigten Mureinsäcken	38
D.6.2	Kontrastierung und Probeneinbettung für Ultradünnschnitte	39
D.6.3	Herstellung von Ultradünnschnitten für TEM-Analysen	40
D.6.4	Mikroskope.....	40

D.6.4.1	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	40
D.6.4.2	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie.....	40
D.6.5	Färbungen von Bakterien	40
D.6.5.1	Färbung der äußeren Membran	40
D.6.5.2	Färbung des Peptidoglycans	41
D.6.5.3	Färbung der Cytoplasmamembran	41
D.6.5.4	Färben mit Alcianblau.....	41
D.6.5.5	Gram-Färbung.....	41
D.6.6	FRAP-Analyse	42
D.6.7	Bestimmung der Größenverhältnisse zwischen <i>amiC2</i> -Mutante und WT.....	43
D.7	Protein-Biochemische Methoden.....	43
D.7.1	Überexpression und Reinigung von AmiC2 aus <i>N. punctiforme</i> ATCC 29133	43
D.7.1.1	Konstruktion eines rekombinanten C-terminal-fusionierten AmiC2-6xHis- Tag Proteins	43
D.7.1.2	Überexpression von AmiC2 in <i>E. coli</i>	44
D.7.1.3	Affinitätsreinigung von 6xHis-gekoppelten Proteinen	44
D.7.2	Zellaufschluss und Präparation von Ganzzellextrakten	44
D.7.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	45
D.7.4	<i>In vitro</i> Aktivitätstests im Zymogramm	45
D.7.5	Immunoblot-Analyse.....	46
D.7.6	Dünnschichtchromatographie.....	46
D.7.7	Affinitätsreinigung von AmiC2-Antikörpern über CNBr-aktivierte Sepharose	46
D.7.8	Gewinnung von Antiserum gegen AmiC2 aus <i>N. punctiforme</i>	47
D.7.9	Gewinnung von Peptid-Antikörpern gegen spezifische Domänen von AmiC1 und AmiC2	47
E	Ergebnisse	49
E.1	Zellwandamidasen in <i>Nostoc punctiforme</i>	49
E.1.1	Gezielte Mutagenese der Zellwandamidasen AmiC1 und AmiC2 in <i>N. punctiforme</i>	49
E.1.2	Wachstumstest der <i>amiC2</i> -Mutante auf BG11- und BG11 ₀ -Medium.....	51
E.1.3	Morphologische Charakterisierung der <i>amiC2</i> -Mutante.....	52
E.1.4	Zelldifferenzierung der <i>amiC2</i> -Mutante	56
E.1.5	Analyse der Heterozysten-spezifischen Glycolipide der <i>amiC2</i> -Mutante	58

E.1.6	Strukturelle Analyse der Zellwand des WTs <i>N. punctiforme</i> und der <i>amiC2</i> -Mutante.....	60
E.1.7	Untersuchung der Zell-Zell-Kommunikation der <i>amiC2</i> -Mutante	62
E.1.8	<i>In vivo</i> Fluoreszenzfärbung des Mureins des WTs <i>N. punctiforme</i> und der <i>amiC2</i> -Mutante.....	63
E.1.9	Mikroskopische Analyse der Feinstruktur des septalen Peptidoglycans des WTs <i>N. punctiforme</i> und der <i>amiC2</i> -Mutante	65
E.2	Biochemische Charakterisierung des AmiC2-Proteins aus <i>N. punctiforme</i>	68
E.2.1	Reinigung eines rekombinanten AmiC2-6xHis-Proteins	68
E.2.2	Zymogramm des gereinigten AmiC2-Proteins	70
E.2.3	Detektion von AmiC2 in differenzierten Zellen von <i>N. punctiforme</i> mittels Immunoblot	73
E.2.4	Immunoblot-Analyse der <i>amiC</i> Knockout-Mutanten in <i>Anabaena</i> PCC 7120 und <i>N. punctiforme</i>	74
E.2.5	Immunodetektion mit affinitätsgereinigten AmiC2-Antikörper	76
E.2.6	Immunoblot-Analyse der AmiC-Domänen mit spezifischen Peptid-Antikörpern.	77
E.3	Gezielte Mutagenese des Septum-lokalisierten Proteins SepJ _N in <i>N. punctiforme</i> ...	80
E.3.1	Wachstumsanalyse der <i>sepJ_N</i> -Mutante.....	81
E.3.2	Zelldifferenzierung der <i>sepJ_N</i> -Mutante	83
F	Diskussion	85
F.1	Die Funktion der Amidasen im Divisom bei der bakteriellen Zellteilung	85
F.2	AmiC2: Ein wichtiges Protein für die Morphologie von <i>N. punctiforme</i>	86
F.3	AmiC2: Ein essentielles Protein für den interzellulären Transport.....	89
F.4	Der Mureinsacculus: Ein Filament-umspannendes Makromolekül von <i>N. punctiforme</i>	90
F.5	AmiC2: Ein essentielles Protein für die Ausbildung von Poren im septalen Murein von <i>N. punctiforme</i>	92
F.6	Modell der Porenbildung im septalen Murein	93
F.7	Zell-Zell-Kommunikation: Die Voraussetzung für die Zelldifferenzierung im Filament von <i>N. punctiforme</i>	94
F.8	AmiC2: Eine Amidase mit differenzieller Proteolyse	96
F.9	AmiC2: Eine Zellwand-hydrolysierende Amidase aus <i>N. punctiforme</i>	98

F.10	Immunodetektion der verschiedenen AmiC2-Domänen in <i>N. punctiforme</i>	99
F.11	Bedeutung des Septum-lokalisiereten SepJ Proteins in <i>N. punctiforme</i> für die Stickstofffixierung, die Filamentintegrität und den interzellulären Stofftransport .	100
F.12	Ausblick.....	102
G	Literaturverzeichnis	104
H	Publikationen.....	113
I	Anhang.....	114
I.1	Weitere Amidasen der Amidase_3 Familie in <i>N. punctiforme</i>	114
I.2	Abbildungsverzeichnis	115
I.3	Tabellenverzeichnis	117

Abkürzungsverzeichnis

A	Amper/Adenin
Abb.	Abbildung
AF	Autofluoreszenz
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure/Aminosäuren
ATCC	American Type Culture Collection
b	Basen
bp	Basenpaare
BF	Durchlicht (bright field)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Cm	Chloramphenicol
Chl.	Chlorophyll
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CNBr	Cyanbromid
Da	Dalton
ddH ₂ O	destilliertes und deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
for.	vorwärts orientiert (forward)
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
g	Gramm
G	Guanin
GFP	grün fluoreszierendes Protein

GlcNAc	N-Acetylglucosamin
h	Stunde/Stunden
Hep	Heterozysten-Polysaccharide
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hgl	Heterozysten-Gycolipide
HIF	hormogonium inducing factor
HRF	hormogonium repressing factor
Hz	Hertz
IgG	Immunglobulin G
k	Kilo
kb	Kilobasen
kl.	kleine
Km	Kanamycin
l	Liter
M	Molar (mol/l)
m ⁻²	pro Quadratmeter
MCS	multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
MetOH	Methanol
mg	Milligramm
min.	Minute/Minuten
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
n	nano
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
Nm	Neomycin
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

Abkürzungsverzeichnis

PBS	phosphatgepufferte Saline
PCC	Pasteur Culture Collection
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
PS	Photosystem
PSI	Pound-force per square inch
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r	Resistenz
rev.	umgekehrt orientiert (reverse)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
s	Sekunde/Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfate)
Sm	Spectinomycin
Sp	Streptomycin
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Temp.	Temperatur
TFA	Trifluorcarbonsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v.a.	vor allem
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
z.B.	zum Beispiel

Sonderzeichen

α	alpha
β	beta
Δ	Deletion
λ	Gamma
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
\geq	Größer gleich
::	Insertion
μ	Mikro
%	Prozent
∞	Unendlich
~	Ungefähr

Buchstabencode der Aminosäuren

A Ala Alanin	I Ile Isoleucin	R Arg Arginin
C Cys Cystein	K Lys Lysin	S Ser Serin
D Asp Asparaginsäure	L Leu Leucin	T Thr Threonin
E Glu Glutaminsäure	M Met Methionin	V Val Valin
F Phe Phenylalanin	N Asn Asparagin	W Trp Tryptophan
G Gly Glycin	P Pro Prolin	Y Tyr Tyrosin
H His Histidin	Q Gln Glutamin	

A Zusammenfassung

Nostoc punctiforme ATCC 29133 ist ein multizelluläres Cyanobakterium, welches photoautotroph in Filamenten aus mehreren hundert Zellen wächst, die über eine kontinuierliche äußere Membran und einen Mureinsacculus miteinander verbunden sind. Nach der Zellteilung werden die Zellen nicht wie bei einzelligen Bakterien voneinander getrennt, sondern bleiben als kommunizierende Einheit miteinander verbunden. Der Informationsaustausch unter den Zellen ermöglicht dem Filament schnell auf Änderungen der Umwelt zu reagieren und sich durch Zelldifferenzierung diesen anzupassen. Um eine schnelle und koordinierte Zelldifferenzierung zu gewährleisten, muss ein komplexes Kommunikationssystem existieren, welches die Zelldifferenzierung von einzelnen stickstofffixierenden Heterozysten, von kurzen beweglichen Filamenten, den Hormogonien, und von klimastabilen Akineten ermöglicht.

Mit der Charakterisierung der Septum-lokaliserten Zellwand-Amidase AmiC2 in *N. punctiforme* ist es gelungen, einen Baustein zu identifizieren, welcher essentiell für die Ausbildung eines solchen Kommunikationssystems ist. Die Inaktivierung des *amiC2* Gens in *N. punctiforme* führte zum Verlust der Zell-Zell-Kommunikation. Des Weiteren war die Mutante nicht zur Zelldifferenzierung befähigt. Stattdessen verharrten die Zellen in einem primordialen Stadium, in welchem keine langen Filamente, sondern Zellklumpen mit schrägen, asymmetrisch angelegten Septen gebildet wurden. Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen des Mureins von Wildtyp und Mutante offenbarten den Wirkort und die Wirkungsweise von AmiC2 am septalen Murein. Hierbei wurden erstmals Poren identifiziert, die als Traverse für mögliche Kommunikationsstrukturen dienlich sind. Zudem konnte festgestellt werden, dass AmiC2 essentiell an deren Bildung beteiligt ist. Im septalen Murein des WTs sind ca. 150 Poren mit einem Durchmesser von ~ 20 nm siebartig organisiert, welche in der *amiC2*-Mutante gänzlich fehlen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der interzelluläre Stoffaustausch über Septum-lokaliserte Kommunikationssysteme funktioniert, an deren transseptalen Orientierung AmiC2 grundlegend beteiligt ist.

SepJ ist ebenfalls ein Septum-lokalisertes Protein in *N. punctiforme*. Dessen Inaktivierung führt zu einer negativen Beeinflussung der Heterozysten-Differenzierung, wodurch das diazotrophe Wachstum gestört wird. Ebenso wird die Filamentintegrität durch die Bildung überdurchschnittlich vieler kurzkettiger Hormogonien negativ beeinflusst.

B Einleitung

B.1 Das Cyanobakterium *Nostoc punctiforme* ATCC 29133

Die Cyanobakterien, früher auch aufgrund gewisser Ähnlichkeit zu eukaryotischen Algen als Blaualgen bezeichnet, bilden eine weit verbreitete Gruppe von photoautotrophen Gram-negativen Mikroorganismen (Stanier *et al.*, 1978). Aufgrund ihrer Anpassungsfähigkeit sind sie wahre Überlebenskünstler und besiedeln nahezu alle terrestrischen und aquatischen Ökosysteme. Cyanobakterien sind sehr komplex in ihrer morphologischen Gestaltung. Es gibt sie als Einzeller oder Vielzeller filamentöser Gestalt, bestehend aus Ketten zusammenhängender Zellen, welche sich wiederum bei manchen Arten verzweigen können. Viele filamentöse Cyanobakterien haben die Fähigkeit, aus der vegetativen Zelle drei weitere Zelltypen zu differenzieren: dickwandige N₂-fixierende Heterozysten, Zellen der beweglichen Hormogonien und klimaresistente Akineten (Palinska, 2008). Aufgrund ihrer Vielgestaltigkeit werden Cyanobakterien in fünf verschiedene Sektionen eingeteilt: In Sektion I und II werden die einzelligen Cyanobakterien eingeordnet und in Sektion III bis V die filamentösen Cyanobakterien. Die Sektionen IV und V beinhalten filamentöse Cyanobakterien mit Differenzierungspotential (Rippka *et al.*, 1979).

Nostoc punctiforme ATCC 29133 (im folgenden Text als *N. punctiforme* bezeichnet) ist ein filamentöses, nicht verzweigtes Cyanobakterium mit Differenzierungspotential der Sektion IV. Es kann aufgrund seiner Anpassungsfähigkeit verschiedenste ökologische Nischen besiedeln; hauptsächlich findet man es aber auf terrestrischen Habitaten. Die Anpassungsfähigkeit spiegelt sich in der Größe des Bakteriengenoms mit ca. 9 Mio. bp wieder, womit *N. punctiforme* eines der größten Bakteriengenome besitzt (Meeks *et al.*, 2001). *N. punctiforme* kann aus der vegetativen Zellform drei spezialisierte Zellformen differenzieren, die der Anpassung an bestimmte Lebensräume dienlich sind (Abb. 1): (i) Bei Stickstoffmangel differenzieren einzelne Zellen (10 - 20 %) im Filament zu Heterozysten (Abb. 1A Pfeilspitzen), welche befähigt sind molekularen Stickstoff (N₂) zu fixieren; (ii) kurze, bewegliche Filamente, die Hormogonien (Abb. 1B), werden differenziert, wenn neue Lebensräume aufgrund von Nährstoffmangel erschlossen werden müssen. Aber auch durch Pflanzenexudate, auch als *hormogonia inducing factor* (HIF) bekannt, werden Filamente zu Differenzierung gezwungen. (iii) Akineten (Abb. 1C Pfeilspitzen) hingegen werden allgemein durch schlechte Umweltbedingungen differenziert und dienen der

Überdauerung. Im Labor kann man sie gezielt durch Phosphatmangel induzieren (Meeks & Elhai, 2002).

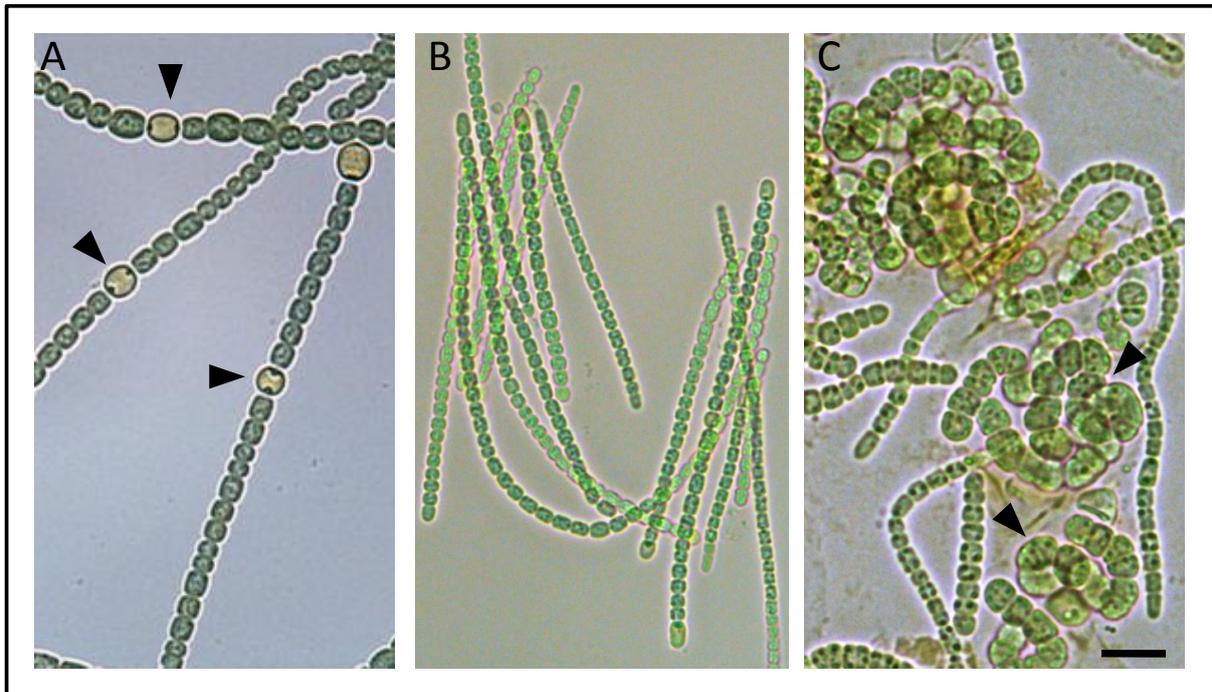


Abb. 1: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Differenzierungsformen von *N. punctiforme*.

A: Vegetatives Filament mit Heterozysten (Pfeilspitzen). B: Hormogonien. C: Akineten (Pfeilspitzen).
Größenmarker: 10 μm .

B.2 Zelldifferenzierung in *N. punctiforme*

B.2.1 Heterozysten

N. punctiforme aber auch andere Vertreter filamentöser Cyanobakterien können molekularen Stickstoff aus der Umgebung fixieren. Dies geschieht über die Heterozysten (Abb. 1A), welche aus einzelnen vegetativen Zellen im Filament differenziert werden. Ca. jede zwanzigste Zelle ist dieser Differenzierung unterworfen. Gebildet werden Heterozysten durch Mangel an gebundenem Stickstoff, wie beispielsweise Nitrat oder Ammonium. Unter micro- bis anoxischen Bedingungen findet die enzymatische Fixierung des Luftstickstoffs durch das Sauerstoff-empfindliche Enzym Nitrogenase statt (Fay, 1992). Heterozysten sind Spezialzellen, die eine solche sauerstoffarme Umgebung gewährleisten (Walsby, 1985). Die Differenzierung zu vollständigen Heterozysten ist nach 20 – 24 h irreversibel abgeschlossen. Während dieser Metamorphose kommt es zu einigen Umgestaltungen in der Zelle.

Kontrolliert wird die Differenzierung durch die beiden Hauptregulatoren NtcA und HetR (Herrero *et al.*, 2001). Wegen der Sauerstoffempfindlichkeit der Nitrogenase wird während der Reifung das sauerstoffbildende Photosystem II abgebaut. Der von den photosynthetisch aktiven Nachbarzellen einströmende Sauerstoff kann durch zu sogenannten Halskanälen reduzierten Septen kontrolliert werden. Die zu den Polen der Heterozyste orientierten Honigwabenmembranen (*honeycomb structures*) und die daran organisierten Oxydasen verhindern das Eindringen des schädlichen Gases in die Heterozyste (Wolk, 1996). Mikroskopische Aufnahmen von Heterozysten unterscheiden sich nicht nur optisch von vegetativen Zellen durch die Gelbpigmentierung, welche durch den Verlust des Photosystems II und seiner Antennenpigmente, den Phycobiliproteinen, hervorgerufen wird, sondern auch in der Größe durch Auflagerung von Zellhüllen (Wolk *et al.*, 1994). Hierbei handelt es sich um eine innere laminare Schicht aus Glycolipiden (Heterozysten-Gycolipid-Schicht, Hgl-Schicht) und einer darauf aufgelagerten Polysaccharid-Schicht (Heterozysten-Polysaccharid-Schicht, Hep-Schicht). 5 - 7 h nach Stickstoffentzug beginnt die Auflagerung der Hep-Schicht auf die äußere Membran der sich bildenden Heterozyste (Wolk, 1996).

B.2.2 Hormogonien

Hormogonien (Abb. 1B) sind die infizierende Einheit cyanobakterieller symbiotischer Interaktionen (Meeks *et al.*, 2002). Dabei handelt es sich um kurze, aus ca. 10 - 30 Zellen organisierte, bewegliche Filamente. Sie bestehen aus kleinen, zylinderförmigen Zellen und spitz zulaufenden, endständigen Zellen (Meeks & Elhai, 2002). Manche Arten besitzen Gasvesikel, welche den Filamenten in Gewässern Auftrieb ermöglichen und somit zum passiven Standortwechsel verhelfen (Walsby & Hayes, 1989). Zusätzlich können sich Hormogonien durch Pili-Strukturen, welche das gesamte Filament umspannen, aktiv bewegen (Duggan *et al.*, 2007). Photo- wie auch chemotaktisch können somit zielgerichtet kurze Distanzen zurückgelegt werden. Die zur Differenzierung getriebenen Hormogonien werden von pflanzlichen Symbiosepartnern angelockt, welche einen noch nicht identifizierten Lockstoff aussenden, den sogenannten HIF (Meeks *et al.*, 2002). Plötzliche Veränderungen des Habitats, wie beispielsweise die Nährstoffkonzentration oder die spektrale Zusammensetzung des Lichts können ebenfalls zur Hormogonieninduktion führen (Tandeau De Marsac, 1994).

Die Hormogonien sind spezialisierte Filamente, welche einem komplexen Differenzierungsprozess unterworfen sind. Kommt es zur Differenzierung, wird eine Reduktionsteilung ohne Zugewinn an Biomasse aller im Filament befindlicher Zellen eingeleitet. Dies führt, wie oben erwähnt, zu kleinen, quadratischen, ca. 3 μm großen Zellen (Meeks *et al.*, 2002). Zusätzlich kommt es zur Verringerung der Synthese von Phycobiliproteinen (Damerval *et al.*, 1991), zur Abnahme der CO_2 -Fixierung und der NH_4^+ -Assimilation (Meeks & Elhai, 2002). Anders als bei den Heterozysten, welche nach der Differenzierung den programmierten Zelltod erleiden, ist der Zustand der Hormogonien transient. Nach ca. 48 – 72 h verlieren die Hormogonien ihre Gleiteigenschaft und kehren wieder in den vegetativen Zellzyklus zurück (Meeks *et al.*, 2002). Transkriptomanalysen von Hormogonien bei *N. punctiforme* zeigen ~ 2000 spezifisch regulierte Gene. Eine im Verhältnis zum Stickstoff *step down* (495 Gene) und zu Akineten (497 Gene) mehr als dreimal so hohe Anzahl (Campbell *et al.*, 2007).

B.2.3 Akineten

Akineten (Abb. 1C) sind Überdauerungsformen ungünstiger Umweltbedingungen. Deshalb werden sie oft als „sporenenähnlich“ beschrieben. Sie sind ausgestattet mit einer verdickten Zellwand, die ihnen erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber Trockenheit und Kälte garantiert (Meeks *et al.*, 2002). Eingelagertes Glykogen und Cyanophycin als Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle bieten in hoher Konzentration die nötigen Reservestoffe zum überdauern von Nährstoffmangel (Adams & Duggan, 1999, Sutherland *et al.*, 1979), wobei ein reduzierter Metabolismus den sparsamen Umgang mit den Speicherstoffen sichert (Campbell *et al.*, 2007). Trotz der Resistenz der Akineten sind diese nicht mit Endosporen der Gram-positiven Bakterien zu vergleichen, welche weitaus extremere klimatische Schwankungen überleben (Adams & Duggan, 1999). Unter Laborbedingungen lassen sich, durch Phosphatmangel ausgelöst, aus vegetativen Zellen in wenigen Tagen Akineten differenzieren (Adams & Duggan, 1999). Dabei bilden sich dickwandige, mit Reservestoffen gefüllte Zellen, welche häufig abgetrennt vom Filament vereinzelt im Medium zu finden sind (Meeks *et al.*, 2002). In diesem Zustand sind optische Ähnlichkeiten zu vereinzelt Heterozysten erkennbar. Aber auch physiologische und genetische Ähnlichkeiten lassen eine evolutionäre Verwandtschaft vermuten. Akineten besitzen eine äußere Polysaccharidschicht, welche identisch in der Zusammensetzung derer von Heterozysten ist (Wolk, 1996). Interessant ist auch, dass Akineten bisweilen nur in Heterozysten-bildenden Cyanobakterien

vorkommen. Experimente mit den Hauptregulatoren der Heterozysten-Differenzierung zeigten in *hetR*-, *devR*- und *hepA*-Mutanten strukturelle Veränderungen in den Akineten. Aus ihrer Dormanz können Akineten durch optimale Nährstoffbedingungen und einer Lichtquelle geweckt werden (Argueta & Summers, 2005, Simon 1987).

B.3 Peptidoglycan durchstoßende Strukturen in filamentösen Cyanobakterien

Schon frühe Untersuchungen von filamentösen, aber auch einzelligen Cyanobakterien zeigten Poren oder Perforationsstrukturen in der Zellwand (Guglielmi & Cohen-Bazire, 1982, Hoiczky & Baumeister, 1995, Palinska & Krumbein, 2000). Diese Strukturen wurden elektronenmikroskopisch anhand von Ultradünnschnitten, Mureinpräparationen und Gefrierbrüchen identifiziert und analysiert (Lang & Fay, 1971, Wildon & Mercer, 1963, Giddings & Staehelin 1981). Aktuell findet auch die Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy* AFM) zur strukturellen Analyse des Peptidoglycans Anwendung (Kurk *et al.*, 2010).

Zwei Hauptfunktionen werden diesen Strukturen in filamentösen Cyanobakterien zugeordnet: (i) Die Funktion der Fortbewegung, wo links und rechts kreisförmig um das Septum Poren organisiert sind. Aus diesen Öffnungen werden Schleime sezerniert, um das Filament zielgerichtet gleitend fortzubewegen. Beispielsweise drehen sich Vertreter der Gattung *Oscillatoria* durch die Schleimabsonderung korkenzieherartig um die eigene Achse und bewegen sich somit voran (Hoiczky & Baumeister, 1995, Palinska & Krumbein, 2000, Hosoi, 1951). (ii) Die Funktion der Kommunikation zwischen zwei Nachbarzellen im Filament, wo über Septum-durchspannende Strukturen Metabolite ausgetauscht werden (Guglielmi & Cohen-Bazire, 1982, Giddings & Staehelin, 1981). *Anabaena cylindrica*, *Anabaena variabilis*, *Nostoc commune* und *Nostoc muscorum* sind filamentöse, Heterozystenbildende Cyanobakterien mit solchen, auch als Septosom bezeichneten Kommunikationsstrukturen (Wilk *et al.*, 2011). 100 bis 250 dieser Strukturen (Giddings & Staehelin, 1981) mit einem Durchmesser von ca. 14 nm und einer Länge von 26 nm sind zentrisch im Septum orientiert (Wilk *et al.*, 2011). FRAP- (*Fluorescence recovery after photobleaching*) Analysen in *Anabaena* haben gezeigt, dass Calcein, ein 623 Da großes Fluorophor, das Septum vermutlich über diese Strukturen passieren kann (Mullineaux *et al.*, 2008). Hingegen sind Moleküle wie beispielsweise GFP (grün fluoreszierendes Protein, 27 kDa) zu groß, um über interzelluläre Verbindungen durch das Septum zu gelangen (Zhang *et al.*, 2008).

B.4 Zell-Zell-Kommunikation in filamentösen Cyanobakterien

Vielzellige Cyanobakterien sind auf den interzellulären Stoffaustausch zwischen den Zellen im Filament angewiesen. Signalstoffe und regulatorische Moleküle, welche für die Differenzierung von vegetativen Zellen zu Spezialzellen verantwortlich sind, müssen an den Zielort rekrutiert werden (Flores *et al.*, 2006, Flores & Herrero, 2010). Bei Stickstoffmangel werden durch bestimmte Signalstoffe in regelmäßigem Abstand N₂ fixierende Heterozysten im Filament gebildet. Sie versorgen die vegetativen Zellen mit verwertbaren Stickstoffverbindungen. Im Gegenzug vermehren sich die vegetativen Zellen und sichern den Bestand der Population (Wolk *et al.*, 1994). Bei der Hormogonien-Differenzierung wird die synchrone Zellteilung durch den schnellen Informationsaustausch im Filament gesteuert. Nach der Differenzierung bewegen sich diese wiederum zielgerichtet fort. Diese gezielte Fortbewegung, die von allen Zellen im Filament gleichermaßen getragen wird, basiert auf phototaktischen bzw. chemotaktischen Reizen, deren Information über das ganze Filament getragen wird (Meeks & Elhai, 2002).

Der periplasmatische und der interzelluläre Transport sind zwei mögliche Varianten des filamentösen Stoffaustauschs von Zelle zu Zelle. Der periplasmatische wird durch die Umspannung der äußeren Membran um das gesamte Filament ermöglicht. Dabei schnürt die äußere Membran das Septum nicht ein und stellt somit auch keine Diffusionsbarriere zur Nachbarzelle dar (Mariscal *et al.*, 2007, Flores *et al.*, 2006, Maldener & Muro-Pastor, 2010). Der Transport konnte experimentell anhand eines GFPs, welches über das Tat- (*Twin-arginine translocation*) System aus dem Cytoplasma ins Periplasma transferiert wurde und sich dort unabhängig von den Septen zwischen den Zellen ausbreitete, nachgewiesen werden (Mariscal *et al.*, 2007).

Der interzelluläre Transport wird vermutlich über Mikroplasmodesmata bzw. Septosomen gewährleistet (Wolk *et al.*, 1994). Dabei handelt es sich um Strukturen, die senkrecht zum Septum das Periplasma durchspannen. Der Begriff Mikroplasmodesmata wurde aus der Botanik übernommen, wo Zell-Zell-Verbindungen als solche bezeichnet werden (Lang & Fay, 1971). Im Unterschied zu den Pflanzen sind diese Strukturen in Cyanobakterien allerdings nicht von einer Cytoplasmamembran umgeben (Mariscal *et al.*, 2007, Flores & Herrero, 2010). Ein Hinweis, dass ein solcher interzellulärer Transport existiert, konnte mit FRAP-Analysen in *Anabaena* PCC 7120 und *A. cylindrica* erbracht werden. Wiederum gibt es filamentöse Arten, die keinen Calceintransport zeigten. Darunter beispielsweise

Oscillatoria terebriformis, ein Vertreter der Sektion III, ohne Differenzierungspotential (Mullineaux *et al.*, 2008). In strukturellen Untersuchungen bei Vertretern mit eingeschränkter Zelldifferenzierung, wie z.B. *Phormidium luridum* oder *Plectonema boryanum*, wurden 60 % weniger Mikroplasmodesmata identifiziert (Giddings & Staehelin, 1981). Die Kommunikationsstrukturen, welche einen schnellen Metaboliten-austausch ermöglichen, scheinen Voraussetzung für das diazotrophe Wachstum zu sein.

B.5 Die Morphogenese der Bakterien

B.5.1 Formgebung und Stabilität durch das bakterielle Exoskelett

Die Zellhülle der Bakterien wird vom Peptidoglycan gebildet. Dies ist ein heteropolymeres Makromolekül, welches auch als Mureinsacculus bezeichnet wird (Schleifer & Kandler, 1972). Dieser Sacculus ist das Exoskelett und für die Stabilität und Formgebung des Bakteriums verantwortlich (Weidel *et al.*, 1960, Höltje, 1998, Vollmer & Höltje, 2004). Das Umkleiden der Zelle mit Murein verhindert ein Bersten der Zelle durch den Turgordruck. Wird das Murein entfernt, verliert das Bakterium seine charakteristische Form und es bilden sich im isotonischen Medium den Zelldrücken unterworfenen runden Sphaeroplasten (Pitzurra & Szybalski, 1959). Der Sacculus ist von netzartiger Struktur, welche durch lange Glycanketten und kurzen Peptidbrücken verbunden ist. Dies verleiht dem Sacculus seine Elastizität, welcher sich somit reversibel ausdehnen oder zusammenziehen kann. Isoliert vom Rest der Zelle repräsentiert der Mureinsacculus diese in ihrer ursprünglichen Form (Weidel *et al.*, 1960, Höltje, 1998).

Nahezu alle bekannten Bakterien besitzen diese Zellhülle, wobei die Dicke des Mureins sehr unterschiedlich sein kann. Gram-positive Bakterien besitzen ein 40 - 80 nm dickes vielschichtiges Murein (Ghuysen, 1968, Schleifer & Kandler, 1972). Daran gebunden sind Wandteichonsäuren, Oberflächenproteine oder Kapselpolysaccharide. Das Murein kann zwischen 30 und 70 % des Zellwandrockengewichts betragen (Schleifer & Kandler, 1972). Gram-negative Bakterien haben ein wesentlich dünneres, ca. 2,5 nm dickes Peptidoglycan (Yao *et al.*, 1999). Meist ist das Peptidoglycan einschichtig parallel zur Membran aufgebaut und über das Braunsche Lipoprotein mit der äußeren Membran kovalent verknüpft (Braun & Rehn, 1969). Die Zellwand Gram-negativer Bakterien besteht meist nur zu 10 % aus Peptidoglycan, die restlichen 90 % sind Lipopolysaccharide, Lipide und Proteine als

Bestandteile der Cytoplasmamembran und der äußeren Membran (Schleifer & Kandler, 1972). Cyanobakterien zählen aufgrund ihrer Zellwandstruktur zu den Gram-negativen Bakterien; ihr Peptidoglycan ist aber bei den meisten Vertretern wesentlich dicker. Die Ausmaße reichen von 10 nm beispielsweise bei *Synechococcus sp.* PCC 6307 bis hin zu 700 nm bei *Oscillatoria princeps* (Schleifer & Kandler, 1972).

B.5.2 Formgebung durch das bakterielle Cytoskelett

Zusätzlich zum bakteriellen Exoskelett sind Aktin-ähnliche MreB-Proteine bei der Bildung eines Cytoskelett essentiell für die bakterielle Formgebung (van den Ent *et al.*, 2001, Jones *et al.*, 2001). MreB windet sich helikal um die Peripherie der Zelle unterhalb der Zytoplasmamembran und steuert vermutlich Peptidoglycan-synthetisierende Enzyme in ihrer räumlichen wie zeitlichen Orientierung (Daniel & Errington, 2003, Carballido-Lopez & Errington, 2003, Carballido-Lopez, 2006). Somit greift das Cytoskelett aktiv in die Morphogenese des Mureins ein. Auch in filamentösen multizellulären Cyanobakterien ist beispielsweise das MreB-Protein wesentlich an der Formgebung der Zelle beteiligt. *Anabaena* PCC 7120 Zellen von *mreB*-Knockout Mutanten verlieren ihre ursprüngliche Form und werden zu Filamenten mit kreisrunden Zellen (Hu *et al.*, 2007).

B.6 Peptidoglycan

B.6.1 Die Struktur des Peptidoglycans

Das Peptidoglycan besteht aus zwei Aminozuckern, N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc), welche über eine β -1,4-glycosidische Bindung miteinander verknüpft sind. Die D-Laktyl-Gruppe jedes MurNAc ist mit einer Peptidseitenkette (Peptidstamm) verbunden. Die Peptidstämme bestehen meist aus L-Alanyl- γ -D-Glutamyl-Diaminopimelyl- (oder L-Lysyl) D-Alanyl-D-Alanin, wo sie helikal am Glycanstrang im Winkel von 90° zueinander orientiert sind. Die Peptidseitenketten sind oft untereinander quervernetzt. Dies geschieht über eine Transpeptidierungsreaktion der ω -Aminogruppe der Diaminopimelinsäure (A2pm) und der Carboxylgruppe eines D-Ala einer anderen Peptidkette (Schleifer & Kandler, 1972). Dadurch bildet sich der charakteristische Mureinsacculus. Einschichtiges Peptidoglycan wird durch die Quervernetzung der

Glycanstränge über 180° mit Peptidseitenketten eines weiteren Glycanstranges gebildet. Dabei wird nur jede zweite Peptidseitenkette nach links bzw. rechts alternierend verknüpft. Mehrschichtiges Murein wird gebildet, wenn mehrere einschichtige Mureinlagen sich über Peptidseitenketten nach oben bzw. unten verbinden. Dabei kommt es zur Bildung trimerer oder tetramerer Peptidbrücken, die drei bzw. vier Glycanstränge miteinander verbinden (Glauner *et al.*, 1988, Höltje, 1998) (Abb. 2). Im Gram-negativen Bakterium *E. coli* ist der Vernetzungsgrad über trimere (5 %) oder tetramere (0,16 %) Peptidseitenketten eher selten (Labischinski *et al.*, 1991). Der Vernetzungsgrad des einzelligen Cyanobakteriums *Synechococcus sp.* PCC 6307 liegt bei ca. 56 % (Jürgens *et al.*, 1983).

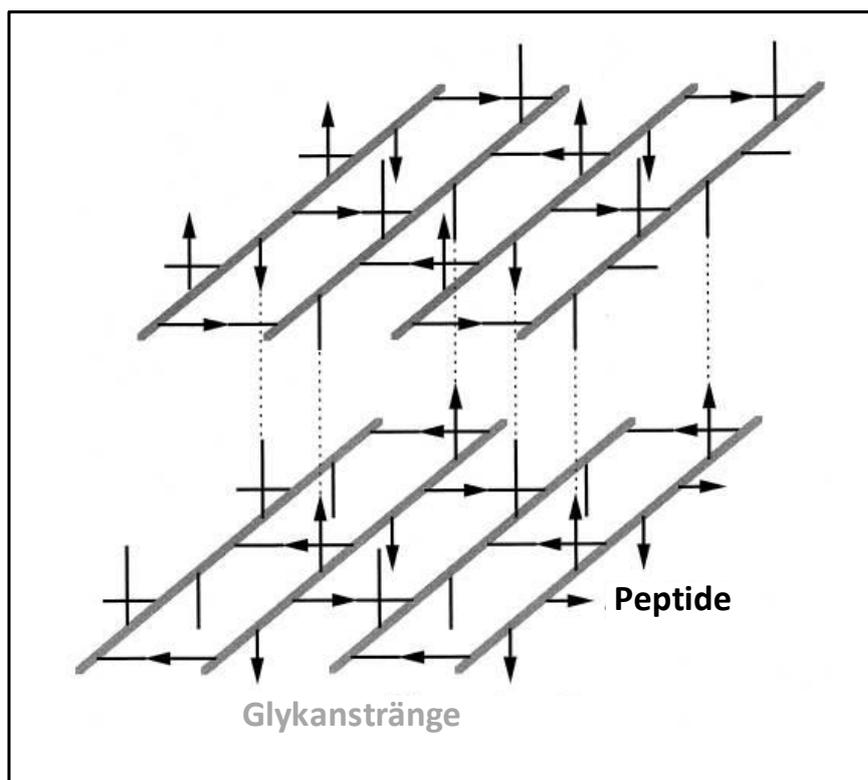


Abb. 2: Die Architektur der Mureinschichten.

Das Schema zeigt zwei Mureinschichten, die miteinander zu einem mehrschichtigen Murein verbunden sind (gepunktete Linien). Die Glycanstränge sind durch graue Säulen dargestellt, die Peptidseitenketten als schwarze Linien (Akzeptor Stamm-Peptide) und schwarze Pfeile (Donor Stamm-Peptide). (Zeichnung modifiziert nach Höltje, 1998)

Auch wenn dies bis heute noch nicht eindeutig gezeigt, geht man davon aus, dass die Glycanstränge aus statischen Gründen senkrecht zur Längsachse orientiert sind. In stäbchenförmigen Bakterien sollen sie sich um die zylinderförmigen Zellen herum winden und somit der Querachse mehr Stabilität und Flexibilität geben (Abb. 2). Dabei sollen die Glycanstränge eine Länge zwischen 1 und 30 Disacchariden betragen. Experimente, in welchen *E. coli* Sacculi partiell mit Endopeptidasen verdaut oder durch Ultraschall zerrissen wurden, zeigten häufig Fragmente zur Querachse der Zelle (Verwer *et al.*, 1978, Verwer *et al.*, 1980). AFM-Aufnahmen von *Bacillus subtilis*, ein Gram-positiver Vertreter,

lassen ebenfalls vermuten, dass Bündel von Peptidoglycansträngen die Zelle zur Längsachse umwickeln, die sich zum Septum spiralförmig verzüngen (Hayhurst *et al.*, 2008).

B.6.2 Die Synthese des Peptidoglycans

Die Synthese des Peptidoglycans (Abb. 3) beginnt im Cytoplasma mit der Umwandlung von Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) in UDP-N-Acetylmuraminsäure (UDP-MurNAc) durch die Enzyme MurA und MurB (Marquardt *et al.*, 1992). Durch die Aminoligasen MurC, D, E, und F werden die Aminosäuren und das D-Ala-D-Ala-Dipeptid übertragen und es bildet sich das UDP-N-Acetylmuramylpentapeptid (Liger *et al.*, 1995, Dougherty *et al.*, 1993, Maruyama *et al.*, 1988). Durch die Glutamat-Racemase MurI (Doublet *et al.*, 1993) und Alanin-Racemase DadX (Wild *et al.*, 1985) werden L-Ala bzw. L-Glu zu D-Ala und D-Glu umgewandelt.

An der Cytoplasmamembran wird anschließend durch das integrale Membranprotein MraY das UDP-N-Acetylmuramylpentapeptid auf den Membrananker Bactoprenol (Undecaprenylphosphat) übertragen (Ikeda *et al.*, 1991). Daraus bildet sich Lipid I. Durch das Anfügen von UDP-GlcNAc durch MurG entsteht aus Lipid I ein Lipid II (Mengin-Lecreulx *et al.*, 1991, Vollmer & Bertsche, 2008). Das Lipid II wird anschließend durch Flipasen (FtsW, RodA) über die Cytoplasmamembran ins Periplasma transportiert (Mohammadi *et al.*, 2011). Das netzartige Murein wird durch die Polymerisierung der Disacchariduntereinheiten mit Hilfe der Glycosyltransferasen (GTase) und die Vernetzung der Glycanstränge über Peptidbindungen durch DD-Transpeptidasen (DD-TPase) gebildet (Höltje, 1998).

GTase und DD-TPase sind Peptidoglycan-Synthasen, welche auch als Penicillin-Bindeproteine (PBPs) bekannt sind, da sie kovalent Penicilin binden können (Suginaka *et al.*, 1972). Es gibt drei verschiedene Typen von Peptidoglycan-Synthasen: (i) Bifunktionale GTase-TPasen (PBP1A, PBP1B, PBP1C) (Broome-Smith *et al.*, 1985, Ishino *et al.*, 1980, Nakagawa *et al.*, 1979, Schiffer & Höltje, 1999) (ii) monofunktionale TPasen (PBP2, PBP3) (Asoh *et al.*, 1986, Nakamura *et al.*, 1983) und (iii) monofunktionale GTasen (Di Berardino *et al.*, 1996).

Bestimmte PBPs übernehmen zusätzlich bei der Modifikation des Mureinsacculus spezifische Funktionen. Dabei ist beispielsweise die TPase (PBP2) wichtig für das Längenwachstum (Spratt, 1975). Im Divisom wiederum befinden sich Septum-spezifische TPasen (PBP3), auch als FtsI bekannt, welche wichtig in der Zellteilung sind. PBP1B wechselwirkt mit zwei

essentiellen Proteinen aus dem Zellteilungskomplex (FtsN, PBP3) (Spratt & Pardee, 1975, Bertsche *et al.*, 2006, van Heijenoort, 2011).

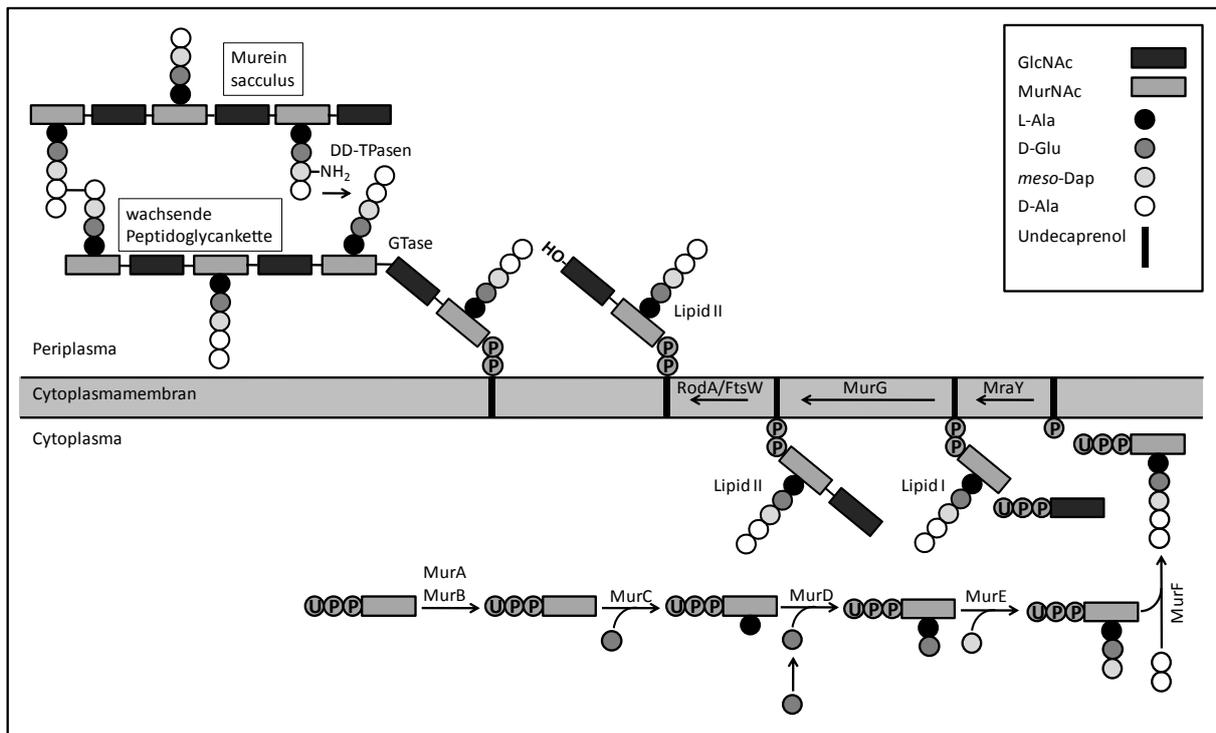


Abb. 3: Schematische Darstellung der Peptidoglycanvorstufen und deren Einbau in den Mureinsacculus.

