

**Detaillierte Charakterisierung von AmiC2,  
einem Schlüsselenzym für die intrafilamentöse Kommunikation  
in *Nostoc punctiforme* ATCC29133**

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
Katharina Faulhaber  
aus Goch

Tübingen  
2017

Tag der mündlichen Prüfung:	30.06.2017
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	PD Dr. Iris Maldener
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Karl Forchhammer

Ich bin immer noch verwirrt, aber auf einem höheren Niveau. – Enrico Fermi  
(1901-1954, Nobelpreis: 1938)

## Danksagung

Mein Dank gilt meinen Betreuern, Frau PD Dr. Iris Maldener und Herrn Prof. Dr. Karl Forchhammer. Sie haben mir ermöglicht, einen neuen Bereich in der Mikrobiologie zu erforschen und Tübingen kennenzulernen, eine Stadt, die mir mit ihren Eigenarten und Besonderheiten immer in guter Erinnerung bleiben wird. Die fachliche Anleitung war stets mit Begeisterung für das Thema verbunden, welche ich von Anfang an sehr geschätzt habe. Neben der fachlichen Ebene konnte ich persönlich viel von meinen Doktoreltern lernen. Durch die große Internationalität der Arbeitsgruppe habe ich Kollegen und Freunde in der ganzen Welt gewonnen.

Meinen Kollegen möchte ich für eine hervorragende Arbeitsatmosphäre danken. Der fachliche Austausch wurde oft passend durch derbe Scherze ergänzt, die den Laboralltag sehr bereicherten. Zusammen haben wir einen Rohrbruch und einen Kulturraum, der ein Backofen sein wollte, überstanden. Auch die Besuche von Konferenzen wären ohne Euch nicht halb so wertvolle Erfahrungen geworden. Ich habe wirklich gerne mit Euch gelacht, besonders dann, wenn das eine oder andere Ergebnis auf sich warten ließ.

Herrn Prof. Dr. Klaus Hantke danke ich für viele fachliche Gespräche und Anregungen. Ich hoffe, dass viele nachfolgende Doktoranden und Studenten auf Ihr umfangreiches Wissen in der Mikrobiologie zurückgreifen dürfen.

Meinen Kooperationspartnern danke ich für eine tolle Zusammenarbeit, insbesondere Felix Büttner, dem die Kristallisation der katalytischen Domäne von AmiC2 gelang. Durch Euch war es mir möglich, methodisch über den Tellerrand zu schauen. Dafür werde ich immer dankbar sein.

Ich danke Michaela Kopp und Regina Grupp für ihr freundliches Wesen und für viele nette Gespräche und Tipps, besonders in der Eingewöhnungsphase hat mir das sehr geholfen.

Claudia Menzel und PD Dr. Iris Maldener gilt mein besonderer Dank. Die Transmissionselektronischen Aufnahmen von Dünnschnitten fixierter Zellen oder Aufnahmen von gereinigten Zellwänden wären ohne sie nicht möglich gewesen. Christina Herrmann danke ich für die Unterstützung, die über die Reinigung manchen Proteins hinausging. Für Hilfe bei der Stammhaltung und der Verifizierung der Mutanten in *Nostoc punctiforme* bin ich Carolina Nishi sehr dankbar.

Mein Dank gilt Sophie Schmidt, die mutig genug war, *Nostoc punctiforme* für die Forschungen ihrer Masterarbeit zu wählen. Weiterhin danke ich meinen Studenten, die mir als HiWis geholfen haben, Peptidoglykan zu reinigen.

Meiner Familie danke ich für die moralische Unterstützung, welche oft nur über große Distanz telefonisch erfolgen konnte. Umso mehr habe ich mich über die Besuche gefreut. Ich konnte Euch die Schwäbische Alb zeigen und wir konnten etwas Zeit miteinander genießen.

Durch meine Freunde schätze ich mich glücklich. Ihr habt mich durch die Höhen und Tiefen, die eine Doktorarbeit mit sich bringt, begleitet. Ich danke Euch für alle Telefonate, Skypegespräche nach Kiel, Tromsø und all die anderen Erdteile, die von Euch bevölkert werden. Ich danke Euch für die gemeinsame Zeit, durch meine Besuche im Norden, Eure Besuche in Tübingen oder durch gemeinsame Urlaube in Prag und Spanien.

## Inhalt

1	Abkürzungsverzeichnis .....	X
2	Zusammenfassung .....	12
3	Summary .....	13
4	Einleitung .....	15
4.1	Die bakterielle Zellhülle .....	15
4.1.1	Peptidoglykan .....	16
4.2	Das Cyanobakterium <i>Nostoc punctiforme</i> ATCC29133 .....	16
4.3	Differenzierungsformen von <i>N. punctiforme</i> .....	17
4.3.1	Heterozysten .....	17
4.3.2	Hormogonien .....	18
4.3.3	Akineten .....	20
4.4	Intrafilamentöse Kommunikation in Cyanobakterien .....	20
4.5	Amidasen .....	22
4.6	Die <i>amiC2</i> -Mutante von <i>N. punctiforme</i> .....	24
4.7	Ziel der Arbeit .....	25
5	Material und Methoden .....	26
5.1	Chemikalien und Geräte .....	26
5.1.1	Verwendete Kits .....	26
5.1.2	Datenbanken .....	26
5.1.3	Verwendete Programme .....	26
5.2	Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide .....	27
5.2.1	Bakterienstämme .....	27
5.2.2	Plasmide .....	27
5.2.3	Oligonukleotide .....	29
5.3	Kultivierungsmethoden .....	37
5.3.1	Medien zur Anzucht der Cyanobakterien .....	37
5.3.2	Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i> .....	37
5.3.3	Sterilisation .....	38
5.3.4	Antibiotika .....	38
5.3.5	Anzucht von Cyanobakterien .....	38
5.3.6	Anzucht und Konservierung von <i>E. coli</i> .....	39
5.4	Molekularbiologische Methoden .....	40
5.4.1	Isolierung der DNA aus <i>N. punctiforme</i> .....	40
5.4.2	Plasmidisolation aus <i>E. coli</i> .....	40
5.4.3	Zelldichtebestimmungen .....	42
5.4.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	42
5.4.5	Agarosegelelektrophorese von DNA-Fragmenten .....	43
5.4.6	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA .....	43

5.4.7	Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	43
5.4.8	Ligation von DNA-Fragmenten .....	44
5.4.9	Gibson-Assembly .....	44
5.4.10	Mikrodialyse von DNA .....	44
5.4.11	Transformation von <i>E. coli</i> .....	45
5.4.12	Transformation von <i>N. punctiforme</i> .....	46
5.4.13	Triparentale Konjugation.....	46
5.4.14	Herstellung von GFP-Konstrukten .....	48
5.4.15	Herstellung von Konstrukten zur heterologen Expression und Reinigung.....	49
5.4.16	Herstellung von Konstrukten für <i>KO</i> -Mutanten.....	49
5.4.17	Mureinpräparationen .....	50
5.5	Proteinbiochemische Methoden .....	54
5.5.1	Heterologe Überexpression und Reinigung.....	54
5.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	54
5.5.3	Pulldown.....	54
5.5.4	Dye-Release-Assays zur <i>in vitro</i> Messung der PG-Hydrolaseaktivität von Proteinen..	55
5.5.5	SDS-PAGE .....	55
5.5.6	Immunoblot .....	55
5.5.7	Immunofluoreszenzmarkierung von AmiC1 und AmiC2 in <i>N. punctiforme</i> .....	56
5.6	Mikroskopie.....	57
5.6.1	Transmissionselektronenmikroskopie .....	57
5.6.2	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie .....	58
5.6.3	Färbemethoden .....	58
6	Ergebnisse .....	60
6.1	Immunfluoreszenzmarkierungen .....	61
6.1.1	Aminosäuresequenz und Domänen der AmiC-Proteine in <i>N. punctiforme</i> .....	61
6.1.2	Lokalisation des nativen AmiC1-Proteins im <i>N. punctiforme</i> WT.....	63
6.1.3	Lokalisation des nativen AmiC1 in der <i>amiC2</i> -Mutante von <i>N. punctiforme</i> .....	64
6.1.4	Lokalisation des nativen AmiC2-Proteins im <i>N. punctiforme</i> WT.....	65
6.2	Die Domänen von AmiC2 und ihr Einfluss auf die Lokalisation.....	66
6.2.1	Untersuchung verschiedener Sec-Signalsequenzen in <i>Anabaena PCC7120</i> .....	66
6.2.2	Lokalisation trunkierter AmiC2-Versionen.....	70
6.3	Die Zellwand von Hormogonien .....	73
6.3.1	Eine Porenkette umschließt das Septum.....	73
6.3.2	Der Nanopore Array bei Hormogonien .....	74
6.3.3	Die Genese des Septums .....	75
6.4	Charakterisierung der katalytischen Domäne von AmiC2 (AmiC2 <sub>C</sub> ) .....	75
6.4.1	Aktivität von AmiC2 <sub>C</sub> bei verschiedenen Temperaturen .....	75
6.4.2	Kristallisation der katalytischen Domäne .....	76
6.4.3	Wichtige Aminosäuren für die Katalyse .....	77

6.5	Identifikation eines Modulators der Aktivität der katalytischen Domäne von AmiC2 .....	78
6.6	Putative Interaktionspartner von AmiC2 .....	80
6.7	Das GerM-Protein (Npun_F0437) als putativer Interaktionspartner von AmiC2 .....	81
6.7.1	Gezielte KO-Mutagenese des <i>gerM</i> -Gens (Npun_F0437) .....	81
6.7.2	Wachstum und Differenzierungspotential der <i>gerM</i> -Mutante.....	83
6.7.3	Mikroskopische Charakterisierung der <i>gerM</i> -Mutante durch Färbemethoden.....	86
6.7.4	Ultrastruktur der <i>gerM</i> -Mutante .....	88
6.8	Npf5024 (Npun_F5024) als putativer Interaktionspartner von AmiC2 .....	90
6.8.1	Gezielte Mutagenese von <i>npf5024</i> .....	91
6.8.2	Wachstum und Differenzierungspotential der <i>npf5024</i> -Mutante .....	92
6.8.3	Mikroskopische Charakterisierung der <i>npf5024</i> -Mutante durch Färbungen.....	95
6.8.4	Ultrastruktur der <i>npf5024</i> -Mutante.....	97
6.8.5	Lokalisation von Npf5024 in <i>N. punctiforme</i> .....	98
6.8.6	Das Npf5024-Protein als putativer Interaktionspartner von AmiC2 .....	98
6.9	SlpD (Npun_R1578) als putativer Interaktionspartner von AmiC2 .....	100
6.9.1	Gezielte KO-Mutagenese von <i>slpD</i> .....	101
6.9.2	Wachstum und Differenzierungspotential der <i>slpD</i> -Mutante.....	102
6.9.3	Lokalisation von SlpDsfGFP .....	103
6.10	SlpB (Npun_R4778) als putativer Interaktionspartner von AmiC2 .....	103
6.10.1	Gezielte KO-Mutagenese von <i>slpB</i> (Npun_R4778) .....	104
6.10.2	Wachstum und Differenzierungspotential der <i>slpB</i> -Mutante .....	105
6.10.3	Mikroskopische Charakterisierung der <i>slpB</i> -Mutante durch Färbungen.....	109
6.10.4	Ultrastruktur der <i>slpB</i> -Mutante.....	111
6.10.5	Lokalisation von SlpBsfGFP .....	112
7	Diskussion .....	113
7.1	Lokalisation von AmiC1 in <i>N. punctiforme</i> WT und in der <i>amiC2</i> -Mutante.....	113
7.2	Lokalisation von AmiC2 im <i>N. punctiforme</i> WT .....	115
7.3	Signalsequenzen und ihr Einfluss auf das Protein.....	116
7.4	Die Domänen von AmiC2 .....	117
7.5	Verstärkte Kommunikation in Hormogonien .....	119
7.6	Charakterisierung von AmiC2 <sub>C</sub> .....	120
7.7	Putative Interaktionspartner von AmiC2 .....	121
7.8	Das GerM-Protein .....	122
7.9	Das NpF5024-Protein.....	124
7.10	Vergleich von SlpD und SlpB mit SleB-Proteinen .....	126
7.10.1	SlpD.....	128
7.10.2	SlpB .....	129
7.11	Wie entsteht der Nanopore Array? .....	130
7.12	Die Speicherstoffe Polyphosphat und Cyanophycin .....	130
7.12.1	Die Bedeutung von Polyphosphat .....	130

7.12.2	Die Bedeutung von Cyanophycin.....	132
7.12.3	Wirtschaftliche Aspekte von Cyanophycin und Polyphosphat .....	132
7.13	Ausblick.....	134
8	Referenzen.....	135
9	Anhang .....	144
9.1	Abbildungsverzeichnis .....	144
9.2	Tabellenverzeichnis.....	149
9.3	Reporterkonstrukte zur Lokalisation von GerM.....	150

# 1 Abkürzungsverzeichnis

Es gelten die Abkürzungen für *SI*-Einheiten (*Système International d'unités*). Abkürzungen von Nuklein- und Aminosäuren richten sich nach dem *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB) und der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC).

A	Absorption
AF	Autofluoreszenz
AFM	<i>atomic force microscopy</i> (Rasterkraftelektronenmikroskopie)
AMIN	<u>Amidase-N-terminal</u>
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaar (DNA)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BF	<i>bright field</i> (Hellfeld)
Bp	Basenpaar
Cm	Chloramphenicol
d	Tag
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DRA	<i>dye-release-assay</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
fw	<i>forward</i>
GlucNAc	N-Acetylglucosamin
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HAc	Essigsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF	<i>hormogonium inducing factor</i>
JPC	<i>junctional pore complex</i>

---

KA	Karbonische Anhydrase
Km	Kanamycin
KO	<i>knockout</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
MOPS	3-(N-Morpholino) propansulfonsäure
Nm	Neomycin
OD	Optische Dichte
<i>orf</i>	<i>open reading frame</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCC	Pasteur Culture Collection
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PG	Peptidoglykan
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Resistenz
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
rv	<i>reverse</i>
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>sf</i>	<i>superfolder</i>
Sm	Streptomycin
Sp	Spectinomycin
TAT	<i>twin arginin transporter</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Tris	Tris-EDTA
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
WT	Wildtyp

## 2 Zusammenfassung

Das Cyanobakterium *Nostoc punctiforme* ATCC29133 wächst in unverzweigten Filamenten aus Hunderten von Zellen. Die Zellen eines Filaments verfügen über eine gemeinsame, kontinuierliche Äußere Membran und ein Mureingerüst, welches das gesamte Filament umspannt. Anders als bei einzelligen Bakterien findet nach der Zellteilung keine Tochterzelltrennung statt. Die Zellen bleiben im Filament als kommunizierende Einheit und können sich durch Differenzierung an verändernde Umweltbedingungen anpassen. Stickstofffixierende Heterozysten sind die terminale Differenzierung aus vegetativen Zellen, transient werden Hormogonien zur Fortbewegung und Akineten als Überdauerungsstadien gebildet.

Die Amidase AmiC2 (Npun\_F1846) bildet als Basis zur Kommunikation von Zelle zu Zelle den *Nanopore Array*. Dazu schneidet AmiC2 ca. 150 Poren von 20 nm im Durchmesser in das septale Peptidoglykan und erlaubt so den Aufbau von Kommunikationsstrukturen zwischen Nachbarzellen. Fehlt AmiC2, so wachsen die Zellen in Klumpen mit schiefen Teilungsebenen statt in Filamenten. Die Fähigkeit zu kommunizieren fehlt. Es werden keine spezialisierten Zelltypen gebildet.

Die AmiC-Amidasen von *Nostoc punctiforme* besitzen einen charakteristischen Aufbau, der sich deutlich von Amidasen einzelliger Bakterien unterscheidet. Eine Sec-Signalsequenz sorgt für den Transport in das Periplasma und zwei AMIN-Domänen (Amidase-N-terminal) sind über einen Abschnitt von 160 Aminosäuren mit der katalytischen Domäne verbunden. In dieser Arbeit wurde dieser Bereich zwischen AMIN-B und katalytischer Domäne als Modulator der Amidaseaktivität identifiziert.

Durch Immunfluoreszenzmarkierung wurde AmiC2 (und die Schwesteramidase AmiC1) an jungen Septen lokalisiert. Dabei folgt AmiC2 der Einstülpung der neu gebildeten Zellwand, bis sie schließlich über das ganze Septum lokalisiert ist. In reifen Septen ist AmiC2 nicht mehr vorhanden.

Die Sec-Sequenz hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von AmiC2. Stattdessen sind die AMIN-Domänen für die Lokalisation am Septum verantwortlich. In Hormogonien ist besonders viel AmiC2 in den Septen nachgewiesen worden. Die zur gerichteten Bewegung befähigten Filamente benötigen eine gesteigerte Kommunikation. Der *Nanopore Array* ist daran angepasst. Normiert auf die Fläche des Septums ist die Anzahl an Poren bei Septen von Hormogonien im Vergleich zu Septen von vegetativen Zellen deutlich erhöht.

Der Vergleich der katalytischen Domäne von AmiC2 mit dem homologen AmiC aus *Escherichia coli* zeigt, basierend auf Sequenzanalyse und Strukturdaten, das Fehlen einer regulatorischen  $\alpha$ -Helix. Im Gegensatz zu AmiC ist bei AmiC2 die katalytische Domäne alleine in *Dye-release-assays* hochaktiv. Das Enzym aus *E. coli* benötigt einen Aktivator, NlpD, der die regulatorische  $\alpha$ -Helix aus dem aktiven Zentrum entfernt. Analog dazu verringert der Modulator von AmiC2 die Aktivität *in vitro*, solange sie kovalent an die katalytische Domäne gebunden ist. Der boolische Charakter, wie bei der Regulation von AmiC aus *E. coli*, ist jedoch nicht gegeben.

Die präzise Regulation von AmiC2 sollte durch Interaktionsstudien erforscht werden. In einem Pull-down-Experiment wurden vier Proteine als potentielle Interaktionspartner von AmiC2 identifiziert (GerM: Npun\_F0437; SlpB: Npun\_R4778; SlpD: Npun\_R1578; Npf5024: Npun\_F5024). Während dieser Arbeit wurden Deletionsmutanten der Gene dieser Interaktionskandidaten erstellt und ihr Phänotyp charakterisiert.

### 3 Summary

The cyanobacterium *Nostoc punctiforme* ATCC29133 grows as unbranched filaments of hundreds of cells. The filament shares a continuous outer membrane and a peptidoglycan layer that spans the filament as one molecule. In contrast to unicellular bacteria, the daughter cells remain connected after cell division forming a communicating unity. By differentiation of specialized cell types, *Nostoc* can adapt to changes in the environment. Nitrogen fixing heterocysts are terminally differentiated and formed in a *semi*-regular pattern along the filament. Gliding hormogonia for dispersion and symbiosis can convert back into vegetative cells as well as dormant akinetes.

The amidase AmiC2 (Npun\_F1846) is vital for cell-cell communication. It drills approx. 150 pores of 20 nm in diameter into the septal peptidoglycan: the nanopore array. Without AmiC2 the filament grows in clumps, the cells show aberrant dividing planes, cell-cell communication and differentiation are aborted.

The domain organization of AmiC amidases in *Nostoc* differs significantly compared to those of unicellular bacteria. The proteins are exported by a sec-signal sequence and consist of two AMIN domains (amidase-N-terminal) connected by a linker to the catalytic domain. This linker was identified as modulator of catalytic activity.

Immunofluorescence showed AmiC2 (and the sibling enzyme AmiC1) localized to young septa. The amidase AmiC2 follows the invagination of new peptidoglycan until the septal plane is fully covered. In mature septa AmiC2 disappeared.

The sec-signal sequence showed no influence of localization. Instead, the AMIN-domains promote localization to the septal plane. During hormogonia live cycle AmiC2 is predominantly recruited to the septa. Movement of a filament requires acting as one and therefore an increased level of communication. The nanopore array is adapted to that. In hormogonia the frequencies of pores building up the nanopore array is three times higher than in vegetative filaments.

Comparing the catalytic domain of AmiC2 to cell-splitting amidases of unicellular bacteria like *Escherichia coli*, both sequence and structural analysis show that a regulatory  $\alpha$ -helix is missing in AmiC2. In contrast to AmiC of *E. coli*, the catalytic domain of AmiC2 is highly active in dye-release-assays. The *E. coli* enzyme requires an activator, NlpD, to remove the  $\alpha$ -helix that obstructs the active center. Analogous to the  $\alpha$ -helix, the modulator of AmiC2 diminishes the hydrolytic activity *in vitro* if the linker is covalently bound to the catalytic domain without showing the boolean characteristics of this regulation as in AmiC of *E. coli*.

The precise regulation of AmiC2 to only form pores in the septal peptidoglycan was to be investigated. By a pulldown experiment, four proteins were identified as candidates for interaction with AmiC2 (GerM: Npun\_F0437; SlpB: Npun\_R4778; SlpD: Npun\_R1578; Npf5024: Npun\_F5024). Knockout mutants of the genes of these four putative interaction partners were generated and characterized.

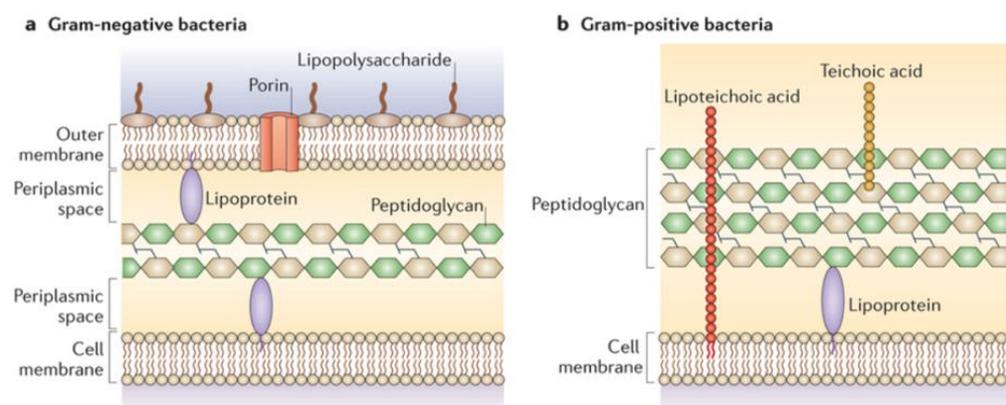
## 4 Einleitung

### 4.1 Die bakterielle Zellhülle

Die bakteriellen Zellen sind durch mehrere Schichten von der Umgebung abgegrenzt. Die bakterielle Zellhülle besteht aus der Cytoplasmamembran, welche die innerste Barriere darstellt. Daran schließt sich ein mehrschichtiges Murein (Peptidoglykan) an. Es ist das formgebende Element der Zellen (Weidel et al., 1960, Höltje, 1998, Vollmer and Höltje, 2004). Durch seine Rigidität verleiht es der Zelle Stabilität gegen den Turgor.

Die Stärke des Peptidoglykansacculus dient als Unterscheidungsmerkmal in der Diagnostik. Besteht die Zellwand aus wenigen Schichten, werden sie während der Gramfärbung wieder entfärbt und gelten als gramnegativ. Besteht das Murein aus vielen Schichten, so behalten die gramgefärbten Zellen das Kristallviolett und gelten als grampositiv (Burke, 1922). Bei gramnegativen Zellen ist der Mureinschicht noch eine äußere Membran aufgelagert, die bei grampositiven Bakterien fehlt. Der Raum zwischen Cytoplasmamembran und äußerer Membran wird Periplasma genannt. Klassischer Weise ist das Periplasma eine Eigenschaft gramnegativer Bakterien, aber auch bei grampositiven Bakterien gibt es Bereiche nahe des Peptidoglykans mit ähnlichen Eigenschaften (Matias and Beveridge, 2006). Untersuchungen mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM, *atomic force microscopy*) ergaben für Zellwände gramnegativer Bakterien eine Mureinstärke von 1,5-3,0 nm (Yao et al., 1999). Dagegen besitzen grampositive Bakterien Murein, das meist eine Stärke von 20-80 nm aufweist (Ghuysen, 1968).

Obwohl Cyanobakterien eine sehr dicke Mureinschicht besitzen, gelten sie als gramnegativ und verfügen über eine äußere Membran.



**Abbildung 1** Gegenüberstellung der stereotypen Zellhüllen gramnegativer und grampositiver Bakterien. Cyanobakterien besitzen eine äußere Membran und zusätzlich ein vielschichtiges Peptidoglykan wie grampositive Bakterien (Brown et al., 2015).

#### 4.1.1 Peptidoglykan

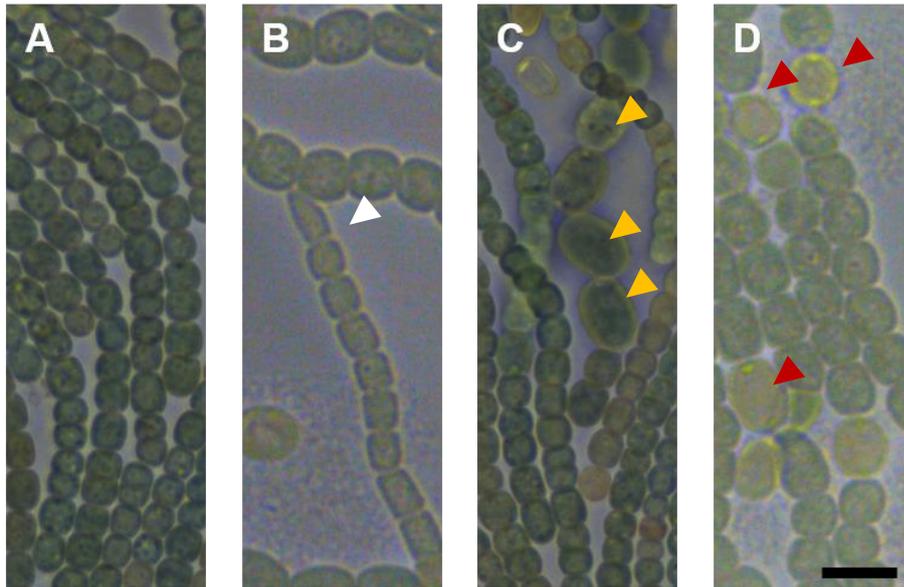
Die bakterielle Zellwand besteht aus Peptidoglykan (Murein). Es umschließt die Zellen vollständig und stabilisiert sie gegen Umwelteinflüsse. Isoliertes Peptidoglykan spiegelt die Zellform des Bakteriums wieder, aus welchem es isoliert wurde (Höltje, 1998, Weidel et al., 1960), allerdings wird der Peptidoglykansacculus nicht zwingend als Vorlage zur Formgebung gebraucht. So kann *Bacillus subtilis* aus der zellwandlosen L-Form die Stäbchenform wiederherstellen (Kawai et al., 2014).

Das Peptidoglykan besteht aus einem Netzwerk alternierender Einheiten N-Acetylmuramin-säure (MurNAc) und N-Acetylglucosamin (GlucNAc), die  $\beta$ -1-4 glycosidisch miteinander verknüpft sind. Über den Lactyl-Rest der MurNAc ist ein Pentapeptid über eine Amidbindung angehängt (Schleifer and Kandler, 1972). Das Pentapeptid variiert in der Zusammensetzung und kann zur Charakterisierung einer Bakterienspezies herangezogen werden. Über das Pentapeptid, das mit zwei D-Alaninen endet, können Quervernetzungen zu anderen Peptidsträngen entstehen. Auch der Vernetzungsgrad des Peptidoglykans ist charakteristisch für eine Spezies. Generell ist das Mureingerüst bei grampositiven Bakterien stärker vernetzt. Es kann so den zehnfachen osmotischen Druck aushalten.

#### 4.2 Das Cyanobakterium *Nostoc punctiforme* ATCC29133

Die Cyanobakterien bilden eine weit verbreitete Gruppe photoautotropher Mikroorganismen mit großer morphologischer Diversität. Aufgrund dieser Komplexität werden Cyanobakterien in fünf morphologische Sektionen unterteilt. Die Sektionen I und II bestehen aus einzelligen Cyanobakterien. Die Vertreter der Sektion III sind filamentöse Cyanobakterien ohne Differenzierungspotential. In Sektion IV und V sind Cyanobakterien zusammengefasst, die als Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen spezielle Zellen entwickeln können. Im Gegensatz zur Sektion IV verfügt die Sektion V über mehr als eine Teilungsebene, sodass verzweigte Filamente entstehen (Rippka et al., 1979).

Die Cyanobakterien entwickelten die oxygene Photosynthese und reicherten die Atmosphäre mit Sauerstoff an. Dies ermöglichte die Evolution höheren Lebens. Auch die Chloroplasten, welche die Photosyntheseleistung der Pflanzen erbringen, stammen von der Gruppe der Cyanobakterien ab (Giovannoni et al., 1988). Da Cyanobakterien über eine äußere Membran verfügen, gelten sie als gramnegative Mikroorganismen.



**Abbildung 2: Differenzierungsformen von *N. punctiforme* WT.** A) vegetative Zellen, B) vegetative Zellen einer späteren Wachstumsphase und ein Hormogonium (weiße Pfeilspitze), gut zu erkennen ist eine der beiden konisch geformten terminalen Zellen des Hormogoniums C) vegetative Zellen und Akineten (orangefarbene Pfeilspitzen), D) vegetative Zellen und Heterozysten (rote Pfeilspitzen). Größenstandard. 5  $\mu$ m.

Als Cyanobakterium der Klasse IV wächst *Nostoc punctiforme* ATCC29133 (*N. punctiforme*) in unverzweigten Filamenten. Ein großes Genom von fast 10 Mbp spiegelt einen komplexen Lebensstil wider (Meeks et al., 2001), der Symbiosen mit Moosen, Pilzen und höheren Pflanzen einschließt (Adams and Duggan, 2008, Liaimer et al., 2015, Meeks and Elhai, 2002). Die Fähigkeit, verschiedene Zelltypen als Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen zu bilden, macht *N. punctiforme* zu einem echten Vielzeller. Transient kann *N. punctiforme* Akineten zur Überdauerung und Hormogonien zur Fortbewegung ausbilden. Die Filamente bilden unter Stickstoffmangelbedingungen Heterozysten aus, um elementaren Stickstoff zu fixieren (Maldener et al., 2014, Abbildung 2). Die Differenzierung zu Heterozysten ist terminal. Filamentöse Cyanobakterien wie *N. punctiforme* gelten als die ersten bekannten mehrzelligen Organismen (Kaiser, 2001). Jedoch ist Vielzelligkeit im Laufe der Evolution mehrfach unabhängig voneinander entstanden (Lyons and Kolter, 2015).

### 4.3 Differenzierungsformen von *N. punctiforme*

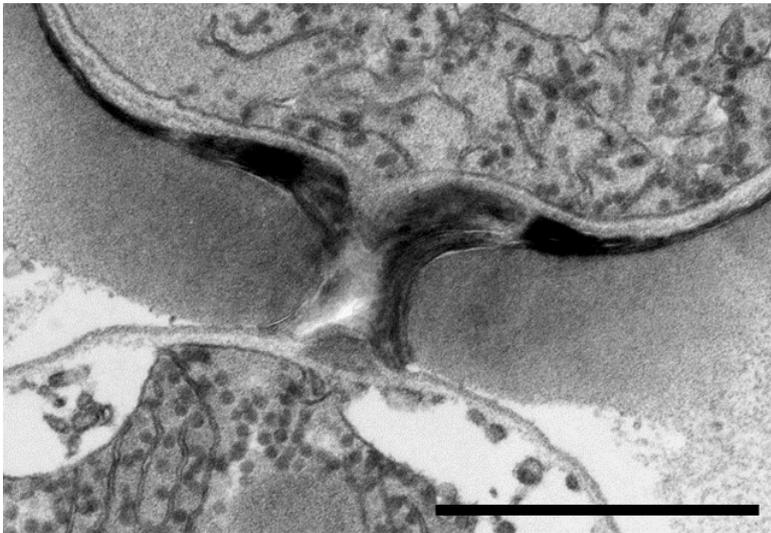
#### 4.3.1 Heterozysten

Die Differenzierung zu Heterozysten ist die einzige terminale Differenzierung, zu der *N. punctiforme* fähig ist. Da vegetative Zellen auf Stickstoffverbindungen wie Nitrat oder Ammonium angewiesen sind, werden Heterozysten gebildet, wenn solche Stickstoffverbindungen fehlen und molekularer Stickstoff fixiert werden muss.

Zur Stickstofffixierung wird das Enzym Nitrogenase benötigt. Das aktive Zentrum dieses Enzyms ist sauerstoffempfindlich, deswegen herrschen in Heterozysten mikrooxische bis anoxische Bedingungen, indem beispielsweise die Thylakoidmembranen abgebaut werden (Giddings and Staehelin, 1979).

Der Kontakt zu Nachbarzellen im Filament ist auf eine halskanalartige Verbindung beschränkt (Abbildung 3), die zwar den Stoffaustausch von Stickstoffintermediaten in Richtung der vegetativen Zellen und Kohlenstoffverbindungen und Glutamat in Richtung der Heterozysten erlaubt, aber die Diffusion von Sauerstoff zur Heterozyste einschränkt (Wolk, 1968, Kumar et al., 2010, Flores and Herrero, 2010, Walsby, 2007).

Die Entwicklung von Heterozysten ist unter bestimmten Laborbedingungen nach 24 h abgeschlossen. Sowohl die Differenzierung zur Heterozyste als auch die Fixierung molekularen Stickstoffs ist mit hohem Energieaufwand verbunden. Die Versorgung des Filaments mit Stickstoffverbindungen durch Heterozysten wird durch eine optimale Anzahl und Verteilung der Heterozysten im Filament gewährleistet (Zhang et al., 2007). Es entsteht ein *semi*-reguläres Muster an Heterozysten. Etwa jede zehnte bis zwanzigste Zelle durchläuft die Differenzierung zur Heterozyste.



**Abbildung 3: TEM-Aufnahme der Schnittstelle zwischen vegetativer Zelle und Heterozyste.** Die Heterozyste (oben) ist über einen Halskanal mit der benachbarten vegetativen Zelle verbunden. Größenstandard: 900 nm.

#### 4.3.2 Hormogonien

Wie viele Vertreter der *Nostocales* bildet *N. punctiforme* kurze, bewegliche Filamente, die Hormogonien (griechisch *hormos* = Schnur, Kette und *goneia* = Zeugung). Sie entstehen aus synchronisierten Reduktionsteilungen vegetativer Zellen oder Akineten und sind eine transiente Differenzierungsform. Die resultierenden Filamente bestehen aus kleineren, zylinderförmigen

Zellen und konischen endständigen Zellen (Abbildung 2). Die zum Gleiten befähigten Hormogonien reagieren auf phototaxische (Campbell et al., 2015) und chemotaxische (Cozy and Callahan, 2014) Reize.

Als infektiöse Einheit können Hormogonien, angelockt von Pflanzen, Symbiosen eingehen. Ein bisher nicht identifizierter chemischer Botenstoff, HIF (*hormogonium inducing factor*), wird von der unter Stickstoffmangel leidenden Pflanze ausgeschieden und fördert die Differenzierung zu Hormogonien und anschließend deren Migration zur Wirtspflanze. Weitere Symbiosepartner von *N. punctiforme* sind Moose (*Antoceros punctatos*), höhere Pflanzen wie *Gunnera* und Pilze (Flechten) (Sprent and Meeks, 2013, Campbell and Meeks, 1989, Meeks and Elhai, 2002). Als Symbiosepartner stellt *N. punctiforme* seinem Wirt Stickstoffverbindung aus Heterozysten zur Verfügung und erhält im Gegenzug von der Pflanze Energie aus Kohlenstoffverbindungen.

Gleitende Hormogonien dienen nicht nur dem Wechsel vom freilebenden Filament zum Symbiont, sondern auch der Verbreitung über kurze Distanzen. Dabei sind Typ IV-Pili in den Mechanismus der Fortbewegung involviert (Duggan et al., 2007, Khayatan et al., 2015). Zum Gleiten sind Hormogonien zudem auf die Exkretion von Polysacchariden angewiesen (Risser and Meeks, 2013, Risser et al., 2014). Transkriptomanalysen von Hormogonien bei *N. punctiforme* zeigen etwa 2000 spezifisch regulierte Gene. Damit sind in die Entwicklung von Hormogonien im Verhältnis zur Differenzierung zu Heterozysten (495 Gene) oder Akineten (497 Gene) mehr als dreimal so viele Gene involviert (Campbell et al., 2007).

Trifft ein Hormogonium während seiner Migration auf ein Hindernis, so kann es sogar seine Migrationsrichtung umkehren, ohne dabei das Filament „wenden“ zu müssen (persönliche Beobachtung). Hormogonien können als einzelnes Filament oder in Gruppen migrieren. Kreuzt ein Hormogonium von *Mastigocladus laminosus* die Spur von anderen Hormogonien, dann kommt es oft zur Änderung des Migrationsverhaltens von einer direkten Linie zu einer Sinusförmigen Wanderung, zudem besteht die Tendenz, der alten Spur zu folgen. Mehrere Hormogonien können sich auch zu Zellknäueln zusammenfinden (Hernández-Muñiz and Stevens, 1987).

In diesem verzweigt wachsenden Sektion V Cyanobakterium konnte gezeigt werden, dass der Stoffaustausch in Hormogonien im Vergleich zu vegetativen Zellen erhöht ist (Nürnberg et al., 2014).

### 4.3.3 Akineten

Die Akineten (von griech. *akinētos* = unbeweglich) sind die dormante Überdauerungsform vieler Cyanobakterien der Klasse IV und V (Rippka et al., 1979). Die reversible Ausbildung zur Akinete erfolgt als Reaktion auf ungünstige Umweltbedingungen. Den Akineten verschiedener Spezies ist gemein die Anreicherung von Speicherstoffen wie Glykogen und Cyanophycin (L-Asparaginsäure-L-Arginin Co-Polymer). Dies ist jedoch kein Alleinstellungsmerkmal. Auch vegetative Zellen in stationärer Wachstumsphase oder unter Stress bilden Speicherstoffe.

Die Akineten verschiedener *Nostocales* sind morphologisch uneinheitlich. Bei *Anabaena variabilis* sind reife Akineten länglich-oval und meist nicht mehr im Verbund eines zusammenhängenden Filaments. Reife Akineten bei *N. punctiforme* sind größer und rundlicher als vegetative Zellen und bleiben meist im Filament zusammen (Perez et al., 2016). Generell sind Akineten größer als die vegetativen Zellen, aus denen sie hervorgehen. Oft enthalten Akineten mehr Kopien des Chromosoms als vegetative Zellen und vermehrt auch Ribosomen. Dies ermöglicht eine schnelle Keimung der Akinete, wenn die Umweltbedingungen günstig sind (Sukenik et al., 2012).

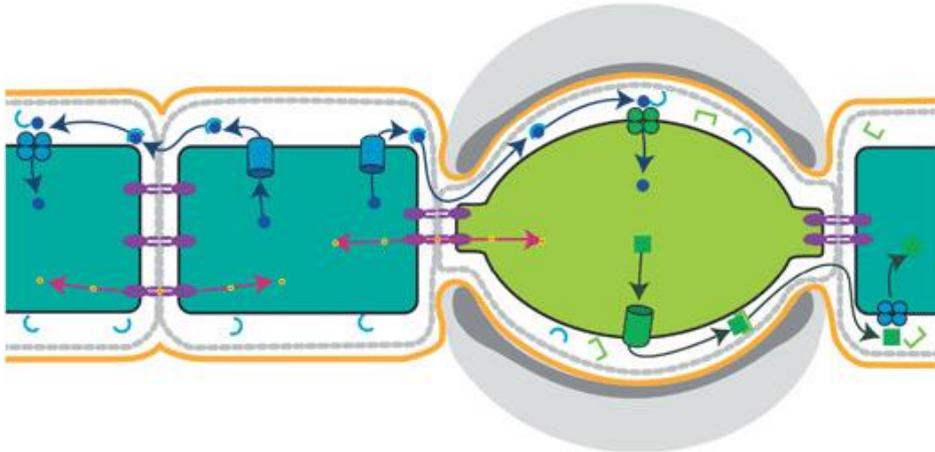
Als Überdauerungsform widerstehen Akineten Kälte und Trockenheit. Im Gegensatz zu den Endosporen grampositiver Bakterien sind Akineten hitzelabil. Trotzdem werden sie in Anlehnung an ihre Funktion als sporen-ähnlich beschrieben.

## 4.4 Intrafilamentöse Kommunikation in Cyanobakterien

Als Zellverband gemeinsam auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren erfordert Kommunikation. Damit erfüllt *N. punctiforme* die zwei grundlegenden Kriterien für echte Vielzelligkeit: Einen Zellverband und Kommunikation (Lyons and Kolter, 2015).

Bei filamentösen Cyanobakterien wie *N. punctiforme* kann dies auf zwei unterschiedlichen Wegen passieren. Als Vertreter gramnegativer Bakterien umspannt bei *N. punctiforme* die äußere Membran das gesamte Filament und fehlt im Septum. Als Folge besitzen die Zellen des Filaments ein gemeinsames Periplasma (Flores et al., 2006, Hoiczky and Baumeister, 1995), welches auch als Kommunikationsraum dient. Dabei werden Stoffe von Zellen in das Periplasma abgegeben und von anderen Zellen des Filaments aufgenommen (Abbildung 4). Direkter ist die Kommunikation von Zelle zu Zelle. Kommunikationsstrukturen zwischen Nachbarzellen haben bei Cyanobakterien seit ihrer Entdeckung verschiedene Bezeichnungen erhalten: Mikroplasmodesmata als Anlehnung an bekannte Strukturen bei Pflanzen (Sager and Lee, 2014, Giddings and Staehelin, 1981), *Channels* (Zheng et al., 2017, Omairi-Nasser et al., 2015, Omairi-Nasser

et al., 2014) oder auch *Septal Junctions* (Flores et al., 2016, Mullineaux and Nürnberg, 2014, Wilk et al., 2011, Nürnberg et al., 2015).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der zwei Routen intrafilamentöser Kommunikation.** In Blau und Grün dargestellt sind Transporter und Metabolite, welche die Route des Stoffaustauschs über das Periplasma nehmen. In Lila sind septumsüberbrückende, proteinöse Zell-Zell-Verbindungen dargestellt, welche den direkten Stoffaustausch ermöglichen. Bild aus (Maldener and Muro-Pastor, 2010).

Mittels FRAP-Experimenten (*fluorescent recovery after photobleaching*) konnte der direkte Stoffaustausch von Zelle zu Zelle bestätigt werden (Nürnberg et al., 2014, Lehner et al., 2011, Mullineaux et al., 2008). Bei diesen FRAP-Experimenten wurde der Rückfluss eines Fluorophors in eine gebleichte Zelle des Filaments gemessen.

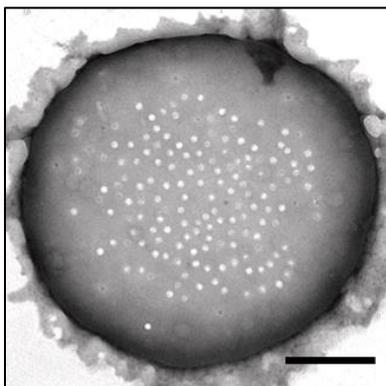
Generell wird FRAP verwendet, um Diffusionsgeschwindigkeiten in Zellen und dünnen Flüssigkeitsfilmen zu messen (Meyvis et al., 1999, Mullineaux, 2007). Neuere Studien zeigen, dass der Stofftransport in intakten Filamenten hauptsächlich von der Temperatur abhängt. Deswegen wird angenommen, dass es sich bei diesem Stoffaustausch um Diffusion handelt (Nieves-Mori3n et al., 2017). Die Diffusion ist abhängig von der Beschaffenheit der Septen eines Filaments, welches ein charakteristisches Merkmal einer Spezies ist (Zheng et al., 2017). Bei manchen Cyanobakterien ist auch die Position im Filament entscheidend für die Geschwindigkeit des Stoffaustausches. Das Cyanobakterium *Cylindrospermopsis raciborskii* entwickelt nur terminal Heterozysten. In dieser Region ist der Stoffaustausch schneller als mitten im Filament (Plominsky et al., 2015).

Die Struktur, welche diese Diffusion ermöglicht, besteht aus mehreren Komponenten. In der Cytoplasmamembran der Nachbarzellen sind Proteine verankert, welche wahrscheinlich die Zellen über das Septum miteinander verbinden. Dabei muss das Periplasma und das septale Peptidoglykan überwunden werden. In *Anabaena* PCC7120 sind SepJ (entspricht FraG) und anderen Fra-Proteinen Kandidaten für den Aufbau der septalen Zell-Zell-Verbindungen (Nürnberg et al., 2015, Mariscal et al., 2016, Nayar et al., 2007, Flores et al., 2007, Merino-Puerto et al., 2010, Merino-Puerto et al., 2011a, Merino-Puerto et al., 2011b). Die Proteine sind

nach der Fragmentation (Fra) benannt, welche durch das Fehlen eines oder mehrerer dieser Proteine verursacht wird, aber auch andere *KO*-Mutanten von periplasmatischen Proteinen können einen morphologischen Phänotyp mit verkürzten Filamenten verursachen (Burnat et al., 2014).

Das septale Peptidoglykan wird von Amidasen zum *Nanopore Array* geformt (Lehner et al., 2013). Dieser ist das Gerüst der direkten Zell-Zell-Kommunikation. In *Anabaena* PCC7120 wurde zusätzlich eine Amidase (AmiC3) gefunden, welche die Porengröße beeinflusst, da in durchgeführten FRAP-Experimenten nur ein kleiner Fluorophor die Septen der *amiC3*-Mutante teilweise noch passieren konnte (Zheng et al., 2017). Ein weiteres Protein, SjcF1, beeinflusst ebenfalls die Porengröße und interagiert mit FraC und SepJ (Rudolf et al., 2015). Eine Überexpression von SepJ in *Anabaena* PCC7120 führte zu vergrößerten Septen zwischen Heterozysten und vegetativen Zellen und zu einem erhöhten Stoffaustausch zwischen diesen Zelltypen (Mariscal et al., 2016), während bei einer *sepJ*-Mutante selektiv weniger Stoffaustausch passiert (Rivers et al., 2014).

Erstmals wurde die Struktur von Septen filamentöser Cyanobakterien wohl in den 1950er Jahren erforscht und Poren in den Seitenwänden (Septen) dokumentiert (Metzner, 1955). Der *Nanopore Array* bei *N. punctiforme* besteht aus ca. 150 Poren von 20 nm Durchmesser pro Septum (Abbildung: 5) und kann monokausal auf die Amidase AmiC2 zurückgeführt werden. Fehlt AmiC2, dann wird kein *Nanopore Array* gebildet. Die Zell-Zell-Kommunikation ist unterbrochen. (Lehner et al., 2013, Lehner et al., 2011).



**Abbildung: 5** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Septums vegetativer Nachbarzellen von *N. punctiforme*. Der *Nanopore Array* besteht aus ca. 150 Poren von 20 nm Durchmesser (Lehner et al., 2013). In der Peripherie des Septums sind keine Poren vorhanden. Größenstandard: 300 nm.

#### 4.5 Amidasen

Die Amidasen gehören zu den Hydrolasen. Sie spalten Amid-Bindungen unter Verbrauch eines Wassermoleküls. Es entstehen eine Carbonsäure und ein Amin. Die N-Acetylmuramyl-L-Ala-

nin-Amidasen (Amidasen) gehören zu den PG-Hydrolasen. Sie sind an dem Umbau der bakteriellen Mureinschicht beteiligt, welche den Zellen Stabilität verleiht und gleichzeitig flexibel genug sein muss, um Wachstum und Zellteilung zuzulassen. Die Amidasen spalten das Stammpeptid des Peptidoglykans von dem Zuckerrückgrat (Höltje, 1998) und sind bei unizellulären Bakterien wichtig für die Zellteilung. Sind in *Escherichia coli* (*E. coli*) die Gene der Amidasen AmiA, AmiB und AmiC ausgeschaltet, dann wächst das Bakterium in Filamenten, unfähig die Tochterzellen voneinander zu trennen (Heidrich et al., 2001). Da Amidasen die Zellwand zerschneiden, müssen sie minutiös reguliert werden. Eine unkontrollierte Aktivierung von Amidasen hätte den Tod der Zellen zu Folge, weil die Zellwand, die dem Turgor standhält, abgebaut würde. Für *E. coli* und einige andere einzellige Bakterien ist die Regulation von Amidasen bekannt (Garcia and Dillard, 2006, Möll et al., 2014, Lenz et al., 2016). Bei *E. coli* regulieren die Proteine EnvC und NlpD, welche LytM-Domänen enthalten, die Aktivität der Amidasen. Werden diese Regulatoren ausgeschaltet, dann besitzt die *envCnlpD*-Mutante denselben filamentösen Phänotyp wie die *amiABC*-Tripelmutante (Uehara et al., 2009, Uehara et al., 2010). Die Regulation von AmiC bei *E. coli* basiert auf der Präsenz einer flexiblen  $\alpha$ -Helix in der katalytischen Domäne. Diese blockiert das aktive Zentrum und wird durch den Einfluss von NlpD entfernt (Rocaboy et al., 2013).

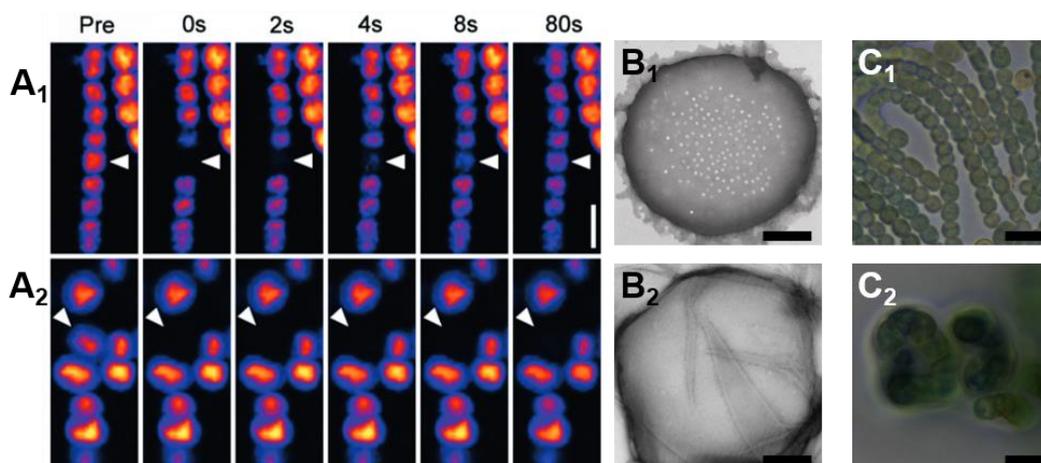
Die Zellwandamidasen AmiC1 und AmiC2 aus *N. punctiforme* sind nicht für die Trennung von Tochterzellen zuständig und besitzen einen anderen Aufbau als beispielsweise AmiC aus *E. coli*. In filamentösen Cyanobakterien treten AmiC1 und AmiC2 im Genom gemeinsam auf. Bisher ist diese Genverdoppelung bei einzelligen Cyanobakterien oder filamentösen Cyanobakterien der Sektion III (ohne Differenzierungspotential) nicht beobachtet worden (Berendt, 2011b). Auch der Transport in das Periplasma erfolgt anders: Während AmiC aus *E. coli* im gefalteten Zustand mittels Tat-Signal über die Cytoplasmamembran transportiert wird (Bernhardt and de Boer, 2003), werden die Amidasen in *N. punctiforme* über ein Sec-Signal in das Periplasma sekretiert. Statt einer AMIN-Domäne (Amidase-N-terminal) besitzen AmiC1 und AmiC2 jeweils zwei dieser Domänen. Über eine Länge von ca. 160 Aminosäuren (AS) sind die AMIN-Domänen mit der C-terminalen katalytischen Domäne verbunden. Dieser Aufbau ist für filamentöse Cyanobakterien der Sektion IV und V charakteristisch (Berendt, 2011b). Über Fusion mit GFP und dem Transport mittels Tat-Signal konnte AmiC2 in den verschiedenen Differenzierungsstadien lokalisiert werden. Besonders präsent ist AmiC2 in jungen Septen vegetativer Filamente und in Hormogonien. Die Amidase ist während der Differenzierung an der Zellwand der Proheterozyste lokalisiert. In reifen Akineten verschwindet das Signal von AmiC2 (Lehner et al., 2013).

#### 4.6 Die *amiC2*-Mutante von *N. punctiforme*

Erkenntnisse über die Funktion von AmiC2 wurden durch die Charakterisierung einer *KO*-Mutante gewonnen. Die daraus resultierende *amiC2*-Mutante ist unfähig, Akineten, Heterozysten oder Hormogonien zu differenzieren (Lehner et al., 2011).

Die Mutante zeigt eine aberrante Morphologie. Die Zellen der *amiC2*-Mutante sind vergrößert. Sie besitzen das dreifache Zellvolumen von vegetativen Zellen des WT. Auch die Septen der *amiC2*-Mutante sind größer (Faktor: 1,7x) (Lehner, 2013). Schiefe Teilungsebenen verhindern eine normale Filamentmorphologie. Die kurzen Filamente der Mutante winden sich zu klumpigen Strukturen. Die Zellwand ist dicker als beim *N. punctiforme* WT und macht die Mutante resistenter gegenüber mechanischem Stress. Zudem sind die Zellen der *amiC2*-Mutante in eine Schicht Exopolysaccharide eingebettet, die durch Alcianblau sichtbar gemacht wurden. Durch FRAP-Analysen konnte gezeigt werden, dass die *amiC2*-Mutante in der Zell-Zell-Kommunikation gestört ist. Im Gegensatz zu den vegetativen Zellen des Wildtyps (WT) gab es bei der *amiC2*-Mutante auch nach 80 s keinen Rückfluss des Fluorophors Calcein in die gebleichte Zelle. Selbst nach mehreren Minuten blieb diese Zelle dunkel. Isolation septalen Peptidoglykans lieferte Antwort darauf, warum die *amiC2*-Mutante keine Zell-Zell-Kommunikation betreiben kann. Das Septum besteht aus einer dickeren Schicht Peptidoglykan ohne eine einzige Pore (Abbildung 6).

Im Gegensatz zu Amidasen bei unizellulären Bakterien ist die Funktion von AmiC2 in *N. punctiforme* nicht die Trennung der Tochterzellen, sondern für die Transformation des septalen Peptidoglykans in den *Nanopore Array* zuständig (Lehner et al., 2013).