Die Synthese der Peptidoglycanvorstufen findet im Cytoplasma statt. Die Vorstufen werden an den Membrananker Undecaprenylphosphat gebunden. Dadurch entsteht Lipid I. Durch Anheften von GlcNAc bildet sich Lipid II. Integrale Membranproteine transportieren die Vorstufen über die Membran. Der Einbau von Lipid II in den Mureinsacculus findet im Periplasma statt. Durch Glycosyltransferasen (GTase) werden die Disacchariduntereinheiten auf einen entstehenden Peptidoglycanstrang übertragen. Die Glycanstränge werden anschließend durch DD-Transpeptidasen (DD-TPasen) über Peptidbindungen miteinander vernetzt. (Zeichung modifiziert nach Typas *et al.*, 2011)

B.6.3 Wachstum und Teilung des Mureinsacculus

Das Wachstum bzw. die Vermehrung von Zellen ist nur durch die Erweiterung und Teilung des Mureinsacculus möglich. Dabei müssen neue Disaccharide in das Peptidoglycan eingebaut werden. Aufgrund der Theorie, dass die Peptidoglycanstränge sich um die kurze Achse des Zylinderwinden, geht man davon aus, dass der Einbau der Glycanstränge gleichermaßen funktioniert (Höltje, 1996, Vollmer & Bertsche 2008, Typas *et al.*, 2012) (Abb. 4).

Da der Mureinsacculus eine in sich geschlossene Struktur ist, erfordert der Einbau von neuem Material in das bestehende Netzwerk die Öffnung von Bindungen. Somit sind neben den Synthasen, Hydrolasen gleichfalls an der Vergrößerung oder Umgestaltung des Peptidoglycans beteiligt. Dabei darf die Stabilität des Mureinsacculus nicht verloren gehen. Beim Einbau bedarf es deshalb einer bestimmten Reihenfolge. Zuerst muss ein Peptidoglycanstrang synthetisiert werden, anschließend wird dieser durch Transpeptidasen bzw. Transglycosylasen polymerisiert und ins Peptidoglycan integriert. Zuletzt wird das bestehende, alte Peptidoglycan durch Hydrolasen entfernt („*make before you brake*“-Modell) (Koch, 1990). Nur durch einen Multienzymkomplex kann Synthese und Hydrolyse zur gleichen Zeit am selben Ort stattfinden. Vermutlich existiert ein solcher Komplex, der ähnlich wie das Holoenzym der DNA-Replikation funktioniert. In diesem Fall spricht man von einem „*three for one*“-Modell, bei dem ein Elongations-Multienzymkomplex aus Transglycosylasen, Transpeptidasen und Mureinhydrolasen drei miteinander verknüpfte Peptidoglycanstränge durch Verlust eines Stranges in das Murein einbaut (Höltje, 1996, Vollmer & Bertsche 2008, Typas *et al.*, 2012).

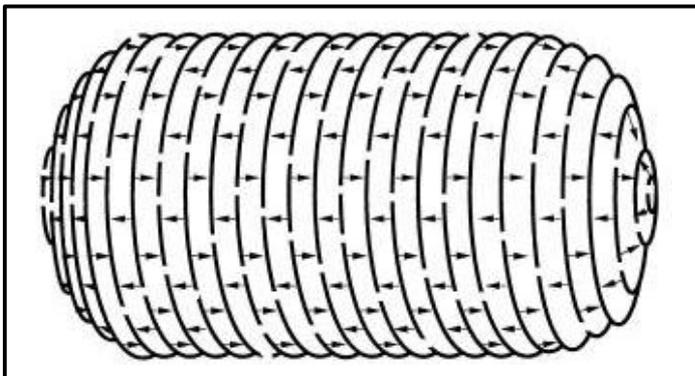


Abb. 4: Schematische Zeichnung der Architektur des Mureinsacculus eines stäbchenförmigen Bakteriums.

Die parallelen Linien stellen die Glycanstränge und die Pfeile deren Quervernetzung durch Peptide dar. (Zeichnung aus Höltje, 1998)

Ähnlich komplex wie die Elongation des Mureins ist auch die Einschnürung des Mureins während der Zellteilung gestaltet. Man geht davon aus, dass zwei Typen von Multienzymkomplexen existieren: (i) Ein Elongations-Multienzymkomplex mit PBP2, welcher spezifisch für das Längenwachstum ist, und (ii) ein Einschnürungs-Multienzymkomplex mit PBP3, der spezifisch für die Zellteilung ist (Spratt, 1975, Vollmer *et al.*, 2008, Typas *et al.*, 2012). Das richtige Zusammenspiel aus beiden Enzymkomplexen ist entscheidend für die Zellform. Dabei spricht man von einem „*two-competing-sites*“-Modell, wo durch die Balance beider Enzymkomplexe die endgültige Zellform bestimmt wird. (Lleo *et al.*, 1990, Satta *et al.*, 1994). Neueste Forschungsergebnisse lassen vermuten, dass

MreB und die Peptidoglycansynthese-Komplexe miteinander interagieren und somit zusammen an der Formgebung beteiligt sind (White *et al.*, 2011, Kawai *et al.*, 2011).

B.6.4 Mureinabbau durch Hydrolasen

Die bakteriellen Peptidoglycan-Hydrolasen umfassen eine Gruppe an spezialisierten Enzymen, die Peptidoglycan-Bindungen hydrolysieren (Shockman *et al.*, 1996). Die Einteilung erfolgt in drei Gruppen: (i) Die Muramidasen, welche die Zuckerstränge hydrolysieren, (ii) die Carboxy- und Endopeptidasen, welche den Peptidrest spalten und (iii) die N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidasen, welche die Verbindung zwischen MurNAc und der Peptidseitenkette trennen (Strominger & Ghuysen, 1967, Huard *et al.*, 2003, Vollmer *et al.*, 2008).

Dabei spielen die Hydrolasen in vielerlei Hinsicht eine wichtige Rolle: (i) Bei der Regulation des *turnovers* während des Zellwand-Wachstums (Koch, 1990, de Pedro *et al.*, 1997, Goodell, 1985). Während des Zellwachstums werden Peptidoglycan-Fragmente, die durch Peptidoglycan-Neusynthese und anschließender Abspaltung alter Fragmente entstanden sind, in das Periplasma entlassen. Über verschiedene Stoffwechselwege können von der Zelle bis zu 90 % der Fragmente wieder verwendet werden. Dieser Prozess wird als *turnover* bezeichnet (Höltje, 1998). (ii) Bei der Trennung zweier Tochterzellen während der Zellteilung und (iii) für die Bildung von Poren für Murein-durchstoßende Komplexe, beispielsweise bei *Salmonella typhimurium* durch das Flagellen-Protein FlgJ (Kubori *et al.*, 1992).

Hydrolasen zeigen allerdings einen ambivalenten Charakter, da sie nicht nur unabdingbar für das Wachstum der Zelle sind, sondern durch Überproduktion auch selbstzerstörerisch für die Zelle sein können. In *Anabaena* PCC 7120 konnte durch Überexpression eines AmiC-Homologen *alr0092* Zell-Lyse beobachtet werden (Berendt *et al.*, 2012). Auch die Überproduktion einer lytischen Transglycosylase (MltB) aus *E. coli* führte zur Lyse (Ehlert *et al.*, 1995). In Abbildung 5 sind die Regionen im Peptidoglycan mit einem Pfeil markiert, die von verschiedenen Mureinhydrolasen gespalten werden.

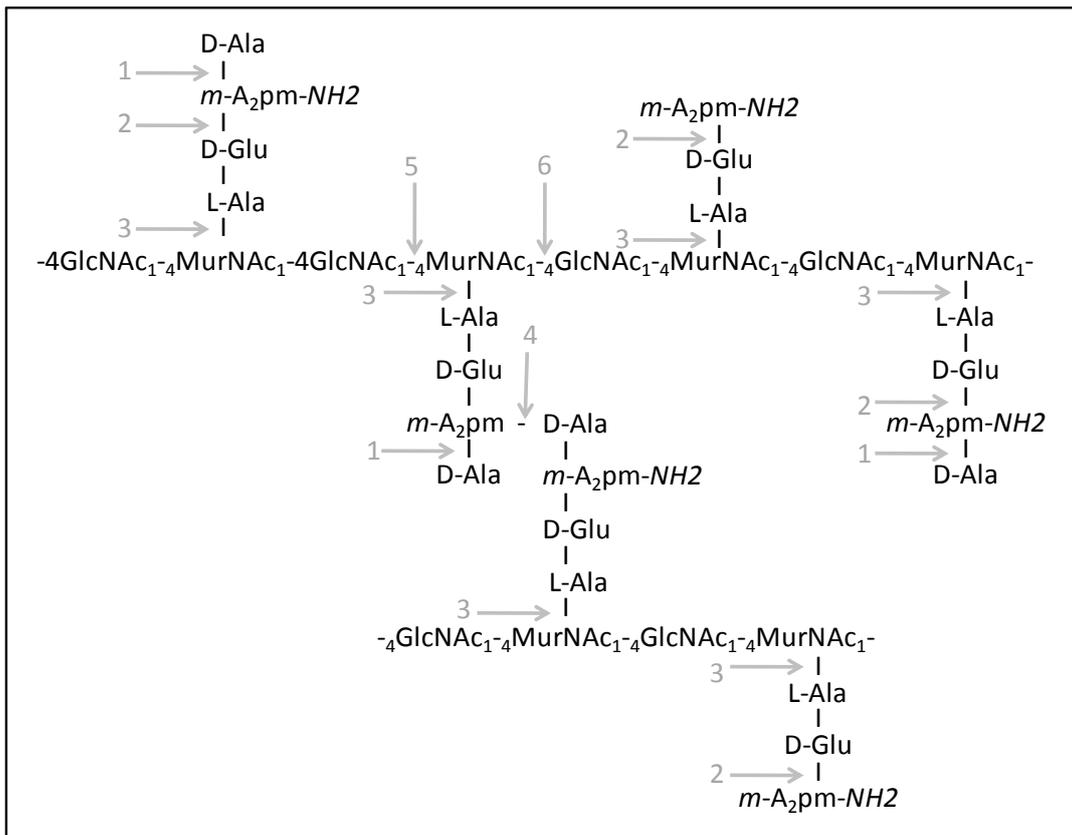


Abb. 5: Hydrolyse der Amid- und Peptid-Bindungen im Peptidoglycan am Beispiel von *E. coli*.

Pfeile deuten auf die Spaltstelle im Peptidoglycan: (1) Carboxypeptidasen regulieren die Peptidoglycanstruktur durch Hydrolyse von Peptidbindungen C-terminaler D- oder L-Aminosäuren; (2) γ -D-Glutamyl-L-Diaminopimelinsäure-Endopeptidasen spalten Amid-Bindungen in Peptiden; (3) N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidasen hydrolysieren die Amidbindung zwischen der Lactylgruppe von MurNac und dem L-Alanine der Peptidbrücke; (4) Septum-lokalisierte Endopeptidasen spalten Amid-Bindungen im Peptid; (5) N-Acetylglycosaminidasen spalten glycosidische Bindungen zwischen N-Acetyl- β -D-Glucosaminresten und angrenzenden Monosacchariden und (6) lytische Transglycosylasen spalten β -1,4-glycosidische Bindungen zwischen MurNac und GlcNac. (Zeichnung modifiziert nach Höltje, 1995)

B.6.4.1 N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidasen

N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidasen spalten Amidbindungen zwischen dem MurNac und dem N-terminalen L-Alanin-Rest des Stammpeptids (Höltje, 1998) (Abb. 5). In einzelligen Bakterien sind die Amidasen vor allem wichtig für die vollständige Abschnürung frisch geteilter Tochterzellen. In *E. coli* sind dabei die Amidasen AmiA, AmiB und AmiC von Bedeutung (Heidrich *et al.*, 2001). AmiB und AmiC haben sogenannte AMIN-Domänen, dabei handelt es sich um Septum-lokalisierende N-terminale Bereiche (Abb. 6) (Bernhardt & de Boer, 2003, de Souza *et al.*, 2008). Sie vermitteln den Amidasen den Wirkort am Septum.

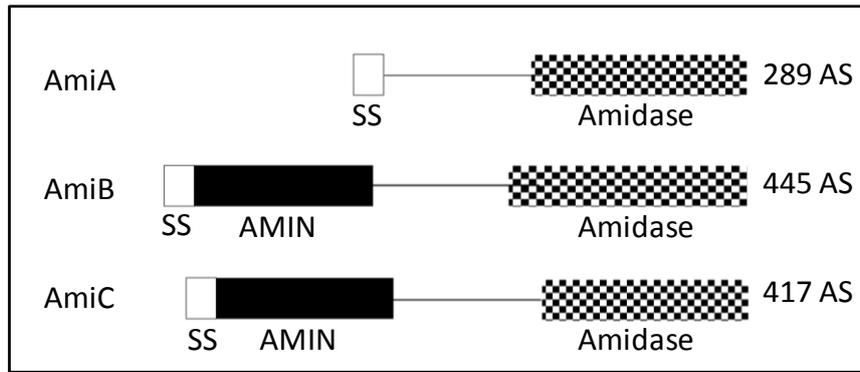


Abb. 6: Domänen-Organisation der Zellteilungsspezifischen Amidasen aus *E. coli*.

Zellwand-spezifische Amidasen AmiA, AmiB und AmiC und deren Domänen-Organisation. AmiB und AmiC-Proteine haben eine AMIN-Domäne zur Lokalisierung an die Zellteilungsebene. SS, Signalsequenz; AMIN, Amidase N-terminale Domäne; Amidase, C-terminale enzymatische Amidase-Domäne; AS; Aminosäuren der jeweiligen Proteine. (Zeichnung modifiziert nach Peters *et al.*, 2011)

Werden alle drei Gene *amiA*, *amiB* und *amiC* in *E. coli* ausgeschaltet, kommt es zur Bildung langer, nicht-separierter Filamente von Tochterzellen. Werden hingegen nicht alle drei Amidasen ausgeschaltet, übernehmen die vorhandenen Amidasen teilweise die Funktionen der ausgeschalteten (Heidrich *et al.*, 2001). Die Redundanz der Amidasen zeigte sich deutlich beim Ausschalten von acht Amidasen in *E. coli*, was nicht zu einem letalen Phänotyp führte, sondern es bildeten sich wie bei der *amiABC*-Dreifachmutante lange Filamente. Dies verdeutlicht wiederum die Hauptfunktion der Amidasen in der Zellteilung von *E. coli* (Höltje & Heidrich, 2001).

Auch in anderen Organismen wurden Septum-lokalisierende Amidasen untersucht. Beispielsweise sind *amiC*-Mutanten in *Neisseria gonorrhoeae* ebenfalls nicht mehr in der Lage, ihre Tochterzellen abzuschneiden und bilden stattdessen Klumpen nicht-separierter Zellen (Garcia & Dillard, 2006). Einen ähnlichen Phänotyp zeigten Deletionsmutanten der Gene *atIA* (Oshida *et al.*, 1995) und *atIE* (Heilmann *et al.*, 1997, Zoll *et al.*, 2010), die für die Hauptautolysine im Gram-positiven Bakterium *Staphylococcus epidermidis* kodieren.

Ebenso wurden auch in Cyanobakterien Gene identifiziert, die für Zellwand-Amidasen kodieren. Bei *Synechocystis* PCC 6803 hat die Inaktivierung von Amidasen aber keine Auswirkung auf die Zellteilung (Marbouty *et al.*, 2009b). Filamentöse Cyanobakterien verfügen ebenfalls über die Amidasen AmiA, AmiB und AmiC. Dort übernehmen diese Amidasen vermutlich andere Funktionen, da die Tochterzellen nach der Zellteilung nicht voneinander getrennt werden und stattdessen langkettige Filamente bilden. In *Anabaena* PCC 7120 wirkt sich das Ausschalten des Autolysins HcwA (*alr0093*) nicht auf die

Zellteilung aus, stattdessen auf die Heterozysten-Differenzierung, wobei die Mutante nicht befähigt ist, auf Stickstoffmangel-Medium zu wachsen (Zhu *et al.*, 2001). Eine weitere Amidase-Mutante in *Anabaena* PCC 7120 wurde erst kürzlich charakterisiert. Dabei wurde festgestellt, dass durch Ausschalten des *amiC1*-Gens (*alr0092*) die Zell-Zell-Kommunikation im Filament unterbrochen wird (Berendt *et al.*, 2012).

B.6.4.2 Regulation der N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidasen

Amidasen AmiA, AmiB und AmiC müssen in ihrer lytischen Aktivität stark reguliert werden. EnvC und NlpD sind Septum-lokalisierte Proteine, die als Aktivatoren der Septum-lokaliserten Amidasen fungieren. Dabei zeigten *in vitro* Peptidoglycan-Hydrolase-Tests, dass EnvC AmiA bzw. AmiB reguliert und NlpD AmiC (Uehara *et al.*, 2010). Die C-terminalen Domänen von EnvC und NlpD weisen eine starke Ähnlichkeit zum Autolysin LytM (Lysostaphin) aus Staphylokokken auf, weshalb diese auch als LytM-Domäne bezeichnet wird. Trotzdem sind sie für die Aktivierung der Amidasen wichtig. Werden *envC* und *nlpD* in *E. coli* ausgeschaltet, werden gleichermaßen wie in der *amiABC* Dreifachmutante lange Filamente gebildet (Uehara *et al.*, 2009).

B.7 Septum-lokalisiertes SepJ-Protein

SepJ, auch als FraG bekannt, ist ein Septum-lokalisiertes Protein in *Anabaena* PCC 7120. SepJ ist ein 751 AS großes Protein, bestehend aus drei Domänen: einer N-terminalen coiled-coil Domäne, einer C-terminalen Permease-Domäne und einer dazwischen befindlichen Verbindungsdomäne (Flores *et al.*, 2007, Nayar *et al.*, 2007, Mariscal *et al.*, 2011). Während der Zellteilung akkumuliert sich SepJ im Z-Ring des Divisoms, wo es nach der Teilung konzentriert im Septum der beiden Tochterzellen bleibt (Flores *et al.*, 2007). FraH und FraD sind Proteine, die für die Positionierung von SepJ an den Zellpolen wichtig sind. Deren weitere Funktionen sind aber bisher noch unklar (Merino-Puerto *et al.*, 2010, Merino-Puerto *et al.*, 2011). Die Mutation des *sepJ*-Gens führt zu starker Fragmentierung der Septen. Die Heterozysten der Mutante sind nicht ausdifferenziert und können auch unter anaeroben Bedingungen kein N₂ fixieren (Flores *et al.*, 2007). Ebenso ist der interzelluläre Calceinaustausch der Mutante stark reduziert, was auf eine Funktion in den Septum-durchspannenden Kommunikationssystemen hinweist (Mullineaux *et al.*, 2008).

C Zielstellung

In einzelligen Gram-negativen Bakterien ist die Zellwand-Amidase AmiC eine Septum-lokalisierte Hydrolase, welche nach der Zellteilung die Separierung der Tochterzellen gewährleistet. Homologe dieser Amidase wurden auch in filamentösen Cyanobakterien gefunden, bei denen eben keine Tochterzell-Separierung stattfindet. Die Klärung der Funktion solcher Amidasen in *N. punctiforme* war Gegenstand dieser Dissertation.

In *N. punctiforme* existiert ein Gen-Cluster, welches für zwei AmiC-Homologe kodiert, *Npun_F1845* und *Npun_F1846*. Die funktionelle Charakterisierung dieser Enzyme sollte durch gezielte Mutagenese ihrer Gene erfolgen. Die erhaltenen Mutanten sollten mittels Wachstumsstudien und verschiedener mikroskopischer Techniken, wie Licht- und Fluoreszenzmikroskopie als auch Elektronenmikroskopie zunächst morphologisch untersucht werden. Daneben sollten die Amidasen zur biochemischen Charakterisierung in *Escherichia coli* überexprimiert und aufgereinigt werden.

Der Zusammenhang zu einem weiteren Septum-lokalisierten Protein, SepJ_N, sollte durch eingehend physiologische und morphologische Charakterisierung der SepJ_N-Mutante analysiert werden.

D Material und Methoden

D.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Tabelle 1: Verwendete Cyanobakterienstämme

Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenzen
<i>Nostoc punctiforme</i> ATCC 29133	Wildtyp	ATCC
<i>Nostoc punctiforme</i> ATCC 29133 <i>amiC2</i> -Mutante	<i>Npun_F1846::C.K3</i> (rev.); Nm ^r ,	diese Arbeit
<i>Nostoc punctiforme</i> ATCC 29133 <i>sepJ</i> -Mutante	<i>Npun_R1732::C.K3</i> (rev.); Nm ^r ,	diese Arbeit
<i>Anabaena</i> PCC 7120	Wildtyp	PCC
<i>Anabaena</i> PCC 7120 SR477	<i>alr0092::pIM477</i> ; Sm ^r /Sp ^r	Berendt <i>et al.</i> , 2012
<i>Anabaena</i> PCC 7120 SR478	<i>alr0093::pIM478</i> ; Sm ^r /Sp ^r	Berendt <i>et al.</i> , 2012

Tabelle 2: Verwendete *E.coli* Stämme

Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenzen
DH5 α	F ⁻ , ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>), U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>gal- phoA</i> , <i>supE44</i> λ - <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
DH10B	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara, leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ - <i>rpsL</i> , <i>nupG</i>	Hanahan <i>et al.</i> , 1991
HB101	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara, leu</i>)7697, (<i>galU</i> , <i>galK</i> , λ - <i>rpsL</i> , <i>nupG</i>)	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
M15	<i>nalS</i> , <i>strS</i> , <i>rifS</i> , <i>thi-</i> , <i>lac-</i> , <i>ara+</i> , <i>gal+</i> , <i>mtl-</i> , <i>recA+</i> , <i>uvr+</i> , <i>lon+</i> Amp ^r , Km ^r	Qiagen
M15/ pIM347	<i>amiC26xHis::pIM347</i> Km ^r , Amp ^r	Kroog, 2009

Tabelle 3: Verwendete Plasmide

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenzen
pRK2013	RK2 Derivat für triparentale Paarung, Km ^r	Figurski & Helinski, 1979
pRL528	Helferplasmid für die Konjugation, Cm ^r	Elhai & Wolk, 1988
pGEM-T	Für A/T Klonierung, Amp ^r	Promega
pJET	Klonierungsvektor, Amp ^r	Fermentas
pRL271	Vektor für <i>sacB</i> Selektion für doppelte Rekombination in Gram-negativen Bakterien, Em ^r , Cm ^r	Black <i>et al.</i> , 1993
pRL448	C.K3 Kasette mit Promotor, Km ^r , Nm ^r	Elhai & Wolk, 1988
pQE-70	Expressionsvektor, T5-Promotor/ <i>lac</i> -Operator Element, C-terminale 6xHis-Tag kodierende Sequenz, β -Lactamase kodierende Sequenz	Qiagen
pIM245	1,33 kb PCR-Fragment mit Oligo 430 + 431; <i>amiC2</i> (Npun_F1846) + up- bzw. downstream Regionen, A/T Klonierung in pGEM-T, Amp ^r	Lehner, 2008
pIM249	2,87 kb PCR-Fragment mit Oligo 424 + 425, interne <i>sepJ</i> (Npun_R1723) Region, A/T Klonierung in pGEM-T, Amp ^r	Lehner, 2008
pIM272	2,43 kb <i>amiC2 XhoI</i> Fragment von pIM245 (for.) inkl. 1,1 kb C.K3 Kasette, Cm ^r , Km ^r , Nm ^r in pRL271	Lehner, 2008
pIM273	2,43 kb <i>amiC2 XhoI</i> Fragment von pIM245 (rev.) inkl. 1,1 kb C.K3 Kasette, Km ^r , Nm ^r in pRL271	Lehner, 2008
pIM301	3,97 kb <i>sepJ_N XhoI</i> Fragment von pIM249 (for.) inkl. 1,1 kb C.K3 Kasette, Km ^r , Nm ^r in pRL271	diese Arbeit
pIM302	<i>sepJ_N XhoI</i> Fragment von pIM249 (rev.) inkl. 1,1 kb C.K3 Kasette, Km ^r , Nm ^r in pRL271	diese Arbeit
pIM347	PCR-Fragment von <i>Nostoc punctiforme</i> mit Oligo 549 + 550 <i>amiC2</i> (NpF1846) kloniert in pQE70, Amp ^r , Km ^r	Kroog, 2009
pIM469	<i>tat-amiC2_N</i> (Npun_F1846)-gfp in pSCR202; Amp ^r	Berendt <i>et al.</i> , 2012
pIM474	P _{<i>sepJ</i>} -NpR1723 in pSCR202; Amp ^r	Berendt <i>et al.</i> , 2012

Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion oder MWG-Biotech synthetisiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotide	Sequenzen	Schnittstelle
Oligo 430 <i>amiC</i> for.	5'-CTCGAGGTCCGGCGAGCCAGG-3'	<i>XhoI</i>
Oligo 431 <i>amiC</i> rev.	5'-CTCGAGCTGAGCAATGCCACGACT-3'	<i>XhoI</i>
Oligo 424 <i>sepJ_N</i> for.	5'-CTCGAGGCTAGTTACAGCCATACGACAATC-3'	<i>XhoI</i>
Oligo 425 <i>sepJ_N</i> rev.	5'-CTCGAGGATAAATCGCCGTCTCTACAAGTG-3'	<i>XhoI</i>
Oligo 549 <i>amiC2</i> for.	5'-GCATGCTATCGTCGCCCCGCAATG-3'	<i>SphI/PaeI</i>
Oligo 500 <i>amiC2</i> rev.	5'-GGATCCACGCTGTAAGTATTTTAGGATGCC-3'	<i>BamHI</i>
Oligo 810 <i>amiC1</i> for.	5'-GCATGCCGACACTTGAATCTTGGCG-3'	
Oligo 811 <i>amiC1</i> rev.	5'-ACAAATTGGACGCGTTTGGG-3'	
Oligo 534 <i>murI</i> for.	5'-TAATTGCCACTCCAGCTACG-3'	
Oligo 535 <i>murI</i> rev.	5'-AAGTAGGCTCTTGCCACTTC-3'	
Oligo 494 <i>rnpB</i> for.	5'-TGTTACCAAACGCCTCTAGC-3'	
Oligo 495 <i>rnpB</i> rev.	5'-GATCTGGTAAGGGTGCAAAG-3'	

D.2 Chemikalien und Geräte

Lösungsmittel und Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Roth (Karlsruhe), Merk (Darmstadt), Roche (Boehringer, Mannheim), Bakto, Peqlab und Sartorius (Göttingen). Enzyme für molekularbiologische Arbeiten stammen von den Firmen: NEB Biolabs, Fermentas (St. Leon-Rot) und Roche (Boehringer, Mannheim). Filter wurden von der Firma Millipore verwendet. Geräte und Reaktionsgefäße stammen von den Firmen: Eppendorf, Gilson, Kodak, Satorius, Fisher Scientific, Biorad, Peqlab, Leica, Beckmann, Branson, Hettich, Gibco, Analytik Jena, SensoQuest, Genaxxon und Finnzymes.

D.2.1 Verwendete Kits

Tabelle 5: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
NucleoSpin Extract II	Macharey & Nagel
NucleoBond Xtra Midi/Maxi	Macharey & Nagel
E.Z.N.A Plasmid Miniprep I	Peqlab Biotechnologie GmbH
High pure RNA isolation Kit	Roche
OneStep RT-PCR isolation Kit	Roche
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen
CnBr-activated Sepharose 4B	Amersham
Ni-NTA-Superflow Cartridge	Qiagen

D.2.2 Verwendete Datenbanken und öffentliche Archive

Tabelle 6: Auflistung der Bezeichnungen und Internetadressen der verwendeten Datenbanken

Bezeichnung	Internetadresse
Cyanobase	http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/
GenBank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/index.html
Joint Genome Institute	http://genome.jgi-psf.org/mic_home.html
Meeks Lab Home Page	http://microbiology.ucdavis.edu/meeks/
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
EMBL-EBI	http://www.ebi.ac.uk/

D.2.3 Verwendete Software und öffentliche Programme

Tabelle 7: Auflistung der Bezeichnungen und Internetadressen der verwendeten Software

Bezeichnung	Internetadresse
InterPro (Proteinsequenzanalyse)	http://www.ebi.ac.uk/interpro/
ClustralW (Mehrfachsequenzvergleich)	http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html

ProtParam (Proteinparameter-Berechnung)	http://web.expasy.org/protparam/
SignalP 4.0 (Signalpeptid-Analyse)	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
Clonemanager 9 (Klonierungssimulation)	käuflich erworben
SDS-PAGE-recipe-calculator (PAGE-Rezeptur-Berechnung)	http://www.changbioscience.com/calculator/sdspc.htm
WinASPECT Specord (Photometrische Kalkulationen)	käuflich erworben
Leica LAS AF Deconvoluion (3D-Rekonstruktion)	käuflich erworben
Needle (Zweifach-Sequenzvergleich)	http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/

D.3 Puffer und Reagenzien

MOPS-Puffer	MOPS	500	mM
	NH ₄ Cl	6,0	M
	NaOH	7,4	pH

RNA-Reinigung

TE-Puffer	Tris	10	mM
	EDTA	1,0	mM
	HCl	7,5	pH

PBS-Puffer (phosphatgepufferte Saline)	NaCl	140	mM
	KCl	2,5	mM
	Na ₂ HPO ₄	10	mM
	KH ₂ HPO ₄	2,0	mM
	HCl	7,4	pH

Lysis-Puffer	Guanidinthiocyanat	4,0	M
	DTT	0,1	mM
	Natriumacetat	20	mM
	N-Lauryl-Sarcosin	0,5	%
	β-Mercaptoethanol	10	µl/ml

Proteomanalyse

Denaturierungspuffer	Harnstoff	6,0	M
	Thioharnstoff	2,0	M
	Tris-Puffer (pH 8,0)	10	mM

Material und Methoden

Reduktionspuffer	Dithiothreitol (DTT)	1,0	M
	Ammoniumbikarbonat	50	mM

Alkylierungspuffer	Iodacetamide	550	mM
	Ammoniumbikarbonat	50	mM

AmiC2-6xHis Reinigung aus *E. coli*

NPI-10 Lysispuffer	Natriumdihydrogenphosphat	50	mM
	Natriumchlorid	300	mM
	Imidazol	10	mM
	EDTA	0,5	mM
	PMSF	0,5	mM
	DNase	kl. Spatelspitze	8,0

NPI-20 Waschpuffer	Natriumdihydrogenphosphat	50	mM
	Natriumchlorid	300	mM
	Imidazol	20	mM
		8,0	pH

NPI-250 Elutionspuffer	Natriumdihydrogenphosphat	50	mM
	Natriumchlorid	300	mM
	Imidazol	250	mM
		8,0	pH

Lagerpuffer für Proteine	Tris/HCl (pH 7,4)	20	mM
	KCl	50	mM
	EDTA	0,5	mM
	NaCl	50	mM
	Glycerin	50	%

Antikörperreinigung

Acetatpuffer	NaCl	0,5	M
	Ammoniumacetat	0,1	M
		4,0	pH

Neutralisierungspuffer	NaCl	0,5	M
	Tris	0,1	M
		8,0	pH

Neutralisierungspuffer (für Eluate)	Tris/HCl	1,0	M
		9,5	pH

Elutionspuffer	NaCl	0,15	M
	Glycin	0,2	M
		2,2	pH
Kopplungspuffer	NaCl	0,5	M
	NaHCO ₃	0,1	M
Zymogramm			
Renaturierungspuffer	Dinatriumhydrogenphosphat	60	mM
	Natriumdihydrogenphosphat	40	mM
	Natriumchlorid	0,1	M
	Kaliumchlorid	0,1	M
		7,0	pH
Laufpuffer			
SDS-PAGE-Gel	Tris	25	mM
	Glycin	200	mM
	SDS	0,1	%
Agarose/TAE Puffer	Tris	40	mM
	EDTA	250	mM
	Essigsäure	7,9	pH
Auftragungspuffer			
1x SDS-Proteinauftragungspuffer	Tris/HCl (pH 6,8)	75	mM
	Dithiothreitol (DTT)	100	mM
	SDS	70	mM
	Glycerin	10	%
	Bromphenolblau		Spatelspitze
6x DNA-Auftragungspuffer	Saccharose	40	%
	Bromphenolblau		Spatelspitze
Färbelösungen/Entfärber			
SDS-Gelfärbelösung	Methanol	45	%
	ddH ₂ O	40	%
	Essigsäure	5,0	%
	Serva Blau (G)	1,7	g/l
Entfärber für SDS-Gele	Methanol	40	%
	Essigsäure	10	%
	ddH ₂ O	50	%

Agarosegel-Färbelösung	Ethidiumbromidlösung in ddH ₂ O	2,0	µg/ml
------------------------	--	-----	-------

Immunoblot-Puffer

Anoden/Katoden-Puffer	SDS-Laufpuffer	B.3.7	
	Methanol	10	%

Standards

DNA-Standard	GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas)
GeneRuler™	100b DNA Ladder Plus (Fermentas)
Proteinstandard	Protein Molecular Weight Marker (Fermentas) PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas)

D.4 Kultivierungsmethoden

D.4.1 Medien zur Anzucht von *Anabaena* PCC 7120 und *N. punctiforme* Zellen

BG11-Medium:

BG11 ₀ -Grundmedium (Endkonzentration)	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,3	mM	
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,25	mM	
	Zitronensäure	0,03	mM	
	Ammoniumeisencitrat	0,023	mM	
	K ₂ HPO ₄	0,2	mM	
	Na ₂ CO ₃	0,18	mM	
	Na ₂ -EDTA x 2H ₂ O	2,5	µM	
	Spurenelementlösung (Endkonzentration)	H ₃ BO ₃	46	µM
		MnCl ₂ x 4H ₂ O	9,2	µM
		ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,77	µM
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O		1,6	µM	
CuSO ₄ x 5H ₂ O		0,32	µM	
CoCl ₂ x 6H ₂ O		0,2	µM	

A+A-Medium:

A+A-Grundmedium (Endkonzentration)	MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,0	mM
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,5	mM
	NaCl	4,0	mM
	K ₂ HPO ₄	2,0	mM
Spurenelementlösung (Endkonzentration)	MnCl ₂ x 4H ₂ O	9,24	µM
	MoO ₃	1,25	µM
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,77	µM
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,32	µM

	H ₃ BO ₃	46	μM
	KOH	39	μM
	Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	23	μM
	FeSO ₄ x 7H ₂ O	21	μM
	NH ₄ VO ₃	0,20	μM
	CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,17	μM
A+A + NO ₃ (Allen & Arnon, 1955)	KNO ₃	2,5	mM
A+A + Ammonium (Cohen <i>et al.</i> , 1994)	NH ₄ Cl	2.5	mM
	MOPS	5,0	mM
A+A-Festmedium	A+A-Flüssigmedium		
	Bacto-Agar	1,5	%
	(Difco, Laurence, USA)		

Die Cyanobakterien wurden in BG11-Medium (Rippka *et al.*, 1979) oder in Allen und Arnon, A+A-Medium kultiviert (Allen & Arnon, 1955). Für die Herstellung von A+A-Flüssigmedien wurde jeweils nur ¼ der Menge an Bestandteilen des A+A-Mediums eingesetzt. Die restlichen Bestandteile (KNO₃, NH₄Cl, MOPS) wurden in unveränderter Konzentration hinzugegeben.

D.4.2 Medien zur Anzucht von *E. coli*

LB-Füssigmedium (Miller, 1972)	Pepton	1,0	%
	Hefeextrakt	0,5	%
	NaCl	0,5	%
LB-Festmedium	LB-Flüssigmedium		
	Agar (Roth, Karlsruhe)	1,5	%

D.4.3 Verwendete Antibiotika

Tabelle 8: Verwendete Antibiotika bei Cyanobakterien

Antibiotikum	Endkonzentration:	Endkonzentration:
	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	<i>N. punctiforme</i> ATCC 29133
Neomycin	50 μg/ml	25 μg/ml
Spectinomycin	5 μg/ml	
Streptomycin	5 μg/ml	

Tabelle 9: Verwendete Antibiotika bei *E. coli*

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	20 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml

D.4.4 Anzucht

D.4.4.1 Anzucht von Cyanobakterien

Zur Anzucht von Cyanobakterien dienten Stammkulturen, die unter Dauerlicht auf BG11₀- oder A+A-Platten gewachsen und zur Lagerung dem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt waren. *Nostoc* wurde in BG11- und *Anabaena* in A+A-Medium kultiviert. Zur Anzucht von Arbeitskulturen bis 500 ml wurden die Medien auf eine OD₆₆₅ von 0,2 (Specord 205, Analytik Jena) mit Cyanobakterien beimpft und in Schikanekolben für *Anabaena* PCC 7120 oder ohne Schikane für *N. punctiforme* unter Dauerlicht angezogen. Die Kolben wurden bei 100 rpm und 8 Wm⁻² Weißlicht bei 28°C geschüttelt.

Zur Anzucht von Volumina über 500 ml wurden Anzuchtflaschen verwendet, welche zur optimalen Belüftung mit 2 % CO₂ angereicherter Luft begast wurden. Temperatur und Belichtung wurden wie oben beschrieben verwendet. Diese Flaschen wurden nicht geschüttelt. Mutanten wurden unter gleichen Bedingungen behandelt und mit den genannten Antibiotikakonzentrationen versetzt (Tabelle 8).

D.4.4.2 Anzucht von *E. coli*

Die verwendeten *E. coli* Zellen wurden, wenn nötig, mit den entsprechenden Antibiotika (Tabelle 9) versetzt und in LB-Medium angezogen. Die Zellen wurden im Kulturenraum bei 37°C im Dunkeln bis zur erwünschten Zelldichte kultiviert. Kolben wurden bei 140 rpm geschüttelt und Reagenzgläser im Karussellschüttler zur besseren Belüftung bewegt.

D.4.4.3 Spezielle Kultivierungsmethoden zur Induktion spezifischer Zelldifferenzierung

Akineteninduktion

Für die Induktion von Akineten wurde eine vegetative *N. punctiforme*-Kultur in Phosphat-freies BG11-Medium überführt und anschließend für zwei Wochen ohne Schütteln bei RT mit Tag-Nacht-Rhythmus kultiviert.

Heterozysteninduktion

Für die Induktion von Heterozysten wurden *N. punctiforme*- oder *Anabaena* PCC 7120-Kulturen verwendet, welche zuvor in Medium mit einer gebundenen Stickstoffquelle kultiviert wurden. Zur Einleitung der Heterozysten-Differenzierung wurde der Kultur die Stickstoffquelle durch dreimaliges Waschen (4000 rpm, RT, 10 min.) mit stickstofffreiem BG11₀-Medium entzogen. Anschließend wurden die Zellen bis zum gewünschten Volumen mit Medium aufgefüllt und unter Schütteln oder CO₂-Begasung im Lichtraum inkubiert.

Hormogonieninduktion

Die Induktion der Hormogonien erfolgte durch Überimpfen einer in der stationären Phase befindlichen Kultur in frisches, stickstofffreies Medium. Dabei wurde die Kultur im Verhältnis 1:50 verdünnt und bei Rotlicht (≥ 600 nm) (Rosco-Filter, Bremen) unter Schütteln (50 rpm) im Lichtraum inkubiert. Die Zellen wurden nach 16 - 24 h auf eine erfolgreiche Differenzierung hin mikroskopisch geprüft und anschließend geerntet.

D.5 Molekularbiologische Methoden

D.5.1 Isolierung der Gesamt-DNA aus *N. punctiforme*

Für die Isolation der Gesamt-DNA aus *N. punctiforme* wurden 50 ml einer exponentiell wachsenden Kultur durch Zentrifugation geerntet (6.000 rpm, RT, 3 min.). Das Zellpellet wurde anschließend einmal mit TE-Puffer gewaschen und in 500 μ l TE-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden ca. 150 μ l Glaskugeln (212 - 300 micron, Sigma), 20 μ l SDS und 450 μ l Rotiphenol (Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1) zugegeben und die Zellen in der FastPrep-24 (MP Biomedicals, Heidelberg) aufgeschlossen. Das Zellysate wurde anschließend zentrifugiert (12.000 rpm, 4°C, 10 min.) und die obere

Phase in ein neues Eppendorfgefäß mit 400 µl Rotiphenol überführt und durchmischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (12.000 rpm, 4°C, 10 min.) wurde abermals die obere Phase abgenommen und in ein mit 400 µl Chloroform befülltes Eppendorfgefäß überführt und durchmischt. Nach anschließender Zentrifugation wurde der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß gegeben und der Waschschrift mit Chloroform wiederholt. Die Fällung der DNA erfolgte nach Zugabe von 40 µl Natriumacetat und 1,5 ml 100 % Ethanol bei -80°C für 30 min. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (12.000 rpm, 4°C, 10 min.) wurde das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Im Anschluss an eine Trocknungsphase der DNA unter der Sterilbank wurde die DNA in TE-Puffer eluiert.

D.5.2 Isolierung der Plasmid DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung der Plasmid DNA wurde das Kit „E.N.Z.A. Plasmid Miniprep I“ von Peqlab verwendet. Hierfür wurden 3 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur eingesetzt.

D.5.3 Isolierung der Gesamt-RNA aus *N. punctiforme*

Für die Isolierung der RNA wurden 50 ml Bakterienkultur durch Zentrifugation (6.000 rpm, 4°C, 3 min.) pelletiert, der Überstand verworfen, und das Pellet mit PBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 200 µl PBS-Puffer bzw. 350 µl Lysis Puffer resuspendiert. Nach anschließender Zugabe von 300 µl Phenol wurden die Zellen bei 65°C für 10 min. lysiert; währenddessen wurde das Reagenz jede Minute für 10 s auf einem Vortexer gemischt. Zur Suspension wurde 300 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) pipettiert und zentrifugiert (14.000 rpm, 4°C, 10 min.). Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 500 µl Chloroform versetzt und abermals zentrifugiert (14.000 rpm, 4°C, 10 min.). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß mit 250 µl 100 % Ethanol gegeben. Die weiteren Isolationschritte wurden mit dem RNA IsolationKit (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

D.5.4 Zelldichtebestimmung

Das Wachstum der Bakterien wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte (OD) von 1 ml Kulturprobe gegen das verwendete Medium als Referenz gemessen. Die Messung

erfolgte in einem Spektralphotometer (Specord 205, Analytik Jena) bei einer Wellenlänge von 600 nm für *E. coli* und von 750 nm für Cyanobakterien.

D.5.5 Bestimmung der Chlorophyllmenge bei *N. punctiforme*

(McKinney, 1941)

1 ml *Nostoc*-Zellen wurden zentrifugiert (3 min, 1.200 rpm, RT), das Pellet in 1 ml Methanol aufgenommen und für 30 min. im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension abermals pelletiert und der Überstand bei OD₆₆₅ gegen Methanol gemessen. Bei jeder Messung wurden Dreifachwerte gewonnen und daraus der Mittelwert gebildet.

Berechnung der Chlorophyllmenge:

$$\frac{\text{OD} \times (\text{V}_{\text{Probe}} + \text{V}_{\text{MetOH}})}{74,5 \times \text{V}_{\text{Probe}}} = \text{mg Chlorophyll/ml Kultur}$$

75 - 100 µg Chlorophyll a/ml entsprechen 0,75 - 1,0 x 10⁸ Zellen/ml (Meeks Lab Homepage)

D.5.6 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente mit unterschiedlicher Größe wurden mittels horizontaler Gelelektrophorese in Agarosegelen in TAE-Puffer bei 80 - 100 V aufgetrennt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 6-fach DNA-Probenpuffer versetzt. Als Größenstandards dienten der Marker „GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder“. Analytische Gele wurden für wenige Minuten in Ethidiumbromidlösung gefärbt, ca. 10 min. in Wasser entfärbt und unter UV-Licht fotografiert.

D.5.7 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA bzw. RNA

Die Bestimmung der Konzentration von DNA-Lösungen erfolgte durch Messung der Extinktion bei 260 nm. Dabei entspricht eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 50 ng/µl dsDNA (DNA-Konzentration = Extinktion 260 nm × 50 × Verdünnungsfaktor). Bei Verwendung der Mikroliter-Messzelle wurden 3 µl DNA-Lösung eingesetzt (DNA-Konzentration = Extinktion 260 nm × 50 × Verdünnungsfaktor × 10). Durch

gleichzeitige Messung der Extinktion bei 280 nm wurde die Reinheit der isolierten DNA im Specord mit der dazugehörigen Software WinASPECT bestimmt. Der Quotient beider Extinktionen beträgt für reine DNA bzw. RNA 1,8.

D.5.8 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für einen analytischen Ansatz wurden 0,1 µg DNA eingesetzt und in einem Gesamtvolumen von 10 µl geschnitten. Dabei setzte sich der Restriktionsansatz aus der DNA-Lösung, 1 µl 10-fach Restriktionspuffer, ddH₂O (steril), sowie Enzymlösung zusammen. Für einen präparativen Ansatz wurden 1 - 3 µg DNA in einem größeren Volumen eingesetzt. Enzyme und entsprechende Restriktionspuffer wurden von den Firmen Roche (Mannheim), Fermentas (St. Leon-Rot) und NEB (Frankfurt a.M.) bezogen. Die Inkubation erfolgte nach dem vom Hersteller empfohlenen Angaben. Der gesamte Ansatz wurde mit Ladepuffer versetzt und auf einem 1 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

D.5.9 Ligation von DNA-Fragmenten

(Weiss *et al.*, 1968)

Bei der Ligation katalysiert die T4 DNA-Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphatenden und 3'-Hydroxyenden von DNA-Molekülen. Das zu klonierende DNA-Fragment wurde im Vergleich zum Vektor in einem fünffach molaren Überschuss eingesetzt. Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit kompatiblen, überstehenden Enden wurde der Ligationsansatz mit 10-fach DNA-Ligasepuffer sowie 4 U T4 DNA-Ligase (Fermentas) versetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 22°C.

D.5.10 Herstellung von Insertionsmutanten in *Nostoc punctiforme*

Um Aussagen über die Funktion verschiedener Gene treffen zu können, wurden Insertionsmutanten erzeugt. Dabei wurde durch doppelt homologe Rekombination eine Resistenzkassette (Elhai & Wolk, 1988) in das Gen integriert und somit das Leseraster unterbrochen, folglich die Funktion des Gens inaktiviert. Die Resistenzkassette C.K3 codiert unter Kontrolle eines starken *psbA*-Promotors die Neomycinphosphotransferase und vermittelt hiermit eine Neomycinresistenz. Unter Zuhilfenahme des *sacB* Gens aus

Bacillus subtilis, welches für die Levansucrase codiert (Cai & Wolk, 1990) und sich auf den Konjugationsvektoren pIM273 und pIM302 (Abb. 7) befindet, konnte auf doppelte homologe Rekombination der Resistenzkassette selektioniert werden.

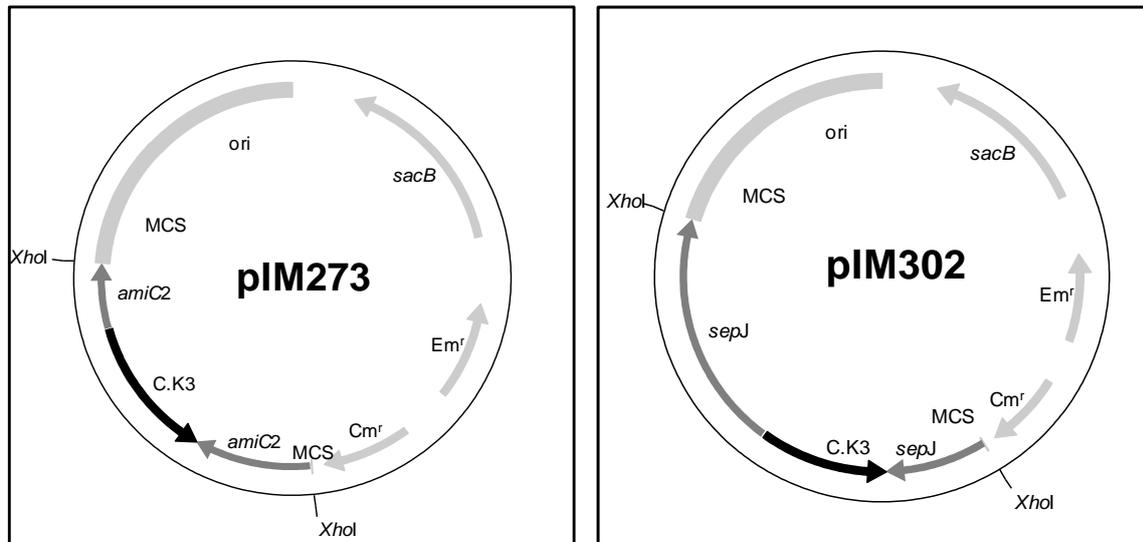


Abb. 7: Schematische Darstellung der Konjugationsvektoren pIM273 und pIM302.

Durch Integration von *amiC2* bzw. *sepJ_N* mit revers orientierter C.K3 Kassette über zwei *XhoI* Restriktionsschnittstellen in den Konjugationsvektor pRL271 resultierten die Konjugationsplasmide pIM273 bzw. pIM302. Die Plasmide pIM272 (*amiC2*) und pIM301 (*sepJ_N*) sind Konstrukte mit jeweils vorwärts orientierter Resistenzkassette C.K3 (nicht gezeigt). Die Konjugationsvektoren pIM273 und pIM302 wurden während meiner Diplomarbeit angefertigt und deren Konstruktion dort genau beschrieben (Lehner, 2008).

Levansucrase wandelt Saccharose in das für Gram-negative Bakterien toxische Levan um und verhindert somit das Wachstum von einfach rekombinierten Exkonjuganten auf den Selektionsplatten mit 5 % Saccharose.

D.5.10.1 Triparentale Konjugation

(Cohen *et al.*, 1994)

Für die triparentale Konjugation wurden exponentiell wachsende *Nostoc* Zellen durch Ultraschall homogenisiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet auf 75 - 100 µg Chl a/ml (~ 0,75 - 1.0 x 10⁸ Zellen/ml) konzentriert. Jeweils 50 ml LB-Medium wurde mit einer Übernachtskultur des Donor-Stamms *E. coli* DH5α mit dem jeweiligen Konjugationsvektoren pIM273 und pIM302 (Abb. 7) bzw. mit einer Übernachtskultur des Mobilisierungsstamms *E. coli* HB101 (pRK2013 + pRL528) in einem

Schikanekolben und den entsprechenden Antibiotika auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft. Nach Erreichen einer OD_{600} von ca. 0,8 bei 37°C im Wasserbadschüttler wurden die beiden Stämme vereint und durch Waschen mit LB-Medium die Antibiotika aus der *E. coli*-Suspension entfernt. Die *E. coli*-Lösung wurde auf eine OD_{600} von 9 - 10 eingestellt. In einem Eppendorfgesäß wurden 0,5 ml der *E. coli*-Suspension und 0,5 ml des *Nostoc*-Konzentrats gemischt, zentrifugiert (6.000 rpm, RT, 30 s) und 800 μl des Überstands verworfen. Das Pellet wurde im restlichen Überstand wieder gelöst und zusammen mittels Glasperlen auf Agarplatten ((A+A/4) + 5,0 mM MOPS + 2,5 mM NH_4Cl + 0,5 % LB), die zuvor mit Milipore-Filter belegt wurden, gleichmäßig verteilt. Durch die Filter ist es möglich, die ausplattierten Bakterienkulturen auf neue Platten zu transferieren. Nach Entfernen der Glasperlen wurden die Agarplatten für die Konjugationspaarung bei Schwachlicht inkubiert (28°C , $1,5 \text{ Wm}^{-2}$, 24 h). Anschließend wurden die Filter auf Selektionsplatten (25 $\mu\text{g/ml}$ Nm) überführt und nach vier Tagen stärkerem Licht (8 Wm^{-2}) ausgesetzt. Alle sieben Tage wurden die Filter auf frische Selektionsplatten überführt und vier Wochen später Flüssigmedium mit Exkonjuganten beimpft. Um eine erfolgreiche Transformation durch Konjugation zu gewährleisten, wurden mindestens 20 Platten pro auszuschaltendes Gen eingesetzt.

D.5.11 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden die *E. coli* Stämme DH5 α und M15 verwendet. Hierfür wurden 1 l LB-Medium mit 5 ml Übernachtskultur der genannten *E. coli* Stämme beimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD_{600} von 0,5 - 0,7 angezogen. Zum Abstoppen der Verdopplungsphase wurden die Zellen für 10 min. auf Eis abgekühlt und durch Zentrifugation (4.000 rpm, 4°C , 10 min.) geerntet. Um Salze und andere Bestandteile des Mediums zu entfernen, die später bei der Elektroporation stören könnten, wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem ddH $_2\text{O}$ gewaschen und nach Zentrifugation (4.000 rpm, 4°C , 20 min.) in 40 ml eiskaltem 10 % Glycerin gelöst. Nach abermaligem Zentrifugieren wurden die Zellen in 15 % Glycerin aufgenommen. Die so gelösten Zellen wurden zu 40 μl Portionen in vorgekühlten (-80°C) Eppendorfgesäßen bei -80°C gelagert.

D.5.11.1 Transformation von elektrokompetenten *E. coli* Zellen

Für die Transformation wurden 1 µl DNA mit einer Konzentration von ca. 50 ng/µl im Reaktionsgefäß mit den kompetenten Zellen gemischt und zusammen in eine vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette pipettiert. Das Gemisch wurde anschließend im Genepulser bei 2,5 kV, 25 µF, 200 Ohm geschockt. Die Zeitkonstante des Genepulser sollte ca. 5 ms betragen haben. Unmittelbar darauf wurden 1 ml LB-Medium zugegeben und die Zellen in Kulturröhrchen für 1 h bei 37° geschüttelt. Nach Zentrifugieren (30 s, 6.000 rpm) wurde 800 µl Überstand verworfen und das Pellet im restlichen Überstand resuspendiert. Dieser wurde auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

D.5.12 Polymerase Kettenreaktion

D.5.12.1 Amplifikation von DNA

Für die Amplifikation von DNA-Abschnitten wurde der PCR „RedMastermix“ (Genaxxon) oder der Phusion High-Fidelity PCR MasterMix (Finnzymes, Finnland) verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen im Labcycler (SensoQuest, Göttingen) durchgeführt. Für den PCR-Ansatz wurden folgende Komponenten verwendet:

Tabelle 10: Pipettierschema für einen 20 µl PCR-Reaktionsansatz von Finnzymes

Komponenten	20 µl Reaktionsansatz	Endkonzentration
2x Phusion Flash PCR MasterMix	10 µl	1x
Oligo A	x µl	0,5 µM
Oligo B	x µl	0,5 µM
Matrix-DNA	x µl	100 ng
ddH ₂ O	ad 20 µl	

Tabelle 11: Pipettierschema für einen 20 µl PCR-Reaktionsansatz von Genaxxon

Komponenten	20 µl Reaktionsansatz	Endkonzentration
2x RedMastermix	10 µl	1x
Oligo A	x µl	1,0 µM
Oligo B	x µl	1,0 µM

Matrix-DNA	x μ l	100 ng
ddH ₂ O	ad 20 μ l	

Für die Durchführung wurden folgende Programme verwendet:

Tabelle 12: PCR Einstellungen unter Verwendung des Genaxxon PCR-Kits

Zyklus	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94°C	5 min.	
Denaturierung	94°C	1 min.	29
Hybridisierung	definierte Temp.	1 min.	29
Synthese	72°C	1 min./1 kb	29
Endsynthese	72°C	10 min.	
Stop	4°C	∞	

Tabelle 13: PCR Einstellungen unter Verwendung des Finnzymes PCR-Kits

Zyklus	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	98°C	10 s	
Denaturierung	98°C	1 s	29
Hybridisierung	definierte Temp.	5 s	29
Synthese	72°C	15 s/1 kb	29
Endsynthese	72°C	1 min.	
Stop	4°C	∞	

D.5.12.2 Relative RNA-Bestimmung mittels RT-PCR

Zur Untersuchung der Expression spezifischer Gene wurde eine Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) unter Verwendung des OneStep RT-PCR Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Im ersten Schritt der PCR wurde durch die Reverse Transkriptase die eingesetzte RNA (60 ng) in cDNA umgeschrieben. Im zweiten Schritt wurde die Transkriptase durch Hitze inaktiviert und es folgte eine Standard-PCR mit der Fusion Flash II DNA Polymerase.

Tabelle 14: PCR Einstellungen unter Verwendung des OneStep RT-PCR Kits

Zyklus	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
RT-Reaktion	50°C	30 min.	
Inaktivierung der rev. Transkriptase	95°C	5 min.	
Denaturierung	95°C	1 min.	29
Hybridisierung	definierte Temp.	1 min.	29
Synthese	72°C	1 min./1 kb	29
Endsynthese	72°C	10 min.	
Stop	4°C	∞	

D.5.13 Mureinpräparation für transmissionselektronenmikroskopische Zwecke (de Pedro *et al.*, 1997)

Alle verwendeten Lösungen, welche für die Präparationen benötigt wurden, sind vor Benutzung filtriert (Millipore, 0,45 µm PVDF-Membran) worden, um Partikel, welche bei der Mikroskopie stören könnten, zu entfernen.

Eine in 50 ml exponentiell wachsende Bakterienkultur wurde zentrifugiert (4.000 rpm, 4°C, 10 min.) und das Pellet in eiskalten 3 ml PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf zwei 1,5 ml Schraubverschluss-Eppendorfgefäße verteilt, und die Zellen mittels ca. 100 µl Glaskugeln (212 - 300 micron, Sigma) im „FastPrep-24“ aufgeschlossen. Hierfür wurden die Zellen dreimal bei maximaler Geschwindigkeit (6,5 m/s) für 20 s homogenisiert. Lichtmikroskopisch wurde der Zellaufschluss überprüft, welcher zum Teil zerborstene Zellen als auch Filamentlängen von ca. 4 - 8 Zellen zeigte. Die aufgeschlossenen Zellen wurden langsam (2 Tropfen/s) in fast kochendes SDS getropft. Hierfür wurden 100 ml Wasser in einem 500 ml Glasmessbecher auf einem Heizrührer zum Sieden gebracht. In dieses Wasser wurde eine 25 ml Schottflasche, gefüllt mit 6 ml 6 % SDS und einem kleinen Rührfisch, gestellt. Nach Erhitzen der SDS-Lösung auf ca. 95°C wurde die Sacculisuspension unter ständigem Rühren zugetropft, und die Lösung anschließend für 4 h gekocht. Nach Schütteln über Nacht bei 37°C wurde die Zellsuspension abermals für 1 h gekocht und anschließend auf RT abgekühlt. Die so erkaltete Lösung wurde in 10 ml Polykarbonat-Zentrifugationsröhrchen überführt und in der Ultrazentrifuge (Beckman) im 75 Ti Festwinkelrotor pelletiert (60.000 rpm, 25°C, 45 min.). Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet in 0,5 ml filtriertem ddH₂O vorsichtig gelöst. Die Suspension wurde auf 2 ml ddH₂O aufgefüllt und

1 ml 6 % SDS zugegeben. Danach wurde die Suspension in eine Schottflasche pipettiert und abermals für 2 h im Wasserbad unter ständigem Rühren gekocht. Anschließend erfolgte das wie oben beschriebene Pelletieren und Lösen der Mureinsäcke in 0,5 ml filtriertem ddH₂O. Nach Zugabe von 1,5 ml ddH₂O und 0,2 ml 6 % SDS wurde die Suspension für weitere 2 h gekocht und anschließend wieder pelletiert. Das Pellet wurde nun in 1,5 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) gelöst und mit 200 µg/ml dreifach kristallinem α-Chymotrypsin unter ständigem Rühren bei 37°C über Nacht verdaut. Nach Zugabe von 0,5 ml ddH₂O und 0,75 ml 6 % SDS erfolgte ein erneutes 2 - 3 stündiges Kochen. Die Mureinsäcke waren nun frei von störenden Zellfragmenten. Nach Auswaschen des SDS wurden die Mureinsäcke in 100 µl ddH₂O gelöst und bis zum Gebrauch im Kühlschrank gelagert.

D.6 Mikroskopie

D.6.1 Negativkontrastierung und TEM von gereinigten Mureinsäcken

Da jegliche Partikel bei der TEM-Analyse stören, mussten die verwendeten wässrigen Lösungen zuvor durch Zentrifugation (10.000 rpm, RT, 1 min.) oder Filtration (Millipore, 0,45 µm PVDF-Membran) von diesen befreit werden.

Wie in Abbildung 8 gezeigt, wurde auf einen Parafilmstreifen der Länge von ca. 15 cm ein Tropfen (20 µl) Sacculisuspension, vier Tropfen ddH₂O (jeweils 50 µl) und ein Tropfen 1 % Uranylacetat (50 µl) aufgetropft. Die kohlebedampften Kupfernetze mit einer Maschenbreite von 200 µm, welche zuvor in der Edwards-Anlage beglimmt, d.h. elektrostatisch aufgeladen wurden (Ladung hält bis zu 1 h), wurden nun für 1 min. mit der glänzenden, kohlebedampften Seite auf die Sacculisuspension gelegt und anschließend zum Entfernen ungebundener Mureinsäcke viermal in ddH₂O gewaschen. Hierfür wurde der Wassertropfen auf dem Parafilm mit dem Netz nur kurz berührt und anschließend auf den nächsten Tropfen gegeben. Nach viermaligem Waschen wurde das überschüssige Wasser am Rand des Netzes vorsichtig mit einem Filterpapier abgesaugt. Anschließend wurde das Netz für eine weitere Minute auf den Tropfen des 1 % Uranylacetats (Kontrastmittel) gelegt. Darauf folgend wurde nahezu vollständig das überschüssige Uranylacetat mittels Filterpapier abgesaugt, und das Netz an der Luft getrocknet. Danach schloss sich eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Proben an.

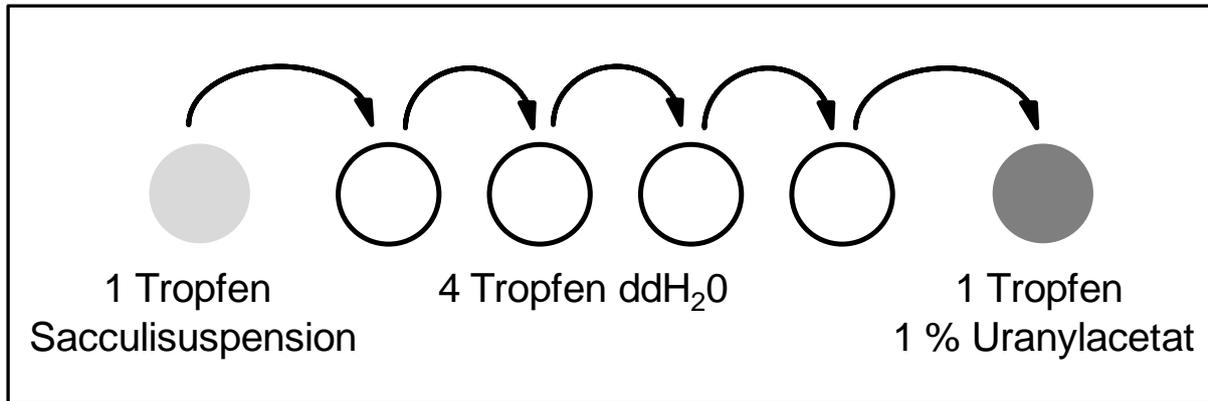


Abb. 8: Kontrastierungsschema auf Parafilm für die Mureinsäcke.

Hier ist exemplarisch die Kontrastierung, beginnend bei der Aufnahme der gereinigten Sacculi auf den Kupfergrid, über die vier Waschschrte mit ddH₂O und die anschließende Kontrastierung mit 1 % Uranylacetat, von links nach rechts mit Pfeilen dargestellt.

D.6.2 Kontrastierung und Probeneinbettung für Ultradünnschnitte

Für die Anfertigung von ultradünnen Schnittpräparaten wurden im Vorfeld 1,5 - 2 ml Zellkultur mit Glutaraldehyd (Endkonzentration 2,5 %) für 10 min. bei RT fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit 5 mM HEPES (pH 8,0) wurden die Proben mit 2 % Kaliumpermanganatlösung über Nacht bei 4°C nachfixiert, was ebenfalls zur besseren Kontrastierung der Glycolipidschicht in Heterozysten führte. Anschließend wurden die Präparate 8-mal mit ddH₂O gewaschen und in 2 % Sea Kem Agarose (FMC Bioproducts, USA) eingebettet. Die so entstandenen Agar-Blöckchen wurden in kleine Würfel mit einer Kantenlänge von 1 - 2 mm geschnitten. Für die Harzeinbettung mussten die Präparate zuvor schrittweise in Ethanol-Lösungen mit steigender Alkoholkonzentration entwässert werden. Dafür wurden sie für zweimal 10 min. in 70 %, 80 %, 90 %, 95 % Ethanol bzw. dreimal 20 min. in 100 % Ethanol unter ständiger Bewegung inkubiert. Für eine vollständige Infiltration des Eponharzes in die Proben, wurden diese erst 15 min. mit Propylenoxid vorbehandelt und schließlich schrittweise Eponharz in steigender Konzentration zugegeben. Die erste Infiltration der Proben mit Harz erfolgte in einem 1:2 Gemisch aus Propylenoxid und Epon für 30 min., gefolgt von einem 1:3 Gemisch für 90 min. bei RT. Zum Einbetten wurden die Agarblöckchen schließlich in spezielle Förmchen gegeben und mit reinem Epon überschichtet.

D.6.3 Herstellung von Ultradünnschnitten für TEM-Analysen

Ultradünnschnitte (60 - 90 nm) wurden mit dem Leica EM UC6 angefertigt und auf Kupfergrids mit Pioloformfolie übertragen. Die Proben wurden durch Inkubation der Grids für 17 min. in Uranylacetat (2 %), gefolgt von 5 min. in Bleicitrat (1 %) kontrastiert.

D.6.4 Mikroskope

D.6.4.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Analyse der Ultradünnschnitte und der Sacculipräparationen erfolgte am TEM-Philips Tecnai10 bei 80 kHz und einer Belichtungszeit von 1,5 - 2 s. Die Bilder wurden analog durch die Belichtung eines Mittelformatfilms erstellt und anschließend mit Hilfe eines Durchlicht-Scanners digitalisiert.

D.6.4.2 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit dem Leica DM 5500B Mikroskop mit angeschlossener Leica DFC420C Farbkamera bzw. Leica DFC360 FX Monochromkamera aufgenommen. Dreidimensionale Fluoreszenzbilder wurden mittels einer Software (Deconvolution Software, Leica) erstellt. Hierfür wurden ca. 60 Bilder des Präparats durch die Z-Ebene aufgenommen. Die Software kalkulierte die durch Streustrahlung bedingte Unschärfe heraus und errechnete den eigentlichen Strahlungsursprung im Präparat. Daraus entstanden Bilder bzw. Filme mit dreidimensionaler Tiefenschärfe, welche um ihre eigene Achse rotieren konnten.

D.6.5 Färbungen von Bakterien

D.6.5.1 Färbung der äußeren Membran

Die äußere Membran wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green 488-X gefärbt. Hierfür wurden 500 µl einer exponentiell wachsenden Bakterienkultur mit Ultraschall homogenisiert, anschließend dreimal mit Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,8) gewaschen und

30 min. mit Oregon Green 488-X (2,5 mg/ml in H₂O). gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch dreimaliges Waschen mit Phosphatpuffer entfernt, um die Färbung fluoreszenzmikroskopisch mit dem GFP-Filter nachzuweisen.

D.6.5.2 Färbung des Peptidoglycans

Für die *in vivo*-Färbung des Peptidoglycans wurden 100 µl einer exponentiell wachsenden Cyanobakterienkultur mit Van-FL (BODIPY® FL Conjugate) (1 µg/ml) für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Überschüssiger, ungebundener Farbstoff wurde durch mehrmaliges Waschen mit frischem BG11-Medium entfernt. Für die Detektion des Fluoreszenzsignals wurde der GFP-Filter verwendet.

D.6.5.3 Färbung der Cytoplasmamembran

Die Cytoplasmamembran wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fm1-43 (Schneider *et al.*, 2007) gefärbt. Hierfür wurden 500 µl einer exponentiell wachsenden Bakterienkultur dreimal mit frischem BGII-Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit FM1-43 (5 µg/ml, Invitrogen, Molecular Probes) für 20 min. bei 30°C im Dunkeln inkubiert, ungebundener Farbstoff durch dreimaliges Waschen mit frischem BG11-Medium entfernt, und die Proben unter Verwendung des GFP-Filters mikroskopiert.

D.6.5.4 Färben mit Alcianblau

Durch Alcianblau lassen sich Polysaccharide anfärben, die sich zum einen in der äußeren Schutzhülle der Heterozysten befinden zum anderen in den nach außen sekretierten Mukus. Für die Färbung wurde 1 ml Bakterienkultur verwendet, die mit 2 µl Alcianblau (1,5 % (w/v) in H₂O) für 5 min. inkubiert wurde. Die Färbung wurde lichtmikroskopisch dokumentiert.

D.6.5.5 Gram-Färbung

Mit der Methode der Gram-Färbung ist es schnell möglich, durch Anfärben des Peptidoglycans Gram-positive Bakterien von Gram-negativen zu unterscheiden (Gram-

Färbekit von Roth, Karlsruhe). Die Färbung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

D.6.6 FRAP-Analyse

Die Abkürzung FRAP steht für „*Fluorescence recovering after photo bleaching*“. Mit dieser Technik in Verbindung mit spezifischen Fluoreszenzmarkern kann mikroskopisch zeitgleich verfolgt werden, ob Stoffe innerhalb eines Zellverbundes ausgetauscht bzw. transportiert werden.

Hierfür wurden 500 µl einer exponentiell wachsenden *N. punctiforme* WT Kultur bzw. einer *amiC2*-Mutanten Kultur geerntet und zweimal mit frischem BG11-Medium gewaschen. Die Färbung erfolgte mit 20 µl nicht-fluoreszierendem Calcein-AM Derivat (1 mg/ml in DMSO; Invitrogen, Molecular Probes) für 90 min. bei 30°C im Dunkeln. Über Zellwanddiffusion wurde das Calcein ins Cytoplasma aufgenommen, wo es durch eine zellinterne Veresterungsreaktion fluoreszent wurde. Hierbei kam es zu Konformationsänderungen, resultierend in einen hydrophilen Farbstoff, welcher nicht aus der Zelle diffundieren konnte. Anschließend wurde der Ansatz abermals dreimal mit frischem Medium gewaschen, um überschüssigen, nicht ins Cytoplasma aufgenommenen Farbstoff zu entfernen. Vor der mikroskopischen Untersuchung der Zellen hinsichtlich ihrer Transporteigenschaften wurden sie erneut 90 min. bei 30°C im Dunkeln inkubiert. Für die Mikroskopie wurden Agarose-überschichtete Objektträger (á 500 µl 2 % Agarose in H₂O) verwendet. Die Analyse wurde mit einem Zeiss LSM 710 konfokalen Mikroskop mit einem 63 x 1,4 NA Öl-Immersion-Objektiv durchgeführt. Zum Schutz vor vorzeitigem Ausbleichen des Farbstoffs der Zellen wurde mit einer 50 µl Lochblende gearbeitet. Die Autofluoreszenz (Anregung: 488 nm; Emission: 665 - 710 nm) sowie die Calcein-AM-Fluoreszenz (Anregung: 488 nm; Emission: 505 - 550 nm) wurden gleichzeitig aufgenommen. Für das Ausbleichen des Fluorophors in einer vorher definierten Zelle und dessen Verlauf bis hin zur vollständigen Erholung beziehungsweise Rückgewinnung der Fluoreszenz wurden folgende Parameter verwendet: Laser-Intensität: 0,3 %, *frame*-Größe: 36 x 60 Pixel, Pixel-Größe: 0,45 x 0,45 µm, Expositionszeit: 22,5 µs, *averaging*: 2x *line average*. Für das Ausbleichen der gewünschten Region wurden folgende Parameter verwendet: Laser-Intensität: 100 %, ROI: 0,9 x 0,9 µm, Pixel-Größe: 0,45 x 0,45 µm, Expositionszeit: 22,5 µs, *averaging*: keine, 300 Iterationen. Die

Verarbeitung und Quantifizierung der Bilder wurde entsprechend Fuger *et al.* durchgeführt (Fuger *et al.*, 2007).

D.6.7 Bestimmung der Größenverhältnisse zwischen *amiC2*-Mutante und WT

Hierfür wurden jeweils 30 licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen des WTs und der *amiC2*-Mutante auf Papier gedruckt, ausgeschnitten und anschließend gewogen. Der Gewichtsunterschied zwischen WT und Mutante wurde zur Berechnung der Größenverhältnisse verwendet.

D.7 Protein-Biochemische Methoden

D.7.1 Überexpression und Reinigung von AmiC2 aus *N. punctiforme* ATCC 29133

D.7.1.1 Konstruktion eines rekombinanten C-terminal-fusionierten AmiC2-6xHis-Tag Proteins

Die Konstruktion des *amiC2*-Expressionsplasmids pIM347 wurde von Markus Kroog angefertigt und ist in dessen schriftlicher Zulassungsarbeit nachzulesen (Kroog, 2009). Der Ausgangsvektor war der Expressionsvektor pQE-70 mit C-terminalem 6xHis-Tag. In diesen wurde ein *amiC2*-Fragment über die Restriktionsschnittstellen *SphI* und *BamHI* integriert. Signalsequenz und Stop-Codon wurden entfernt und durch ein nach dem His-Tag lokalisiertem Stop-Codon ersetzt (Abb. 9). Das *amiC2*-Fragment ist unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren T5-Promotors.

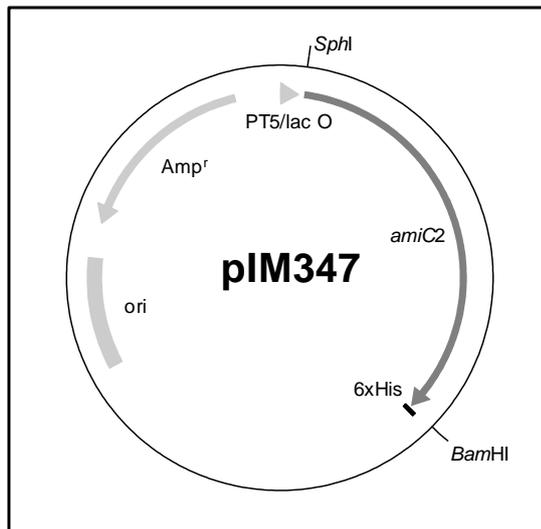


Abb. 9: Schematische Darstellung von pIM347.

Über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Sph*I wurde *amiC2* in das Expressionsplasmid pQE-70 mit C-terminalem 6xHis-Tag (6xHis) integriert. Amp^r, β -Lactamase; ori, *open reading frame*; PT5, T5-Promotor; lac O, Lac-Operator.

D.7.1.2 Überexpression von AmiC2 in *E. coli*

Für die Überexpression wurden 500 ml LB-Medium mit Amp (50 μ g/ml) im Schikanekolben versetzt, mit 1 ml der Übernachtskultur des AmiC2-Überexpressionsstammes beimpft und bei 37°C unter Schütteln auf eine OD₆₀₀ von 0,8 angezogen. Danach wurde zur Aktivierung von Chaperonen die Kultur für 15 min. auf 30°C abgekühlt und durch Zugabe von 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) die Expression gestartet. Die Kultur wurde unter Schütteln bei 30°C für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (4.000 rpm, 4°C, 10 min.) und für die Reinigung (D.7.2) aufgeschlossen.

D.7.1.3 Affinitätsreinigung von 6xHis-gekoppelten Proteinen

Zur Reinigung von 6xHis-gekoppeltem AmiC2 wurde die 5 ml Säule „Ni-NTA-Superflow Cartridge“ (Qiagen) verwendet. Die Reinigung erfolgte wie im „Ni-NTA Superflow Cartridge Handbook“, Qiagen, Seite 21 beschrieben.

D.7.2 Zellaufschluss und Präparation von Ganzzellextrakten

Alle Schritte zur Gewinnung von Zellextrakten wurden bei 4°C durchgeführt. 100 ml einer exponentiell wachsenden *E. coli*- oder Cyanobakterienkultur wurden durch Zentrifugation (4.000 rpm, 4°C, 10 min.) geerntet. Das Zellpellet wurde anschließend in 10 ml Lysispuffer

gelöst und mittels Frenchpress (1.000 psi) homogenisiert. Es wurden zwei Wiederholungen des Aufschlusses durchgeführt.

D.7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Der Coomassie-Brilliant-Blue Farbstoff des Bradfordreagenz bindet dabei an ein Protein und überführt es von dem kationischen in den anionischen Zustand. Die Absorptionsänderung wird bei 595 nm gemessen und ist proportional zur Proteinkonzentration. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer parallel mitgeführten Kalibriergerade mit BSA (0,1 - 1,5 mg/ml) ermittelt.

Die Gesamtproteinkonzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{OD}_{595} \times 16,68}{\text{Probe in } \mu\text{l}} = \mu\text{g Protein}/\mu\text{l}$$

D.7.4 *In vitro* Aktivitätstests im Zymogramm

Das Zymogramm ist eine Methode, um die enzymatische Zellwandhydrolaseaktivität von Proteinen nachzuweisen. Basierend auf Zhu *et al.* (Zhu *et al.*, 2001) wurden 25 ml einer *E. coli* Übernachtskultur durch Zentrifugation pelletiert (10.000 rpm, RT, 1 min.), in 1 ml H₂O resuspendiert und für 20 min. bei 90°C denaturiert. Die Zellsuspension wurde anschließend abermals pelletiert, und das Pellet in 1 ml H₂O gelöst. Anschließend wurde ein 12 % SDS-Gel gegossen, in dessen Trenngel 1 ml denaturierte *E. coli* Suspension als Substrat eingegossen wurde. Das Gel wurde mit 5 µg BSA als Negativkontrolle, 5 µg Lysozym als Positivkontrolle und 10 µg gereinigtem AmiC2-6xHis-Protein, gelöst in 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), beladen. Der dafür verwendete Proteinauftragspuffer enthielt kein DTT. Nach dem Lauf bei 100 V wurde das Gel mehrmals mit ddH₂O gewaschen, um das SDS zu entfernen. Anschließend wurden durch Inkubation des Gels im Renaturierungspuffer bei 37°C bis zu vier Tagen die Proteine zurückgefaltet. Danach wurde das Gel mit 0,1 % Methylenblau gefärbt. Nach Auswaschen des überschüssigen Farbstoffs mit ddH₂O wurde die Aktivität durch klare ungefärbte Banden auf der zu erwarteten Höhe sichtbar.

D.7.5 Immunoblot-Analyse

Nach Auftrennung der Proben über ein 12 % SDS-PAGE-Gel wurden die Proteine für die Immunoblot-Analyse auf eine PVDF-Membran mittels „semi-dry“ Elektroblothing transferiert. Nach Absättigung der geblotteten Membran wurde diese mit dem ersten Antikörper (Verdünnung 1:2.000) über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper (Verdünnung 1:10.000; anti-rabbit, IgG Peroxidase (POD) (Sigma-Aldrich, Deutschland) versetzt und mit dem LumiLight Detektionssystem (Roche Diagnostics, Mannheim) visualisiert.

D.7.6 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden die Glycolipide nach der Methode von Winkenbach *et al.* extrahiert (Winkenbach *et al.*, 1972). Hierfür wurden 50 ml einer *Nostoc*- bzw. Mutanten-Kultur zum einen unter Stickstoffmangel und zum andern mit einer Stickstoffquelle (NH₄Cl) kultiviert. Anschließend wurden die Lipide durch ein Methanol-Chloroform-Gemisch (1:1) extrahiert und durch Verdunstung angereichert. Die Extrakte wurden in 200 µl Chloroform gelöst und 50 µl davon auf eine Dünnschicht-Silica-Platte (Merk, Deutschland) aufgetragen. In der mobilen Phase aus Chloroform-Methanol-Essigsäure-Wasser (85:15:10:3,7) wurden die Lipide aufgetrennt. Durch Erhitzen der mit 25 % H₂SO₄ besprühten Silica-Patte auf 220°C für 1 - 2 min. wurden die Lipide sichtbar.

D.7.7 Affinitätsreinigung von AmiC2-Antikörpern über CNBr-aktivierte Sepharose

Antikörper können nachgereinigt werden, so dass ihre unspezifische Affinität reduziert wird. Hierfür wurden 5 mg (1,5 mg/ml) rekombinantes AmiC2-6xHis-Protein gegen den Kopplungspuffer über Nacht bei 4°C dialysiert. Danach wurden 0,5 g Sepharose (CNBr-aktivierte Sepharose 4B, Amersham) in 1 mM HCl aufgenommen und in einer Filternutsche mit mind. 100 ml 1 mM HCl gewaschen. Die so gespülte Sepharose wurde in ein 15 ml Plastikröhrchen (Greiner) überführt, zentrifugiert (40 rpm, RT, 5 min.) und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 2,5 ml Kopplungspuffer wurde das dialysierte Protein zur Sepharose gegeben, für 2 h bei RT auf einem Taumelrollschüttler inkubiert und anschließend bei 4°C über Nacht weiter inkubiert. Anschließend wurde dieses

Immunkonjugat einmal mit Kopplungspuffer und einmal mit 1 M Ethanolamin (pH 8,0) gewaschen. Um verbliebene aktive Gruppen zu blockieren, wurde das Immunkonjugat mit 1 M Ethanolamin (pH 8,0) bei RT für zwei weitere Stunden auf dem Taumelrollschüttler inkubiert und anschließend je dreimal im Wechsel mit jeweils dem 5-fachen Säulenmatrixvolumen an Acetatpuffer und Neutralisierungspuffer gewaschen. Das Immunkonjugat wurde in PBS equilibriert und 4 ml des Antiserums zugegeben. Nach Inkubation für 2 - 3 h auf einem Taumelrollschüttler wurde zentrifugiert (40 rpm, RT, 5 min.) und der Überstand entfernt. Das Sepharose-Antikörper-Gemisch wurde auf eine leere Säule gegeben und 10-mal mit 10 ml 1x PBS gewaschen, um unspezifische Antikörper loszuwerden. Die Antikörper wurden mit dem 5-fachen Matrixvolumen (2 ml Matrixvolumen) an Elutionspuffer von der Säule in ein mit 600 µl vorgelegtem Neutralisierungspuffer (pH 5,9) eluiert. Danach wurde die Säule nochmals mit 30 ml 1x PBS gewaschen und bei 4°C in 1x PBS aufbewahrt.

D.7.8 Gewinnung von Antiserum gegen AmiC2 aus *N. punctiforme*

Zur Gewinnung von spezifischem Antiserum gegen AmiC2 wurden 3 mg des gereinigten Proteins an „Pineda Antikörper-Service“ (Berlin, Deutschland) geschickt. Die Immunisierungsprozedur erfolgte in Kaninchen über 125 Tage.

D.7.9 Gewinnung von Peptid-Antikörpern gegen spezifische Domänen von AmiC1 und AmiC2

Von der Firma „Pineda“ wurden Peptide synthetisiert, die unterschiedlichen Aminosäuresequenzen der AMIN Domänen von AmiC1 und AmiC2 entsprachen als auch der enzymatischen Domäne von AmiC1 und AmiC2. Zur Gewinnung von spezifischen Peptid-Antikörpern wurden diese Peptide in jeweils drei Kaninchen injiziert, und nach 170 Tagen das Immuserum gewonnen. Die Peptide entsprechen den fettgedruckten Aminosäuren in Abbildung 10 und haben folgende Aminosäuresequenz (benannt nach „Pineda“):

AmiC1-5: NH₂-C**ERQPGISRVATTTRGATQ**-CONH₂ (19 AS)

AmiC2-5: NH₂-C**RTSPINPPKNGMLAARV**-CONH₂ (18 AS)

AmiC1+2-Cterm: NH₂-CY**QNQMAEAIARGILKYLQR**-COOH (20 AS)

AmiC1-Aminosäuresequenz:

VKLHWLLPSTIGTIFMLSSPAMAA**ARLESWRFDANQNRL**EINTVGA**VQPPQAQLIFNPTRLVIDLP**GTT**FGRPQLTQ**
QVGGGIRSIRVGQFDTETTRIVVELTPGYTL**DPKRVQFVGTSGDRWTVQLPRPEVDRVASFSASPPRSAYTV**V**TFP**
DSERQPGISRVATTTRGATQIESLTVTG**DGLFLRTSGGNPGIKI**IRSRDRASIFIDVSDASLSP**LQAQ**
QNNQPVNKHGISRVEFTQ**LQNQAPIVRLTLRVDKNSPDWQATNSNSGGI**VVLP**SRVVRLPGSSNSDNQSQPPSFP**
SRLSAANNSPATIESVQLADNGRQLLIRADQ**TL**SAAGT**WDRSSGVFRVT**INNAKLAPRV**TGPTFAPNSPILRVRL**
Q**PQAANTVVVLVQ**PAPGV**QLDQPQQIGDQLLA**IP**IQGSRRIVSLPGRPSFALPGLPPP**NRGPF**PDNNPNPQQQF**
Q**PQRRVTNGRVVVI**IDPGHGGK**D**SGALGIGGAREK**DVILPIGKRLAQILQ**QNGVQ**VVMTRDSDFVTL**PGRV**QLA**
ERANADV**FVSIHANSAGASRPDVNGLEVYYYYD**SGLDLAR**VVRSSILQSIGTLKDRGVRRARFYVLRKSSMPSILV**
ETGYMTGREDMARLRTSA**YQNQMAEAIARGVLYLKRR**

AmiC2-Aminosäuresequenz:

VKLRWLLSSTIGTIFMLSSPAMAA**AKLEYWRFDVNQNKLEINTLGNVQPPQAQLIFNPTRLVIDLP**GTT**FGRPQLTQ**
QVGGGAIRAIRVGQFDEQ**TTRIVVELTPGYTL**DPKGVQ**FVGR**TGDRWTVQL**PTPVAENVPSINTGGQQQAIATQPS**
LRTSPSVFSPRDIYN**VV****RTSPINPPKNGMLAARV**TQ**IENLQVTGDGFFIRTNGGNPQIQVNR**SNDQRE
INIDIASATLSPSLEQ**RDLSINRYGVSRIQFSQLQTS**PSVVR**MTLQVDENSQNWRATNSNSSGF**VLLPSRGIAQ**F**
PGGNNNPRPIPSSTGTATIESVQLANNGTQ**LLIRADQALSATGGWDR**TSGLYRITINNARLAPKV**TGPTFNSNSP**
ILRVRLQ**PQESNTVTVLVQ**PAAGVQIGELN**QVGDQLLAL**ELQ**RS**GS**VTQQPIDLPLSPNQGF**PNSIDN**PPPI**S
RPQ**PRPSVPRGKLLVVIDPGHGGKDSGAPGLGGLLEKDVILPIGKRVA**AILEQHGVQ**AVLTRDADFFVELQGRVE**
IAERNATA**FVSIHANSVDNRPDVNGLEVYYYYDSGYALAEVVRNTILQ**NIDTIK**NRGTRKARFYVLRKSSMPSIL**
VETGYMTGREDNPRLASRE**YQNQMAEAIARGILKYLQR**

Abb. 10: Aminosäuresequenzen von AmiC1 und AmiC2 mit Domänen und Epitopen.

Darstellung der Aminosäuresequenzen mit eingezeichneten Domänen: Signalsequenz (schwarz umrandet) AMIN-Domäne (schwarz hinterlegt), Linker-Domäne (hellgrau hinterlegt), Amidase-Domäne (dunkelgrau hinterlegt) und der synthetisierten Peptide bzw. Epitope (fett gedruckt). Erstellt mit InterProScan (EMBL-EBI).