**Abbildung 6: FRAP-Aufnahmen, TEM-Aufnahmen und Hellfeldmikroskopie der *amiC2*-Mutante (2) im Vergleich mit dem *N. punctiforme* WT (1).** A) FRAP- Aufnahmen. Die gebleichten Zellen sind durch weiße Pfeilspitzen gekennzeichnet. Nach wenigen Sekunden ist die Zelle des WT wieder mit dem Fluorophor gefüllt, während die Zelle der Mutante dunkel bleibt. Größenstandard: 5  $\mu\text{m}$  (Lehner et al., 2011). B) TEM-Aufnahmen des septalen Peptidoglykans. Das Septum des WT verfügt über den *Nanopore Array*, welcher den Stoffaustausch von Zelle zu Zelle ermöglicht. Das Septum der Mutante besitzt keinen *Nanopore Array*. Größenstandard: 300 nm (Lehner et al., 2013). C) Die Hellfeldaufnahmen zeigen die Filamentmorphologien der Zellen. Der WT bildet reguläre Filamente, die Mutante wächst in aberranten Filamenten mit schiefen Teilungsebenen. Größenstandard: 5  $\mu\text{m}$ .

## 4.7 Ziel der Arbeit

Die Amidase AmiC2 transformiert das septale Peptidoglykan von *N. punctiforme* in das Grundgerüst der Zell-Zell-Kommunikation, den *Nanopore Array*. Die Deletionsmutante dieser Amidase zeigt schwerwiegende morphologische Defekte und ist unfähig zur Zelldifferenzierung. In dieser Arbeit sollte AmiC2 näher charakterisiert werden.

Der Einsatz von Peptidantikörpern sollte die Lokalisation von AmiC2 *in situ* durch Immunfluoreszenzmarkierung ermöglichen. Damit sollten frühere Untersuchungen zur Lokalisation von AmiC2 bestätigt werden. Die Untersuchung der Signalsequenzen sollte den Einfluss auf die Lokalisation von AmiC2 klären. Mit diesen Versuchen sollte das Argument eines artifiziellen Systems bei früheren Lokalisationsstudien von AmiC2 ausgeräumt werden.

Es sollte ein *Assay* etabliert werden, mit welchem die Aktivität der Amidase gemessen werden kann. Mit der Kristallstruktur der katalytischen Domäne (AmiC2<sub>C</sub>) sollten Einblicke in den Wirkmechanismus von AmiC2 gewonnen werden. Mutationen einzelner Aminosäuren sollten Aufschluss über deren Bedeutung für die Katalyse geben.

Die Domänenstruktur von AmiC2 unterscheidet sich von den Zellteilungsamidasen einzelliger Bakterien. Die einzelnen Domänen sollten mit verschiedenen Methoden auf ihre Funktion bezüglich der Lokalisation und katalytischen Aktivität untersucht werden.

Studien zeigten eine höhere Rate des Stoffaustausches über die Septen bei Hormogonien im Vergleich zu Filamenten vegetativer Zellen (Nürnberg et al., 2014). Deswegen wurde das septale Peptidoglykan von Hormogonien untersucht.

Zusätzlich sollten putative Interaktoren von AmiC2 identifiziert und ihre Deletionsmutanten auf ihr Differenzierungsverhalten hin untersucht werden. Morphologisch sollten diese Mutanten unter Verwendung mikroskopischer Methoden charakterisiert und durch Fusionen mit *sfGFP* lokalisiert werden.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Chemikalien und Geräte

Lösungsmittel, Chemikalien und Antibiotika wurden von folgenden Firmen bezogen: Karl Roth GmbH (Karlsruhe), Merk (Darmstadt), Roche (Boehringer, Mannheim), Sigma-Aldrich (München), Serva (Heidelberg), Fluka (Neu-Ulm), Bakto, Peqlab und Sartorius (Göttingen).

Enzyme und DNA-Standards für molekularbiologische Arbeiten stammten von den Firmen NEB Biolabs (Ipswich, England), Fermentas (St. Leon-Rot), Roche (Mannheim), Promega (Mannheim) und Genaxxon (Ulm).

Filter wurden von der Firma Millipore verwendet. Geräte und Reaktionsgefäße stammten von den Firmen Eppendorf, Gilson, Kodak, Sartorius, Fisher Scientific, Biorad, Peqlab, Leica, Beckmann, Branson, Hettich, Gibco, Analytik Jena, SensoQuest und Genaxxon.

#### 5.1.1 Verwendete Kits

Kits für Plasmid Präparationen (Mini- und Midi-Prep) wurden von den Firmen Macherey & Nagel (Düren, Deutschland) oder Peqlab (Erlangen) bezogen. Für die Affinitätschromatographie von Proteinen wurden His-Trap Säulen von Genaxxon oder GST-Trap Säulen von GE Healthcare verwendet.

#### 5.1.2 Datenbanken

Bezeichnung	Internetadresse
Cyanobase	<a href="http://genome.microbedb.jp/cyanobase/">http://genome.microbedb.jp/cyanobase/</a>
Meeks Lab Home Page	<a href="http://microbiology.ucdavis.edu/meeks/">http://microbiology.ucdavis.edu/meeks/</a>
NCBI	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
EMBL-EBI	<a href="http://www.ebi.ac.uk/">http://www.ebi.ac.uk/</a>

#### 5.1.3 Verwendete Programme

Bezeichnung	Internetadresse
Promotorvorhersage	<a href="http://www.fruitfly.org/">http://www.fruitfly.org/</a>
InterPro	<a href="https://www.ebi.ac.uk/interpro/">https://www.ebi.ac.uk/interpro/</a>
ClustalΩ	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</a>
ProtParam	<a href="http://web.expasy.org/protparam/">http://web.expasy.org/protparam/</a>
SignalP 4.1	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</a>
ReverseComplement (DNA)	<a href="http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html">http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html</a>
Clonemanager 9	Lizenzsoftware
WinASPECT Specord	Lizenzsoftware
Leica LAS AF Deconvolution	Lizenzsoftware
TMHMM Server 2.0	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a>

## 5.2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

### 5.2.1 Bakterienstämme

**Tabelle 1: Verwendete *E. coli*-Stämme.**

Stamm	Merkmale	Referenz
DH5 $\alpha$	F-, $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ), U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk-, mk+), <i>gal- phoA</i> , <i>supE44</i> $\lambda$ - <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	(Hanahan, 1983)
DH10B	F-, <i>mcrA</i> , $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta$ ( <i>ara, leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , $\lambda$ - <i>rpsL</i> , <i>nupG</i>	(Hanahan et al., 1991)
Lemo (DE3)	<i>fhuA2</i> [ <i>lon</i> ] <i>ompT gal</i> ( $\lambda$ DE3) [ <i>dcm</i> ] $\Delta$ <i>hsdS</i> / pLemo(CamR) $\lambda$ DE3 = $\lambda$ sBamHI $\Delta$ EcoRI-B int::( <i>lacI</i> ::PlacUV5::T7 gene1) i21 $\Delta$ nin5 pLemo = pACYC184-PrhaBAD-lysY	NEB Biolabs
MG1655	K-12 F- $\lambda$ - <i>ilvG</i> - <i>rfb-50 rph-1</i>	(Jensen, 1993)
HB101	F- <i>mcrB mrr hsdS20</i> (rB- mB-) <i>recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20</i> (Sm <sup>R</sup> ) <i>glnV44</i> $\lambda$ -	(Boyer and Roulland-Dussoix, 1969)
J53	F <sup>+</sup> <i>met pro</i>	(Clowes and Rowley, 1954)

**Tabelle 2: Verwendete Cyanobakterien.**

Stamm	Merkmale	Referenz
<i>Anabaena</i> sp.PCC7120	WT	PCC
<i>Nostoc punctiforme</i> ATCC29133	WT	ATCC
<i>Nostoc punctiforme</i> ATCC29133 <i>amiC2</i> -Mutante	Npun_F1846::C.K3 (rev.); Nm <sup>R</sup>	(Lehner et al., 2011)
<i>Nostoc punctiforme</i> ATCC29133 <i>gerM</i> -Mutante	Npun_F0437::C.K3t4 Nm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Nostoc punctiforme</i> ATCC29133 <i>Npf5024</i> -Mutante	Npun_F5024::C.K3t4 Nm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Nostoc punctiforme</i> ATCC29133 <i>slpD</i> -Mutante	Npun_R1578::C.K3t4 Nm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Nostoc punctiforme</i> ATCC29133 <i>slpB</i> -Mutante	Npun_R4778::C.K3t4 Nm <sup>R</sup>	Diese Arbeit

### 5.2.2 Plasmide

**Tabelle 3: Plasmide für die triparentale Konjugation.**

Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Referenz
pRK2013	RK2 Derivat für triparentale Konjugation	Km <sup>R</sup>	(Figurski and Helinski, 1979)
pRL528	Helferplasmid für die Konjugation	Cm <sup>R</sup>	(Elhai and Wolk, 1988)
RP4	Für Konjugation	Km <sup>R</sup>	(Wolk et al., 1984)

**Tabelle 4: pGEX-basierte Plasmide.** Der N-terminale GST-Tag lässt sich bei den 4T-3 Plasmiden durch Thrombin entfernen, bei den 6P-1 Plasmiden wird der Tag mittels PreScission Protease™ entfernt.

Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Referenz
pGEX-4T-3	Leervektor	Amp <sup>R</sup>	GE Healthcare
pIM629	AmiC2 <sub>C</sub>	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pIM630	AmiC2 <sub>AB</sub>	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pGEX-6P-1	Leervektor	Amp <sup>R</sup>	GE Healthcare
pIM627	AmiC2 <sub>MC</sub>	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pIM628	AmiC2 <sub>M</sub>	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit

**Tabelle 5: pET15b-basierte Plasmide.**

Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Referenz
pET-15b	Leervektor	Amp <sup>R</sup>	Novagen
pIM637	His-GerM	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pIM638	GerM-His	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pIM642	His-Npf5024	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pIM643	Npf5024-His	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pIM644	His-SlpB	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit

**Tabelle 6: pET28a(+)-GFPe basierte Plasmide.** Da diese Plasmide für den *Pull-down* bestimmt sind wurde, durch die Klonierung der His-Tag des Leervektors entfernt.

Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Referenz
pET28a(+)-GFPe	Leervektor	Kan <sup>R</sup>	(Drew et al., 2006)
pIM673	AmiC1 <sub>ABMC</sub> GFPe	Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pIM674	AmiC2 <sub>ABMC</sub> GFPe	Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pIM675	AmiC2 <sub>BC</sub> GFPe	Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit

**Tabelle 7: pRL271 basierte Plasmide.** Durch das *sacB*-Gen ist die Selektion auf Doppelte Rekombination möglich.

Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Referenz
pRL271	Leervektor	Em <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	(Black et al., 1993)
pIM647	Npun_F5024::C.K3t4	Em <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Nm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pIM648	Npun_R1578::C.K3t4	Em <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Nm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pIM649	Npun_R4778::C.K3t4	Em <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Nm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pIM651	Npun_F0437::C.K3t4	Em <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Nm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pIM672	Npun_F0437sfYFP-C.K3t4-	Em <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Nm <sup>R</sup>	Diese Arbeit

**Tabelle 8: pSCR202 basierte Plasmide.** Bei den Reporterkonstrukten von Npf5024, SlpD, SlpB und GerM wurde die jeweils native Promotorregion dem Fusionsgen vorgeschaltet. Das Plasmid pIM650 ist mit Ausrufezeichen gekennzeichnet, weil die Promotorregion von *gerM* in *E. coli* so stark erkannt wurde, dass der Wirt das Plasmid modifiziert.

Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Referenz
pSCR202	Leervektor	Amp <sup>R</sup>	(Summers et al., 1995)
pIM469	Tat-AmiC2 <sub>ABMC</sub> -GFP	Amp <sup>R</sup>	(Berendt, 2011b)
pIM583	Tat-AmiC2 <sub>C</sub> - GFP	Amp <sup>R</sup>	Sophie Schmidt
pIM591	Tat-AmiC2 <sub>AC</sub> - GFP	Amp <sup>R</sup>	Sophie Schmidt
pIM593	Tat-AmiC2 <sub>BMC</sub> - GFP	Amp <sup>R</sup>	Sophie Schmidt
pIM625	Tat-AmiC2 <sub>MC</sub> - GFP	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pIM626	Tat-AmiC2 <sub>AMC</sub> - GFP	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit

pIM635	Tat-AmiC2 <sub>BC</sub> - GFP	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pIM639	Npf5024(Npun_F5024)sfGFP	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pIM640	SlpD(Npun_R1578)sfGFP	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pIM641	SlpB(Npun_R4778)sfGFP	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pIM650!	GerM(Npun_F0437)sfGFP	Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit

**Tabelle 9: pRL1049 basierte Plasmide.** Für alle Konstrukte wurde die vektorinterne Promotorsequenz verwendet.

Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Referenz
pRL1049	Leervektor	Sm <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup>	(Black and Wolk, 1994)
pIM612	C.K3t4	Sm <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> Nm <sup>R</sup>	Jan Bornikoel
pIM584	SeC <sub>Npun_F1846</sub> SfGFP	Sm <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup>	Sophie Schmidt
pIM609	Tat(Npun_R2356)sfGFP	Sm <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup>	Sophie Schmidt
pIM631	SeC <sub>all4575</sub> SfGFP	Sm <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pIM632	SeC <sub>all4999</sub> SfGFP	Sm <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pIM633	SeC <sub>alr1834</sub> SfGFP	Sm <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pIM634	SeC <sub>alr2269</sub> SfGFP	Sm <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pIM636	SeC <sub>all1666</sub> SfGFP	Sm <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup>	Diese Arbeit

### 5.2.3 Oligonukleotide

**Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide.** Grundsätzlich erfolgte die Namensgebung in Leserichtung des Gens. Oligonukleotide für Gibson-Klonierungen sind nach ihren Überhängen benannt. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen oder Modifikationen sind fett markiert. „Linker“ stellt der veraltete Name des Modulators von AmiC2 dar. „EZD“ ist die alte Bezeichnung für die katalytische Domäne von AmiC2.

Nummer	Bezeichnung	Sequenz 3'-5'
992	GST-AmiC2Np_fw	GCGT <b>GGATCC</b> GCGAAACTTGAATATTGG
993	GST-AmiC2Np_rv	CCGG <b>GAAATTC</b> TTAACGCTGTAAGTATTTTAGGATG
994	GST-AmiC2NpEZD_fw	GCGT <b>GGATCC</b> GGGAAATTACTAGTTGTGATTGAC
995	GST-Seq-fw	AGAGCGTGCAGAGATTTTC
997	Amin_fw	CTGGTGCCGCGCGGATCCG
998	Amin_rv	GAGGCCCAAGGGTATGCTAGGAATTA
1029	GST-AmiC1Np_fw	CCT <b>GGATCC</b> GCGAGACTTGAATCTTGGCGCTTTG
1030	GST-AmiC1Np_rv	GCC <b>GCTCGAG</b> TTATCTTCTCTTTAAATACTGAAGAACGCCAC
1031	sfBFP(Y66H) fw	GGCCAACATTAGTAACAACATTAACAC <b>CAT</b> GGTGTACAATGTTTTTCACGTTATCCAG
1032	sfBFP(Y66H) rv	CTGGATAACGTGAAAAACATTGTACACC <b>ATG</b> TGTTAATGTTGTTACTAATGTTGGCC
1033	sfYFP(T203Y) fw	CCAGTATTATTACCAGATAATCATTATTTATCAT <b>AT</b> CAATCA GTATTATCAAAAGATCC
1034	sfYFP(T203Y) rv	GGATCTTTTGATAATACTGATTG <b>ATAT</b> GATAAATAATGATTATCTGGTAATAATACTGG
1035	AmiC2NpSS-sfGFP	GTGAAATTACGCTGGTACTATCCAGTACTATTGGA <b>ACTAT</b> CTTCATGCTATCGTCGCCCCGCAATGGCTGCATCAAAAGGTGAAGAATTATTACAGGTG

1036	pRL1049 - AmiC2NpSS	GACGGATATCCCGCAAGAGGCCCTTTTCGTCTTCAAGAATT CGTGAAATTACGCTGGTTACTATCC
1037	pRL1049 - sfGFP rv	CACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTACCGGGATC CTTATTTATATAATTCATCCATAC
1038	pSCR202 rv	CGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGG
1039	PamiC-TAT-seq fw	GGCTCCCATGAACGTGAATTAG
1040	TAT-EZD (amiC2Np) fw	CTGCAAGTGCTGTATTCCTTAAAGGCTGTTTGGGTAATCC CGGGAAATTACTAGTTGTGATTGACCCAGG
1041	TAT-EZD (amiC2Np) rv	CCACCATGTCCTGGGTCAATCACAACAGTAATTTCCCGG GATTACCCAAACAGCCTTTAAGG
1042	pSCR202-PamiC1 fw	GTA AACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGG GATCCAGTATCCCTAGGCTTGTGAGCC
1043	3xFLAG-amiC1ss rv	TTTATCGTCATCGTCTTTGTAGTCAATATCATGATCTTTATA ATCACCATCATGATCTTTATAATCAGCCATTGCCGGCGAC G
1044	3xFLAG-L-amiC1ss fw	GATTATAAAGATCATGATGGTGATTATAAAGATCATGATAT TGACTACAAAGACGATGACGATAAAGCGGCTGCGAGACTT GAATCTTGCGC
1045	amiC1-t1t2 rv	GTTTTATCAGACCGCTTCTGCCAACCAATTAACCAATTCTG ATTATCTTCTCTTTAAATACTGAAGAACGCCAC
1046	amiC1-t1t2 fw	GATCGCTCGTGGCGTTCTTCAGTATTTAAAGAGAAGATAA TCAGAATTGGTTAATTGGTTGGCAGAAG
1047	pSCR202 -t1t2 rv	CGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGACTCTAGAGGATC CGAGTTTGTAGAAACGCCAAAAGGCCATC
1048	amiC1-3xFLAG rv	CAATATCATGATCTTTATAATCACCATCATGATCTTTATAAT CAGCCGCTCTTCTCTTTAAATACTGAAGAACGCCAC
1049	3xFLAG-t1t2 fw	GATTATAAAGATCATGATGGTGATTATAAAGATCATGATAT TGACTACAAAGACGATGACGATAAATAATCAGAATTGGTTA ATTGGTTGGCAGAAG
1050	PamiC1-amiC2ss rv	TGAAGATAGTTCCAATAGTACTGGATAGTAACCAGCGTAA TTTCACAGTTCTTTCTCCTAATTCACGTTTCATGG
1051	amiC2ss-3xFLAG rv	CATCATGATCTTTATAATCAGCCATTGCGGGCGACGATAG CATGAAGATAGTTCCAATAGTACTGGATAG
1052	amiC2ss-3xFLAG rv2	CGCTTTATCGTCATCGTCTTTGTAGTCAATATCATGATCTT TATAATCACCATCATGATCTTTATAATCAGCCATTGC
1053	3xFLAG-amiC2 fw	GATTATAAAGATCATGATATTGACTACAAAGACGATGACGA TAAAGCGGCTGCGAAACTTGAATATTGGCG
1054	amiC2-t1t2 rv	CTGTTTTATCAGACCGCTTCTGCCAACCAATTAACCAATTC TGATTAACGCTGTAAGTATTTAGGATGC
1055	amiC2-t1t2 fw	GAAGCGATCGCTCGTGGCATCCTAAAATACTTACAGCGTT AATCAGAATTGGTTAATTGGTTGGCAG
1056	PamiC1-amiC2ss fw	GATATTGACGGCTCCCATGAACGTGAATTAGGAGAAAGAA CTGTGAAATTACGCTGGTTACTATCC
1057	amiC2-3xFLAG rv	CGTCATCGTCTTTGTAGTCAATATCATGATCTTTATAATCA CCATCATGATCTTTATAATCAGCCGCACGCTGTAAGTATTT TAGGATGC

1060	TAT-AMINa fw	CTGTGTTCTCCCCAAGAGATATTTACAACGTGGTGAGAAC AGGGAAATTACTAGTTGTGATTGACCCAGG
1061	TAT-AMINa rv	CTTTTCCACCATGTCCTGGGTCAATCACAACCTAGTAATTTCC CCTGTTCTCACCACGTTGTAATATCTCTTGG
1062	TAT-AMINb fw	CTGCAAGTGCTGTATTCCTTAAAGGCTGTTTGGGTAATCC CACAAGCCCTATTAATCCACCTAAAAACGG
1063	TAT-AMINb rv	CGGCAAGCATCCCGTTTTTAGGTGGATTAATAGGGCTTGT GGGATTACCCAAACAGCCTTTAAGG
1064	pSCR202 Seq fw	TGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGG
1065	pSCR202 Seq rv	CGACAGGTTTCCCGACTGGAAAG
1066	Np amiC1+2 fw	TCCGTCCCATCTGATTGTAG
1067	Np amiC1+2 rv	TTCTGCACGCCAAAGGATTC
1081	inAMIN B (NpAmiC2) fw	ATGCTTGCCGCCAGGGTAAC
1082	inEZD (Np AmiC2) fw	GCAGCCGGAGTGCAAATTGG
1083	pSCR-PamiC2 fw	CGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCCAGT ATCCCTAGGCTTG
1084	amiC2-FLAG rv	TTGTAGTCAATATCATGATCTTTATAATCACCATCATGATCT TTATAATCAGCCGCTCTTCTCTTTAAATACTG
1085	FLAG-t1t2 fw	GTGATTATAAAGATCATGATATTGACTACAAAGACGATGAC GATAAATAATCAGAATTGGTTAATTG
1086	FLAG-t1t2 rv	CGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATC CGAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGGCCATCCGTCAG
1087	SSamiC1-FLAG rv	TTGTAGTCAATATCATGATCTTTATAATCACCATCATGATCT TTATAATCAGCCATTGCCGGCGACGATAG
1088	FLAG-amiC1 fw	ATGGTGATTATAAAGATCATGATATTGACTACAAAGACGAT GACGATAAAGCGGCTGCGAGACTTGAATCTTG
1089	amiC1-t1t2 rv	AACCAATTAACCAATTCTGATTATCTTCTCTTTAAATAC
1090	amiC1-t1t2 fw	AGTATTTAAAGAGAAGATAATCAGAATTGGTTAATTG
1091	PamiC1-SSamiC2 rv	AGTAACCAGCGTAATTTACAGTTCTTTCTCCTAATTCAC
1092	PamiC1-SSamiC2 fw	GTGAATTAGGAGAAAGAACTGTGAAATTACGCTGGTTAC
1093	amiC2-FLAG rv	TTGTAGTCAATATCATGATCTTTATAATCACCATCATGATCT TTATAATCAGCCGCACGCTGTAAGTATTTTAG
1094	amiC2-t1t2 fw	TAAATACTTACAGCGTTAATCAGAATTGGTTAATTGG
1095	amiC2-t1t2 rv	AACCAATTAACCAATTCTGATTAACGCTGTAAGTATTTTAG GATG
1096	FLAG-amiC2 fw	ATGGTGATTATAAAGATCATGATATTGACTACAAAGACGAT GACGATAAAGCGGCTGCGAAACTTGAATATTGG
1097	SSamiC2-FLAG rv	TTGTAGTCAATATCATGATCTTTATAATCACCATCATGATCT TTATAATCAGCCATTGCCGGCGACGATAG
1098	PamiC1-SSamiC1 rv	AGCCATTGCGGGCGACGATAGCATGAAGATAGTTCCAATA GTAAGTGGATAGTAACCAGCGTAATTTACAGTTCTTTCTCC TAATTCAC
1113	pMA-T fw	GAGCGCGACGTAATACGAC

1114	pMA-T rv	GCCCAATACGCAAGGAAAC
1115	pRL277 fw (XhoI)	GCCCTTAAACGCCTGGTG
1116	pRL277 rv (XhoI)	TAACCGGCCTCTTCATCG
1206	intern amiC2fw	TCAGCCGTATTTCAGTTCAG
1207	intern amiC1fw	TTGGTGGTTCTGCCTAGTC
1210	TAT sfGFP fw	CTTAAAGGCTGTTTGGGTAATCCCGCATCAAAGGTGAAG AATTATTTAC
1264	AMIN-A-LINKER fw	TATTTACAACGTGGTGAGAACACCTGGAGGTAATAATAAT C
1265	AMIN-A-LINKER rv	GTGGATTATTATTACCTCCAGGTGTTCTCACCACGTTGTAA ATATCTC
1266	AMIN-B-EZD fw	GTCGTGGCATTGCTCAGTTCGGGAAATTACTAGTTGTG
1267	AMIN-B-EZD rv	ATCACAACTAGTAATTTCCCGAACTGAGCAATGCCACGAC TG
1268	TAT-LINKER fw	CCTTAAAGGCTGTTTGGGTAATCCCCCTGGAGGTAATAAT AATC
1269	TAT-LINKER rv	GCTGTTTGGGTAATCCCCCTGGAGGTAATAATAATCCACG CCCCA
1270	sfGFPstart	CGCATCAAAGGTGAAGAATTATTTAC
1271	pLR1049 rv	CGATCCCGCGAAATTAATAC
1272	TAT-LINKER rv new	TGGGGCGTGGATTATTATTACCTCCAGGGGGATTACCCAA ACAGC
1307	gfp-seq upstream	TGTGCCCATTAACATCACCATC
1308	pRL1049 -seq	ACGGCTTGATGAGTACC
1336	GST-LINKER fw	ATCGGATCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATC CCCTGGAGGTAATAATAATCCAC
1337	cat-pGEX rv	AACGCGCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCACGATGCGGCC GCTCGAGTTAACGCTGTAAGTATTTTAGGATGC
1338	LINKER-pGEX rv	AACGCGCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCACGATGCGGCC GCTCGAGTTATCTAGGAACAGAGGG
1339	AMINb-cat neu fw	GTCGTGGCATTGCTCAGTTCCTAGAGGGAAATTACTAGT TG
1340	AMINb-cat neu rv	ACAAC TAGTAATTTCCCTCTAGGGAAGT GAGCAATGCCAC GACTG
1342	Npun_F0437 fw	CTCCAGGTTTCGGGAAACTC
1343	Npun_F0437 rv	ACCGGGTGGAAAGATGAAATG
1344	pET15b- Npun_F0437His fw	CTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCA TGAAAGACCAACAAGGATCTAATCGCATTCTTCAG
1345	pET15b- Npun_F0437His rv	CCTCGAGCATATGGCTGCCGCGCGGCACCAGGCCGCTG CTCTAGTGATGATGATGATGGCTGCTGCCAAGCTGAT AATTTTTCTC
1346	pET15b-HisN- pun_F0437 fw	GAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGC ATCATCATCATCACGGCAGCAGCAAAGACCAACAAGG ATCTAATCGCATTC

1347	pET15b-HisN-pun_F0437 rv	CCAGGCCGCTGCTGTGATGATGATGATGATGGCTGCTGC CCTAAAGCTGATAATTTTTCTC
1357	Npun_R4778 fw	ACCCTAGCCCGATGTAAGTG
1358	Npun_R4778 rv	GCAAGCAATGCGAGGGTAAG
1359	His-Npun_R4778 fw	CTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCA TGCATCATCATCATCACGGCAGCAGCTTAGATTTATTT ATCTCTACTTACTTAATTT
1360	His-Npun_R4778 rv	CCAGGCCGCTGCTGTGATGATGATGATGATGGCTGCTGC CTTACTTCTTATTCCAGAGACTTAAAAATG
1361	Npun_R4778-His fw	GAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGT TAGATTTATTTATCTCTACTTACTTAAATTT
1362	Npun_R4778-His rv	ATCCTCGAGCATATGGCTGCCGCGCGGCACCAGGCCGCT GCTCTAGTGATGATGATGATGATGGCTGCTGCCCTTCTTA TTCCAGAGACTTAAA
1363	Npun_R1578 fw	GAAGATAGCGAACAAGAAGG
1364	Npun_R1578 rv	CCACATGCCACACCTCAAAG
1365	His-Npun_R1578 fw	CTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCA TGCATCATCATCATCACGGCAGCAGCCTTCAAAAAAT TGGAAGTAATG
1366	His-Npun_R1578rv	CACCAGGCCGCTGCTGTGATGATGATGATGATGGCTGCT GCCTTAATTGAATTTTACCCGTGCATCC
1367	Npun_R1578-His fw	CTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCA TGCTTCAAAAAATTGGAAGTAATG
1368	Npun_R1578-His rv	CCTCGAGCATATGGCTGCCGCGCGGCACCAGGCCGCTG CTCTAGTGATGATGATGATGATGGCTGCTGCCATTGAATT TTACCCGTGCATCC
1369	Npun_F5024 fw	CCCAATTGCTCCATTAGG
1370	Npun_F5024 rv	ATTGGGTATTGGGCATTGG
1371	His-Npun_F5024 fw	CTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCA TGCATCATCATCATCACGGCAGCAGCGCTGTAGGTG GTTGCCCGATTCC
1372	His-Npun_F5024 rv	CCAGGCCGCTGCTGTGATGATGATGATGATGGCTGCTGC CTCATTCTTCAAATAACCTTTTGGGTCTTGTG
1373	Npun_F5024-His fw	CTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCA TGGCTGTAGGTGGTTGCCCGATTCC
1374	Npun_F5024-His rv	CCTCGAGCATATGGCTGCCGCGCGGCACCAGGCCGCTG CTCTAGTGATGATGATGATGATGGCTGCTGCCTTTCTTCA AATAACCTTTTGGGTCTTGTG
1375	pSCR202-sfGFP rv	GGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT GAATTCCTATTTATATAATTCATCCATACCATGTGTAATAC
1376	sfGFP fw	GCATCAAAGGTGAAGAATTATTAC
1377	pSCR202-NpunF5024	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATG CATTGGCGACTTTGCGAGTGG
1378	Npun_F5024-sfGFP rv	CTAAAATTGGTACTACACCTGTAATAAATTCCTTACCTTTT GATGCTTTCTTCAAATAACCTTTTGGGTCTTGTG
1379	pSCR202-Npun_R1578	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATG CGAAGATAGCGAACAAGAAGG

1380	Npun_R1578-sfGFP	CTAAAATTGGTACTACACCTGTAAATAATTCTTCACCTTTT GATGCATTGAATTTTACCCGTGCATCCAGAC
1381	pSCR202- Npun_R4778	CACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCA TGCACCCTAGCCCGATGTAAGTG
1382	Npun_R4778-sfGFP	CTAAAATTGGTACTACACCTGTAAATAATTCTTCACCTTTT GATGCCTTCTTATTCCAGAGACTTAAAAATG
1383	CK3t4 fw	TCTAGAGGATCTCAATGAATA
1384	CK3t4 rv	ATGCTTGTAACCGTTTTG
1385	pRL271-Npun_F5024 up	GATAATAAGCGGATGAATGGCAGAAATTCGATATCTAGAT CCCCAATTGCTCCATTAGG
1386	Npun_F5024 up- CK3t4	CTTATACGCCCGTGTCAACCAATATTCATTGAGATCCTCTA GATATGCTTACTAGGCCCAAGG
1387	CK3t4-Npun_F5024 down	CTTTTTTATTTTAAAAATTTTTTACAAAACGGTTTACAAGC ATATATCCCTTGGCACAAGTG
1388	Npun_F5024 down- pRL271	CGCCGGCATGTCCCCCTGGCGGACGGGAAGTATCCAGCT CGAATTGGGTATTGGGCATTGG
1389	pRL271-Npun_R1578 up	GATAATAAGCGGATGAATGGCAGAAATTCGATATCTAGAT CGAAGATAGCGAACAAGAAGG
1390	Npun_R1578 up- CK3t4	CTTATACGCCCGTGTCAACCAATATTCATTGAGATCCTCTA GAAGATTGCCCTGCGATACTC
1391	CK3t4-Npun_R1578 down	CTTTTTTATTTTAAAAATTTTTTACAAAACGGTTTACAAGC ATCTGGAAATGTAGATTGGCAAACCTTG
1392	Npun_R1578 down- pRL271	CCGGCATGTCCCCCTGGCGGACGGGAAGTATCCAGCTCG ACCACATGCCACACCTCAAAG
1393	pRL271-Npun_R4778 up	GATAATAAGCGGATGAATGGCAGAAATTCGATATCTAGAT CACCCCTAGCCCGATGTAAGTG
1394	Npun_R4778 up- CK3t4	CTTATACGCCCGTGTCAACCAATATTCATTGAGATCCTCTA GATCTGGTTTTACAAAAATTAAG
1395	CK3t4-Npun_R4778 down	CTTTTTTATTTTAAAAATTTTTTACAAAACGGTTTACAAGC ATACAGCAGTCAAGAAATTTT
1396	Npun_R4778 down- pRL271	CCGGCATGTCCCCCTGGCGGACGGGAAGTATCCAGCTCG AGCAAGCAATGCGAGGGTAAG
1403	pSCR202- Npun_F0437	CACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCA TGCACTGAATTGTAAATTTAATC
1404	Npun_F0437-sfGFP	CTAAAATTGGTACTACACCTGTAAATAATTCTTCACCTTTT GATGCAAGCTGATAATTTTTCTCAAAG
1405	pSCR202-AmiC1	CACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTG CATGCTGCATTGATGGCAAAAAAC
1406	AmiC1-sfGFP	CTAAAATTGGTACTACACCTGTAAATAATTCTTCACCTTTT GATGCTCTTCTCTTTAAATAC
1407	Npun_F0437 fw(Pro- motor)	GATTACCGCCGCAATTGATG
1416	pRL271-Npun_F0437 up	GTGATAATAAGCGGATGAATGGCAGAAATTCGATATCTAG ATCGATTACCGCCGCAATTGATG
1417	Npun_F0437 up- CK3t4	CTTATACGCCCGTGTCAACCAATATTCATTGAGATCCTCTA GAGTCCAGAGGGGTTTGATG

1418	CK3t4-Npun_F0437 down	CCTTTTTTATTTTAAAAATTTTTTACAAAACGGTTTACAAG CATAAGCAGCTTTTCAAAGTTTGTTGG
1419	Npun_F0437 down-pRL271	CCGGCATGTCCCCCTGGCGGACGGGAAGTATCCAGCTCG AACCGGGTGGAAAGATGAAATG
1468	TEST pIM631	AATAACCGCATTCCAGTATC
1469	TEST pIM632	TCACCTCCTCCGTTGCTTTG
1470	TEST pIM633	TGCCCTCAGTTTAGGTTTAG
1471	TEST pIM634	GCGTTTATCTCCCGTATTAG
1472	TEST pIM636	AATTTCTCTTGGCTTGATGG
1473	TEST pIM584	AATTACGCTGGTTACTATCC
1474	TEST pIM609	CATCTGCAAGTGCTGTATTC
1478	Npun_F0437 fw	AGCCGTTTCAGCAGTGGTTG
1479	NpunF0437 rv	AGCCGAAGTCTCTGGACAGG
1480	pRL271 - NpunF0437	GTGATAATAAGCGGATGAATGGCAGAAATTCGATATCTAG ATCAGCCGTTTCAGCAGTGGTTG
1481	sfYFP - CK3t4 rv	CTTATACGCCCGTGTCAACCAATATTCATTGAGATCCTCTA GATTATTTATATAATTCATCCATACCATGTGTAATAC
1482	CK3t4 - F0437 rv	TTTTTTTTAAAAATTTTTTACAAAACGGTTTACAAGCATT GGTGGTGAAGGCGTAGAG
1483	F0437 - pRL271 rv	CCGGCATGTCCCCCTGGCGGACGGGAAGTATCCAGCTCG AAGCCGAAGTCTCTGGACAGG
1484	pET28 - AmiC1 fw	CTTTAAGAAGGAGACTCGAGGATGTTAAGAATTCCGGGTA CCTGGATCCATGGCGAGACTTGAATCTTGG
1485	AmiC1 - GFP rv	GAATTGGGACAACCTCCAGTGAAAAGTTCTTCTCCTTTGCT AGCTCTTCTCTTTAATACTGAAGAACGCCACGAG
1486	pET28 - GFPsolo fw	GGAGACTCGAGGATGTTAAGAATTCCGGGTACCTGGATC CATGGCTAGCAAAGGAGAAGAAGACTTTTCA
1487	GFP - pET28 rv	CAGCTTCTTTCCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCAAGCTT ATTTGTAGAGCTCATCCATGCCATGTGT
1488	gfp fw	AGCAAAGGAGAAGAAGACTTTTCA
1489	pET28 - AmiC2 fw	GGAGACTCGAGGATGTTAAGAATTCCGGGTACCTGGATC CATGGCGAAACTTGAATATTGG
1490	AmiC2 - GFP rv	GAATTGGGACAACCTCCAGTGAAAAGTTCTTCTCCTTTGCT AGCACGCTGTAAGTATTTTAGGATG
1491	pET28 - AMINb fw	GAAGGAGACTCGAGGATGTTAAGAATTCCGGGTACCTGG ATCCATGACAAGCCCTATTAATCCACCTAAA
1492	pET28 - cat fw	GAAGGAGACTCGAGGATGTTAAGAATTCCGGGTACCTGG ATCCATGGGAAATTAAGTATTGATTG
1493	pET28 - Linker fw	GAAGGAGACTCGAGGATGTTAAGAATTCCGGGTACCTGG ATCCATGCCTGGAGGTAATAATAATC
1520	pET28rv	GGATCCAGGTACCCGGAATTCT
1521	pET28fw	GCTTGATCCGGCTGCTAACAAAG

1522	His-N 0437 ohne TM	GAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGC ATCATCATCATCATCACGGCAGCAGCACTACACACTCCAG CAATCC
1523	His-C 0437 ohne TM	CTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCA TGACTACACACTCCAGCAATCC
1524	sfCFP fw	AGTACCATGGCCAACATTAGTAACAACATTAACATGGGGT GTACAATGTTTTTCAC
1525	sfCFP rv	GTGAAAAACATTGTACACCCCATGTTAATGTTGTTACTAAT GTTGGCCATGGTACT
1536	5' pET	CCGCGAAATTAATACGACTCAC
1537	3'pET2	CCTCAAGACCCGTTTAGAGG

### 5.3 Kultivierungsmethoden

#### 5.3.1 Medien zur Anzucht der Cyanobakterien

Die Cyanobakterien wurden in BG11-Medium (Rippka et al., 1979) oder in Allen-und-Arnon Medium (Allen and Arnon, 1955) gezogen. Das A+A-Medium wurde bei Flüssigkulturen verdünnt verwendet (A+A1/4). Für festes Medium wurde jeweils 1,5 % Difco-Agar zugefügt. Gebundener Stickstoff wurde in Form von 17,2 mM NaNO<sub>3</sub> oder zusätzlich 4 mM NH<sub>4</sub>Cl und 8 mM HEPES (pH 7,5) für BG11-Medium und 5 mM KNO<sub>3</sub> oder 2,5 mM NH<sub>4</sub>Cl, 5,0 mM MOPS (pH 7,4) (A+A) beigelegt. Generell wurde BG11-Medium für *N. punctiforme* verwendet und A+A-Medium für *Anabaena* PCC7120.

<b>BG11<sub>0</sub>-Medium: (Endkonzentration)</b>	MgSO <sub>4</sub>	0,3	mM
	CaCl <sub>2</sub>	0,25	mM
	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> (Zitronensäure)	0,03	mM
	Ammoniumeinencitrat	0,023	mM
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2	mM
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,18	mM
	Na <sub>2</sub> EDTA	2,5	µM
<b>Spurenelemente: (Endkonzentration)</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	46	µM
	MnCl <sub>2</sub>	9,2	µM
	ZnSO <sub>4</sub>	0,77	µM
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	1,6	µM
	CuSO <sub>4</sub>	0,32	µM
	CoCl <sub>2</sub>	0,2	µM

<b>A+A-Medium: (Endkonzentration)</b>	MgSO <sub>4</sub>	1,0	mM
	CaCl <sub>2</sub>	0,5	mM
	NaCl	4,0	mM
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0	mM
<b>Spurenelemente: (Endkonzentration)</b>	MnCl <sub>2</sub>	9,24	µM
	MoO <sub>3</sub>	1,25	µM
	ZnSO <sub>4</sub>	0,77	µM
	CuSO <sub>4</sub>	0,32	µM

#### 5.3.2 Medien zur Anzucht von *E. coli*

<b>LB-Medium: (Bertani, 1951)</b>	Hefeextrakt	1,0	%
	Trypton	0,5	%
	NaCl	0,5	%
<b>LB-Agar:</b>	Agar	1,5	%

### 5.3.3 Sterilisation

Glaswaren wurden bei 180°C durch trockene Hitze sterilisiert, Medien und Puffer wurden für 20 min bei 121°C und 2 bar Überdruck dampfsterilisiert. Temperaturempfindliche Lösungen wurden mit Hilfe eines Filters (0,45 µm oder 0,22 µm) steril filtriert.

### 5.3.4 Antibiotika

In folgender Tabelle sind die verwendeten Endkonzentrationen der Antibiotika für *E. coli*, *Anabaena* sp. PCC7120 und *N. punctiforme* aufgeführt. Das Antibiotikum Kanamycin wurde für *E. coli* eingesetzt und das stabilere Neomycin für *N. punctiforme*, wegen der längeren Inkubationszeiten. Es liegt dieselbe Resistenz zugrunde.

Tabelle 11: Konzentrationen verwendeter Antibiotika.

Antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>Anabaena</i>	<i>N. punctiforme</i>
Ampicillin	100 µg/mL	-	10 µg/mL
Kanamycin	50 µg/mL	-	-
Neomycin	-	-	50 µg/mL
Spectinomycin	100 µg/mL	5 µg/mL	-
Streptomycin	25 µg/mL	5 µg/mL	-

### 5.3.5 Anzucht von Cyanobakterien

Zur Anzucht in einem Volumen von 50 mL wurden 1-2 mL aus einer gut gewachsenen Kultur von *N. punctiforme* in das frische BG11-Medium überführt. Die Kolben wurden bei max. 100 rpm geschwenkt und unter Dauerlicht (8 Wm<sup>-2</sup> Weißlicht bei 28°C) inkubiert. Die Agarplatten wurden unter den gleichen Bedingungen ohne Schwenken inkubiert. Größere Volumina (1 L) wurden in Kolben mit sterilen Magnetfischen und CO<sub>2</sub>-Begasung angezogen. Auf Magnetrührern, die sich im Dauerbetrieb nicht überhitzten, wurde so für die Durchwirbelung der Kultur gesorgt. Für die Lagerung der Kulturen wurden sie dem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt. Zur Anzucht von *Anabaena* wurde A+A1/4-Medium verwendet.

#### 5.3.5.1 Induktion von Heterozysten

Vor der Induktion von Heterozysten wuchsen *N. punctiforme* oder *Anabaena* in Medium mit gebundener Stickstoffquelle. Anschließend wurden die Kulturen mehrfach mit Medium ohne gebundenen Stickstoff gewaschen und im Lichtraum ohne gebundene Stickstoffquelle inkubiert. Nach ca. 24 h ist die Differenzierung der ersten Heterozysten abgeschlossen.

### 5.3.5.2 Induktion von Akineten

Die Differenzierung zu Akineten wird bei *N. punctiforme* durch Phosphatmangel ausgelöst. Eine auf Vollmedium gut gewachsene Kultur von *N. punctiforme* wurde durch mehrmaliges Waschen von Phosphat befreit und in phosphatfreiem Medium über 4 Wochen inkubiert, bis reife Akineten zu finden waren.

### 5.3.5.3 Induktion von Hormogonien

Durch Verdünnung (1:50) einer Vorkultur von *N. punctiforme* in frisches Medium kann die Differenzierung zu Hormogonien ausgelöst werden. Nach 16-24 h wurde die Kultur mikroskopisch auf Hormogonien untersucht und geerntet.

### 5.3.5.4 Konservierung von Cyanobakterien

Zellen einer exponentiell wachsenden Kultur wurden geerntet und in 1 mL des Mediums (mit 8 % v/v DMSO versetzt) resuspendiert. Die Kryokultur wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 5.3.6 Anzucht und Konservierung von *E. coli*

Grundsätzlich erfolgte die Anzucht von *E. coli* in LB-Medium bei 37°C ohne Licht. Der Gasaustausch wurde durch Schütteln mit bis zu 140 rpm auf einem Horizontalschüttler ermöglicht.

#### 5.3.6.1 Konservierung von *E. coli*

Zur Konservierung von *E. coli*-Stämmen wurde 1 mL einer ÜN-Kultur mit 0,5 mL sterilem 98 %igem Glycerin gemischt und bei -80°C gelagert.

### 5.4 Molekularbiologische Methoden

#### 5.4.1 Isolierung der DNA aus *N. punctiforme*

Zur Gewinnung der gesamt-DNA wurden 50 mL einer Kultur in spätlogarithmischen Wachstumsphase geerntet und mit TE-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 400  $\mu$ L TE-Puffer aufgenommen und in ein Schraubgefäß überführt. Nach der Zugabe von 20  $\mu$ L 10 % (w/v) SDS und 450  $\mu$ L eines Gemisches aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis von 25:24:1 wurde der Ansatz in der FastPrep in drei Durchgängen á 30 s auf höchster Stufe homogenisiert. Durch Zentrifugation (15.000 x g, 5 min, 4°C) wurde Zelldebris von dem Überstand getrennt. Der Überstand wurde nochmal mit Chloroform, Phenol und Isoamylalkohol versetzt und zentrifugiert (15.000 x g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die genomische DNA mit 400  $\mu$ L Chloroform versetzt. In der Schwerphase (Chloroform, unten) waren Proteine gelöst, während sich die DNA in der Leichtphase (wässrige Phase, oben) befand. Für eine höhere Reinheit der DNA wurde die Leichtphase abgenommen und wieder mit Chloroform versetzt. Anschließend wurde die DNA mit 40  $\mu$ L 3 M Natriumacetat und 800  $\mu$ L 100 % EtOH bei -20°C für min. 30 min gefällt. Die DNA wurde sedimentiert (15.000 x g, 10 min, 4°C) und mit 70 % EtOH gewaschen. Nach der Trocknung wurde die DNA in 40  $\mu$ L TE-Puffer aufgenommen und verwendet oder bei -20°C gelagert.

**Tabelle 12: TE-Puffer**

Tris/HCl (pH 8)	10	mM
EDTA	1	mM

#### 5.4.2 Plasmidisolation aus *E. coli*

##### 5.4.2.1 Mini-Prep

Für die Plasmidisolation aus *E. coli* wurden Kits von PeqLab verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Abweichend von diesen Angaben wurde die Elution mit TE-Puffer (Tabelle 12) oder Wasser vorgenommen.

### 5.4.2.2 Midi-Prep

Besonders für die Transformation von *N. punctiforme* (5.4.12) wurden hohe Konzentrationen reiner Plasmid-DNA benötigt, deswegen erfolgte hier die detaillierte Beschreibung zur Isolation größerer Plasmidmengen. Die Puffer waren Bestandteil des Kits (Peqlab).

Für die Midi-Prep wurden *E. coli*-ÜN-Kulturen von 500 mL geerntet (2x 6000 rpm Ja-10 Rotor 10 min), beim zweiten Zentrifugationsschritt wurde etwas Überstand (ca. 30 mL) zurückbehalten und die Zellen resuspendiert und in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand entfernt. Die Zellen konnten so bei -20°C gelagert werden. Für den Zellaufschluss und die Entfernung der RNA wurden die Zellen in 12 mL Puffer 1 (RES) durch Vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 12 mL Puffer 2 (LYS) wurden die Zellen durch Invertieren schonend aufgeschlossen, um Scherung der chromosomalen DNA, welche später die Säule kontaminieren könnte, zu vermeiden. Parallel zu dem nächsten Schritt wurden Säule und Filter mit 12 mL Puffer 4 (EQU) equilibriert. Das Zellysate wurde mit 12 mL Puffer 3 (NEU) neutralisiert und so lange sanft invertiert, bis die Blaufärbung durch Puffer 2 (LYS) komplett aufgehoben war (dies konnte etwas Zeit in Anspruch nehmen, da sich in dem schleimigen Niederschlag oft noch Blaufärbung verbarg). Das neutralisierte Lysat wurde durch Zentrifugation (5000 rpm, 10 min) von dem Zelldebris getrennt und auf die filterbesetzte Säule gegeben. Durch den zusätzlichen Zentrifugationsschritt verstopfte der Filter der Säule nicht.

Nachdem das Lysat die Säule passiert hatte, wurde der Filter mit min. 5 ml Puffer 4 (EQU) gewaschen, sodass auch die restliche DNA die Säule passieren konnte. Der Filter wurde entfernt und die Säule mit 12 mL Puffer 5 (WASH) gewaschen. Währenddessen wurden in 15 ml Reaktionsgefäßen 3,5 mL Isopropanol vorgelegt, diese dienen zum Auffangen des Eluats. Für die Elution wurden 5 mL Puffer 5 (ELU) verwendet. Die DNA war als weißer Niederschlag erkennbar. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde das Eluat-Isopropanolgemisch bei -20°C eingefroren und vorher gut durch Invertieren gemischt. Nach dem anschließenden Auftauen war sehr viel mehr Präzipitat erkennbar. Das vorhandene Volumen wurde in je 2 mL Reaktionsgefäßen aliquotiert und für 30 min bei 15.000 xg bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und durch je 2 mL 70 % Ethanol ersetzt. Nach Zentrifugation bei RT mit 15.000 xg für 5 min wurde der Überstand vorsichtig entfernt. Die Pellets wurden bei RT getrocknet und anschließend mit 200 µL TE-Puffer (Tabelle 12) resuspendiert (Schüttler: 30°C und 400 rpm). Alle Aliquots einer MIDI-Prep wurden vereint.

Die DNA-Konzentration wurde auf einem Gel (2,5 µL GeneRuler, 0,5 µL DNA) überprüft und/oder photometrisch bestimmt.

Soll eine MIDI-Säule für dasselbe Plasmid mehr als einmal verwendet werden, so wurde sie mit den Puffern in umgekehrter Reihenfolge gewaschen/equilibriert, bevor ein zweites Lysat auf die Säule geladen werden konnte. Dem Laden der Säule ohne Filter sollte eventuell ein zweiter Zentrifugationsschritt des Lysats vorangehen, damit die Säule nicht verstopft.

### 5.4.3 Zelldichtebestimmungen

#### 5.4.3.1 Zelldichtebestimmung von *E. coli*

Die optische Zelldichte (OD) von *E. coli* wurde bei 600 nm im Spektralphotometer (Specord 205, Analytik Jena) gemessen. Das verwendete Medium diente als Referenz.

#### 5.4.3.2 Chlorophyll *a* Bestimmung bei *N. punctiforme*

(Mackinney, 1941)

Zur Bestimmung der Chlorophyll-Konzentration wurde 1 mL einer Kultur geerntet und der Überstand entfernt. Die Zellen wurden mit 1 mL Methanol resuspendiert und für 30 min dunkel auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (20.817 xg 1 min RT) wurde der Überstand gegen Methanol bei 665 nm gemessen. Bei *N. punctiforme* wurde der Mittelwert aus Fünffachmessungen verwendet. Basierend auf einem Extinktionskoeffizienten von  $78.74 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  wurde der Mittelwert von  $A_{665 \text{ nm}}$  mit dem Faktor 12,7 multipliziert, um die Chlorophyll-*a* Konzentration in  $\mu\text{g/mL}$  zu erhalten (Meeks *Lab Homepage*).

### 5.4.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zwei verschiedene Polymerasen kamen bei der gezielten Amplifikation von DNA-Fragmenten zum Einsatz: Die Q5-*high fidelity*-Polymerase (BioLabs) wurde für Amplikate eingesetzt, die zur Klonierung dienen. Der RedTaq-Mastermix (Genaxxon) wurde genutzt, um *Insert*-Längen nach erfolgter Klonierung zu überprüfen.

Es wurde nach Herstellerangaben verfahren. Zu beachten war die Beschaffenheit der Matrize, die Geschwindigkeit der Polymerasen (in der Phase der Elongation) und die verwendeten Oligonukleotide. Bei Kolonie-PCRs wurde die initiale Denaturierungsphase auf 10 min erhöht. Falls lange Oligonukleotide, wie sie zur Herstellung von Gibson-Inserts üblich sind, verwendet wurden, wurde lediglich die Schmelztemperatur des Abschnittes, der an die Matrize bindet, berücksichtigt. Die PCR-Reaktionen wurden in 0,2 mL PCR-Reaktionsgefäßen im Labcycler (SensoQuest, Göttingen) mit bis zu 35 Zyklen durchgeführt.

### 5.4.5 Agarosegelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde die DNA mit 6x DNA- Probenpuffer versetzt und auf Agarosegele (0,7-2 % Agarose in 1x TAE- Puffer; Midori Green, Advanced DNA Stain Nippon Genetics Europe GmbH 1:10.000) aufgetragen. Die Fragmente wurden bei 70-130 V für 60-20 min in horizontalen Gelkammern aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der 1 kb GeneRuler™ (Thermo Fischer Scientific) verwendet. Die Dokumentation erfolgte an der GelDoc mit einer Einstellung von ISO 800 und einer Belichtungszeit von 500 ms.

**Tabelle 13: 6x DNA-Probenpuffer**

Bromphenolblau	25	mg
Glycerol	3	mL
	ad 10 mL H <sub>2</sub> O	

**Tabelle 14: TAE-Puffer**

Tris	50	mM
EDTA	1	mM
	Mit HAc auf pH 8 einstellen	

### 5.4.6 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Durch Messung der Extinktion bei 260 nm wurde die Konzentration von DNA-Lösungen bestimmt. Die Extinktion von 1 entspricht einer Konzentration von 50 ng/μl doppelsträngiger DNA. Bei Verwendung der Mikroliter-Messzelle im Specord (Software: WinASPECT) wurden 3 μL DNA-Lösung eingesetzt. Durch zusätzliche Messung der Extinktion bei 280 nm wurde die Reinheit der isolierten DNA bestimmt. Der Quotient beider Extinktionen beträgt für reine DNA 1,8.

### 5.4.7 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionshydrolyse von DNA wurde präparativ zur Herstellung passender Fragmente für Ligationen verwendet oder zur Überprüfung von Klonierungen. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die Enzyme wurden von Fermentas oder NEB Biolabs bezogen. Bei präparativen Ansätzen wurde mit größeren DNA-Mengen gearbeitet. Diese wurden anschließend auf ein Agarose-Gel aufgetragen und die ausgeschnittene Bande mittels „NucleoSpin ExtractII Kit“ (Macherey & Nagel) gereinigt.

### 5.4.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Für Ligationen wurde die T4-Ligase (Fermentas) genutzt und nach Herstellerangaben verfahren. Mittels Restriktionshydrolyse wurden Vektor und Insert zuvor mit kompatiblen Enden versehen. Abweichend von einer molaren Ratio von 1:3 in Bezug auf Vektor und Insert wurden Ligationsansätze auch mit einem Verhältnis von 1:6 hergestellt.