E Ergebnisse

E.1 Zellwandamidasen in *Nostoc punctiforme*

N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidasen sind Zellwandhydrolasen, welche Peptidoglycanbindungen zwischen dem N-terminalen L-Alanin und MurNAc (N-Acetylmuraminsäure) spalten. In einzelligen Bakterien sind diese Amidasen wichtig, um teilende Tochterzellen am Ende der Zellteilung voneinander abzuschneiden (Heidrich *et al.*, 2001).

E.1.1 Gezielte Mutagenese der Zellwandamidasen AmiC1 und AmiC2 in *N. punctiforme*

Die Zellwand unterliegt in einem lebenden Organismus einer ständigen Neusynthese und Umstrukturierung. Es ist bekannt, dass Zellwandamidasen in einzelligen Bakterien an der Zellteilung und an der steten Erneuerung des Peptidoglycans, auch bekannt als *turn over*, beteiligt sind (Höltje, 1998). In einzelligen Bakterien wurde die Funktion der Zellwandamidasen ausführlich charakterisiert. Über die Funktion in filamentösen, multizellulären Cyanobakterien ist hingegen sehr wenig bekannt. Trotzdem kann man davon ausgehen, dass Amidasen während der Zelldifferenzierung ebenso wichtig für die Zellwandmodifizierung sind.

Transkriptionsdaten zeigten eine hochregulierte Expression der Gene *Npun_F1845* und *Npun_F1846* während der Hormogonien- bzw. Akineten-Differenzierung. Die Expression von *Npun_F1845* war ebenfalls nach Stickstoffentzug hochreguliert, wohingegen der Expressionsspiegel von *Npun_F1846* nach Stickstoffentzug unverändert blieb (Campbell *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit angewandten *in silico* Analysen zeigten, dass die beiden Gene *Npun_F1845* und *Npun_F1846* der Amidase_3 Familie zugeordnet werden können und für N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidasen kodieren. Außerdem wurden noch vier weitere Amidase_3 ermittelt: *Npun_R2674*, *Npun_R3584*, *Npun_R6032* und *Npun_R6436* (Abb. 38). Welchen Effekt das Ausschalten des Gens *NpunF_1845* (*amiC1*) bzw. *NpunF_1846* (*amiC2*) im multizellulären Organismus *N. punctiforme* ATCC 29103 auf die Zellteilung und -differenzierung von Heterozysten, Hormogonien und Akineten haben könnte, war in meiner Arbeit von vorrangigem Interesse.

Um die Funktion der Zellwandamidasen im filamentösen Cyanobakterium *N. punctiforme* zu charakterisieren, wurde versucht, Insertionsmutanten herzustellen, welche durch Integration einer Kanamycin/Neomycin-Resistenzkassette (C.K3) Defekte in den Genen *amiC1* bzw. *amiC2* aufwiesen. Dabei konnte eine *amiC2*-Mutante mit einer revers orientierten C.K3-Kassette generiert (Abb. 11A) und durch eine PCR-Analyse die Integration der C.K3-Kassette bestätigt werden (D.5.10/ Tabelle 3) (Abb. 11B).

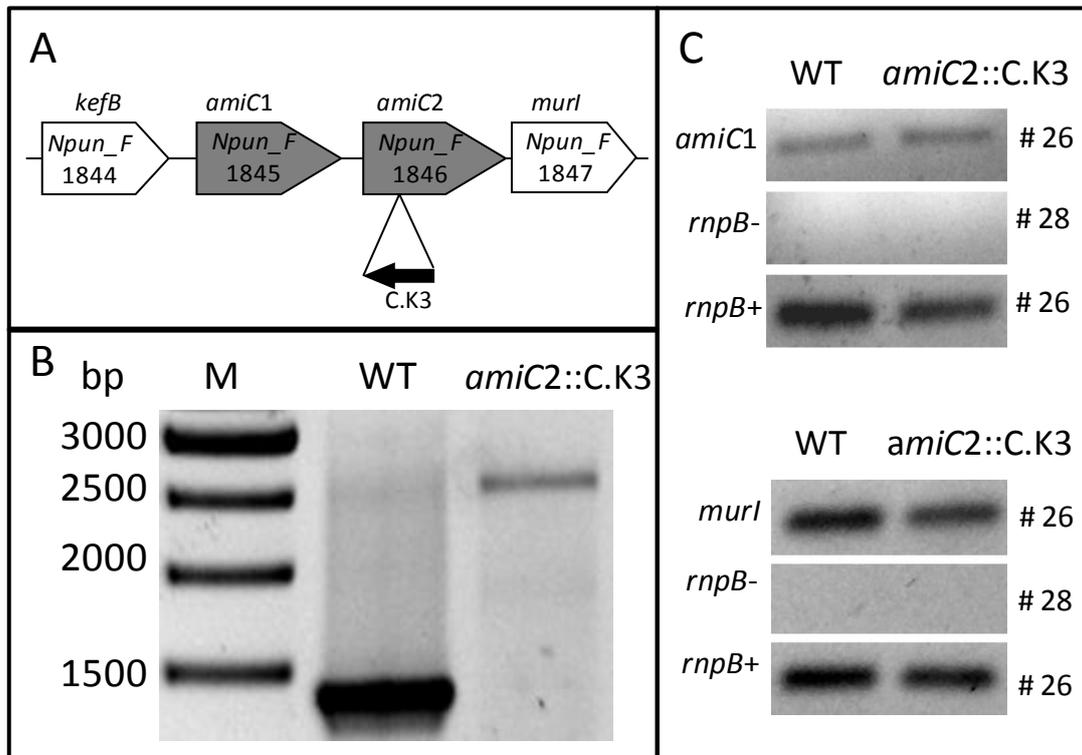


Abb. 11: Genomische Organisation der *amiC*-Gene, Insertion der Resistenzkassette C.K3 in *amiC2* und Transkriptionsanalyse von *amiC1* und *murI*.

A: Schematische Darstellung der genomischen Organisation der *amiC*-Region. (bezogen auf: http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/NPUN/genes/Npun_F1846) und der Insertion der Resistenzkassette C.K3 in *amiC2*. B: PCR-Analyse der Integration der C.K3-Kassette in das *amiC2*-Gen von *N. punctiforme*. Als Matrize dienten 100 ng gereinigte genomische DNA des Wildtyps (WT) und der *amiC2*-Mutante (*amiC2*::C.K3). Als Primer wurden Oligo 430 und Oligo 431 verwendet. C: Transkriptionsanalyse von *amiC1* (stromaufwärts von *amiC2*) und *murI* (stromabwärts von *amiC2*) durch RT-PCR (mit 26 bzw. 28 PCR_Zyklen) des WTs und der *amiC2*-Mutante. Als Ladekontrolle diente das *rnpB*-Gen, wofür einmal ohne reverse Transkriptase (*rnpB*-) und einmal mit (*rnpB*+) gearbeitet wurde. Für die RT-PCR wurden Oligo 810, Oligo 811, Oligo 534, Oligo 535, Oligo 494 und Oligo 495 als Primer verwendet (Tabelle 4). Die für die RT-PCR als Matrize eingesetzte RNA (60 ng pro Ansatz) wurde aus dem WT und der Mutante gewonnen.

Das PCR-Produkt der Mutante war um 1,1 kb größer als das WT-Fragment was der Größe der C.K3-Kassette entsprach. Ein Fragment in der Größe des WTs war nicht mehr vorhanden. Durch vielfache Überimpfungen über längere Wachstumsperioden hinweg führte es zu einer vollständigen Segregation des mutierten Allels.

Bedingt durch den starken *psbA*-Promotor der Resistenzkassette ohne transkriptionellen Terminator können polare Effekte die Expression der benachbarten Gene stören. Sollte das stromabwärts gelegene *murI*-Gen keinen eigenen Promotor besitzen, so könnte dessen Expression durch die Insertion der C.K3-Kassette in reverser Orientierung in *amiC2* unterbunden sein. Die Expression der umgebenen Gene in der Mutante wurden daher mit der des WTs verglichen. Das Agarose-Gel der aufgetragenen RT-PCR zeigte gleich starke Banden der getesteten Gene im WT wie auch in der Mutante (Abb. 11C). Das bedeutet, dass die Insertion der Resistenzkassette in der Mutante keine Auswirkung auf die Expression von *amiC1* als auch von *murI* hatte. Die Komplementation der Mutation durch Elektroporation mit dem Plasmid pIM474 wurde mehrmals versucht, jedoch ohne Erfolg (Berendt, 2011).

E.1.2 Wachstumstest der *amiC2*-Mutante auf BG11- und BG11₀-Medium

Nostoc punctiforme wächst in langen Filamenten, die zu einem dicken Film untereinander verwoben sind. Die Filamente können nur schwer mechanisch voneinander getrennt werden, ohne dabei Zellen zu beschädigen bzw. zu lysieren. Somit kann man mit *N. punctiforme* keine Wachstumstests in Flüssigmedien durchführen, in welchen photometrisch die Zellzahl bestimmt wird. Eine Möglichkeit, trotzdem das Wachstumsverhalten der *amiC2*-Mutante mit dem des WTs zu vergleichen, bieten sogenannte Tropfplatten. Bei dieser Methode wurden verdünnte Zellsuspensionen der *amiC2*-Mutante auf BG11- bzw. BG11₀-Agarplatten getropft und über mehrere Tage die Bildung von Pseudokolonien beobachtet (Abb. 12). Ebenso konnte dabei geprüft werden, ob die *amiC2*-Mutante befähigt ist, auf stickstofffreiem BG11₀-Medium zu wachsen.

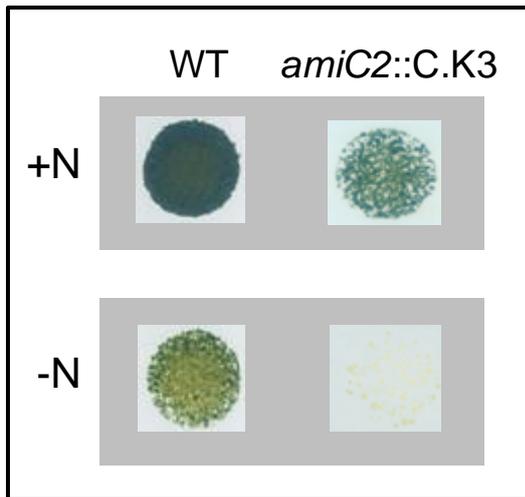


Abb. 12 Wachstumstest der *amiC2*-Mutante auf BG11- und BG11₀-Medium.

Es wurden jeweils 20 µl Zellsuspension des WT's *N. punctiforme* und der *amiC2*-Mutante mit einer Konzentration von 1 µg Chl a/ml auf Agarplatten mit Stickstoffquelle (+N) und ohne (-N) getropft und bei Dauer-Weißlicht sieben Tage inkubiert.

Im Vergleich zur WT-Kontrolle wuchs die auf BG11-Medium getropfte *amiC2*-Zellsuspension etwas langsamer (Abb. 12, +N). Hatte die Mutante nach sieben Tagen noch schwach bewachsene Bereiche im Tropfen (Abb. 12, *amiC2*::C.K3, +N), so ist der Tropfen des WT's vollständig geschlossen bewachsen (Abb. 12, WT, +N). Dagegen ist die *amiC2*-Mutante auf der stickstofffreien BG11₀-Platte im Vergleich zum WT nicht angewachsen und die Zellen blichen aus (Abb. 12, -N).

E.1.3 Morphologische Charakterisierung der *amiC2*-Mutante

Mit Hilfe von Licht- (Abb. 13) und Elektronenmikroskopie (Abb. 13) wurden Morphologie und Ultrastruktur der *amiC2*-Mutante charakterisiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Mutante einen morphologisch stark auffälligen Phänotyp entwickelt hatte, mit Zellen, die nicht mehr imstande waren, langkettige Filamente auszubilden (Abb. 13+14).

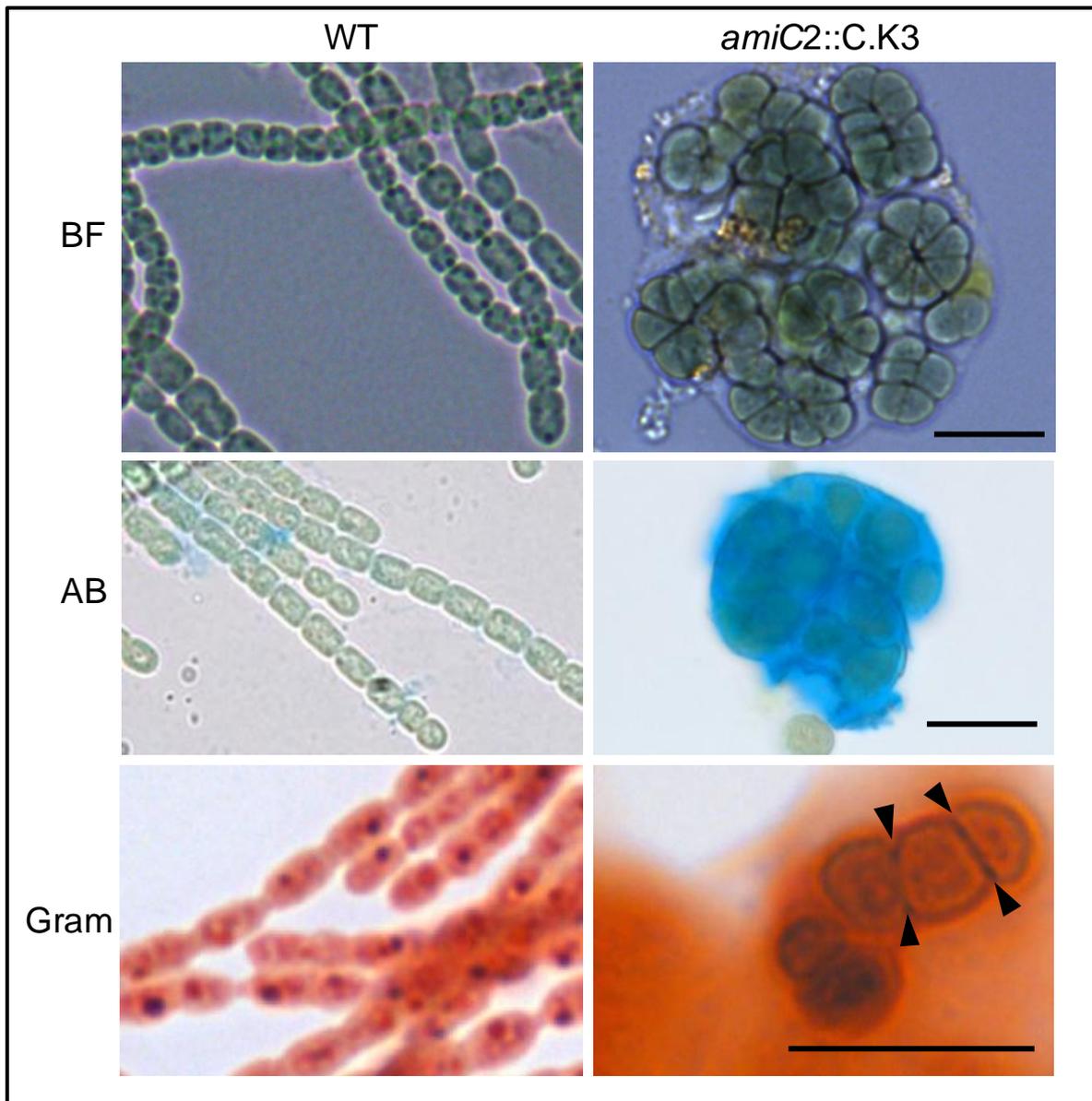


Abb. 13: Mikroskopische Analyse des WTs *N. punctiforme* und der *amiC2*-Mutante.

Morphologische Charakterisierung der *amiC2*-Mutante mittels Durchlichtmikroskopie (BF), unter Verwendung von Alcianblau (AB) und Gramfärbung (Gram). Die Pfeilspitzen zeigen auf die Gramfärbung im Septum der Mutante. Größenmarker: 10 μm .

Die Zellen der Mutante wuchsen ohne symmetrisch angelegte Zellteilungsebene zu verhältnismäßig großen Zellklumpen, die unregelmäßige oder kleeblattartige Formen bildeten (Abb. 13, BF). Dabei waren die Zellen der Mutante im Vergleich zu denen des WTs größer, was sich in einem dreifach größeren Zellvolumen äußerte. Auch die Septen der Mutante waren 1,7-fach breiter.

Dicke Schleimschichten ummantelten die Zellen der Mutante, was die kompakte Form unterstützte. Diese Auflagerung machte sie widerstandsfähiger gegen mechanische Kräfte,

und die Zellhaufen konnten nur schwer vereinzelt werden. Alcianblau wurde verwendet, um die in den Schleimen enthaltenen Exopolysaccharide anzufärben. Dadurch legte sich eine blaue Hüllschicht um die Mutante, wohingegen der WT nur vereinzelt Farbreaktionen zeigte (Abb.13, AB).

Wie erwartet zeigte die Gramfärbung beim WT keine Färbung des Peptidoglycans (Abb. 13, Gram). Bei der Mutante allerdings färbte sich das Peptidoglycan im Septum schwach violett (Abb. 13, Gram, Pfeilspitzen). Dies weist auf ein dickeres, stärker quervernetztes Murein hin.

Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen von Ultradünnschnitten des WTs und der Mutante zeigen einen Querschnitt durch die Zellen (Abb. 14).

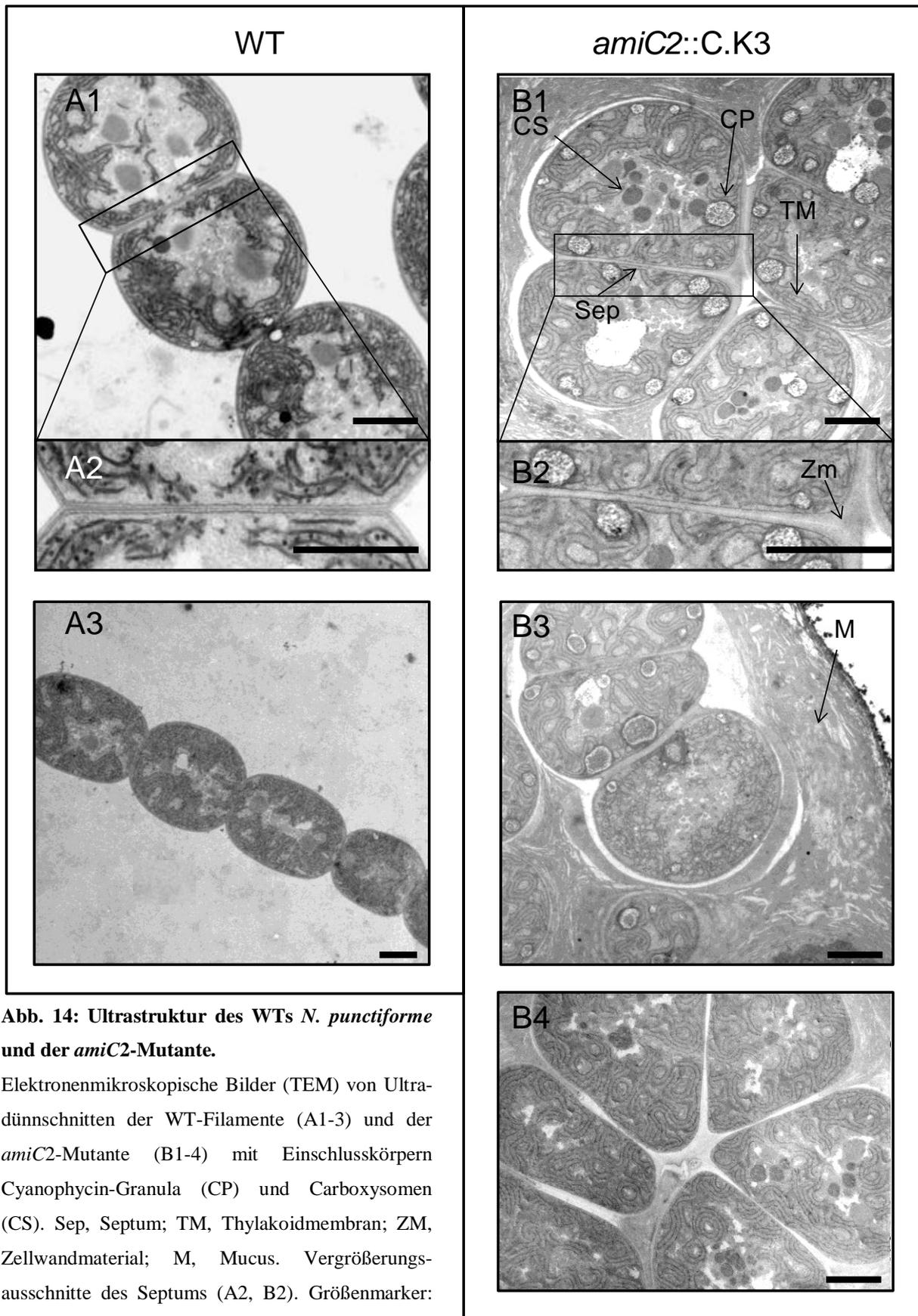


Abb. 14: Ultrastruktur des WTs *N. punctiforme* und der *amiC2*-Mutante.

Elektronenmikroskopische Bilder (TEM) von Ultra-dünnschnitten der WT-Filamente (A1-3) und der *amiC2*-Mutante (B1-4) mit Einschlusskörpern Cyanophycin-Granula (CP) und Carboxysomen (CS). Sep, Septum; TM, Thylakoidmembran; ZM, Zellwandmaterial; M, Mucus. Vergrößerungsausschnitte des Septums (A2, B2). Größenmarker: 1 μm.

Auffällig zu erkennen waren abermals die zur Teilungsebene schiefen Septen der ungleichen Tochterzellen der Mutante (Abb. 14B1-4). Die Septen der Mutante waren meist breiter und dicker gestaltet als die des WTs, mit größerem Abstand zu den Nachbarzellen (Abb. 14B3+4). An den Rändern des Septums kam es zur Akkumulation amorphen Zellwandmaterials (Abb. 14B2, Zm). In den Mutanten-Zellen waren Anhäufungen von granulären Strukturen zu erkennen, bei denen es sich um Cyanophycin (CP) und Carboxysomen (CS) handelte (Abb. 14B1). Zu sehen war auch, dass eine dicke Schleimschicht (M) die Mutante umkleidete, welche aber das Septum nicht invaginierte, da sie der äußeren Membran aufgelagert war (Abb. 14B3).

Trotz des starken Phänotyps konnte die *amiC2*-Mutante weiterhin in Verbindung mit gebundenem Stickstoff photoautotroph wachsen, wodurch weitere Experimente durchgeführt werden konnten.

E.1.4 Zelldifferenzierung der *amiC2*-Mutante

Um zu überprüfen, ob die Inaktivierung von *amiC2* Auswirkung auf die Differenzierungsfähigkeit hat, wurden Heterozysten, Hormogonien als auch Akineten unter Laborbedingungen induziert, lichtmikroskopisch verfolgt und mit dem WT *N. punctiforme* verglichen (Abb. 15).

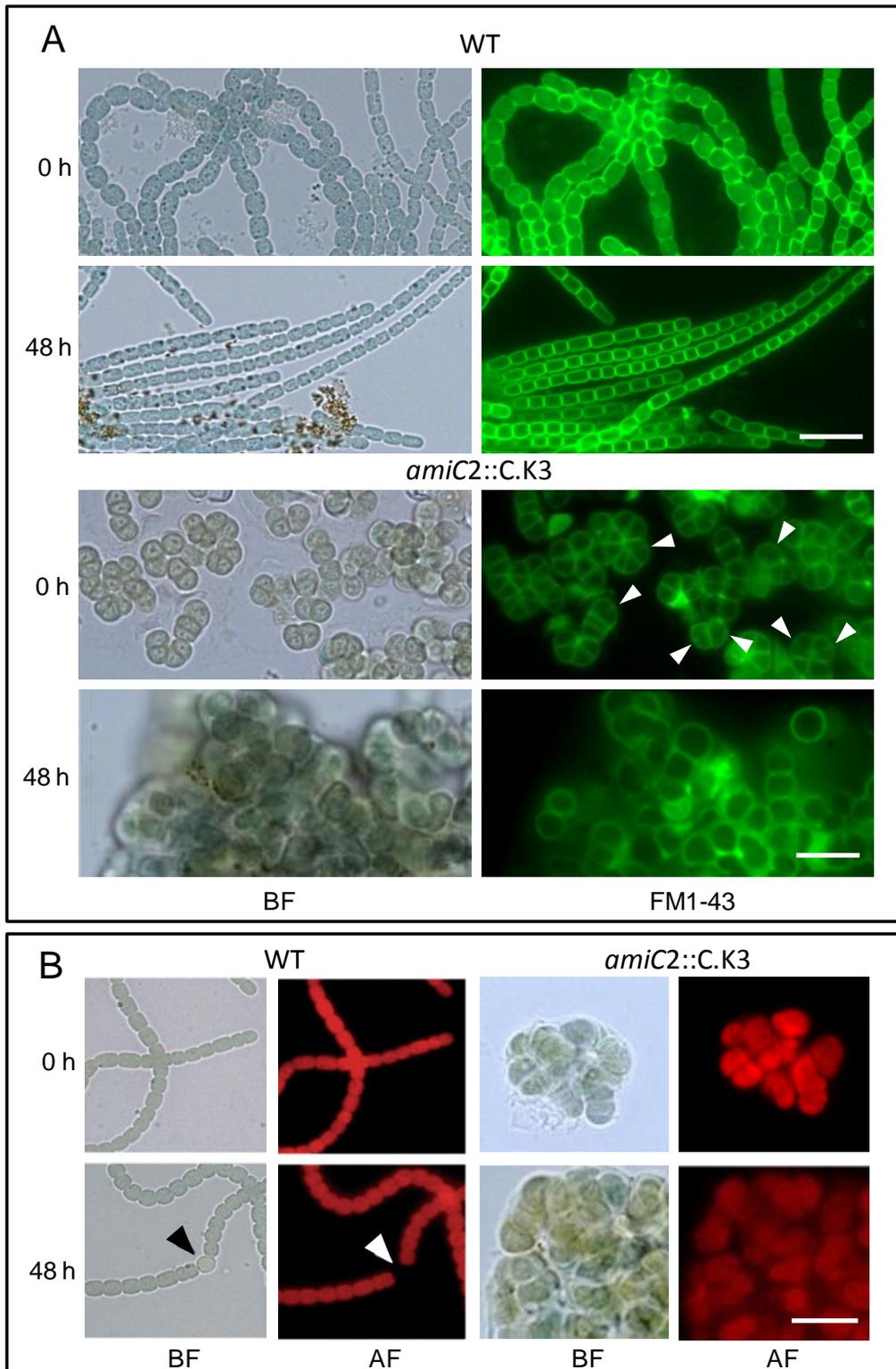


Abb. 15: Untersuchung der Zelldifferenzierung von WT *N. punctiforme* und *amiC2*-Mutante.

A: Durchlicht- (BF) und fluoreszenzmikroskopische (FM1-43) Bilder vor (0 h) und 48 h nach der Hormogonieninduktion. Die weißen Pfeilspitzen zeigen die entstehenden Septen der Mutante. B: Durchlicht- (BF) und Autofluoreszenzbilder (AF) vor (0 h) und 48 h nach Stickstoffmangel. Die Heterozysten zeigten keine Autofluoreszenz (Pfeilspitzen). Größenmarker: 10 μ m.

Die mikroskopischen Proben wurden mit einem Cytoplasmamembran-bindenden Fluoreszenzfarbstoff (FM1-43) gefärbt (Abb. 15A). 48 h nach der Hormogonieninduktion durch Entzug gebundenen Stickstoffs und unter Rotlicht waren 80 % der WT-Filamente zu Hormogonien differenziert (Abb. 15A, WT, 48 h). Dies wird durch kleine, durch eine vorhergehende Reduktionsteilung differenzierte Zellen ersichtlich. Die Filamente fragmentierten in kurze, konisch zulaufende, bewegliche Filamente. Die fluoreszenzmarkierte Cytoplasmamembran des WTs verdeutlicht die Differenzierung nach 48 h. Im Gegensatz dazu differenzierte sich die *amiC2*-Mutante nicht (Abb. 15A, *amiC2::C.K3*). Lediglich die Zellen nahmen an Größe zu, blieben aber unbeweglich.

Bei der Heterozysten-Differenzierung wurde den Zellen durch mehrmaliges Waschen in BG11₀-Medium gebundener Stickstoff entzogen. Nach 48 h unter Stickstoffmangel waren einige Heterozysten in den Filamenten der WT-Kontrolle vollständig differenziert (Abb. 15B, WT, 48 h, Pfeilspitzen). Diese waren an ihrer zugewonnenen Größe, bedingt durch die Auflagerung dicker Zellhüllen, und am Verlust der Autofluoreszenz zu erkennen. Die Mutante hingegen bildete nach 48 h und auch später keine Heterozysten (Abb. 15B, *amiC2::C.K3*, 48 h). Aufgrund dessen und durch die Unfähigkeit, auf einer N₂-Quelle zu wachsen, blichen die Zellen nach mehreren Tagen auf BG11₀-Medium vollständig aus und begannen zu lysieren (Abb. 15B, *amiC2::C.K3*, 48 h, AF). Sporenartige Akineten konnten bei der Mutante ebenfalls nie beobachtet werden. In alten Kulturen wurden keine Akineten gefunden, welche ebenso nicht durch Phosphatmangel induziert werden konnten.

Diese Studie zeigte, dass die *amiC2*-Mutante eine grundlegende Störung in der Zelldifferenzierung aufwies.

E.1.5 Analyse der Heterozysten-spezifischen Glycolipide der *amiC2*-Mutante

Ob die *amiC2*-Mutante befähigt ist, Heterozysten-spezifische Glycolipide zu synthetisieren, wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie nachgewiesen. Dafür wurden Gesamt-Lipidextrakte der Mutante vor Stickstoffentzug und 48 Stunden danach analysiert (Abb. 16).

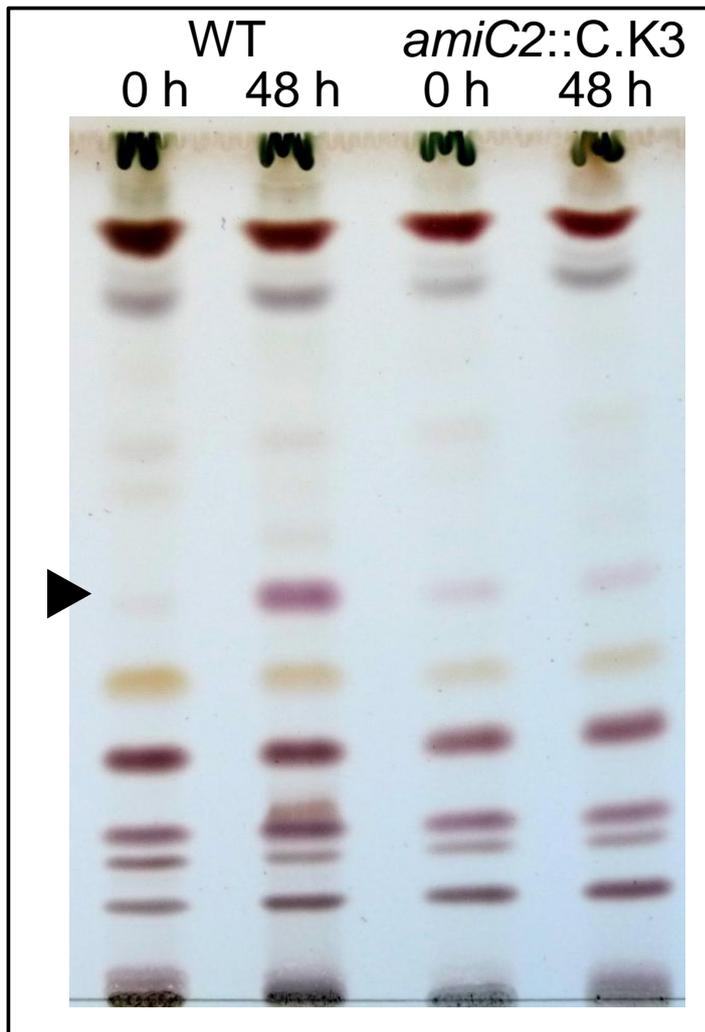


Abb. 16 Chromatographische Peptid-analyse der *amiC2*-Mutante.

Dünnschichtchromatographie der Gesamtlipide des WTs *N. punctiforme* und der *amiC2*-Mutante gewachsen in BG11-Medium vor Stickstoffentzug (0 h) bzw. in BG11₀-Medium 48 Stunden (48 h) nach Stickstoffentzug. Pfeilspitze: Heterozysten-spezifische Glycolipide, welche in den Proben nach 48 h zu sehen waren.

Der WT *N. punctiforme* synthetisierte 48 h nach Stickstoffentzug Heterozysten-spezifische Glycolipide (Hgl), welche als charakteristische Bande im Chromatogramm erkennbar wurden (Abb. 16, WT, 48 h, Pfeilspitze). Vor dem Stickstoffentzug ist die Synthese der Hgl unterdrückt, weshalb in der WT-Kontrolle keine solche Bande zu erkennen war (Abb. 16, WT, 0 h). Die Mutante zeigte vor wie auch nach dem Stickstoffentzug nur sehr schwache Banden (Abb. 16, *amiC2::C.K3*, 0 h und 48 h), aber keine charakteristische Hgl-Bande wie in der WT-Kontrolle. Die Synthese der Heterozysten-spezifischen Glycolipide fand in der *amiC2*-Mutante nicht statt. Das Fehlen der charakteristischen Bande bei der *amiC2*-Mutante auf Höhe der Hgl ist ein Indiz für einen frühen Defekt in der Heterozysten-Differenzierung.

E.1.6 Strukturelle Analyse der Zellwand des WTs *N. punctiforme* und der *amiC2*-Mutante

Mikroskopische Aufnahmen der Zellaggregate der *amiC2*-Mutante zeigten, dass diese sich grundlegend vom Filament des WTs *N. punctiforme* unterschieden (Abb. 13+14). Ursächlich für die Form der Mutante sind die willkürlich angelegten Teilungsebenen, resultierend in klumpigen Zellhaufen mit aberranten Septen. Um zu bestätigen, dass dies auf die Struktur der Zellwände zurückzuführen ist, wurde die äußere Membran mit dem Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green 488-X markiert und deren Lokalisierung am Septum mikroskopisch untersucht (Abb. 17A1-4 + B1-4). Zusätzlich wurden Murein-Säcke präpariert und mikroskopisch analysiert (Abb. 17A5-6 + B5-6).

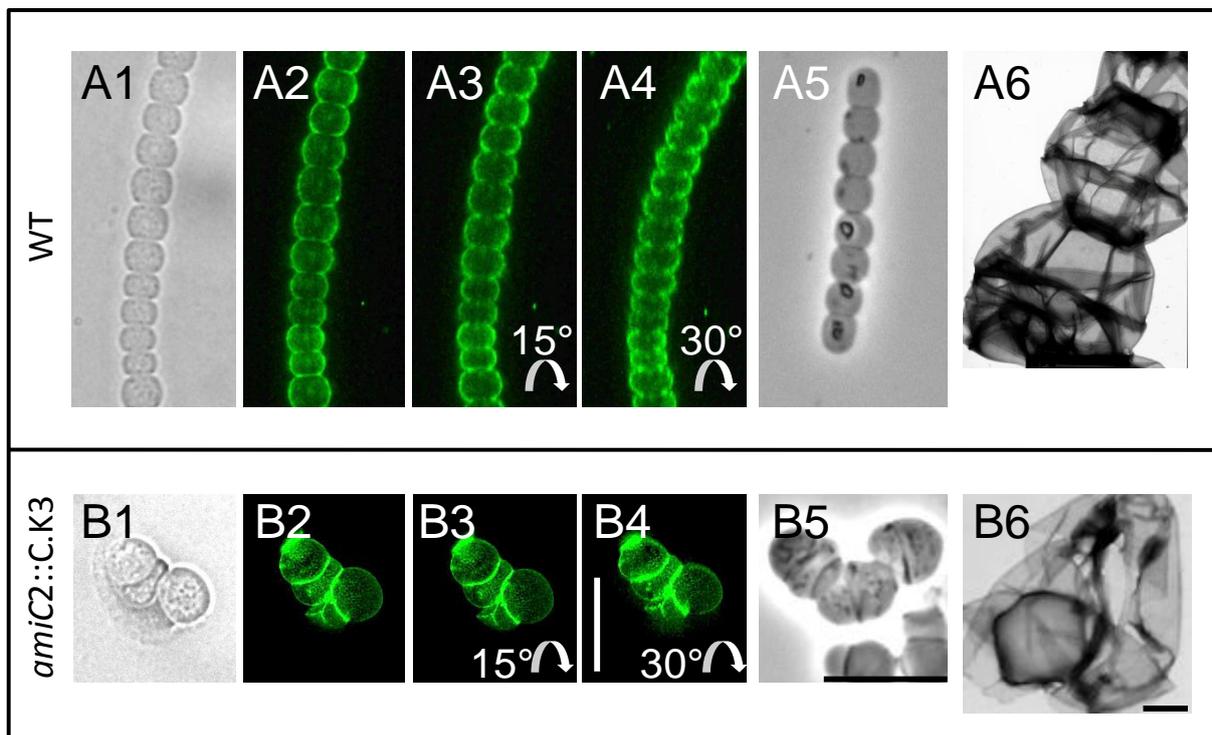


Abb. 17: Untersuchung der Zellwände des WTs *N. punctiforme* und der *amiC2*-Mutante.

Durchlicht (A1, B1) und fluoreszenzmikroskopische (A2-4, B2-4) Bilder lebender WT- und *amiC2*-Mutantenzellen. Die äußere Membran wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green spezifisch gefärbt. Die dreidimensionale Darstellung wurde mittels eines Computerprogramms (*Deconvolution Software*) errechnet. Die Pfeile zeigen die Rotationsrichtung des Bildes um 15° bzw. 30°. Größenmarker: 10 µm. Phasenkontrastbilder (A5, B5) von isolierten Peptidoglycan-Säcken des WTs und der *amiC2*-Mutante. Größenmarker: 10 µm. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen (A6, B6) isolierter Murein-Säcke von WT und *amiC2*-Mutante. Größenmarker: 1 µm.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Filamenten in mehreren Ebenen und anschließende dreidimensionale Rekonstruktion der Fluoreszenzsignale machten die Organisation der äußeren Membran um das Filament des WTs (Abb. 17A2-4) und der klumpigen Mutante (Abb. 17B2-4) klar ersichtlich. Durch Drehung des dreidimensionalen Bildes in der Querachse bis zu 30° konnte beim WT eine filamentumschließende äußere Membran definiert werden (Abb. 17A4). Das Fluoreszenzsignal berührte das Septum, drang aber in dieses nicht ein. Dies entspricht der gängigen Vorstellung eines kontinuierlichen Periplasmas Heterozysten-bildender Cyanobakterien (Flores *et al.*, 2006).

Die 3D-Rekonstruktion des Z-Stapels der gefärbten Mutante zeigte prinzipiell ein ähnliches Bild. Die Färbung der äußeren Membran in Septumnähe war stärker, aber drang nicht in das Innere des Septums ein (Abb. 17B2). Durch Drehung der Projektion um 30° wurde keine gefärbte Septumscheibe, sondern ein ringförmiges Fluoreszenzsignal ersichtlich (Abb. 17B4). Wie aus den Phasenkontrastbildern zu erkennen ist (Abb. 17A5+B5), sind die Septen der Mutante breiter als die des WTs. Dies ist ebenfalls in den 3D-Bildern zu erkennen (Abb. 17B2-4).

Präparationen von Mureinsäcken des WTs und der Mutante entsprachen der Filament- und Zellmorphologie lebender Zellen. Der WT zeigte ein zusammenhängendes Filament aus einem riesigen Mureinsack, der auch im Septum bestehen blieb (Abb. 17A5). Die Mureinsäcke der Mutante zeigten schräge, aber vollständige mit den Nachbarzellen verknüpfte Septen (Abb. 17B5). Diese waren breiter und erschienen dicker als die des WTs.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der präparierten Mureinsäcke des WTs ermöglichten einen detaillierteren Blick auf ein zusammenhängendes septales Peptidoglycan (Abb. 17A6). Über dieses sind die Zellen im Filament miteinander verknüpft und fragmentieren somit nicht zu einzelligen Mureinsäcken. Die größeren Ringe in der Mitte der Zellen sind neu angelegte Zellteilungsebenen mit bereits gebildetem Murein. Bedingt durch den Aufschluss der Zellen mit Ultraschall bzw. Glasperlen während der Präparation, reduzierte sich die Filamentlänge auf 4 - 8 Zellen im Vergleich zu lebenden Filamenten (zwischen 50 und 100 Zellen). Aufgrund der schrägen Septen der Mutante waren die Mureinpräparationen klumpig. Beim Aufbringen der *amiC2*-Mureinsäcke auf den Objektträger blieben deshalb nur wenige einzellige oder stark fragmentierte Säcke hängen, was die Analyse elektronenmikroskopischer Aufnahmen erschwerte (Abb. 17B6, 20B).

E.1.7 Untersuchung der Zell-Zell-Kommunikation der *amiC2*-Mutante

Aufgrund des vollständigen Verlustes der Zelldifferenzierung der *amiC2*-Mutante konnte davon ausgegangen werden, dass bei dieser essentielle Funktionen für die Differenzierung verloren gegangen waren. Um zu überprüfen, ob die Zell-Zell-Kommunikation gestört sei, wurden FRAP- (*fluorescence recovery after photobleaching*) Analysen durchgeführt. Zellen des WTs *N. punctiforme* und der *amiC2*-Mutante wurden hierfür mit dem 623 Da großen Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM *in vivo* gefärbt, im konfokalen Laserscannmikroskop fokussiert (Abb. 18), und der Farbstoff in einer Zelle mit einem starken Laser für 0,5 s geblichen.

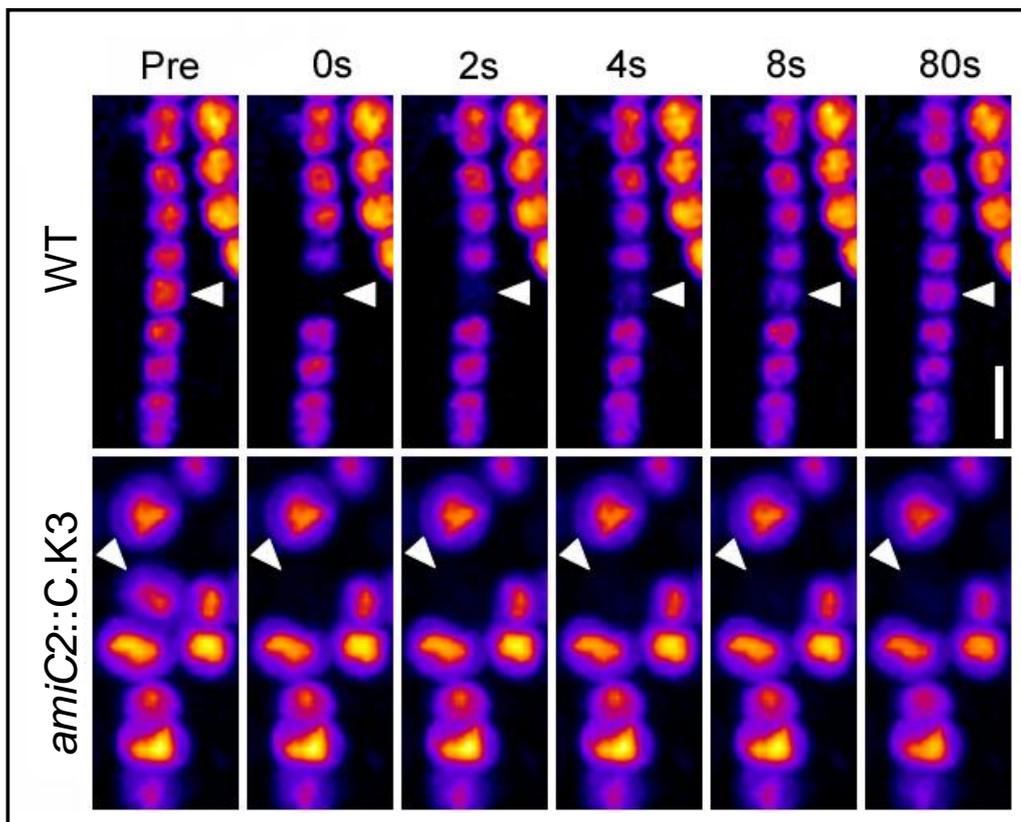


Abb. 18: *In vivo* FRAP-Analyse Calcein-beladener Zellen des WTs *N. punctiforme* und der *amiC2*-Mutante.