### 5.4.9 Gibson-Assembly

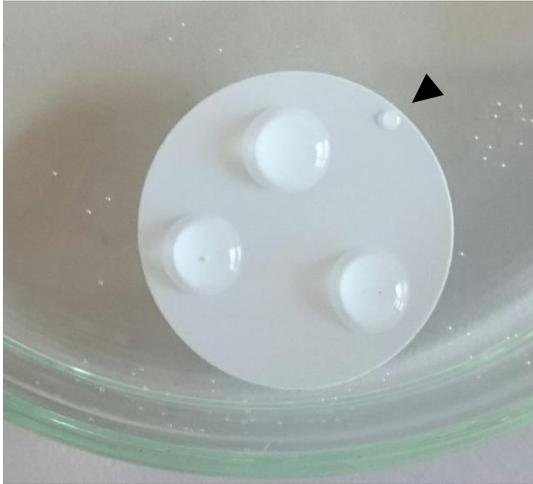
Die Gibson-Assembly (Gibson et al., 2009) ist eine Vereinfachung der klassischen Klonierung mittels Restriktionshydrolyse und Ligation. Außerdem können mehrere *Inserts* ohne den Einsatz vieler unterschiedlicher Restriktionsendonukleasen in einen Vektor eingebracht werden. Durch die Verwendung entsprechender Oligonukleotide während der Amplifikation des gewünschten Gens mittels PCR entsteht ein Produkt mit überlappenden Sequenzen zum Vektor oder anderen *Inserts*. Der Bereich der Überschneidung beträgt in der Summe immer min. 40 bp in der Länge. Diese Überlappungen sorgen automatisch für die richtige Reihenfolge der *Inserts* und deren Ausrichtung im Gibson-Assembly. Vektor und *Insert(s)* wurden in einem äquimolaren Verhältnis in einem Gesamtvolumen von 5  $\mu\text{L}$  verwendet und zu 15  $\mu\text{L}$  Gibson-Mastermix gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 50°C für 1 h. Zur Entfernung von Salzen und Enzymen wurde der Gibson-Ansatz gefällt und vor der Transformation mikrodialysiert.

**Tabelle 15: Gibson-Mastermix**

ISO-Puffer	320	$\mu\text{L}$
T5-Exonuklease (10 U/7 $\mu\text{L}$ )	0,64	$\mu\text{L}$
Phusion DNA-Polymerase (2 U/ $\mu\text{L}$ )	20	$\mu\text{L}$
Taq DNA-Ligase (40 U/ $\mu\text{L}$ )	160	$\mu\text{L}$
	ad 1,2 mL H <sub>2</sub> O	
	Aliquots á 15 $\mu\text{L}$	

### 5.4.10 Mikrodialyse von DNA

Zur Entsalzung von DNA-Lösungen (Ligationsansätze, Plasmidisolate oder gefällte Gibson Ansätze) für die Elektroporation wurde über eine Dialysemembran (Millipore, Porengröße: 0,025  $\mu\text{m}$ ) für 20 min gegen Wasser bei RT dialysiert. Der pH-Wert des Wassers wurde vor der Dialyse überprüft. Wichtig ist die Verwendung einer Petri-Schale aus Glas, da diese sich nicht elektrostatisch aufladen kann und der Filter nicht sinkt.



**Abbildung 7: Mikrodialyse von DNA-Lösungen.** Auf einen Filter passen bis zu neun verschiedene Proben. Ein kleiner Wassertropfen am Rand des Filters (schwarze Pfeilspitze) dient der Orientierung.

### 5.4.11 Transformation von *E. coli*

#### 5.4.11.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Ein halber Liter LB-Medium wurde 0,5% ig beimpft und bei 37°C schüttelnd inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5-0,7 erreicht wurde. Die Zellen wurden für 10 min im Eiswasserbad gekühlt und anschließend sedimentiert (Ja-10, 2500 rpm, 4°C, 20 min). Die Zellen wurden mindestens zweimal in 500 mL eiskaltem, destilliertem und sterilem Wasser gewaschen. Danach wurden die Zellen in 40 mL kaltem und sterilem 10%igem Glycerin aufgenommen und sedimentiert (4000 rpm, 4°C, 10 min). Das Zellpellet wurde in 500 µL 15%igem Glycerin aufgenommen und zu Portionen von je 50 µL bei -80°C gelagert.

#### 5.4.11.2 Transformation

Die Transformation von *E. coli* erfolgte über Elektroporation. Dazu wurden 50 µL kompetente Zellen mit DNA versetzt und für ca. 1 min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gefüllt. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ohm. Anschließend wurden die Zellen in 1 mL vorgewärmten LB-Medium ohne Antibiotika für 45 min bei 37°C inkubiert. Bei Transformation von Gibson-Ansätzen wurde das Gesamtvolumen auf eine entsprechende Selektionsagarplatte ausgebracht. Bei Transformation von Ligationsansätzen oder Plasmiden wurden 100 µL auf eine Selektionsagarplatte ausgebracht, der Rest wurde zentrifugiert und mit wenig Überstand eine Selektionsagarplatte beschickt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C ÜN. Am Folgetag wurde die Transformation ausgewertet.

### 5.4.12 Transformation von *N. punctiforme*

In *N. punctiforme* werden selbstreplizierende Plasmide durch Elektroporation eingebracht (Summers et al., 1995). Dazu wurden gut gewachsene Kulturen (bis zu 2 L) auf 20 mL konzentriert und unter Eiskühlung mittels Branson Sonifier (ca. 10 Impulse, DutyCycle 50 %; OutputControl 5) behandelt. Die Filamente wurden danach im Mikroskop auf ihre Filamentlänge überprüft. Die Filamente sollten eine durchschnittliche Länge von 5 Zellen besitzen. Danach wurden die Zellen in A+A1/4- Medium mit NH<sub>4</sub>Cl für min. 4 h bis ÜN regeneriert.

Für die Elektroporation wurden die Zellen mehrfach (min. 4x) mit Wasser gewaschen und auf eine Konzentration von 75-100 µg/mL Chlorophyll *a* eingestellt. Zu 400 µL Zellen wurden 10 µg Plasmid-DNA gegeben und in einer Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand (Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei 1,6 kV, 25 µF und 600 Ω elektroporiert. Danach wurden die Zellen in 2 mL A+A/4 Medium mit 2,5 mM NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM MOPS und 20 mM MgCl<sub>2</sub> ÜN bei wenig Licht regeneriert. Am Folgetag wurden Selektionsagarplatten mit HAFT-Filtern belegt und diese mit den Zellen beschickt. Die Filter mit den Zellen wurden wöchentlich auf neue Selektionsagarplatten transferiert. Nach ca. 4 Wochen waren Kolonien zu erkennen.

### 5.4.13 Triparentale Konjugation

#### 5.4.13.1 Triparentale Konjugation von *N. punctiforme*

(Meeks *Lab Homepage*)

Zur Anzucht wurden 4x ein Liter BG11 (8 mM HEPES, 4 mM NH<sub>4</sub>Cl) mit *N. punctiforme* beimpft und für ca. sechs Wochen schwenkend inkubiert, bis die Kulturen in der spätlogarithmischen Wachstumsphase waren und ein sattes und dunkles Grün aufwiesen. Die Zellen wurden geerntet (6000 rpm, 10 min, RT, Rotor: Ja-10). In einem 50 mL Reaktionsgefäß wurde das Zellkonzentrat sonifiziert (Branson Sonifier 250 DutyCycle 50 %; OutputControl 5; ca. 20 Impulse), bis die durchschnittliche Filamentlänge 5-7 Zellen betrug. Daneben waren nur noch Akineten in der Kultur vertreten. Das Zellkonzentrat wurde auf zwei Liter Medium (A+A/4 + 5 mM KNO<sub>3</sub>+5 mM MOPS + 2,5 mM NH<sub>4</sub>Cl) aufgeteilt und für 24 h regeneriert.

Währenddessen wurden in Schikanekölbchen 50 mL LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika die zur Konjugation benötigten *E. coli* Stämme DH5α, mit entsprechendem Konjugationsvektor (*hier*: pIM647, pIM648, pIM649 und pIM651), und HB101 (pRK2013 + pRL528) von ÜN-Kulturen beimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,7 gezogen. Bevor die *E. coli*-Stämme vereinigt wurden, wurden sie dreimal mit frischem LB-Medium gewaschen,

um Antibiotika zu entfernen. Die Resuspension erfolgte so schonend wie möglich, da sonst die F-Pili des *E. coli* HB101 abgebrochen wären. Es wurde je eine OD<sub>600</sub> von 10 eingestellt und die Stämme im Verhältnis 1:1 gemischt.

Die Chlorophyll-*a*-Konzentration der regenerierten *Nostoc*-Kulturen wurde durch Fünffachbestimmung ermittelt. Die Kultur bestand nun aus kurzen Filamenten und keimenden Akineten. Um eine Konzentration von 100 µg Chl<sub>a</sub>/mL zu erhalten, wurden die Kulturen vereint konzentriert. Ein Volumen von 30 mL reichte für 60 Konjugationsansätze. Bei vier unterschiedlichen Konjugationen ergab dies 15 Ansätze pro Konjugation. Dazu wurden 7,5 mL der jeweiligen *E. coli*-Mischung mit 7,5 mL *N. punctiforme*-Suspension vereint, durch Invertieren gemischt und bei RT dunkel gelagert, während eine entsprechende Anzahl an A+A1/4 + 5 mM KNO<sub>3</sub> + 5 mM MOPS + 2,5 mM NH<sub>4</sub>Cl + 0,5 % LB Agar-Platten mit Filtern (Immobilion® Transfer Membranes: HAFT-Filter, Porengröße: 0,45 µm; Durchmesser: 82 mm) belegt wurden. Je 1 mL der Konjugationsansätze wurde mittels Glasperlen auf einem Filter verteilt. Optional konnte die Flüssigkeit zuvor durch Zentrifugation (1000 xg, 30 s, RT) reduziert werden. Auf den Filtern wurden die Zellen für 24 h bei Schwachlicht (Mit 1-2 Küchentüchern abgedeckt) und 28°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Filter auf A+A + 5 mM KNO<sub>3</sub> + 5 mM MOPS + 2,5 mM NH<sub>4</sub>Cl (ohne Antibiotika) übertragen und zwei weitere Tage bei Schwachlicht inkubiert. Darauf folgten zwei Tage bei gesteigerter Lichtintensität. Generell sollte die Lichtintensität nicht zu hoch gewählt werden, da nicht bekannt ist, wie die angestrebten Mutanten darauf reagieren. Anschließend wurden die Filter auf Platten (A+A + 5 mM NO<sub>3</sub> + 5 mM MOPS + 2,5 mM NH<sub>4</sub>Cl) übertragen, die mit entsprechendem Antibiotikum versetzt waren. Anfangs wurde eine Konzentration von 40 µg/mL Neomycin gewählt und später auf 50 µg/mL gesteigert.

### 5.4.13.2 Triparentale Konjugation von *Anabaena* sp. PCC7120

(Wolk et al., 1984)

Zunächst musste das zu konjugierende Plasmid in den *E. coli* Stamm HB101 (pRL528) gebracht werden. Das konjugative Plasmid (RP4) ist in *E. coli* J53 enthalten. Aus ÜN-Kulturen wurden je 30 mL LB beimpft und für 3 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit antibiotikafreiem LB-Medium gewaschen, auf ca. 500 µL konzentriert und vereinigt. Während der einstündigen Inkubation der *E. coli*-Zellen (30°C, dunkel, ohne Schütteln) wurde eine auf mit Nitrat supplementiertem Medium gewachsene Kultur von *Anabaena* geerntet. Dabei wurden 10 mL auf 200 µL konzentriert. Aus diesem Konzentrat wurden 1:10 und 1:100 Verdünnungen hergestellt. Von den drei unterschiedlich konzentrierten *Anabaena*-Suspensionen wurden je

100  $\mu\text{L}$  mit 200  $\mu\text{L}$  der *E. coli*-Mischung vereint und auf HAFT-Filter belegte und mit Nitrat supplementierte A+A-Agarplatten ausgebracht. Die Inkubation ÜN erfolgte bei wenig Licht. Am nächsten Tag wurden die Filter auf Selektionsagarplatten transferiert. Nach etwa zwei Wochen waren Kolonien zu erkennen.

### 5.4.14 Herstellung von GFP-Konstrukten

#### 5.4.14.1 Herstellung von GFP-Konstrukten zur Untersuchung von Signalsequenzen

Als Vektorrückgrat diente pRL1049. Die DNA-Abschnitte, welche für die verschiedenen Signalsequenzen codieren und das Fragment, welches das Gen von *sfGFP* enthält, wurden mittels *Gibson-Assembly* in den Vektor eingebracht. Die Signalsequenzen wurden entweder über Gibson-Oligonukleotide an die Sequenz von *sfgfp* angefügt oder als Gibson-Fragment bestellt (IDT DNA Technologies).

#### 5.4.14.2 Trunkierte AmiC2-Versionen

Als Matrize für diese Klonierungen wurde pIM469 verwendet. Dieser Vektor kodiert für das Volllängen-AmiC2 (*AmiC2<sub>ABMC</sub>*), C-terminal fusioniert mit GFP unter der Kontrolle des *AmiC1*-Promotors. Damit GFP im gefalteten Zustand in das Periplasma transportiert wird, wurde die Sec-Signalsequenz durch das Tat-Signal von *Npun\_R2356* ersetzt (Berendt, 2011b). Mittels Gibson-Oligonukleotiden wurden *Inserts* generiert, bei denen *AmiC2* um eine oder mehrere Domänen verkürzt wurde. Diese *Inserts* wurden in das Rückgrat von pSCR202 kloniert, sodass die entstandenen Vektoren für trunkierte *AmiC2*-Versionen kodieren, die ebenfalls unter der Kontrolle des *AmiC1*-Promotors stehen und durch dieselbe Tat-Sequenz wie bei pIM469 in das Periplasma transportiert werden. Somit ist die höchste Vergleichbarkeit zu der Lokalisation von *AmiC2* in *N. punctiforme* mittels pIM469 gegeben.

#### 5.4.14.3 *sfGFP*-Reporterkonstrukte

Für die Lokalisation putativer Interaktionspartner (*NpF5024*, *SlpB*, *SlpD*, *GerM*) von *AmiC2* wurde die Gibson-Klonierung verwendet. Zunächst wurden die nativen Promotorregionen der Gene identifiziert. Es wurde ein Insert generiert, das für *sfGFP* inklusive Stopp-Codon nach *sfgfp*, kodiert und am 3'-Ende einen ca. 40 bp langen Überhang zum Vektor besitzt. Dieses

Insert besitzt am 5'-Ende keine Überhänge zu sequenzspezifischen Abschnitten und konnte deswegen für alle Gibson-Klonierungen eingesetzt werden.

Das zweite, jeweils gen- und promotorspezifische Insert besaß am 5'-Ende den Überhang zum Vektor und am 3'-Ende den Überhang zur Sequenz von *sfgfp*, jedoch ohne das Stopp-Codon des jeweiligen Gens.

### 5.4.15 Herstellung von Konstrukten zur heterologen Expression und Reinigung

#### 5.4.15.1 GST-Tag Proteine

Die Expressionsvektoren, welche auf dem Vektor pGEX-4T-3 basieren, wurden mittels klassischer Klonierung hergestellt. Dazu wurde der Vektor mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI geschnitten. Die Oligonukleotide, welche zur Amplifikation der *Inserts* dienten, fügten diese Schnittstellen an die *Inserts* an. Geschnittene und gereinigte DNA-Fragmente wurden in die Ligationsreaktion im Verhältnis 1:3 und 1:6 (Vektor: *Insert*) eingesetzt.

Die Expressionsvektoren, die auf dem Vektor pGEX-6P-1 basieren, wurden mittels Gibson-*Assembly* hergestellt. Dazu wurde der Vektor an der MCS linearisiert und durch Überhänge der *Inserts* im Gibson-*Assembly* (5.4.9) neu zusammengefügt.

#### 5.4.15.2 His-Tag Proteine

Als Vektorrückgrat wurde pET15b verwendet und enzymatisch an der MCS aufgeschnitten. Über Gibson-Oligonukleotide wurde der His-Tag C- oder N-terminal an das entsprechende Gen angefügt. Bei C-terminaler Fusion musste das Stopp-Codon durch die Oligonukleotide hinter die Sequenz, die für den His-Tag codiert, verschoben werden.

### 5.4.16 Herstellung von Konstrukten für *KO*-Mutanten

Für die Deletionsmutanten der putativen Interaktionspartner wurden gute Oligonukleotid-Bindestellen oberhalb der nativen Promotorregionen der Gene und unterhalb des Stopp-Codons der Gene mittels CloneManager ausfindig gemacht. Diese Positionen wurden als Ausgangspunkt zur Amplifikation 500 bp langen genomischen Sequenzen genutzt, die über die Gibson-Oligonukleotide zusätzlich Überhänge zum Vektorrückgrat (pRL271) und der Resistenzkassette C.K3t4 besaßen. So musste für die verschiedenen Gibson-Reaktionen das *Insert*, welches für die C.K3t4-Kassette codiert, nur einmal hergestellt werden. Die entstandenen Plasmide

pIM647, pIM648, pIM649 und pIM651 besitzen die Resistenzkassette, flankiert von je 500 bp genomischer DNA zur doppelten Rekombination.

Da *E. coli* die C.K3t4-Kassette erkennt, konnte nach der Transformation der Gibson-Ansätze direkt mit Kanamycin auf den korrekten Zusammenbau der Plasmide selektiert werden.

Nach der triparentalen Konjugation (5.4.13.1) und doppelter Rekombination der Plasmide in das Genom von *N. punctiforme* wurden die jeweiligen Gene (Npun\_F5024, Npun\_R1578, Npun\_R4778 und Npun\_F0437) nahezu vollständig durch die Neomycin-Resistenzkassette (C.K3t4) ersetzt.

### 5.4.17 Mureinpräparationen

Sämtliche Lösungen, die zur Präparation von Peptidoglykan für elektronenmikroskopische Zwecke verwendet wurden, wurden zuvor durch Filtration (0,45 µm Porendurchmesser) von Partikeln befreit. Die Mureinpräparationen basieren auf dem Prinzip von de Pedro et al., 1997).

#### 5.4.17.1 Isolation von Peptidoglykan aus *N. punctiforme*

Zur Isolation des Peptidoglykans wurden Zellen geerntet und in PBS-Puffer resuspendiert. Die Filamentlänge wurde durch Ultraschall (Branson Sonifier 250) oder in der FastPrep (3x 20 s bei 6,5 m/s) auf durchschnittlich 5-7 Zellen pro Filament verkürzt.

In einem Wasserbad auf einem Magnetheizrührer wurde 6 % SDS erhitzt und die Zellsuspension tropfenweise zugefügt. Die mit SDS versetzten Zellen wurden für 4 h unter ständigem Rühren gekocht. Über Nacht wurde die Zellsuspension bei 37°C geschüttelt und am Folgetag nochmal für 3 h unter ständigem Rühren gekocht. Nach Abkühlung auf RT wurde zentrifugiert (60.000 rpm, 45 min, 40°C) und die Zellwände in Wasser resuspendiert. Zur Entfernung des SDS wurde das Peptidoglykan entweder wiederholt mit Wasser gewaschen oder dialysiert (5.4.17.3). Anschließend wurde das Peptidoglykan in Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 6,8) resuspendiert und mit Chymotrypsin (200 µg/mL), einer Spatelspitze DNase und RNase bei 37°C ÜN schüttelnd behandelt.

Zur Entfernung der Proteine wurde das Peptidoglykan in das gleiche Volumen 6 %iges SDS gegeben und für 3 h unter ständigem Rühren im Wasserbad gekocht. Das SDS wurde durch Zentrifugation und Resuspension in Wasser oder durch Dialyse entfernt.

Es stellte sich heraus, dass geringe Mengen SDS zur Haftung des Peptidoglykans an die Grids für die Elektronenmikroskopie vorteilhaft waren. Sollte vornehmlich septales Peptidoglykan untersucht werden, wurden die Filamente anfangs stärker verkürzt oder Ultraschall (Branson

Sonifier) zur Resuspension des Peptidoglykans genutzt. Es wurde zum Kochen mit SDS immer dasselbe Volumen an SDS-Lösung eingesetzt wie das Volumen der Zellen oder des Peptidoglykans. Dieses richtete sich nach der gewählten Menge. Je größer die Menge an Zellen zu Anfang gewählt wurde, desto länger dauerte die Entfernung des SDS, da das Detergenz besser im Pellet haftete.

**Tabelle 16: PBS-Puffer.**

NaCl	140	mM
KCl	2,5	mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10	mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	mM
Mit HCl auf pH 7,4 einstellen		

### 5.4.17.2 Isolation von Peptidoglykan aus *E. coli* als Substrat für Dye-Release-Assays

Zur Gewinnung des Substrates der Dye-Release-Assays wurde Zellwand von *E. coli* MG1655 verwendet. Dazu wurden zwei Liter ÜN-Kultur (LB-Medium) geerntet und die Zellen in Wasser resuspendiert, sodass eine Konzentration von ca. 0,2 g/mL entstand. Die Resuspension wurde tropfenweise zu dem gleichen Volumen kochendem 8%igem SDS gegeben und unter starkem Rühren mindestens 30 min im Wasserbad gekocht. Danach wurde die Probe auf RT abgekühlt und sedimentiert (36.000 rpm, 45TI Rotor, 25°C, 30 min). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Wasser resuspendiert. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis im Überstand kein SDS mehr nachweisbar war. Der Nachweis von SDS erfolgte nach der Methode von Hayashi (Hayashi, 1975).

Alternativ konnte die Entfernung des SDS auch über Dialyse erreicht werden (5.4.17.3). Nach einem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellfragmente mit ca. 5 mL Puffer 2 resuspendiert und das Peptidoglykan mit 100 µg/mL  $\alpha$ -Amylase sowie mit einer Spatelspitze DNase und RNase versetzt. Die  $\alpha$ -Amylase wurde für zwei Stunden bei 37°C mit dem Peptidoglykan inkubiert. Danach wurde die Lösung mit Pronase versetzt (200 µg/mL), die für zwei Stunden bei 60°C vorbehandelt wurde, und für 90 min bei 60°C inkubiert. Dadurch wurde das Peptidoglykan von DNA, RNA, kovalent gebundenen Zuckern und Proteinen befreit. Um die dafür eingesetzten Enzyme vom Peptidoglykan zu trennen, wurde die Resuspension nochmals zu demselben Volumen kochenden 8%igem SDS getropft und für mindestens 15 min unter starkem Rühren gekocht. Das SDS wurde anschließend durch Zentrifugation und Resuspension in Wasser oder Dialyse, wie bereits beschrieben, entfernt.

**Tabelle 17: Puffer 1 für die Reinigung von Peptidoglykan aus *E. coli*.**

TrisHCl pH 7	10	mM
NaCl	10	mM

**Tabelle 18: Puffer 2 für die Reinigung von Peptidoglykan aus *E. coli*.**

TrisHCl pH 7	10	mM
NaCl	10	mM
Imidazol	320	mM

**Tabelle 19: Stammlösungen der Enzyme für die Reinigung von Peptidoglykan aus *E. coli*.**

PronaseE	10	mg/mL
In Puffer 1 lösen und in Portionen á 150µL bei -20°C lagern		
α-Amylase	6,7	mg/mL
In Puffer 1 lösen und in Portionen á 100 µL bei -20°C lagern		

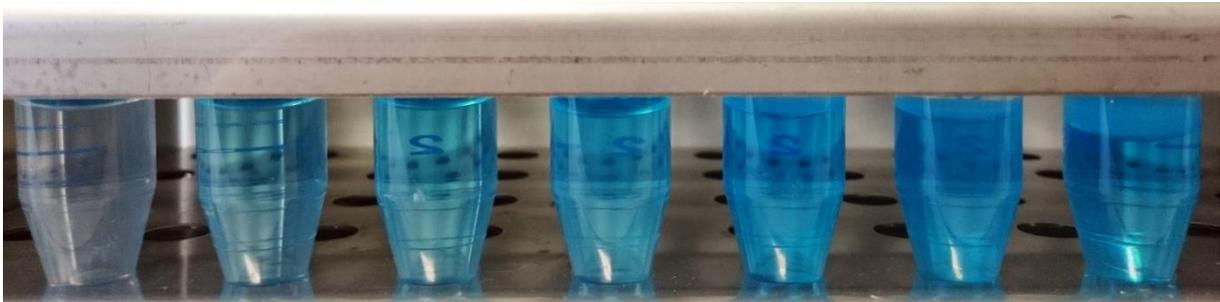
### 5.4.17.3 Durchflussdialyse zur Entfernung von SDS

Das in Wasser resuspendierte Peptidoglykan wurde in einen Dialyseschlauch gefüllt (ZelluTrans 25 mm, Roth), mit Clips verschlossen (Weland patented, *made in sweden*) und gegen Wasser (5 L) dialysiert. Bei RT ist das Equilibrium nach ca. 30 min eingestellt und das Wasser muss ersetzt werden. Eine Durchflussdialyse erleichterte diesen Schritt. Dazu wurde ein 5 L Eimer besorgt und oben mit einem Hahn versehen. An diesen wurde ein Schlauch für das Abwasser angeschlossen. Der Frischwasserzufluss wurde durch einen zweiten Schlauch bewerkstelligt. Der Eimer wurde auf einen Hocker über einen Magnetrührer platziert, damit die Hitze des Rührers, die unter Dauerbetrieb abgegeben wurde, den Eimer nicht angreift. Innen auf den Boden wurde eine Petrischale aus Glas gelegt, in der ein Magnetfisch ohne Abrieb am Eimerboden das Wasser umwälzt. Damit die Schläuche durch die Wasserbewegung nicht Richtung Magnetfisch gezogen und beschädigt wurden, wurde mehrfach dünn gefaltete Aluminiumfolie durch die Clips gezogen und am Rand des Eimers befestigt und die Geschwindigkeit des Magnetrührers angepasst. Mit langsamem Durchfluss wurde so für mehrere Tage dialysiert. Da bei der Probenentnahme aus dem Dialyseschlauch Material verloren geht, sollten sich Zentrifugation und Dialyse nicht ständig abwechseln.

### 5.4.17.4 SDS-Konzentrationsbestimmungen nach Hayashi (Hayashi, 1975)

Für die Reinigung des Peptidoglykans werden die Proben mit SDS gekocht, um Proteine und andere Zellbestandteile zu entfernen. Für nachfolgende Behandlungen mit Enzymen ist es wichtig, das SDS gründlich zu entfernen. Dies wurde entweder durch wiederholtes Zentrifugieren

und Resuspendieren in frischem Wasser bewerkstelligt oder durch Dialyse. Nach einem Zentrifugationsschritt kann der Überstand auf SDS-Gehalt analysiert werden. Dazu wurde ein Milliliter des Überstands in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt und nacheinander mit 5  $\mu\text{L}$  0.5%iger Methylenblaulösung und 495  $\mu\text{L}$  0,7 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2 versetzt. Nach Zugabe von 3 mL Chloroform wurde gut durchmischt (Vortexen auf höchster Stufe für 30 s) und die Phasentrennung abgewartet. Die Chloroformphase (unten) sollte farblos und klar sein, dann ist die Probe SDS-frei. Zur photometrischen Bestimmung kann die Absorption der Schwerphase bei 655 nm gegen Chloroform gemessen werden. Dabei sind Glasküvetten zu verwenden, da Chloroform Plastik angreift und schnell zu Trübungen führt.



**Abbildung 8: Hayashi-Assay mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen.** Nur bei geringen SDS-Konzentrationen ist die Schwerphase (Chloroform) nicht blau gefärbt. Gezeigt ist eine Reihe aufsteigender SDS-Konzentrationen von links nach rechts (Angaben in % (w/v): 0 /  $2 \cdot 10^{-3}$  /  $4 \cdot 10^{-3}$  /  $6 \cdot 10^{-3}$  /  $8 \cdot 10^{-3}$  /  $12 \cdot 10^{-3}$  /  $16 \cdot 10^{-3}$ ).

#### 5.4.17.5 Färbung von Peptidoglykan aus *E. coli* für Dye-Release-Assays

(Büttner et al., 2016)

Zur Koppelung des Farbstoffes Remazol Brilliantblau an das Peptidoglykan wurde 1 mL der Zellwandsuspension mit 500  $\mu\text{L}$  des Farbstoffes (1 % w/v) und 100  $\mu\text{L}$  (20 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 2.32 g  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  in 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ) versetzt. Das Peptidoglykan wurde anschließend für 30 min bei 50°C unter Schütteln inkubiert. Die Bewegung ist wichtig, da das Peptidoglykan sonst absinkt und die Färbung nicht gleichmäßig wird. Das Peptidoglykan wurde zentrifugiert. Es ist wichtig, dass hier das Peptidoglykan tief blau ist und der Überstand eine Blaufärbung aufweist. Wenn dies nicht der Fall ist, sollte die Färbung wiederholt werden.

Überschüssige Farbe wurde durch wiederholtes Waschen mit 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7) entfernt. Das gefärbte Peptidoglykan wurde in dem Waschpuffer bei 4°C gelagert.

### 5.5 Proteinbiochemische Methoden

#### 5.5.1 Heterologe Überexpression und Reinigung

Zur Überprüfung der Expression von pGEX-Plasmiden wurde nach Herstellerangaben von GE Healthcare verfahren. Gereinigte AmiC-Proteine wurden von Felix Büttner (IFIB Tübingen) zur Verfügung gestellt, mit denen die *in vitro*-Assays durchgeführt wurden. Dieselben Bedingungen wurden genutzt, um Protein für die Kristallisation zu gewinnen (Büttner et al., 2016)

#### 5.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Nach der Methode von Bradford wurden Proteinkonzentrationen bestimmt (Bradford, 1976). Dabei bindet der Coomassie Brilliantblau-Farbstoff an das Protein, die Änderung der Absorption kann bei 595 nm gemessen werden. Mit bekannten Proteinkonzentrationen wurde eine Eichgerade erstellt und die Proteinkonzentration der Probe ermittelt.

#### 5.5.3 Pulldown

Bei einem Pulldown können stabile Protein-Protein-Interaktionen aufgedeckt werden. An einer Matrix binden Antikörper, die gegen GFP gerichtet sind. Diese wurden für den Pulldown mit AmiC2GFP verwendet. Mit Waschschrritten werden ungebundene Proteine entfernt. Mögliche Interaktionspartner bleiben an AmiC2 haften und können nach der Elution analysiert werden. Die GFP-Trap magnetischen Agarosekügelchen (*GFP-Trap\_magnetic\_agarose\_beads*) wurden von der Firma Chromotek (Planegg-Martinsried) bezogen. Zur Identifikation von Interaktionspartnern von AmiC2 wurden je 50 mL von einer *N. punctiforme* WT- Kultur und *N. punctiforme* (pIM469) geerntet. Das Plasmid pIM469 codiert für AmiC2GFP, welches an die Antikörper bindet. Die Zellen wurden in Lysis-Puffer (Angaben vom Hersteller) resuspendiert und durch Sonifizierung (Branson Sonifier 250 DutyCycle 50 %; OutputControl 5; ca. 30 Impulse im Eisbad) aufgeschlossen. Durch kurze Zentrifugation wurde der Zelldebris von dem Überstand getrennt. Die magnetischen Agarosekügelchen wurden mit *dilution*-Puffer (Herstellerangaben) vorbereitet und mit den Zelllysaten beschickt. Anschließend wurden die Agarosekügelchen mit *wash*-Puffer (Herstellerangaben) mindestens dreimal gewaschen. Im Fluoreszenzmikroskop konnte überprüft werden, ob die Bindung des Antikörpers an den GFP-Tag erfolgt war.

Die Elution erfolgte durch Kochen der magnetischen Agarosekügelchen mit 2x SDS-Probenpuffer (Herstellerangaben) für 10 min bei 95°C. Anschließend wurden die Proben zur Analyse ins Proteom Center Tübingen gegeben.

### 5.5.4 Dye-Release-Assays zur *in vitro* Messung der PG-Hydrolaseaktivität von Proteinen (Büttner et al., 2016)

Die hydrolytische Aktivität von AmiC2 wurde in Dye-Release-Assays gemessen. Die gefärbte Zellwand wird den zu testenden Enzymen ausgesetzt. Bei der Hydrolyse von Peptidoglykan entstehen immer kleinere Fragmente. Diese kleineren Fragmente besitzen eine höhere Löslichkeit und bleiben nach Zentrifugation eher im Überstand.

Zu 50 µL der gefärbten Zellwand (in 50 mM Natriumphosphatpuffer) wurden 50 µL 0,16 µM Enzym in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl Puffer (pH 7,8) gegeben und sofort bei 28°C und unter Schütteln bei 300 rpm inkubiert. Die Reaktion wurde nach 30 min durch 100 µL 20 % (w/v) TCA gestoppt und der Ansatz bei 1.700x g für 10 min bei RT zentrifugiert. Von dem Überstand wurden vorsichtig 150 µL entnommen und zu 150 µL Wasser gegeben. Die Änderung der Absorption bei 595 nm, gemessen gegen einen Ansatz ohne Enzym, ist das Maß für die hydrolytische Aktivität.

### 5.5.5 SDS-PAGE

(Laemmli, 1970)

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufgrund ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Das SDS maskiert die natürlichen Ladungen der Proteine. In einem weitmaschigen Sammelgel werden die Proteine fokussiert und danach in einem engmaschigeren Trenngel aufgetrennt. Dadurch kommt eine bessere Bandenschärfe und eine höhere Trennleistung zustande. Es wurden 5%ige (w/v) Sammelgele und 12%ige (w/v) Trenngele verwendet.

### 5.5.6 Immunoblot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE, können Proteine nach dem Transfer auf eine Membran (PVDF) mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Dazu wurde die Membran in 100 % Ethanol aktiviert und wie das SDS-Gel und die Whatmann-Papiere in *Friendly-Towbin*-Puffer equilibriert (Villanueva, 2008). Der Proteintransfer fand bei 30 V für 30 min bei RT mittels *semidry*-Verfahren statt (Peqlab).

Nach Sättigung der verwendeten 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; Sigma-Aldrich, Deutschland) versetzt und mit dem *LumiLight* Detektionssystem (Roche Diagnostics, Mannheim) visualisiert.

**Tabelle 20: Friendly-Towbin-Puffer.**

TrisHCl pH 8,5	25	mM
Glycin	192	mM
2-Propanol	5	% (v/v)

### 5.5.7 Immunofluoreszenzmarkierung von AmiC1 und AmiC2 in *N. punctiforme*

Für die Immunfluoreszenzmarkierung wurden polyklonale Peptidantikörper gegen spezifische Regionen von AmiC1 und AmiC2 verwendet (Abbildung 10; Dr. J. Pineda Antikörper-Service, Berlin).

Exponentiell wachsende Kulturen von *N. punctiforme* wurden geerntet und mit PBS gewaschen (Tabelle 16). Die Filamente wurden mit 2 mL HistoChoice (Sigma-Aldrich) für 10 min bei RT und 30 min bei 4°C fixiert. Das Fixativ wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Filamente in 70 % Ethanol resuspendiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in GTE-Puffer (Tabelle 21) resuspendiert. Die Zugabe von 2 mg/mL Lysozym und Inkubation für 5 min bei RT führte zur erhöhten Durchlässigkeit der Zellwand. Je 200 µL der Zellsuspension wurde auf Polylysin-Objektträger (Thermo Scientific) verteilt. Die Objektträger wurden mit 2 % BSA in PBS geblockt und anschließend mit dem Primärantikörper inkubiert (Verdünnung 1:5). Die Inkubation erfolgte ÜN bei 4°C in einer Feuchtkammer. Dazu wurden die Objektträger in einer flachen Schale positioniert und feuchtes Zelltuch in die Schale gelegt. Mit einer Glasscheibe wurde die Schale abgedeckt.

Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen (min. 8x) und mit dem Sekundärantikörper beschickt (FITC-gekoppelter *anti-Rabbit* Antikörper, Sigma-Aldrich; Verdünnung 1:200 in 2 % BSA in PBS). Die Inkubation erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei wenig Licht durchgeführt. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen mit PBS (min. 8x) entfernt. Die Filamente wurden mit einem Tropfen Mounting Medium H1200 (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) bedeckt und mit einem Deckgläschen (24\*60 mm) und klarem Nagellack versiegelt. Bis zur Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop wurden die Objektträger in Aluminiumfolie umhüllt und bei 4°C gelagert.

Tabelle 21: GTE-Puffer.

Glucose	50	mM
TrisHCl pH	7,5	mM
EDTA	10	mM

## 5.6 Mikroskopie

### 5.6.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Ultradünnschnitte und Sacculipräparationen wurden am TEM-Philips Tecnai 10 bei 80 kHz mit einer Belichtungszeit von 1,5-2 s durch die Belichtung eines Mittelformatfilms aufgenommen. Mit einem Durchlichtscanner wurden die Negative digitalisiert.

#### 5.6.1.1 Kontrastierung von gereinigtem Peptidoglykan

Alle verwendeten Lösungen wurden vor der Verwendung durch Filtration (0,45 µm Porendurchmesser) von Partikeln befreit.

Die kohlebedampften und beglimmten (Edwards-Anlage) Kupfergrids (Maschenbreite: 200 µm) wurden mit der glänzenden Seite auf einen Tropfen Peptidoglykan-Suspension gelegt (ca. 20 µL) und für 1 min inkubiert. Die Waschschritte erfolgten durch kurzes, seriales Berühren von vier Wassertropfen. Mit einem Filtertuch wurde der Rand des Kupfergrids berührt, um überschüssiges Wasser zu entfernen. Die Kontrastierung erfolgte auf einem Tropfen 1%igem Uranylacetat. Überschüssiges Kontrastmittel wurde mit einem Filtertuch aufgenommen und das Kupfergrid an der Luft getrocknet.

#### 5.6.1.2 Probenvorbereitung und Ultradünnschnitte

Aus einer Kultur von *N. punctiforme* wurden 1,5-2 mL entnommen und mit Glutaraldehyd (Endkonzentration: 2,5 %) bei RT für 10 min fixiert. Das Fixativ wurde durch Waschen mit 5 mM HEPES (pH 8) entfernt. In einer zweiten Fixierung wurden die Zellen mit 2%iger Kaliumpermanganatlösung versetzt und ÜN bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Wasser gewaschen (8x) und in 2 % Sea Kem Agarose (FMC Bioproducts, USA) eingebettet. Die Agarblöckchen wurden auf eine Kantenlänge von 1-2 mm getrimmt. Die Entwässerung für die Harzeinbettung erfolgte schrittweise mit steigender Alkoholkonzentration. Die Blöckchen wurden zweimal für 10 min in EtOH-Lösungen von 70 %, 80 %, 90 %, 95 % gelegt und abschließend dreimal in 100 % EtOH. Für die vollständige Infiltration des Harzes wurde das Verhältnis von Propylenoxid zu Epon von 1:2 und 1:3 gesteigert. Die Inkubationszeiten betragen

jeweils 90 min bei RT. Die Einbettung erfolgte in Förmchen, in denen die Proben mit reinem Epon übergossen wurden. Im Trockenschrank wurden die Proben bei 40°C für 24 h und bei 60°C für 48 h ausgehärtet. Die Ultradünnschnitte (60 - 90 nm) wurden mit dem Leica EM UC6 angefertigt und auf Kupfergrids mit Pioloformfolie übertragen. Durch Inkubation der Grids für 17 min. in Uranylacetat (2 %), gefolgt von 5 min. in Bleicitrat (1 %), wurden die Proben kontrastiert. Nach beiden Kontrastierungsschritten wurden die Proben mit Wasser gewaschen.

### 5.6.2 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Die Licht- und Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem DM2500-Mikroskop und angeschlossener DFC420C-Farbkamera sowie mit dem DM5500-Mikroskop mit angeschlossener Monochromkamera (DFC360FX). Alle Geräte wurden von der Firma Leica bezogen. Für 3D-Rekonstruktionen wurden Z-Stapel von 40 Bildern im Abstand von 0,1 µm aufgenommen und über die *Deconvolutions-Software* das Streulicht herausgerechnet. Die entstandenen Bilder konnten um die eigene Achse rotiert werden.

### 5.6.3 Färbemethoden

#### 5.6.3.1 NEISSER-Färbung

(Pelczar, 1957)

Es wurde 1 mL Zellen einer *N. punctiforme* Kultur geerntet (13.000 xg, 1 min, RT) und mit 1 mL PBS (Tabelle 16) gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet mit 500 µL einer Mischung aus NEISSER I + II (zwei Volumina NEISSER I zu einem Volumen NEISSER II) resuspendiert und für mindestens 1 min inkubiert. Die Farbe wurde durch einen Waschschrift mit 1 mL H<sub>2</sub>O entfernt und die Zellen in 500 µL NEISSER III aufgenommen. Dieser Färbeschritt wurde für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert und danach die Farbe durch einmaliges Waschen mit 1 mL H<sub>2</sub>O entfernt. Die verbleibenden Zellen wurden in 200 µL H<sub>2</sub>O aufgenommen und ca. 15 µL für die Mikroskopie auf agarosebeschichteten Objektträgern verwendet. Die Polyphosphatgranula waren deutlich im Lichtmikroskop als dunkellila bis schwarz gefärbte Granula zu erkennen.

**Tabelle 22: NEISSER I**

Methylenblau	0,1	% (w/v)
EtOH	2,0	% (v/v)
HAc	5,0	% (v/v)

**Tabelle 23: NEISSER II**

Kristallviolett	0,33	% (w/v)
EtOH	3,33	% (v/v)

**Tabelle 24: NEISSER III**

Crysoidin	0,3	% (w/v)
-----------	-----	---------

### 5.6.3.2 Sakaguchi-Reaktion zum Nachweis von Cyanophycin

(Watzer et al., 2015)

Von einer *N. punctiforme*-Kultur werden ca. 50  $\mu\text{L}$  (ein paar grüne Krümel sollten zu sehen sein) zentrifugiert (3000  $\times g$ , 10 min, RT) und dreimal mit 500  $\mu\text{L}$  1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 500  $\mu\text{L}$  1x PBS mit 2,5 % (w/v) Glutaraldehyd für 30 min auf Eis fixiert. Durch einen Waschschriff bei 4°C mit 1x PBS wird das überschüssige Fixativ entfernt. Die Zellen wurden vorsichtig in 80  $\mu\text{L}$  5 M KOH (pH 14) gelöst, 10  $\mu\text{L}$  1 % (w/v) 2,4-Dichloro-1-naphthol (EtOH als Solvent) hinzugegeben und für 3 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit 10  $\mu\text{L}$  5 % (v/v) Natriumhypochlorid vorsichtig gemischt und zentrifugiert (3000  $\times g$ , 6 min, RT). Die Zellen wurden in 100  $\mu\text{L}$  PBS resuspendiert und ca. 15  $\mu\text{L}$  zum Mikroskopieren verwendet.

### 5.6.3.3 BODIPY

(Perez, 2016)

Zu 500  $\mu\text{L}$  Zellkultur wurden 2  $\mu\text{L}$  BODIPY 493/503 (Molecular Probes) gegeben und für 5 min bei RT einwirken lassen. Danach wurde einmal mit 1 mL PBS gewaschen (13.000  $\times g$ , 1 min, RT) und das Pellet in 200  $\mu\text{L}$  1x PBS aufgenommen. Zur Mikroskopie wurden ca. 15  $\mu\text{L}$  auf einen Agarosebeschichteten Objektträger gegeben und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

### 5.6.3.4 Van-FL

(Lehner et al., 2013)

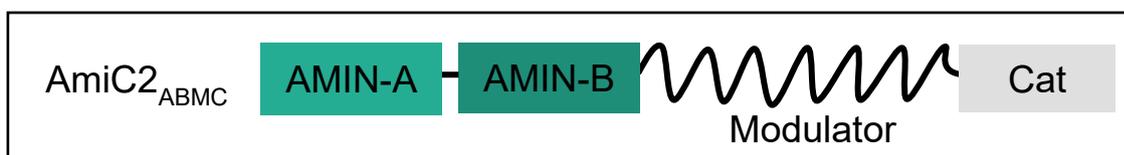
Zur Färbung des septalen Peptidoglykans wurden 100  $\mu\text{L}$  Zellen einer *N. punctiforme* Kultur mit 1  $\mu\text{L}$  Van-FL (BODIPY® FL Conjugate, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) versetzt und eine Stunde im Dunkeln bei RT inkubiert. Ungebundener Farbstoff wurde durch Waschen mit PBS (3x) entfernt. Mittels GFP-Filter des Fluoreszenzmikroskops konnte die Färbung betrachtet werden.

## 6 Ergebnisse

Die AmiC-Amidasen der *Nostocales* besitzen einen charakteristischen Aufbau. Anders als AmiC aus *E. coli* werden die *Nostocales*-Amidasen nicht im gefalteten Zustand durch ein Tat-Signal in das Periplasma transportiert (Bernhardt and de Boer, 2003), sondern ungefaltet über das Sec-Transportsystem (Büttner et al., 2016). Anstatt einer einzelnen AMIN-Domäne besitzen AmiC1 und AmiC2 zwei AMIN-Domänen, die über eine flexible Sequenz mit einer Länge von 160 AS mit der katalytischen Domäne verbunden sind (Abbildung 9). Dieser Bereich wurde in der vorliegenden Arbeit als Modulator der Aktivität der katalytischen Domäne identifiziert und weist damit auf eine bisher unbekannte Möglichkeit der Regulation von Amidasen hin. Andere Amidasen, die beispielsweise für die Tochterzelltrennung nach der Zellteilung verantwortlich sind, besitzen eine regulatorische  $\alpha$ -Helix, welche das aktive Zentrum blockiert und von anderen Proteinen wie NlpD entfernt wird, wodurch die Amidase aktiviert wird (Rocaboy et al., 2013). Die katalytische Domäne von AmiC1 und AmiC2 aus *N. punctiforme* und anderen filamentösen Cyanobakterien wie *Anabaena* PCC7120 besitzt im Gegensatz zu den vorgenannten keine regulatorische  $\alpha$ -Helix.

In den folgenden Kapiteln wird die *in situ* Lokalisation von AmiC1 und AmiC2 in *N. punctiforme* behandelt. Es wird auf die einzelnen Domänen von AmiC2 eingegangen und ob sie einen Einfluss auf die Lokalisation oder die Aktivität des Proteins haben. Es wird gezeigt, wie AmiC2 für die erhöhte Kommunikation in Hormogonien sorgt. Die Kristallstruktur der katalytischen Domäne von AmiC2 (AmiC2<sub>C</sub>) wird vorgestellt und wichtige Aminosäuren (AS) für die Katalyse beleuchtet. Die neue Art der Regulation von AmiC2 mittels Modulator wird beschrieben.

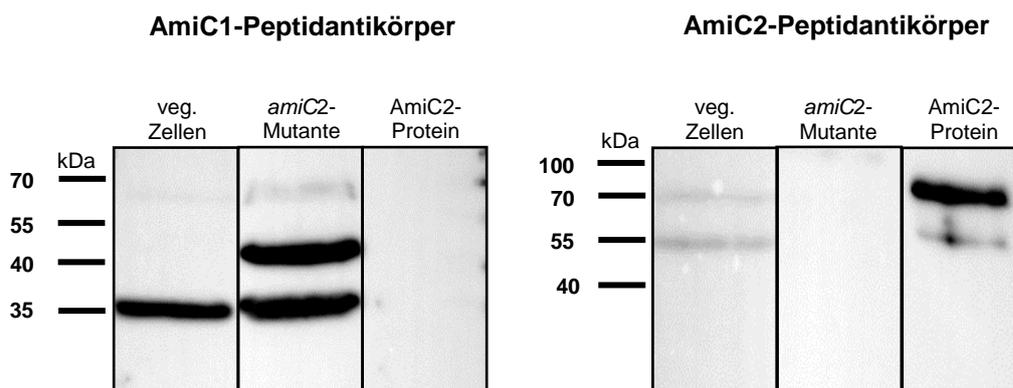
Zuletzt werden vier putative Interaktoren von AmiC2 durch Charakterisierung von *KO*-Mutanten und Lokalisation der Proteine vorgestellt.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung von AmiC2.** Das Volllängenprotein besitzt zwei AMIN-Domänen (AMIN-A und AMIN-B), die katalytische Domäne ist durch eine lange, flexible Region verbunden, den Modulator. Die verschiedenen Domänen werden mit einem Buchstaben abgekürzt und als Subskript an die Proteinbezeichnung angehängt. Trunkierte Versionen von AmiC2 werden im Folgenden durch fehlende Buchstaben eindeutig gekennzeichnet. Sind keine Subskripte vorhanden, wird sich immer die Volllängenvariante von AmiC2 bezogen.



Mittels Western Blot (Abbildung 11) wurde die Spezifität der Antikörper nachgewiesen. Ohne Signalsequenz besitzen AmiC1 und AmiC2 als Volllängenproteine eine Größe von ca. 67 kDa. Bei beiden Proteinen wurden auch verkürzte Varianten vom Peptidantikörper erkannt, die entweder durch Autoproteolyse oder durch Protease entstanden (Lehner et al., 2013). Der Peptidantikörper gegen AmiC1 erkannte AmiC1 und hauptsächlich AmiC1-Fragmente von apparent 35 kDa und ca. 42 kDa in Zellextrakten von *N. punctiforme* WT und *amiC2*-Mutante. Es erschien kein Signal bei der Verwendung von gereinigtem AmiC2. Analog dazu erkannte der Peptidantikörper, der gegen eine spezifische Sequenz von AmiC2 gerichtet ist (Abbildung 10), AmiC2 im Zellextrakt des WT und das gereinigte Protein. Die Bande bei ca. 70 kDa repräsentiert das Volllängen-AmiC2. Die Bande bei 55 kDa war präsent in Zellextrakten und bei gereinigtem Protein. Bei Verwendung von Zellextrakt der *amiC2*-Mutante gab es kein Signal (Abbildung 11). Die Intensitäten der Banden in Western Blot variierten stark in unabhängigen Experimenten. Die Ursache dafür ist unklar.

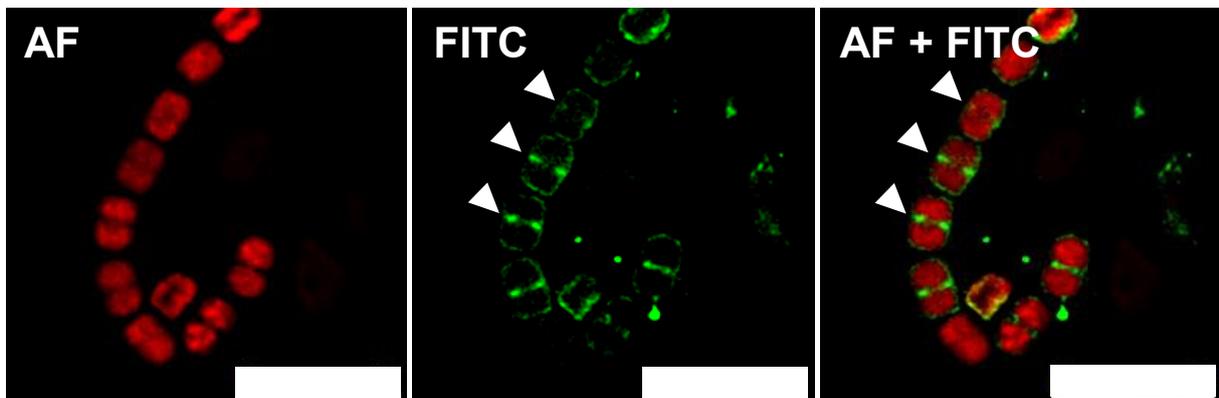


**Abbildung 11: Western Blot mit den Peptidantikörpern gegen die spezifischen Regionen von AmiC1 und AmiC2 aus *N. punctiforme*.** Von Zellextrakten der vegetativen Zellen des WT und der *amiC2*-Mutante wurden je 20 µg Protein eingesetzt. Von dem gereinigten AmiC2-Protein wurden je 10 ng verwendet. Beide Proteine besitzen ohne Signalsequenz eine Größe von ca. 67 kDa, daneben werden von den Peptidantikörpern auch verkürzte Varianten der Amidasen erkannt.

### 6.1.2 Lokalisation des nativen AmiC1-Proteins im *N. punctiforme* WT

Der Peptidantikörper gegen die spezifische Sequenz von AmiC1 wurde verwendet, um natives AmiC1 *in situ* zu lokalisieren. Dazu wurde eine Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und wie in (5.5.7) behandelt. Der sekundäre Antikörper ist an den Fluorophor FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) gekoppelt, der im GFP-Kanal des Fluoreszenzmikroskops (QUER) detektiert werden kann. Durch Überlagerung der Autofluoreszenz mit dem Signal aus dem GFP-Kanal kann AmiC1 lokalisiert werden.

Die Amidase AmiC1 befindet sich in der Zellwand. Besonders stark ist das Signal an den jungen Septen, die noch nicht vollständig durchgeschnürt sind. Auch an jungen Septen zwischen den neu gebildeten Tochterzellen ist AmiC1 präsent (Abbildung 12, weiße Pfeile). Das Signal wird in reifen Septen deutlich schwächer.



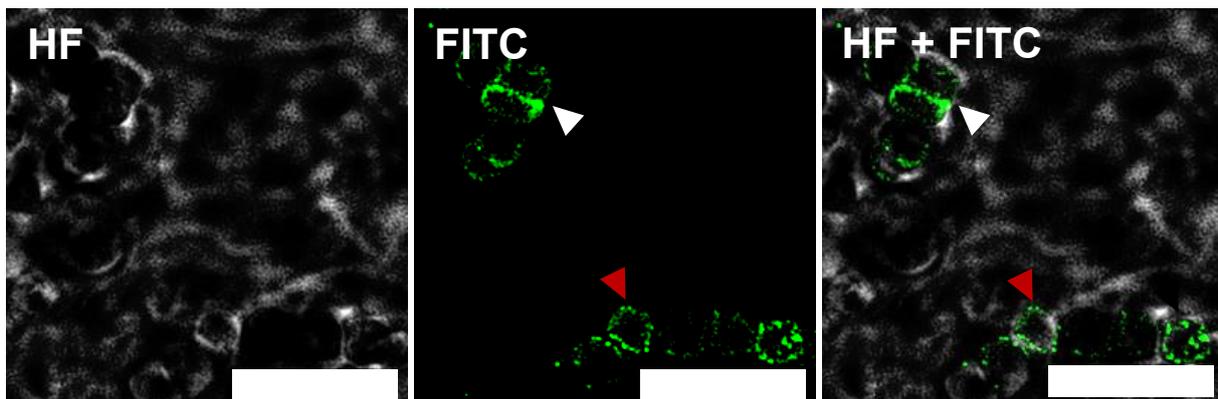
**Abbildung 12: Immunfluoreszenzmarkierung von AmiC1 in *N. punctiforme* WT Filamenten.** AF) Autofluoreszenz FITC) Detektion von AmiC1 durch FITC-gekoppelte Antikörper im GFP-Kanal. Die Überlagerung zeigt die zelluläre Lokalisation von AmiC1. Es befindet sich in der Zellwand und dort vermehrt an den jungen Septen (weiße Pfeile). Größenstandard: 10 µm.