Gezeigt sind konfokal-mikroskopische Bilder von im Filament ungebleichten (Pre), gebleichten (0 s) und sich erholenden (0 s - 80 s) Zellen. Die Pfeilspitzen zeigen auf die Laser-gebleichten Zellen. Zur besseren Visualisierung wurde die Falschfarbe „fire“ verwendet. Größenmarker: 10 μm .

Im WT diffundierte unmittelbar nach dem Bleichen der Zelle ungebleichter Farbstoff aus den Nachbarzellen innerhalb des Filaments in die gebleichte Zelle, wodurch diese wieder

fluoreszierte (Abb. 18, WT). Gegensätzlich zum WT kam es bei der Mutante zu keiner Rückgewinnung der Fluoreszenz (Abb. 18, *amiC2::C.K3*), und folglich auch zu keinem Stoffaustausch zwischen den Zellen. Selbst nach mehreren Minuten blieben die Zellen immer noch dunkel. Das Bleichen wurde mehrfach wiederholt, mit einer Digitalkamera aufgezeichnet und anschließend quantifiziert (Tabelle 15).

Tabelle 15: Quantifizierung der FRAP-Analysen von Zellen des WTs *N. punctiforme* und der *amiC2*-Mutante

	$t_{1/2}$ [s]		$t_{1/2}$ [s]	Rückgewinnung
WT-1	16	Mutante-1	> 80	3 %
WT-2	7	Mutante-2	> 80	3 %
WT-3	2	Mutante-3	> 80	3 %
WT-4	10	Mutante-4	> 80	3 %
WT-5	4	Mutante-5	> 80	5 %
WT-6	4	Mutante-6	> 80	8 %

Es wurden jeweils nur eine Zelle aus sechs WT-Filamenten bzw. *amiC2*-Mutanten-Zellklumpen gebleichen. Daraus wurde die Zeit berechnet, bei der die Hälfte des Fluoreszenzgleichgewichts (vollständiger Rückfluss des Farbstoffes in die gebleichte Zelle) erreicht wurde (= $t_{1/2}$). Bei der Mutante wurde die Rückgewinnung nach 80 s in Prozent angegeben.

E.1.8 *In vivo* Fluoreszenzfärbung des Mureins des WTs *N. punctiforme* und der *amiC2*-Mutante

Vancomycin ist ein Antibiotikum, welches an die D-Ala-D-Ala-Dipeptid-Untereinheiten im Peptidoglycan und an die Mureinvorstufe Lipid II bindet (Reynolds, 1989, Ge *et al.*, 1999). Dipeptid-Untereinheiten sind in neu-synthetisiertem, noch nicht quervernetztem Peptidoglycan zu finden (Vollmer *et al.*, 2008). Bindet Vancomycin, so wird die Peptidoglycansynthese gestört. Dadurch kann das Exoskelett dem inneren Turgor nicht mehr standhalten, was folglich zur Zellyse führt. Van-FL ist ein mit Vancomycin gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff, welcher *in vivo* an D-Ala-D-Ala-Dipeptide koppelt, wodurch diese Bindung fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden kann (Tianont *et al.*, 2006).

In diesem Experiment wurden Zellen des WTs *N. punctiforme* und der *amiC2*-Mutante *in vivo* mit Van-FL gefärbt (Abb. 19).

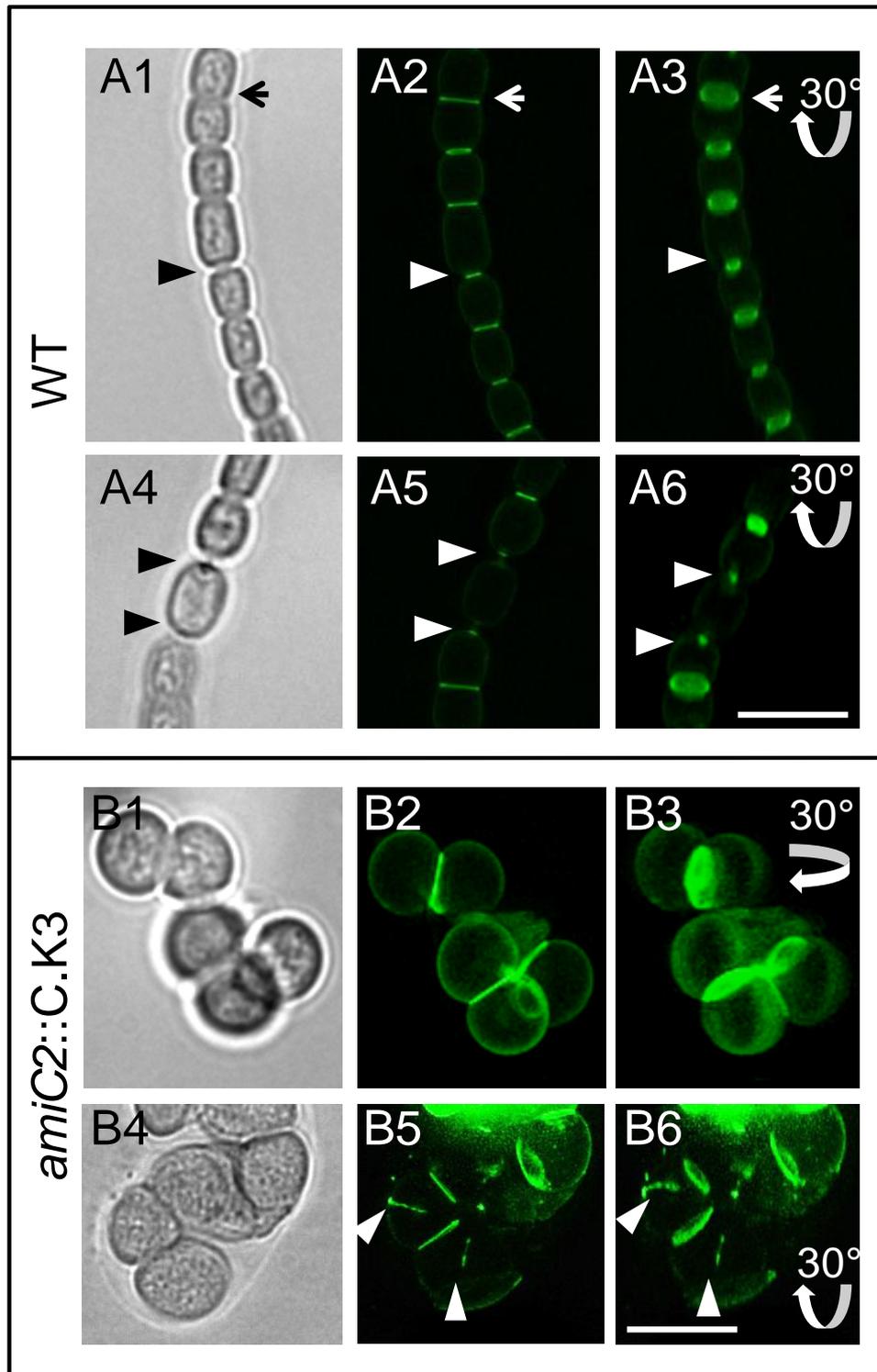


Abb. 19: Lichtmikroskopische Darstellung des Mureins des WTs *N. punctiforme* und der *amiC2*-Mutante.

Durchlicht- (A1+4, B1+4) und fluoreszenzmikroskopische (A2+3, B2+3, A5+6, B5+6) Aufnahmen lebender Zellen des WTs und der *amiC2*-Mutante. Die Zellen wurden mit einem Vancomycin-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. A1, A2, A3: Pfeilspitzen zeigen auf ein altes Septum, Pfeile auf ein junges Septum. A4, A5, A6: Pfeilspitzen zeigen auf die zwei angrenzenden Septen der Heterozyste. B5, B6: Pfeilspitzen zeigen halbmondförmige Septen. Die gebogenen Pfeile zeigen die Rotationsrichtung des Bildes um 30°. Größenmarker: 10 μm .

Es ist deutlich zu erkennen, dass das Peptidoglycan des WTs stark an den Septen der Filamente angefärbt wurde (Abb. 19A2-3, A5-6). Im WT-Filament wurden dabei unterschiedlich große Bereiche im Septum sichtlich kontrastiert. Die Breite der gefärbten Septen ist vermutlich auf deren Alter zurückzuführen. Mikroskopisch wurden junge, breite Septen (Abb. 19A1-3, Pfeil), entstanden aus frisch geteilten Tochterzellen, als auch alte, schmale Septen (Abb. 19A1-3, Pfeilspitzen) beobachtet. Die zwei sehr schmalen Septen der Heterozyste waren nur noch als grün fluoreszierende Punkte zu erkennen (Abb. 19A5-6). Im Vergleich zum septalen PG war das zellumschließende Murein wesentlich schwächer gefärbt (Abb. 19A2-3, A5-6). Die Drehung der 3D-Rekonstruktion ermöglichte einen Blick auf das Septum. Dabei wurde deutlich, dass die Peripherie stärker fluoreszierte als der innere Bereich. Ansonsten sind die Septen unabhängig vom Alter der Tochterzellen gleichbleibend stark kontrastiert (Abb. 19A2-3).

Die *amiC2*-Mutante zeigte aufgrund der Ultraschallbehandlung nur fragmentierte Bruchstücke an Zellen (Abb. 19B1-6). Die großen, gefärbten Zellen wiesen breite, stark kontrastierte, schiefe Septen auf (Abb. 19B2+3, B5+6). Das Murein im Septum war stärker kontrastiert als das des WTs. Durch die Drehung der 3D-Rekonstruktion wurde ebenfalls ein stark gefärbter Ring im septalen Peptidoglycan ersichtlich (Abb. 19B3+6). Des Weiteren wurden in der Mutante stark fluoreszierende Bereiche des Peptidoglycans sichtbar, welche sich nicht wie ein Septum als Scheibe darstellten, sondern sich ringförmig um nur einen Teil der Zelle herum orientierten (Abb. 19B5+6, Pfeilspitzen). Die Fluoreszenzbilder zeigten beim WT unterschiedlich breite Septen (Abb. 19A2+A3). Möglicherweise handelt es sich bei den breiten Septen um frisch geteilte Tochterzellen (Abb. 19A2+A3, Pfeil) und bei den schmalen Septen um ältere Tochterzellen (Abb. 19A2+A3, Pfeilspitzen).

E.1.9 Mikroskopische Analyse der Feinstruktur des septalen Peptidoglycans des WTs *N. punctiforme* und der *amiC2*-Mutante

Da FRAP-Studien (E.1.7) darauf hindeuteten, dass in der *amiC2*-Mutante kein intrazellulärer Stoffaustausch stattfindet, könnte die AmiC2-Amidase am Aufbau von Zell-Zell-Verbindungen durch Modifizierungen im PB beteiligt sein. Daher wurden die isolierten Mureinsacculi der Mutante mit denen des WTs *N. punctiforme* genauer in ihrer Feinstruktur verglichen (Abb. 20).

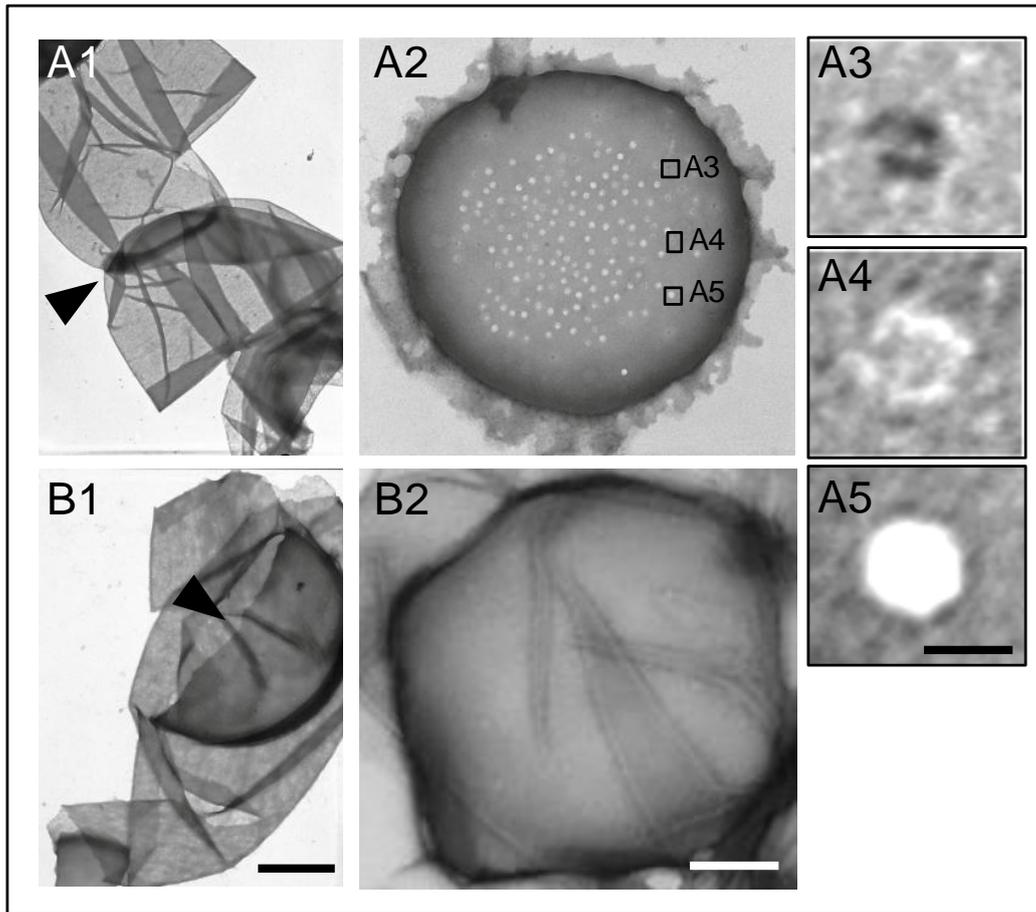


Abb. 20: Elektronenmikroskopische Analyse des Peptidoglycans des WTs *N. punctiforme* und der *amiC2*-Mutante.

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen isolierter Mureinsäcke des WTs (A1) und der *amiC2*-Mutante (B1). Größenmarker: 1 μm . Vergrößerung des septalen Mureins des WTs (A2) und der *amiC2*-Mutante (B2). Größenmarker: 300 nm. Vergrößerungsausschnitte von sich in der Differenzierung befindlichen Poren (A3 und A4) und einer vollständig differenzierten Pore (A5). Pfeile zeigen den ringförmigen Rand eines Septums. Größenmarker: 20 nm.

Die Aufnahme des WTs zeigt Mureinsäcke eines Filaments bestehend aus zwei Zellen mit einem Septum (Abb. 20A1). Das Murein wurde präparationsbedingt pergamentartig auf dem Objektträger fixiert. Deutlich wurde die faltige, hauchdünne Struktur der Mureinsäcke mit dem deutlich stärker, ringförmigen Septum, welches eine Mureinschicht mit Verdickungen im Randbereich aufwies. Diese Beobachtungen wurden durch Betrachtung eines isolierten Septums, an dessen Rand Fransen des restlichen Mureinsacks hafteten, noch verstärkt (Abb. 20A2). Das Septum wirkte im Verhältnis zum restlichen Murein stabiler. Auffällig waren die ca. 20 nm breiten Poren im inneren Bereich des Septums. Ungefähr 150 dieser Poren befanden sich in jedem WT-Septum. Die Vergrößerungsausschnitte zeigten den

möglichen Verlauf der Porendifferenzierung mit vorhergehender Mureinauflagerung (Abb. 20A3) über anschließende ringförmige Mureinhydrolyse (Abb. 20A4) bis hin zur vollständig differenzierten Pore, welche eine randständige Peptidoglycan-Verstärkung aufwies (Abb.20A5).

Die Mureinpräparationen der Mutante zeigten ebenfalls einen Mureinsack mit stärker kontrastiertem Septum (Abb. 20B2) Das gezeigte Bruchstück eines kreisrunden, einschichtigen Septums ließ wie der WT verstärkte Ränder erkennen. Allerdings war das Septum breiter und wies keine Poren auf. Auch die Vergrößerung eines weiteren Septums zeigte keine Poren (Abb. 20B3).

Zur Quantifizierung der septalen Strukturen wurden jeweils acht Septen des WTs und der Mutante aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen genau vermessen, die Anzahl der Löcher gezählt und deren Durchmesser bzw. Abstand zueinander bestimmt (Tabelle 16).

Tabelle 16: Größen der septalen Strukturen im WT und der *amiC2*-Mutante

Strukturen	<i>N. punctiforme</i>	<i>amiC2::C.K3</i>
Durchmesser des Septums [nm]	1596 ± 235	2686 ± 322
Anzahl der Poren	155 ± 13	
Durchmesser der Poren [nm]	20 ± 1	
Abstand der Poren zueinander [nm]	28 ± 8,8	

Die Werte setzen sich aus den Mittelwerten ± mittlere Abweichung von jeweils acht vermessenen Septen des WTs bzw. der *amiC2*-Mutante zusammen.

Die Messdaten zeigten Unterschiede im Durchmesser der Septen, wobei die *amiC2*-Mutante im Vergleich zum WT ein um mehr als 1 µm breiteres Septum hatte. Die Anzahl und auch der Durchmesser der Poren waren in den untersuchten Septen sehr ähnlich, was sich dadurch zeigte, dass die Mittlere Abweichung sehr niedrig war. Die Anzahl der Poren unterschieden sich in der mittleren Abweichung um die Zahl 13 und der Durchmesser nur um 1 nm.

Schlussfolgernd muss die Amidase AmiC2 wichtig für die Porenbildung im Septum sein, die wiederum essentiell für die Bildung der septalen Kommunikationsstrukturen von *N. punctiforme* sind.

E.2 Biochemische Charakterisierung des AmiC2-Proteins aus *N. punctiforme*

E.2.1 Reinigung eines rekombinanten AmiC2-6xHis-Proteins

In diesem Teilprojekt wurde das AmiC2-Protein im *E. coli* Stamm M15/pREP4 mit einem C-terminalen 6xHis-Tag überexprimiert und gereinigt.

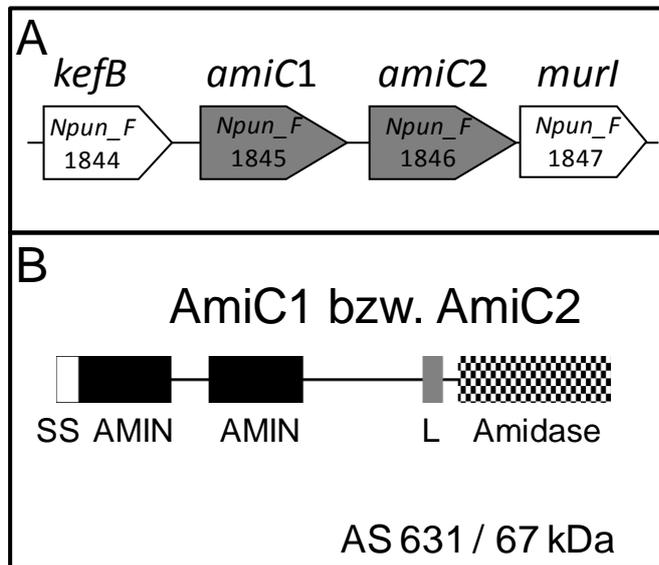


Abb. 21: Schematische Zeichnung des *amiC*-Gen-Clusters und der AmiC-Domänen.

A: Schematische Darstellung der genomischen Organisation der *amiC*-Region (bezogen auf: „http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/NPUN/genes/Npun_F1846“). B: Organisation der verschiedenen Domänen von AmiC1 bzw. AmiC2 (bezogen auf generierte Daten aus „InterPro“). *kefB*, kodiert für einen Natrium-Hydrogen-Tauscher; *murI*, kodiert für eine Glutamat-Racemase; SS, sekretorische Signalsequenz; AMIN, Amidase N-terminal; L, Linker; AS, Aminosäuren.

In *N. punctiforme* sind AmiC1 und AmiC2 mit einer Länge von 631 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 67 kDa gleich groß (Abb. 21B). Computergestützte Analysen mit der Software „InterPro“ zeigten für beide Proteine eine gleiche Domänenorganisation bestehend aus einer N-terminalen sekretorischen Signalsequenz (SS), zwei Septum-lokalisierenden AMIN-Domänen, einer beweglichen Linker-Domäne und einer C-terminalen enzymatischen Amidase-Domäne (Abb. 21B). Unter den insgesamt sechs ermittelten Amidasen in *N. punctiforme* haben nur AmiC1 und AmiC2 eine Septum-lokalisierende AMIN-Domäne (Abb. 21) (siehe auch I.1).

Durch Konstruktion des AmiC2-6xHis-Expressionsplasmids pIM347 (Abb. 22A) wurde die Signalsequenz am N-Terminus, die zum Export des Proteins ins Periplasma führt, entfernt, und AmiC2 translational mit 6xHis-Resten fusioniert.

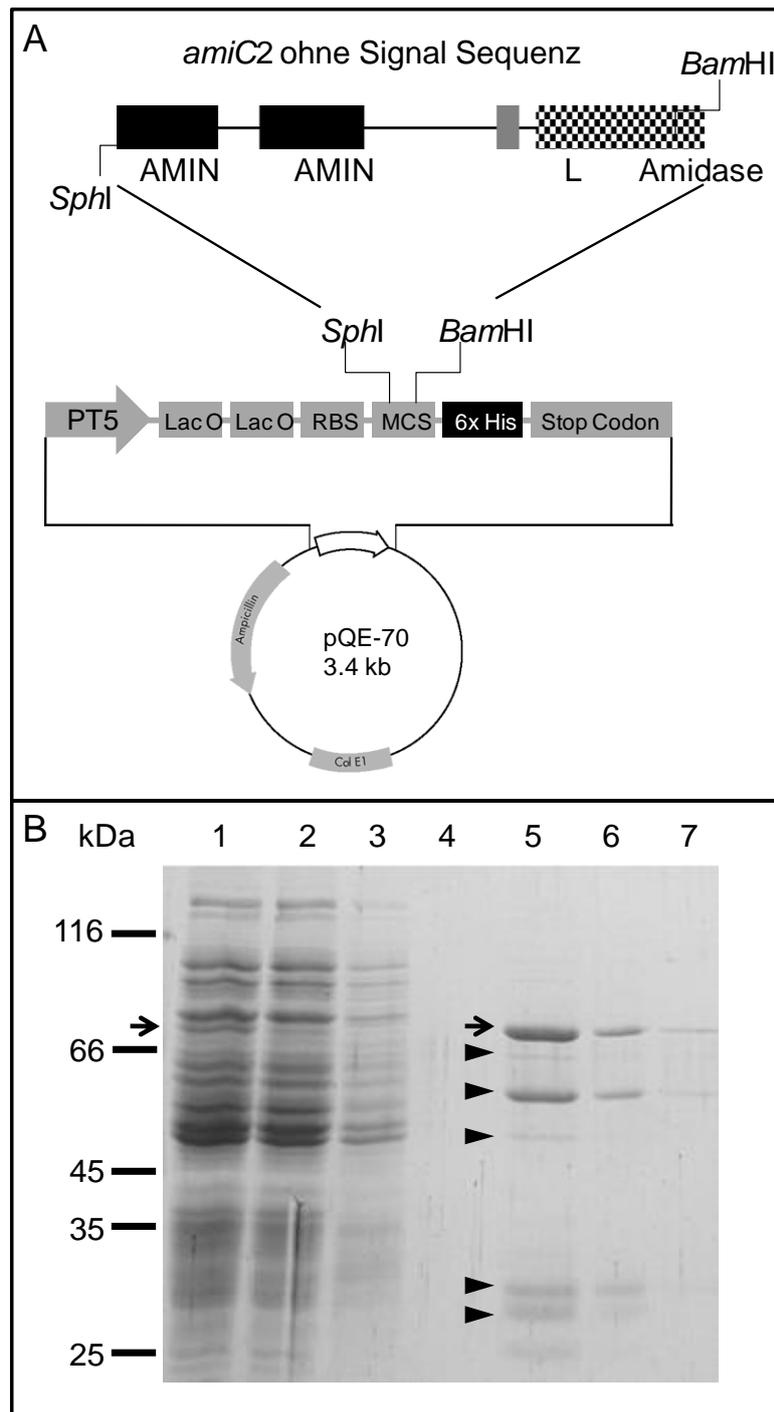


Abb. 22: Schematische Darstellung der Konstruktion des AmiC2-6xHis-Expressionsplasmids pIM347 und der Überexpression von AmiC2-6xHis.

A: Konstruktion des Überexpressionsvektors pIM347 mit ColE1, Replikationsursprung; 6xHis, C-terminaler Hexahistidin-Tag; PT5, T5-Promotor; LacO, Lac-Operator; MCS, *multiple cloning site*; RBS, Ribosomenbindestelle; *SphI* und *BamHI*, Restriktionsschnittstellen. B: Darstellung der Reinigung von AmiC2-6xHis im Coomassie gefärbten SDS-Gel (12 %) mit den Zwischenschritten: 1: Rohextrakt nach 2 h IPTG-Induktion; 2: Durchlauf nach Ni-NTA Säule (5 µl); 3-4: erster und letzter Waschschritt (5 µl); 5-7: entsprechende Elutionsfraktionen (10 µl). Pfeil zeigt auf das AmiC2-Volllängenprotein. Pfeil zeigt auf das 68 kDa große Volllängenprotein, Pfeilspitzen auf dessen autoproteolytische Abbaubanden.

Nach Überexpression in *E. coli* und Aufreinigung über eine Nickel-NTA-Säule erhielt man ein 68 kDa großes rekombinantes AmiC2-Protein mit einer Konzentration von 1 mg/ml in einem Gesamtvolumen von 10 ml. Die Qualität der Reinigung wurde mittels Gelelektrophorese getestet (Abb. 22B). Spur 1 zeigt den Rohextrakt ganzer Zellen nach 2 h IPTG-Induktion. Die zweite Spur zeigt den Säulen-Durchlauf, nachdem AmiC2 vollständig an die Säule gebunden hat (Abb. 22B, Pfeil). Der letzte von zwei Waschsritten, Spur 4, garantierte, dass alle ungebundenen Fragmente entfernt wurden und somit die Elutionen in Spuren 5-8 nahezu rückstandsfrei von unspezifischen Proteinen waren. Die Elutionsfraktionen zeigen mehrere Banden, das Volllängenprotein bei 68 kDa und mehrere autoproteolytische Abbaubanden zwischen 55 und 25 kDa (Abb. 22B, Pfeilspitzen).

E.2.2 Zymogramm des gereinigten AmiC2-Proteins

Die Zellwandhydrolase-Aktivität der rekombinanten Amidase AmiC2-6xHis wurde mittels eines Zymogramms nachgewiesen (Abb. 23). Hierfür wurden *E. coli* Zellpräparate als Substrat in ein SDS-Gel eingegossen. Durch den enzymatischen Abbau der Zellwandbestandteile kam es zur Bildung einer klaren Bande im Gel. Mit Methylenblau wurde das Zymogramm angefärbt, wobei sich ein farblicher Kontrast zwischen den nicht angefärbten klaren Banden und den blau gefärbten Zellwandbestandteilen bildete.

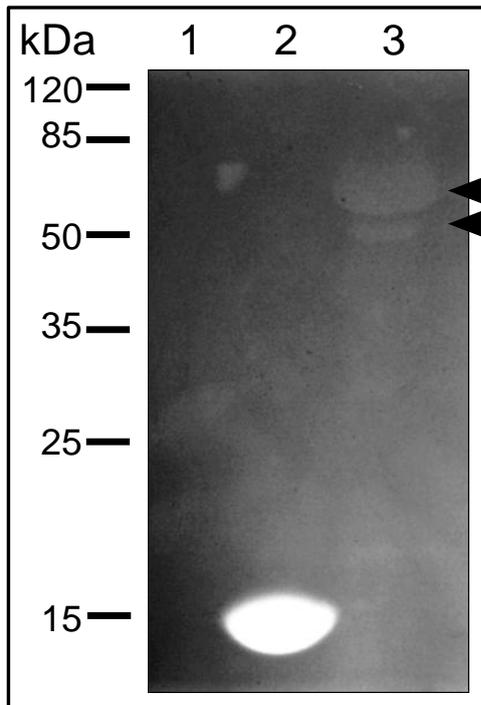


Abb. 23: Nachweis der Zellwandhydrolase-Aktivität der Amidase AmiC2-6xHis mittels Zymogramm.

Zymogramm-Analyse zum Nachweis der Hydrolase-Aktivität des rekombinanten AmiC2-6xHis-Proteins in *E. coli* Zellwandpräparaten. Spur 1: Negativkontrolle mit 10 µg BSA. Spur 2: Positivkontrolle mit 10 µg Lysozym. Spur 3: 30 µg AmiC2-6xHis. Pfeile zeigen auf die aufgeklärten Bereiche von AmiC2.

Im Zymogramm sind drei Spuren aufgetragen. Wie erwartet hat BSA als Negativkontrolle keine Hydrolyseaktivität und zeigt somit keine Aufklärung des Zymogramms (Abb. 23, Spur 1). Hingegen ist eine deutliche Aufklärung des Gels dort zu erkennen, wo Lysozym als Positivkontrolle aufgetragen wurde (Abb. 23, Spur 2). Lysozym hat eine hohe Murein-degradierende Aktivität, weshalb auf Höhe des Molekulargewichts von Lysozym (15 kDa) eine helle Bande ersichtlich wurde. In Spur 3 wurde das gereinigte, rekombinante AmiC2-6xHis-Protein aufgetragen (Abb. 23, Spur 3 Pfeile). Dort zeigten sich zwischen 85 und 50 kDa zwei schwach helle Banden. Die obere Bande entspricht mit 68 kDa dem Volllängenprotein AmiC2-6xHis. Die knapp darunter befindliche Bande entspricht dem autoproteolytischen Spaltprodukt der Amidase mit 55 kDa. Beide Banden entstanden durch Hydrolyse des Mureins und der damit verbundenen Aufklärung der Banden im Bereich der enzymatischen Aktivität. Die kleineren Spaltprodukte unter 55 kDa hatten im Zymogramm keine lytische Aktivität. Folglich hatten nur das Volllängenprotein und das 55 kDa Spaltprodukt eine Zellwandhydrolase-Aktivität.

Die Abbildung 24 zeigt zusammenfassend die proteolytische und zellwandlytische Aktivität des AmiC2-6xHis-Proteins.

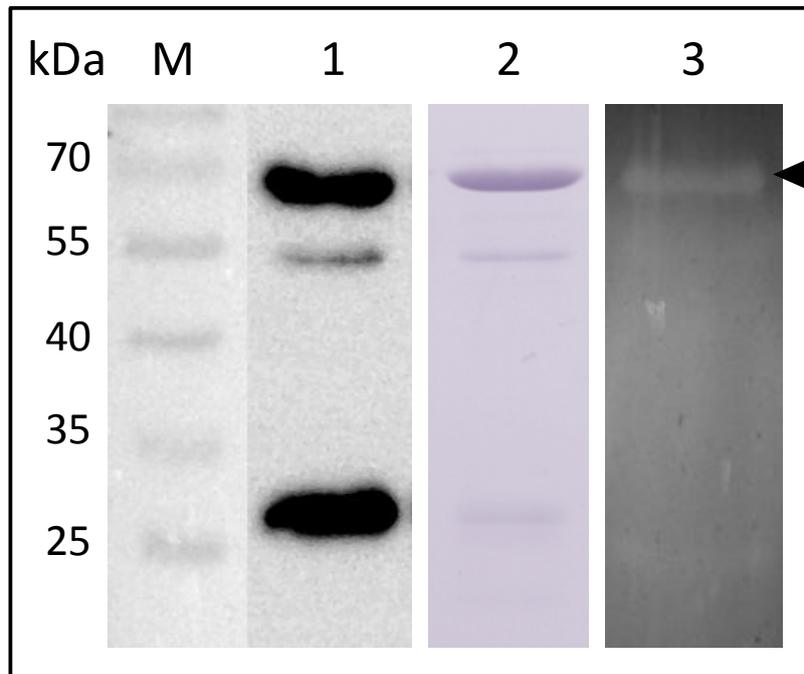


Abb. 24: Übersicht über die autoproteolytische und Zellwand-Hydrolase-Aktivität von AmiC2-6xHis.

Spur 1: Immunodetektion der proteolytischen Spaltprodukte von AmiC2-6xHis mit 6xHis-AK. 20 ng des gereinigten AmiC2-6xHis wurden aufgetragen. Verdünnung primärer AK 1:5.000; Verdünnung sekundärer Antimaus-HRP-AK 1:10.000. Spur 2: Coomassie gefärbtes SDS-Gel mit 10 µg gereinigtem AmiC2-6xHis. Spur 3: Methylenblau gefärbtes Zymogramm mit 10 µg gereinigtem AmiC2-6xHis. Pfeil zeigt auf den aufgeklärten Bereich des Zymogramms. M: Marker.

Sowohl im Immunoblot (Abb. 24, Spur 1) als auch im Coomassie gefärbten SDS-Gel (Abb. 24, Spur 2) wurden jeweils drei charakteristische Banden erkennbar, welche das Volllängenprotein bei 68 kDa und zwei Spaltprodukte bei 55 bzw. 30 kDa zeigten. Folglich wurde AmiC2 vor der Reinigung autoproteolytisch gespalten und die restlichen Spaltprodukte bei der Affinitätsreinigung entfernt.

Das Zymogramm zeigte die Zellwandhydrolase-Aktivität der Amidase, wobei hier nur 10 µg rekombinantes Protein verwendet wurden. Diese Menge an eingesetztem Protein war zu niedrig, weshalb nur eine Enzymaktivität im höher konzentrierten Volllängenprotein nachgewiesen werden konnte. Das wesentlich geringer konzentrierte 55 kDa Spaltprodukt hatte im Zymogramm somit keinen aufklärenden Effekt (Abb. 24, Spur 3).

E.2.3 Detektion von AmiC2 in differenzierten Zellen von *N. punctiforme* mittels Immunoblot

Um das AmiC2-Protein im Rohextrakt der verschiedenen Differenzierungsformen von *N. punctiforme* zu detektieren, wurde AmiC2 mittels Immunoblot in vegetativen Zellen, Heterozysten, Hormogonien und Akineten nachgewiesen (Abb. 25). Hierfür wurde ein polyklonaler Antikörper gegen AmiC2 aus *N. punctiforme* verwendet (D.7.8).

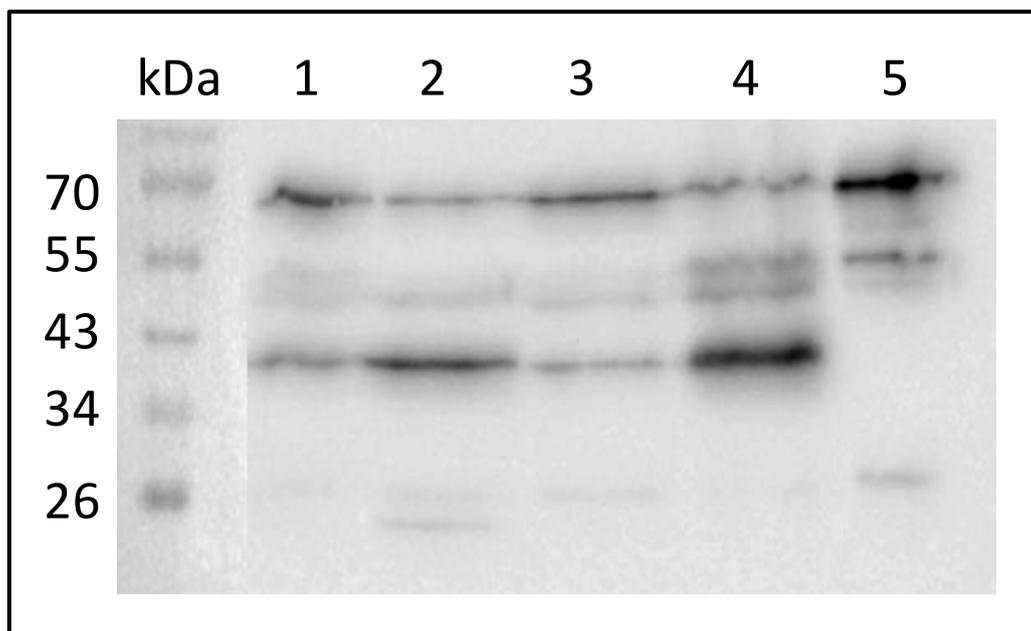


Abb. 25: Nachweis von AmiC2 in Zellextrakten differenzierter Zellen von *N. punctiforme* mittels Immunoblot.

Immunoblot von *N. punctiforme* Ganzzellextrakten aus vegetativen Zellen (Spur 1), Heterozysten 48 h nach Induktion (Spur 2), Hormogonien (Spur 3) und Akineten (Spur 4). Gesamtproteingehalt pro Spur 20 µg. Positivkontrolle (Spur 5): 20 ng gereinigtes AmiC2-6xHis. Durch die Induktion enthielten die Rohextrakte ca. 80 % differenzierte Zellen. Der primäre AmiC2-AK wurde in einer Verdünnung von 1:3.000, der sekundäre AK von 1:10.000 eingesetzt.

Der Immunoblot zeigte in allen Spuren das charakteristische AmiC2-Volllängenprotein bei 68 kDa in unterschiedlicher Intensität (Abb. 25, Spur 1-5). Die höchsten Konzentrationen waren in den vegetativen Zellen (Abb. 25, Spur 1) und in der Hormogonienextrakten (Abb. 25, Spur 3) zu erkennen. AmiC2 hatte *in vivo* ein anderes autoproteolytisches Spaltungsmuster als das rekombinante AmiC2-6xHis-Protein. Dort erschien das größere Spaltprodukt bei ca. 50 kDa (Abb. 25, Spur 5), statt bei ca. 40 kDa wie im Ganzzellextrakt von *N. punctiforme* (Abb. 25, Spur 1). In den Rohextrakten der vegetativen Zellen und der

Hormogonien (Abb. 25, Spur 1+3) war ein höherer Anteil des Volllängenproteins festzustellen als in den Heterozysten und Akineten (Abb. 25, Spur 2+4). Wiederum war in diesen Extrakten die Konzentration der Spaltprodukte höher als in den Rohextrakten der vegetativen Zellen und Hormogonien, vorausgesetzt man geht davon aus, dass es sich hierbei um die Epitope des Spaltprodukts von AmiC2 handelte.

E.2.4 Immunoblot-Analyse der *amiC* Knockout-Mutanten in *Anabaena* PCC 7120 und *N. punctiforme*

Nostoc punctiforme, *Nostoc azollae*, *Nodularia*, *Anabaena* PCC 7120 und *Anabaena variabilis* gehören zur Gruppe der filamentösen Cyanobakterien mit Differenzierungspotential. Alle Stämme haben ein *amiC*-Cluster mit zwei aufeinanderfolgenden Amidasen, *amiC1* und *amiC2*, mit gleicher Domänenorganisation (Abb. 26A). Beide AmiC-Proteine haben mit 68 kDa das gleiche Molekulargewicht. Ebenso weisen AmiC1 und AmiC2 von *N. punctiforme* und *Anabaena* PCC 7120 eine starke Homologie untereinander auf. Die prozentualen Identitäten errechneten sich aus dem direkten Sequenzvergleich mit AmiC2 aus *N. punctiforme* (Abb. 26A). AmiC2 aus *Anabaena* PCC 7120 hat die größte Ähnlichkeit zu AmiC2 aus *N. punctiforme*, gefolgt von AmiC1 aus *N. punctiforme* und AmiC1 aus *Anabaena* PCC 7120.

Über Immunoblot sollte experimentell die Fragestellung geklärt werden, ob das *Nostoc* AmiC2-Antiserum auch beim nahen Verwandten, dem filamentösen Cyanobakterium *Anabaena* PCC 7120 eine messbare Avidität zeigt. Zudem sollte die Spezifität des AKs anhand der *amiC2*-Mutante als Negativkontrolle getestet werden.

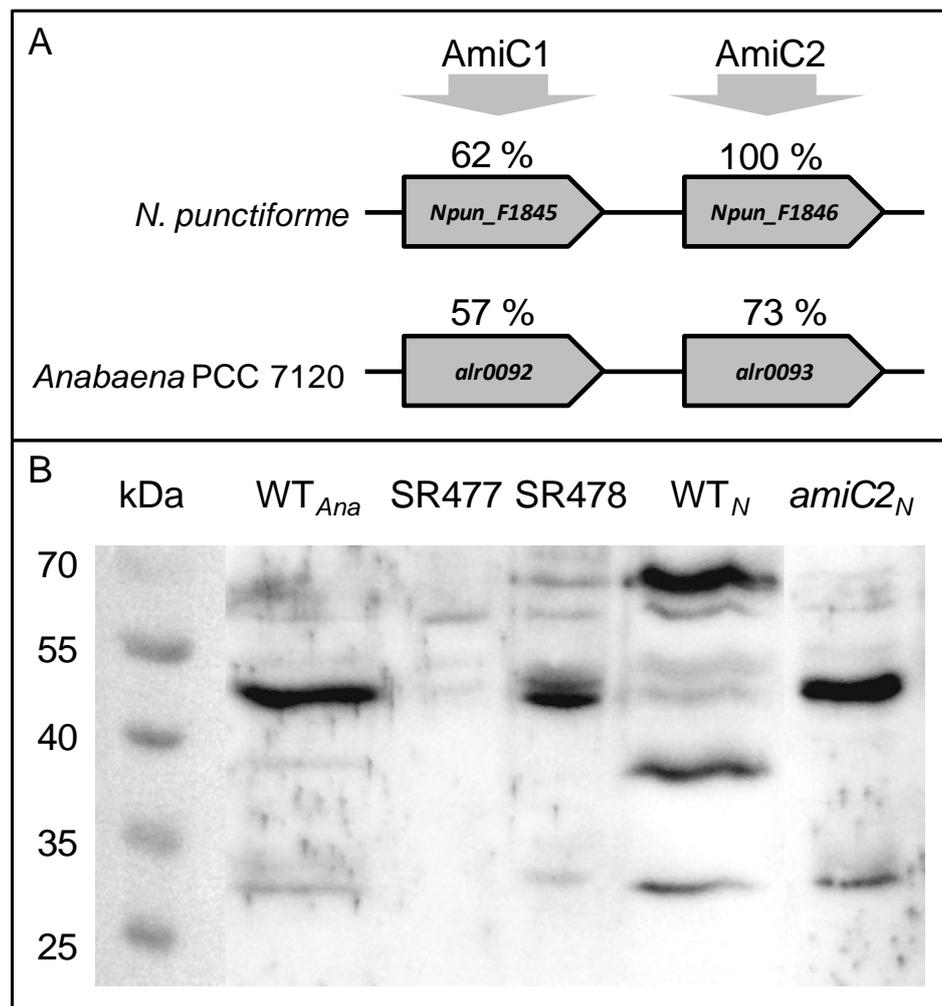


Abb. 26: Homologie des *amiC*-Clusters und Immunoblot-Analyse des AmiC1 und AmiC2 von *Nostoc* und *Anabaena*.

A: Schematische Darstellung der *amiC*-Gencluster von *N. punctiforme* und *Anabaena* PCC 7120 mit den entsprechenden Aminosäureidentitäten in % ausgehend von AmiC2 aus *N. punctiforme*. B: Immunoblot-Analyse von *Anabaena* PCC 7120 WT (WT_{Ana}) und der Mutanten *amiC1* (SR477) und *amiC2* (SR478) von *Anabaena* (Berendt *et al.*, 2012) im Vergleich zum *N. punctiforme* WT (WT_N) und der *amiC2*-Mutante von *N. punctiforme* (*amiC2_N*). Immunoblot von jeweils 20 µg Ganzzellextrakten. Der primäre AK wurde in einer Verdünnung von 1:3.000, der sekundäre AK von 1:10.000 eingesetzt.

Im *Anabaena* PCC 7120 WT bindet der Antikörper an ein Protein zwischen 40 und 55 kDa (Abb. 26B, WT_{Ana}). Ein ähnlich großes Protein erkennt dieser auch bei SR478 (Abb. 26B, SR478). Bei SR477 werden diese Proteine nicht erkannt (Abb. 26B, SR478).

Hingegen erkennt der Antikörper im *N. punctiforme* WT das AmiC2 Volllängenprotein und mehrere kleine Banden (Abb. 26B, WT_N). In der *amiC2*-Mutante kam es zu keinem Immunsignal auf Höhe des Volllängenproteins, stattdessen wurde aber ein Protein zwischen 55 und 40 kDa erkannt (Abb. 26B, *amiC2_N*).

E.2.5 Immunodetektion mit affinitätsgereinigten AmiC2-Antikörper

Da das Immunsereum gegen AmiC2-6xHis auch unspezifische Bindungen an möglicherweise andere Amidasen in *N. punctiforme* aufwies, wurden 10 ml der IgG-Fractionen über CNBr-aktivierte Sepharose affinitätsgereinigt. Die Qualität der Affinitätsreinigung wurde mittels Immunoblot überprüft (Abb. 27).

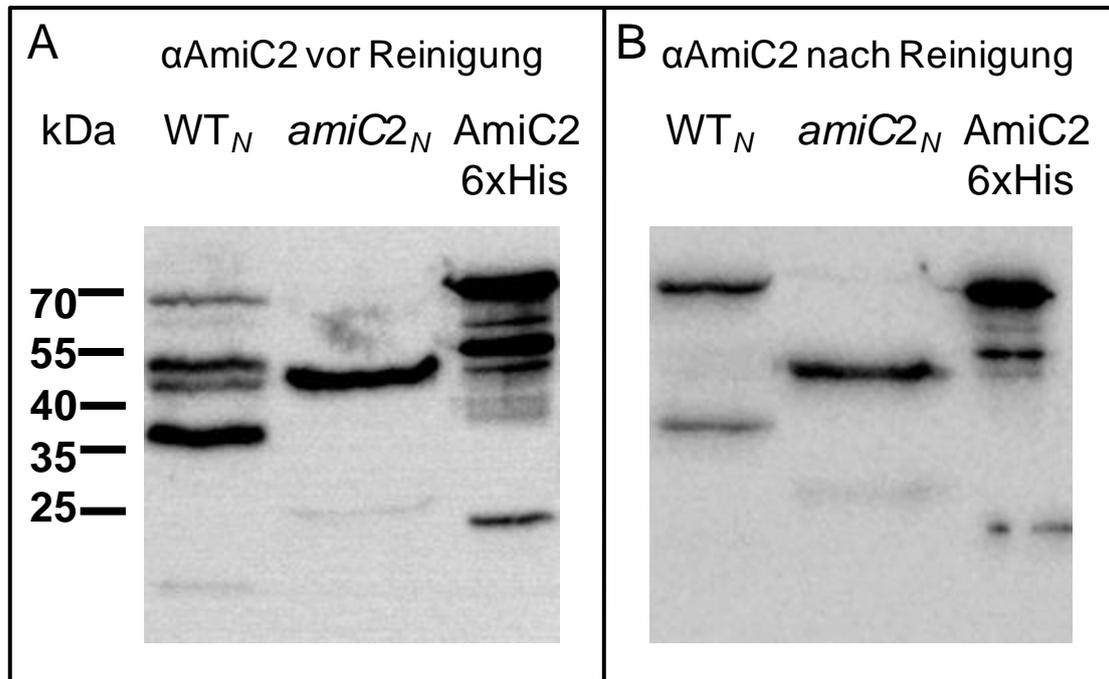


Abb. 27: Vergleich der Spezifität von Antiserum und affinitätsgereinigtem Antikörper an Rohextrakten von *N. punctiforme*.

Immunoblots mit AmiC2-Antiserum (A) und affinitätsgereinigtem Antikörper (B). Für beide Blots wurden 20 µg Zellextrakt von *N. punctiforme* WT (WT_N), 20 µg Zellextrakt der *amiC2*-Mutante- (*amiC2*_N) und 20 ng gereinigtes AmiC2-6xHis-Protein (AmiC2 6xHis) verwendet. Verdünnung des primären AKs ungereinigt 1:3.000, gereinigt 1:600 und des sekundären AKs 1:10.000.

Abbildung 27 zeigt den Vergleich der Immunoblots von ungereinigtem AK (Abb. 27A) und gereinigtem AK (Abb. 27B). Verwendet wurden Zellextrakte des WTs von *N. punctiforme* (Abb. 27A, WT_N; Abb. 27B, WT_N), der *amiC2*-Mutante (Abb. 27A, *amiC2*_N; Abb. 27B, *amiC2*_N) und das gereinigte AmiC2-6xHis-Protein (Abb. 27A, AmiC2 6xHis; Abb. 27B, AmiC2 6xHis). Der gereinigte Antikörper erkannte nur noch zwei Proteine im WT (Abb. 27B, WT_N), die in der *amiC2*-Mutante nicht auftraten (Abb. 27B, *amiC2*_N). Peptide zwischen 40 und 55 kDa wurden vom Antiserum noch zusätzlich erkannt (Abb. 27A, WT_N),

von denen nur das kürzere Protein auch in der *amiC2*-Mutante vorhanden war (Abb. 27A, *amiC2_N*). Beide Antikörperfraktionen erkannten in der *amiC2*-Mutante ein Protein bei 45 kDa und zwei schwache Banden bei 25 kDa und auf Höhe des Volllängenproteins (Abb. 27, Spuren *amiC2_N*). Das bedeutet, dass der Antikörper vermutlich AmiC1 schwach als Volllängenprotein detektiert. Die darunter-liegenden Banden (40 - 55 kDa, 25 kDa) sind vermutlich Spaltprodukte des AmiC1-Proteins.

E.2.6 Immunoblot-Analyse der AmiC-Domänen mit spezifischen Peptid-Antikörpern

Da der polyvalente Antikörper gegen AmiC2 auch unspezifisch AmiC1 der *amiC2*-Mutante von *N. punctiforme* erkannte (Abb. 28), ist dieser für die AmiC2-Detektion mit Immunogold an Dünnschnitten im Elektronenmikroskop nicht zu verwenden. Dies ist auf die starke Homologie der beiden Amidasen zurückzuführen, wodurch wahrscheinlich Epitope in AmiC1 ebenfalls erkannt werden.

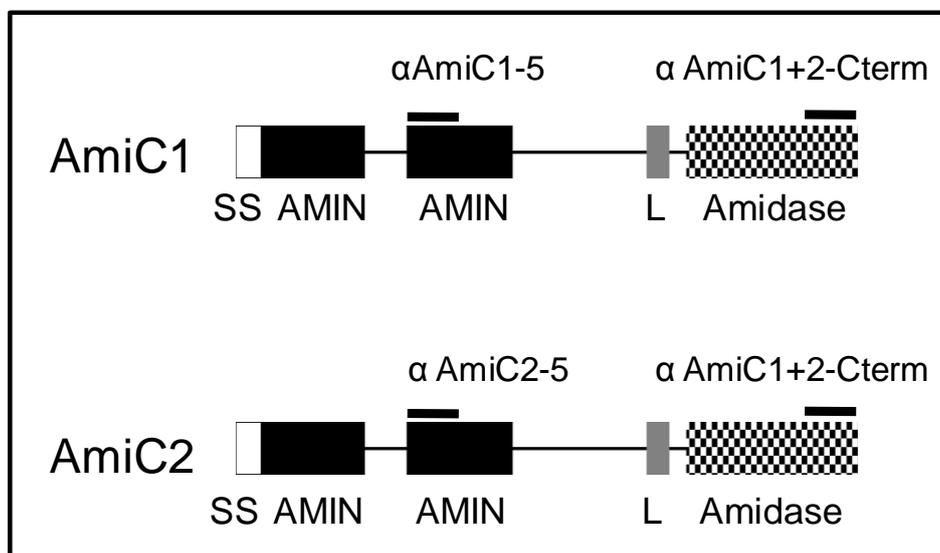


Abb. 28: Binderegionen der Peptid-Antikörper von AmiC1 und AmiC2.

Die drei Peptid-Antikörper (α AmiC1-5, α AmiC2-5 und α AmiC1+2-Cterm) binden jeweils an spezifische Bereiche der Domänen (schwarze Balken). Der Antikörper AmiC1-5 bzw. AmiC2-5 bindet an die zweite AMIN-Domäne von AmiC1 bzw. AmiC2. Der Antikörper AmiC1+2-Cterm erkennt wiederum Epitope von AmiC1 und AmiC2 in der enzymatischen Amidase-Domäne.

Für die Gewinnung der Peptid-Antikörper wurden neun Kaninchen mit jeweils drei unterschiedliche synthetisierten Peptiden immunisiert, die verschiedenen Domänen von AmiC1 bzw. AmiC2 zuzuordnen waren (Abb. 28).

Mit diesen spezifischen Antikörpern sollten im Immunoblot nicht nur AmiC1 von AmiC2 differenziert, sondern auch Spaltprodukte von AmiC2 identifiziert und den entsprechenden Domänen zugeordnet werden (Abb. 29). In der folgenden Abbildung 29 wurden jeweils die Blots mit den besten Immunantworten gegen die Domänen von AmiC1 und AmiC2 gezeigt.

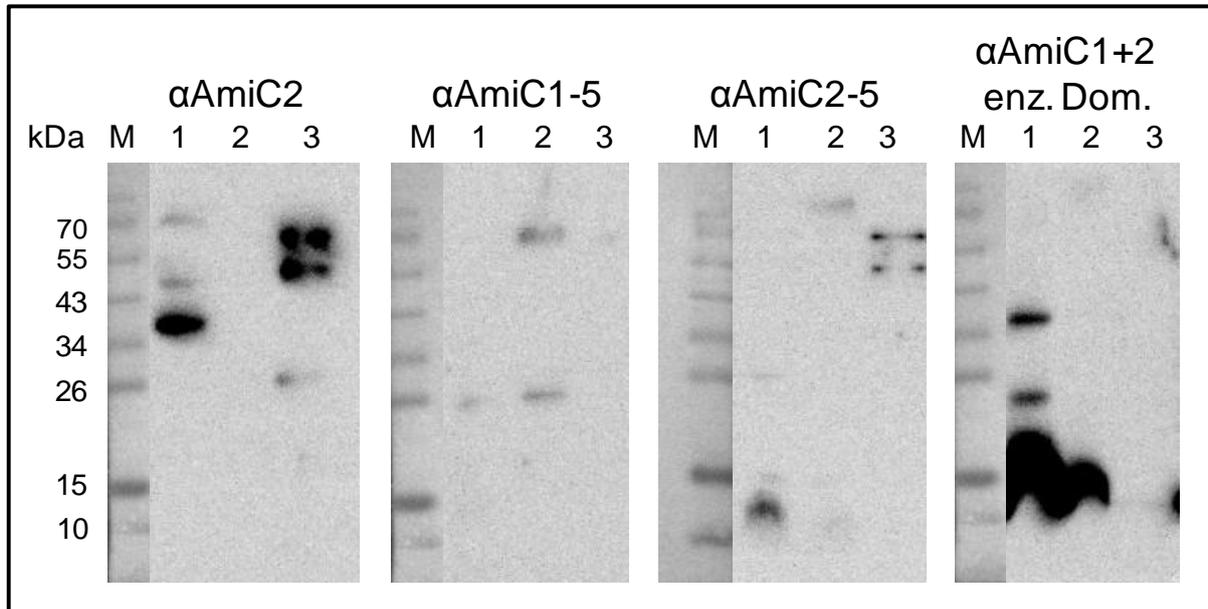


Abb. 29: Immunoblot-Analyse der AMIN- und enzymatischen Domäne von AmiC1 und AmiC2.

Die Peptid-Antikörper wurden im Immunoblot auf ihre AmiC2-Avidität getestet. Hierfür wurden Ganzzellextrakt des WT's *N. punctiforme* (1) und der *amiC2*-Mutante (2) und gereinigtes AmiC2-Protein verwendet. Die Gesamtproteinmenge der Ganzzellextrakte betrug 20 μg , vom gereinigten Protein wurden 20 ng eingesetzt. Von den jeweils drei Tieren pro Peptid wurde der sensitivste Blot eines Tieres abgebildet. Die Verdünnung des primären AKs war 1:500, die des sekundären AKs betrug 1:10.000.

Die Positivkontrolle, welche mit dem polyklonalen AmiC2-Antikörper durchgeführt wurde, zeigte sowohl beim Ganzzellextrakt (Abb. 29, αAmiC2 , Spur 1) als auch beim gereinigten Protein (Abb. 29, αAmiC2 , Spur 3) das typische Bandenmuster mit dem Vollängenprotein (68 kDa) und den zwei Abbaubanden (zwischen 55 und 26 kDa). Die Negativkontrolle mit *amiC2*-Zellextrakt imitierte kein Signal (Abb. 29, αAmiC2 , Spur 2).

Der Antikörper AmiC1-5, welcher spezifisch an die AMIN-Domäne des AmiC1-Proteins binden sollte, zeigte beim WT auf Höhe des Vollängenproteins kein Signal, aber eine schwache Bande bei 26 kDa (Abb. 29, $\alpha\text{AmiC1-5}$, Spur 1). Bei der *amiC2*-Mutante wurde ebenfalls eine Bande bei 26 kDa erkannt und zusätzlich eine Bande auf Höhe des Vollängenproteins (Abb. 29, $\alpha\text{AmiC1-5}$, Spur 2). Das AmiC2-Protein wird vom AmiC1-spezifischen Antikörper nicht erkannt (Abb. 29, $\alpha\text{AmiC1-5}$, Spur 3).

Der Antikörper AmiC2-5 zeigte im Ganzzellextrakt des WTs zwei schwache, aber klare Banden bei 26 und 15 kDa (Abb. 29, α AmiC2-5, Spur 1). Knapp unter 15 kDa wurde ein undeutlicher „Schmier“ detektiert. In der Mutante wurde ein unspezifisches Signal bei über 70 kDa festgestellt, was bedingt durch das hohe Molekulargewicht nicht AmiC1 zugeordnet werden konnte (Abb. 29, α AmiC2-5, Spur 2). Im gereinigten AmiC2-Protein erkannte der Antikörper das Volllängenprotein und ein Abbauprotein auf Höhe von 50 kDa, nicht aber das kleinere Abbauprodukt bei 30 kDa (Abb. 29, α AmiC2-5, Spur 3).

Im letzten Blot sind beim WT zwei deutliche Banden zwischen 43 und 20 kDa und ein undeutlicher „Schmier“ unter 20 kDa zu erkennen (Abb. 29, α AmiC1+2 enz. Dom., Spur 1). Ein solcher „Schmier“ auf gleicher Höhe wurde auch in der *amiC2*-Mutante identifiziert (Abb. 29, α AmiC1+2 enz. Dom., Spur 2). Das gereinigte AmiC2-Protein wurde vom Antikörper AmiC1+2 enz. Dom. nicht festgestellt (Abb. 29, α AmiC1+2 enz. Dom., Spur 3), was dafür spricht, dass dieser spezifisch nur AmiC1 erkennt.

E.3 Gezielte Mutagenese des Septum-lokalisiereten Proteins SepJ_N in *N. punctiforme*

SepJ (septales Protein) ist ein im Septum lokalisiertes Protein filamentöser Cyanobakterien (Flores *et al.*, 2007, Berendt, 2011). Die Funktion des Proteins ist noch nicht eindeutig geklärt, vermutlich ist es Teil von Zell-Zell-verbindenden Strukturen oder an der Ausbildung dieser beteiligt (Flores *et al.*, 2007, Mullineaux *et al.*, 2008). Deletionsmutanten von *sepJ* im filamentösen Cyanobakterium *Anabaena* PCC 7120 zeigten eine starke Fragmentierung der Filamente in kurze Teilstücke sowie einen frühen Abbruch der Heterozysten-Differenzierung (Flores *et al.*, 2007, Nayar *et al.*, 2007, Mariscal *et al.*, 2011). Zusätzlich haben *sepJ*-Mutanten einen stark verringerten Molekülaustausch von Zelle zu Zelle (Mullineaux *et al.*, 2008). Ein Vergleich der SepJ-Proteine verschiedener filamentöser Cyanobakterien zeigte die drei charakteristischen Domänen, die in allen untersuchten Vertretern vorkommen (Mariscal *et al.*, 2011) (Abb. 30).

Filamentöse Heterozysten bildende Cyanobakterien	Cyanobakterium	SepJ Domänen			Länge	Identität (%)		
		CC	L	P	AS	CC	L	P
	<i>Anabaena</i> 7120					751	100	100
<i>A. variabilis</i>					751	99	92	98
<i>Nodularia spumigena</i>					853	69	41	63
<i>N. punctiforme</i>					779	69	22	58
<i>N. azollae</i>					728	60	33	58

Abb. 30: Domänenorganisation cyanobakterieller SepJ-Proteine.

SepJ-Homologe in filamentösen Cyanobakterien wurden durch Homologievergleiche über NCBI Datenbank ermittelt (bezogen auf: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dabei wurde die Homologie der einzelnen Domänen zu *Anabaena* PCC 7210 in % ermittelt. CC, coiled-coil-Domäne; L, Linker-Domäne; P, membranintegrierende Permease-Domäne; AS, Aminosäuren. (Abbildung nach Mariscal *et al.*, 2011)

Dazu gehören eine N-terminale coiled-coil-Domäne (CC), eine Linker-Domäne (L) und eine C-terminale membranintegrierende Permease-Domäne (P).

Im Hinblick auf die Funktion von SepJ_N bei der Filamentintegrität, Zelldifferenzierung und diazotrophen Wachstum im multizellulären Organismus *N. punctiforme* sollte eine Insertionsmutante generiert und anschließend charakterisiert werden.

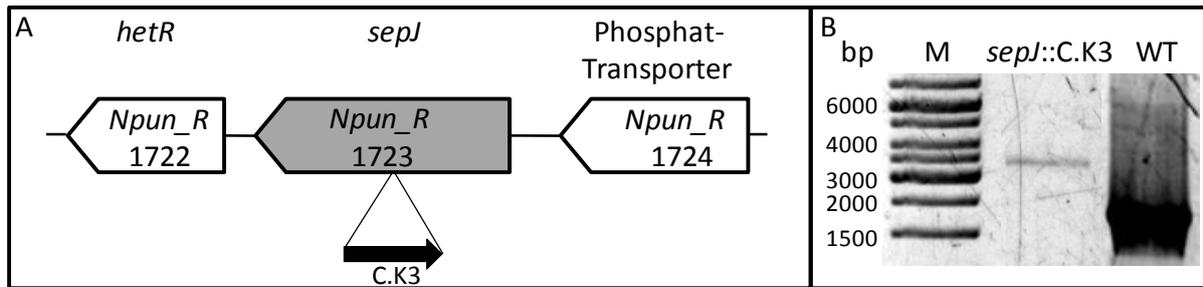


Abb. 31 Generierung der *sepJ_N*-Mutante in *N. punctiforme* und die Überprüfung der Integration der Resistenzkassette.

A: Schematische Darstellung der genomischen Organisation der *sepJ_N*-Region in *N. punctiforme* (bezogen auf: “http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/NPUN/genes/Npun_R1723”) und der Insertion der Resistenzkassette C.K3 in *sepJ_N*. B: PCR-Analyse über Integration der Resistenzkassette C.K3 in das *sepJ_N*-Gen von *N. punctiforme* (*sepJ_N::C.K3*) im Vergleich zum Wildtyp als Kontrolle (WT). Als Primer wurden Oligo 424 und Oligo 425 verwendet. M, Marker.

Das *sepJ_N*-Gen in *N. punctiforme* wurde durch die Integration der Resistenzkassette C.K3 nach konjugalem Transfer von pIM302 ausgeschaltet (Abb. 31A). Mittels PCR wurde die Integration der Resistenzkassette überprüft (Abb. 31B, *sepJ_N::C.K3*) und gegen den WT als Kontrolle verglichen (Abb. 31B, WT). Die Kontroll-PCR mit *sepJ_N*-spezifischen Primern zeigte, dass die C.K3-Kassette (1,1 kb) durch homologe Rekombination in das vollständig segregierte Genom eingebaut worden war und somit kein PCR Produkt bei 2 kb auf Höhe des WTs zu sehen war. Die Komplementation der Mutation durch Elektroporation mit dem Plasmid pIM474 wurde mehrmals versucht. Es wurden jedoch keine Klone erhalten (Berendt *et al.*, 2012).

E.3.1 Wachstumsanalyse der *sepJ_N*-Mutante

In diesem Test wurde zum einen das Wachstumsverhalten der *sepJ_N*-Mutante im Vergleich zum WT *N. punctiforme* in BG11-Medium (mit Stickstoffquelle) bzw. BG11₀-Medium (ohne Stickstoffquelle) untersucht (Abb. 32A) als auch das Wachstum auf BG11- und BG11₀-Agarmedien durch die Bildung von Pseudokolonien (Tropfentest) getestet (Abb. 32B).

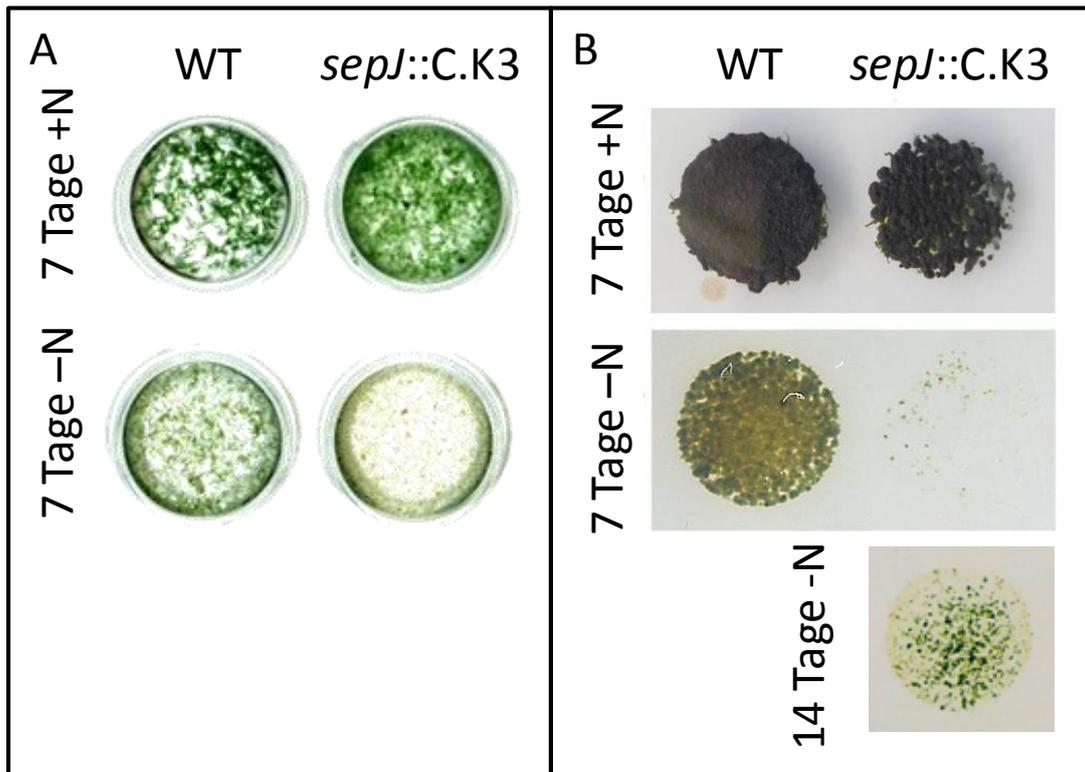


Abb. 32: Wachstumstest der *sepJ_N*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp *N. punctiforme*.

A: Der WT *N. punctiforme* und die Mutante *sepJ_N* wurden in BG11-Flüssigmedium mit Stickstoffquelle (+N) und BG11₀-Flüssigmedium ohne Stickstoffquelle (-N) für sieben Tage unter Weißlicht-Bedingungen und Schütteln (120 rpm) inkubiert. Für die bessere Darstellung wurde 1 ml jeder Kultur in Mikrotiterplatten überführt. B: Jeweils 20 µl Zellsuspension des WTs und der *sepJ_N*-Mutante mit einer Konzentration von 1 µg Chl. a/ml wurden auf Agarplatten getropft und bei Weißlicht-Bedingungen 7 bzw. 14 Tage inkubiert.

In BG11-Flüssigmedium als auch auf BG11-Agarplatten wuchsen sowohl die WT-Kontrolle (Abb. 32A+B, WT, +N) als auch die *sepJ_N*-Mutante (Abb. 32A+B, *sepJ_N::C.K3*, +N) gleich gut. Hingegen war die *sepJ_N*-Mutante nach sieben Tagen unter Stickstoffmangel ausgebleichen (Abb. 32A+B, *sepJ_N::C.K3*, -N). Im Vergleich zum WT (Abb. 32A+B, WT, -N), der intensiv grün war, zeigte sich die Mutante vollständig gelb. Erst nach 14 Tagen war die *sepJ_N*-Mutante auf der BG11₀-Agarplatte angewachsen und hatte voll funktionsfähige Heterozysten, was mikroskopisch überprüft wurde (Abb. 32B, *sepJ_N::C.K3*, 14 Tage -N). Mittels PCR wurde abermals die Integration der C.K3 Kasette überprüft. Eine Bande bei ca. 3500 bp bestätigte eine vollständig segregierte *sepJ_N*-Mutante (Daten nicht gezeigt). Folglich hatte die *sepJ_N*-Mutante im Vergleich zum WT ohne gebundene Stickstoffquelle nur anfänglich ein Wachstumsdefizit, welches sich nach 14 Tagen relativierte.

E.3.2 Zelldifferenzierung der *sepJ_N*-Mutante

Die *sepJ_N*-Mutante war nach Stickstoffentzug in den ersten zwei Wochen nicht befähigt auf N₂ zu wachsen. Mikroskopisch sollte nun beleuchtet werden, ob die für die Stickstoff-fixierung wichtigen Heterozysten, sowie Hormogonien und Akineten differenziert werden konnten.

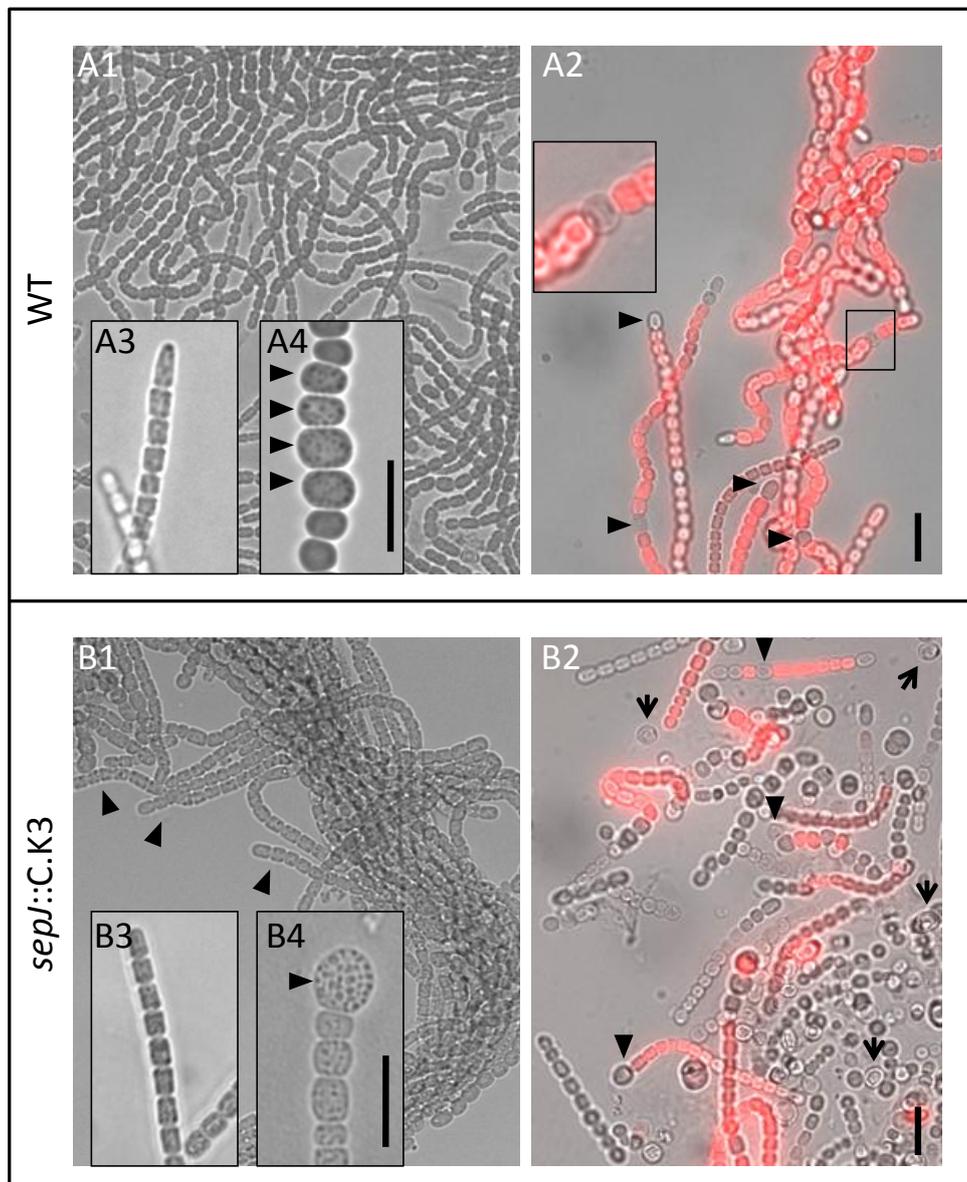


Abb. 33: Zelldifferenzierung der *sepJ_N*-Mutante im Vergleich zum WT *N. punctiforme*.

Durchlicht-Bilder von vegetativen Zellfilamenten des WTs (A1) der *sepJ_N*-Mutante (B1). Überlagerungen von Durchlicht- und Autofluoreszenz-Aufnahmen von Heterozystenkulturen des WTs (A2) und *sepJ_N*-Mutante (B2) sieben Tage nach Stickstoffmangel. Pfeilspitzen zeigen auf reife Heterozysten, Pfeile auf fragmentierte bzw. defekte Heterozysten. 48 h nach Hormogonien-Induktion des WTs (A3) und der Mutante (B3). Akinetenbildung des WTs (A4) und der Mutante (B4) nach sieben Tagen unter Phosphatmangel. Pfeilspitzen zeigen auf Akineten.

In BG11-Medium wächst die *sepJ_N*-Mutante ohne einen morphologisch auffälligen Phänotyp. (Abb. 33B1). Eine Fragmentierung der Filamente wie bei der *SepJ*-Mutante von *Anabaena* PCC 7120 konnte jedoch nicht beobachtet werden (Nayar *et al.*, 2007, Flores *et al.*, 2007). Die mikroskopische Überprüfung der verschiedenen Zelldifferenzierungsformen wurde nach Induktion durchgeführt. Differenzierungsexperimente mit dem WT dienten dabei als Positivkontrolle (Abb. 33A1-A4). In der WT-Kultur bildeten sich 48 h bis hin zu einer Woche nach Stickstoffmangel in BG11₀-Flüssigmedium voll funktionsfähige Heterozysten (Abb. 33A2). Diese konnten als nicht-fluoreszierende Zellen innerhalb eines Filaments fluoreszierender vegetativer Zellen in Durchlicht-Autofluoreszenz-Überlagerungsbildern identifiziert werden (Abb. 33A2, Vergrößerungsausschnitt). Hingegen waren in der Kultur der *sepJ_N*-Mutante sieben Tage nach Stickstoffmangel 90 % der Zellen geblichen (Abb. 33B2). Nur noch wenige Filamente hatten funktionsfähige Heterozysten, die N₂ fixieren konnten und somit das Filament mit dem notwendigen Stickstoff versorgten (Abb. 33B2, Pfeilspitzen). Neben geblichenen Filamenten befanden sich in der Stickstoffmangel-Kultur der *sepJ_N*-Mutante viele vereinzelt, tote Heterozysten (Abb. 33B2, Pfeile). 48 h nach Hormogonien-Induktion bildeten sich sowohl im WT als auch in der *sepJ_N*-Mutante kurze, bewegliche Hormogonien (Abb. 33A3+B3). Diese waren ebenfalls im BG11-Medium ohne Induktion zu identifizieren (zwischen 40 und 60 %) (Abb. 33B1, Pfeile). Nach sieben Tagen unter Phosphatmangel bildeten sowohl bei der Mutante als auch bei der WT-Kontrolle Akineten, die an ihrer überdurchschnittlichen Größe und der granularen Strukturen im Zellinnern identifiziert werden konnten (Abb. 33A4+B4).

F Diskussion

F.1 Die Funktion der Amidasen im Divisom bei der bakteriellen Zellteilung

Ein wichtiger Aspekt bei der Definition des Lebens ist Wachstum und Vermehrung. Dabei ist die Teilung in zwei Tochterzellen der abschließende Schritt im Wachstum einer Bakterienzelle. Die Amidasen widmen sich genau diesem Vorgang, indem sie im Divisom den letzten Schritt der Zellteilung vollziehen - die vollständige Abschnürung zweier Tochterzellen (Heidrich *et al.*, 2001). Die bakterielle Zellteilung in der Zellmitte nach Verdoppelung der Zelllänge und des genetischen Materials läuft in allen Bakterien nahezu gleich ab und ist in vielen Publikationen ausführlich beschrieben (Bi *et al.*, 1991, Weiss, 2004, Lutkenhaus, 2007). Bei der Trennung der Tochterzellen wird allerdings zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien unterschieden (Uehara & Bernhardt, 2011). Die meisten Gram-positiven Bakterien, wie beispielsweise *B. subtilis*, bilden während der Zellteilung ein flaches Septum in der Zellteilungsebene. Im Anschluss daran kommt es durch Einschnürung des gebildeten Septums zur Separierung der Tochterzellen (Burdett, 1979). Hingegen kommt es in der Zellteilungsebene einzelliger Gram-negativer Bakterien von Beginn der Zellteilung an zur sofortigen Einschnürung der Teilungsebene ohne vorhergehende Septum-Bildung (Adams & Errington, 2009). In beiden Fällen sind Hydrolasen die separierenden Enzyme (Vollmer & Höltje, 2004).

Im Modellorganismus *E. coli* gibt es 13 verschiedene Murein-Hydrolasen, wovon fünf Amidasen sind. AmiA, AmiB und AmiC sind die drei bestuntersuchten Amidasen in *E. coli*, wobei alle bei der Separierung der Tochterzellen beteiligt sind (Heidrich *et al.*, 2001). Von AmiC weiß man, dass es während der Zellteilung am Divisom lokalisiert ist, hingegen kommt AmiA im gesamten Periplasma verteilt vor (Bernhardt & de Boer, 2003). Auch in Cyanobakterien wurden Gene identifiziert, die für Zellwand-Amidasen kodieren. In einzelligen Cyanobakterien ist deren Funktion noch unklar, da die Inaktivierung dreier unterschiedlicher, *amiC*-homologer Gene in *Synechocystis* PCC 6803 keine Auswirkung auf die Zellmorphologie hatte (Marbouty *et al.*, 2009a). Auch in diversen Heterozysten-bildenden, filamentösen Cyanobakterien konnten Gene identifiziert werden, die für Zellwandamidasen kodieren, u.a. ein konserviertes Gen-Cluster mit zwei *amiC*-kodierenden Genen.

Das in dieser Arbeit beschriebene AmiC2-Protein aus *N. punctiforme* konnte ebenfalls im Septum lokalisiert werden, wo ein GFP-Fusionsprodukt in jungen Septen akkumulierte, in älteren jedoch verschwand (Abb. 36) (Lehner *et al.*, 2011, Berendt, 2011).

GFP-Lokalisierungsstudien der Gene *alr0093* (*amiC1*) und *alr0094* (*amiC2*) des Gen-Clusters in *Anabaena* PCC 7120 zeigten ebenfalls die Rekrutierung der Proteine zum Septum während der Zellteilung (Berendt *et al.*, 2012). In *N. punctiforme* wurde ein ebenso konserviertes Gen-Cluster gefunden, bei dem Produkte des *amiC2*-homologen Gens (*Npun_F1846*) am Septum identifiziert werden konnten (Abb. 36) (Lehner *et al.*, 2011, Berendt, 2011). Die Modifikation des septalen Mureins durch AmiC findet wie in einzelligen Vertretern während der Zellteilung statt, wobei es hier aber nicht zur Separierung der beiden Tochterzellen kommt (Bernhardt & de Boer, 2003, Heidrich *et al.*, 2001).

Welche Funktion diese für die Separierung der Tochterzellen von einzelligen Bakterien zuständigen Proteine im multizellulären, filamentösen Cyanobakterium haben, war Gegenstand dieser Arbeit.

F.2 AmiC2: Ein wichtiges Protein für die Morphologie von *N. punctiforme*

Die Mutation des *amiC2*-Gens führte in *N. punctiforme* zu einem stark morphologisch auffälligen Phänotyp. Dieser ist die alleinige Konsequenz des defekten Gens. Polare Effekte konnten ausgeschlossen werden, da die Integration der Resistenzkassette keinen Einfluss auf stromabwärts gelegene Gene hatte (Abb. 11C). Die Charakterisierung mehrerer *amiC2*-Mutationsreplikate in *N. punctiforme* zeigte jeweils den gleichen Phänotyp. Die Komplementation der *amiC2*-Mutante war leider fehlgeschlagen. Der stark morphologische Phänotyp mit einem dickwandigen Peptidoglycan und starker Schleimauflagerungen auf der Außenhülle verhinderte jegliche Transformation. Die Mutation hatte keinen Einfluss auf die Zellteilung, welche in zwei lebensfähigen Tochterzellen resultierte (Abb. 13, BF). Färbungen der äußeren und der Cytoplasma-Membran mit dem Fluoreszenzfarbstoff FM1-43 zeigten wie für Gram-negative Bakterien eine typische invaginierende Zellteilungsebene (Abb. 15A) (Schneider *et al.*, 2007). Die Färbung mit dem Peptidoglycan-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Van-FL zeigte neben großen, kreisrund gefärbten Septen von jungen sich teilenden Tochterzellen auch kleine Septen von vollständig geteilten Tochterzellen (Abb. 19). AmiC ist das letzte Protein in der Zellteilungskaskade einzelliger Gram-negativer Vertreter (Heidrich *et al.*, 2001, Weiss, 2004, Priyadarshini *et al.*, 2007). Somit ist es nicht verwunderlich, dass

die Zellteilung als solche nicht gestört ist. Die subzelluläre Lokalisierung von AmiC2-GFP hat gezeigt, dass AmiC2 nur für die kurze Dauer der Zellteilung im Divisom von *Anabaena* PCC 7120 und *N. punctiforme* lokalisiert ist (Abb. 37) (Lehner *et al.*, 2011, Berendt *et al.*, 2012).

Auch wenn die Zellteilungsmaschinerie funktioniert, ist die Filamentintegrität durch schiefe Septen in der *amiC2*-Mutante gestört. Im *N. punctiforme* WT sind die Zellteilungsebenen in der longitudinalen Achse des Filaments parallel zueinander angeordnet. Daraus resultieren nach mehreren Zellteilungen lange Trichome, die, bestehend aus vielen Zellen, über parallel zueinander geordnete Septen verbunden sind (Abb. 13, WT; Abb. 14A1-3). Die Mutante hingegen liefert ein ungeordnetes Bild, in welchem Zellteilungsebenen scheinbar willkürlich angelegt werden (Abb. 13, *amiC2::C.K3*). *In vivo* Fluoreszenzfärbungen des Peptidoglycans mit Van-FL lassen vermuten, dass die Mureinsynthese in dieser Mutante gestört ist. Van-FL bindet an neu synthetisiertes, noch nicht quervernetztes Murein. Die Abbildungen zeigen ein Fluoreszenzsignal, dass sich nicht nur im Septum, sondern auch in der Mitte von Zellen halbmondartig um die Zelle erstreckt (Abb. 19B5+6). Ob es sich dabei um neu angelegte Zellteilungsebenen handelt, ist nicht nachgewiesen. Zu der Verschiebung der Zellteilungsebenen kommt es vermutlich dadurch, dass an diesen Stellen unverhältnismäßig mehr neues Peptidoglycan eingebaut wird und es somit zu einer Krümmung der Zellen kommt. Dadurch sind die schiefen Septen vermutlich ein sekundärer Effekt des heterogenen Peptidoglycans. Die Klumpenbildung ist ein Resultat der schiefen Septen, woraufhin die Zellen sich ungerichtet im Raum erstrecken und sich zu mehr oder weniger runden Zellhaufen akkumulieren. Dieser Phänotyp ist in der Forschung filamentöser Cyanobakterien bisher einzigartig und noch nie beobachtet, in einzelligen Vertretern nach Ausschalten von verschiedenen Hydrolasen hingegen schon öfters charakterisiert worden (Garcia & Dillard, 2006, Kajimura *et al.*, 2005, Carballido-Lopez, 2006). Bei *E. coli* wurde nach Ausschalten mehrerer Hydrolasen und dem PBP5 ein Effekt auf die Septum-Differenzierung nachgewiesen, bei dem es zur Bildung in sich schiefer Septen kam. Diese teilweise S-förmigen Septen hatten aber keinen Klumpen-bildenden Effekt auf die sich bildenden Filamente (Priyadarshini *et al.*, 2006). Im filamentösen Cyanobakterium *Anabaena* PCC 7120 hatte das Ausschalten der *amiC*-Homologen *amiC1* und *amiC2* keinen Effekt auf die Filamentintegrität (Berendt *et al.*, 2012, Zhu *et al.*, 2001).

Licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen gereinigter Mureinsäcke verdeutlichten die schiefen, sehr breiten Septen der Mutante im Vergleich zum WT (Abb. 14B4;

Abb. 17B5+6). Die elektronenmikroskopischen Bilder und die Gramfärbung der Mutante lassen auch auf ein dickeres, stärker quervernetztes septales Murein schließen (Abb. 14B2+3; Abb.13, Gram). In *E. coli* führte die Deletion der drei Amidasen *amiA*, *amiB* und *amiC* zu einem 13 % stärker quervernetztem Peptidoglycan. In der *amiC2*-Mutante von *N. punctiforme* wird vermutlich durch die fehlende Amidase altes Murein unzureichend hydrolysiert, wodurch es zu einer Anreicherung überschüssigen Peptidoglycans im Septum während der Zellteilung kommt. Dieses stört wiederum das weitere Einschnüren des septalen Mureins und führt zur Bildung dickerer und stärker quervernetzter Septen. Dass es zu einer reduzierten Invagination im Divisom kommt, zeigen die gemessenen Durchmesser der Septen gereinigter Mureinsäcke. Ein um 1 µm breiteres Septum zeigte die Mutante im Vergleich zum WT (Tabelle 16).

Ebenfalls auffällig waren die überdurchschnittlich großen Zellen der Mutante (Abb. 13+14). Dies könnte in einem verlangsamten Zellzyklus, aufgrund des Knockouts eines Divisom-lokalisierten Proteins, begründet sein. Ein Beispiel hierfür sind die Zellen des einzelligen *Synechocystis* PCC 6303 in der Deletionsmutante des Septum-lokalisierten Proteins Ftn6, welche auf doppelte Zellgröße heran wuchsen (Marbouty *et al.*, 2009b).

Viele Einschlusskörper, wobei es sich vermutlich um Speichermaterial handelt, wurden in der Ultrastruktur identifiziert (Abb. 14B1-4). Ebenso wurden dicke Auflagerungen von mukösem Material an der Außenhülle der Mutante erkennbar, die durch Alcian-Blau angefärbt werden konnten (Abb. 13, AB). Vermutlich ist die Akkumulation von Speichermaterial als auch die überdurchschnittliche Schleimabsonderung das Resultat eines gestörten Metabolismus (Otero & Vincenzini, 2004).

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Anfärben der äußeren Membran mit Oregon Green zeigten in der Mutante wie im WT kein Eindringen des Farbstoffs in das Septum. Die äußere Membran umschließt wie ein Mantel sowohl die Zellen im Filament des WTs als auch diejenigen der *amiC2*-Mutanten-Klumpen (Abb. 17A2-4 + B2-4). Die stärkere Färbung der äußeren Membran am Septum der Mutante im Vergleich zum WT zeugt von einer unterschiedlichen chemischen Zusammensetzung der äußeren Membran. In *Anabaena* PCC 7120 wurde in den beiden Amidase-Mutanten SR477 und SR478 im Vergleich zum WT eine Veränderung der Integrität bzw. Permeabilität der äußeren Membran beobachtet (Berendt, 2011). Auch in *E. coli* entwickelten verschiedene Hydrolase-Mutanten eine erhöhte Permeabilität der äußeren Membran (Heidrich *et al.*, 2002). Ob ein Zusammenhang zwischen der Anfärbbarkeit und der Integrität der äußeren Membran besteht, konnte bisher nicht gezeigt

werden. Da das Peptidoglycan über verschiedene Ankerproteine, wie beispielsweise das Braun'sche Lipoprotein, mit der äußeren Membran verbunden ist, könnte eine gestörte Quervernetzung des Peptidoglycans ebenfalls Folgen für die Vernetzung der äußeren Membran mit sich bringen (Braun & Rehn, 1969).