### 6.1.3 Lokalisation des nativen AmiC1 in der *amiC2*-Mutante von *N. punctiforme*

Mit schiefen Teilungsebenen und ohne die Möglichkeit zur Differenzierung ist die *amiC2*-Mutante nur unter Laborbedingungen und in einem Medium, das eine anorganische Stickstoffquelle enthält, lebensfähig. Da die Generierung einer *amiC1-KO*-Mutante erfolglos blieb, wurde angenommen, dass AmiC1 essentiell ist (Lehner et al., 2011).

Die Filamente der *amiC2*-Mutante ähneln Aseriaten, aber sie sind deutlich stärker verklumpt. Dadurch war es schwierig, einzelne Zellen oder Filamente zu fokussieren. Aufgrund der Exopolysaccharidschichten der *amiC2*-Mutante war die Lokalisierung von AmiC1 nur in einzelnen Zellen oder Filamenten erfolgreich. Zur Orientierung wurde hier eine Hellfeldaufnahme herangezogen, da selbst mit der *Deconvolution-Software* des Mikroskops die Herausrechnung der Streuung im Kanal zur Aufnahme der Autofluoreszenz nicht gelang.

Wie im WT ist auch in der *amiC2*-Mutante AmiC1 in der Zellwand lokalisiert (Abbildung 13, rote Pfeile). Während der Zellteilung befindet sich AmiC1 vorwiegend im Septum und den angrenzenden Bereichen zum Septum (Abbildung 13, weißer Pfeil).

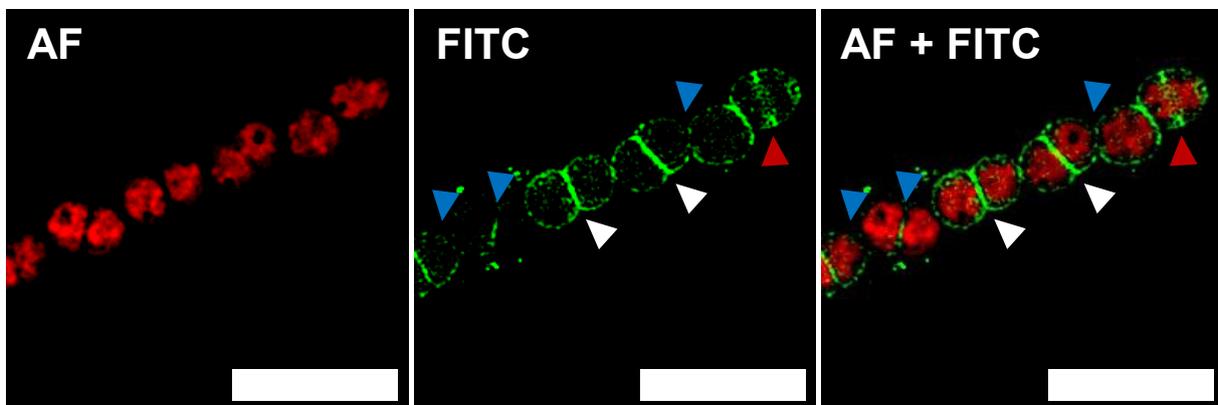


**Abbildung 13:** Immunfluoreszenzmarkierung von AmiC1 in der *amiC2*-Mutante von *N. punctiforme*. HF) Hellfeld. FITC) Lokalisierung von AmiC1 mit FITC-gekoppeltem Antikörper. Die Überlagerung der Kanäle zeigt die zelluläre Lokalisation von AmiC1. Das Protein befindet sich in der Zellwand (rote Pfeile) und speziell auch an naszenten Septen (weißer Pfeil). Größenstandard: 10 µm.

#### 6.1.4 Lokalisation des nativen AmiC2-Proteins im *N. punctiforme* WT

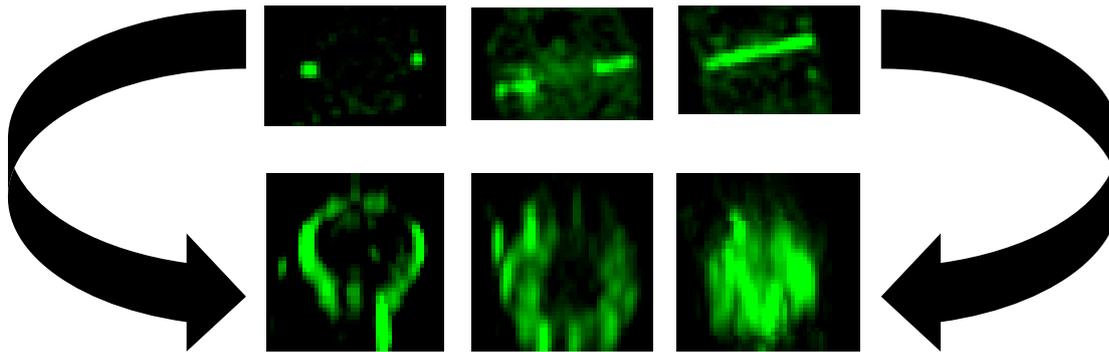
Der Peptidantikörper gegen die spezifische Sequenz von AmiC2 (6.1) wurde zur *in-situ*-Lokalisation von nativem AmiC2 verwendet. Die Vorhergehens Weise ist analog zu (6.1.2) und ist ausführlich unter Kapitel 5.5.7 beschrieben.

Die Amidase AmiC2 lokalisiert im Periplasma mit klarer Präferenz für die Septumsregionen. In jungen Septen ist AmiC2 sehr präsent (Abbildung 14, weiße Pfeile). Auch in Septen, die sich in der Entstehung befinden, ist AmiC2 vorhanden (Abbildung 14, roter Pfeil). In reifen Septen ist das Signal zur Lokalisation von AmiC2 hingegen schwächer oder es fehlt ganz (Abbildung 14, blaue Pfeile).



**Abbildung 14: Immunfluoreszenzmarkierung von AmiC2 in *N. punctiforme* WT.** **AF**) Autofluoreszenz der vegetativen Zellen. **FITC**) Lokalisierung von AmiC2 mit FITC-gekoppeltem sekundären Antikörper. Die Übereinanderlegung der Kanäle zeigt die zelluläre Lokalisation von AmiC2. Die Amidase lokalisiert in der Zellwand, besonders stark ist das Signal in jungen Septen (weiße Pfeile). Das Protein ist schon vorhanden, wenn das Septum noch in der Entstehung ist (roter Pfeil), in älteren Septen verschwindet das Signal (blauer Pfeil). Größenstandard: 10 µm.

Durch die Aufnahme mehrerer Bilder im Abstand von 0,1 µm der Fokusebene (Z-Stapel) konnte ein dreidimensionales Abbild von Filamenten rekonstruiert werden. In drei Septen in unterschiedlichem Stadium der Genese wurde die unterschiedliche Lokalisierung von AmiC2 beobachtet. Bei der Zellteilung wird neues Zellwandmaterial in der Teilungsebene angelagert, das Septum wächst nach innen. Die Tochterzellen trennen sich ohne, sich voneinander abzuschneiden. In der Anfangsphase ist AmiC2 ringförmig an der naszenten Zellwand lokalisiert (Abbildung 15A). Dies entspricht der Lokalisation des FtsZ-Rings (Vischer et al., 2015, Ma et al., 1996) Während der fortschreitenden Einschnürung des Septums heftet sich fortlaufend AmiC2 an das neue Septumsmaterial (Abbildung 15B), bis schließlich die gesamte Septumscheibe bedeckt ist (Abbildung 15C).



**Abbildung 15: Immunfluoreszenzlokalisierung von AmiC2 im Septum.** Die 3D Rekonstruktion erlaubt den Einblick auf das Septum, das um 90° gedreht wurde. A) junges Septum im Beginn der Entstehung. Die Amidase AmiC2 ist ringförmig lokalisiert und stellt damit das periplasmatische Pendant zu dem cytoplasmatischen FtsZ-Ring dar. B) Beginn der Septumbildung. Die ringförmige Lokalisation von AmiC2 verzüngt sich nach innen. C) AmiC2 bedeckt das junge Septum zwischen zwei Tochterzellen komplett.

## 6.2 Die Domänen von AmiC2 und ihr Einfluss auf die Lokalisation

### 6.2.1 Untersuchung verschiedener Sec-Signalsequenzen in *Anabaena* PCC7120

Für den Transport von Proteinen über die Cytoplasmamembran gibt es bei Bakterien zwei verschiedene Mechanismen. Für beide Möglichkeiten wird eine N-terminale Signalsequenz benötigt. Proteine, die im gefalteten Zustand transportiert werden, verfügen über eine TAT-Signalsequenz (*twin-arginine-transporter*). Die AmiC-Amidase aus *E. coli* wird über diesen Mechanismus transportiert (Rocaboy et al., 2013, Bernhardt and de Boer, 2003). Im Gegensatz dazu werden die AmiC-Amidasen der *Nostocales* wie *N. punctiforme* und *Anabaena* PCC7120 im ungefalteten Zustand über die Cytoplasmamembran transportiert. Das Sec-Translokationssystem ist in vielen Bakterien das am häufigsten verwendete Transportsystem (Pugsley, 1993). Die N-terminale Signalsequenz wird während des Transportvorgangs abgespalten. Sie variiert in Länge und der Sequenz der Aminosäuren, welche die Geschwindigkeit des Transports über die Membran beeinflusst und damit auch die Geschwindigkeit der Faltung. Dies bestimmt die Menge korrekt gefalteten Proteins außerhalb des Cytoplasmas.

Die Signalpeptide von AmiC1 und AmiC2 aus *N. punctiforme* und *Anabaena* PCC 7120 zeigen eine hohe Homologie (Tabelle 25), während Sec-Signalsequenzen anderer Proteine keine so großen Ähnlichkeiten zu verwandten Proteinen aufweisen. Zudem scheint die Homologie exklusiv für die Amidasen AmiC1 und AmiC2 zu sein.

Bei eukaryotischen Zellen ist bekannt, dass Signalpeptide auch für die Lokalisation an Zellkompartimenten oder in den extrazellulären Raum verantwortlich sind (Nakai and Kanehisa, 1992). Um die Frage zu beantworten, ob Signalsequenzen auch in filamentösen Cyanobakterien

einen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins haben, wurden die kodierenden Sequenzen einer Auswahl an Signalsequenzen mit der Sequenz des *sfGFP* fusioniert und mittels Gibson-*Assembly* auf Vektor pRL1049 kloniert (5.4.14.3). Die Variante sfGFP (*superfolder*) weist zehn Punktmutationen auf, die das GFP stabil falten lassen, sodass es seine korrekte Faltung auch nach dem Transport in ungefalteter Form über das Sec-Sekretionssystem im Periplasma annimmt (Aronson et al., 2011, Dinh and Bernhardt, 2011, Pédelacq et al., 2006).

Tabelle 25: AS-Sequenzen der Sec-Signale.

Plasmid	Gen	Annotation des Proteins	AS-Sequenz
-	Npun_F1845	AmiC1	VKHLWLLPSTIGTIFMLSSPAMA
pIM584	Npun_F1846	AmiC2	VKLRWLLSSTIGTIFMLSSPAMA
-	<i>alr0092</i>	AmiC1 <sup>ANA</sup>	MKHLWLLSGTVGTVLLLSSPALA
-	<i>alr0093</i>	AmiC2 <sup>ANA</sup>	MKHLWLLSGTVGTIFLLSSPALA
pIM609	Tat (Npun_R2356)	Substratbindeprotein des Bicarbonat Transportsystems	MTEFFNQISRRKFIFAAGASASAVFLKGCLGNP
pIM631	<i>all4575</i>	PstS	MLSYIKRIKNNRIPVSITVLTLAMSLAACG
pIM632	<i>all4999</i>	Amidase	VPQSHSEYFCDTAVKKVLIPVILSFVVTSSVALA
pIM633	<i>alr1834</i>	branched-chain Aminosäurebindeprotein	MQRISAALSGLATFTAGFLLA
pIM634	<i>alr2269</i>	Omp85	MRLSPVLVAVAITAPLSSSLTANA
pIM636	<i>alr1666</i>	D-alanyl-D-Alanin Carboxypeptidase	MPRKISLGLMALFISVQVSVTQQLVKA

Die verschiedenen Plasmide (pIM584, pIM609, pIM631, pIM632, pIM633, pIM634, pIM636) enthalten je eine kodierende Sequenz eines Signalpeptids fusioniert mit der DNA-Sequenz des *sfGFP* unter der Kontrolle des Promotors, der auf dem Vektor (pRL1049) vorhanden ist (Tabelle 25 (Black and Wolk, 1994)). Die Plasmide wurden durch triparentale Konjugation (5.4.13.2) auf *Anabaena* PCC 7120 übertragen. Anschließend konnte die Lokalisation des *sfGFP* in den verschiedenen Exkonjuganten im Fluoreszenzmikroskop dokumentiert werden. Die Kolonie-PCR

mit spezifischen Oligos (Tabelle 10) für die kodierenden Bereiche der Signalsequenzen diente als Nachweis der einzelnen Plasmide (Abbildung 16).

Als Kontrolle diente der Wildtyp von *Anabaena* PCC 7120 (Abbildung 16), der kein *sfGFP* enthält. Mit der Sec-Sequenz von AmiC2 aus *N. punctiforme* (Npun\_F1846; pIM584) lokalisiert *sfGFP* im Periplasma (Abbildung 16) ohne Präferenz für die Lokalisation im Septum. Der Transport in gefalteter Form (Abbildung 16, pIM609), vermittelt durch das TAT-Signal von Npun\_R2356, einem Substratbindeprotein für das Bicarbonat-Transportsystem (Lehner et al., 2011), diente als zweite Kontrolle und zeigt die Lokalisation des *sfGFP* in der Zellwand. Wieder konnte keine Präferenz für die Lokalisation an einem bestimmten Ort in der Zellwand festgestellt werden. Die ausgewählten Sec-Sequenzen stammen von Proteinen, die unterschiedliche Funktionen im Periplasma erfüllen.

Die Sequenz von *all4575* (pIM631) kodiert für das phosphatbindende, periplasmatische Protein PstS, das Teil eines ABC-Transporters ist. Die Signalsequenz dieses Proteins unterscheidet sich deutlich von den Signalsequenzen der Amidasen (Tabelle 25) und bedingt eine randomisierte Lokalisation von *sfGFP* im Periplasma (Abbildung 16).

Die Sequenz von *all4999* (pIM632) kodiert für eine Amidase. Die Sec-Sequenz dieses Proteins transportiert *sfGFP* in das Periplasma, ohne eine erkennbare Präferenz für einen bestimmten Ort (Abbildung 16). Die Sec-Signalsequenz von All4999 unterscheidet sich deutlich in der Länge der Aminosäuresequenz von den AmiC-Amidasen aus *N. punctiforme* und *Anabaena* PCC7120. Die Verteilung des *sfGFP* ist im Periplasma ähnlich wie bei dem Transport über die Sec-Signalsequenz von AmiC2.

Zu den proteinogenen, verzweigten AS gehören Valin, Leucin und Isoleucin. Verzweigte Aminosäuren sind Bestandteil des Peptidoglykans. Mit hoher Wahrscheinlichkeit bindet das Genprodukt von *alr1834* (pIM633) an Strukturen der Zellwand, dessen Signalsequenz besitzt eine ähnliche Länge wie die AmiC-Signalsequenzen aus *N. punctiforme* und *Anabaena* PCC7120 (22 AS bei *alr1834* und 23 AS bei AmiC-Amidasen, Tabelle 25). Das durch die Signalsequenz von Alr1834 transportierte *sfGFP* lokalisiert im Periplasma ohne Präferenz für die Lateralwand der Zellen oder den Bereich des Septums (Abbildung 16).

Die Signalsequenz von Omp85 (*alr2269*; pIM634) ist in Länge und Sequenz den Sequenzen der AmiC-Amidasen sehr ähnlich (Tabelle 25). Das Protein Omp85 wirkt an der äußeren Membran (Nicolaisen et al., 2009). Das *sfGFP*, welches durch die Signalsequenz von Omp85 in das Periplasma transportiert wird, lokalisiert bevorzugt an den Einschnürungsstellen der äußeren Membran zwischen zwei Zellen außerhalb des Septums (Abbildung 16). Dies ist die einzige

Signalsequenz, welche in diesem Experiment zu einer distinkten Lokalisation von *sfGFP* an der Zellwand führte.

Die Sequenz von *alr1666* wurde ausgewählt, da sie für eine Carboxypeptidase kodiert. Die Carboxypeptidasen zerschneiden wie die Amidasen das Peptidoglykan, allerdings an anderer Stelle. Dies wirkt sich jedoch nicht auf die Lokalisation des Proteins aus. Das *sfGFP*, das durch die Signalsequenz von Alr1666 in das Periplasma sekretiert wird, lokalisiert sowohl im Septum als auch peripher (Abbildung 16E).

Durch diese Studie konnte ausgeschlossen werden, dass die native Sec-Sequenz oder die im nachfolgenden auch verwendete Tat-Sequenz die Lokalisation von AmiC2 beeinflussten.

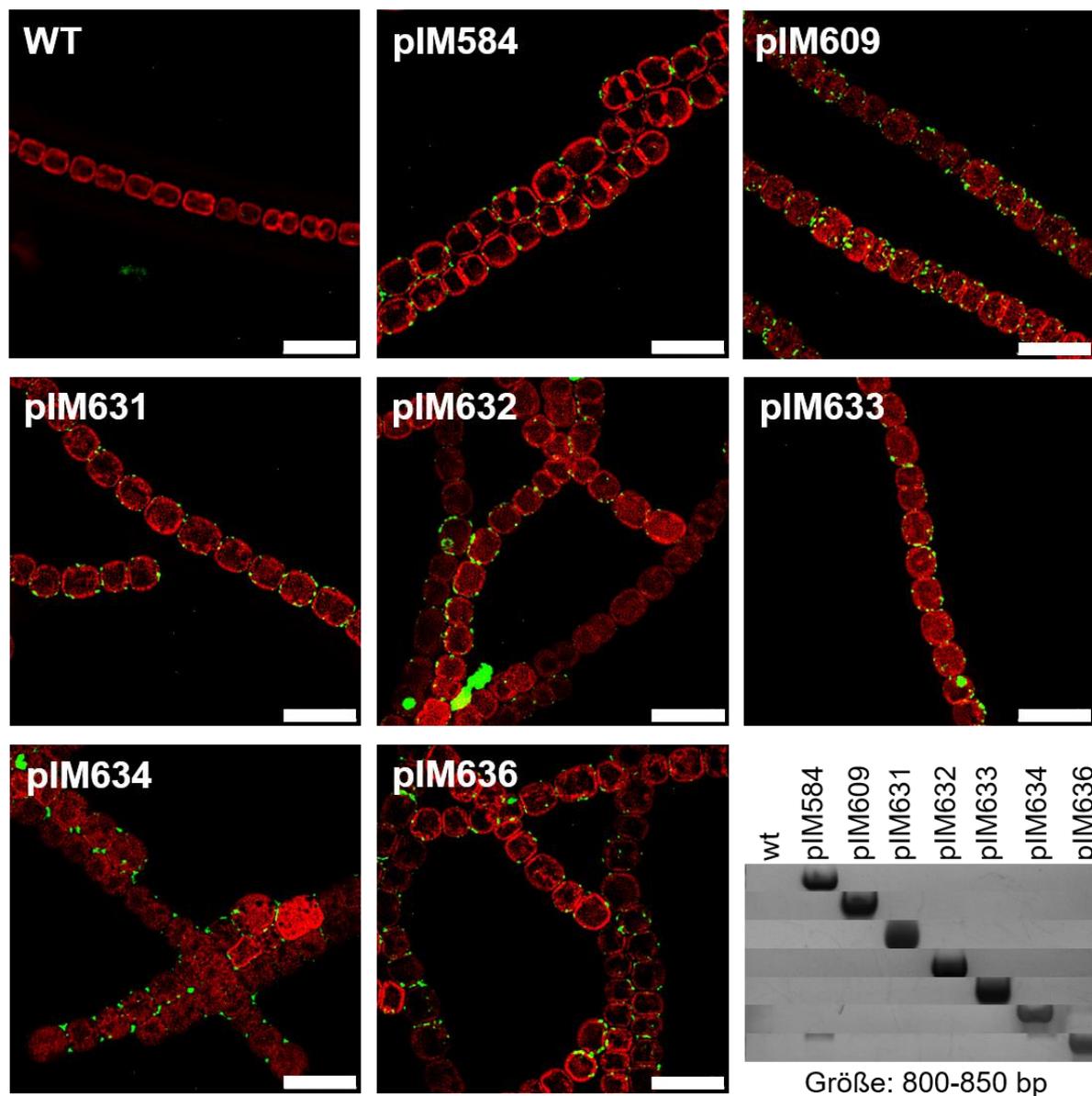


Abbildung 16: Lokalisierung von *sfGFP* unter dem Einfluss verschiedener Sec-Sequenzen in *Anabaena* PCC 7120. Größenstandard: 7,5 µm.

### 6.2.2 Lokalisation trunkierter AmiC2-Versionen

Die Amidase AmiC2 besitzt zwei AMIN-Domänen. Für das Homolog aus *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die AMIN-Domäne Peptidoglykan bindet und für die Lokalisation des Enzyms am Septum verantwortlich ist (Rocaboy et al., 2013). Die Verdoppelung der AMIN-Domäne ist typisch für die AmiC1 und 2-Amidasen filamentöser Cyanobakterien, jedoch kein Alleinstellungsmerkmal (de Souza et al., 2008, Berendt, 2011a). Sind die AMIN-Domänen auch in *N. punctiforme* für die Lokalisation von AmiC2 am Septum verantwortlich, dann sollte das Enzym ohne die AMIN-Domänen gleichmäßig im Periplasma lokalisieren. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden trunkierte Varianten von AmiC2 auf Basis des Vektors pIM496 durch Gibson-Klonierung erstellt. Dieser Vektor kodiert für AmiC2, welches mit GFP fusioniert wurde und über das Tat-Signal des Proteins Npun\_R2356 (Lehner et al., 2011) in das Periplasma transportiert wird, damit das GFP im gefalteten Zustand die Membran passiert. Die AMIN-Domänen wurden mit „A“ und „B“ gekennzeichnet. Der in dieser Arbeit identifizierte Modulator (6.5) wurde mit „M“ und die katalytische Domäne mit „C“ gekennzeichnet. Tiefgestellt an AmiC2 zeigen diese Buchstaben, welche Domänen in den trunkierten Versionen von AmiC2 vorhanden sind. Demnach kennzeichnet AmiC2<sub>ABMC</sub> das Volllängenprotein.

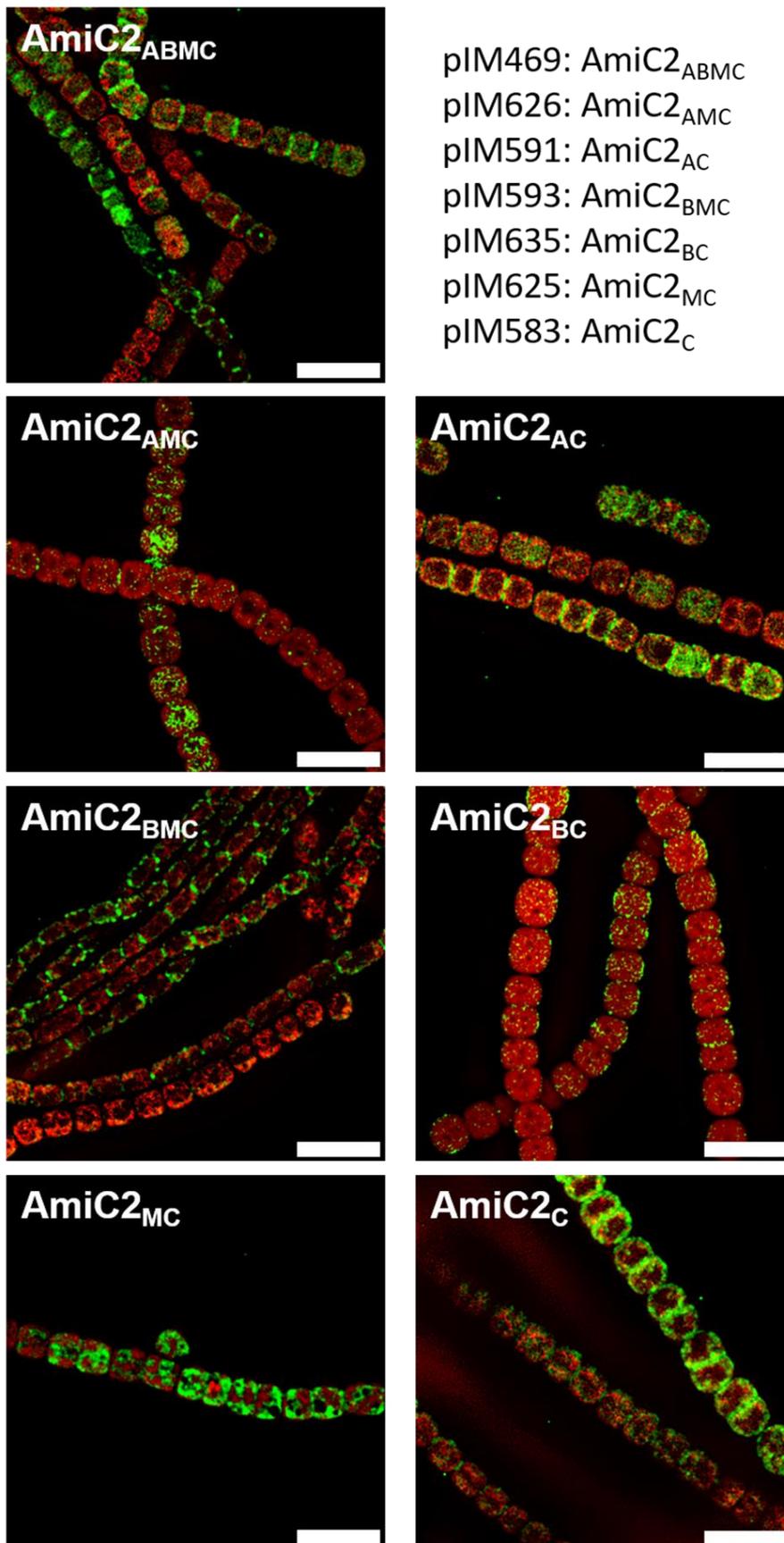
Das Fusionsgen (*tat-amiC2-gfp*) steht unter der Kontrolle des AmiC1-Promotors, eingebettet in das Rückgrat des pSCR202-Vektors (Argueta et al., 2004, Berendt, 2011a, Lehner et al., 2011). Die daraus entstandenen neuen Vektoren erhielten die Bezeichnungen pIM583, pIM591, pIM593, pIM625, pIM626 und pIM635. Der Vektor pIM469 wurde in vorangegangenen Lokalisationsstudien verwendet (Lehner et al., 2011).

Zur Übersicht und zum Vergleich wurde auch das vollständige AmiC2 dargestellt (AmiC2<sub>ABMC</sub>, pIM469, Abbildung 17). Wie auch durch die Immunfluoreszenzmarkierung gezeigt (0), lokalisiert AmiC2 bevorzugt im Bereich junger Septen an der Zellwand (Lehner et al., 2011, Berendt, 2011a). Wenn AmiC2 um beide AMIN-Domänen und um den Modulator verkürzt wurde, dann lokalisierte die katalytische Domäne (AmiC2<sub>C</sub>) sowohl an der lateralen Zellwand als auch im Septum ohne erkennbare Bevorzugung für eine bestimmte Region (Abbildung 17). Folglich sind auch bei AmiC2 aus *N. punctiforme* die AMIN-Domänen zur Lokalisation des Proteins an das Septum verantwortlich. Welchen Einfluss auf die Lokalisation vom AmiC2 die Entfernung der AMIN-Domänen und der Modulator im Detail haben, ist in Abbildung 17 gezeigt. Dabei beinhalten die Bilder in der linken Spalte grundsätzlich verkürzte Varianten, welche den Modulator beinhalten und die Bilder in der rechten Spalte die entsprechenden Varianten ohne den Modulator.

Fehlt dem AmiC2-Protein nur die AMIN-B Domäne (AmiC2<sub>AMC</sub>), so ist es im Periplasma nur schwach an den Septen lokalisiert. Fehlt zusätzlich auch der Modulator (AmiC2<sub>AC</sub>), so ist AmiC2 wieder stärker an den Septen lokalisiert.

Wenn hingegen die AMIN-A Domäne fehlt, dann lokalisiert AmiC2 stark an den Septen (AmiC2<sub>BMC</sub>), und wenn zusätzlich der Modulator fehlt, ist die Lokalisation schwächer ausgeprägt (AmiC2<sub>BC</sub>, Abbildung 17). Sind alle Domänen bis auf die Katalytische deletiert, dann lokalisiert AmiC2 in der Zellwand ohne Präferenz für die Septalregion (AmiC2<sub>C</sub>, Abbildung 17). Wenn dagegen nur die beiden AMIN-Domänen fehlen (AmiC2<sub>MC</sub>), dann wird das Protein nicht zuverlässig in das Periplasma transportiert.

Diese Daten unterstreichen die Bedeutung der Verbindung zwischen AMIN-B, Modulator und katalytischer Domäne für die Funktionalität von AmiC2 als septale Amidase.



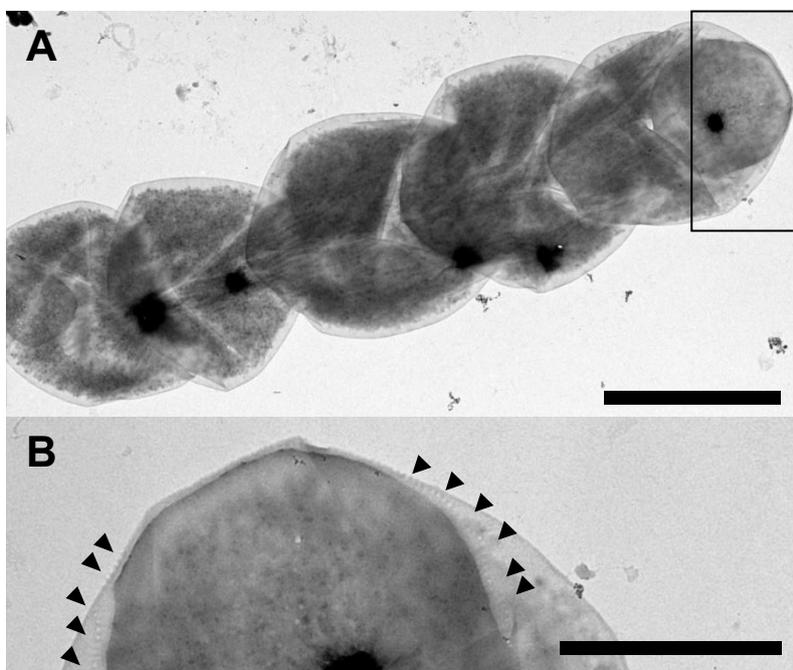
**Abbildung 17: Übersicht zur Lokalisation verschiedener trunkierter AmiC2-Versionen.** Die Autofluoreszenz (rot) und die Lokalisation der Proteine (grün) ist überlagert dargestellt. Alle Plasmide basieren auf dem Vektor pSCR202, besitzen dieselbe Promotorsequenz und dieselbe Tat-Sequenz zum Export der Proteine. Größenstandard: 7,5  $\mu$ m.

### 6.3 Die Zellwand von Hormogonien

#### 6.3.1 Eine Porenkette umschließt das Septum

Hormogonien sind in *N. punctiforme* verkürzte Filamente, welche durch synchrone Reduktionsteilung aus vegetativen Zellen hervorgehen. Morphologisch unterscheiden sich Hormogonien in der Zellgröße von vegetativen Zellen, die Zellen sind kleiner und meist etwas eckiger. Die endständigen Zellen von Hormogonien sind konisch geformt (Campbell and Meeks, 1989). Hormogonien dienen der Dispersion. Sie sind zur gerichteten Bewegung fähig und reagieren auf verschiedene abiotische Reize. Pflanzen senden einen Lockstoff aus, auf den Hormogonien ebenfalls reagieren. So können Symbiosen etabliert werden (Adams and Duggan, 2008). Treffen Hormogonien auf ein nicht überwindbares Hindernis, können sie die Richtung wechseln. Das andere Ende übernimmt dabei die Führung (eigene Beobachtungen).

Das Peptidoglykan von Hormogonien wurde isoliert und für die Transmissionselektronenmikroskopie vorbereitet. Auch bei Hormogonien umspannt das Peptidoglykan das gesamte Filament. Die Zellen erhalten ihre Form durch das Peptidoglykan, denn auch nach der Isolation und Reinigung des Peptidoglykans spiegelt es die Form der Zellen wider (Abbildung 18A). Die Ansicht im Detail zeigt eine Kette kleiner Poren, die in dem lateralen Peptidoglykan perlschnurartig um das Septum liegen (Abbildung 18B, schwarze Pfeile).



**Abbildung 18: Sacculi von Hormogonien.** A) Das Peptidoglykan ist über das gesamte Hormogonium zusammenhängend. Der schwarze Kasten markiert die Vergrößerung im zweiten Bildabschnitt. Größenstandard: 2,2  $\mu\text{m}$ . B) Detailansicht eines Septums von Hormogonien mit lateralem Peptidoglykan. Eine Kette kleiner Poren umringt das Septum (schwarze Pfeile). Größenstandard: 400  $\mu\text{m}$ .

### 6.3.2 Der *Nanopore Array* bei Hormogonien

Das reife Septum vegetativer Zellen ist von ca. 150 Poren von 20 nm durchlöchert. Es ist das Gerüst der Zell-Zell-Kommunikation, der *Nanopore Array* (Tabelle 26, Lehner et al., 2013). Bei Hormogonien wurde für gerichtete Bewegungen im Filament ein hohes Maß an Kommunikation vermutet. In *N. punctiforme* wird mehr AmiC2 an die Septen von Hormogonien rekrutiert als bei vegetativen Zellen (Lehner et al., 2013). Zur Beantwortung der Frage, ob die erhöhte Kommunikation auch in einem modifizierten *Nanopore Array* zu erkennen ist, wurde septales Peptidoglykan von Hormogonien untersucht.

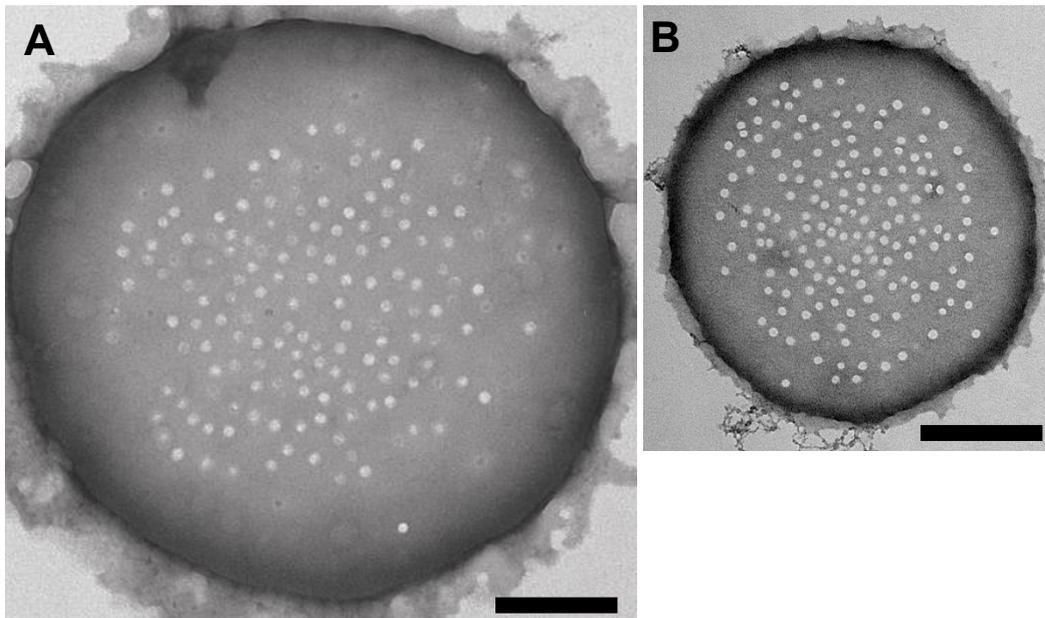


Abbildung 19: Septum von vegetativen Zellen (A) und Hormogonien (B) im Vergleich. Größenstandard: 300  $\mu\text{m}$ .

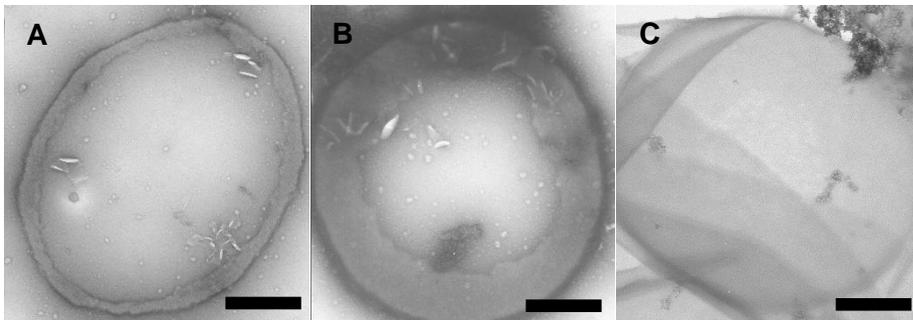
Das septale Peptidoglykan von Hormogonien besitzt ähnlich viele Poren wie die Septen vegetativer Zellen (Abbildung 19). Die Porengröße besitzt eine höhere Varianz als beim *Nanopore Array* vegetativer Filamente. Durch die reduzierte Zellgröße ist die Fläche des septalen Peptidoglykans jedoch kleiner. Normiert auf die Fläche besitzen Septen der Hormogonien die dreifache Menge an Poren (Tabelle 26): Der *Nanopore Array* ist auf den erhöhten Bedarf an Kommunikation in Hormogonien angepasst.

Tabelle 26: Der *Nanopore Array* von vegetativen Zellen und Hormogonien im Vergleich.

	Durchmesser des Septums (nm)	Anzahl der Poren imSeptum	Porengröße (nm)	Ø Poren/ $\mu\text{m}^2$
veg. Zellen	1596 +/- 235	155 +/- 23	20 +/- 1	77.5
Hormogonien	842 +/- 21	133 +/- 48	18 +/- 2	237.5

### 6.3.3 Die Genese des Septums

Transmissionselektronische Aufnahmen von gereinigter septaler Zellwand zeigen, wie ein Septum entsteht. Drei Septen von Hormogonien zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Septumsgenese sind in Abbildung 20 dargestellt. Zunächst besteht das spätere Septum aus einer ringförmigen Verdickung von Peptidoglykan (Abbildung 20A), an diese Verdickung wird innen neues Material angelagert (Abbildung 20B), bis schließlich eine geschlossene Septumsscheibe entstanden ist (Abbildung 20C). In diesem noch frühen Stadium der Septumsgenese ist noch kein *Nanopore Array* vorhanden. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei vegetativen Zellen von *Anabaena* PCC7120 gemacht (Bornikoel, 2015).



**Abbildung 20: Septen von Hormogonien zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Septumsgenese.** A) Das Septum besteht nur aus einem verdickten Ring und wenig Peptidoglykan, das innen angelagert wurde. B) Die Entstehung des Septums ist weiter vorangeschritten, mehr Peptidoglykan wurde innen angelagert, sodass das Septum weiter eingeschnürt ist. C) Die Septumsscheibe ist komplett, aber noch ist kein *Nanopore Array* zu erkennen. Größenstandard: 400  $\mu\text{m}$ .

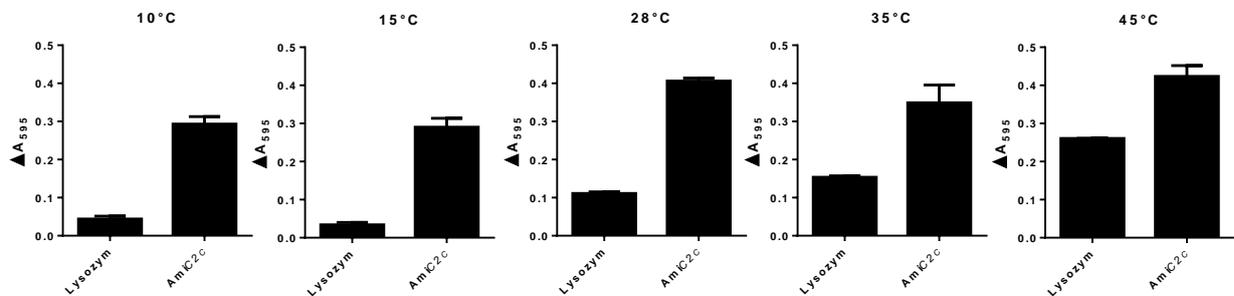
## 6.4 Charakterisierung der katalytischen Domäne von AmiC2 (AmiC2<sub>C</sub>)

### 6.4.1 Aktivität von AmiC2<sub>C</sub> bei verschiedenen Temperaturen

In seinen natürlichen Habitaten ist *N. punctiforme* Temperaturschwankungen ausgesetzt. Die intrafilamentöse Kommunikation muss relativ unabhängig von dem Temperaturfaktor funktionieren, um eine Anpassung des Filaments an seine Umwelt zu gewährleisten. Die Aktivität der katalytischen Domäne von AmiC2 (AmiC2<sub>C</sub>) wurde bei verschiedenen Temperaturen untersucht (Abbildung 21).

Die Temperatur, bei der *N. punctiforme* optimal wächst, ist 28°C. Diese Temperatur wurde als physiologische Temperatur für alle folgenden Enzymtests verwendet. Es wurden je zwei Temperaturen über der physiologischen Temperatur und zwei Werte darunter gewählt und die Aktivität von AmiC2<sub>C</sub> getestet.

Die katalytische Domäne ist bei allen gewählten Temperaturen in *Dye-Release-Assays* (DRAs) aktiv. Selbst bei 10°C sinkt die Aktivität nicht unter 70 % des Wertes bei 28°C. Bei Temperaturen über dem physiologischen Optimum (28°C) zeigte AmiC2<sub>C</sub> eine leichte Erhöhung der PG-Hydrolyse. Die Hypothese, dass AmiC2<sub>C</sub> innerhalb einer großen Temperaturspanne funktionell ist, wurde bestätigt.



**Abbildung 21: Aktivität der AmiC2<sub>C</sub> bei verschiedenen Temperaturen.** Als Kontrolle der *Dye-Release-Assays* diente Lysozym. Die Enzyme wurden in äquimolaren Konzentrationen eingesetzt. AmiC2<sub>C</sub> ist über alle getesteten Temperaturen aktiv. Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

#### 6.4.2 Kristallisation der katalytischen Domäne

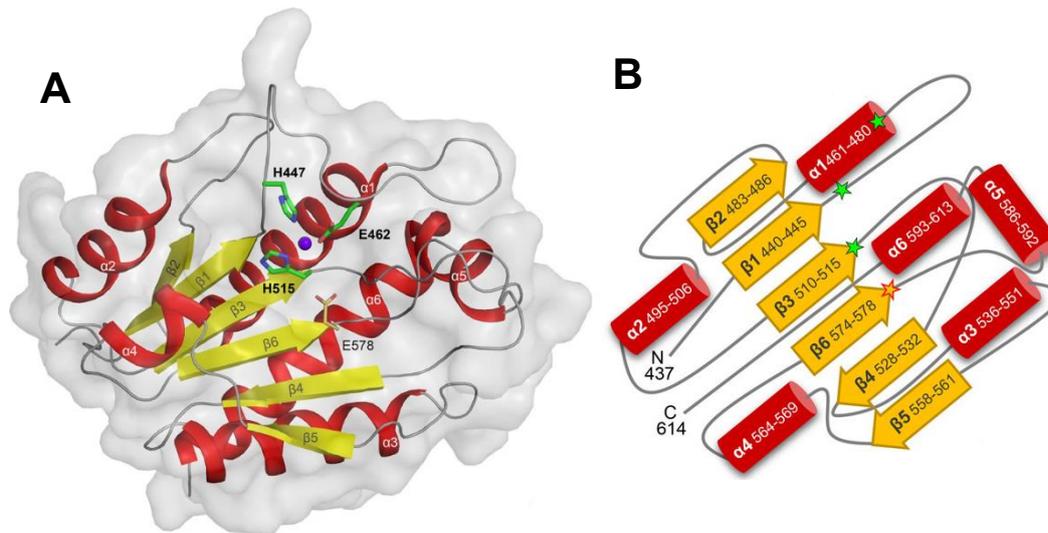
Zur Kristallisation wurde nur die katalytische Domäne von AmiC2 (AmiC2<sub>C</sub>) verwendet. Dadurch wurde die flexible Region des Modulators umgangen. Durch den Vektor PGEX-4T-3 wurde AmiC2<sub>C</sub> als N-terminales GST-Fusionsprotein exprimiert.

Die Kristallisation wurde von Felix Michael Büttner aus der Arbeitsgruppe von Thilo Stehle am Interfakultären Institut für Biochemie (IFIB, Universität Tübingen) vorgenommen. Die Expression des rekombinanten Proteins erfolgte heterolog in *E. coli* BL21 (DE3) (Büttner et al., 2016). Der GST-Rest wurde durch Thrombin entfernt. Anschließend konnte die katalytische Domäne durch Größenaufschlusschromatographie isoliert werden.

Die Kristallisation erfolgte mit einer sehr guten Auflösung von 1,12 Å. Die katalytische Domäne besitzt eine gemischte  $\alpha\beta$ -Faltung, welche charakteristisch für Amidase<sub>3</sub> Enzyme ist (Büttner et al., 2015). Zentral befinden sich 6  $\beta$ -Faltblätter, die von 6  $\alpha$ -Helices umgeben sind. Unterhalb der  $\beta$ -Faltblätter befinden sich die Helices  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$  und  $\alpha_6$ . Die verbleibenden beiden Helices ( $\alpha_2$  und  $\alpha_4$ ) befinden sich oberhalb der  $\beta$ -Faltblätter.

Die Aminosäurereste H447, E462 und H515 koordinieren das Zink im aktiven Zentrum (Abbildung 22). Ein konserviertes GHGG-Motiv (G446, H447, G448, G449) am Ende des ersten  $\beta$ -Faltblatts erlaubt eine enge Faltung oberhalb des aktiven Zentrums aufgrund der Abwesenheit von störenden Resten. Über Wasserstoffbrückenbindungen positionieren D541 und S513 die Imidazolringe der Histidine im aktiven Zentrum. In Vertretern der Amidase<sub>3</sub>-Familie sind diese Reste, zusammen mit den Resten des aktiven Zentrums und einem Glutamat an Position

578, konserviert (Abbildung 22). Abgesehen davon ist die Aminosäuresequenz der Amidasen wenig konserviert (Büttner et al., 2016).



**Abbildung 22: Kristallstruktur (A) und schematische Darstellung (B) von AmiC2<sub>C</sub> in *N. punctiforme*.** Jeweils grün mit Sternchen hervorgehoben sind die Reste des katalytischen Zentrums. Mit gelbem Sternchen ist das konservierte Glutamat an Position 578 markiert.

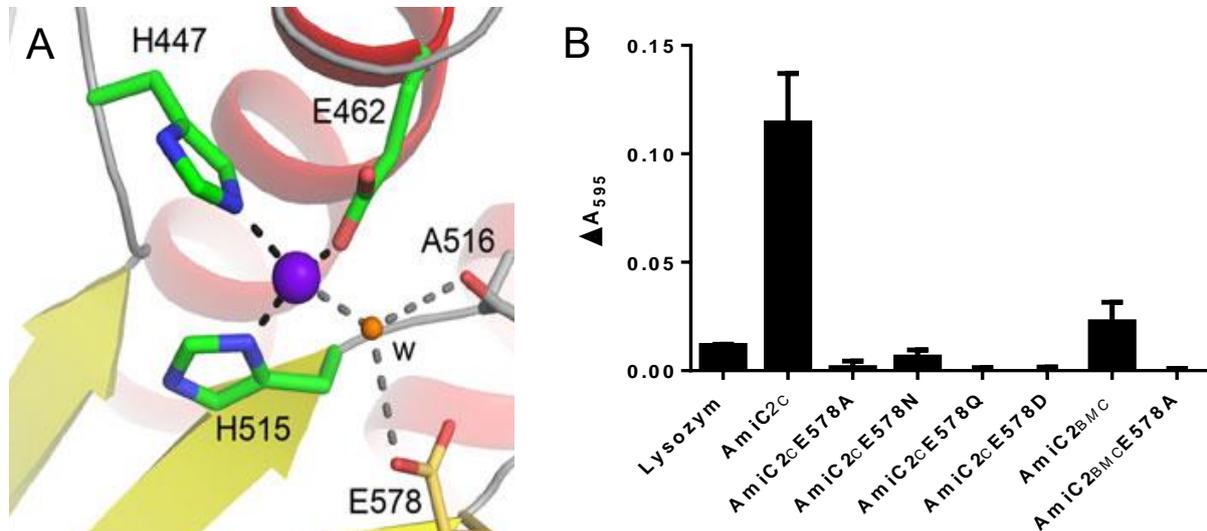
### 6.4.3 Wichtige Aminosäuren für die Katalyse

Um die Funktion spezifischer Aminosäuren im aktiven Zentrum für die enzymatische Aktivität von AmiC2 zu testen, wurden diese mutiert und die Proteinvarianten im DRA getestet.

Punktmutationen der Aminosäuren im aktiven Zentrum zu Alanin (H447A, E462A, H515A) führten zur Destabilisation des Proteins. Das Zink Ion ist daher wichtig für die korrekte Faltung des Proteins. Diese Varianten von AmiC2<sub>C</sub> konnten daher nicht in Dye-Release-Assays auf veränderte Aktivität getestet werden. Der Einsatz von hohen Konzentrationen an EDTA, welches dem Protein das Zink entzieht, führte ebenfalls zur Aggregation von AmiC2<sub>C</sub> (Büttner et al., 2016).

Der Austausch des Wasser-koordinierenden Glutamat zu Alanin (E578A) ergab dagegen stabil gefaltete Proteine (AmiC2<sub>C</sub>E578A und AmiC2<sub>BMC</sub>E578A). Beide Proteine zeigten keine Aktivität in Dye-Release-Assays (Abbildung 23). Bei der katalytischen Domäne allein (AmiC2<sub>C</sub>) wurden weitere Punktmutationen vorgenommen. Glutamat unterscheidet sich von Aspartat um ein C-Atom, die Carboxylgruppe (-COOH) bleibt erhalten, der Austausch von Glutamat zu Glutamin ersetzt die Carboxylgruppe durch eine Carbamoylgruppe (-CONH<sub>2</sub>). Im letzten Fall wurde Glutamat durch Asparagin ersetzt: Der Rest ist um ein C-Atom verkürzt und die Car-

boxylgruppe durch eine Carbamoylgruppe ersetzt. Jede vorgenommene Veränderung an Position 578 führte zum Verlust der Aktivität (Abbildung 23B). Das Glutamat an Position 578 ist essentiell für die Aktivität von AmiC2.



**Abbildung 23: Detailansicht des aktiven Zentrums von AmiC2C und DRA mit Punktmutanten von AmiC2C und AmiC2<sub>BMC</sub>.** A) Im aktiven Zentrum wird ein Zinkion durch zwei Histidine und ein Glutamat koordiniert. Das Wasser für den nukleophilen Angriff wird durch A516 und E578 stabilisiert. B) Dye-Release-Assay. Der Austausch des konservierten Glutamats (E587) führt zum Verlust der Aktivität von AmiC2<sub>C</sub> und AmiC2<sub>BMC</sub>. Dreifachbestimmung mit Mittelwert und Standardabweichung.

## 6.5 Identifikation eines Modulators der Aktivität der katalytischen Domäne von AmiC2

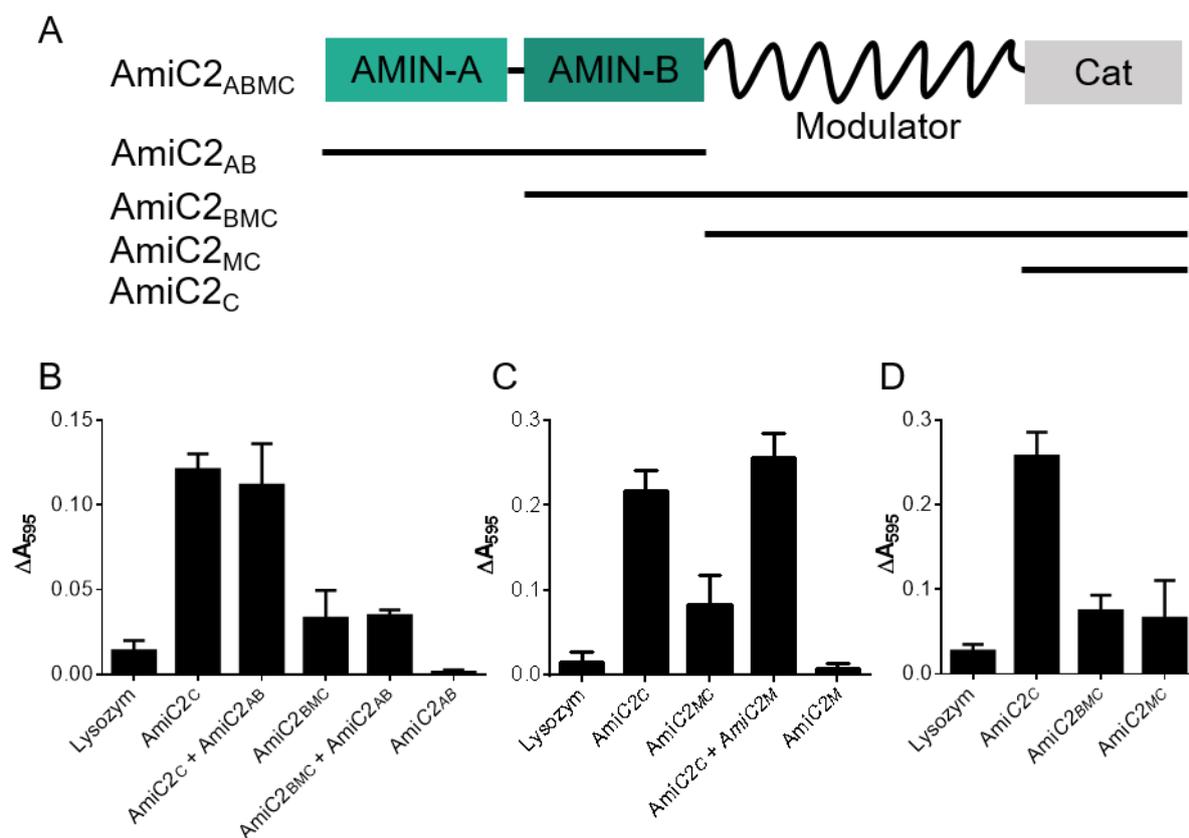
In *N. punctiforme* konnten zwei native Varianten der Amidase AmiC2 mittels Western Blot nachgewiesen werden (6.1.1): Das Volllängenprotein (AmiC2<sub>ABMC</sub>) mit ca. 68 kDa und eine Variante, der mit etwa 55 kDa die AMIN-A Domäne fehlt (AmiC2<sub>BMC</sub>). Bei der Aufreinigung rekombinant überexprimiertem AmiC2 ist ebenfalls ein Fragment der Größe 55 kDa entstanden, dem die AMIN-A-Domäne fehlt. In Zymogrammen konnte eine PG-hydrolytische Aktivität für dieses Fragment (AmiC2<sub>BMC</sub>) nachgewiesen werden (Lehner et al., 2013). Durch die gezielte Herstellung verschiedener trunkierter Varianten von AmiC2 sollten die verschiedenen Aktivitäten in Dye-release-Assays ermittelt werden. Eine Übersicht der Proteine gibt Abbildung 24A.