F.3 AmiC2: Ein essentielles Protein für den interzellulären Transport

Kürzlich wurde der cytoplasmatische Molekülaustausch über das Filament von Zelle zu Zelle an verschiedenen filamentösen Cyanobakterien mit FRAP-Experimenten gezeigt (Mullineaux *et al.*, 2008, Merino-Puerto *et al.*, 2010, Berendt *et al.*, 2012). Analog konnte in vorliegender Arbeit ebenfalls ein Molekülaustausch im filamentösen Cyanobakterium *N. punctiforme* nachgewiesen werden, wobei in der *amiC2*-Mutante kein Austausch mehr messbar war (Abb. 18). Während die Fluoreszenz-Rückgewinnung der geblichenen Zelle im WT nach wenigen Sekunden abgeschlossen war, war die Rückgewinnung in der Mutante selbst nach 80 s nur marginal (Tabelle 15). Mehrfache Wiederholungen des Experiments bestätigten den klaren Phänotyp der gestörten Zell-Zell-Kommunikation. Mutationen der Septum-lokaliserten Proteine SepJ, FraD oder FraC in *Anabaena* PCC 7120 führten zu einem partiell verzögerten interzellulären Austausch (Mullineaux *et al.*, 2008, Merino-Puerto *et al.*, 2010). Man vermutet, dass diese Proteine Teil eines hochkomplexen Septum-lokaliserten Kommunikationssystems sind (Merino-Puerto *et al.*, 2011). Dieses System soll einen direkten cytoplasmatischen Transport von Zelle zu Zelle über das Septum ermöglichen. Die FRAP-Analysen lassen vermuten, dass AmiC2 einen wohl entscheidenden Beitrag zur Ausbildung solcher septalen Kommunikationsstrukturen leistet. Daten der subzellulären Lokalisation von AmiC2-GFP in *N. punctiforme* festigen diese Hypothese (Lehner *et al.*, 2011). AmiC2-GFP akkumuliert sich im Divisom frisch teilender Tochterzellen. Ältere Septen zeigen hingegen kein GFP-Signal (Abb. 37B+D). Wie in *E. coli* übernimmt AmiC2 in *N. punctiforme* eine bestimmte Funktion in der Zellteilung. Ein Unterschied besteht darin, dass diese nicht für die Separierung der Tochterzellen nach der Zellteilung zuständig sind, sondern essentiell für die Ausbildung von Kommunikationsstrukturen im Septum sind (Lehner *et al.*, 2011).

F.4 Der Mureinsacculus: Ein Filament-umspannendes Makromolekül von *N. punctiforme*

Elektronen- und lichtmikroskopische Aufnahmen gereinigter Mureinsäcke von *N. punctiforme* WT und der *amiC2*-Mutante zeigten in beiden Fällen ein Makromolekül, welches die Morphologie der lebenden Zellen im Filament widerspiegelt. Der WT-Mureinsacculus zeigte eine filamentartige Struktur mit regelmäßigen septalen Einschnürungen (Dunn & Wolk, 1970). Die klumpenartige Struktur der Mutante mit den schiefen und breiten Septen spiegelte sich ebenfalls im Sacculus wider (Abb. 17B6). Wie in einzelligen Gram-negativen Bakterien gezeigt, ist das Peptidoglycan das Exoskelett der bakteriellen Zelle, welches explizit für die Formgebung und Stabilität verantwortlich ist. Auch wenn alle anderen Zellbestandteile nach Kochen in SDS vom Mureinsacculus abgelöst werden, bleibt dieser stabil und repräsentiert die ursprüngliche Zellform (Weidel *et al.*, 1960).

Im Gegensatz zur Zellteilung einzelliger Gram-negativer Bakterien bildet *N. punctiforme* ein echtes Septum aus, welches nach der Zellteilung erhalten bleibt (Ris & Singh, 1961). Dieses Septum ist Teil des Exoskeletts und bleibt auch nach der Mureinreinigung bestehen (Abb. 19A5+6, B5+6). Dabei handelt es sich um ein einschichtiges Septum, welches nach elektronenmikroskopischer Analyse augenscheinlich dicker als das periphere Murein ist. Auch in Ultradünnschnitten durch die Mitte des Septums bei *N. punctiforme* ist das Peptidoglycan als dünne einschichtige Linie zu erkennen (Abb. 34, *N. punctiforme*). Die Analysen von Gefrierbrüchen und Ultradünnschnitten von *Oscillatoria rubescens* D. C. zeigten ebenfalls ein einschichtiges septales Murein (Jost, 1965). Dies steht im Widerspruch zu Daten von Wilk *et al.*, wo von einem zweischichtigen septalen Murein die Rede ist (Wilk *et al.*, 2011). Demnach hätte jede Zelle einen eigenen Mureinsack. Diese These wurde anhand elektronenmikroskopischer Dünnschnitte aufgestellt, die das Septum von *Anabaena* PCC 7120 mit zwei getrennten Mureinsäcken im Septum zeigen. Bei genauerer Betrachtung erschließt sich aber, dass diese Schnitte nicht mittig das Septum durchschneiden, sondern randständig (Abb. 34, *Anabaena* PCC 7120). Somit erweckt die Abbildung den Anschein von getrennten Mureinsäcken (Wilk *et al.*, 2011). Eine Trennung des septalen Mureins durch Hydrolasen würde, wie in einzelligen Cyanobakterien, zur gleichzeitigen Invagination der äußeren Membran führen. Eine solche Trennung wäre bei der Differenzierung endständiger Hormogonien-Zellen vorstellbar. Zur Kontrastierung des Mureins wurde in Wilk *et al.* (2011) Rutheniumrot verwendet. Dieser Farbstoff bindet an Polysaccharidstrukturen, wie sie u.a. im

Peptidoglycan zu finden sind, und färbt diese rot (Schwarzenlander *et al.*, 2009). Polysaccharidverbindungen können aber auch im Periplasma vorkommen. In diesem Fall wäre nicht nur das Peptidoglycan gefärbt, sondern zusätzlich die Polysaccharidverbindungen im periplasmatischen Raum.

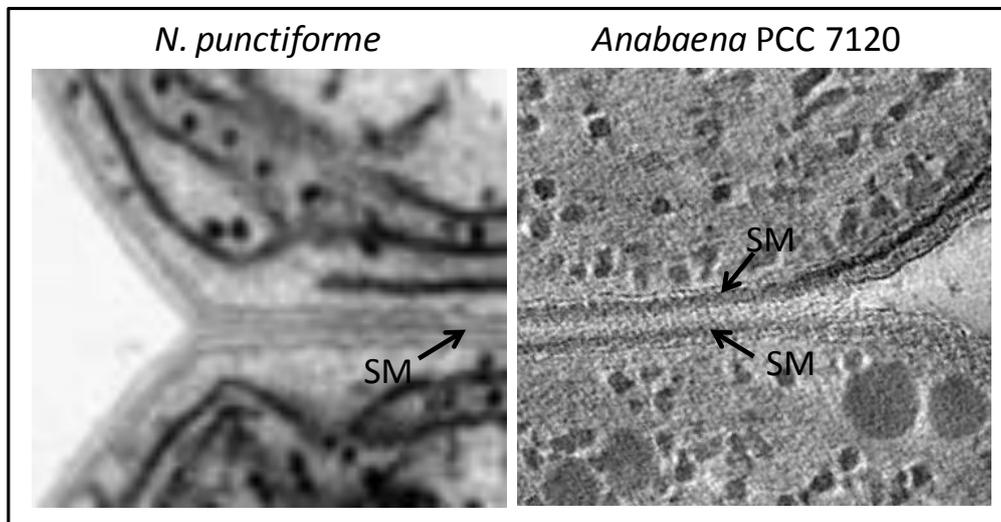


Abb. 34: Vergleich des septalen Mureins von *N. punctiforme* und *Anabaena* PCC 7120.

Die mit Permanganat fixierte Linie stellt das septale Murein (SM) in *N. punctiforme* dar. Die beiden mit Rutheniumrot gefärbten Linien stellen das septale Murein (SM) in *Anabaena* PCC 7120 dar. In *N. punctiforme* bildet sich im Septum eine Linie, in *Anabaena* PCC 7120 bleiben es zwei getrennte Linien. Die Abbildung von *Anabaena* PCC 7120 ist entnommen aus Wilk *et al.*, 2011.

Der Fluoreszenzfarbstoff Van-FL bindet an D-Ala-D-Ala-Dipeptide noch nicht quervernetzten Peptidoglycans (Tiyant *et al.*, 2006). *In vivo* gefärbte Zellen des WTs und der *amiC2*-Mutante offenbarten ein vielfach stärker gefärbtes septales Murein gegenüber dem restlichen Murein. Die Stärke des Fluoreszenzsignals war im Septum sich teilender Zellen wie auch in alten Zellen nahezu identisch. In *B. subtilis* oder *S. aureus* haben Färbungen des Septums gezeigt, dass sich dieses im Fall frisch teilender Zellen wesentlich stärker anfärbt als alte, kurz von der Separierung befindliche Teilungsebenen (Tiyant *et al.*, 2006, Yu & Götz, 2012). Vermutlich ist das septale Murein von *N. punctiforme* einer ständigen Umstrukturierung unterworfen. Als verbindende Einheit zweier Zellen im Filament muss dieses möglicherweise auf kleinste Änderungen im Stoffaustausch reagieren. Werden durch Stickstoffmangel Heterozysten differenziert, kommt es zu massiven Umstrukturierungen des Peptidoglycans. Zum einen bildet sich ein schmaler schlauchartiger Halskanal aus, in welchem das Peptidoglycan strukturellen Veränderungen unterworfen ist. Zum andern

verschmälert sich deutlich das Septum der angrenzenden Nachbarzellen (Abb. 19A4-6) (Wolk, 1996). An der Differenzierung des Mureins in Heterozysten, möglicherweise bei der Ausbildung des Halskanals, sind vermutlich Penicillin-Bindeproteine beteiligt. Die Mutation des Gens *pbpB*, welches in *Anabaena* PCC 7120 für PBP2 kodiert, führte zu Störungen in der Heterozysten-Differenzierung und im diazotrophen Wachstum (Lazaro *et al.*, 2001). Ebenso hat die Mutation des beim Murein-Recycling-Prozess beteiligten Proteins MurQ Auswirkungen auf die Heterozysten-Differenzierung unter Schwachlicht-Bedingungen (Jiang *et al.*, 2010).

F.5 AmiC2: Ein essentielles Protein für die Ausbildung von Poren im septalen Murein von *N. punctiforme*

Hinweise auf Kommunikationsstrukturen von Zelle zu Zelle im Septum filamentöser Cyanobakterien gab es in der Vergangenheit häufig. Ultradünnschnitte durch das Septum von Filamenten von *Anabaena* PCC 7120 und *N. punctiforme* zeigten Septum-durchspannende Strukturen (Abb. 36) (Palinska & Krumbein, 2000, Flores *et al.*, 2006, Bauer *et al.*, 1995, Merino-Puerto *et al.*, 2011). Gefrierbruch-Analysen verschiedener filamentöser Cyanobakterien wiesen im Septum auf Vertiefungen hin, die vermutlich durch sogenannte Mikroplasmodesmata erzeugt wurden (Giddings & Staehelin, 1981). Erst kürzlich publizierte Kryo-elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten vermutlich Septum-durchstoßende Strukturen, welche als Septosomen beschrieben wurden (Wilk *et al.*, 2011).

In unserer Arbeit wurden erstmals elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mureinsäcken gezeigt, deren septales Murein von ca. 150 Poren mit einem Durchmesser von ca. 20 nm siebartig durchlöchert war (Abb. 20A2+5). Mikroskopische Analysen des septalen Mureins der *amiC2*-Mutante zeigten keine solchen Poren. AmiC2 ist somit grundlegend an der Differenzierung septaler Poren im Murein beteiligt (Abb. 20B2).

Dass Hydrolasen, hauptsächlich lytische Transglycosylasen (Koraimann, 2003), an der Porenbildung im Murein mitwirken, wurde bei der Differenzierung zellwandpenetrierender Strukturen gezeigt, beispielsweise bei den Sekretionssystemen (Typ II, III, und IV), Typ IV Pili (Koraimann, 2003) und Flagellen (Nambu *et al.*, 1999). Sie hydrolysieren kontrolliert das Murein, um eine Penetration der Zellwand punktuell zu gewährleisten.

In *N. punctiforme* hydrolysiert AmiC2 zur Bildung septaler Poren das Murein, um eine Traverse zur Ausbildung von Kommunikationsstrukturen zu schaffen (Abb. 36C). Dass es

sich bei den Poren um Überreste komplexer Kommunikationsstrukturen handelt, ist bei der Betrachtung der FRAP-Ergebnisse anzunehmen. Das Fehlen dieser Strukturen führte bei der *amiC2*-Mutante zum vollständigen Verlust des molekularen Stoffaustauschs im Filament (Abb. 18, *amiC2::C.K3*).

F.6 Modell der Porenbildung im septalen Murein

Basierend auf der Netzstruktur des Peptidoglycans wurde ein maximaler Porendurchmesser von 2 nm eines einschichtigen Peptidoglycans errechnet, was eine Diffusion von Molekülen bis zu einer Größe von 55 kDa ermöglicht (Demchick & Koch, 1996). Durch die Quervernetzung des Mureins wird dieser Wert drastisch reduziert. Das dicke, stark quervernetzte Peptidoglycan von *N. punctiforme* erfordert Poren im septalen Peptidoglycan, in denen Kommunikationsstrukturen differenziert werden, die den schnellen Transport von Makromolekülen von Zelle zu Zelle gewährleisten.

Jedes Durchbrechen des Peptidoglycangerüsts birgt das Risiko der Zelllyse durch den Turgor (Vollmer & Bertsche, 2008) - sei es beim Elongationswachstum, bei dem kurzzeitig das Peptidoglycan durchbrochen wird, oder bei der Porenbildung. Beide Prozesse müssen genau reguliert werden. Vermutlich wird vor der Porenbildung nach dem Prinzip „*make before break*“ gezielt Peptidoglycan aufgelagert bzw. quervernetzt und anschließend durch ringförmige Hydrolyse durchbrochen (Koch, 1990). Dieses Prinzip ist aus dem Elongationswachstum des Mureinsacculus bekannt. Dort werden vermutlich drei neu synthetisierte Disaccharidpentapeptide durch einen Multienzymkomplex, bestehend aus Synthasen und Hydrolasen, erst mit dem Mureinsacculus quervernetzt und anschließend durch Hydrolyse eines alten Disaccharidpentapeptidstrangs integriert („*three for one*“-Modell) (Höltje, 1998). Diese Vermutung wird durch die Analyse mehrerer Septen und deren Poren bestärkt, die drei regelmäßig auftretende Strukturen aufwiesen (Abb. 20A3-5; Abb. 35A1-3): (i) Verdickungen des Peptidoglycans in Form dunkler Punkte (Abb. 35A1+B1), (ii) ringartige Hydrolyse um die Verdickungen des Peptidoglycans (Abb. 35A2+B2) und (iii) 20 nm breite Poren mit ringartigen Verdickung am Rand („*grommet-like-structures*“) (Abb. 35A3) (Hamilton *et al.*, 1975). Der Durchmesser von 20 nm würde die Ausbildung von Kommunikationsstrukturen, bestehend aus Proteinkomplexen, durch die Poren hindurch gewährleisten. SepJ wurde als möglicher Kandidat für die Ausbildung solcher Strukturen diskutiert (Mullineaux *et al.*, 2008).

Die *amiC2*-Mutante hatte sowohl keine punktuelle Verdickung bzw. Quervernetzung als auch keine Löcher im septalen Murein. Möglicherweise ist für die Bildung der Poren ein Multienzymkomplex aus Murein-Synthasen und -Hydrolasen verantwortlich. Durch das Fehlen der Hydrolase könnte der Multienzymkomplex in seiner Funktion vollständig gestört sein. Folglich kam es vor der Porenbildung auch zu keiner Auflagerung bzw. Quervernetzung des Mureins.

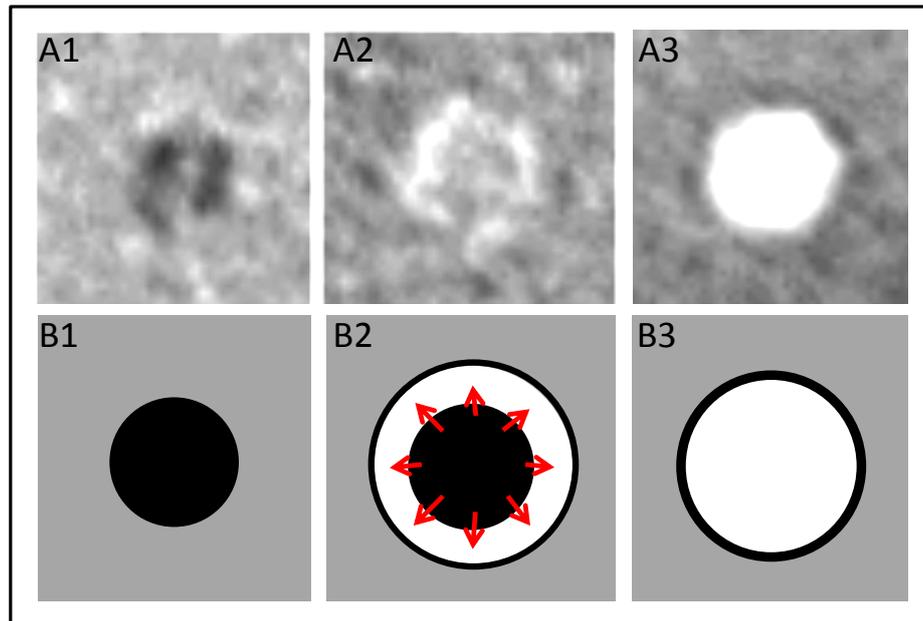


Abb. 35: Hypothese der Porenbildung.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen (A1-A3) und schematische Darstellung (B1-B3) der Porenbildung im septalen Murein. (A1, B1) Punktuelle Mureinauflagerung. (A2, B2) Ringförmige Hydrolyse des Mureins ausgehend vom verdickten Murein (rote Pfeile). (A3, B3) Fertig differenzierte Pore. Schwarzer Punkt: punktuelle Verdickung des Mureins vor der Porenbildung; Grau: peripheres Murein; Weißer Kreis: Pore.

F.7 Zell-Zell-Kommunikation: Die Voraussetzung für die Zelldifferenzierung im Filament von *N. punctiforme*

N. punctiforme ist ein multizelluläres filamentöses Cyanobakterium, das aufgrund seiner Differenzierungsfähigkeit von verschiedenen Spezialzellen auch verschiedene Standorte der Erde besiedeln kann. Die Adaptierung an diese ist ein ganzheitlicher Prozess, bei welchem entweder einzelne Zellen gezielt oder kurze Filamente gleichzeitig differenzieren (Meeks & Elhai, 2002). Ein schneller Informationsaustausch der Zellen im Filament ist für die Differenzierung von entscheidender Bedeutung (Wolk, 1996). Das Fehlen der Poren im

septalen Murein verhindert die Ausbildung von Kommunikationsstrukturen. Somit ist der Informationsaustausch zwischen den Zellen im Filament unterbrochen. Dies hatte dramatische Folgen auf die Zelldifferenzierung der *amiC2*-Mutante, welche nicht mehr fähig war irgendeine Form von Differenzierung zu leisten.

Filamente können aus mehr als hundert Zellen aufgebaut sein. Bei der Differenzierung einzelner Heterozysten ist ein Konzentrationsgefälle des Heterozysten-hemmenden Proteins (PatS) im gesamten Filament von entscheidender Bedeutung (Yoon & Golden, 2001). PatS ist ein kurzes Peptid und diffundiert wahrscheinlich entlang des Filaments. HetR ist der Hauptaktivator der Heterozysten-Differenzierung (Black *et al.*, 1993). Durch die Diffusion von PatS im Filament bildet sich ein Inhibitorgradient aus, an dessen niedrigster Konzentration HetR gebildet wird. Das Zusammenspiel aus Heterozysten-aktivierendem HetR und -hemmendem PatS führt zur Ausbildung einzelner Heterozysten im Filament mit regelmäßigem Abstand zueinander (Zhang *et al.*, 2006). Der Verlust der Zell-Zell-Kommunikation in der *amiC2*-Mutante führte zu einer früh gestörten Heterozysten-Differenzierung. Ein frühes Indiz der Heterozysten-Differenzierung ist die Auflagerung der Hgl-Schicht (Wolk, 1996), welche bei der *amiC2*-Mutante gestört ist. Dünnschicht-chromatographische Analysen der Mutante zeigten im Vergleich zum WT keine Hgl-Synthese 48 h nach Stickstoffmangel (Abb. 16, 48 h). Ebenso konnte mikroskopisch kein Verlust der Phycobiliproteine (Antennenpigmente des Photosystems II) in einzelnen sich differenzierenden Zellen beobachtet werden (Abb. 15B, *amiC2*::C.K3, AF), stattdessen blichen die Zellen nach mehreren Tagen aufgrund von Stickstoffmangel vollständig aus. Die Mutation des *amiC2*-Homologen (*hcwA*) in *Anabaena* PCC 7120 führte ebenso zu einem Phänotyp mit gestörter Heterozysten-Differenzierung (Zhu *et al.*, 2001). Im Ansatz von Berendt *et al.* (2012) zeigte sich, dass nur die Inaktivierung des *amiC1*-Gens in *Anabaena* PCC 7120 diesen Differenzierungsphänotyp hat. Die *amiC2*-Mutante SR478 entwickelte hier hingegen vollfunktionsfähige Heterozysten (Berendt *et al.*, 2012). Noch nicht publizierte Daten zeigen, dass nur die Mutation des *amiC1*-Gens in *Anabaena* PCC 7120 zum vollständigen Verlust der Porenbildung und somit der Zell-Zell-Kommunikation führte. Die *amiC2*-Mutante hatte nur eine verminderte Anzahl an Poren ohne Auswirkung auf die Zelldifferenzierung.

Die Differenzierung der Hormogonien bei *N. punctiforme* geht einher mit einer gleichzeitigen Reduktionsteilung der Zellen im Filament (Meeks *et al.*, 2002). Für die Synchronisation der Zellteilung ist vermutlich ein schneller Informationsfluss Voraussetzung. Dieser ist in der

amiC2-Mutante nicht mehr gewährleistet, was zu einem Differenzierungsverlust der Hormogonien führte (Abb. 14A, *amiC2::C.K3*, FM1-43).

Die Zellen verharren in einem primordialen Stadium ohne jegliches Zell-Differenzierungspotential. Das Schema in Abbildung 36C veranschaulicht die Zell-Zell-Kommunikation durch Poren im septalen Murein. Die postulierten trans-septalen Kommunikationsstrukturen sind in der Vergrößerungsabbildung des Septums hervorgehoben (Abb. 36B, Pfeilspitzen).

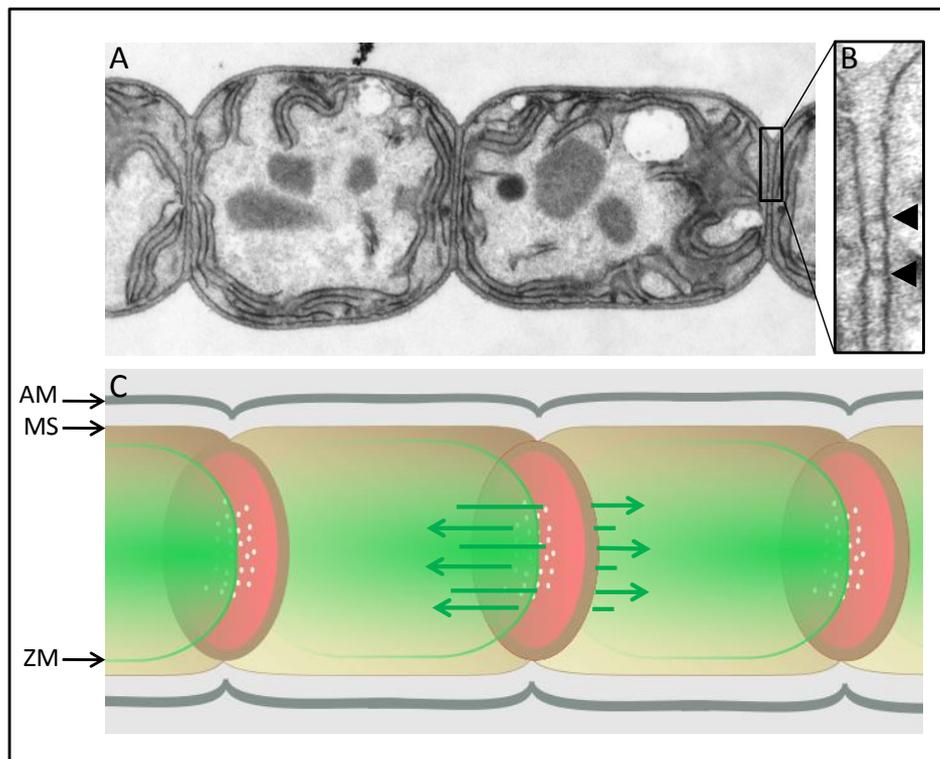


Abb. 36: Elektronenmikroskopische Aufnahme und schematische Veranschaulichung der möglichen septalen Zell-Zell-Kommunikation bei *N. punctiforme*.

A: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch ein Filament von *N. punctiforme*. B: Vergrößerung eines Septums mit potentiellen Kommunikationsstrukturen (Pfeilspitzen). C: Schematische Darstellung der septalen Zell-Zell-Kommunikation. Grüne Pfeile: Stoffaustausch durch das Peptidoglycan. AM, äußere Membran; MS, Mureinsacculus; ZM, Cytoplasmamembran.

F.8 AmiC2: Eine Amidase mit differenzieller Proteolyse

Das gereinigte AmiC2-6xHis-Protein zeigte in der SDS-PAGE das Volllängenprotein bei 68 kDa und kleinere Abbaubanden. Die Aufreinigungen waren von unterschiedlicher Qualität, wobei teilweise mehrere Banden in den Elutionsfraktionen auftauchten

(Abb. 22, Pfeilspitzen). In einer späteren Reinigung waren in der Elutionsfraktion des SDS-PAGE Gels das Volllängenprotein und nur zwei Abbaubanden zu sehen (Abb. 24). Im Immunoblot konnte mittels 6xHis-spezifischer Antikörper der fusionierte 6xHis-Tag des rekombinanten Volllängenproteins und der beiden Abbaubanden nachgewiesen werden (Abb. 24). Da im Eluat nur His-Tag-gekoppelte Spaltprodukte gezeigt wurden, kam es vor der Reinigung zu einer proteolytischen Spaltung. Die N-terminalen Gegenstücke banden nicht an die Säulenmatrix, weshalb diese bei der Reinigung entfernt wurden. Die Proteolyse der Amidase könnte möglicherweise einen gezielten regulatorischen Hintergrund haben. Hydrolasen haben im Allgemeinen einen suizidalen Charakter, welche bei unkontrollierter Expression die Zelle lysieren. Überexprimiert hydrolysiert beispielsweise die Amidase AmiC1 die Zellen im Filament von *Anabaena* PCC 7120 (Berendt *et al.*, 2012).

Im Immunoblot waren die Spaltprodukte des gereinigten rekombinanten Proteins andere als die des nativen AmiC2-Proteins aus *N. punctiforme*. Die Modifikation des rekombinanten AmiC2-6xHis-Proteins unterlag in *E. coli* anderen Faktoren als des nativen AmiC2 in *N. punctiforme*, was sich somit in einem anderen Bandenmuster im Immunoblot widerspiegelte (Abb. 25). Welche Faktoren zu den unterschiedlichen proteolytischen Spaltungen führten, wurde nicht geklärt. Die Größen der AmiC2-Fragmente waren in allen Rohextrakten der verschiedenen Zelldifferenzierungsformen von *N. punctiforme* annähernd gleich. Hingegen waren aber unterschiedliche Konzentrationen der Spaltprodukte bzw. des Volllängenproteins in den verschiedenen Rohextrakten mittels Immunoblot detektiert worden. Die höchsten Konzentrationen an AmiC2-Volllängenprotein wurden in den Fraktionen einer exponentiell wachsenden vegetativen Zellkultur und in der Hormogonien-Kultur gefunden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Hormogonien-Differenzierung einer vorhergehenden Reduktionsteilung unterworfen ist und die Verdoppelungsrate einer wachsenden Zellkultur bei voller Nährstoffversorgung exponentiell ist. Ähnliche Resultate zeigten sich bei AmiC2-GFP-Lokalisierungsstudien in *N. punctiforme*. Dort konnten in Septen sich frisch teilender Tochterzellen von Hormogonien und vegetativen Zellen starke GFP-Signale registriert werden (Abb. 37A+C). In Heterozysten-haltigen und Akineten-Rohextrakten ist die Menge an AmiC2-Volllängenprotein geringer. Eine AmiC2-Abbaubande knapp unterhalb von 43 kDa ist wiederum stärker als in den vegetativen und Hormogonien-Zellextrakten. Ebenso konnte 48 h nach Stickstoffentzug an den Septen sich bildender Heterozysten ein starkes definiertes GFP-Signal lokalisiert werden, jedoch keines an den vegetativen Zellen (Abb. 37B). Da nur ca. 10 - 20 % der vegetativen Zellen im Filament zu

Heterozysten differenzieren, ist somit im Rohextrakt einer Heterozystenkultur die Gesamtmenge an AmiC2-Protein dementsprechend geringer. In der Akineten-Kultur wurde kein GFP-Signal gemessen (Abb. 37D) (Berendt, 2011).

Die spezifische AmiC2-Bindung des Antikörpers konnte durch Reinigung über CNBr erhöht werden, wodurch zwei unspezifische Signale im Immunoblot verschwanden (Abb. 27B, WT_N). Trotz der Reinigung wurde in der Mutante aber weiterhin ein Signal zwischen 40 und 55 kDa detektiert (Abb. 27B, amiC2_N). Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine Abbaubande des AmiC1-Proteins, welches eine starke Homologie zu AmiC2 hat. Im Immunoblot wurden im WT von *Anabaena* PCC 7120 wie auch in SR478 die gleichen Fragmente erkannt, in SR477 blieben deutliche Signale aus. Vermutlich erkennt der AmiC2-Antikörper unspezifisch AmiC1-Fragmente in *Anabaena* PCC 7120 und in der AmiC2-Mutante von *N. punctiforme*.

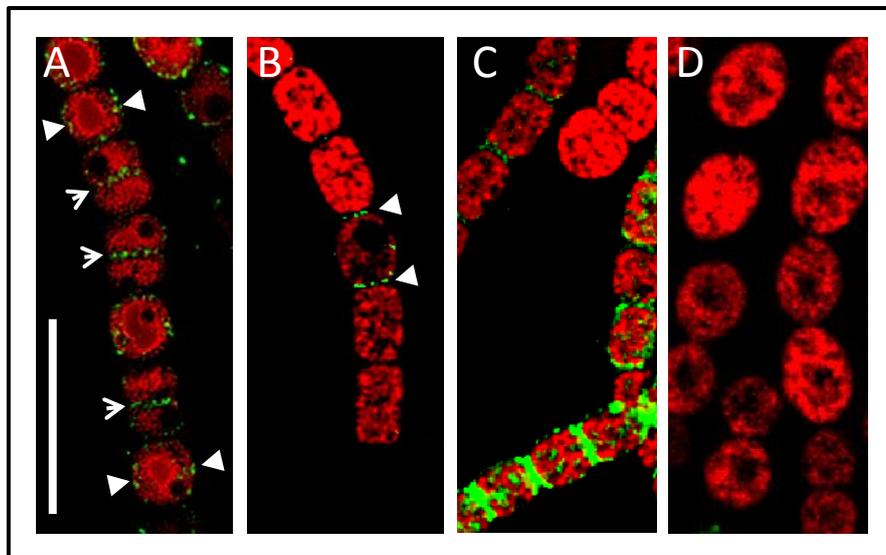


Abb. 37: Subzelluläre Lokalisation von AmiC2 in vegetativen Filamenten und den drei Differenzierungsformen von *N. punctiforme*.

Überlagerung der Autofluoreszenz und des GFP-Signals. A: Exponentiell wachsendes vegetatives Filament. B: Differenzierende Heterozyste 48 h nach Stickstoffentzug. C: Differenzierende Hormogonien 48 h nach Induktion. D: Akineten. Pfeilköpfe zeigen auf das GFP-Signal in den Septen junger Tochterzellen, Pfeilspitzen auf neu angelegte Teilungseben. Größenmarker: 10 μm . (Abbildung aus Berendt, 2011)

F.9 AmiC2: Eine Zellwand-hydrolysierende Amidase aus *N. punctiforme*

In vivo wurden mittels Zymogramm die Zellwand-hydrolysierenden Eigenschaften des rekombinanten Proteins nachgewiesen. Dabei wurden mehrere Zymogramme mit

verschiedenen Zellwandsubstraten von *E. coli*, *Synechococcus* und *B. subtilis* durchgeführt, wobei nur der Aktivitätstest mit Zellwandextrakten von *E. coli* gezeigt ist (Abb. 23+24). Die Hydrolyse-Aktivität war stark abhängig von der Menge eingesetzter Amidase. Wurden 30 µg rekombinantes AmiC2-6xHis eingesetzt, war sowohl beim Volllängenprotein als auch beim 50 kDa Fragment eine Aufklärung des Zymogramms zu beobachten (Abb. 23, Spur 3). Die schwächere Aufklärung der Amidase im Vergleich zur Positivkontrolle des Lysozyms ist auf die Spaltungseigenschaften der unterschiedlichen Hydrolasen zurückzuführen. Die Muramidase Lysozym spaltet β -1,4-glycosidische Bindungen zwischen N-Acetylmuramyl- und N-Acetylglucosaminresten und bildet somit kleinere Bruchstücke als die Amidase, welche zwischen N-Acetylmuramyl und dem L-Ala des Peptidstamms spaltet (Vollmer *et al.*, 2008). Die lytische Aktivität wurde in der homologen Amidase AmiC2 (HcwA) aus *Anabaena* PCC 7120 ebenfalls gezeigt (Zhu *et al.*, 2001).

F.10 Immunodetektion der verschiedenen AmiC2-Domänen in *N. punctiforme*

Um die Amidasen AmiC1 und AmiC2 aus *N. punctiforme* spezifisch zu detektieren und die Zuordnung der proteolytischen Spaltprodukte zu ermöglichen, wurden Peptid-Antikörper eingesetzt, die spezifisch verschiedene Domänen der Amidasen erkennen sollten: α AmiC1-5 bindet spezifisch die AMIN-Domäne von AmiC1, α AmiC2-5 dagegen die AMIN-Domäne von AmiC2, wohingegen α AmiC1+2 enz. Dom. die enzymatischen Domänen von AmiC1 und AmiC2 gleichermaßen bindet. Peptid-Antikörper sind in der Bindungskraft verhältnismäßig schwächer als polyvalente Antikörper. Deshalb zeigte die Positivkontrolle im Immunoblot mit den gereinigten AmiC2-Antikörpern eine stärkere Immunreaktion als die Peptid-Antikörper (Abb. 29, α AmiC2, Spur 1+3). Weshalb die Mutante in der Kontrolle (Abb. 29, α AmiC2, Spur 2) im Vergleich zu den zuvor durchgeführten Immunoblots (Abb. 26, *amiC2_N*; Abb. 27, *amiC2_N*) kein Signal aufwies, konnte nicht geklärt werden. Die Immunreaktionen aller Peptid-Antikörper waren verhältnismäßig schwach, weshalb eine Interpretation der Banden nur sehr oberflächlich möglich war. Ein interessantes Resultat lieferte die Immunodetektion von AmiC1 (Abb. 29, α AmiC1-5), in welcher die *amiC2*-Mutante eine erkennbare Konzentration des Volllängenproteins und einer kleineren vermutlichen Degradationsbande von AmiC1 hatte (Abb. 29, α AmiC1-5, Spur 2). Im Vergleich dazu bildete der WT nur eine schwache Bande des kleineren Abbauprodukts bei 26 kDa (Abb. 29, α AmiC1-5, Spur 1). Aufgrund der Negativkontrolle konnte eine unspezifische Bindung des Antikörpers an AmiC2

ausgeschlossen werden (Abb. 29, α AmiC1-5, Spur 3). Bedingt durch die Inaktivierung von AmiC2 könnte die Konzentration an AmiC1 in der Mutante erhöht sein, um möglicherweise Funktionen von AmiC2 teilweise zu ersetzen. Die Expression von AmiC1 ist in der Mutante nicht hochreguliert, was RT-PCR-Daten zeigten (Abb. 11C). Möglicherweise konnte durch eine verminderte Proteolyse des AmiC1-Proteins die Konzentration auf einem höheren Level gehalten werden. Bei den beiden Immunodetektionen der AMIN-Domäne und der enzymatischen Domäne waren die Resultate zu schwach, um diese zu diskutieren (Abb. 29, α AmiC2-5 + α AmiC1+2 enz. Dom.). Die verwendeten Seren sind nach 150 Tagen der Immunisierung den Kaninchen entnommen worden. Nach weiteren 30 Tagen sollten diese erneut im Immunoblot kontrolliert werden.

F.11 Bedeutung des Septum-lokaliserten SepJ Proteins in *N. punctiforme* für die Stickstofffixierung, die Filamentintegrität und den interzellulären Stofftransport

SepJ (FraG) wird in *Anabaena* PCC 7120 als Septum-lokalisiertes Protein beschrieben, welches druckknopfartig die Zellen im Filament verbindet und somit die Filamentintegrität aufrecht erhält. Ebenso ist es essentiell für die Entwicklung funktionsfähiger Heterozysten und das diazotrophe Wachstum (Nayar *et al.*, 2007, Flores *et al.*, 2007). Der Knockout in *Anabaena* PCC 7120 zeigte einen stark fragmentierenden Phänotyp in BG11-Medium. Werden der Mutante die gebundenen Stickstoffquellen entzogen, fragmentiert diese noch stärker in kurze Filament-Bruchstücke. Da die Heterozysten-Differenzierung gestört ist, kann die Mutante keinen Luftstickstoff fixieren (Flores *et al.*, 2007, Nayar *et al.*, 2007). Desweiteren wird aufgrund eines verlangsamten interzellulären Calcein-Transports in der Mutante postuliert, dass SepJ ein Kanal-formendes Protein im Septum des filamentösen Cyanobakteriums *Anabaena* PCC 7120 sein könnte (Mullineaux *et al.*, 2008). Das durch BLAST-Analysen identifizierte SepJ-Homologe Protein (53 % Homologie) *Npun_F1623* aus *N. punctiforme* zeigte wie in *Anabaena* PCC 7120 die gleiche Domänenorganisation (Abb. 30) (Mariscal *et al.*, 2011). Lokalisierungsstudien in *N. punctiforme* zeigten, dass SepJ_N ebenfalls wie in *Anabaena* PCC 7120 Septum-lokalisiert ist. Außer in Akineten war SepJ_N in allen Zelldifferenzierungsformen einschließlich der vegetativen Form im Septum identifiziert worden (Berendt, 2011).

In *N. punctiforme* führte die Mutation zu einer vermehrten Hormogonien-Differenzierung auf BG11-Medium. Ansonsten zeigte die *sepJ_N*-Mutante in diesem keinen sichtbaren Phänotyp.

Microarray-Daten ließen eine Herunterregulation von *sepJ_N* (NpunR1723) um den Faktor 1,5 nach 12 h Hormogonieninduktion erkennen (Campbell *et al.*, 2007). Ein Merkmal der Hormogonien-Differenzierung ist die Fragmentierung in kurze Filamente mit einer Zellzahl zwischen 10 und 30 Zellen. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Mutation von *sepJ_N* und der vermehrten Hormogonien-Differenzierung. Die Herunterregulation von *sepJ_N* könnte zu einer verminderten Filamentintegrität führen, was eine kontrollierte Fragmentierung der Filamente im Septum unterstützt (Meeks *et al.*, 2002). Eine starke Fragmentierung der Filamente konnte auch bei der *sepJ*-Mutante in *Anabaena* PCC 7120 beobachtet werden (Flores *et al.*, 2007, Nayar *et al.*, 2007). Der WT von *Anabaena* PCC 7120 differenziert aber keine Hormogonien. Die Fragmentierung hat somit einen direkten Effekt auf die Filamentlänge vegetativer Zellen. Die Differenzierungsexperimente bei der Mutante zeigten, dass vom WT nicht zu unterscheidende Hormogonien und Akineten gebildet wurden (Abb. 33B1), jedoch war die Differenzierung von Heterozysten gestört (Abb. 33B2). Nach wenigen Tagen Stickstoffentzug blichen die Zellen aus. Mikroskopische Analysen bestätigten, dass ca. 90 % der Zellen geblichen waren, die restlichen 10 % jedoch in ihrem Wachstum nicht beeinträchtigt schienen und diazotroph mit offensichtlich funktionierenden Heterozysten wuchsen (Abb. 33B2, Pfeilspitzen). Wie in *Anabaena* PCC 7120 scheint *SepJ_N* bei der Differenzierung funktionsfähiger Heterozysten wichtig zu sein. In der BG11₀-Kultur waren nach wenigen Tagen viele vereinzelte Heterozysten aufzufinden. Ebenso waren die Filamente stark fragmentiert, was im Zusammenhang mit der Heterozysten-Differenzierung stehen könnte, da das schmale Septum strukturell bedingt eine potentielle Bruchstelle im Filament bildet (Abb. 19A5-6, Pfeilspitzen). Der Stickstoffmangel kann durch die defekten Heterozysten nicht ausgeglichen werden, weshalb fortlaufend neue funktionslose Heterozysten differenziert werden. In der Konsequenz fragmentierten viele Filamente und vereinzelte Heterozysten (Abb. 33B2, Pfeile). Die mangelnde Stickstofffixierung durch fehlerhafte Heterozysten und die einhergehende Filament-Fragmentierung deckte sich phänotypisch mit der *sepJ*-Mutante in *Anabaena* PCC 7120. Diese fragmentierte 72 h nach Stickstoffentzug zu einer Filamentlänge von bis zu 10 Zellen (Flores *et al.*, 2007, Nayar *et al.*, 2007, Mariscal *et al.*, 2011).

In *Anabaena* PCC 7120 führte die Mutation zur fehlerhaften Orientierung der intrazellulären Membranen in den Heterozysten. Zum Teil bildeten sich mehrere Pro-Heterozysten innerhalb einer Hep-Schicht, und die Heterozysten-spezifische Glycolipidschicht wurde nicht aufgelagert (Flores *et al.*, 2007). Wenngleich das Wachstum der *sepJ_N*-Mutante von

N. punctiforme auf stickstofffreiem Medium zu schätzungsweise 90 % nicht möglich war, konnten phänotypische Anomalien in den vorhandenen Heterozysten nicht beobachtet werden (nicht gezeigt). Jedoch lassen FRAP-Vorversuche auf einen verzögerten interzellulären Calcein-Transport in der Mutante schließen. Dabei wurde im Durchschnitt ein um $\frac{1}{4}$ langsamerer interzellulärer Calcein-Transport einer in BG11-Medium gewachsener Mutanten-Kultur im Vergleich zum WT gemessen (Daten nicht gezeigt). Ein reduzierter Transport wurde auch in der *sepJ*-Mutante von *Anabaena* PCC 7120 festgestellt. Durch die Lokalisierung von SepJ im Septum von *Anabaena* PCC 7120 und den verzögerten interzellulären Transport in der Mutante schließen die Autoren, dass es sich bei SepJ um ein Kanal-bildendes Protein handeln könnte (Mullineaux *et al.*, 2008). Zusammenfassend kann man behaupten, dass sich die *sepJ*-Mutation in *Anabaena* PCC 7120 und *N. punctiforme* negativ auf die Filamentintegrität, die Stickstofffixierung und den interzellulären Calcein-Transport auswirkt (Mariscal *et al.*, 2011, Flores *et al.*, 2007).