Die Aktivität des längeren AmiC2<sub>BMC</sub>-Konstrukts ist sehr viel geringer als die Aktivität der katalytischen Domäne (AmiC2<sub>C</sub>). Die AMIN-Domänen allein (AmiC2<sub>AB</sub>) können Peptidoglykan nicht spalten (Abbildung 24B). Auch die Zugabe von AmiC2<sub>AB</sub> als separates Protein hat keinen Einfluss auf die Aktivität von AmiC2<sub>C</sub> oder AmiC2<sub>BMC</sub> (Abbildung 24B). Zur Eingrenzung der Aktivität modulierenden Sequenz wurde eine Version von AmiC2 erstellt, die um

AMIN-A und AMIN-B verkürzt ist und eine weitere Version, die nur die putative Modulatorsequenz enthielt.

Der Modulator ist selbst nicht zur PG-Hydrolyse fähig (Abbildung 24C). Als separates Protein zu AmiC2<sub>C</sub> dazu gegeben, ist auch keine Verminderung der Aktivität der katalytischen Domäne zu beobachten. Die Verbindung aus putativer Modulatorsequenz und katalytischer Domäne (AmiC2<sub>MC</sub>) zeigte die gleiche niedrige Aktivität wie AmiC2<sub>BMC</sub> (Abbildung 24D). Folglich ist die flexible Region von AmiC2 zwischen der AMIN-B-Domäne und der katalytischen Domäne verantwortlich für die geringere Aktivität von AmiC2 und damit als Modulator der Aktivität identifiziert.

Der Modulator muss kovalent an die katalytische Domäne gebunden sein, um die Aktivität zu vermindern. Als separates Protein hat der Modulator keinen Effekt auf die Aktivität von AmiC2<sub>C</sub>. *In-Silico*-Analysen zeigten keine Übereinstimmung mit bekannten Proteindomänen. Es ist somit eine neue Struktur zur Modulierung der Aktivität einer Amidase entdeckt worden.



**Abbildung 24: Identifikation der flexiblen Region zwischen AMIN-B und Katalytischer Domäne (AmiC2<sub>C</sub>) als Modulator der Aktivität von AmiC2 *in vitro*.** A) Übersicht der verschiedenen trunkierten Versionen von AmiC2. AmiC2<sub>ABMC</sub> entspricht dem Volllängenprotein ohne Signalsequenz. B) Dye-Release-Assay. AmiC2<sub>BMC</sub> ist weniger aktiv als AmiC2<sub>C</sub>, AmiC2<sub>AB</sub> zeigt keine Aktivität. Die Zugabe von AmiC2<sub>AB</sub> beeinflusst weder AmiC2<sub>C</sub> noch AmiC2<sub>BMC</sub> in der Aktivität. C) Dye-Release-Assay. Der Modulator muss kovalent an die katalytische Domäne gebunden sein, um die Aktivität dieser zu vermindern. D) Dye-Release-Assay. Die Aktivität von AmiC2<sub>MC</sub> und AmiC2<sub>BMC</sub> ist identisch. Alle Werte sind Mittelwerte von Dreifachmessungen mit Standardabweichung.

## 6.6 Putative Interaktionspartner von AmiC2

Die komplexe Aufgabe, runde Löcher in das septale PG zu schneiden, die nur wenig im Durchmesser von etwa 20 nm variieren und ohne dass sich dabei Löcher überschneiden, bedarf einer genauen Regulation. Zur Identifikation möglicher Interaktionspartner wurde ein Pulldown durchgeführt (5.5.3). Dabei wurden parallel Zellextrakte von *N. punctiforme* WT und einer Kultur, die das replikative Plasmid pM469 trägt, verwendet. Der Vektor pIM469 kodiert für das Fusionsprotein AmiC2-GFP, welches durch kommerzielle  $\alpha$ GFP-Antikörper im Pulldown gebunden wurde. Durch den Vergleich mit den Ergebnissen bei Verwendung des Zellextrakts des WT konnten unspezifische Proteine erkannt werden.

Neben vielen als unspezifisch identifizierten Proteinen konnten vier Kandidaten ausgemacht werden, die möglicherweise mit AmiC2 interagieren. Die Tabelle 27 zeigt, wie viele Peptide dieser vier Proteine identifiziert werden konnten. In den nachfolgenden Kapiteln wurden diese Kandidaten näher charakterisiert.

**Tabelle 27: Identifikation putativer Interaktionspartner von AmiC2.** Die Tabelle gibt an, wie viele Peptide der Proteine gefunden wurden.

Gen	Peptide – AmiC2GFP	Peptide – WT
<b>Npun_F0437</b>	<b>4</b>	<b>0</b>
<b>Npun_F5024</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
<b>Npun_R1578</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>Npun_R4778</b>	<b>1</b>	<b>0</b>

## 6.7 Das GerM-Protein (Npun\_F0437) als putativer Interaktionspartner von AmiC2

Durch den *Pulldown* (5.5.3) wurde Npun\_F0437 als putativer Interaktionspartner von AmiC2 identifiziert. Aufgrund der Homologien zu GerM aus *Bacillus subtilis* (Slynn et al., 1994) wurde der Proteinname GerM für Cyanobakterien wie *Nostoc punctiforme* und *Anabaena variabilis* PCC 29413 übernommen (Perez, 2016).

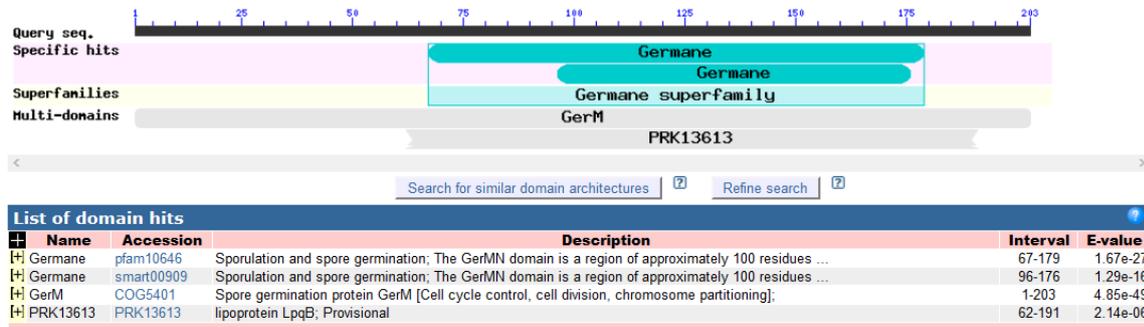


Abbildung 25: BLAST-P-Analyse der AS-Sequenz von GerM aus *N. punctiforme*.

Das Protein besteht aus 203 AS und ist laut *in silico* Analysen nahe dem N-Terminus im Cytoplasma verankert (Programm: TMHMM). Zentraler Bestandteil von GerM ist die periplasmatische GerM-Domäne (pfam10646).

**AS-Sequenz GerM (203 AS)**

```

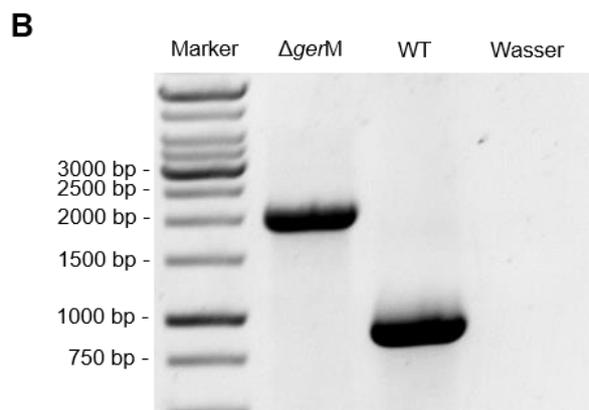
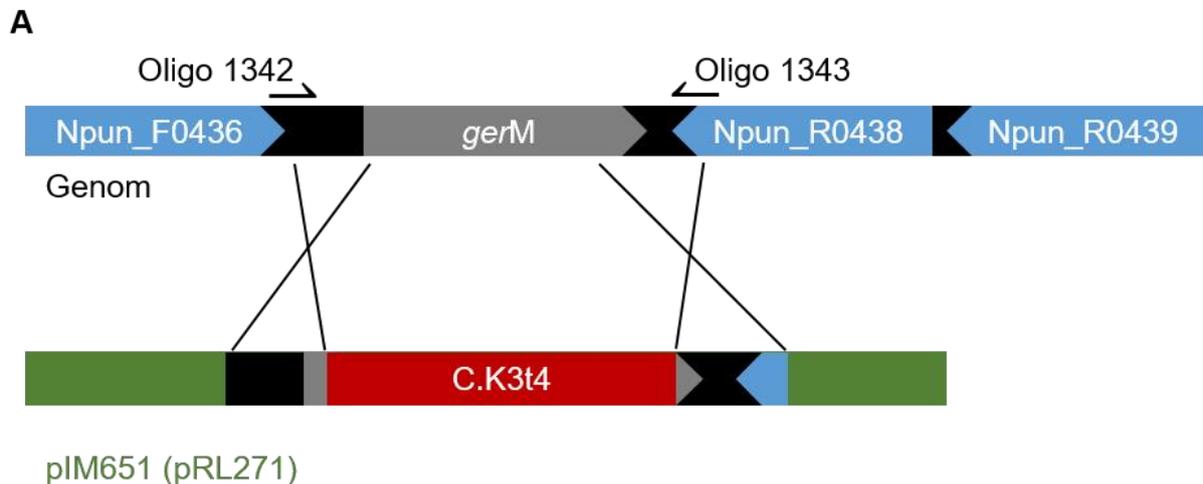
MKDQQGSNRI SSGTIAAVSA VWAVGGGVA WFTTHSSNPP TPSNPSGPIA
QPAQPSTRQP ANEQSPNVYW LRPKDKSVAL VPQPVKVASI RASQPLEAAF
QSLLAGPTEG TDSTTIPKGT KLLGLKSEND EVHVNLSDF TSGGGSTSM
GRVGQVVYTA TSLNPKAKVY IDVNGKPLDV LGGEGVELQQ PLTRESFEKN
YQL
  
```

Abbildung 26: AS-Sequenz von GerM (203 AS). Die Transmembranhelix (AS 12-24) ist durch graue, kursive Schrift und unterstrichen gekennzeichnet. Die GerM-Domäne (AS 67-179, pfam10646) ist grau unterlegt.

### 6.7.1 Gezielte *KO*-Mutagenese des *gerM*-Gens (Npun\_F0437)

Die Charakterisierung einer *KO*-Mutante sollte weitere Erkenntnisse über die Funktion von GerM in *N. punctiforme* bringen. Das Gen Npun\_F0437 wurde durch Insertion der Resistenzkassette C.K3t4 mutiert. Dazu wurde der Vektor pIM651 durch triparentale Konjugation in *N. punctiforme* transferiert. Die Integration erfolgte durch doppelte Rekombination homologer Bereiche. Der Terminator der Resistenzkassette verhindert polare Effekte auf die umliegenden Gene von Npun\_F0437 im Genom. Die Integration wurde mittels PCR überprüft. Die verwendeten Oligos 1342 und 1343 (Tabelle 10) wurden so gewählt, dass ein Amplifikat der Genregion

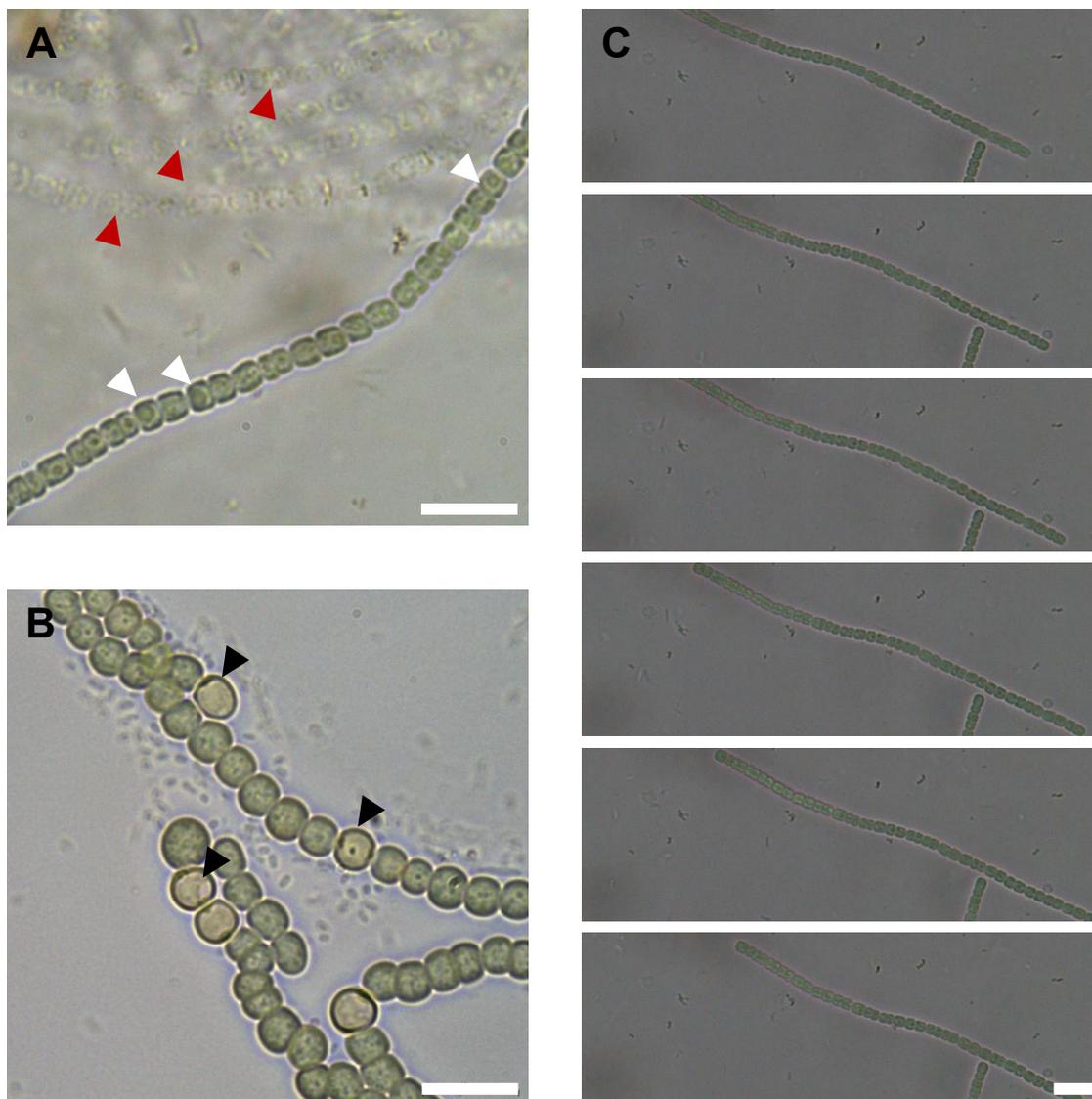
von 889 bp ohne Integration der Resistenzkassette mit Terminator entstand. Bei vollständiger Integration war dagegen ausschließlich ein Amplifikat von 1946 bp vorhanden. Abbildung 27 zeigt, dass die Resistenzkassette durch homologe Rekombination in das Genom eingebaut worden und vollständig segregiert ist.



**Abbildung 27: Verifizierung der *gerM*-Mutante.** **A**) Schematische Darstellung der doppelten Rekombination. Durch zwei Rekombinationsereignisse wird das *gerM*-Gen im Genom von *N. punctiforme* durch die Resistenzkassette (C.K3t4) **B**) Agarosegelelektrophorese der Kolonie-PCR. Die Oligos 1342 und 1343 binden in den flankierenden Seiten für die homologe Rekombination. Dient das WT-Allel als Matritze, so entsteht ein Amplifikat von 889 bp, bei erfolgter Integration von C.K3t4-Kassette ist das Amplifikat 1946 bp lang. Die *gerM*-Mutante ist vollständig segregiert.

6.7.2 Wachstum und Differenzierungspotential der *gerM*-Mutante

Unter vergleichbaren Bedingungen wächst die *gerM*-Mutante langsamer als der *N. punctiforme* WT. Die vegetativen Zellen der *gerM*-Mutante besitzen viele und teilweise auch sehr große Speichergranula (Abbildung 28A weiße Pfeilspitzen). Viele Filamente sterben und bleiben als leere Hülle zurück (Abbildung 28A rote Pfeilspitzen). Ohne geeignete Stickstoffquelle im Medium bildet die *gerM*-Mutante Heterozysten (Abbildung 28B schwarze Pfeile). Auch Hormogonien werden gebildet (Abbildung 28C). Die gerichtete Bewegung des Hormogoniums ist in der Bilderserie deutlich zu erkennen. Das Filament bewegt sich in die untere rechte Ecke der Aufnahmen.

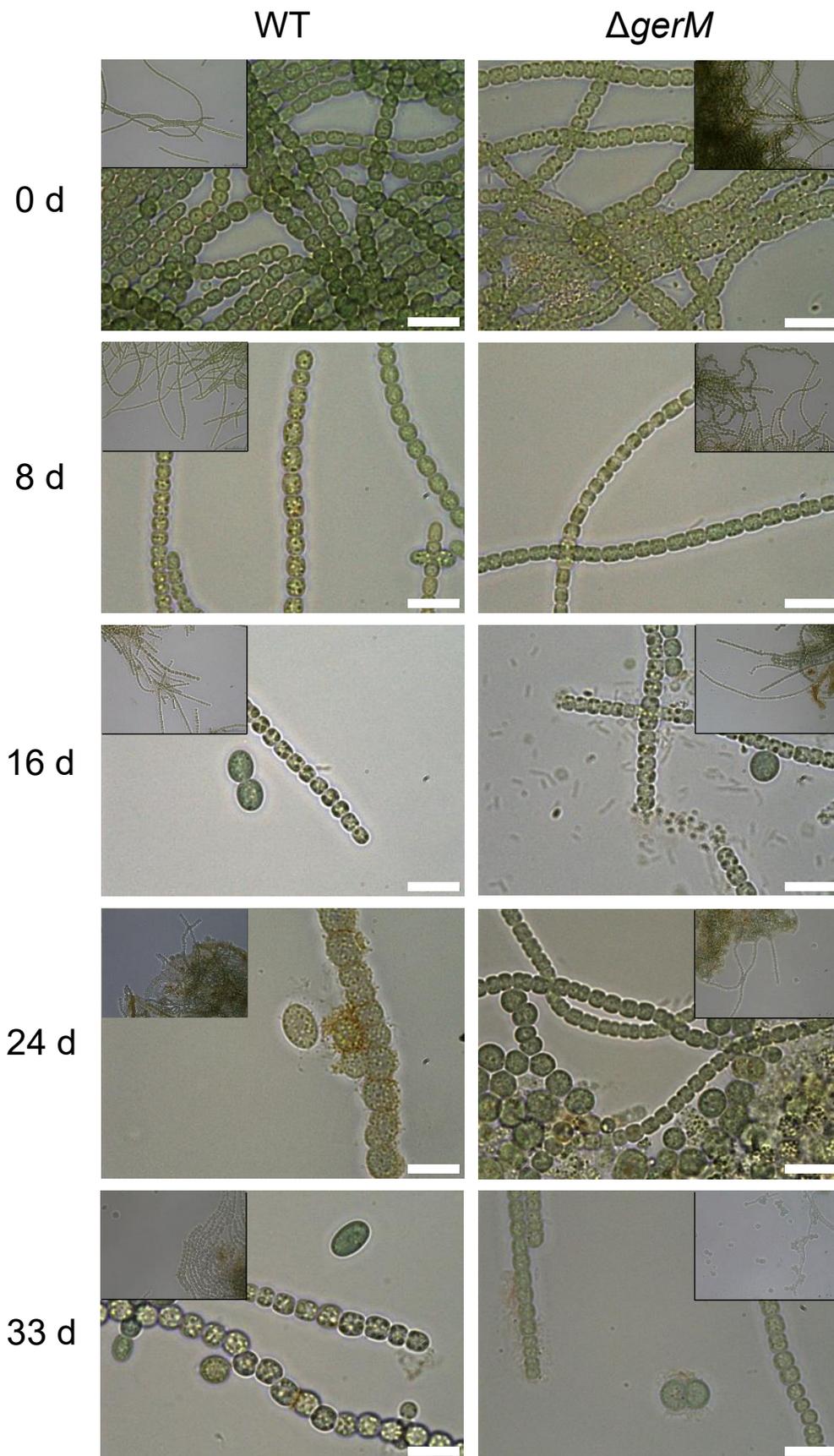


**Abbildung 28: Differenzierungspotential der *gerM*-Mutante in *N. punctiforme*.** A) vegetative Zellen B) Heterozysten C) Hormogonien. Zellen mit besonders großen oder vielen Speichergranula sind mit einem weißen Pfeil versehen, Heterozysten sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Rote Pfeile weisen auf Filamenthüllen hin. Größenstandard: 10  $\mu\text{m}$ .

Die Charakterisierung der Akinetendifferenzierung ist schwierig, da die Entwicklung der Akineten in einer Kultur asynchron abläuft. Die Akineten von *N. punctiforme* bleiben oft als Filament zusammen (Perez et al., 2016), sie sind größer als vegetative Zellen und besitzen viele Speicherstoffe.

Die Differenzierung von Akineten kann durch verschiedene Reize erfolgen und ist speziesspezifisch. Für *N. punctiforme* ist der Entzug von Phosphat im Medium der effektivste Reiz (Perez et al., 2016). Abbildung 29 zeigt den Verlauf der Akinetendifferenzierung über 33 Tage, induziert durch Phosphatmangel.

Bei der *gerM*-Mutante verläuft die Differenzierung zu Akineten langsamer als beim WT. Bereits nach acht Tagen besitzen viele Filamente des WT Granula, während die *gerM*-Mutante weniger Granula besitzt als vor dem Phosphatentzug. Dieser Effekt ist nach 16 Tagen nicht mehr zu sehen. Sowohl WT als auch *gerM*-Mutante sind granulös. Nach 24 Tagen haben die Zellen in beiden Kulturen an Volumen zugenommen. Bei der *gerM*-Mutante wird deutlich, dass die Zellen sich vermehrt aus dem Verbund des Filaments lösen. Mit zunehmendem Alter der Kulturen ist dieser Effekt deutlicher zu sehen. Nach 33 Tagen besteht die Kultur der *gerM*-Mutante aus vegetativen Filamenten, welche noch nicht in die Differenzierung zu Akineten eingetreten sind, und vielen unizellulären Akineten. Diese Fragmentierung ist stärker als im WT.



**Abbildung 29:** Verlauf der Akinetendifferenzierung der *gerM*-Mutante in *N. punctiforme*. Das kleine Bild zeigt eine Übersicht der Kultur, die größere Aufnahme zeigt die Filamente im Detail. Zum Vergleich ist der Verlauf der Akinetendifferenzierung des WT gezeigt. Größenstandard: 10  $\mu$ m.

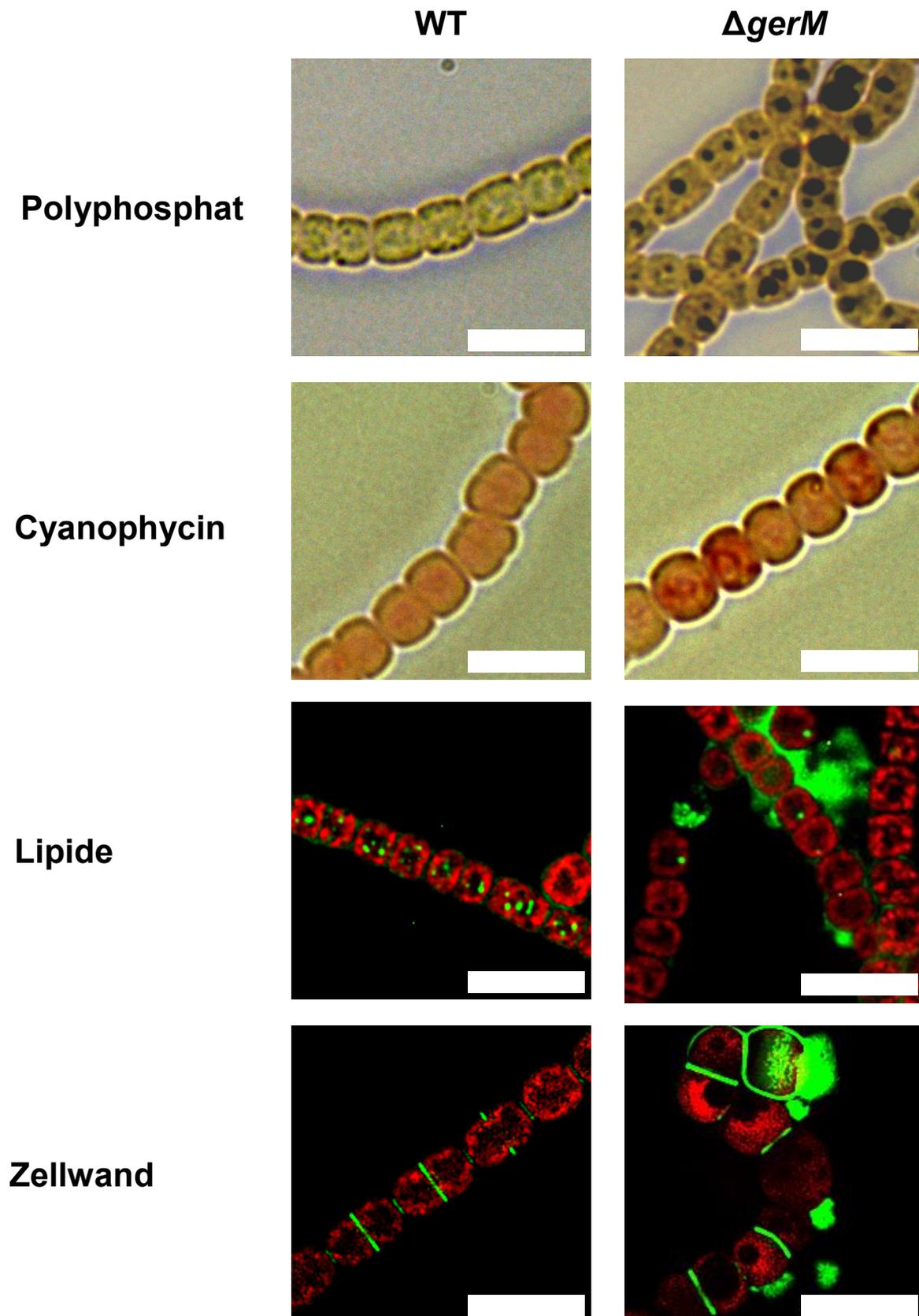
### 6.7.3 Mikroskopische Charakterisierung der *gerM*-Mutante durch Färbemethoden

Mit verschiedenen Färbemethoden können Granula und andere Zellkomponenten angefärbt werden, sodass auch subtilere Unterschiede zwischen WT und *gerM*-Mutante zu erkennen sind. Abbildung 30 zeigt vier verschiedene Färbungen, die verschiedene Zellstrukturen hervorheben. Der Speicherstoff Polyphosphat wird mit der Neisser-Färbung (5.6.3.1) dunkel gefärbt. Cyanophycin erscheint rot durch die Sakaguchi-Reaktion (5.6.3.2). Der Einsatz von BODIPY lässt Lipidtröpfchen grün fluoreszieren (5.6.3.3). Auch VanFL fluoresziert grün. Es zeigt den Einbau neuen Materials in das vorhandene Peptidoglykangerüst, da es wie die von Vancomycin an D-Ala-D-Ala bindet (5.6.3.4). Der WT ist jeweils der Mutante gegenübergestellt.

Der *N. punctiforme* WT reicherte kein Polyphosphat an, in der *gerM*-Mutante sind dagegen große Phosphatgranula zu erkennen. Diese Granula sind in einigen Zellen sehr groß (Abbildung 30). Cyanophycin ist ein Polymer und besteht aus gleichen Teilen L-Asparaginsäure und L-Arginin. Es wird während der Entwicklung zu Akineten von *N. punctiforme* WT gebildet (QUER, Perez et al., 2016, Simon, 1971). Beim WT ist Cyanophycin in vegetativen Zellen nicht vorhanden. In der *gerM*-Mutante wurde Cyanophycin mit der Sakaguchi-Reaktion in vielen vegetativen Zellen gefunden.

In Cyanobakterien wie *N. punctiforme* werden Lipide in kleinen Tröpfchen gespeichert. Der Fluoreszenzfarbstoff BODIPY lagert sich in diese ein. Die Übereinanderlegung der Aufnahme der Autofluoreszenz der vegetativen Zellen und die Lipidtröpfchen im GFP-Kanal ermöglicht die Lokalisation innerhalb der Zellen. Die vegetativen Zellen des WT besitzen Lipidtröpfchen und auch die Cytoplasmamembran wird leicht angefärbt. Die *gerM*-Mutante speichert Lipidtröpfchen in den vegetativen Zellen. Die ausufernden Bereiche der Grünfärbung sind durch Material von abgestorbenen Zellen und Filamenten begründet.

Der Ort der Peptidoglykansynthese in filamentösen Cyanobakterien ist das Septum (Schubert, 2014). Dies gilt auch für *N. punctiforme* WT und die *gerM*-Mutante. Der Fluoreszenzfarbstoff VanFL färbte überwiegend die Septen ein. Zusätzlich führte Material toter Zellen zu weiterem Signal im GFP-Kanal (Abbildung 30). Die *gerM*-Mutante akkumuliert im Gegensatz zum WT Polyphosphat und Cyanophycin.



**Abbildung 30: Vergleich von *N. punctiforme* WT und *gerM*-Mutante.** Zur Detektion von Polyphosphat (dunkelblau) wurde die Neisser-Färbung verwendet (Hellfeld). Der Speicherstoff Cyanophycin wurde durch die Sakaguchi-Reaktion rot angefärbt (Hellfeld). Die Lokalisation von Lipidtröpfchen und der Einbau neuer Bausteine in das Peptidoglykangerüst wurde durch Überlagerung der Autofluoreszenz der Filamente und dem GFP-Kanal sichtbar. Größenstandard: 7,5  $\mu\text{m}$ .

#### 6.7.4 Ultrastruktur der *gerM*-Mutante

Aufnahmen mittels TEM sollten einen detaillierten Blick in die Zellen der *gerM*-Mutante gewähren. Abbildung 31 zeigt die Feinstruktur des WT und der *gerM*-Mutante im Vergleich.

Der WT von *N. punctiforme* zeigt regelmäßig geformte Zellen. Das Filament liegt in der Schnittebene. Einige Zellen enthalten Polyphosphat (PP) als Speicherstoff (Abbildung 31). In den Zellen ist Glykogen in kleinen elektronendichten Granula (schwarze Pfeilspitzen) zu sehen. Ein höherer Gehalt an Glykogen wurde in Zellen gefunden, die sich in einer postexponentiellen Phase befinden (Perez et al., 2016, Chao and Bowen, 1971).

Dünnschnitte der *gerM*-Mutante zeigen ähnlich viel Glykogen in den Zellen. Zusätzlich besitzen die Zellen eine ausgedehnte Schicht an Exopolysacchariden (EP) und größere Polyphosphatgranula (PP). Der Dünnschnitt der *gerM*-Mutante zeigt eine intakte Zelle (I) und drei weitere in unterschiedlichen Stadien der Auflösung (II/III/IV). Die Filamente befinden sich senkrecht zur Schnittebene. Bei den Zellen II-IV stellt die Cytoplasmamembran keine Barriere mehr gegen den Extrazellularraum dar. Es haben sich kleine Membranvesikel gebildet. Viele Vesikel haben keinen Inhalt, andere enthalten Glykogen (rote Pfeilspitzen). Die Tylakoidmembran ist weniger organisiert und löst sich auf. Einige Glykogengranula sind bereits in den Extrazellularraum übergetreten (schwarze Pfeilspitzen). Warum viele Zellen der *gerM*-Mutante absterben, ist bisher nicht bekannt.

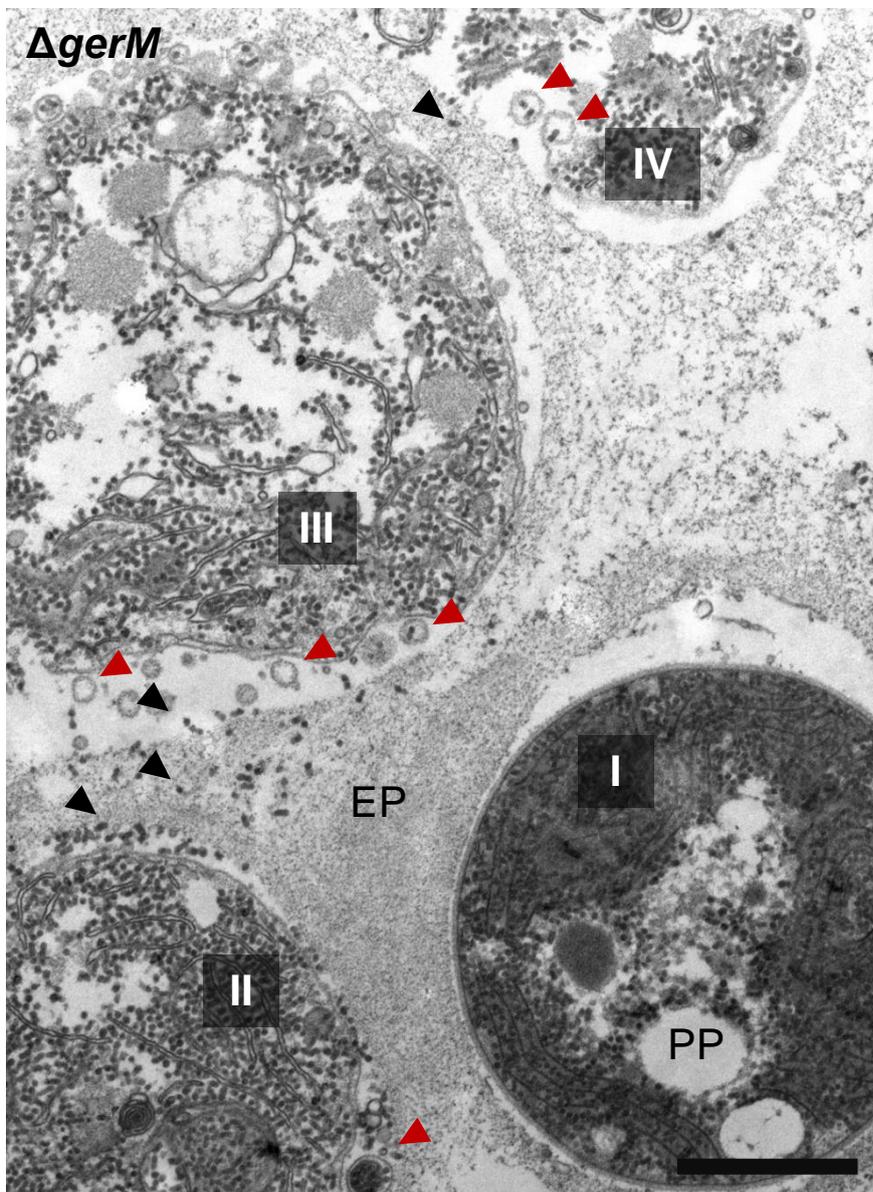
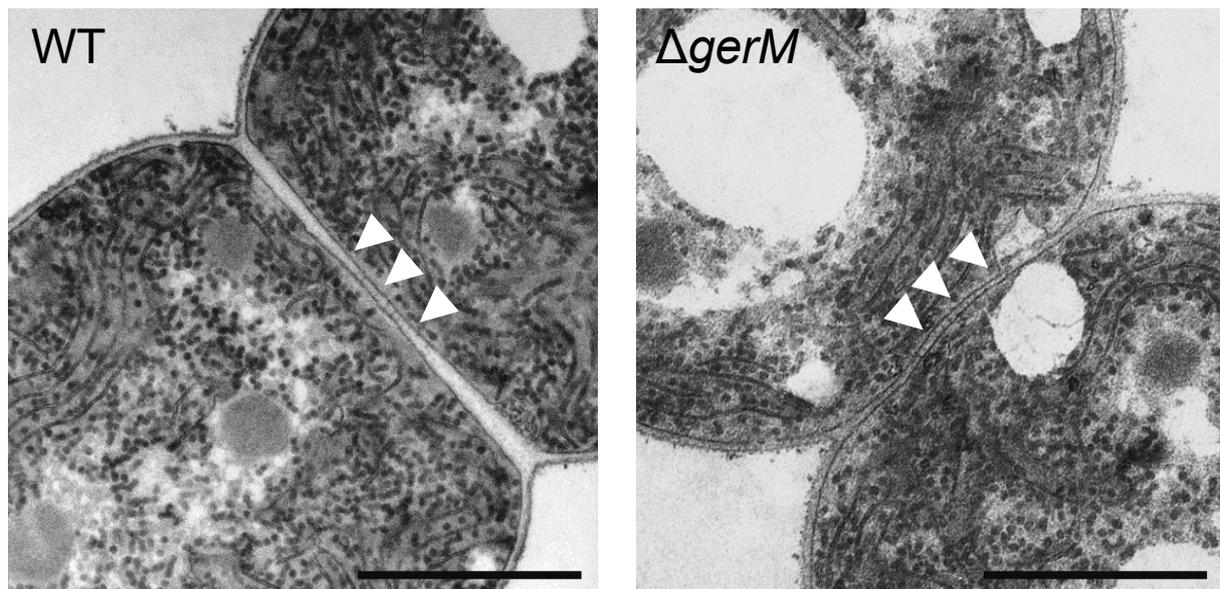


Abbildung 31: Ultrastruktur der *gerM*-Mutante im Vergleich zum WT in *N. punctiforme*. Der Dünnschnitt der *gerM*-Mutante zeigt Zellen in verschiedenen Stadien der Auflösung (I-IV). **PP**: Polyphosphat; **EP**: Exopolysaccharid; schwarze Pfeilspitzen: Glykogengranula; rote Pfeilspitzen: Membranvesikel; Größenstandard: 1,1  $\mu\text{m}$ .

Der *Nanopore Array* ist für die Zell-Zell-Kommunikation eine Grundvoraussetzung. Die Poren des *Nanopore Array* sind das Gerüst für proteinöse *Septal Junctions*, Septumsübergänge, welche die Kommunikation ermöglichen. Die *Septal Junctions* sind als kontrastreiche Brücken zwischen den vegetativen Zellen im Filament zu erkennen (Abbildung 32). Sowohl im WT als auch in der *gerM*-Mutante sind diese septalen Zell-Zell-Verbindungen in Dünnschnitten zu erkennen (weiße Pfeilspitzen). Ob diese Verbindungen für die Kommunikation funktionell sind, bleibt zu klären.



**Abbildung 32: Detailansicht des Septums in Ultradünnschnitten.** *N. punctiforme* WT und *gerM*-Mutante weisen beide *Septal Junctions* auf (weiße Pfeilspitzen). Größenstandard: 1,1  $\mu\text{m}$ .

## 6.8 Npf5024 (Npun\_F5024) als putativer Interaktionspartner von AmiC2

Im Pulldown mit AmiC2 wurde auch ein Protein identifiziert, das wie NlpD eine LysM-Domäne und eine Peptidase\_M23-Domäne aufweist: Npf5024. Im Gegensatz zu NlpD aus *E. coli* wurde bei Npf5024 *in silico* kein Lipidanker gefunden. Bei *E. coli* konnte eine boolische Regulation der homologen Amidase AmiC von NlpD *in vitro* nachgewiesen werden (Rocaboy et al., 2013). Eine Erhöhung der Amidase-Aktivität durch NlpD-Homologe wurde beispielsweise auch in *Neisseria gonorrhoeae* und *Vibrio cholerae* gefunden (Lenz et al., 2016, Stohl et al., 2015, Möll et al., 2014). Das Protein Npf5024 besteht aus 297 AS inklusive einer Sec-Signalsequenz (Abbildung 34).

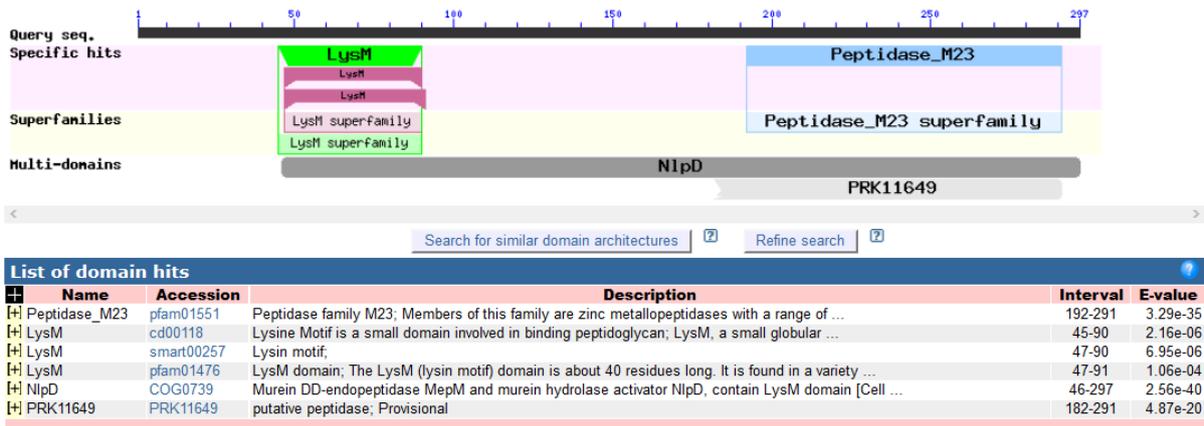


Abbildung 33: BLAST-P Analyse der AS-Sequenz von Npf5024 aus *N. punctiforme*.

Die Kombination einer LysM-Domäne (pfam01476) und einer LytM-Domäne (pfam01551) ist charakteristisch für NlpD-Proteine. Der Phänotyp einer *npf5024*-Mutante und die Lokalisierung von Npf5024 sollten Aufschluss über die Funktion des Proteins in *N. punctiforme* geben.

#### AS-Sequenz Npf5024 (297 AS)

**MTLTFRQLFL CSLVSALGLV SILPNLNSAN AAVGGCPIPA LSRFQRHKVV**  
**RGETLESIAQ RYNLIPTTII GMNPALQNGA VAVGSLVLI PPYNGIVVEV**  
 PRGQTRQVA AQYKVRADSL FEVNGCQDP RIVFVPGVNW SPNGVVTKSP  
 LPTDAATPNR ASLSGYPLAQ VANVGLAYGW QINPATGEVF **FHSGVDLLAP**  
**VGSNVLAIAP GTVAFANDQG SYGKLVIIINH SGLQSRYAQ LDSIKVTVGQ**  
**QVKKGDLLGT VGTSKPTST QPHLHFVRS TSLGWVAQD PKGYLKK**

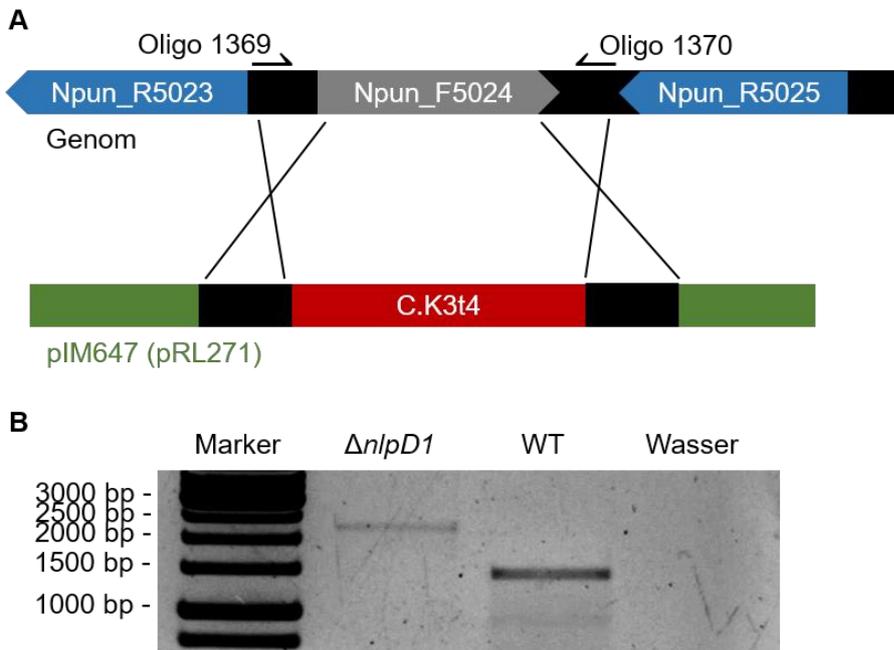
Abbildung 34: AS-Sequenz des Npf5024-Proteins. In Fett und unterstrichen ist die Sec-Signalsequenz (AS 1-31). Dunkelgrau unterlegt ist die LysM-Domäne (AS 45-91) und hellgrau ist die LytM-Domäne (AS 192-291) markiert. Der gesamte Bereich von LysM bis LytM wird in BLAST-P als NlpD erkannt.

#### 6.8.1 Gezielte Mutagenese von *npf5024*

Durch homologe Rekombination wurde das Gen (Npun\_F5024) durch die C-K3t4-Kassette ersetzt. *In silico* wurde eine eigene Promotorregion für *npf5024* identifiziert. Die Lage der Nachbargene deutet nicht auf eine Organisation innerhalb eines Operons hin (Abbildung 35A). Das Gen Npun\_R5023 ist als Serinprotease annotiert, Npun\_R5025 kodiert für eine Cysteinhydrolase.

Zur Generierung der *npf5024*-Mutante wurde der Vektor pIM647 mittels triparentaler Konjugation in *N. punctiforme* eingebracht und die Substitution von *npf5024* mittels PCR überprüft. Die Verwendung der Oligos 1369 und 1370 führen im WT-Allel zu einem Amplifikat in der Größe von 1428 bp. Nach der Substitution des Gens Npun\_F5024 durch die C.K3t4-Kassette

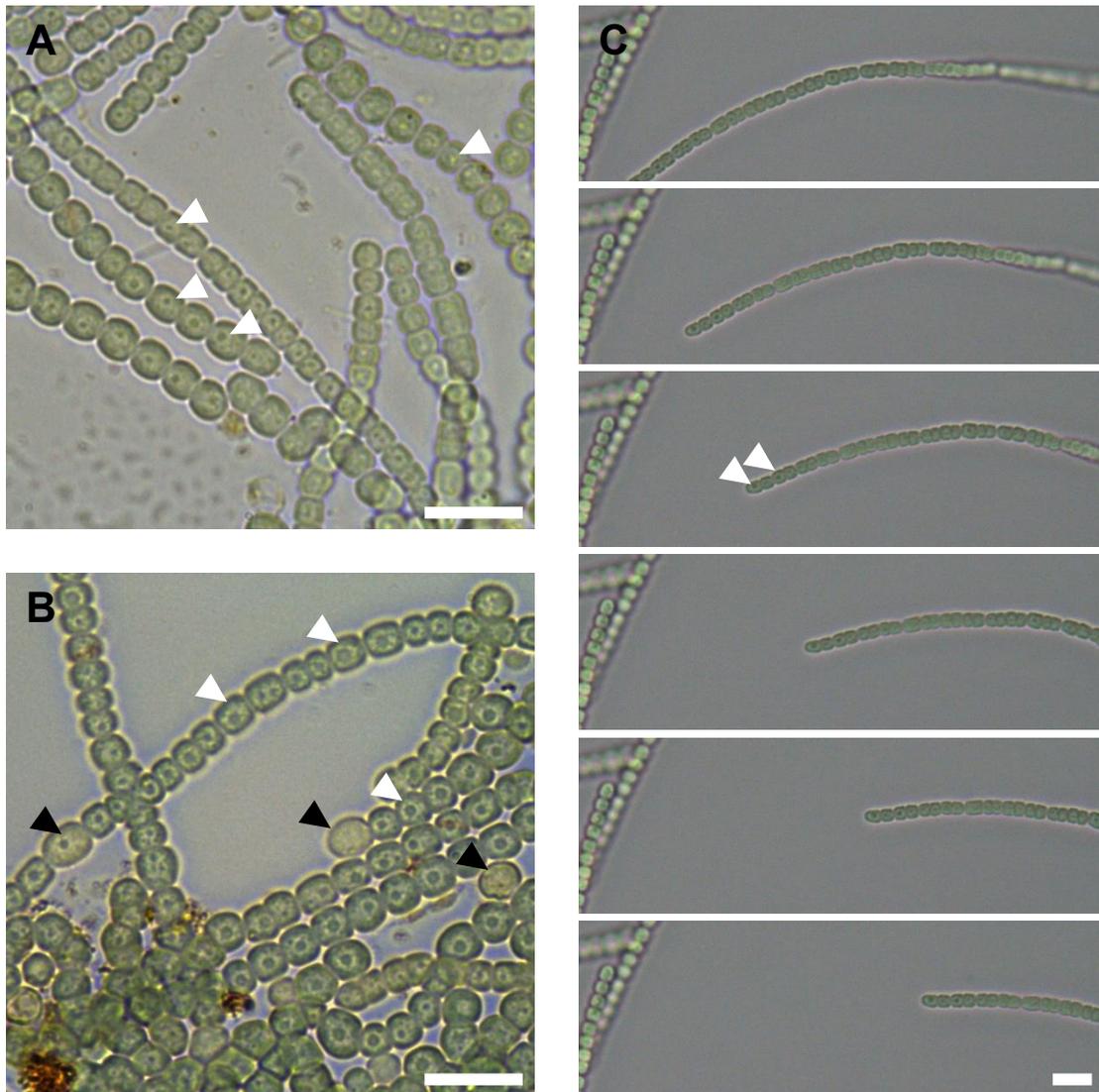
zeigte sich nach der Kolonie-PCR ein Amplifikat von 2204 bp Länge. Wasser diente als Negativkontrolle der PCR. Die *npf5024*-Mutante ist vollständig segregiert (Abbildung 35B).



**Abbildung 35: Verifizierung der *npf5024*-Mutante in *N. punctiforme*.** **A)** Schematische Darstellung der genomischen Umgebung und der homologen Rekombination mit pIM647. **B)** Agarosegelelektrophorese einer Kolonie-PCR. Mit den Oligos 1369 und 1370 entstand im WT ein Amplifikat von 1428 bp, nach erfolgter Insertion der Resistenzkassette C.K3t4 war das Amplifikat 2204 bp lang. Wasser diente als Kontrolle der PCR. Die *npf5024*-Mutante ist vollständig segregiert.

### 6.8.2 Wachstum und Differenzierungspotential der *npf5024*-Mutante

Die vegetativen Zellen der *npf5024*-Mutante zeichnen sich durch eine schnelle Zellteilung aus (Abbildung 36A). Viele Filamente bestanden aus wenig elongierten Zellen. Zudem beinhalteten viele Filamente Granula etwa mittig in den jeweiligen Zellen (weiße Pfeilspitzen). Die *npf5024*-Mutante bildete funktionsfähige Heterozysten (Abbildung 36B, schwarze Pfeilspitzen). Selbst nach zwei Wochen ohne Stickstoff im Medium zeigte die Kultur kein Ausbleichen und wuchs (nicht gezeigt). Die vegetativen Zellen zwischen den Heterozysten beinhalteten ebenfalls wie manche Heterozysten der *npf5024*-Mutante Granula. Die *npf5024*-Mutante bildete bewegungsfähige Hormogonien. Im Unterschied zu Hormogonien des *N. punctiforme* WT besaßen auch die Hormogonien der *npf5024*-Mutante Granula (Abbildung 36C, weiße Pfeilspitzen), welche hinsichtlich Position und Lichtverhalten den Granula in vegetativen Zellen glichen.



**Abbildung 36: Differenzierungspotential der *npf5024*-Mutante in *N. punctiforme*. A) vegetative Zellen B) Heterozysten C) bewegungsfähige Hormogonien. Granula sind durch weiße Pfeilspitzen gekennzeichnet. Sogar in den Hormogonien sind diese Granula vorhanden. Die schwarzen Pfeilspitzen in Teilbild B heben die Heterozysten hervor. Größenstandard: 10  $\mu$ m.**

Ob die Filamente der *npf5024*-Mutante noch fähig waren, Akineten auszubilden, wurde durch Phosphatentzug getestet. Zuvor wurden die Zellen für neun Tage in Vollmedium (A+A1/4 mit Nitrat, Ammonium und MOPS) gezogen (5.3.5.2). In dieser Ausgangssituation zeigten die Zellen der *npf5024*-Mutante kaum Unterschiede zum WT. Acht Tage nach Entzug des Phosphats wiesen weniger Filamente der *npf5024*-Mutante Granula auf als der WT. Auch nach 16 Tagen waren weniger Filamente der *npf5024*-Mutante in den Differenzierungsprozess zu Akineten eingetreten. Vereinzelt zeigten sich vergrößerte Zellen, die keine Granula beinhalteten. Nach 24 Tagen stieg die Häufigkeit von Filamenten mit granulösen Zellen an. Vereinzelt waren auch einzellige Akineten zu sehen. Die Häufigkeit einzelliger Akineten nahm nach 33 Tagen des Phosphatentzugs noch zu.