Trotz dieses Phänotyps entwickelten sich ca. 10 % der Filamente normal. Mikroskopisch betrachtet haben sie eine mit dem WT vergleichbar starke Autofluoreszenz mit funktionierenden Heterozysten (Abb. 33B2, Pfeilspitzen). Nach mehreren Wochen unter Stickstoffmangel entwickelte sich die gesamte Kultur zu wachsenden Filamenten mit funktionierenden Heterozysten (Abb. 32B, 14 Tage -N). PCR-Analysen dieser stickstofffixierenden Kultur zeigten eine vollständig segregierte *sepJ_N*-Mutante ohne intaktes WT-Gen (Daten nicht gezeigt). Vermutlich handelt es sich bei der Mutante um eine Suppressor-Mutante, die durch Mutationen weiterer Gene die Dysfunktion in der Stickstoff-Assimilation aufhebt. Möglicherweise könnten durch regulatorische Veränderungen die Produkte anderer Gene die Funktion von SepJ_N übernehmen und somit den Phänotyp unterdrücken. Dieser Effekt hält aber nur so lange an, wie die Mutante in stickstofffreiem BG11₀-Medium dem Selektionsdruck unterlegen ist. Überführt man die Mutante von stickstofffreiem BG11₀-Medium in stickstoffhaltiges BG11-Medium und nach mehreren Wochen wieder zurück in BG11₀-Medium wiederholt sich die Symptomatik. Bisher konnte noch nicht geklärt werden, welche intrazellulären Ereignisse diesen phänotypischen Effekt herbeiführen.

F.12 Ausblick

Mit der Entdeckung der Poren im septalen Murein von *N. punctiforme* hat sich nicht nur der Blickwinkel auf die Zell-Zell-Kommunikation geändert, gleichermaßen hat sich hiermit ein

neuer Schwerpunkt in diesem Forschungsfeld geöffnet. In dieser Arbeit wurden zum einen erstmals diese Poren gezeigt, zum anderen aber auch ein Protein AmiC2 charakterisiert, welches grundlegend an der Bildung dieser Strukturen beteiligt ist.

Elektronenmikroskopische Analysen offenbarten ein hoch strukturiertes Siebmuster, dessen Differenzierung weitestgehend ungeklärt ist. In zukünftigen Projekten sollte verstärkt der vermutlich hochkomplexe Prozess der Porenbildung erforscht werden. Proteomanalysen Murein-gekoppelter Proteine könnten Kandidaten liefern, die an der Porenbildung bzw. an der Organisation der Porenstruktur beteiligt sind. In *E. coli* sind EnvC und NlpD die beiden Hauptregulatoren der Amidasen AmiA, AmiB und AmiC (Uehara *et al.*, 2010). Mit der Identifikation der Regulatoren von AmiC2 in *N. punctiforme* könnte ein wichtiger Faktor der Porenbildung geklärt worden sein. Ebenso sollten die nicht-letalen Folgen der AmiC2-Überexpression in *Anabaena* PCC 7120 auf die Porenbildung bzw. den Calcein-Transport ergründet werden.

Ferner sollte spezifisch nach Mureinsynthasen wie den PBPs gesucht werden, welche möglicherweise in einem Multienzymkomplex an der Porenbildung beteiligt sein könnten. Deren Identifikation könnte wichtige Fragen hinsichtlich der Porenbildung klären. Findet tatsächlich eine anfängliche Auflagerung von Murein statt, bevor eine Pore gebildet wird? Wenn ja, wie wird die Mureinsynthase an ihren Wirkort rekrutiert?

In der weiteren Charakterisierung von AmiC2 von *N. punctiforme* könnte eine Kristallstruktur Informationen über die Bindung der AMIN-Domäne an spezifische Strukturen im Septum liefern. Im Vergleich mit anderen Amidase-Strukturen könnten möglicherweise auch in *N. punctiforme* spezifische Elemente gefunden werden, die für die Porenbildung essentiell sind.

Mit der Erarbeitung eines Protokolls zur Reinigung von Mureinsäcken aus filamentösen Cyanobakterien und deren elektronenmikroskopische Analyse wurde eine Methode geschaffen, die feinste Strukturen im Murein sichtbar machen. Mit dieser Methode ist es zukünftig möglich, Mureinpräparationen beliebiger Mutanten zu analysieren und deren Effekte auf die Mureinsynthese zu charakterisieren.

G Literaturverzeichnis

- Adams, D. G. & P. S. Duggan**, (1999) Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytol.* **144**: 3-33.
- Adams, D. W. & J. Errington**, (2009) Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nature reviews. Microbiology* **7**: 642-653.
- Allen, M. B. & D. I. Arnon**, (1955) Studies on Nitrogen-Fixing Blue-Green Algae. I. Growth and Nitrogen Fixation by *Anabaena Cylindrica* Lemm. *Plant physiology* **30**: 366-372.
- Argueta, C. & M. L. Summers**, (2005) Characterization of a model system for the study of *Nostoc punctiforme* akinetes. *Archives of microbiology* **183**: 338-346.
- Asoh, S., H. Matsuzawa, F. Ishino, J. L. Strominger, M. Matsushashi & T. Ohta**, (1986) Nucleotide sequence of the *pbpA* gene and characteristics of the deduced amino acid sequence of penicillin-binding protein 2 of *Escherichia coli* K12. *European journal of biochemistry / FEBS* **160**: 231-238.
- Bauer, C. C., W. J. Buikema, K. Black & R. Haselkorn**, (1995) A short-filament mutant of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 that fragments in nitrogen-deficient medium. *Journal of bacteriology* **177**: 1520-1526.
- Berendt, S.**, (2011) Funktionelle Charakterisierung von Zellwandproteinen in der Zelldifferenzierung von Heterozysten bildenden Cyanobakterien der Ordnung Nostocales. *Dissertation: Eberhard Karls Universität Tübingen*.
- Berendt, S., J. Lehner, Y. Zhang, T. M. Rasse, K. Forchhammer & I. Maldener**, (2012) Cell-Wall Amidase AmiC1 is Required for Cellular Communication and Heterocyst Development in the Cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120 but Not for Filament Integrity. *Journal of bacteriology* **194**: 5218-5227
- Bernhardt, T. G. & P. A. de Boer**, (2003) The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Molecular microbiology* **48**: 1171-1182.
- Bertsche, U., T. Kast, B. Wolf, C. Fraipont, M. E. Aarsman, K. Kannenberg, M. von Rechenberg, M. Nguyen-Disteche, T. den Blaauwen, J. V. Holtje & W. Vollmer**, (2006) Interaction between two murein (peptidoglycan) synthases, PBP3 and PBP1B, in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **61**: 675-690.
- Bi, E., K. Dai, S. Subbarao, B. Beall & J. Lutkenhaus**, (1991) FtsZ and cell division. *Research in microbiology* **142**: 249-252.
- Black, T. A., Y. Cai & C. P. Wolk**, (1993) Spatial expression and autoregulation of *hetR*, a gene involved in the control of heterocyst development in *Anabaena*. *Molecular microbiology* **9**: 77-84.
- Bradford, M. M.**, (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254.
- Braun, V. & K. Rehn**, (1969) Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the *E. coli* cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure. *European journal of biochemistry / FEBS* **10**: 426-438.
- Broome-Smith, J. K., A. Edelman, S. Yousif & B. G. Spratt**, (1985) The nucleotide sequences of the *ponA* and *ponB* genes encoding penicillin-binding protein 1A and 1B of *Escherichia coli* K12. *European journal of biochemistry / FEBS* **147**: 437-446.
- Burdett, I. D.**, (1979) Electron microscope study of the rod-to-coccus shape change in a temperature-sensitive rod- mutant of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **137**: 1395-1405.

- Cai, Y. P. & C. P. Wolk**, (1990) Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *Journal of bacteriology* **172**: 3138-3145.
- Campbell, E. L., M. L. Summers, H. Christman, M. E. Martin & J. C. Meeks**, (2007) Global gene expression patterns of *Nostoc punctiforme* in steady-state dinitrogen-grown heterocyst-containing cultures and at single time points during the differentiation of akinetes and hormogonia. *Journal of bacteriology* **189**: 5247-5256.
- Carballido-Lopez, R.**, (2006) Orchestrating bacterial cell morphogenesis. *Molecular microbiology* **60**: 815-819.
- Carballido-Lopez, R. & J. Errington**, (2003) A dynamic bacterial cytoskeleton. *Trends in cell biology* **13**: 577-583.
- Cohen, M. F., J. G. Wallis, E. L. Campbell & J. C. Meeks**, (1994) Transposon mutagenesis of *Nostoc* sp. strain ATCC 29133, a filamentous cyanobacterium with multiple cellular differentiation alternatives. *Microbiology* **140** (Pt 12): 3233-3240.
- Damerval, T., G. Guglielmi, J. Houmard & N. T. De Marsac**, (1991) Hormogonium Differentiation in the Cyanobacterium *Calothrix*: A Photoregulated Developmental Process. *The Plant cell* **3**: 191-201.
- Daniel, R. A. & J. Errington**, (2003) Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* **113**: 767-776.
- de Pedro, M. A., J. C. Quintela, J. V. Höltje & H. Schwarz**, (1997) Murein segregation in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **179**: 2823-2834.
- de Souza, R. F., V. Anantharaman, S. J. de Souza, L. Aravind & F. J. Gueiros-Filho**, (2008) AMIN domains have a predicted role in localization of diverse periplasmic protein complexes. *Bioinformatics* **24**: 2423-2426.
- Demchick, P. & A. L. Koch**, (1996) The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **178**: 768-773.
- Di Berardino, M., A. Dijkstra, D. Stuber, W. Keck & M. Gubler**, (1996) The monofunctional glycosyltransferase of *Escherichia coli* is a member of a new class of peptidoglycan-synthesising enzymes. *FEBS letters* **392**: 184-188.
- Doublet, P., J. van Heijenoort, J. P. Bohin & D. Mengin-Lecreulx**, (1993) The *murI* gene of *Escherichia coli* is an essential gene that encodes a glutamate racemase activity. *Journal of bacteriology* **175**: 2970-2979.
- Dougherty, T. J., J. A. Thanassi & M. J. Pucci**, (1993) The *Escherichia coli* mutant requiring D-glutamic acid is the result of mutations in two distinct genetic loci. *Journal of bacteriology* **175**: 111-116.
- Duggan, P. S., P. Gottardello & D. G. Adams**, (2007) Molecular analysis of genes in *Nostoc punctiforme* involved in pilus biogenesis and plant infection. *Journal of bacteriology* **189**: 4547-4551.
- Dunn, J. H. & C. P. Wolk**, (1970) Composition of the cellular envelopes of *Anabaena cylindrica*. *Journal of bacteriology* **103**: 153-158.
- Ehlert, K., J. V. Höltje & M. F. Templin**, (1995) Cloning and expression of a murein hydrolase lipoprotein from *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **16**: 761-768.
- Elhai, J. & C. P. Wolk**, (1988) A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene* **68**: 119-138.
- Fay, P.**, (1992) Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiological reviews* **56**: 340-373.
- Figurski, D. H. & D. R. Helinski**, (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 1648-1652.

- Flores, E. & A. Herrero, (2010) Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nature reviews. Microbiology* **8**: 39-50.
- Flores, E., A. Herrero, C. P. Wolk & I. Maldener, (2006) Is the periplasm continuous in filamentous multicellular cyanobacteria? *Trends in microbiology* **14**: 439-443.
- Flores, E., R. Pernil, A. M. Muro-Pastor, V. Mariscal, I. Maldener, S. Lechno-Yossef, Q. Fan, C. P. Wolk & A. Herrero, (2007) Septum-localized protein required for filament integrity and diazotrophy in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena sp.* strain PCC 7120. *Journal of bacteriology* **189**: 3884-3890.
- Fuger, P., L. B. Behrends, S. Mertel, S. J. Sigrist & T. M. Rasse, (2007) Live imaging of synapse development and measuring protein dynamics using two-color fluorescence recovery after photo-bleaching at *Drosophila* synapses. *Nature protocols* **2**: 3285-3298.
- Garcia, D. L. & J. P. Dillard, (2006) AmiC functions as an N-acetylmuramyl-l-alanine amidase necessary for cell separation and can promote autolysis in *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of bacteriology* **188**: 7211-7221.
- Ge, M., Z. Chen, H. R. Onishi, J. Kohler, L. L. Silver, R. Kerns, S. Fukuzawa, C. Thompson & D. Kahne, (1999) Vancomycin derivatives that inhibit peptidoglycan biosynthesis without binding D-Ala-D-Ala. *Science* **284**: 507-511.
- Ghuysen, J. M., (1968) Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriological reviews* **32**: 425-464.
- Giddings, H. T. & L. A. Staehelin, (1981) Observation of Microplasmodesmata in both heterocyst-forming and non-heterocyst forming filamentous cyanobacteria by freeze-fracture electron microscopy. *Archives of microbiology* **129**: 295-298.
- Glauner, B., J. V. Höltje & U. Schwarz, (1988) The composition of the murein of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **263**: 10088-10095.
- Goodell, E. W., (1985) Recycling of murein by *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **163**: 305-310.
- Guglielmi, G. & G. Cohen-Bazire, (1982) Structure et distribution des pores et des perforations de l'enveloppe de peptidoglycane chez quelques cyanobactéries. *Protistologica* **2**: 151-165.
- Hamilton, R. C., F. G. Bover & T. J. Mason, (1975) An association between fimbriae and pores in the wall of *Fusiformis nodosus*. *Journal of general microbiology* **91**: 421-424.
- Hanahan, D., (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**: 557-580.
- Hanahan, D., J. Jessee & F. R. Bloom, (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in enzymology* **204**: 63-113.
- Hayhurst, E. J., L. Kailas, J. K. Hobbs & S. J. Foster, (2008) Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 14603-14608.
- Heidrich, C., M. F. Templin, A. Ursinus, M. Merdanovic, J. Berger, H. Schwarz, M. A. de Pedro & J. V. Höltje, (2001) Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **41**: 167-178.
- Heidrich, C., A. Ursinus, J. Berger, H. Schwarz & J. V. Holtje, (2002) Effects of multiple deletions of murein hydrolases on viability, septum cleavage, and sensitivity to large toxic molecules in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **184**: 6093-6099.
- Heilmann, C., M. Hussain, G. Peters & F. Götz, (1997) Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Molecular microbiology* **24**: 1013-1024.

- Herrero, A., A. M. Muro-Pastor & E. Flores**, (2001) Nitrogen control in cyanobacteria. *Journal of bacteriology* **183**: 411-425.
- Hoiczky, E. & W. Baumeister**, (1995) Envelope structure of four gliding filamentous cyanobacteria. *Journal of bacteriology* **177**: 2387-2395.
- Höltje, J. V.**, (1995) From growth to autolysis: the murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Archives of microbiology* **164**: 243-254.
- Höltje, J. V.**, (1996) A hypothetical holoenzyme involved in the replication of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology* **142 (Pt 8)**: 1911-1918.
- Höltje, J. V.**, (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **62**: 181-203.
- Höltje, J. V. & C. Heidrich**, (2001) Enzymology of elongation and constriction of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Biochimie* **83**: 103-108.
- Hosoi, A.**, (1951) Secretion of slime substance in *Oscillatoria* in relation to its movement. *Bot. Mag.* **64**: 6-14.
- Hu, B., G. Yang, W. Zhao, Y. Zhang & J. Zhao**, (2007) MreB is important for cell shape but not for chromosome segregation of the filamentous cyanobacterium *Anabaena sp.* PCC 7120. *Molecular microbiology* **63**: 1640-1652.
- Huard, C., G. Miranda, F. Wessner, A. Bolotin, J. Hansen, S. J. Foster & M. P. Chapot-Chartier**, (2003) Characterization of AcMB, an N-acetylglucosaminidase autolysin from *Lactococcus lactis*. *Microbiology* **149**: 695-705.
- Ikeda, M., M. Wachi, H. K. Jung, F. Ishino & M. Matsushashi**, (1991) The *Escherichia coli mraY* gene encoding UDP-N-acetylmuramoyl-pentapeptide: undecaprenylphosphate phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide transferase. *Journal of bacteriology* **173**: 1021-1026.
- Ishino, F., K. Mitsui, S. Tamaki & M. Matsushashi**, (1980) Dual enzyme activities of cell wall peptidoglycan synthesis, peptidoglycan transglycosylase and penicillin-sensitive transpeptidase, in purified preparations of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1A. *Biochemical and biophysical research communications* **97**: 287-293.
- Jiang, H., R. Kong & X. Xu**, (2010) The N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase gene promotes growth and cell differentiation of cyanobacteria under light-limiting conditions. *Journal of bacteriology* **192**: 2239-2245.
- Jones, L. J., R. Carballido-Lopez & J. Errington**, (2001) Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**: 913-922.
- Jost, M.**, (1965) Die Ultrastruktur von *Oscillatoria rubescens* D. C. *Archiv für Mikrobiologie* **50**: 211-245.
- Jürgens, U. J., G. Drews & J. Weckesser**, (1983) Primary structure of the peptidoglycan from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC 6714. *Journal of bacteriology* **154**: 471-478.
- Kajimura, J., T. Fujiwara, S. Yamada, Y. Suzawa, T. Nishida, Y. Oyamada, I. Hayashi, J. Yamagishi, H. Komatsuzawa & M. Sugai**, (2005) Identification and molecular characterization of an N-acetylmuramyl-L-alanine amidase Sle1 involved in cell separation of *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology* **58**: 1087-1101.
- Kawai, Y., J. Marles-Wright, R. M. Cleverley, R. Emmins, S. Ishikawa, M. Kuwano, N. Heinz, N. K. Bui, C. N. Hoyland, N. Ogasawara, R. J. Lewis, W. Vollmer, R. A. Daniel & J. Errington**, (2011) A widespread family of bacterial cell wall assembly proteins. *The EMBO journal* **30**: 4931-4941.
- Koch, A. L.**, (1990) The surface stress theory for the case of *Escherichia coli*: the paradoxes of gram-negative growth. *Research in microbiology* **141**: 119-130.
- Koraimann, G.**, (2003) Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cell. Mol. Life Sci* **60**: 2371-2388.

- Kroog, M.**, (2009) Zur Funktion der AmiC-Amidasen (NpF1845 und NpF1846) des mehrzelligen symbiotischen Cyanobakteriums *Nostoc punctiforme* Stamm ATCC29133. *Zulassungsarbeit: Eberhard Karls Universität Tübingen.*
- Kubori, T., N. Shimamoto, S. Yamaguchi, K. Namba & S. Aizawa**, (1992) Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Journal of molecular biology* **226**: 433-446.
- Kurk, T., D. G. Adams, S. D. Connell & N. H. Thomson**, (2010) Three-channel false colour AFM images for improved interpretation of complex surfaces: a study of filamentous cyanobacteria. *Ultramicroscopy* **110**: 718-722.
- Labischinski, H., E. W. Goodell, A. Goodell & M. L. Hochberg**, (1991) Direct proof of a "more-than-single-layered" peptidoglycan architecture of *Escherichia coli* W7: a neutron small-angle scattering study. *Journal of bacteriology* **173**: 751-756.
- Lazaro, S., F. Fernandez-Pinas, E. Fernandez-Valiente, A. Blanco-Rivero & F. Leganes**, (2001) *pbpB*, a gene coding for a putative penicillin-binding protein, is required for aerobic nitrogen fixation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120. *Journal of bacteriology* **183**: 628-636.
- Lehner, J.**, (2008) Zellwand-Differenzierung bei *Nostoc punctiforme*. *Diplomarbeit Eberhard Karls Universität Tübingen.*
- Lehner, J., Y. Zhang, S. Berendt, T. M. Rasse, K. Forchhammer & I. Maldener**, (2011) The morphogene AmiC2 is pivotal for multicellular development in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Molecular microbiology* **79**: 1655-1669.
- Liger, D., A. Masson, D. Blanot, J. van Heijenoort & C. Parquet**, (1995) Over-production, purification and properties of the uridine-diphosphate-N-acetylmuramate:L-alanine ligase from *Escherichia coli*. *European journal of biochemistry / FEBS* **230**: 80-87.
- Lleo, M. M., P. Canepari & G. Satta**, (1990) Bacterial cell shape regulation: testing of additional predictions unique to the two-competing-sites model for peptidoglycan assembly and isolation of conditional rod-shaped mutants from some wild-type cocci. *Journal of bacteriology* **172**: 3758-3771.
- Lutkenhaus, J.**, (2007) Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annual review of biochemistry* **76**: 539-562.
- Maldener, I. & A. M. Muro-Pastor**, (2010) Cyanobacterial Heterocysts. *Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons, Ltd.*
- Marbouty, M., C. Saguez, C. Cassier-Chauvat & F. Chauvat**, (2009a) ZipN, an FtsA-like orchestrator of divisome assembly in the model cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Molecular microbiology* **74**: 409-420.
- Marbouty, M., C. Saguez & F. Chauvat**, (2009b) The cyanobacterial cell division factor Ftn6 contains an N-terminal DnaD-like domain. *BMC structural biology* **9**: 54.
- Mariscal, V., A. Herrero & E. Flores**, (2007) Continuous periplasm in a filamentous, heterocyst-forming cyanobacterium. *Molecular microbiology* **65**: 1139-1145.
- Mariscal, V., A. Herrero, A. Nenninger, C. W. Mullineaux & E. Flores**, (2011) Functional dissection of the three-domain SepJ protein joining the cells in cyanobacterial trichomes. *Molecular microbiology* **79**: 1077-1088.
- Marquardt, J. L., D. A. Siegele, R. Kolter & C. T. Walsh**, (1992) Cloning and sequencing of *Escherichia coli murZ* and purification of its product, a UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase. *Journal of bacteriology* **174**: 5748-5752.
- Maruyama, I. N., A. H. Yamamoto & Y. Hirota**, (1988) Determination of gene products and coding regions from the *murE-murF* region of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **170**: 3786-3788.
- McKinney, G.**, (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *The Journal of biological chemistry* **140**: 315-322.

- Meeks, J. C., E. L. Campbell, M. L. Summers & F. C. Wong, (2002) Cellular differentiation in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Archives of microbiology* **178**: 395-403.
- Meeks, J. C. & J. Elhai, (2002) Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **66**: 94-121; table of contents.
- Meeks, J. C., J. Elhai, T. Thiel, M. Potts, F. Larimer, J. Lamerdin, P. Predki & R. Atlas, (2001) An overview of the genome of *Nostoc punctiforme*, a multicellular, symbiotic cyanobacterium. *Photosynthesis research* **70**: 85-106.
- Mengin-Lecreulx, D., L. Texier, M. Rousseau & J. van Heijenoort, (1991) The *murG* gene of *Escherichia coli* codes for the UDP-N-acetylglucosamine: N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase involved in the membrane steps of peptidoglycan synthesis. *Journal of bacteriology* **173**: 4625-4636.
- Merino-Puerto, V., V. Mariscal, C. W. Mullineaux, A. Herrero & E. Flores, (2010) Fra proteins influencing filament integrity, diazotrophy and localization of septal protein SepJ in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena sp.* *Molecular microbiology*.
- Merino-Puerto, V., H. Schwarz, I. Maldener, V. Mariscal, C. W. Mullineaux, A. Herrero & E. Flores, (2011) FraC/FraD-dependent intercellular molecular exchange in the filaments of a heterocyst-forming cyanobacterium, *Anabaena sp.* *Molecular microbiology* **82**: 87-98.
- Miller, L. H., (1972) Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory, Press Cold Spring Harbor, New York*.
- Mohammadi, T., V. van Dam, R. Sijbrandi, T. Vernet, A. Zapun, A. Bouhss, M. Diepeveen-de Bruin, M. Nguyen-Disteche, B. de Kruijff & E. Breukink, (2011) Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *The EMBO journal* **30**: 1425-1432.
- Mullineaux, C. W., V. Mariscal, A. Nenner, H. Khanum, A. Herrero, E. Flores & D. G. Adams, (2008) Mechanism of intercellular molecular exchange in heterocyst-forming cyanobacteria. *The EMBO journal* **27**: 1299-1308.
- Nakagawa, J., S. Tamaki & M. Matsushashi, (1979) Purified penicillin binding proteins 1Bs from *Escherichia coli* membrane showing activities of both peptidoglycan polymerase and peptidoglycan crosslinking enzyme. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 1379-1380.
- Nakamura, M., I. N. Maruyama, M. Soma, J. Kato, H. Suzuki & Y. Horota, (1983) On the process of cellular division in *Escherichia coli*: nucleotide sequence of the gene for penicillin-binding protein 3. *Molecular & general genetics : MGG* **191**: 1-9.
- Nambu, T., T. Minamino, R. M. Macnab & K. Kutsukake, (1999) Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* **181**: 1555-1561.
- Nayar, A. S., H. Yamaura, R. Rajagopalan, D. D. Risser & S. M. Callahan, (2007) FraG is necessary for filament integrity and heterocyst maturation in the cyanobacterium *Anabaena sp.* strain PCC 7120. *Microbiology* **153**: 601-607.
- Oshida, T., M. Sugai, H. Komatsuzawa, Y. M. Hong, H. Suginaka & A. Tomasz, (1995) A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo-beta-N-acetylglucosaminidase domain: cloning, sequence analysis, and characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 285-289.

- Otero, A. & M. Vincenzini**, (2004) *Nostoc* (cynophyceae) goes nude: extracellular polysaccharides serve as a sink for reducing power under unbalanced C/N metabolism. *J Phycol* **40**: 74-81.
- Palinska, K. A.**, (2008) Cyanobacteria. *Encyclopedias of Life Sciences, John Wiley & Sons, Ltd.*: 1-11.
- Palinska, K. A. & W. E. Krumbein**, (2000) Perforation patterns in the peptidoglycan wall of filamentous cyanobacteria. *J. Phycol.* **36**: 139-145.
- Peters, N. T., T. Dinh & T. G. Bernhardt**, (2011) A fail-safe mechanism in the septal ring assembly pathway generated by the sequential recruitment of cell separation amidases and their activators. *Journal of bacteriology* **193**: 4973-4983.
- Pitzurra, M. & W. Szybalski**, (1959) Formation and multiplication of spheroplasts of *Escherichia coli* in the presence of lithium chloride. *Journal of bacteriology* **77**: 614-620.
- Priyadarshini, R., M. A. de Pedro & K. D. Young**, (2007) Role of peptidoglycan amidases in the development and morphology of the division septum in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **189**: 5334-5347.
- Priyadarshini, R., D. L. Popham & K. D. Young**, (2006) Daughter cell separation by penicillin-binding proteins and peptidoglycan amidases in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **188**: 5345-5355.
- Reynolds, P. E.**, (1989) Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **8**: 943-950.
- Rippka, R., J. Deruelles, J. B. Waterbury, M. Herdman & R. Y. Stanier**, (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* **111**: 1-61.
- Ris, H. & R. N. Singh**, (1961) Electron microscopy studies on blue-green algae. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**: 63-80.
- Sambrock, J., E. Fritsch & T. Maniatis**, (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.*
- Satta, G., R. Fontana & P. Canepari**, (1994) The two-competing site (TCS) model for cell shape regulation in bacteria: the envelope as an integration point for the regulatory circuits of essential physiological events. *Advances in microbial physiology* **36**: 181-245.
- Schiffer, G. & J. V. Höltje**, (1999) Cloning and characterization of PBP 1C, a third member of the multimodular class A penicillin-binding proteins of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **274**: 32031-32039.
- Schleifer, K. H. & O. Kandler**, (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological reviews* **36**: 407-477.
- Schneider, D., E. Fuhrmann, I. Scholz, W. R. Hess & P. L. Graumann**, (2007) Fluorescence staining of live cyanobacterial cells suggest non-stringent chromosome segregation and absence of a connection between cytoplasmic and thylakoid membranes. *BMC cell biology* **8**: 39.
- Schwarzenlander, C., W. Haase & B. Averhoff**, (2009) The role of single subunits of the DNA transport machinery of *Thermus thermophilus* HB27 in DNA binding and transport. *Environmental microbiology* **11**: 801-808.
- Shockman, G. D., L. Daneo-Moore, R. Kariyama & O. Massidda**, (1996) Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins, and autolysis. *Microbial drug resistance* **2**: 95-98.

- Simon, R. D.**, (1987) Inclusion bodies in the cyanobacteria; cyanophycin, polyphosphate, polyhedral bodies, In: The cyanobacteria, Fay, P., Van Baalen, C. (eds.), . *Elsevier Science Publishers (eds.)*,: 199-225.
- Spratt, B. G.**, (1975) Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**: 2999-3003.
- Spratt, B. G. & A. B. Pardee**, (1975) Penicillin-binding proteins and cell shape in *E. coli*. *Nature* **254**: 516-517.
- Stanier, R. Y., W. R. Siström & T. A. Hansen**, (1978) Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green-algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* **28**: 335-336.
- Strominger, J. L. & J. M. Ghuyssen**, (1967) Mechanisms of enzymatic bacteriaolysis. Cell walls of bacteria are solubilized by action of either specific carbohydrases or specific peptidases. *Science* **156**: 213-221.
- Suginaka, H., P. M. Blumberg & J. L. Strominger**, (1972) Multiple penicillin-binding components in *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **247**: 5279-5288.
- Sutherland, J. M., M. Herman & W. D. P. Stewart**, (1979) Akinetes of the Cyanobacterium *Nostoc* PCC 7524: Macromolecular Composition, Structure and Control of Differentiation. *Journal of general microbiology* **115**: 273-287.
- Tandeau De Marsac, N.**, (1994) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. *Kluwer Academic Publishers*. 825-842.
- Tiyanont, K., T. Doan, M. B. Lazarus, X. Fang, D. Z. Rudner & S. Walker**, (2006) Imaging peptidoglycan biosynthesis in *Bacillus subtilis* with fluorescent antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 11033-11038.
- Uehara, T. & T. G. Bernhardt**, (2011) More than just lysins: peptidoglycan hydrolases tailor the cell wall. *Current opinion in microbiology* **14**: 698-703.
- Uehara, T., T. Dinh & T. G. Bernhardt**, (2009) LytM-domain factors are required for daughter cell separation and rapid ampicillin-induced lysis in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **191**: 5094-5107.
- Uehara, T., K. R. Parzych, T. Dinh & T. G. Bernhardt**, (2010) Daughter cell separation is controlled by cytokinetic ring-activated cell wall hydrolysis. *The EMBO journal* **29**: 1412-1422.
- van den Ent, F., L. A. Amos & J. Lowe**, (2001) Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* **413**: 39-44.
- van Heijenoort, J.**, (2011) Peptidoglycan hydrolases of *Escherichia coli*. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* **75**: 636-663.
- Verwer, R. W., E. H. Beachey, W. Keck, A. M. Stoub & J. E. Poldermans**, (1980) Oriented fragmentation of *Escherichia coli* sacculi by sonication. *Journal of bacteriology* **141**: 327-332.
- Verwer, R. W., N. Nanninga, W. Keck & U. Schwarz**, (1978) Arrangement of glycan chains in the sacculus of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **136**: 723-729.
- Vollmer, W. & U. Bertsche**, (2008) Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta* **1778**: 1714-1734.
- Vollmer, W. & J. V. Höltje**, (2004) The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)? *Journal of bacteriology* **186**: 5978-5987.

- Vollmer, W., B. Joris, P. Charlier & S. Foster**, (2008) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS microbiology reviews* **32**: 259-286.
- Walsby, A. E.**, (1985) The permeability of heterocysts to the gases nitrogen and oxygen. *Proc. R. Soc. London Ser. B* **226**: 345-366.
- Walsby, A. E. & P. K. Hayes**, (1989) Gas vesicle proteins. *The Biochemical journal* **264**: 313-322.
- Weidel, W., H. Frank & H. H. Martin**, (1960) The rigid layer of the cell wall of *Escherichia coli* strain B. *Journal of general microbiology* **22**: 158-166.
- Weiss, B., A. Jacquemin-Sablon, T. R. Live, G. C. Fareed & C. C. Richardson**, (1968) Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *The Journal of biological chemistry* **243**: 4543-4555.
- Weiss, D. S.**, (2004) Bacterial cell division and the septal ring. *Molecular microbiology* **54**: 588-597.
- White, C. L., A. Kitich & J. W. Gober**, (2010) Positioning cell wall synthetic complexes by the bacterial morphogenetic proteins MreB and MreD. *Molecular microbiology* **76**: 616-633.
- Wild, J., J. Hennig, M. Lobočka, W. Walczak & T. Kłopotowski**, (1985) Identification of the *dadX* gene coding for the predominant isozyme of alanine racemase in *Escherichia coli* K12. *Molecular & general genetics : MGG* **198**: 315-322.
- Wilk, L., M. Strauss, M. Rudolf, K. Nicolaisen, E. Flores, W. Kuhlbrandt & E. Schleiff**, (2011) Outer membrane continuity and septosome formation between vegetative cells in the filaments of *Anabaena sp.* PCC 7120. *Cellular microbiology* **13**: 1744-1754.
- Winkenbach, F., C. P. Wolk & M. Jost**, (1972) Lipids of membranes and of the cell envelope in heterocysts of blue-green alga. *Planta* **107**: 69-80.
- Wolk, C. P.**, (1996) Heterocyst formation. *Annual review of genetics* **30**: 59-78.
- Wolk, C. P., A. Ernst & J. Elhai**, (1994) Heterocyst metabolism and development. *The Molecular Biology of Cynaobacteria, ed. DA Bryant*: 769-823.
- Yao, X., M. Jericho, D. Pink & T. Beveridge**, (1999) Thickness and elasticity of gram-negative murein sacculi measured by atomic force microscopy. *Journal of bacteriology* **181**: 6865-6875.
- Yoon, H. S. & J. W. Golden**, (2001) PatS and products of nitrogen fixation control heterocyst pattern. *Journal of bacteriology* **183**: 2605-2613.
- Yu, W. & F. Götz**, (2012) Cell wall antibiotics provoke accumulation of anchored mCherry in the cross wall of *Staphylococcus aureus*. *PloS one* **7**: e30076.
- Zhang, C. C., S. Laurent, S. Sakr, L. Peng & S. Bedu**, (2006) Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: a chorus of signals. *Molecular microbiology* **59**: 367-375.
- Zhang, L. C., Y. F. Chen, W. L. Chen & C. C. Zhang**, (2008) Existence of periplasmic barriers preventing green fluorescent protein diffusion from cell to cell in the cyanobacterium *Anabaena sp.* strain PCC 7120. *Molecular microbiology* **70**: 814-823.
- Zhu, J., K. Jager, T. Black, K. Zarka, O. Koksharova & C. P. Wolk**, (2001) HcwA, an autolysin, is required for heterocyst maturation in *Anabaena sp.* strain PCC 7120. *Journal of bacteriology* **183**: 6841-6851.
- Zoll, S., B. Patzold, M. Schlag, F. Götz, H. Kalbacher & T. Stehle**, (2010) Structural basis of cell wall cleavage by a staphylococcal autolysin. *PLoS pathogens* **6**: e1000807.

H Publikationen

Aus der vorliegenden Arbeit sind folgende Publikation entstanden:

Lehner, J., Zhang, Y., Berendt, S., Rasse, T. M., Forchhammer, K. & Maldener, I. (2011).
The morphogene AmiC2 is pivotal for multicellular development in the cyanobacterium
Nostoc punctiforme.
Molecular Microbiology, **79**: 1655-1669.

Lehner, J., Berendt, S., Dörsam, B., Pérez, R., Forchhammer, K., Maldener, I. (2012).
Prokaryotic multicellularity: A nanosieve for bacterial cell communication.
Eingereicht bei *FASEB Journal*.

Publikationen aus anderen Arbeiten:

Berendt, S., Lehner, J., Zhang, Y, Rasse, T. M., Forchhammer, K & Maldener, I. (2012).
Cell-Wall amidase AmiC1 is required for cellular communication and heterocyst development
in the Cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120 but not for filament integrity.
Journal of Bacteriology, **194**: 5218-5227.

I Anhang

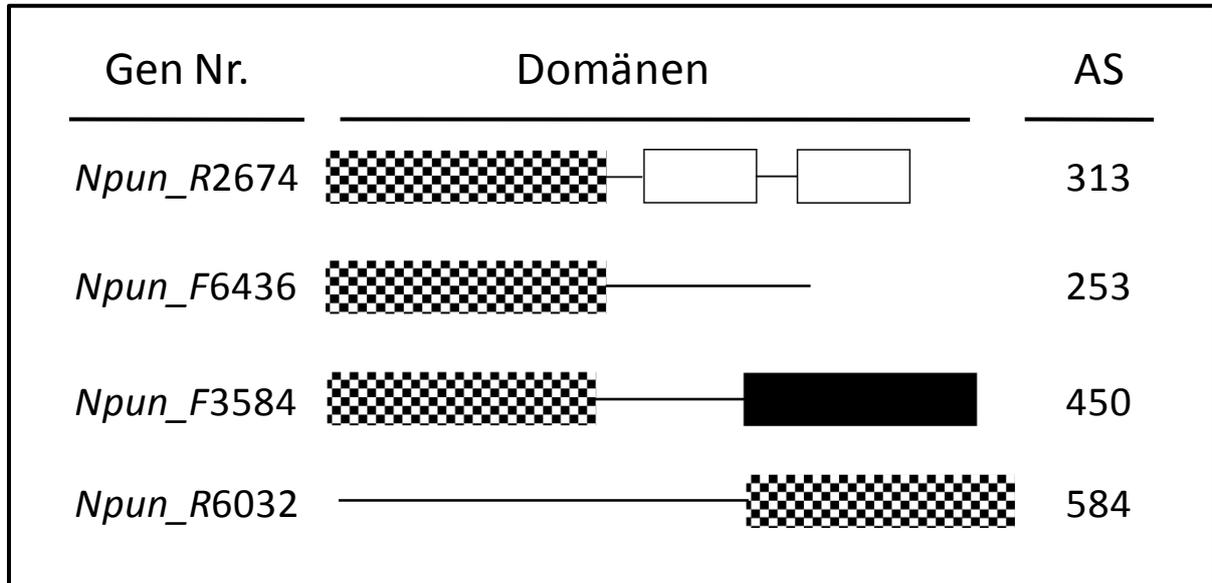
I.1 Weitere Amidasen der Amidase_3 Familie in *N. punctiforme*

Abb. 38: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Amidase_3-Homologen in *N. punctiforme*.

Die Amidase_3-Homologen wurden über Cyanobase ermittelt (bezogen auf: „<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>“) und deren Domänen-Organisation mit der Software InterProScan (EMBL-EBI) definiert. Amidase-Domäne (kariert), Peptidoglycan-Binde-Domänen (schwarz umrandet) und Glucosaminidase (schwarz); AS, Aminosäuren.

I.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Differenzierungsformen von <i>N. punctiforme</i>	3
Abb. 2: Die Architektur der Mureinschichten.....	10
Abb. 3: Schematische Darstellung der Peptidoglycanvorstufen und deren Einbau in den Mureinsacculus.....	12
Abb. 4: Schematische Zeichnung der Architektur des Mureinsacculus eines stäbchenförmigen Bakteriums.	13
Abb. 5: Hydrolyse der Amid- und Peptid-Bindungen im Peptidoglycan am Beispiel von <i>E. coli</i>	15
Abb. 6: Domänen-Organisation der Zellteilungs-spezifischen Amidasen aus <i>E. coli</i>	16
Abb. 7: Schematische Darstellung der Konjugationsvektoren pIM273 und pIM302.	33
Abb. 8: Kontrastierungsschema auf Parafilm für die Mureinsäcke.	39
Abb. 9: Schematische Darstellung von pIM347.	44
Abb. 10: Aminosäuresequenzen von AmiC1 und AmiC2 mit Domänen und Epitopen.	48
Abb. 11: Genomische Organisation der <i>amiC</i> -Gene, Insertion der Resistenzkassette C.K3 in <i>amiC2</i> und Transkriptionsanalyse von <i>amiC1</i> und <i>murI</i>	50
Abb. 12 Wachstumstest der <i>amiC2</i> -Mutante auf BG11- und BG11 ₀ -Medium.....	52
Abb. 13: Mikroskopische Analyse des WT's <i>N. punctiforme</i> und der <i>amiC2</i> -Mutante.	53
Abb. 14: Ultrastruktur des WT's <i>N. punctiforme</i> und der <i>amiC2</i> -Mutante.....	55
Abb. 15: Untersuchung der Zelldifferenzierung von WT <i>N. punctiforme</i> und <i>amiC2</i> -Mutante.	57
Abb. 16 Chromatographische Peptid-analyse der <i>amiC2</i> -Mutante.....	59
Abb. 17: Untersuchung der Zellwände des WT's <i>N. punctiforme</i> und der <i>amiC2</i> -Mutante.	60
Abb. 18: <i>In vivo</i> FRAP-Analyse Calcein-beladener Zellen des WT's <i>N. punctiforme</i> und der <i>amiC2</i> -Mutante.....	62
Abb. 19: Lichtmikroskopische Darstellung des Mureins des WT's <i>N. punctiforme</i> und der <i>amiC2</i> -Mutante.....	64
Abb. 20: Elektronenmikroskopische Analyse des Peptidoglycans des WT's <i>N. punctiforme</i> und der <i>amiC2</i> -Mutante.	66
Abb. 21: Schematische Zeichnung des <i>amiC</i> -Gen-Clusters und der AmiC-Domänen.....	68
Abb. 22: Schematische Darstellung der Konstruktion des AmiC2-6xHis-Expressionsplasmids pIM347 und der Überexpression von AmiC2-6xHis.	69

Abb. 23: Nachweis der Zellwandhydrolase-Aktivität der Amidase AmiC2-6xHis mittels Zymogramm.	71
Abb. 24: Übersicht über die autoproteolytische und Zellwand-Hydrolase-Aktivität von AmiC2-6xHis.	72
Abb. 25: Nachweis von AmiC2 in Zellextrakten differenzierter Zellen von <i>N. punctiforme</i> mittels Immunoblot.	73
Abb. 26: Homologie des <i>amiC</i> -Clusters und Immunoblot-Analyse des AmiC1 und AmiC2 von <i>Nostoc</i> und <i>Anabaena</i>	75
Abb. 27: Vergleich der Spezifität von Antiserum und affinitätsgereinigtem Antikörper an Rohextrakten von <i>N. punctiforme</i>	76
Abb. 28: Binderegionen der Peptid-Antikörper von AmiC1 und AmiC2.	77
Abb. 29: Immunoblot-Analyse der AMIN- und enzymatischen Domäne von AmiC1 und AmiC2.	78
Abb. 30: Domänenorganisation cyanobakterieller SepJ-Proteine.	80
Abb. 31 Generierung der <i>sepJ_N</i> -Mutante in <i>N. punctiforme</i> und die Überprüfung der Integration der Resistenzkassette.	81
Abb. 32: Wachstumstest der <i>sepJ_N</i> -Mutante im Vergleich zum Wildtyp <i>N. punctiforme</i>	82
Abb. 33: Zelldifferenzierung der <i>sepJ_N</i> -Mutante im Vergleich zum WT <i>N. punctiforme</i>	83
Abb. 34: Vergleich des septalen Mureins von <i>N. punctiforme</i> und <i>Anabaena</i> PCC 7120.	91
Abb. 35: Hypothese der Porenbildung.	94
Abb. 36: Elektronenmikroskopische Aufnahme und schematische Veranschaulichung der möglichen septalen Zell-Zell-Kommunikation bei <i>N. punctiforme</i>	96
Abb. 37: Subzelluläre Lokalisation von AmiC2 in vegetativen Filamenten und den drei Differenzierungsformen von <i>N. punctiforme</i>	98
Abb. 38: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Amidase_3-Homologen in <i>N. punctiforme</i>	114

I.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Cyanobakterienstämme	19
Tabelle 2: Verwendete <i>E.coli</i> Stämme	19
Tabelle 3: Verwendete Plasmide	20
Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide.....	21
Tabelle 5: Verwendete Kits	22
Tabelle 6: Auflistung der Bezeichnungen und Internetadressen der verwendeten Datenbanken	22
Tabelle 7: Auflistung der Bezeichnungen und Internetadressen der verwendeten Software...	22
Tabelle 8: Verwendete Antibiotika bei Cyanobakterien	27
Tabelle 9: Verwendete Antibiotika bei <i>E. coli</i>	28
Tabelle 10: Pipettierschema für einen 20 µl PCR-Reaktionsansatz von Finnzymes	35
Tabelle 11: Pipettierschema für einen 20 µl PCR-Reaktionsansatz von Genaxxon	35
Tabelle 12: PCR Einstellungen unter Verwendung des Genaxxon PCR-Kits	36
Tabelle 13: PCR Einstellungen unter Verwendung des Finnzymes PCR-Kits	36
Tabelle 14: PCR Einstellungen unter Verwendung des OneStep RT-PCR Kits.....	37
Tabelle 15: Quantifizierung der FRAP-Analysen von Zellen des WTs <i>N. punctiforme</i> und der <i>amiC2</i> -Mutante.....	63
Tabelle 16: Größen der septalen Strukturen im WT und der <i>amiC2</i> -Mutante.....	67