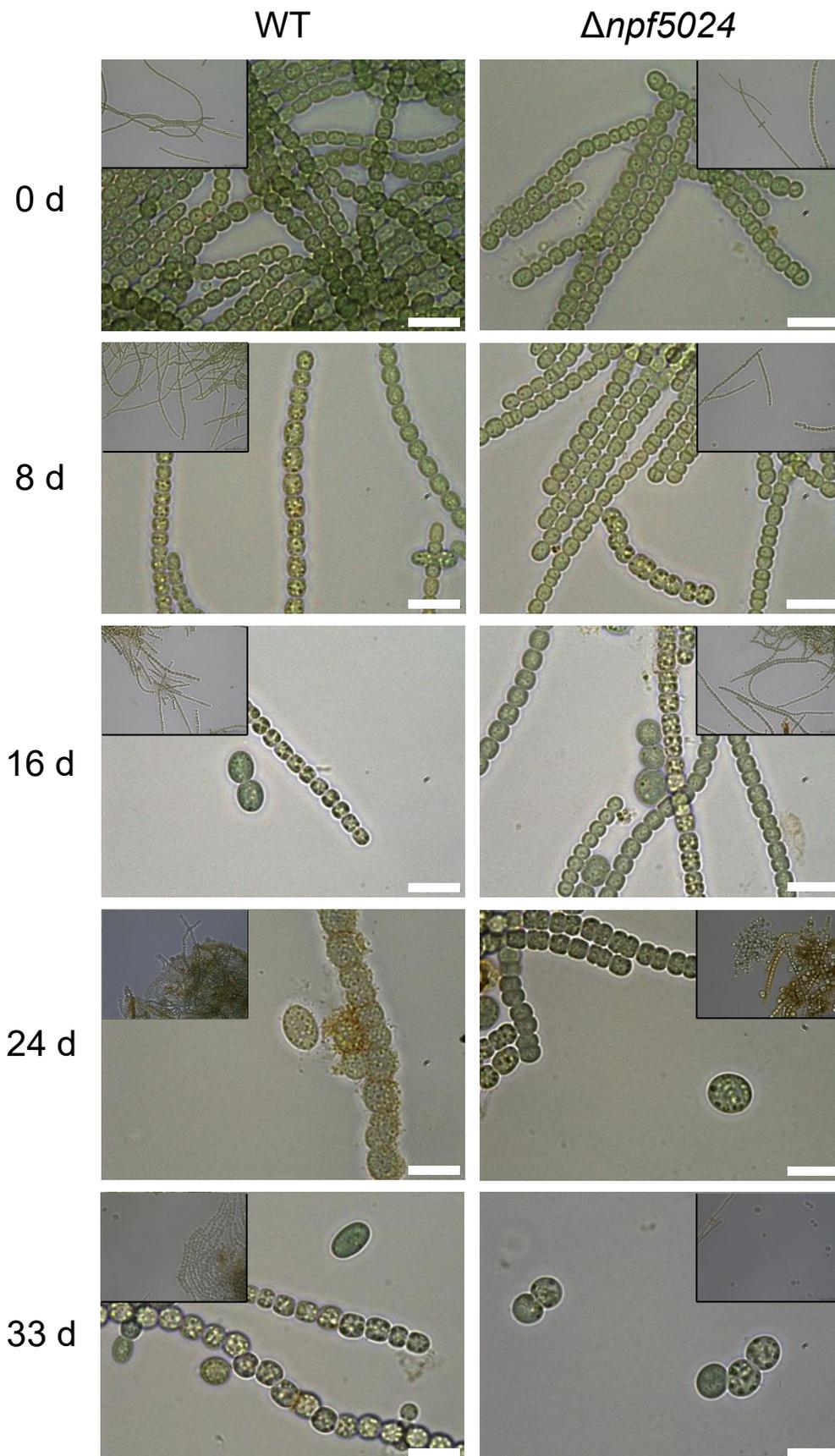


Abbildung 14: Differenzierung von Akineten der *npf5024*-Mutante in *N. punctiforme*. Hellfeldaufnahmen vor der Akineteninduktion (0 d) und nach Phosphatentzug. Größenstandard: 10  $\mu\text{m}$ .

### 6.8.3 Mikroskopische Charakterisierung der *npf5024*-Mutante durch Färbungen

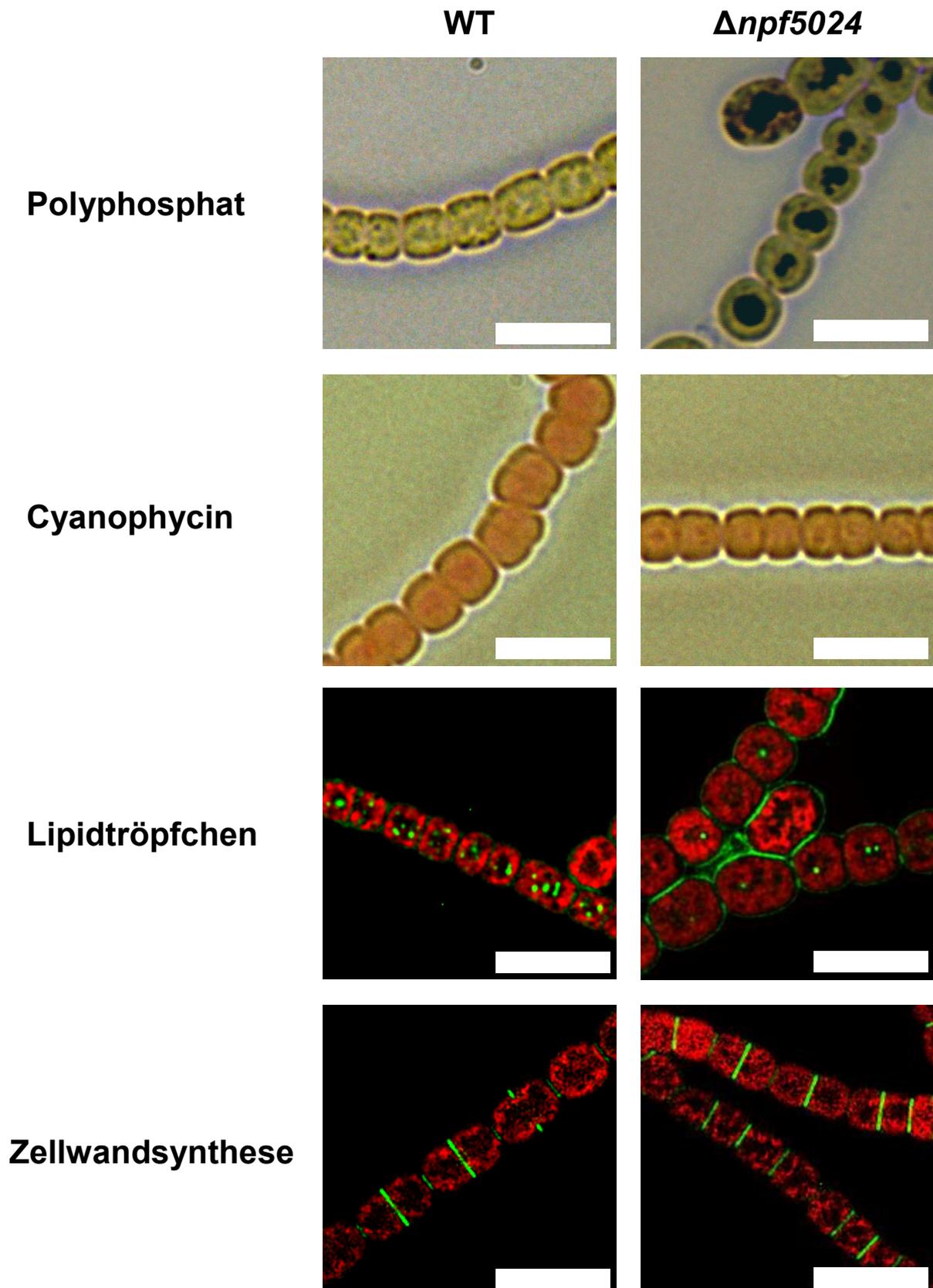
In lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigte die *npf5024*-Mutante eine höhere Granulabildung im Vergleich zum WT von *N. punctiforme*. Mit Färbemethoden können unterschiedliche Granula und andere Zellkomponenten angefärbt werden, sodass auch feine Unterschiede zwischen WT und *npf5024*-Mutante zu erkennen sind. Die Abbildung 37 zeigt vier verschiedene Färbungen, die jeweils verschiedene Zellstrukturen hervorheben.

Der Speicherstoff Polyphosphat wurde von dem *N. punctiforme* WT nicht angereichert, in der *npf5024*-Mutante sind dagegen große Phosphatgranula zu sehen. Diese Granula nehmen viel Volumen in den Zellen ein.

In vegetativen Zellen des WT war Cyanophycin nicht vorhanden. In vegetativen Zellen der *npf5024*-Mutante wurde Cyanophycin ebenfalls nicht akkumuliert.

Wie der WT speicherte die *npf5024*-Mutante ebenfalls Lipidtröpfchen in den vegetativen Zellen, ein signifikanter Unterschied in der Anzahl oder Größe der Tröpfchen zum WT wurde nicht festgestellt. Die deutliche Anfärbung außerhalb der Zellwand kam wahrscheinlich durch extrazelluläres Material zustande.

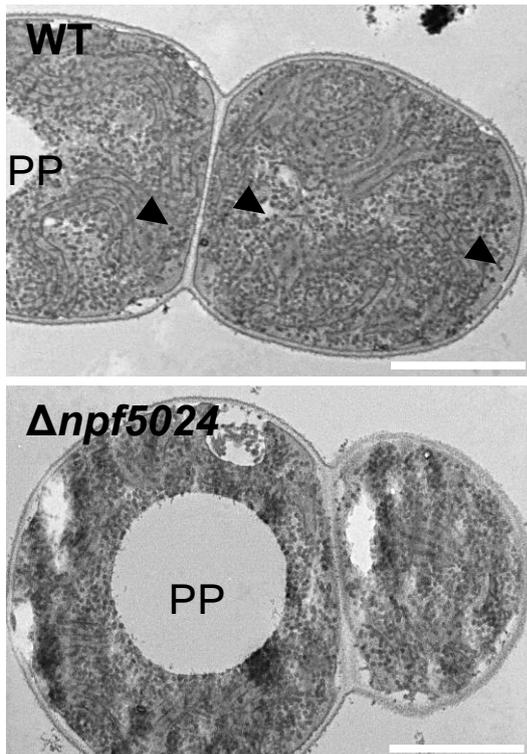
Die Septen fluoreszierten grün, nachdem sie mit VanFL gefärbt wurden (Abbildung 37). Die vegetativen Zellen der *npf5024*-Mutante unterscheiden sich vom WT durch die starke Akkumulation von Polyphosphat. In Bezug auf Cyanophycin, Lipidtröpfchen und Peptidoglykangeneese gleicht die *npf5024*-Mutante dem WT.



**Abbildung 37: Vergleich verschiedener Zellkomponenten des *N. punctiforme* WT und der *npf5024*-Mutante.** Zur Detektion von Polyphosphat (dunkelblau) wurde die Neisser-Färbung verwendet (Hellfeld). Der Speicherstoff Cyanophycin wurde durch die Sakaguchi-Reaktion rot angefärbt (Hellfeld). Die Lokalisation von Lipidtröpfchen und der Einbau neuer Bausteine in das Peptidoglykangerüst wurde durch Überlagerung der Autofluoreszenz der Filamente und dem GFP-Kanal sichtbar. Größenstandard: 7,5  $\mu\text{m}$ .

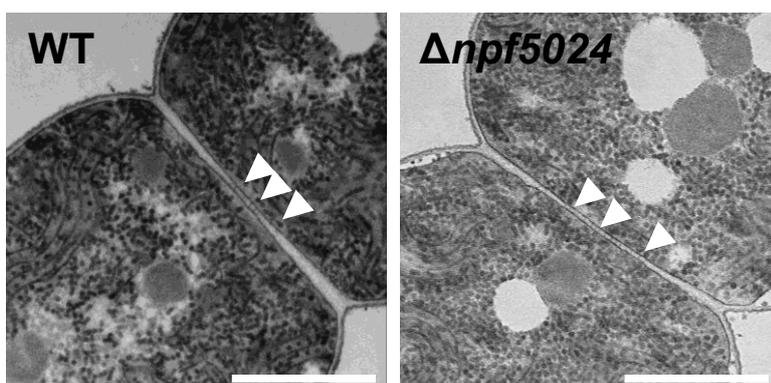
6.8.4 Ultrastruktur der *npf5024*-Mutante

Die Feinstruktur kann mittels Transmissionselektronenmikroskopie von Dünnschnitten betrachtet werden. Die Dünnschnitte der *npf5024*-Mutante zeigten ähnlich viel Glykogen in den Zellen wie Aufnahmen vom WT. Die Polyphosphatgranula (PP) einiger Zellen der *npf5024*-Mutante waren dagegen sehr voluminös.



**Abbildung 38:** Ultradünnschnitt von vegetativen Zellen des WT und der *npf5024*-Mutante in *N. punctiforme*. In vielen vegetativen Zellen der *npf5024*-Mutante sind große Phosphatgranula (PP) zu sehen. Größenstandard: 1,1  $\mu\text{m}$ .

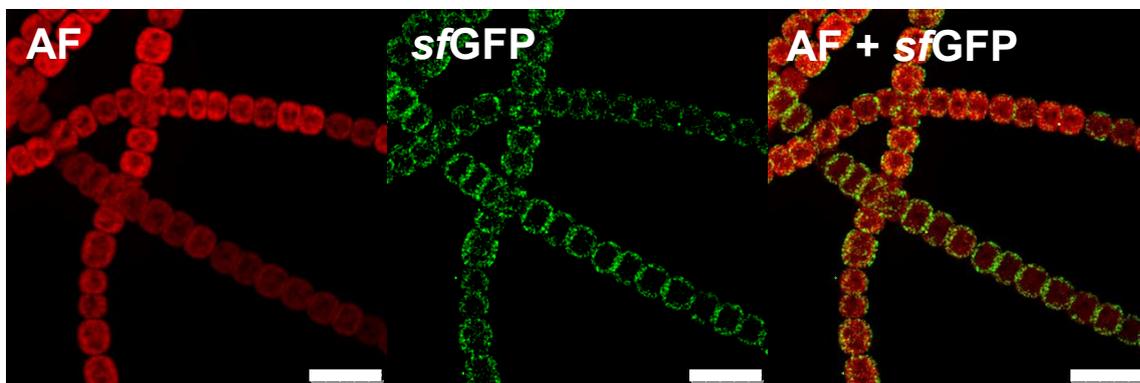
Die Abbildung 39 zeigt Dünnschnitte senkrecht zum Septum von WT und *npf5024*-Mutante. Die weißen Pfeilspitzen deuten auf *Septal Junctions*, welche im WT die Nachbarzellen miteinander verbinden und den Stoffaustausch steuern.



**Abbildung 39:** Detailansicht des Septums in Ultradünnschnitten. *N. punctiforme* WT und *npf5024*-Mutante weisen beide *Septal Junctions* auf (weiße Pfeilspitzen). Größenstandard: 1,1  $\mu\text{m}$ .

### 6.8.5 Lokalisation von Npf5024 in *N. punctiforme*

Zur zellulären Lokalisation von Npf5024 in *N. punctiforme* wurde eine C-terminale GFP-Fusion unter Kontrolle des nativen *npf5024*-Promotors konstruiert und in den WT gebracht. Die Verwendung des nativen Promotors des Gens ermöglichte auch im Hintergrund des WT Aufschluss über die Häufigkeit und Situation, in der das Gen abgelesen wird. Die Übereinanderlagerung der Aufnahme der Autofluoreszenz und des Signals des Fusionsproteins ermöglichte die Lokalisation von Npf5024 in den Filamenten. Das Npf5024-Protein wurde in vegetativen Zellen in das Periplasma transportiert und lokalisierte dort gleichmäßig. Es war kein Signal des Proteins im Cytoplasma auszumachen. Es gab keine Anreicherung des Proteins am Septum.



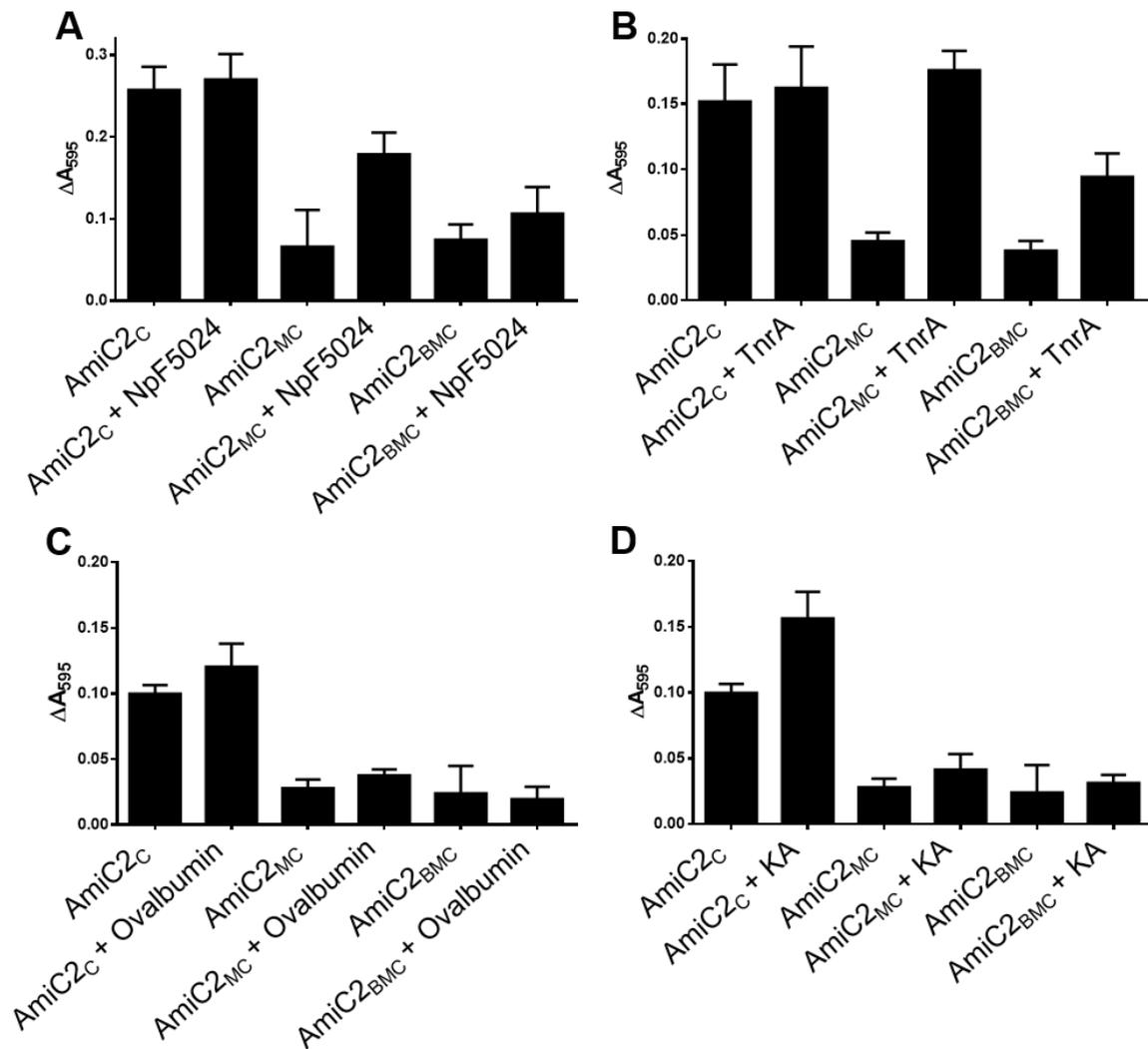
**Abbildung 40: Lokalisation des Npf5024sfGFP in vegetativen Filamenten von *N. punctiforme*.** AF) Autofluoreszenz der vegetativen Zellen sfGFP) Lokalisation des Npf5024sfGFP. Durch die Überlagerung der beiden Kanäle wird deutlich, dass Npf5024sfGFP in der Zellwand lokalisiert. Die Verteilung ist gleichmäßig; es gibt keine Präferenz für die Region des Septums. Größenstandard: 7,5 µm.

### 6.8.6 Das Npf5024-Protein als putativer Interaktionspartner von AmiC2

In *E. coli* wurde die Interaktion von AmiC und NlpD auch durch die Verwendung von Dye-Release-Assays aufgeklärt (Rocaboy et al., 2013). Das Npf5024-Protein besitzt eine ähnliche Domänenorganisation wie NlpD aus *E. coli* und könnte in *N. punctiforme* AmiC2 regulieren. Das Protein Npf5024 wurde mittels His-Tag über Affinitätschromatographie und anschließender Größenausschlusschromatographie gereinigt. Die Abbildung 41A zeigt den Effekt der äquimolaren Zugabe von Npf5024 zu verschiedenen trunkierten Versionen von AmiC2. Alleine zeigte Npf5024 keine PG-hydrolytische Aktivität im Dye-Release-Assay (nicht gezeigt). Dies ist in völliger Übereinstimmung zu Beobachtungen von NlpD-Proteinen anderer Organismen (Stohl et al., 2015, Rocaboy et al., 2013). Als Zusatz zu AmiC2<sub>C</sub> hatte Npf5024 keinen Einfluss auf die Aktivität. Wurde Npf5024 zu AmiC2<sub>MC</sub> oder zu AmiC2<sub>BMC</sub> gegeben, so war deren Aktivität erhöht. Das gleiche Experiment wurde mit TnrA durchgeführt mit dem gleichen Ergebnis. Die katalytische Domäne von AmiC2 (AmiC2<sub>C</sub>) wurde nicht durch TnrA beeinflusst. Die

längeren Varianten von AmiC2 (AmiC2<sub>MC</sub> und AmiC2<sub>BMC</sub>) erfuhren eine Aktivierung. Das TnrA-Protein stammt aus *Bacillus subtilis* und ist dort im Cytoplasma der Haupttranskriptionsregulator unter Stickstoffmangelbedingungen (Kayumov et al., 2011).

Dienten Ovalbumin oder die Karbonische Anhydrase (KA) als Kontrolle, so wurden AmiC2<sub>MC</sub> und AmiC2<sub>BMC</sub> nicht aktiviert. Die Anwesenheit dieser Kontrollproteine führte jedoch zu einer leichten Steigerung der Aktivität von AmiC2<sub>C</sub>.



**Abbildung 41: Dye-Release-Assays mit verschiedenen AmiC2-Versionen und Npf5024 und verschiedenen Kontrollproteinen.** Alle Proteine wurden in äquimolaren Konzentrationen eingesetzt. (A) AmiC2 mit Npf5024 (B) AmiC2 mit dem Kontrollprotein TnrA (C) AmiC2 mit dem Kontrollprotein Ovalbumin (D) AmiC2 mit dem Kontrollprotein Karbonische Anhydrase. Alle Proteinpartner zeigten alleine im Dye-Release-Assay keine Aktivität (nicht gezeigt). Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

## 6.9 SlpD (Npun\_R1578) als putativer Interaktionspartner von AmiC2

Das Protein, welches von Npun\_R1578 kodiert wird, ist im Pulldown-Experiment als putativer Interaktionspartner von AmiC2 identifiziert worden (6.6). Aufgrund von Homologien zu SleB-Proteinen aus *Bacillus subtilis* (Masayama et al., 2006) wurde Npun\_R1578 SlpD (*SleB-like protein*) genannt. Die Hydrolase-Domäne, welche in SleB-Proteinen vorkommt, fehlt in SlpD. Inklusive Sec-Signalsequenz (Petersen et al., 2011) ist SlpD 449 AS lang. Mittels BLAST-P konnten vier putative PG-Bindedomänen identifiziert werden (PG\_binding\_1; pfam01471; Abbildung 43). Diese sind durch das „D“ gekennzeichnet, welches die vierte Position im Alphabet einnimmt. Diese Domänen sind in vielen PG-hydrolysierenden Enzymen C- oder N-terminal enthalten.

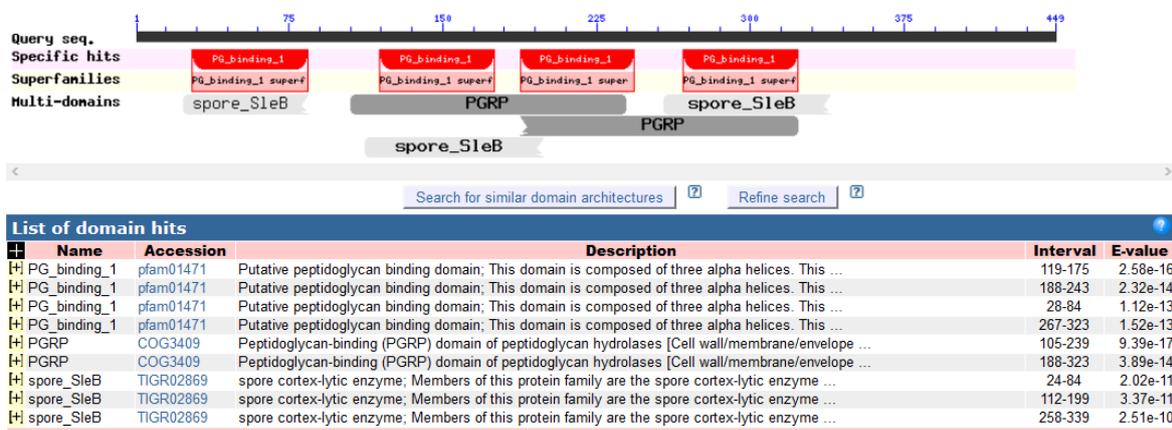


Abbildung 42: BLAST-P Analyse der AS-Sequenz von SlpD. aus *N. punctiforme*.

Am C-Terminus wurde eine 30 AS-lange Sequenz als SPOR-Domäne erkannt (pfam05036). Normalerweise besteht die SPOR-Domäne aus zwei Wiederholungen von 35 AS und dient der PG-Bindung, meist in Assoziation mit dem FtsZ-Ring (Yahashiri et al., 2015). Durch Charakterisierung einer Insertionsmutante und der Lokalisation des Proteins nach dessen Fusion an *sfGFP* sollte die Funktion von SlpD analysiert werden. Da diese Mutante länger brauchte, bis sie vollständig segregiert war, steht die Charakterisierung weitestgehend noch aus.

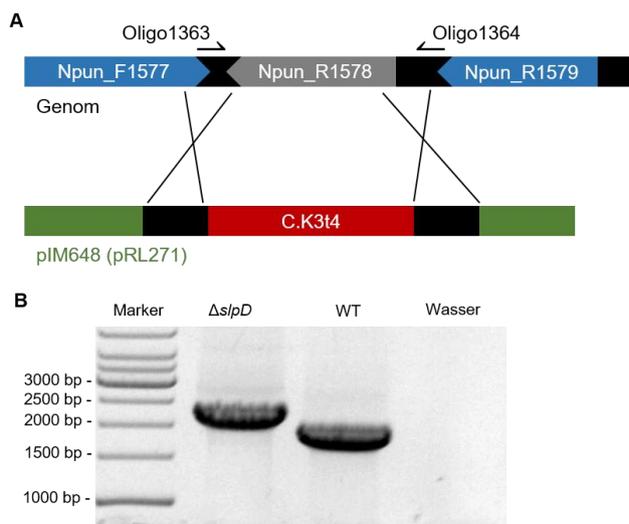
## AS-Sequenz von SlpD (449 AS)

MRLLSAAIIT GLLSIAGQSL ALQKIGSNGS EVTSSQRCLK KLGYFNGPVS  
GKFASLTQNA VIKFQQANRI PADGVVGINT QQALQRACQS RTSSSASRRR  
STTQASPSGQ YPVLSQGKTG AAVTRLQQL RQLGYLNANA TGTFGPMTRD  
AVIKFQRNYR IAANGIVNRQ TWNALLGSSP TQTRSSLSTQ QVRELQGRLQ  
QLGYFNTSPT GKIGPMTRDA VIKFQRNYRL PVNGIANAQV LDAVRRVSTG  
GSITQQPSRD YLTLDGRGDN VALVQERLSQ LGFSNTNPDG FFSDSTKETV  
IAFQQYSRLN VTGNVDWQTW QALGLDSSTG GNYTEANGSV LPETRYLVPV  
NTGYATPENN RYVLPPATAY AVPGTNGNTL VASNPYRVIV PISNNDTLK  
VQQYIPNAVT EQSHLGDVYV AGAFSDRAQA ETLTKMLRSY GLDARVKFN

**Abbildung 43: AS-Sequenz von SlpD aus *N. punctiforme*.** Die Sec-Signalsequenz ist unterstrichen und fett. Die vier PG-Bindedomänen (pfam01471) sind grau unterlegt (AS 28-84, AS 119-175, AS 188-243, AS 267-323, AS). Die schwarz unterlegte Sequenz wurde als SPOR-Domäne erkannt (pfam05036).

6.9.1 Gezielte *KO*-Mutagenese von *slpD*

Mittels homologer Rekombination wurde *slpD* nahezu vollständig durch die C.K3t4-Resistenzkassette ersetzt. Dazu wurde der Vektor pIM648 über triparentale Konjugation in *N. punctiforme* geschleust. Die Oligos 1363 und 1364 dienen dem Nachweis der doppelten Rekombination. Das Amplifikat war 1877 bp lang, wenn keine Rekombination stattgefunden hat. Bei erfolgreicher Integration wies das Amplifikat eine Größe von 2204 bp auf. Wasser diente als Kontrolle der PCR. Die Abbildung 44 zeigt, dass die *slpD*-Mutante vollständig segregiert war.

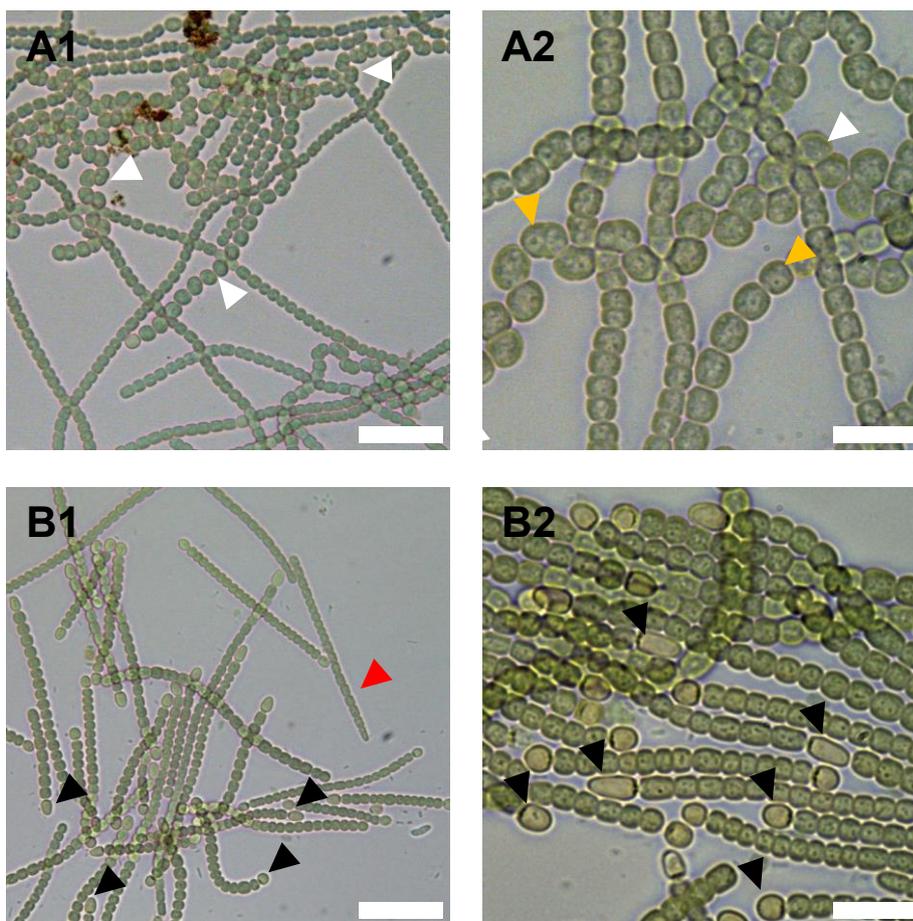


**Abbildung 44: Verifizierung der *slpD*-Mutante in *N. punctiforme*.** **A)** Schematische Darstellung der genomischen Umgebung und homologen Rekombination. Npun\_F1577 kodiert für die Exonuklease SbcC und Npun\_R1579 kodiert für ein SH3 Typ3 Protein. **B)** Agarosegelelektrophorese der Kolonie-PCR. Die Oligos 1363 und 1364 binden in den Bereichen der homologen Rekombination. Es entsteht ein Amplifikat von 1877 bp, wenn das WT-Allel die Matrize ist, in der Mutante ist *slpD* durch die Resistenzkassette C.K3t4. Das Amplifikat hat eine Größe von 2204 bp, wenn das mutierte Allel als Matrize für die PCR dient. Wasser wurde als Negativkontrolle der PCR verwendet. Die *slpD*-Mutante ist vollständig segregiert.

6.9.2 Wachstum und Differenzierungspotential der *slpD*-Mutante

Die vegetativen Zellen der *slpD*-Mutante bilden vermehrt Aseriaten (Abbildung 45A, weiße Pfeile), welche durch schiefe Teilungsebenen ein ungleichmäßiges Erscheinungsbild der Filamente verursachen. Vereinzelt sind Speichergranula zu erkennen (orangefarbene Pfeilspitzen), die in der Häufigkeit und Lage dem Zustand vegetativer Zellen des WT entsprechen. Die *slpD*-Mutante differenziert unter Stickstoffmangelbedingungen funktionsfähige Heterozysten (Abbildung 45B, schwarze Pfeilspitzen). Die Filamente fragmentieren, sodass viele endständige Heterozysten vorhanden waren. Die Form der Heterozysten ist anders als beim WT. Die Zellen weisen häufig eine konische Form auf, welche der endständigen Zellen der Hormogonien ähnelt. Unter Stickstoffmangelbedingungen konnte morphologisch auch ein Hormogonium identifiziert werden (Abbildung 45B1, rote Pfeilspitze).

Die *slpD*-Mutante bildet vegetative Filamente, die vermehrt Aseriaten sind. Unter Stickstoffentzug verkürzt sich die Filamentlänge. Viele endständige Heterozysten weisen eine konische Form auf.

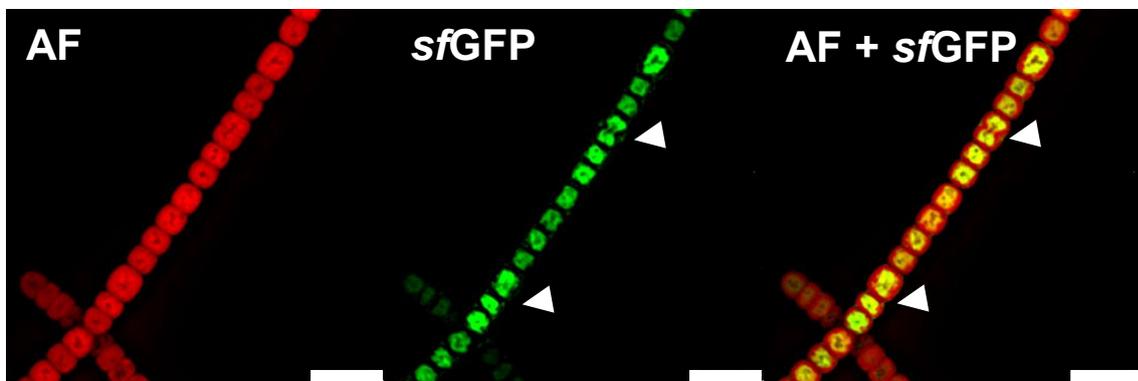


**Abbildung 45: Differenzierungspotential der *slpD*-Mutante in *N. punctiforme*.** **A)** Vegetative Filamente bilden häufig Aseriaten (weiße Pfeilspitze) und beinhalten kleine Speichergranula (orangefarbene Pfeilspitzen). **B)** Heterozysteninduktion. Viele Filamente fragmentieren. Es gibt vermehrt endständige Heterozysten, welche häufig eine konische Form aufweisen (schwarze Pfeilspitzen). In Aufnahme **B1** konnte zusätzlich ein Hormogonium identifiziert werden (rote Pfeilspitze) Größenstandards: Links: Übersicht (25  $\mu$ m), rechts Detailaufnahme (10  $\mu$ m).

### 6.9.3 Lokalisation von SlpD $\text{sfGFP}$

Zur Lokalisation des Peptidoglykanbindepoteins SlpD unter möglichst authentischen Bedingungen wurde die gleiche Strategie wie bei Npf5024 (pIM639) verwendet (6.8.4). Das Gen *slpD* (Npun\_R1578) wurde unter der Kontrolle seines nativen Promotors als Fusionskonstrukt mit *sfGFP* in den Vektor pSCR202 mittels Gibson-Klonierung eingebracht (Gibson et al., 2009). Der resultierende Vektor (pIM640) wurde mittels Elektroporation (5.4.12) in *N. punctiforme* eingebracht.

Die Überlagerung des Signals der Autofluoreszenz vegetativer Zellen mit dem GFP-Signal ermöglicht die Lokalisation von SlpD $\text{sfGFP}$  (Abbildung 46). In vegetativen Filamenten im Hintergrund des WT von *N. punctiforme* wird SlpD $\text{sfGFP}$  stark exprimiert. Das Signal im Kanal zur Detektion von *sfGFP* zeigt, dass das Fusionsprotein hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert, obwohl eine Sec-Signalsequenz vorhergesagt worden ist (6.9). Ein schwächeres Signal wurde in der Zellwand aufgenommen, das Protein lokalisiert dort an Septen *in statu nascendi* (weiße Pfeilspitzen). Da die Amidase AmiC2 ebenfalls an jungen Septen lokalisiert (0 und 0; (Büttner et al., 2016, Lehner et al., 2013)), würde eine Interaktion *in vivo* möglich. Eine simultane Lokalisation ist Voraussetzung für eine Interaktion der beiden Proteine.



**Abbildung 46:** Lokalisation von SlpD in *Nostoc punctiforme*. AF) Autofluoreszenz *sfGFP*) Aufnahme zur Detektion des Fusionsproteins SlpD $\text{sfGFP}$ . Größenstandard: 7,5  $\mu\text{m}$ .

### 6.10 SlpB (Npun\_R4778) als putativer Interaktionspartner von AmiC2

Im *Pulldown* wurde das Protein des Gens Npun\_R4778 als putativer Interaktionspartner von AmiC2 identifiziert. Homologien bestehen zu SleB-Proteinen (*sporecore lytic enzyme*), die besonders in *Bacillus subtilis* charakterisiert wurden (Masayama et al., 2006). Da keine Hydrolase-Domäne wie in SleB vorhanden ist, wurde Npun\_R4778 SlpB genannt (*SleB-like protein*). Der Buchstabe „B“ an zweiter Stelle des Alphabets steht für die zwei PG-Bindedomänen

(pfam01471; PG\_binding\_1; Abbildung 48). Diese sind N- und C-terminal in verschiedenen Enzymen der PG-Degradation zu finden.

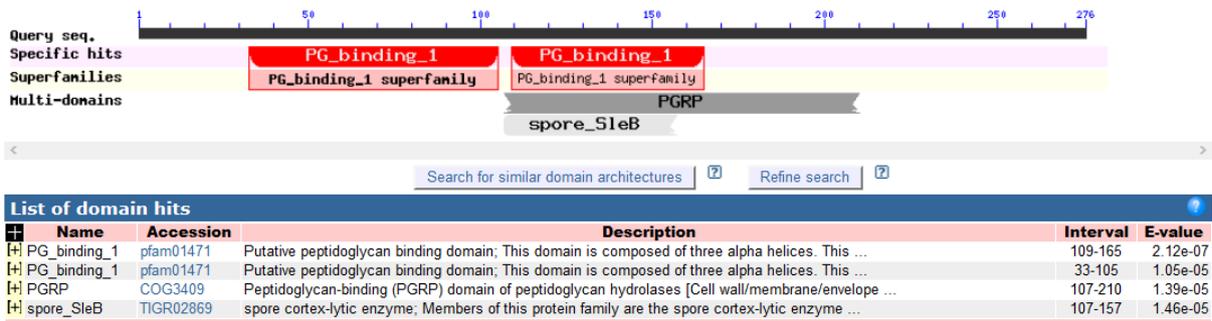


Abbildung 47: BLAST-P der AS-Sequenz von SlpB aus *N. punctiforme*.

Das Protein SlpB besteht aus 276 AS. Mit SignalP konnte keine Signalsequenz für den Export ins Periplasma gefunden werden (Abbildung 48). Wie das Protein zum PG in das Periplasma gelangt, ist unklar; auch eine Sequenz für den Transport über das Tat-System konnte nicht gefunden werden. Durch Charakterisierung einer *KO*-Mutante und der Lokalisation des SlpB-*f*GFP-Fusionsproteins in *N. punctiforme* sollte dessen Funktion analysiert werden.

#### AS-Sequenz von SlpB (276 AS)

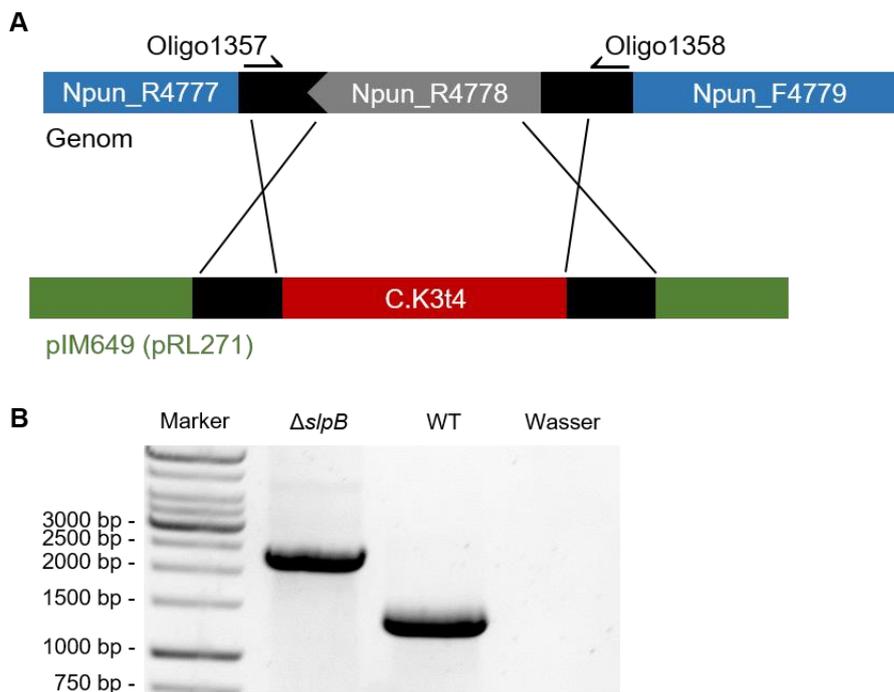
```
MLDLFISTYL IFVKPDTLNG SLVAKESKSM AISSPEVIRH ILIGLGYLAP
EIDPKPDLTK FAPWKRNNNS LTDDLTEEAI KKFQKQYSQK LVVNGNADAE
TRTVMEETVK GLQNRLKFHG FATPAEIPQD KPFYGPATYT AVKKFQKSQG
LTENGIATFE QRQILQQPNL TDKPPTPPQS QLKLIDLCFQ FKKNPQNPSY
IAALNNLQQN LPKDV LHKVT NKWRGTNDQN PEIVKLTLNF IYYDDNNQNH
RDALNHLQSQ ITPAISQAFSLWNNK
```

Abbildung 48: AS-Sequenz von SlpB aus *N. punctiforme*. Grau unterlegt sind die beiden PG-Bindedomänen (AS 33-135 und AS 109-165).

#### 6.10.1 Gezielte *KO*-Mutagenese von *slpB* (Npun\_R4778)

Um das Gen *slpB* auszuschalten, wurde es weitestgehend durch die C.K3t4-Kassette ersetzt. Die genomische Umgebung deutet darauf hin, dass Npun\_R4778 nicht in einem Operon liegt, welches durch die Ausschaltung von Npun\_R4778 betroffen sein könnte. Das Gen Npun\_R4777 kodiert für eine Arsenit-aktivierte ATPase, ArsA, und Npun\_F4779, welches als Citrat-transporter annotiert ist (Abbildung 49A).

Die flankierenden Bereiche von *slpB* (Npun\_R4778) wurden zur homologen Rekombination genutzt. Der Vektor für die homologe Rekombination wurde pIM649 genannt und über triparentale Konjugation in *N. punctiforme* eingebracht. Mittels Kolonie-PCR wurde die vollständige Segregation der Mutante bestätigt (Abbildung 49B). Die Oligos 1357 und 1358 binden in den Regionen der homologen Rekombination. Das Amplifikat mit dem WT-Allel als Matrize war 1370 bp groß. war *slpB* durch die Resistenzkassette und den Terminator ersetzt, entstand ein Amplifikat von 2204 bp. Wasser diente als Negativkontrolle der PCR. Die Mutante war vollständig segregiert.



**Abbildung 49: Verifizierung der *slpB*-Mutante in *N. punctiforme*.** A) Schematische Darstellung der doppelten Rekombination von pIM649 in das Genom von *N. punctiforme*. Die C.K3t4-Kassette ersetzt *slpB* nahezu vollständig. B) Agarosegelelektrophorese der Kolonie-PCR zur Verifizierung der Mutante. Die verwendeten Oligos 1357 und 1358 binden in den Bereichen der homologen Rekombination. Das WT-Allel als Matrize der PCR bedingt ein Amplifikat von 1370 bp. Bei Integration der C.K3t4-Kassette wird ein Amplifikat von 2204 bp gebildet. Die Mutante ist vollständig segregiert, es ist keine Bande bei 1370 bp zu erkennen. Wasser diente als Kontrolle der PCR.

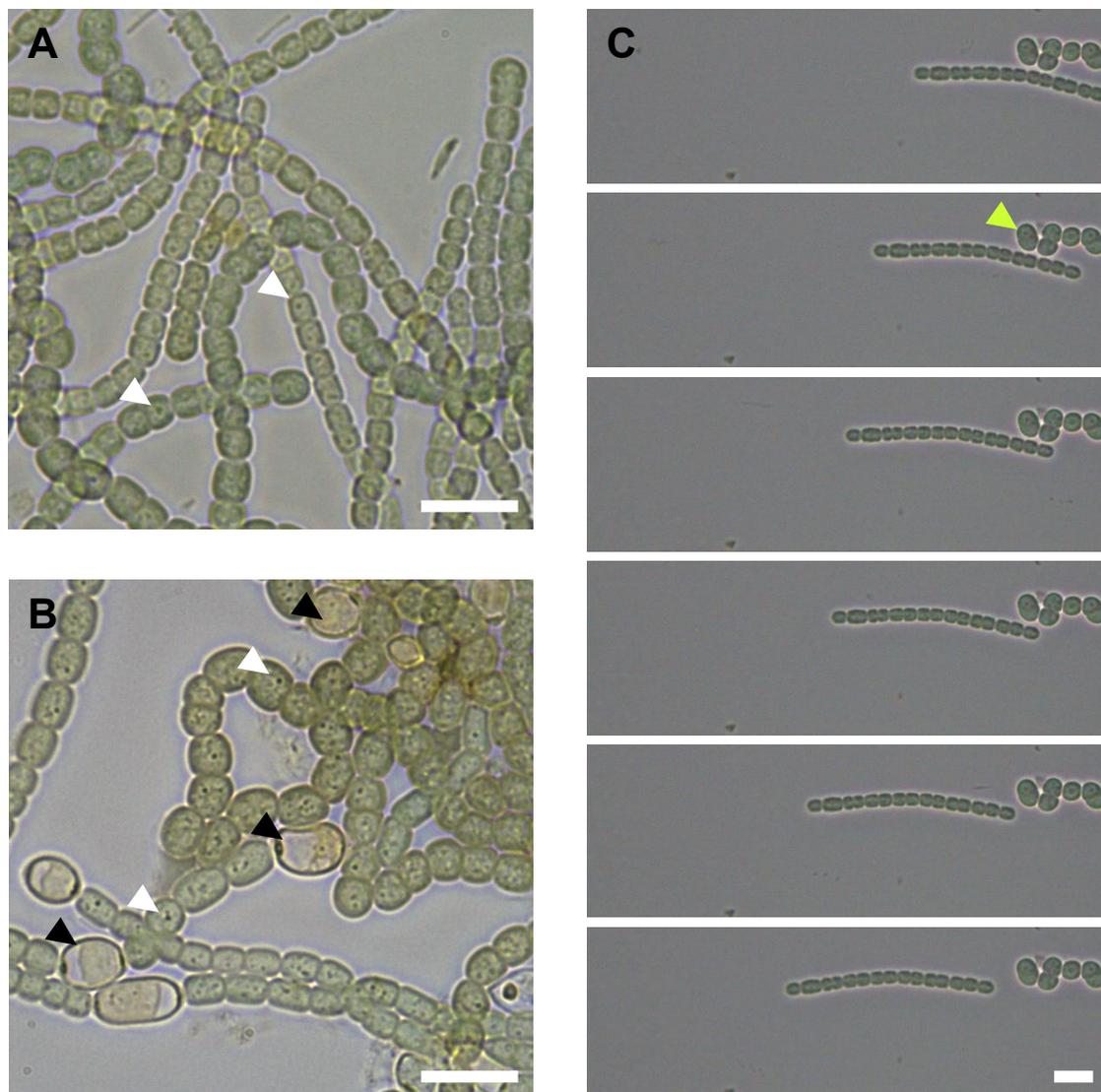
### 6.10.2 Wachstum und Differenzierungspotential der *slpB*-Mutante

Die vegetativen Zellen der *slpB*-Mutante sind denen des *N. punctiforme* WT sehr ähnlich. Nur gelegentlich waren Speicherpolymere in lichtmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen (Abbildung 50A, weiße Pfeilspitzen). Ein Unterschied in der Lage und Häufigkeit der Granula war zwischen *slpB*-Mutante und *N. punctiforme* WT nicht vorhanden. Nach Stickstoffentzug bildete die Mutante Heterozysten, welche die Filamente mit Stickstoffverbindungen versorgten.

Braune Pfeile in Abbildung 50B zeigen Heterozysten in verschiedenen Abschnitten ihres Lebenszyklus. Die Mutante wuchs über 4 Tage mit molekularem Stickstoff als einzige Stickstoffquelle. So kann davon ausgegangen werden, dass die Heterozysten funktionell sind.

Häufiger als beim *N. punctiforme* WT waren Aseriaten zu erkennen (gelbe Pfeilspitze, Abbildung 50C). Dies sind Filamente mit aberranten Zellteilungsebenen. Die Hormogonien der *slpB*-Mutante sind zu gerichteter Bewegung fähig. Ein Hormogonium in Abbildung 50C bewegte sich nach links durch das Bild.

Die *slpB*-Mutante war fähig, Heterozysten unter Stickstoffmangelbedingungen zu differenzieren. Vegetative Zellen bildeten häufiger Aseriaten als der Wildtyp. Die Hormogonien der *slpB*-Mutante waren mobil.

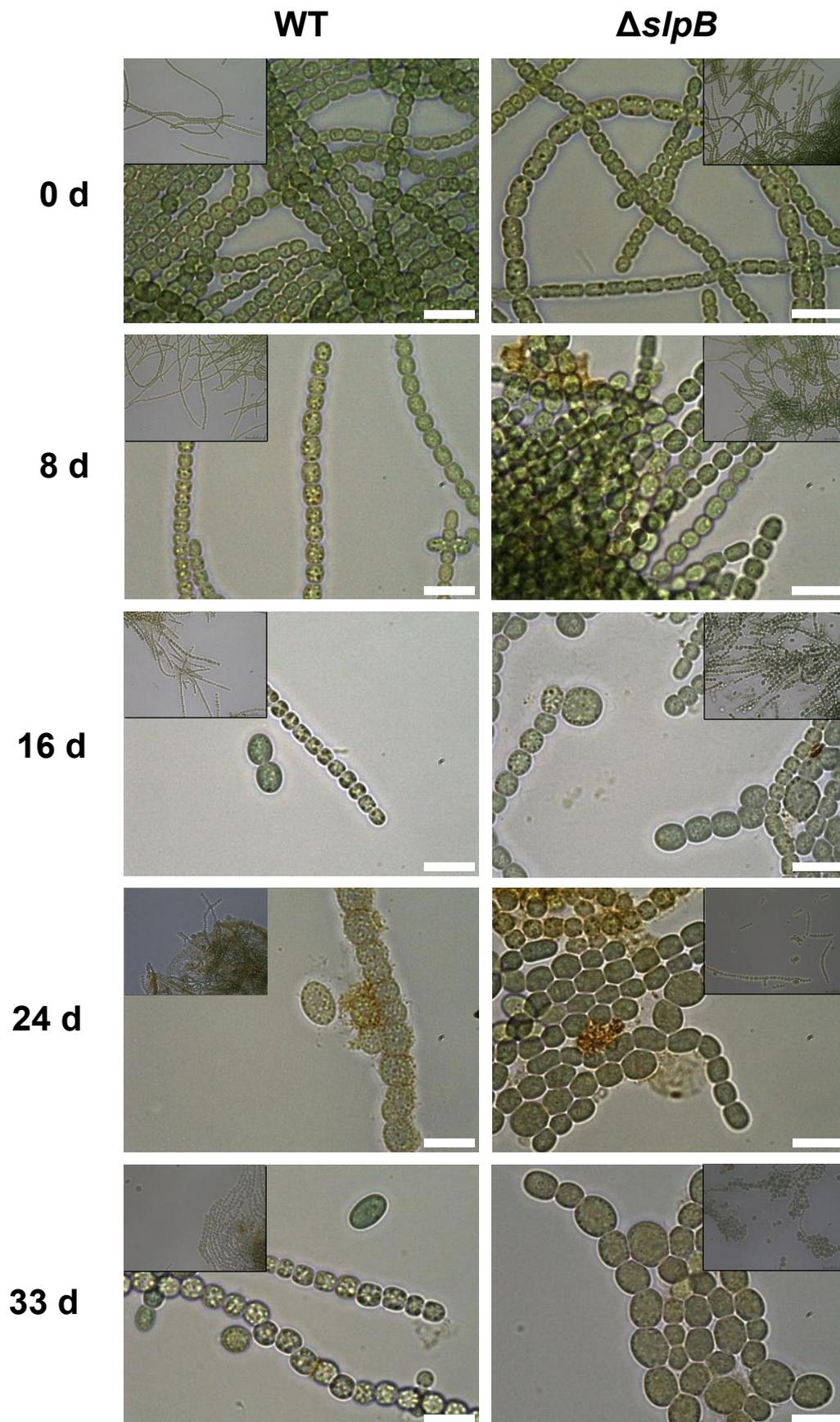


**Abbildung 50: Differenzierungspotential der *slpB*-Mutante in *N. punctiforme*.** A) vegetative Zellen, Speichergranula sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet (Abb. A und B) B) Heterozysten 96 h nach Transfer auf stickstofffreies Medium (schwarze Pfeile) C) mobiles Hormogonium. Die *slpB*-Mutante bildet vermehrt Aseriaten (gelber Pfeil). Größenstandard: 10 µm.

Vor der Induktion der Akinetendifferenzierung durch Phosphatentzug glichen die Zellen der Mutante weitestgehend den Zellen des WT (6.10.2). Die Entwicklung zu Akineten wurde über einen Zeitraum von 33 Tagen dokumentiert.

In der ersten Woche verlief die Entwicklung zu Akineten beim *N. punctiforme* WT und der *slpB*-Mutante relativ ähnlich. Die Zellen nahmen leicht an Volumen zu. Erste Granula wurden sichtbar (Abbildung 51, 8 d). Unterschiede in der Entwicklung zu Akineten wurden 16 Tage nach Induktion deutlich (Abbildung 51, 16 d). Die Filamente wurden kürzer als beim WT. Die Zellen der *slpB*-Mutante gewannen deutlich an Volumen. Granula sind in diesen Zellen kaum vorhanden. In den Zellen des WT sind dagegen Granula zu erkennen, die nach Lage und Anzahl in den Zellen auf den Speicherstoff Cyanophycin deuten. Nach 24 Tagen ist eine Verstärkung dieses Phänotyps zu beobachten. In den lichtmikroskopischen Aufnahmen der *slpB*-Mutante beinhalteten die Zellen keine Granula, im WT waren kleine Granula deutlich zu erkennen. Nach 33 Tagen bestand die Kultur der *slpB*-Mutante hauptsächlich aus großen unizellulären Akineten, die keine Granula beinhalteten.

Erst in der Differenzierung zu Akineten besitzt die *slpB*-Mutante eine phänotypische Auffälligkeit im Vergleich zum WT.



**Abbildung 51: Akinetendifferenzierung der *slpB*-Mutante in *N. punctiforme* durch Phosphatentzug.** Der Verlauf zeigt die Kultur vor Induktion der Akinetendifferenzierung und zu mehreren Zeitpunkten nach Phosphatentzug im Vergleich zum *N. punctiforme* WT. Während der Differenzierung zu Akineten bildet die Mutante wesentlich größere unizelluläre Zellen ohne Granula. Größenstandard: 10  $\mu\text{m}$ .

### 6.10.3 Mikroskopische Charakterisierung der *slpB*-Mutante durch Färbungen

Mit unterschiedlichen Färbemethoden konnten unterschiedliche Speicherstoffe und Zellkomponenten angefärbt werden. Dies erlaubte eine detaillierte Charakterisierung der *slpB*-Mutante im Vergleich zum WT. Der Speicherstoff Polyphosphat wurde von dem *N. punctiforme* WT kaum angereichert, in der *slpB*-Mutante sind kleine Polyphosphatgranula zu sehen. Zusätzlich ist bei der Mutante extrazelluläres Material angefärbt worden. Dieses war beim WT nicht vorhanden.

In vegetativen Zellen war Cyanophycin beim WT nicht vorhanden und auch bei vegetativen Zellen der *slpB*-Mutante über die Sakaguchi-Reaktion nicht nachweisbar. Auch die *slpB*-Mutante speicherte Lipidtröpfchen in den vegetativen Zellen, ein großer Unterschied in der Anzahl oder Größe der Tröpfchen konnte nicht festgestellt werden.

Das Septum ist der Ort des Peptidoglykanwachstums in filamentösen Cyanobakterien wie *N. punctiforme* (Schubert, 2014). Sowohl im WT als auch in der *slpB*-Mutante konnte unvernetztes Peptidoglykan in den Septen mit VanFL angefärbt werden.

Die vegetativen Zellen der *slpB*-Mutante waren den Zellen des WT sehr ähnlich. Durch den Einsatz von Crysoidin (5.6.3.1) konnte eine geringe Einlagerung von Polyphosphat festgestellt werden, zusätzlich wurde extrazelluläres Material angefärbt, das im WT nicht vorhanden war. In Bezug auf Cyanophycin, Lipidtröpfchen und Peptidoglykangenesese glich die *slpB*-Mutante dem WT.

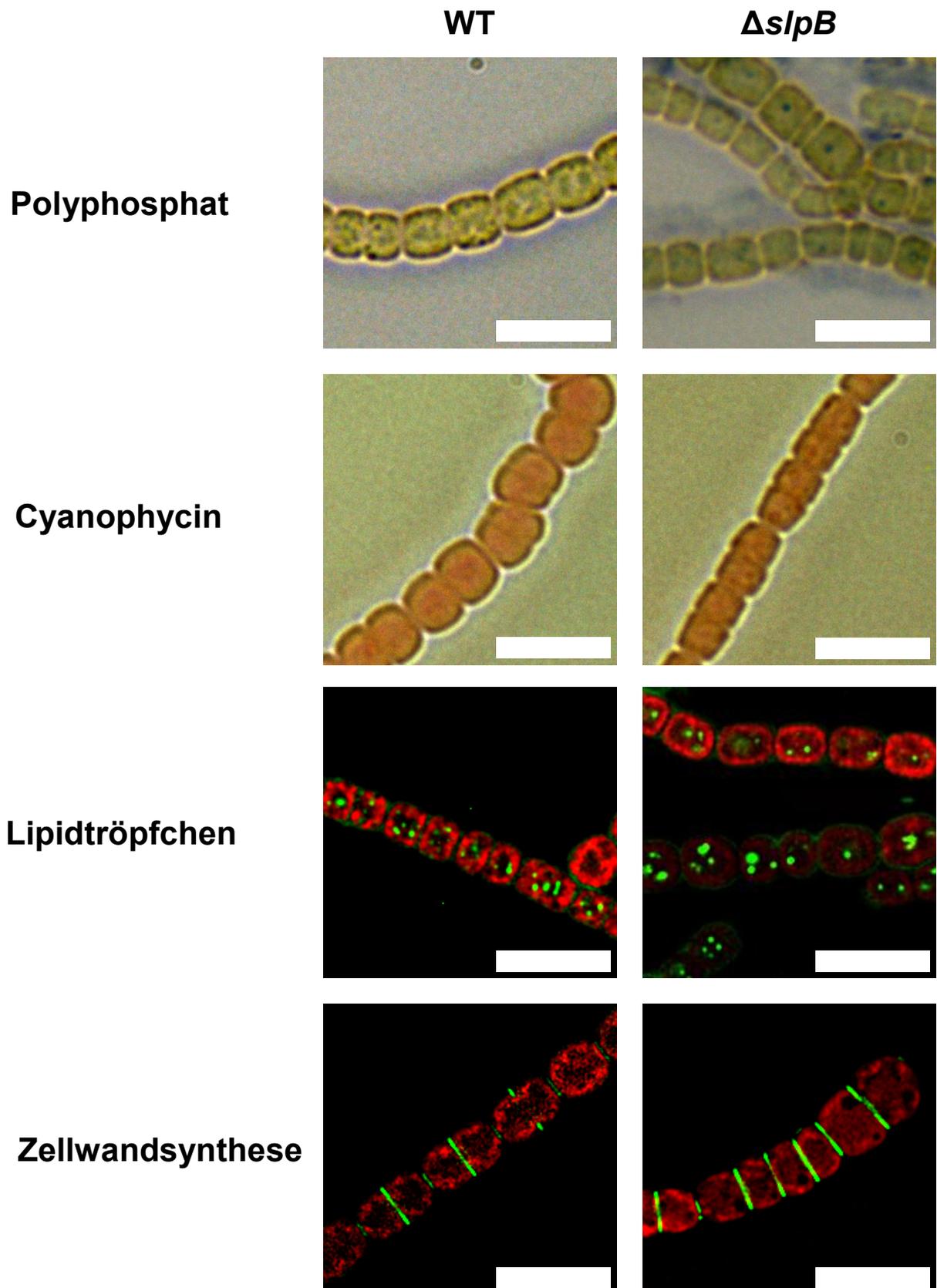
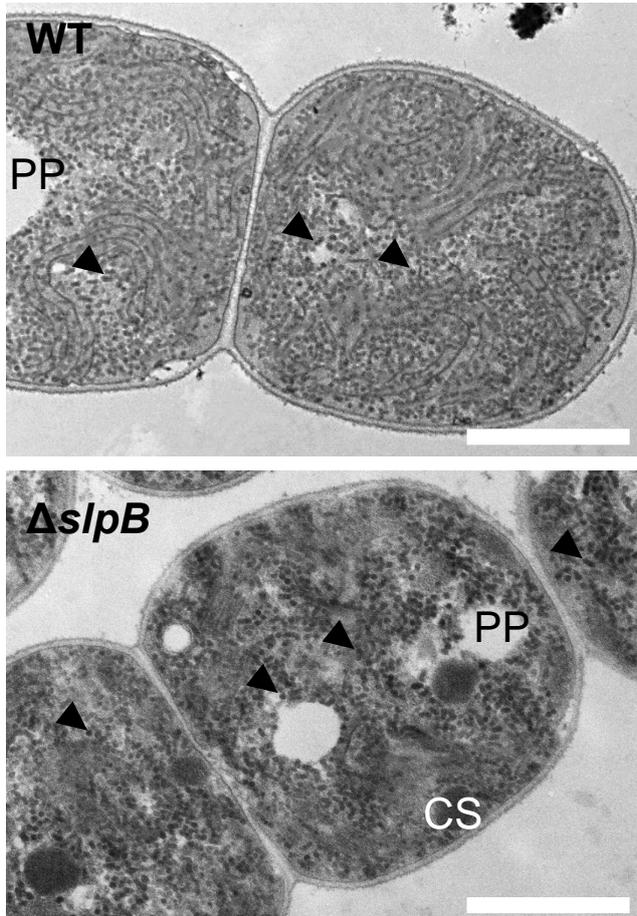


Abbildung 52: Charakterisierung der *slpB*-Mutante aus *N. punctiforme* mittels verschiedener Färbungen. Mit dem NEISSER-Verfahren wird Polyphosphat angefärbt. Die Sakaguchi-Reaktion färbt Cyanophycin rot. Mit BODIPY werden Lipidtröpfchen sichtbar. Mit VanFL wird der Ort der Peptidoglykangense angefärbt. Größenstandard: 7,5  $\mu\text{m}$ .

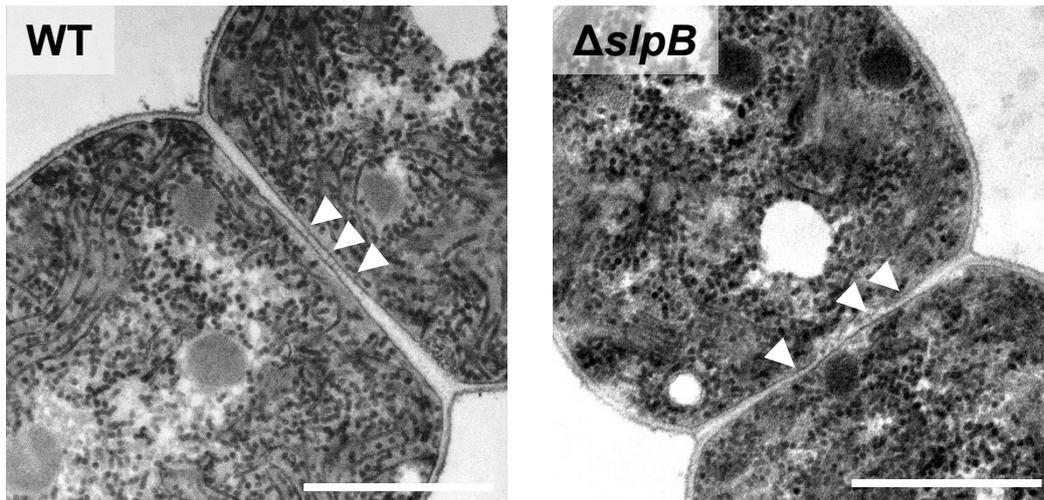
6.10.4 Ultrastruktur der *slpB*-Mutante

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von vegetativen Zellen der *slpB*-Mutante zeigten auch auf Ebene der Feinstruktur der Zellen eine große Ähnlichkeit zu dem WT. Eine extrazelluläre Schicht ist nicht zu erkennen. Diese könnte eventuell durch Waschschriffe während der Präparation verloren gegangen sein.



**Abbildung 53: Ultrastruktur der *slpB*-Mutante in *N. punctiforme* im Vergleich zum WT.** Auch auf zellulärer Ebene gibt es keinen Unterschied zwischen WT und *slpB*-Mutante. Schwarze Pfeilspitzen: Glykogengranula; PP: Polyphosphat, CS: Carboxysomen; Größenstandard: 1,1  $\mu\text{m}$ .

Die Abbildung 54 zeigt Dünnschnitte senkrecht zum Septum von WT und *slpB*-Mutante. Die weißen Pfeilspitzen deuten auf *Septal Junctions*. Auch in der *slpB*-Mutante sind diese Zell-Zell Verbindungen vorhanden.

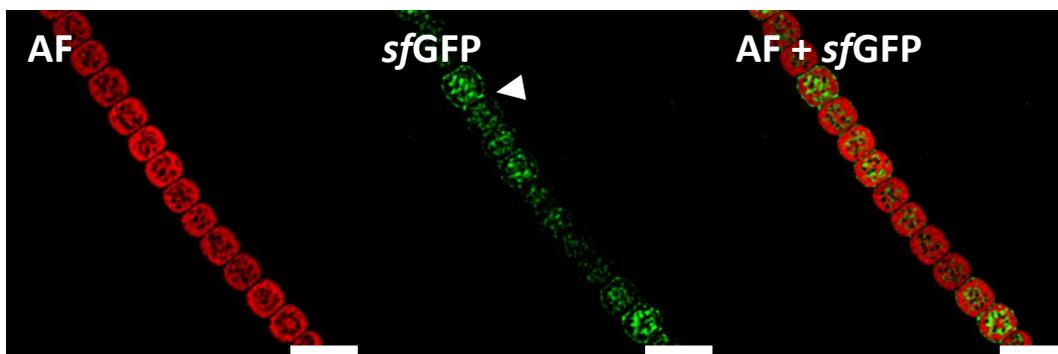


**Abbildung 54: Detailsicht des Septums in Ultradünnschnitten.** *N. punctiforme* WT und *slpB*-Mutante weisen beide *Septal Junctions* auf (weiße Pfeilspitzen). Größenstandard: 1,1  $\mu\text{m}$ .

#### 6.10.5 Lokalisation von SlpB<sub>s</sub>/GFP

Zur Lokalisation des Proteins unter nativen Bedingungen wurde die native Promotorregion ermittelt und *slpB* mit *sfgfp* fusioniert und in den Vektor pSCR202 kloniert. Der resultierende Vektor, pIM641, verfügt über die native Promotorregion von *slpB*. Von diesem Promotor wird das Fusionsgen abgelesen. Der Vektor pIM641 wurde in *N. punctiforme* über Elektroporation transformiert.

Durch die Überlagerung der Autofluoreszenz und dem Signal aus dem GFP-Kanal ist zu erkennen, dass SlpB<sub>s</sub>/GFP im Cytoplasma lokalisiert. Trotz fehlender Signalsequenz ist SlpB<sub>s</sub>/GFP auch in der Zellwand. Der Ort der designierten Funktion ist am Peptidoglykan, da das Protein zwei PG-Bindedomänen besitzt. Um kleinere Zellen herum ist das Signal von SlpB<sub>s</sub>/GFP schwächer als an Zellen mit größerem Volumen, dort ist SlpB<sub>s</sub>/GFP sowohl lateral als auch an den Septen zu sehen (Abbildung 55, weiße Pfeilspitze).



**Abbildung 55: Lokalisation des SlpB<sub>s</sub>/GFP in *Nostoc punctiforme*.** AF) Autofluoreszenz vegetativer Zellen eines Filamentes *sfgFP*) Aufnahme mittels GFP-Kanals zur Lokalisation des Fusionsproteins (SlpB<sub>s</sub>/GFP). Größenstandard: 7,5  $\mu\text{m}$ .

## 7 Diskussion

Der *Nanopore Array* ist das Gerüst der intrafilamentösen Kommunikation in *N. punctiforme*. Ohne die Poren in dem septalen Peptidoglykan findet kein Stoffaustausch zwischen den Zellen im Filament statt. Die Zelldifferenzierung als Antwort auf verschiedene Umweltbedingungen ist auf die Kommunikation über das Septum angewiesen. In *N. punctiforme* ist die Amidase AmiC2 das Schlüsselenzym zu Bildung des *Nanopore Arrays*. Fehlt diese eine Amidase, dann wachsen die Zellen mit starken Defekten in der Zellmorphologie. Es findet kein Stoffaustausch über das Septum mehr statt. In dieser Konsequenz könnten die Filamente der *amiC2*-Mutante nicht mehr zu Hormogonien, Heterozysten oder Akineten differenzieren (Lehner et al., 2011, Lehner et al., 2013).

Da Amidasen die Zellwand zerschneiden, müssen diese Enzyme durch die Zellen minutiös reguliert werden, weil die Zellwand sonst an Integrität verliert und die Zellen dem Turgor nicht standhalten können. Die Aufgabe, das septale Peptidoglykan in den *Nanopore Array* umzuwandeln, ist eine besonders elaborierte Funktion einer Amidase. Durchschnittlich sind die Poren, welche durch AmiC2 entstehen, im Durchmesser 20 nm groß. Die Abweichung von dieser Größe ist gering. Auch der Abstand der Poren zueinander im Septum ist regelmäßig (Lehner et al., 2013). Damit AmiC2 zum richtigen Zeitpunkt an der richtigen Stelle in der richtigen Größe eine Pore in das septale Peptidoglykan schneidet, bedarf es wahrscheinlich einer ebenso elaborierten Regulation.

In dieser Arbeit sollte AmiC2 im Detail analysiert werden. Dazu gehörte die Aufklärung der Funktion der einzelnen Domänen. Eine neue, intrinsische Regulation von AmiC2 wurde aufgedeckt, putative Interaktionspartner von AmiC2 wurden identifiziert und charakterisiert.

### 7.1 Lokalisation von AmiC1 in *N. punctiforme* WT und in der *amiC2*-Mutante

Bei filamentösen Cyanobakterien der Sektion IV treten zwei AmiC-Amidasen in einem *Cluster* nebeneinander auf (Berendt et al., 2012). In dem nah Verwandten Cyanobakterium *Anabaena* PCC7120 zeigte eine *amiC1-KO*-Mutante keinen Effekt auf die Filamentintegrität, jedoch wird AmiC1 in *Anabaena* PCC7120 für die intrafilamentöse Kommunikation und die Entwicklung von Heterozysten benötigt (Berendt et al., 2012). In *Anabaena* PCC7120 lokalisiert AmiC1 an jungen Septen. In *N. punctiforme* wurde mehrfach versucht, eine *KO*-Mutante für AmiC1 zu generieren, jedoch ohne Erfolg. Dies deutet darauf hin, dass AmiC1 ein essentielles

Protein ist, ohne das *N. punctiforme* nicht leben kann. Daher wurde in dieser Arbeit die Lokalisation von AmiC1 in *N. punctiforme* mittels Immunfluoreszenzmarkierung durchgeführt (6.1.2).

Wie in *Anabaena* PCC7120 (Berendt et al., 2012) befindet sich AmiC1 an naszenten Septen in der Zellwand. Das Protein lokalisiert in sehr jungen Septen in der Peripherie des Septums, während es in anderen Septen überall präsent ist. In älteren Septen ist AmiC1 dagegen kaum nachweisbar. Damit gleicht AmiC1 in der Lokalisation der Schwesteramidase AmiC2 (6.1.4 und (Büttner et al., 2016). Auch in der *amiC2*-Mutante konnte AmiC1 in Zellwänden nachgewiesen werden. Dort ist sie sowohl an Septen *in statu nascendi* zu finden, aber vermehrt auch um die irregulär geformten Zellen herum in der Zellwand verteilt (6.1.3). Die partielle Delokalisierung von AmiC1 in der *amiC2*-Mutante deutet auf eine Interdependenz der beiden Amidasen hin. Es könnte bedeuten, dass AmiC1 und AmiC2 direkt miteinander interagieren. Da AmiC1 im Pulldown nicht gefunden wurde, ist es ebenso möglich, dass die partielle Delokalisation von AmiC1 in der *amiC2*-Mutante durch strukturelle Veränderungen des Peptidoglykans hervorgerufen wird und nur ein indirekter Zusammenhang besteht.

Mit der gleichen Domänenorganisation und einer identischen Lokalisation in vegetativen Zellen des *N. punctiforme* WT liegt die Vermutung nahe, dass AmiC1 und AmiC2 funktionell redundant sind. In Western Blot-Analysen wurden, ähnlich wie bei AmiC2, mehrere Banden mit dem spezifisch gegen AmiC1 gerichteten Antikörper detektiert. Analog zu AmiC2 kann eine Regulation durch (Auto-)proteolyse angenommen werden. Wegen der vielfältigeren Lebensweise von *N. punctiforme* ist die Redundanz der AmiC-Schwesteramidasen wahrscheinlich einer Spezialisierung gewichen, auch wenn die Lokalisation gleichgeblieben ist. Beide Amidasen werden vermehrt in der Differenzierung zu Akineten und Hormogonien exprimiert, aber nur bei *amiC1* ist die Expression unter diazotrophen Wachstumsbedingungen erhöht (Campbell et al., 2007). Eventuell übernimmt AmiC1 essentielle Aufgaben bei der Ausbildung des Halskanals, der Verbindung zwischen vegetativen Zellen und Heterozysten. Dies allein führt nicht zwangsläufig zur Letalität der *amiC1*-Mutante, da auch die *amiC2*-Mutante nicht diazotroph wachsen kann. Daher ist es wahrscheinlich, dass AmiC1 weitere essentielle Aufgaben übernimmt.

Als Amidase ist AmiC1 wahrscheinlich an der Remodulierung des Peptidoglykans im Septum beteiligt. Insbesondere das Zellwachstum und die Zellteilung sind als lebenswichtige Prozesse von dieser Remodulierung abhängig. Möglicherweise ist die komplette Genese des Septums durch Fehlen von AmiC1 gehemmt und eine *amiC1*-Mutante in *N. punctiforme* deswegen nicht lebensfähig.

## 7.2 Lokalisation von AmiC2 im *N. punctiforme* WT

Die Lokalisation von AmiC2 in *N. punctiforme* wurde in früheren Studien mit einer C-terminalen Fusion mit GFP realisiert (Lehner et al., 2013, Lehner et al., 2011). Da kein *sfGFP* verwendet wurde, wurde die native Sec-Signalsequenz durch das Tat-Signal von Npun\_R2356 ersetzt (Lehner et al., 2011).

In dieser Arbeit konnte bewiesen werden, dass der Austausch der Signalsequenz, welche den gefalteten Transport ins Periplasma statt der Sekretion des ungefalteten Proteins mittels Sec-Signals bedingt, keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins hatte (6.2.1). Ist die Expression des Fusionsproteins jedoch schwach, so gestaltet sich die Detektion des Proteins schwierig. Die Lokalisation von AmiC2 an jungen Septen konnte mittels Immunfluoreszenzmarkierung *in situ* bestätigt werden. Da die Filamente für diese Methode fixiert werden, konnten nur Momentaufnahmen entstehen. Die Resistenz der Heterozystenzellwand gegenüber Lysozym behindert die Detektion von AmiC2 mittels Immunfluoreszenzmarkierung in Heterozysten. Durch den Einsatz von pIM469 ist die Lokalisation von AmiC2 während der Heterozystenentwicklung schon bekannt (Lehner et al., 2013). Der Vorteil, die Lokalisation über ein Fusionsprotein kodiert auf einem replikativen Plasmid mit dem nativen Promotor von *amiC1* (pIM469) durchzuführen, ist, dass AmiC2 in allen Differenzierungsformen von *N. punctiforme* beobachtet werden kann.

Der Einsatz eines Peptidantikörpers mit einem signalgebenden sekundären Antikörper ermöglichte die Amplifikation des Signals, da mehrere sekundäre Antikörper an einen primären Antikörper binden können. Mit dem verstärkten Signal war es möglich, AmiC2 in Septen verschiedener Entwicklungsstadien im Detail zu betrachten. Mit Aufnahmen als Z-Stapel von 0,1  $\mu\text{m}$  Abstand zueinander wurden 3D-Rekonstruktionen hergestellt. Um 90° gedreht ermöglicht dies die Aufsicht auf das Septum. Die Amidase AmiC2 ist in Septen *in statu nascendi* vorhanden. Sie könnte somit den Grad der Bildung des Peptidoglykans im Septum markieren, da sie erst ringförmig am Septum lokalisiert ist und später die gesamte Fläche des jungen Septums bedeckt (6.1.4). Die Lokalisation von AmiC2 am Septum lässt sich gut mit der Septumsgenese bezüglich des Einbaus neuen Peptidoglykans korrelieren: Erst entsteht eine ringförmige Verdickung in der Mitte der Längsachse der Mutterzelle. Dort wird neues Peptidoglykan innen angelagert, bis ein geschlossenes Septum entsteht. Elektronenmikroskopische Aufnahmen unfertiger Septen zeigen keine *Nanoporen* in der septalen Zellwand (6.3.3). Dies würde bedeuten, dass AmiC2 am Septum vorhanden ist und erst, nachdem die Zellwand im Septum geschlossen ist, aktiviert wird.

### 7.3 Signalsequenzen und ihr Einfluss auf das Protein

In Bakterien sind zwei Wege des Exports von Proteinen über die Cytoplasmamembran bekannt. Bei beiden Möglichkeiten sind N-terminale Signalsequenzen notwendig. Die Signalsequenzen sind nach dem gleichen Schema aufgebaut. Sie bestehen aus drei Regionen: die N-terminale Region „n“, eine mittlere Region „h“ und eine Region „c“, angrenzend zur Schnittstelle des Proteins (Cristóbal et al., 1999, Pugsley, 1993). Während das Sec-Sekretionssystem die Proteine in ungefalteter Form als Kette von AS über die Cytoplasmamembran schleust (Cristóbal et al., 1999), ist der Transport über das Tat-System in gefalteter und oligomerisierter Form möglich (Santini et al., 1998, Settles and Martienssen, 1998). In der n-Region und h-Region unterscheiden sich die beiden Sequenztypen. Tat-Signalpeptide sind weniger hydrophob als Sec-Sequenzen. Ein Tat-Signal kann in eine Sec-Signalsequenz überschrieben werden, wenn Hydrophobizität der zentralen h-Region erhöht wird (Cristóbal et al., 1999).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *sfGFP* mittels Sec-Signalen im Periplasma von Cyanobakterien fluoreszent ist (6.2.1). Daher konnte *sfGFP* genutzt werden, um putative Interaktionspartner von AmiC2 zu lokalisieren (Npf5024 (6.8.5), SlpD (6.9.3), SlpB (6.10.5) und GerM(0)).

Zusätzlich zeigten verschiedene Sec-Signale keinen Einfluss auf die Lokalisation von *sfGFP* innerhalb des Periplasmas von *Anabaena* PCC7120 (6.2.1). Die hohe Sequenzhomologie der Signalsequenz der AmiC-Amidasen aus *N. punctiforme* und *Anabaena* PCC7120 hat keinen Einfluss auf die septale Lokalisation. Die Homologie ist also entweder ein Überbleibsel der Genduplikation und ist seitdem von Mutationen verschont geblieben, oder die Homologie der Signalsequenzen ist aus einem anderen Grund wichtig für die Amidasen, und deswegen wurden die Sequenzen im Laufe der Evolution nicht stärker verändert.

Auch die Tat-Signalsequenz, welche für Lokalisationsstudien von AmiC2 diente (Lehner et al., 2013, Lehner et al., 2011), zeigte keinen Einfluss auf die Lokalisation von *sfGFP* in der Zellwand von *Anabaena* PCC7120. Deswegen konnte der bereits hergestellte Vektor pIM469 als Grundlage zum Studium der Domänen und ihres Einflusses auf die Lokalisation von AmiC2 verwendet werden (6.2.2).

Einzig die Sec-Signalsequenz von Omp85 führte zu einer Lokalisation von *sfGFP* an den Septumsrand in der Zellwand. In dieser Arbeit war es die einzige Signalsequenz eines Proteins, das an der äußeren Membran wirkt. Die einzige bekannte Lokalisationsstudie über Omp85 in *Anabaena* PCC7120 legte den Fokus auf Heterozysten. Eine subzelluläre Lokalisation von Omp85 war nicht auszumachen (Nicolaisen et al., 2009). Die detailliertere Lokalisation von Omp85

und weitere Experimente mit mehr Signalsequenzen von Proteinen der äußeren Membran wären notwendig, um dieses Ergebnis zu untermauern.

Mit diesem Experiment konnten zwei wichtige Dinge gezeigt werden: Erstens trägt die Signalsequenz von AmiC2 aus *N. punctiforme* nicht zur Lokalisation der Amidase an das Septum bei. Zweitens beeinflusst die verwendete Tat-Signalsequenz von Npun\_R2356, die bei früheren Lokalisationsstudien verwendet wurde (Lehner et al., 2013, Lehner et al., 2011), die Lokalisation der Amidase nicht. So ist nicht nur eine optimale Vergleichbarkeit zwischen dem Volllängeprotein und den trunkierten AmiC2-Versionen (6.2.2) gegeben, sondern auch die Signalsequenz und die Art des Transports ins Periplasma als möglicher Faktor für die Lokalisation ausgeschlossen.

Wird die Lokalisation von SlpB und SlpD in Betracht gezogen, so wird deutlich, dass es über den Einfluss von Signalsequenzen auf die Lokalisation der Proteine nur unvollständige Erkenntnisse gibt. Während SlpD über eine Transportsequenz ins Periplasma verfügt, wurde dieses Protein in vegetativen Zellen von *N. punctiforme* hauptsächlich im Cytoplasma gefunden (6.9.3). Andersherum verhält es sich mit SlpB. Obwohl keine Transportsequenz für die Lokalisation im Periplasma gefunden werden konnte, ist dieses Protein in vegetativen Zellen von *N. punctiforme* überwiegend periplasmatisch lokalisiert (6.10.5).

#### 7.4 Die Domänen von AmiC2

Die Amidase AmiC2 besteht aus einer N-terminalen Signalsequenz, zwei AMIN-Domänen (Amidase-N-terminal, pfam11741), einer neu identifizierten Modulator-Region und der C-terminalen katalytischen Domäne (pfam01520). In dieser Arbeit wurde der Effekt einzelner Domänen auf die Lokalisation (GFP-Fusionen) und die Aktivität (*Dye-Release-Assays*) der Amidase untersucht.

Obwohl Signalsequenzen für den Export durch das Sekretionssystem von Bakterien sehr vielfältig sein können und die Signalsequenzen von AmiC1 und AmiC2 in *N. punctiforme* und *Anabaena* PCC7120 sehr ähnlich sind, wurde kein Einfluss auf die Lokalisation der Amidase festgestellt (6.2.1). Da die Signalsequenz während der Translokation abgespalten wird (von Heijne, 1985), ist ein Einfluss der Signalsequenz auf die Aktivität der AmiC2<sub>C</sub> ausgeschlossen. Für AMIN-Domänen wurde vorhergesagt und gezeigt, dass sie Peptidoglykan binden (de Souza et al., 2008, Rocaboy et al., 2013). In *E. coli* wurde gezeigt, dass die AMIN-Domäne die Lokalisation an das Septum vermittelt (Bernhardt and de Boer, 2003). Auch andere Proteine, die an Peptidoglykan wirken, besitzen AMIN-Domänen. Für PilQ aus *Myxococcus xanthus* ist bekannt, dass die AMIN-Domänen die Lokalisation an die Zellpole bewirken (Nudleman et al.,

2006). Hauptsächlich in gramnegativen Bakterien sind AMIN-Domänen zu finden. Es wird angenommen, dass sie aus dem Bedürfnis heraus, den periplasmatischen Raum zu organisieren, entstanden sind und als Anker am Peptidoglykan fungieren oder mit anderen Komponenten des gelartigen Periplasmas interagieren (de Souza et al., 2008).

Das Protein AmiC2 aus *N. punctiforme* besitzt zwei AMIN-Domänen. Es konnte gezeigt werden, dass die AMIN-Domänen für die Lokalisation an die Septen verantwortlich sind und dass für die Lokalisation grundsätzlich eine AMIN-Domäne ausreicht (6.2.2). Es wurde gezeigt, dass die AMIN-Domänen selbst keine PG-hydrolytische Aktivität haben (6.5).

Bei den AMIN-Domänen scheint die Intensität der Lokalisation am Septum von den umgebenden Domänen abhängig zu sein. Ist die AMIN-A Domäne an ihrem C-terminus mit AMIN-B oder der katalytischen Domäne verbunden, kann sie die Lokalisation an das Septum besser vermitteln, als wenn die AMIN-A Domäne mit dem Modulator direkt verbunden ist. Andersherum braucht die AMIN-B Domäne zur Lokalisation an das septale Peptidoglykan C-terminal wahrscheinlich einen flexiblen Bereich (Modulator). Die Lokalisation am Septum von AmiC2<sub>BMC</sub> ist stärker als bei AmiC2<sub>BC</sub>.

Die trunkierte Version AmiC2<sub>BMC</sub> ist *in vivo* mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen worden (6.1). Diese native Version besitzt katalytische Aktivität in Dye-Release-Assays, jedoch geringer als AmiC2<sub>C</sub> (6.5). Von den verkürzten Versionen von AmiC2 zeigte AmiC2<sub>BMC</sub> noch die stärkste Lokalisation am Septum. Wahrscheinlich ist die Kombination aus AMIN-B und Modulator für die korrekte Lokalisation entscheidend. Die modulierende Eigenschaft auf die Aktivität ist nicht auf die AMIN-B Domäne, sondern auf den neu entdeckten Modulator zurückzuführen. In Dye-Release-Assays gleicht die Aktivität von AmiC2<sub>BMC</sub> der von AmiC2<sub>MC</sub>. Fehlt die AMIN-B-Domäne *in vivo*, so ist nur noch eine Lokalisation von AmiC2 am Septum möglich, wenn AMIN-A vorhanden ist.

Ohne AMIN-Domänen und ohne Modulator lokalisiert AmiC2<sub>C</sub> in der Zellwand ohne Präferenz für das Septum. Diese Version ist in Dye-Release-Assays hochaktiv und wird deswegen *in vivo* wahrscheinlich präzipitiert und abgebaut. Da das Signal zur Lokalisation der trunkierten AmiC2-Versionen von der GFP-Fusion ausgeht, wäre es möglich, dass nur noch GFP zu sehen war und die katalytische Domäne abgebaut wurde. Oder die GFP-Fusion verhinderte die unregulierte Aktivität der Amidase. Die ungebremste Aktivität der Amidase würde den Tod der Zellen durch Platzen zur Folge haben.

Sowohl die Lokalisation der trunkierten AmiC2-Versionen als auch die Dye-Release-Assays unterstreichen die Besonderheit des Modulators. Die Flexibilität dieser Region von AmiC2 scheint so hoch zu sein, dass der Transport über die Plasmamembran als gefaltetes Protein über

das Tat-Signal nicht mehr möglich ist, falls die Tat-Sequenz direkt an den Modulator gebunden ist. Beide verkürzte Varianten (AmiC2<sub>BMC</sub> und AmiC2<sub>MC</sub>), in denen der Modulator enthalten ist, zeigten eine verminderte Aktivität in Dye-Release-Assays. Vielleicht ist der Wirkmechanismus dieses Modulators der  $\alpha$ -Helix der Zellteilungsamidasen ähnlich (Rocaboy et al., 2013). Der Modulator könnte das aktive Zentrum bedecken, sodass kein Peptidoglykan gebunden werden kann. Durch Interaktion mit anderen Proteinen könnte der Modulator in einer offenen Position arretiert werden, damit AmiC2 die Nanoporen in das septale Peptidoglykan schneiden kann. So wie die Proteine EnvC und NlpD Amidasen in *E. coli* regulieren (Peters et al., 2013, Uehara et al., 2010). Zusätzlich könnte der Modulator für die Größe der *Nanoporen* wichtig sein. Die Länge des Modulators lässt die Spekulation zu, dass eine AmiC2-Amidase jeweils eine Pore in das septale Peptidoglykan schneidet.

## 7.5 Verstärkte Kommunikation in Hormogonien

Die Hormogonien sind mobile Filamente von Cyanobakterien der Sektion IV und V (Rippka et al., 1979). In Hormogonien des *N. punctiforme* WT wird AmiC2 verstärkt an die Septen rekrutiert (Lehner et al., 2013). In dieser Arbeit wurde septales Peptidoglykan von Hormogonien isoliert und bezüglich der Beschaffenheit des *Nanopore Arrays* untersucht. Die Poren des *Nanopore Arrays* in Hormogonien variieren etwas stärker in der Größe (6.3.2), eventuell werden unterschiedliche *Septal Junctions* für spezifische Zwecke gebraucht. Die absolute Zahl der Poren des *Nanopore Arrays* von Hormogonien ist ähnlich der Zahl der Poren des *Nanopore Arrays* vegetativer Septen. Allerdings sind Septen von Hormogonien von geringerem Durchmesser als vegetative Zellen (6.3.2). Normiert auf die Fläche besitzt der *Nanopore Array* bei Hormogonien die dreifache Anzahl an Poren des *Nanopore Array* von vegetativen Septen.

Diese Erkenntnis unterstreicht den Kommunikationsbedarf motiler Filamente und ergänzt die Daten von Nürnberg et al., 2014. Die Veröffentlichung stellt FRAP-Experimente in dem Sektion V Cyanobakterium *Mastigocladus laminosus* vor. Der Rückfluss des verwendeten Fluorophors war bei Hormogonien von *Mastigocladus laminosus* schneller als in vegetativen Filamenten. Die Autoren führten dies hauptsächlich auf eine schnellere Diffusion in den kleineren Zellen von Hormogonien zurück. Durch diese Arbeit gibt es den Hinweis, dass auch ein durchlässigerer *Nanopore Array* für die erhöhte Kommunikation verantwortlich sein kann. Zudem wurde ein Kranz von Poren, der das Septum umschließt, gefunden. Solche Strukturen wurden erstmals wahrscheinlich 1955 beschrieben (Metzner, 1955). Dies ist wahrscheinlich das Gerüst für den JPC, *junctional pore complex*, welcher zur Fortbewegung des Hormogoniums benötigt wird (Khayatan et al., 2015).

## 7.6 Charakterisierung von AmiC2<sub>c</sub>

In Kooperation mit Felix Büttner (IFIB, Tübingen) konnte die Kristallstruktur der katalytischen Domäne von AmiC2 (AmiC2<sub>c</sub>) aufgeklärt werden (Büttner et al., 2016). Die Kristallisation des Vollängenproteins war nicht erfolgreich, da besonders die Region zwischen den AMIN-Domänen und der katalytischen Domäne eine hohe Flexibilität aufweist. Zudem besitzt AmiC2 wahrscheinlich autoproteolytische Aktivität, sodass gereinigtes Vollängenprotein nach kurzer Zeit wieder in Spaltprodukte zerfiel. Auch der intensive Einsatz von Proteasehemmern konnte die Entstehung von AmiC2-Spaltprodukten nicht verhindern.

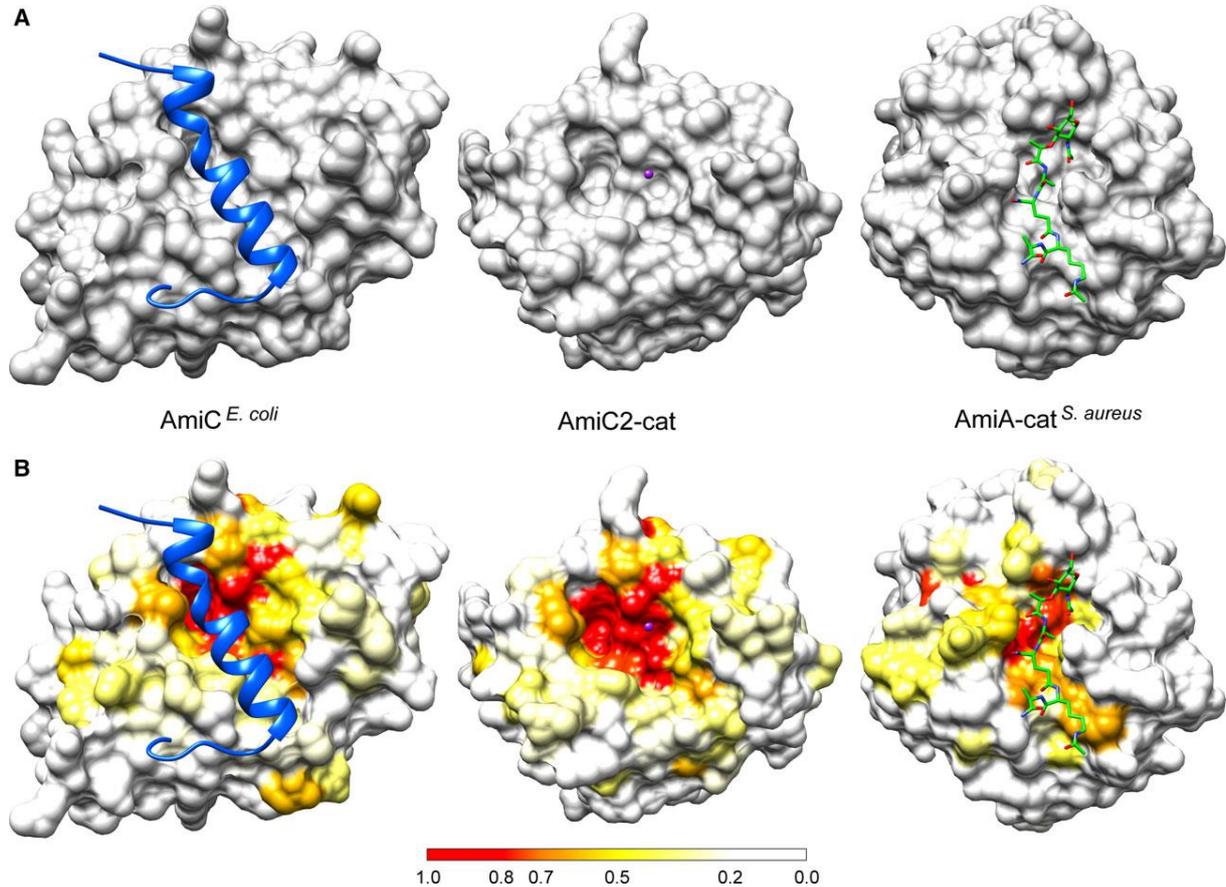
Für andere Peptidoglykanhydrolasen ist bekannt, dass die Regulation der Aktivität durch Proteolyse via eines Zweikomponentensystems erfolgt (Singh et al., 2015). Eine Regulation von AmiC2 durch (Auto-)Proteolyse ist eine mögliche Erklärung für die Entstehung der Spaltprodukte, von denen einige auch *in vivo* nachgewiesen wurden (6.1 und (Lehner et al., 2013).

Die Amidasedomäne besitzt einen typischen Aufbau. Zentrale  $\beta$ -Faltblätter werden ober- und unterhalb durch  $\alpha$ -Helices ergänzt. Die Kristallstruktur bestätigte, dass die katalytische Domäne von AmiC2 keine regulatorische  $\alpha$ -Helix besitzt (Abbildung 56). Bei einzelligen Bakterien werden über diese  $\alpha$ -Helix die Amidasen reguliert, welche nach erfolgter Zellteilung für die Trennung der Tochterzellen verantwortlich sind (Rocaboy et al., 2013). Die Regulation von AmiC2 ist wahrscheinlich komplexer, weil diese Amidase Poren in das septale Peptidoglykan schneidet, nachdem das naszente Septum eine geschlossene Scheibe darstellt (0).

In der katalytischen Domäne von AmiC2 sind nur wenige AS hochkonserviert (Abbildung 56). Ein katalytisches Zink-Ion wird von drei AS komplexiert (H447, E468, H515). Austausch dieser AS durch Alanin führte zu instabilen Proteinen, die aggregierten. Der Entzug des Zink-Ions durch hohe Konzentrationen von EDTA hatte denselben Effekt. Das Zink-Ion ist wichtig für die korrekte Faltung von AmiC2<sub>c</sub>. Ebenfalls hochkonserviert ist ein Glutamat an Position 578. Die Faltung wurde durch den Austausch dieses Restes zu Alanin, Asparagat, Glutamin oder Asparagin nicht behindert, aber diese gereinigten katalytischen Domänen zeigten in Dye-Release-Assays keine Aktivität. Sowohl die Länge des Kohlenstoffrückgrates als auch die Ladung des AS-Restes sind für die Komplexierung des Wassermoleküls, das den nukleophilen Angriff auf die Amidbindung im Peptidoglykan ausübt, entscheidend.

Das aktive Zentrum liegt in einer flachen Furche, welche wahrscheinlich Peptidoglykanstränge aus verschiedenen Ausgangsorientierungen akzeptieren kann. Dies stünde im Einklang mit der einzigartigen Aufgabe von AmiC2. Falls ein AmiC2-Enzym für eine Pore verantwortlich wäre, dann müsste die katalytische Domäne befähigt sein, das septale Peptidoglykan aus möglichst vielen verschiedenen Winkeln zu prozessieren. Auch bei der katalytischen Domäne von AmiC

aus *E. coli* konnten bisher keine Rückschlüsse auf den Mechanismus der Substratbindung gezogen werden. Dagegen besitzt die Amidase\_2-Domäne aus *Staphylococcus aureus* eine gut definierte Bindetasche, bei der die Substratbindung aufgeklärt werden konnte (Büttner et al., 2016).



**Abbildung 56: Darstellung der Konservierung der Oberfläche von verschiedenen Amidasen.** A) Darstellung der Oberfläche der Amidase-Domäne von AmiC aus *E. coli*, von AmiC2 aus *N. punctiforme* und von AmiA aus *Staphylococcus aureus* (Amidase\_2-Familie). B) Nur bei dem Enzym aus *S. aureus* konnte durch eine definierte Bindetasche eine Substratbindung interpretiert werden (Büttner et al., 2016).

## 7.7 Putative Interaktionspartner von AmiC2

Die Tochterzelltrennung verlangt einer Amidase eine geringere Präzision ab als die Herstellung des *Nanopore Arrays* aus septalem Peptidoglykan. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Regulation von AmiC2 am Septum komplexer als bei entsprechenden Amidasen unizellulärer Bakterien ist. Da der *Nanopore Array* erst entsteht, nachdem das Peptidoglykan das Septum komplett auskleidet, wird AmiC2 von anderen Proteinen räumlich und zeitlich strikt reguliert. Mit einem *Pulldown*-Experiment sollten mögliche Interaktionspartner gefunden werden.

Kandidaten für die Interaktion mit AmiC2 sollten möglichst durch unabhängige Experimente bestätigt werden. Die verwendeten Antikörper waren gegen GFP gerichtet, so konnten Proteine, die an das Fusionsprotein AmiC2GFP gebunden waren, untersucht werden. Ein hypothetisches

Protein (Npun\_F0437) wurde durch BLAST-Analysen als Homolog von GerM aus *Bacillus subtilis* identifiziert (Altschul et al., 1990). Auf die Funktion dieses GerM-Homologs in filamentösen Cyanobakterien wies nur eine Studie über die Veränderungen der Transskription während der Akinetendifferenzierung hin. In diesem Prozess ist die Transkription von *gerM* erhöht (Campbell et al., 2007).

Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Identifizierung von Homologen zu NlpD oder EnvC gelegt, da diese Proteine in anderen, einzelligen Organismen Amidasen regulieren. Ein Protein mit sehr ähnlicher Domänenorganisation zu NlpD (*E. coli*) wurde im *Pulldown* gefunden (Npf5024). Es enthält sowohl eine LysM-Domäne, als auch eine LytM-Domäne. Des Weiteren wurden Proteine mit Peptidoglykanbindedomänen (Gene: *slpD* (Npun\_R1578) und *slpB* (Npun\_R4778)) gefunden, welche ebenfalls untersucht wurden. Durch Kontamination der AmiC2GFP-Kultur konnten keine oder nur sehr eingeschränkt Aussagen über die Anzahl oder Intensitäten der Peptide im *Pulldown* gemacht werden.

Zur Verifizierung putativer Interaktionskandidaten können Methoden wie die Plasmonresonanz oder die *Microscale-Thermoporese* eingesetzt werden. Zusammen mit kombinierten Dye-Release-Assays konnte Letztere zur Aufklärung der Interaktion von AmiC mit NlpD in *E. coli* erfolgreich eingesetzt werden (Rocaboy et al., 2013). Die Plasmonresonanz stellte sich bei der flüchtigen Interaktion von AmiC mit NlpD als ungeeignet heraus (Bernhardt, persönliche Mitteilung).

## 7.8 Das GerM-Protein

Als putativer Interaktionspartner von AmiC2 wurde das hypothetische Protein Npun\_F0437 im *Pulldown* gefunden (6.6). Mittels BLAST-P-Analyse wurde es als homolog von GerM aus *Bacillus subtilis* identifiziert. Das GerM-Protein aus *B. subtilis* ist assoziiert mit der Sporulation und Keimung (Slynn et al., 1994, Sammons et al., 1987).

Die phylogenetische Verteilung der Sporulationsgene aus *B. subtilis* ist komplex. Viele dieser Gene haben regulatorische Funktionen. Diese kommen auch in nichtsporulierenden Mikroorganismen vor und können in einigen *Clostridia*- und *Bacillus*genomen fehlen (Rigden and Galperin, 2008). Auch außerhalb der *Firmicutes* wurden Homologe zu GerM aus *B. subtilis* gefunden, unter anderem bei Aktinobakterien, Proteobakterien, der *Deinococcus-Thermus* – Gruppe und Cyanobakterien.

Bisher ist ein Fall bekannt (*Halothermothrix orenii*), bei dem die GERMN-Domäne (pfam10646) mit einer Amidase\_3 Domäne (pfam01520) fusioniert ist (Rigden and Galperin, 2008). Es wurden über Sequenzanalysen zwei GERMN-assoziierte Domänen gefunden, die in

einigen Spezies (*Bacillus halodurans* und *Corynebacterium efficiens*) wiederum mit LysM-Domänen in einem Protein vorkommen (Rigden and Galperin, 2008). Die LysM-Domäne ist Bestandteil vieler NlpD-Proteine, welche AmiC-Amidasen regulieren. Das GerM-Protein in *N. punctiforme* besitzt dagegen nur eine Transmembranregion und die GERMN-Domäne.

Die Zellen der *gerM*-Mutante in *N. punctiforme* wachsen langsamer als der WT. Die Mutante akkumuliert Speicherstoffe wie Polyphosphat und Cyanophycin (6.7.3). Die *gerM*-Mutante differenziert zu Heterozysten, Hormogonien und Akineten. Die Akinetendifferenzierung setzte bei der *gerM*-Mutante später als beim WT ein (6.7.2). Wahrscheinlich konnte die Mutante von dem gespeicherten Polyphosphat zehren, bevor für die Zellen eine Mangelsituation eintrat. TEM-Aufnahmen von Dünnschnitten des Septums zeigten *Septal Junctions* (6.7.4). Zusammen mit der Tatsache, dass die *gerM*-Mutante zu Zelldifferenzierung fähig ist, wird angenommen, dass die Filamente über ein ausreichendes Maß an Zell-Zell-Kommunikation verfügen.

Viele Filamente der *gerM*-Mutante sterben. Aufnahmen der Ultrastruktur vegetativer Zellen der *gerM*-Mutante zeigen verschiedene Stadien der Auflösung der Zellen (6.7.4). Auch in Hellfeldaufnahmen wurden tote Filamente gefunden, die nur noch aus der Zellhülle zu bestehen schienen (6.7.2). Dies deutet darauf hin, dass die Zellen nicht an dem unkontrollierten Abbau des Peptidoglykans starben. Fehlt die Zellkomponente, die dem Turgor standhält, dann platzt die Zelle. Verschiedene Stadien der Auflösung von Zellen zu finden suggeriert eher einen kontrollierten Prozess.

In *Bacillus thuringiensis* kann die *gerM*-Mutante im vegetativen Lebenszyklus normal wachsen, auch die Sporulation verläuft normal. Die Keimung verläuft jedoch verzögert zum WT (Yan et al., 2007). Deswegen wäre es interessant, auch die Keimung aus Akineten der *gerM*-Mutante in *N. punctiforme* zu untersuchen. Zusätzlich wäre die Lokalisation des GerM während der Akinetendifferenzierung und Keimung interessant. Dazu würde ein Reporterkonstrukt benötigt. bisherige Versuche, ein Reporterkonstrukt zu konstruieren, sind im Anhang (9.3) beschrieben.

Die Expression von *gerM* ist während der Akinetendifferenzierung in *N. punctiforme* erhöht (Campbell et al., 2007). Während der Differenzierung zu Akineten verändern die Zellen von *N. punctiforme* ihre Morphologie. Das Zellvolumen nimmt zu und die Zellen runden sich ab. Folglich erfährt das Peptidoglykan als Formgeber der Zellen starke Veränderungen. Sowohl *amiC1*, als auch *amiC2* sind zu diesem Zeitpunkt (3 d nach Phosphatentzug) ebenfalls in der Expression hochreguliert (Campbell et al., 2007).

Bei *Anabaena variabilis* zeigte eine *KO*-Mutante (Ava620) des *gerM* vergrößerte vegetative Zellen mit aberranten Septen. Die Mutante kann keine Heterozysten differenzieren und entwickelt Akineten, die sich deutlich von den Akineten des WT von *A. variabilis* unterscheiden: Die Zellen behalten eine blau-grüne Färbung, anstatt braun zu werden und eine charakteristische extrazelluläre Schicht, die sich beim WT mit BODIPY anfärben ließ, fehlte bei Ava620 (Perez, 2016).

Das GerM-Protein könnte AmiC2 aktivieren, eventuell ist eine spezifische Aktivierung während der Akinetendifferenzierung notwendig. Neben der Herstellung des *Nanopore Array* könnte AmiC2 auch andere Funktionen übernehmen, zum Beispiel die Beteiligung an dem PG-Umbau oder die spezifischen Umbauten des septalen Peptidoglykans während der Akinetendifferenzierung. Reife Akineten haben als Überdauerungsform keinen Bedarf an intrafilamentöser Kommunikation. Eventuell könnte AmiC2 durch GerM auch am Rückbau der *Nanoporen* beteiligt sein.

### 7.9 Das NpF5024-Protein

In dieser Arbeit wurde ein NlpD-ähnliches Protein als putativer Interaktionspartner im Pull-down (6.5) gefunden. Von unterschiedlichen unizellulären Bakterien ist bekannt, dass NlpD-Proteine AmiC-Amidasen regulieren. Anders als AmiC2 aus *N. punctiforme* sind diese Amidasen bei der Tochterzelltrennung nach erfolgter Teilung involviert. Das Protein Npf5024 besteht aus einer Sec-Signalsequenz, einer LysM und einer LytM-Domäne.

Die *npf5024*-Mutante kann alle Zelltypen ausbilden. Vegetative Zellen und teilweise sogar Hormogonien akkumulieren, anders als der WT, Polyphosphat. Aufnahmen des Septums mittels Transmissionselektronenmikroskopie zeigen *Septal Junctions*. Ob es Unterschiede in der Zell-Zell-Kommunikation zwischen WT und *npf5024*-Mutante gibt, könnte durch FRAP-Analysen oder durch elektronenmikroskopische Aufnahmen isolierten Peptidoglykans der *npf5024*-Mutante erforscht werden.

Die Fusion mit dem Reporter *sfGFP* zeigt die Lokalisation von Npf5024 im Periplasma von *N. punctiforme*. Die Lokalisation überlappt mit der Lokalisation von AmiC2, welches in der Zellwand überwiegend an jungen Septen gefunden wurde. Eine Interaktion von Npf5024 mit AmiC2 kann deswegen nicht ausgeschlossen werden. Ein eindeutigeres Indiz für eine Interaktion der Proteine wäre jedoch eine identische Lokalisation und *in vitro* Studien zu Interaktion der Proteine.

Es wurde gezeigt, dass LysM-Domänen Peptidoglykan binden (Steen et al., 2003), wobei einige Vertreter dieser Domäne auch an Chitin oder Lipochitin binden (Spaink, 2004, Onaga and

Taira, 2008). In einzelligen Bakterien, wie *E. coli*, konnte gezeigt werden, dass die LytM-Domäne zur Aktivierung einer Amidase ausreicht (Uehara et al., 2010). Zudem führte der *Knock-out* von LytM-Faktoren zu demselben Phänotyp wie die Ausschaltung von Genen der Amidasen (Heidrich et al., 2001, Priyadarshini et al., 2007, Uehara et al., 2009). Alleine mit dem *Knockout* des *npf5024*-Gens (Npun\_F5024) konnte dies in *N. punctiforme* nicht erreicht werden.

In *E. coli* wurden drei Amidasen identifiziert (Heidrich et al., 2002, Heidrich et al., 2001). Dass LytM-Faktoren wie NlpD und EnvC Amidasen regulieren, wurde durch *KO*-Mutanten bewiesen. Fehlen *E. coli* alle drei Amidasen (AmiA, AmiB, AmiC), bleiben die Tochterzellen im Filament zusammen. Dieser Phänotyp ist durch Deletion der LytM-Faktoren NlpD und EnvC reproduziert (Uehara et al., 2009, Uehara et al., 2010). In *E. coli* ist AmiC durch NlpD boolisch reguliert. Eine regulatorische  $\alpha$ -Helix versperrt das katalytische Zentrum (Yang et al., 2012). In Dye-Release-Assays konnte gezeigt werden, dass die Interaktion mit NlpD zur Aktivierung von AmiC führt. Das Level der Aktivität ist vergleichbar mit einer AmiC-Variante, der diese  $\alpha$ -Helix fehlt (Rocaboy et al., 2013).

Auch in *Neisseria gonorrhoeae* wurde der Zusammenhang zwischen AmiC und NlpD festgestellt (Garcia and Dillard, 2006, Stohl et al., 2015, Lenz et al., 2016). Der Phänotyp der *amiC*-Deletionsmutante gleicht dem Phänotyp der *nlpD*-Mutante. Der Charakter der Regulation unterscheidet sich von *E. coli*. In Dye-Release-Assays ist AmiC aus *N. gonorrhoeae* aktiv, wird jedoch von NlpD noch weiter aktiviert. Alleine hat NlpD auch hier keine PG-hydrolysierende Aktivität (Stohl et al., 2015).

Zu ähnlichen Ergebnissen kam es bei der Untersuchung von *Vibrio cholerae* (Möll et al., 2014). Die einzige Amidase von *V. cholerae*, AmiB, besitzt C-terminal drei LysM-Domänen und wird sowohl von EnvC und NlpD reguliert. Die Deletion von AmiB oder EnvC und NlpD führen zum Defekt der Zellteilung und es entstehen Zellketten. Versuche im Mausmodell zeigten, dass die Regulation durch NlpD wichtiger für die Kolonisation des Darms junger Mäuse ist. Über das *Bacterial-two-hybrid* System (Karimova et al., 1998, Möll et al., 2010) wurde die Interaktion zwischen NlpD und AmiB nachgewiesen (Möll et al., 2014).

Zum Nachweis der Interaktion von AmiC<sub>2</sub> mit einem putativen Interaktionspartner ist der Dye-Release-Assay nur bedingt geeignet. Es konnte zwar eine Steigerung der Aktivität von AmiC<sub>2</sub><sub>MC</sub> und AmiC<sub>2</sub><sub>BMC</sub> durch die Addition von Npf5024 gezeigt werden. Diese Aktivierung erreicht jedoch nicht das Niveau von AmiC<sub>2</sub><sub>C</sub>, welches nicht über die Modulatorregion verfügt. Die Addition von TnrA sollte keinen Effekt auf die PG-Hydrolaseaktivität haben. Es ist ein cytoplasmatisches Protein aus einem anderen Organismus mit einer gänzlich anderen Funktion. Der Effekt von TnrA auf AmiC<sub>2</sub><sub>MC</sub> und AmiC<sub>2</sub><sub>BMC</sub> ist jedoch noch stärker als bei der Zugabe

von Npf5024. Anders verhielt es sich bei der Zugabe von Ovalbumin oder der Karbonischen Anhydrase als Kontrolle. Diese Proteine führen nicht zu einer Aktivierung von AmiC2<sub>MC</sub> oder AmiC2<sub>BMC</sub>, allerdings erfährt AmiC2C eine leichte Aktivierung.

Es gibt zwei Richtungen, in welche hier argumentiert werden kann. Entweder TnrA ist die „richtige“ Kontrolle und es gibt keine spezifische Interaktion zwischen AmiC2<sub>MC</sub> oder AmiC2<sub>BMC</sub> mit Npf5024, oder TnrA ist als Kontrolle ungeeignet, da es mit anderen Proteinen interagiert (Kayumov et al., 2011). Dadurch kommt vielleicht eine unspezifische Interaktion mit AmiC2-Proteinen zustande.

In *Microscale-Thermoporese*-Experimenten wurde Lysozym als Kontrolle verwendet (Rocaboy et al., 2013). Das Lysozym aus Hühnereiweiß, welches meist Verwendung findet, ist Teil des angeborenen Immunsystems. Es bedarf keiner Kontrolle, da es gegen bakterielle Strukturen gerichtet ist. Lysozym besitzt keine Domäne zur Protein-Protein-Interaktion. Wenn TnrA als Kontrolle verworfen und stattdessen Ovalbumin und die Karbonische Anhydrase als Kontrollen akzeptiert würden, müsste die leichte Aktivitätssteigerung von AmiC2<sub>C</sub> durch Zugabe von Ovalbumin oder Karbonischer Anhydrase als unspezifisch angesehen werden.

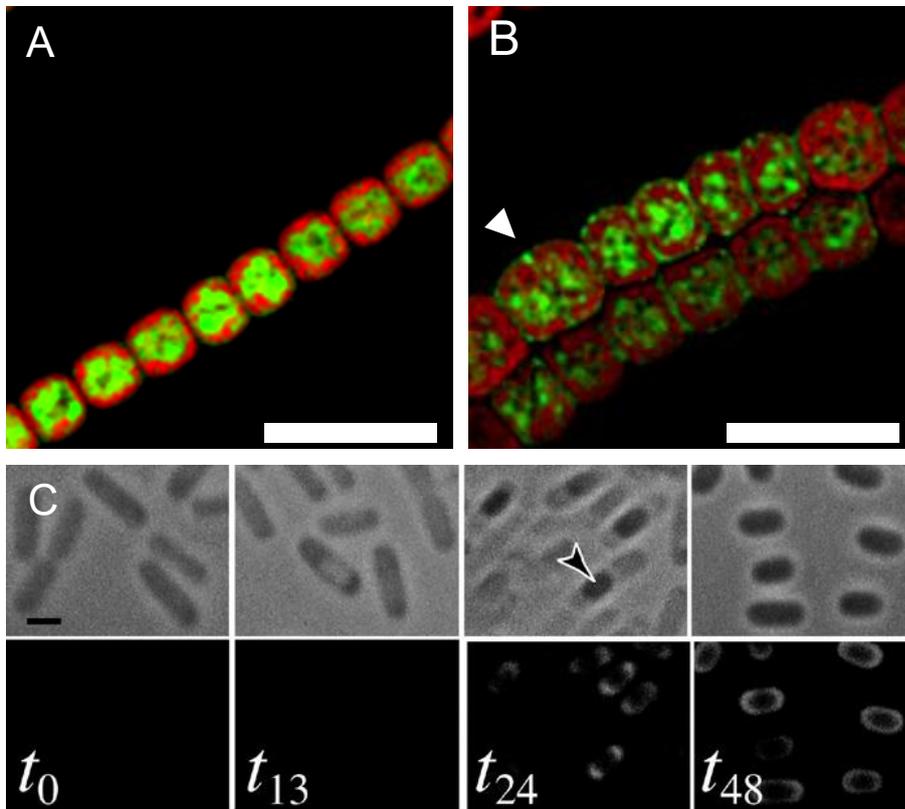
### 7.10 Vergleich von SlpD und SlpB mit SleB-Proteinen

Auf Ebene der AS-Sequenzen von SlpB (Npun\_R4778) und SlpD (Npun\_R1578) wurden Homologien zu SleB (*spore-core lytic enzyme B*) aus *Bacillus subtilis* und anderen grampositiven Bakterien gefunden. Diese Mitglieder der *Firmicutes* bilden Endosporen, welche Gemeinsamkeiten, aber auch markante Unterschiede zu Akineten der Cyanobakterien besitzen.

Beide Sporenformen dienen der Überdauerung harscher Umweltbedingungen und nicht der Verbreitung. Endosporen können als kryptobiotische Form der Bakterien Millionen von Jahren überdauern (Cano and Borucki, 1995). Endosporen sind resistent gegen Hitze, Kälte, Austrocknung und sogar Radioaktivität (Setlow, 2006). Die Akineten widerstehen Kälte und Trockenheit, aber sie behalten eine metabolische Restaktivität (Thiel and Wolk, 1983, Perez et al., 2016). Akineten entwickeln sich aus vegetativen Zellen durch den Umbau der vegetativen Zelle, während Endosporen durch asymmetrische Zellteilung und anschließende Einkapselung innerhalb der Sporenmutterzelle entstehen. Die Sporenmutterzelle stirbt, wenn die Endospore reif ist und in die Umgebung freigegeben wird (Stragier and Losick, 1996).

Während der Sporulation wird SleB in einer inaktiven Form exprimiert und in die Kortexregion der Spore transportiert. Erst während der Keimung wird SleB aktiviert (Boland et al., 2000, Ishikawa et al., 1998). Nach Induktion der Sporulation ist ein Signal für SleB nach 24 h zu sehen (Abbildung 57C). In den länglichen Vorsporen lokalisiert SleB in den Polregionen. In

reifen Sporen ist, 48 h nach Beginn der Sporulation, SleB im Kortex um die Spore gleichmäßig verteilt (Masayama et al., 2006).

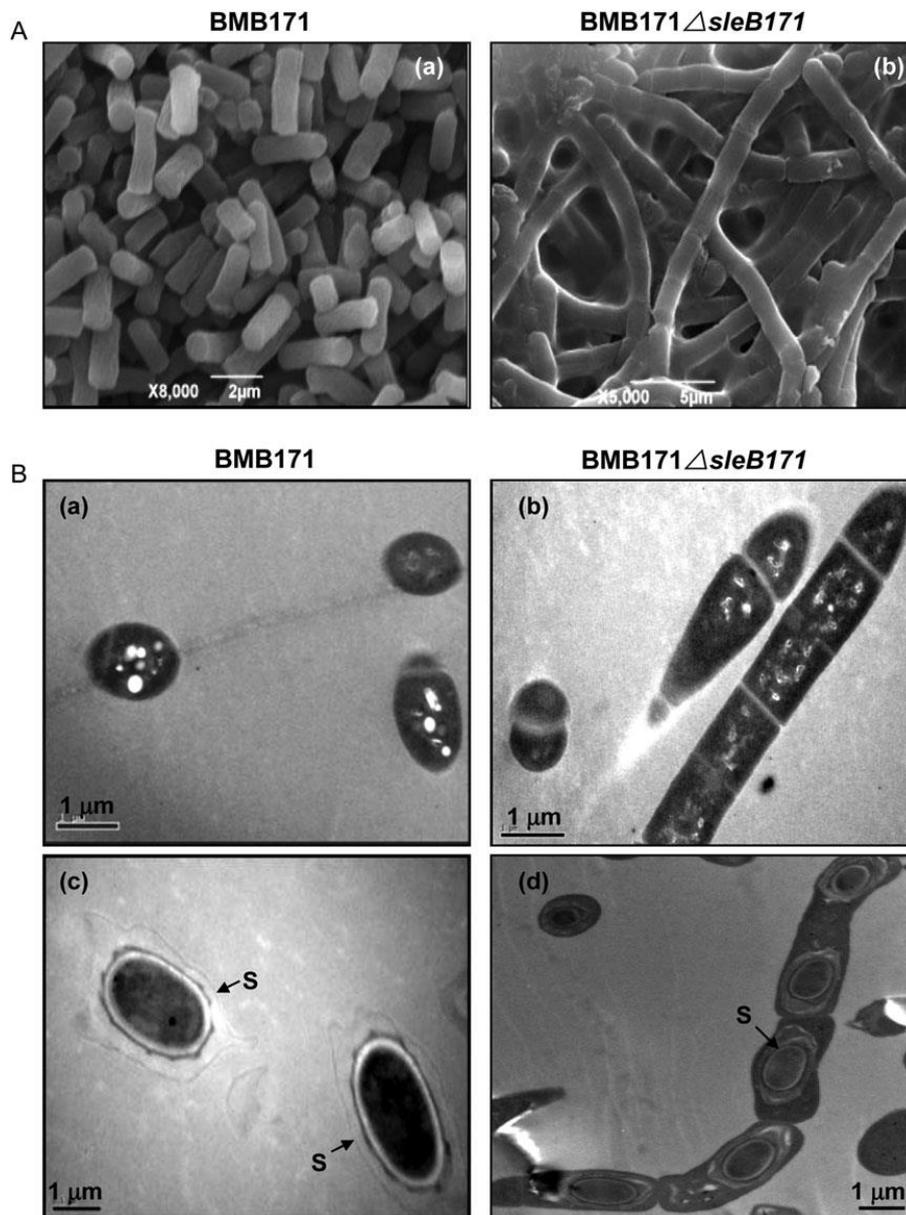


**Abbildung 57: Lokalisation von SlpD (A), SlpB (B) und SleB von *Bacillus subtilis* (C) im Vergleich.** SlpD wird in vegetativen Zellen stark exprimiert, aber kaum in das Periplasma transportiert. Obwohl SlpB keine Signalsequenz besitzt, ist es stärker im Periplasma lokalisiert als SlpD. Auch in der Region naszenter Septen ist das Signal vorhanden (weißer Pfeil, Größenstandards: 7,5  $\mu\text{m}$ ). Während der Sporulation wird SleB exprimiert und ist hier unter (C) als GFP-Fusion zu sehen. Aufnahmen nach Induktion der Sporulation (0 h, 13 h, 24 und 48 h) im Hellfeld (oberes Paneel) und im GFP-Kanal (unteres Paneel). Erst in der Vorspore ist ein Signal zu erkennen (Pfeil). Das Protein ist zunächst an den Polen und in der reifen Spore im Kortex um die Spore gleichmäßig verteilt. Größenstandard: 1  $\mu\text{m}$ . (Masayama et al., 2006).

Auch wenn diese drei Proteine innerhalb ihrer Domänen konserviert sind, werden vermutlich sehr unterschiedliche Funktionen von ihnen erfüllt. Das Lokalisationsverhalten von SlpD und SlpB könnte in Filamenten mit Heterozysten und in Hormogonien studiert werden. Besonders im Hinblick auf die Funktion von SleB wäre die Lokalisation von SlpD und SlpB während der Akinetendifferenzierung und Keimung interessant.

In *Bacillus thuringiensis* BMB171 ist SleB als Peptidoglykanhydrolase annotiert, die nicht als SCLE (*spore cortex-lytic enzyme*) gilt, sondern als lytische Transglykosilase (Giebel et al., 2009) mit wichtiger Funktion für die Zellteilung im vegetativen Zellzyklus. Es konnte gezeigt werden, dass SleB171 hauptsächlich in der Wachstumsphase in vegetativen Zellen exprimiert wird (Li et al., 2016). Eine *sleB171-knockout*-Mutante spiegelt den Phänotyp von *amidase*-Mutanten einzelliger Bakterien wider (Abbildung 58). Die Proteine SlpB und SlpD aus *N. punctiforme* besitzen beide keine oder zumindest keine vollständige enzymatische Domäne. Durch

ihre Peptidoglykan-Bindedomänen und durch Protein-Protein-Interaktion könnten sie regulieren, wo bestimmte PG-Hydrolasen schneiden.



**Abbildung 58: Elektronenmikroskopieaufnahmen von *Bacillus thuringiensis* BMB171, WT und *sleB171*-Mutante im Vergleich. A) Rasterelektronenmikroskopieaufnahme nach 48 h Inkubation. Vegetative Zellen des WT wachsen einzellig (a), während die *sleB171*-Mutante in Zellketten wächst (b). B) Transelektronenmikroskopieaufnahmen von Zellen nach 48 h (a+b) und nach 72 h (c+d) Inkubation. Auch während der Sporulation bleiben die Zellen der *sleB171*-Mutante im Filament verbunden. Die Sporenentwicklung der Mutante ist verzögert. Nach 72 h Inkubation zeigt der WT reife Sporen (s) (Li et al., 2016).**

### 7.10.1 SlpD

Das Protein SlpD<sub>s</sub>/GFP wird über seine native Promotorregion in vegetativen Zellen stark exprimiert. Obwohl SlpD über eine Sec-Signalsequenz verfügt, ist es hauptsächlich intrazellulär lokalisiert (6.9.3, Abbildung 57A). Das Protein SlpD besitzt vier PG-Bindedomänen (pfam01471). Daher wird der Wirkort von SlpD am Peptidoglykan vermutet. Eventuell wird

das Protein im Cytoplasma zurückgehalten und erst bei Bedarf ins Periplasma exportiert. Da mit einer Sec-Signalsequenz versehene Proteine ungefaltet ins Periplasma sekretiert werden, wäre zu erwarten, dass SlpD im Cytoplasma in seiner ungefalteten Form vorliegt. Ungefaltet wäre jedoch *sfGFP* nicht fluoreszent, das Signal des SlpD:*sfGFP* ist aber deutlich im Cytoplasma zu sehen (Abbildung 57A). Zumindest der Fluorophor ist daher in der korrekt gefalteten Version vorhanden. Da es sich um die *superfolder*-Variante von GFP handelt, könnte es sein, dass dieses sich selbstständig faltet (Aronson et al., 2011, Dinh and Bernhardt, 2011, Pédelacq et al., 2006). Falls SlpD eine sehr schwache Exportsequenz besitzt, könnte gefaltetes *sfGFP* eventuell den Transport behindern.

Das Protein SlpD besitzt einen Teil von zwei Teilen einer SPOR-Domäne. Diese Domäne ist in *E. coli* in Zellteilungsproteinen wie FtsN, DamX, DedD und RlpA vorhanden. Jeder der SPOR-Domänen führt zur Lokalisation am Septum, da SPOR-Domänen vorzugsweise an Glykanstränge binden, die keine Peptidketten mehr aufweisen (Yahashiri et al., 2015). Genau diese „nackten“ Glykanstränge werden von Amidasen wie AmiC2 hinterlassen. Falls eine halbe SPOR-Domäne ausreicht, um diese Glykanstränge zu binden, könnte SlpD auch am Aufbau der proteinösen *Septal Junctions* beteiligt sein. Die *slpD*-Mutante zeigt in *N. punctiforme* keinen auffälligen Phänotyp, allerdings steht die Charakterisierung über die Akinetendifferenzierung und Keimung noch aus. Der intrafilamentöse Stoffaustausch zwischen den Nachbarzellen könnte durch FRAP analysiert werden. Außerdem sollten die Sacculi im TEM analysiert werden.

### 7.10.2 SlpB

Das zweite Protein mit Ähnlichkeit zu SleB ist SlpB. Die *slpB*-Mutante zeigte lediglich in der Akinetendifferenzierung Unterschiede zum WT in *N. punctiforme*. Die Akineten der *slpB*-Mutante sind sehr voluminös und nicht granulös. Obwohl bei SlpB keine Transportsequenz gefunden wurde (6.10), ist es in vegetativen Zellen sowohl im Cytoplasma als auch in der Zellwand lokalisiert (Abbildung 57B). Entweder sind die verfügbaren Vorhersageprogramme lückenhaft, sodass die Sequenz nicht erkannt wurde, oder es gibt weitere, bisher unbekannte Formen des Proteintransports über die Cytoplasmamembran. Das Protein SlpB besitzt zwei PG-Bindedomänen (pfam01471), daher wurde die Lokalisation im Periplasma trotz fehlender Signalsequenz erwartet. Das Signal ist stärker in kleineren, jungen Zellen und dort intrazellulär wie auch im Periplasma lateral und in den Septumsregionen lokalisiert. In Zellen, die sich im Prozess der Teilung befinden, ist SlpB im naszenten Septum vorhanden (Abbildung 57 weiße Pfeilspitze).

### 7.11 Wie entsteht der *Nanopore Array*?

Der spezielle Domänenaufbau von AmiC2 könnte grundsätzlich der Herstellung der Poren dienen. Die AMIN-Domänen verankern AmiC2 am Peptidoglykan, der Modulator erlaubt das flexible Agieren der katalytischen Domäne. Theoretisch ist die Modulatorregion lang genug, dass AmiC2-Proteine die einzelnen Poren wie ein Zirkel ausscheiden könnten. Da AmiC2 an der septalen Zellwand lokalisiert, lange bevor der *Nanopore Array* zu sehen ist, wird davon ausgegangen, dass AmiC2 zunächst inaktiv ist. Wenn das Septum geschlossen ist, könnte ein Signal die AmiC2-Proteine aktivieren und der *Nanopore Array* entsteht. In *Anabaena* PCC7120 beeinflussen Fra-Proteine den *Nanopore Array* (Nürnberg et al., 2015). Homologe dieser Proteine konnten im *Pulldown* (6.6) als putative Interaktionspartner von AmiC2 nicht gefunden werden. Eventuell dienen Peptidoglykanbindepoteine wie SlpD und SlpB als Begrenzung oder zur Positionierung der AmiC2-Proteine, während Proteine wie beispielsweise Npf5024 oder GerM AmiC2 regulieren.

Flüchtige Protein-Protein-Interaktionen sind schwer zu identifizieren. Für weitere *Pulldown*-Experimente wurde ein Set von AmiC<sub>1/2</sub>-GFP- Expressionsplasmiden entwickelt (5.2.2). Damit wird es möglich sein, Interaktionspartner von AmiC1 und AmiC2 zu identifizieren. Besonders unterschiedliche Interaktionspartner könnten Einblicke in die Funktion von AmiC1 erlauben. Durch trunkierte Versionen, die den Lokalisationskonstrukten aus Abschnitt 6.2.2 gleichen, wird es für AmiC2 auch möglich, die Domäne, welche für die Protein-Protein-Interaktion verantwortlich ist, zu identifizieren.

### 7.12 Die Speicherstoffe Polyphosphat und Cyanophycin

Die *npf5024*-Mutante reichert intrazellulär Polyphosphat an und die *gerM*-Mutante akkumuliert Polyphosphat und Cyanophycin. In den nachfolgenden Abschnitten wird die Bedeutung dieser Speicherstoffe für Zellen beleuchtet. Auch wirtschaftlich sind diese Stoffe wichtig.

#### 7.12.1 Die Bedeutung von Polyphosphat

In dieser Arbeit wurden putative Interaktionspartner von AmiC2 charakterisiert. Zwei der *KO*-Mutanten, die *gerM*-Mutante und die *Npf5024*-Mutante, zeigen die Tendenz, Polyphosphat zu akkumulieren.

Polyphosphat ist ein lineares Polymer und besteht aus vielen Orthophosphatresten, die durch energiereiche Phosphoanhydridbindungen verbunden sind (Manganelli, 2007). Umstellungen

des Metabolismus sowie Gen- und Enzymregulation werden mit Polyphosphat assoziiert (Achbergerová and Nahálka, 2011, Brown and Kornberg, 2008). Auch der Einlagerung von Kationen der Metalle Magnesium, Barium und Mangan können Polyphosphatgranula dienen (Baxter and Jensen, 1980). In Cyanobakterien wurde gezeigt, dass Schwermetalle zu einer Volumenzunahme des Polyphosphats führten, jedoch nicht zu einer Zunahme der Masse der Polyphosphatgranula. Wenn Cyanobakterien toxischen Schwermetallen ausgesetzt sind, fungiert Polyphosphat als eine Art Puffer und dient damit der Detoxifizierung (Allen, 1984).

Generell ist Polyphosphat das interne Reservoir für energiereiche Phosphoanhydridbindungen. Darüber hinaus verhindert es den Abbau von RNA, ist involviert in *Quorum Sensing* und Biofilmbildung, sorgt für die Akkuratess bei der Replikation der DNA und bei der Translation von Proteinen. Polyphosphat trägt zur Stressresistenz bei und beeinflusst in einigen Spezies auch die Virulenz (Brown and Kornberg, 2004, Rao et al., 2009, Stumpf and Foster, 2005, McInerney et al., 2006)

In Bakterien wird Polyphosphat durch die Polyphosphatkinase (PPK) synthetisiert, dabei wird terminales Phosphat von ATP in einer reversiblen Hydrolyse-Reaktion abgespalten und in Polyphosphat umgewandelt. Die Exopolyphosphatase baut Polyphosphat ab. Beide Enzyme sind membranassoziiert und balancieren den Phosphatmetabolismus der Zelle (Kuroda et al., 1997). Bei *Synechocystis* konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von Phosphat sehr schnell erfolgt und bis zu 10 % des Phosphats in den Zellen als Polyphosphat vorliegt (Grillo and Gibson, 1979). In einzelligen Cyanobakterien werden Polyphosphatgranula oft in der Nähe von Carboxysomen im Cytoplasma der Zellen gefunden (Nierzwicki-Bauer et al., 1983, Liberton et al., 2011). Auch in *N. punctiforme* konnte diese Beobachtung gemacht werden (Abbildung 39 und Abbildung 53). Einige Zellen der beide hier beschriebenen Mutanten lassen auf einen höheren Anteil als 10 % des Polyphosphats in den Zellen schließen.

Die *gerM*-Mutante in *N. punctiforme* wächst langsamer als der WT. Die Speicherstoffe Polyphosphat und Cyanophycin (N-Reservoir) werden akkumuliert (6.7.3). Sowohl Stickstoff als auch Phosphat sind in der Natur oft die wachstumsbegrenzenden Faktoren. Auch wenn die *gerM*-Mutante zur Differenzierung von Heterozysten, Hormogonien und Akineten fähig ist, ist sie kaum lebensfähig. Viele Filamente sterben und treiben als *ghosts* im Medium (6.7.2). Daher könnte in der Mutante Polyphosphat als Stressantwort gebildet werden.

Im Gegensatz zur *gerM*-Mutante wächst die *npf5024*-Mutante etwas schneller als der WT. Auch diese Mutante akkumuliert Polyphosphat (6.8.3). Als Makronährstoff ist Phosphat für das Zellwachstum wichtig. Da das Wachstum schneller ist als beim WT und zusätzlich Polyphosphat aufgebaut wird, müsste die Aufnahme des Phosphats erhöht sein.

### 7.12.2 Die Bedeutung von Cyanophycin

Als Speicher für Stickstoff benutzen viele Cyanobakterien und einige heterotrophe Bakterien Cyanophycin (Simon, 1971, Allen, 1984, Allen et al., 1980, Ziegler et al., 2002, Krehenbrink et al., 2002). Das Polymer aus den proteinogenen Aminosäuren L-Arginin und L-Asparaginsäure wurde schon im Jahre 1887 von dem Botaniker Antonino Borzì entdeckt (Simon, 1971). In Cyanobakterien können Faktoren wie Phosphatlimitierung, Lichtstress, niedrige Temperaturen, das Antibiotikum Chloramphenicol oder die stationäre Wachstumsphase zur Akkumulation von Cyanophycin führen (Watzer et al., 2015, Obst and Steinbüchel, 2004, Simon, 1973b, Simon, 1973a).

Das PII-Protein integriert Informationen über den Energiestatus der Zellen, den Kohlenstoffhaushalt und den Stickstoffhaushalt. Durch PII-Proteine wird letztlich auch der Aufbau von Cyanophycin reguliert (Watzer et al., 2015, Maheswaran et al., 2006). In der Ordnung der *Nostocales* befindet sich Cyanophycin auch in Heterozysten an den Kontaktstellen zu Nachbarzellen des Filaments (Ziegler et al., 2001) und in Akineten (Simon, 1971).

In *Anabaena* PCC7120 konnte gezeigt werden, dass das PII-Protein in vegetativen Zellen phosphoryliert vorliegt und in Heterozysten nicht phosphoryliert ist. Dies steht in Korrelation zu den metabolischen Funktionen der verschiedenen Zelltypen. Vegetative Zellen besitzen eine hohe Konzentration an 2-Oxoglutarat, die durch Photosynthese und Kohlenstofffixierung verursacht wird. Ähnliche Erkenntnisse liegen für *N. punctiforme* nicht vor.

Die *gerM*-Mutante akkumuliert Cyanophycin in vegetativen Zellen (6.7.3). Zudem ist das Wachstum stark verlangsamt. Durch Fehlen des GerM-Proteins wird wahrscheinlich eine Stresssituation simuliert, sodass die Physiologie der vegetativen Zellen gestört ist. Auch Polyphosphat wird von der *gerM*-Mutante angereichert.

### 7.12.3 Wirtschaftliche Aspekte von Cyanophycin und Polyphosphat

Aufgrund der Ähnlichkeiten zu Polyacrylaten steht Cyanophycin im Fokus der Forschung für die Herstellung von Biokunststoffen (Nausch et al., 2016b, Nausch et al., 2016a). Die *gerM*-Mutante aus *N. punctiforme* wächst zu langsam, sodass sie für Gewinnung von Cyanophycin ungeeignet ist. Im Gegensatz zu heterotrophen Bakterien brauchen Cyanobakterien für die Cyanophycingewinnung keine teuren Ausgangsstoffe. Erkenntnisse aus der Erforschung der *gerM*-Mutante aus *N. punctiforme* könnten genutzt werden, um andere Cyanobakterien zu Cyanophycin-Produktionsstämmen zu entwickeln.

Die moderne Landwirtschaft braucht Phosphat als Mineraldünger für das Pflanzenwachstum. Als gefragte Ressource mit einer ungleichen Verteilung von Phosphatminen kam es 2008 zum Preisanstieg von Düngemitteln (Schoumans et al., 2015). Gleichzeitig sind Abwässer oft hoch mit Phosphaten belastet, welche das Gleichgewicht der Umwelt durch Eutrophierung gefährden. Die Rückgewinnung von Phosphat aus Abwässern ist Gegenstand intensiver Forschungen (Wilfert et al., 2015, Ye et al., 2015, Tarayre et al., 2016, Hirota et al., 2010). Der Vorteil des Einsatzes von Cyanobakterien gegenüber copiothrophen Phosphatakkumulierern ist ihr geringer Bedarf an Nährstoffen. Eventuell kann die *Npf5024*-Mutante aus *N. punctiforme* oder die Erkenntnisse über diese Mutante zur Rückgewinnung von Phosphat beitragen.

### 7.13 Ausblick

In *N. punctiforme* ist die Amidase AmiC2 grundlegend für die Zell-Zell-Kommunikation innerhalb des Filaments. Die Transformation des septalen Peptidoglykans in den *Nanopore Array* ist eine anspruchsvolle Aufgabe, die einer gut organisierten Regulation des potentiell lethalen Enzyms erfordert. Neue Expressionsplasmide, welche für verschiedene trunkierte AmiC2<sub>sf</sub>GFP-Varianten kodieren, können verwendet werden, um im Zellextrakt Interaktionspartner zu finden. Durch die verkürzten Versionen von AmiC2 kann die Domäne der Interaktion ausgemacht werden. Zudem ist der Vergleich von AmiC1 und AmiC2 interessant: Identisch im Aufbau ihrer Domänen und in der Lokalisation in vegetativen Zellen, aber unterschiedlich in der Expression während der Heterozystenentwicklung haben diese beiden Enzyme trotz ihrer hohen Ähnlichkeit wahrscheinlich verschiedene Funktionen.

In dieser Arbeit wurden vier putative Interaktionspartner von AmiC2 aufgezeigt. Die Deletionsmutante des Gens *slpD* segregierte so spät, dass hier die Charakterisierung der Deletionsmutante noch weitestgehend aussteht. Die Charakterisierung der drei anderen Mutanten kann durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gereinigter Septen vervollständigt werden. In Dünnschnitten von Filamenten der Mutanten waren in der septalen Zellwand Strukturen, die *Septal Junctions* darstellen könnten, zu erkennen. Deswegen ist es wahrscheinlich, dass die Filamente der Mutanten über Zell-Zell-Kommunikation verfügen. Jedoch nur die Auswertung des *Nanopore Arrays* und FRAP-Analysen können Aufschluss geben, ob die Kommunikation der des WT entspricht. Die Reporterkonstrukte können genutzt werden, um die Deletionsmutanten zu komplementieren. Die Lokalisation der Proteine der putativen Interaktoren wurde bisher nur bei vegetativen Zellen vorgenommen. Da die jeweiligen nativen Promotoren verwendet wurden, entstehen aussagekräftige Muster der Expression und Lokalisation. Einzig bei der *gerM*-Mutante (NpunF0437) konnte der native Promotor nicht verwendet werden, da der Klonierungswirt *E. coli* diesen Promotor extrem stark abgelesen hat. Dies führte zu unerwünschten Veränderungen des Plasmids. Zur Lokalisation von GerM könnte das neu hergestellte Reporterkonstrukt ohne Promotorsequenz verwendet werden. Zur Herstellung einer Revertante ist diese Herangehensweise nicht geeignet. Besonders attraktiv wäre eine zeitliche Auflösung der Lokalisierung der Zellwandproteine durch *time-lapse*-Mikroskopie mit den Reporterstämmen während dem exponentiellen Wachstum und den Zelldifferenzierungen.

Ein Hauptaugenmerk sollte der Erforschung des Modulators von AmiC2 gelten. Diese Domäne der intrinsischen Regulation von AmiC2 wurde in dieser Arbeit entdeckt und eröffnet neue Möglichkeiten zum Verständnis der vielfältigen Regulation von Amidasen.

## 8 Referenzen

- Achbergerová, L. and Nahálka, J. (2011) 'Polyphosphate--an ancient energy source and active metabolic regulator', *Microb Cell Fact*, 10, pp. 63.
- Adams, D. G. and Duggan, P. S. (2008) 'Cyanobacteria-bryophyte symbioses', *J Exp Bot*, 59(5), pp. 1047-58.
- Allen, M. B. and Arnon, D. I. (1955) 'Studies on Nitrogen-Fixing Blue-Green Algae. I. Growth and Nitrogen Fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm', *Plant Physiol*, 30(4), pp. 366-72.
- Allen, M. M. (1984) 'Cyanobacterial cell inclusions', *Annu Rev Microbiol*, 38, pp. 1-25.
- Allen, M. M., Hutchison, F. and Weathers, P. J. (1980) 'Cyanophycin granule polypeptide formation and degradation in the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308', *J Bacteriol*, 141(2), pp. 687-93.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990) 'Basic local alignment search tool', *J Mol Biol*, 215(3), pp. 403-10.
- Argueta, C., Yuksek, K. and Summers, M. (2004) 'Construction and use of GFP reporter vectors for analysis of cell-type-specific gene expression in *Nostoc punctiforme*', *J Microbiol Methods*, 59(2), pp. 181-8.
- Aronson, D. E., Costantini, L. M. and Snapp, E. L. (2011) 'Superfolder GFP is fluorescent in oxidizing environments when targeted via the Sec translocon', *Traffic*, 12(5), pp. 543-8.
- Baxter, M. and Jensen, T. (1980) 'Uptake of magnesium, strontium, barium, and manganese by *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) with special reference to polyphosphate bodies', *Protoplasma*, 104(1), pp. 81-89.
- Berendt, S. (2011a) *Funktionelle Charakterisierung von Zellwandproteinen in der Zelldifferenzierung von Heterozysten bildenden Cyanobakterien der Ordnung Nostocales*. PhD, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Universität Tübingen.
- Berendt, S. (2011b) *Funktionelle Charakterisierung von Zellwandproteinen in der Zelldifferenzierung von Heterozysten bildenden Cyanobakterien der Ordnung Nostocales*. PhD, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Universität Tübingen.
- Berendt, S., Lehner, J., Zhang, Y. V., Rasse, T. M., Forchhammer, K. and 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', *J Bacteriol*, 194(19), pp. 5218-27.
- Bernhardt, T. G. and de Boer, P. A. (2003) 'The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway', *Mol Microbiol*, 48(5), pp. 1171-82.
- Bertani, G. (1951) 'Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 62(3), pp. 293-300.
- Black, T. A., Cai, Y. and Wolk, C. P. (1993) 'Spatial expression and autoregulation of *hetR*, a gene involved in the control of heterocyst development in *Anabaena*', *Mol Microbiol*, 9(1), pp. 77-84.
- Black, T. A. and Wolk, C. P. (1994) 'Analysis of a *Het*- mutation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 implicates a secondary metabolite in the regulation of heterocyst spacing', *J Bacteriol*, 176(8), pp. 2282-92.
- Boland, F. M., Atrih, A., Chirakkal, H., Foster, S. J. and Moir, A. (2000) 'Complete spore-cortex hydrolysis during germination of *Bacillus subtilis* 168 requires SleB and YpeB', *Microbiology*, 146 ( Pt 1), pp. 57-64.
- Bornikoel, J. 2015. *RE: Septal Peptidoglycan grows inwards. Only when the septal disc is completed, the nanopore array will start to form.*
- Boyer, H. W. and Roulland-Dussoix, D. (1969) 'A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*', *J Mol Biol*, 41(3), pp. 459-72.
- Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Anal Biochem*, 72, pp. 248-54.

- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R. and Casadevall, A. (2015) 'Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi', *Nat Rev Microbiol*, 13(10), pp. 620-30.
- Brown, M. R. and Kornberg, A. (2004) 'Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(46), pp. 16085-7.
- Brown, M. R. and Kornberg, A. (2008) 'The long and short of it - polyphosphate, PPK and bacterial survival', *Trends Biochem Sci*, 33(6), pp. 284-90.
- Burke, V. (1922) 'Notes on the Gram Stain with Description of a New Method', *J Bacteriol*, 7(2), pp. 159-82.
- Burnat, M., Schleiff, E. and Flores, E. (2014) 'Cell envelope components influencing filament length in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120', *J Bacteriol*, 196(23), pp. 4026-35.
- Büttner, F. M., Faulhaber, K., Forchhammer, K., Maldener, I. and Stehle, T. (2016) 'Enabling cell-cell communication via nanopore formation: structure, function and localization of the unique cell wall amidase AmiC2 of *Nostoc punctiforme*', *FEBS J*, 283(7), pp. 1336-50.
- Büttner, F. M., Renner-Schneck, M. and Stehle, T. (2015) 'X-ray crystallography and its impact on understanding bacterial cell wall remodeling processes', *Int J Med Microbiol*, 305(2), pp. 209-16.
- Campbell, E. L., Hagen, K. D., Chen, R., Risser, D. D., Ferreira, D. P. and Meeks, J. C. (2015) 'Genetic analysis reveals the identity of the photoreceptor for phototaxis in hormogonium filaments of *Nostoc punctiforme*', *J Bacteriol*, 197(4), pp. 782-91.
- Campbell, E. L. and Meeks, J. C. (1989) 'Characteristics of Hormogonia Formation by Symbiotic *Nostoc* spp. in Response to the Presence of *Anthoceros punctatus* or Its Extracellular Products', *Appl Environ Microbiol*, 55(1), pp. 125-31.
- Campbell, E. L., Summers, M. L., Christman, H., Martin, M. E. and Meeks, J. C. (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', *J Bacteriol*, 189(14), pp. 5247-56.
- Cano, R. J. and Borucki, M. K. (1995) 'Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber', *Science*, 268(5213), pp. 1060-4.
- Chao, L. and Bowen, C. C. (1971) 'Purification and properties of glycogen isolated from a blue-green alga, *Nostoc muscorum*', *J Bacteriol*, 105(1), pp. 331-8.
- Clowes, R. C. and Rowley, D. (1954) 'Some observations on linkage effects in genetic recombination in *Escherichia coli* K-12', *J Gen Microbiol*, 11(2), pp. 250-60.
- Cozy, L. M. and Callahan, S. M. (2014) 'The hmp chemotaxis cluster regulates gliding in the filamentous cyanobacterium *Nostoc punctiforme*', *Mol Microbiol*, 92(2), pp. 213-6.
- Cristóbal, S., de Gier, J. W., Nielsen, H. and von Heijne, G. (1999) 'Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*', *EMBO J*, 18(11), pp. 2982-90.
- de Pedro, M. A., Quintela, J. C., Höltje, J. V. and Schwarz, H. (1997) 'Murein segregation in *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 179(9), pp. 2823-34.
- de Souza, R. F., Anantharaman, V., de Souza, S. J., Aravind, L. and Gueiros-Filho, F. J. (2008) 'AMIN domains have a predicted role in localization of diverse periplasmic protein complexes', *Bioinformatics*, 24(21), pp. 2423-6.
- Dinh, T. and Bernhardt, T. G. (2011) 'Using superfolder green fluorescent protein for periplasmic protein localization studies', *J Bacteriol*, 193(18), pp. 4984-7.
- Drew, D., Lerch, M., Kunji, E., Slotboom, D. J. and de Gier, J. W. (2006) 'Optimization of membrane protein overexpression and purification using GFP fusions', *Nature Methods*, 3(4), pp. 303-313.
- Duggan, P. S., Gottardello, P. and Adams, D. G. (2007) 'Molecular analysis of genes in *Nostoc punctiforme* involved in pilus biogenesis and plant infection', *J Bacteriol*, 189(12), pp. 4547-51.
- Elhai, J. and Wolk, C. P. (1988) 'A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers', *Gene*, 68(1), pp. 119-38.

- Figurski, D. H. and Helinski, D. R. (1979) 'Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(4), pp. 1648-52.
- Flores, E. and Herrero, A. (2010) 'Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria', *Nat Rev Microbiol*, 8(1), pp. 39-50.
- Flores, E., Herrero, A., Forchhammer, K. and Maldener, I. (2016) 'Septal Junctions in Filamentous Heterocyst-Forming Cyanobacteria', *Trends Microbiol*, 24(2), pp. 79-82.
- Flores, E., Herrero, A., Wolk, C. P. and Maldener, I. (2006) 'Is the periplasm continuous in filamentous multicellular cyanobacteria?', *Trends Microbiol*, 14(10), pp. 439-43.
- Flores, E., Pernil, R., Muro-Pastor, A. M., Mariscal, V., Maldener, I., Lechno-Yossef, S., Fan, Q., Wolk, C. P. and Herrero, A. (2007) 'Septum-localized protein required for filament integrity and diazotrophy in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120', *J Bacteriol*, 189(10), pp. 3884-90.
- Forchhammer, K. and Tandeau de Marsac, N. (1995) 'Phosphorylation of the PII protein (glnB gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: analysis of in vitro kinase activity', *J Bacteriol*, 177(20), pp. 5812-7.
- Garcia, D. L. and Dillard, J. P. (2006) 'AmiC functions as an N-acetylmuramyl-L-alanine amidase necessary for cell separation and can promote autolysis in *Neisseria gonorrhoeae*', *J Bacteriol*, 188(20), pp. 7211-21.
- Ghuysen, J. M. (1968) 'Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism', *Bacteriol Rev*, 32(4 Pt 2), pp. 425-64.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A. and Smith, H. O. (2009) 'Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases', *Nat Methods*, 6(5), pp. 343-5.
- Giddings, T. H. and Staehelin, L. A. (1979) 'Changes in thylakoid structure associated with the differentiation of heterocysts in the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*', *Biochim Biophys Acta*, 546(3), pp. 373-82.
- Giddings, T. H. and Staehelin, L. A. (1981) 'Observation of Microplasmodesmata in both Heterocyst-Forming and Non-Heterocyst-Forming Filamentous Cyanobacteria by Freeze-Fracture Electron Microscopy.', *Archives of Microbiology*, 129, pp. 295-298.
- Giebel, J. D., Carr, K. A., Anderson, E. C. and Hanna, P. C. (2009) 'The germination-specific lytic enzymes SleB, CwlJ1, and CwlJ2 each contribute to *Bacillus anthracis* spore germination and virulence', *J Bacteriol*, 191(18), pp. 5569-76.
- Giovannoni, S. J., Turner, S., Olsen, G. J., Barns, S., Lane, D. J. and Pace, N. R. (1988) 'Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts', *J Bacteriol*, 170(8), pp. 3584-92.
- Grillo, J. F. and Gibson, J. (1979) 'Regulation of phosphate accumulation in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus*', *J Bacteriol*, 140(2), pp. 508-17.
- Hanahan, D. (1983) 'Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids', *J Mol Biol*, 166(4), pp. 557-80.
- Hanahan, D., Jessee, J. and Bloom, F. R. (1991) 'Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria', *Methods Enzymol*, 204, pp. 63-113.
- Hayashi, K. (1975) 'A rapid determination of sodium dodecyl sulfate with methylene blue', *Anal Biochem*, 67(2), pp. 503-6.
- Heidrich, C., Templin, M. F., Ursinus, A., Merdanovic, M., Berger, J., Schwarz, H., de Pedro, M. A. and Höltje, J. V. (2001) 'Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*', *Mol Microbiol*, 41(1), pp. 167-78.
- Heidrich, C., Ursinus, A., Berger, J., Schwarz, H. and Höltje, J. V. (2002) 'Effects of multiple deletions of murein hydrolases on viability, septum cleavage, and sensitivity to large toxic molecules in *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 184(22), pp. 6093-9.
- Hernández-Muñoz, W. and Stevens, S. E. (1987) 'Characterization of the motile hormogonia of *Mastigocladus laminosus*', *J Bacteriol*, 169(1), pp. 218-23.
- Hirota, R., Kuroda, A., Kato, J. and Ohtake, H. (2010) 'Bacterial phosphate metabolism and its application to phosphorus recovery and industrial bioprocesses', *J Biosci Bioeng*, 109(5), pp. 423-32.

- Hoiczky, E. and Baumeister, W. (1995) 'Envelope structure of four gliding filamentous cyanobacteria', *J Bacteriol*, 177(9), pp. 2387-95.
- Höltje, J. V. (1998) 'Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*', *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(1), pp. 181-203.
- Ishikawa, S., Yamane, K. and Sekiguchi, J. (1998) 'Regulation and characterization of a newly deduced cell wall hydrolase gene (cwlJ) which affects germination of *Bacillus subtilis* spores', *J Bacteriol*, 180(6), pp. 1375-80.
- Jensen, K. F. (1993) 'The *Escherichia coli* K-12 "wild types" W3110 and MG1655 have an rph frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low pyrE expression levels', *J Bacteriol*, 175(11), pp. 3401-7.
- Kaiser, D. (2001) 'Building a multicellular organism', *Annu Rev Genet*, 35, pp. 103-23.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. and Ladant, D. (1998) 'A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(10), pp. 5752-6.
- Kawai, Y., Mercier, R. and Errington, J. (2014) 'Bacterial cell morphogenesis does not require a preexisting template structure', *Curr Biol*, 24(8), pp. 863-7.
- Kayumov, A., Heinrich, A., Fedorova, K., Ilinskaya, O. and Forchhammer, K. (2011) 'Interaction of the general transcription factor TnrA with the PII-like protein GlnK and glutamine synthetase in *Bacillus subtilis*', *FEBS J*, 278(10), pp. 1779-89.
- Khayatan, B., Meeks, J. C. and Risser, D. D. (2015) 'Evidence that a modified type IV pilus-like system powers gliding motility and polysaccharide secretion in filamentous cyanobacteria', *Mol Microbiol*, 98(6), pp. 1021-36.
- Krehenbrink, M., Oppermann-Sanio, F. B. and Steinbüchel, A. (2002) 'Evaluation of non-cyanobacterial genome sequences for occurrence of genes encoding proteins homologous to cyanophycin synthetase and cloning of an active cyanophycin synthetase from *Acinetobacter* sp. strain DSM 587', *Arch Microbiol*, 177(5), pp. 371-80.
- Kumar, K., Mella-Herrera, R. A. and Golden, J. W. (2010) 'Cyanobacterial heterocysts', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(4), pp. a000315.
- Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M. and Kornberg, A. (1997) 'Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*', *J Biol Chem*, 272(34), pp. 21240-3.
- Laemmli, U. K. (1970) 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227(5259), pp. 680-5.
- Laurent, S., Forchhammer, K., Gonzalez, L., Heulin, T., Zhang, C. C. and Bédu, S. (2004) 'Cell-type specific modification of PII is involved in the regulation of nitrogen metabolism in the cyanobacterium *Anabaena PCC 7120*', *FEBS Lett*, 576(1-2), pp. 261-5.
- Lehner, J. (2013) *Funktionelle Charakterisierung der Zellwandproteine AmiC2 und SepJN und ihre Bedeutung für die Vielzelligkeit des filamentösen Cyanobakteriums Nostoc punctiforme ATCC 29133*.
- Lehner, J., Berendt, S., Dörsam, B., Pérez, R., Forchhammer, K. and Maldener, I. (2013) 'Prokaryotic multicellularity: a nanopore array for bacterial cell communication', *FASEB J*, 27(6), pp. 2293-300.
- Lehner, J., Zhang, Y., Berendt, S., Rasse, T. M., Forchhammer, K. and Maldener, I. (2011) 'The morphogene AmiC2 is pivotal for multicellular development in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*', *Mol Microbiol*, 79(6), pp. 1655-69.
- Lenz, J. D., Stohl, E. A., Robertson, R. M., Hackett, K. T., Fisher, K., Xiong, K., Lee, M., Heseck, D., Mobashery, S., Seifert, H. S., Davies, C. and Dillard, J. P. (2016) 'Amidase Activity of AmiC Controls Cell Separation and Stem Peptide Release and Is Enhanced by NlpD in *Neisseria gonorrhoeae*', *J Biol Chem*, 291(20), pp. 10916-33.
- Li, H., Hu, P., Zhao, X., Yu, Z. and Li, L. (2016) '*Bacillus thuringiensis* peptidoglycan hydrolase SleB171 involved in daughter cell separation during cell division', *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 48(4), pp. 354-62.
- Liaimer, A., Helfrich, E. J., Hinrichs, K., Guljamow, A., Ishida, K., Hertweck, C. and Dittmann, E. (2015) 'Nostopeptolide plays a governing role during cellular differentiation of the symbiotic cyanobacterium *Nostoc punctiforme*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(6), pp. 1862-7.

- Liberton, M., Austin, J. R., Berg, R. H. and Pakrasi, H. B. (2011) 'Unique thylakoid membrane architecture of a unicellular N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium revealed by electron tomography', *Plant Physiol*, 155(4), pp. 1656-66.
- Lyons, N. A. and Kolter, R. (2015) 'On the evolution of bacterial multicellularity', *Curr Opin Microbiol*, 24, pp. 21-8.
- Ma, X., Ehrhardt, D. W. and Margolin, W. (1996) 'Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(23), pp. 12998-3003.
- Mackinney, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J Biol Chem*.
- Maheswaran, M., Ziegler, K., Lockau, W., Hagemann, M. and Forchhammer, K. (2006) 'PII-regulated arginine synthesis controls accumulation of cyanophycin in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803', *J Bacteriol*, 188(7), pp. 2730-4.
- Maldener, I. and Muro-Pastor, A. M. 2010. Cyanobacterial Heterocysts.: Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons, Ltd.
- Maldener, I., Summers, M. L. and Sukenik, A. (2014) 'Cellular differentiation in filamentous cyanobacteria.', in Flores, E. & Herrero, A. (eds.) *The Cell Biology of Cyanobacteria*. Norwich: Caister Academic Press, pp. 263–291.
- Manganelli, R. (2007) 'Polyphosphate and stress response in mycobacteria', *Mol Microbiol*, 65(2), pp. 258-60.
- Mariscal, V., Nürnberg, D. J., Herrero, A., Mullineaux, C. W. and Flores, E. (2016) 'Overexpression of SepJ alters septal morphology and heterocyst pattern regulated by diffusible signals in *Anabaena*', *Mol Microbiol*, 101(6), pp. 968-81.
- Masayama, A., Fukuoka, H., Kato, S., Yoshimura, T., Moriyama, M. and Moriyama, R. (2006) 'Subcellular localization of a germination-specific cortex-lytic enzyme, SleB, of *Bacilli* during sporulation', *Genes Genet Syst*, 81(3), pp. 163-9.
- Matias, V. R. and Beveridge, T. J. (2006) 'Native cell wall organization shown by cryo-electron microscopy confirms the existence of a periplasmic space in *Staphylococcus aureus*', *J Bacteriol*, 188(3), pp. 1011-21.
- McInerney, P., Mizutani, T. and Shiba, T. (2006) 'Inorganic polyphosphate interacts with ribosomes and promotes translation fidelity in vitro and in vivo', *Mol Microbiol*, 60(2), pp. 438-47.
- Meeks, J. C. and Elhai, J. (2002) 'Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states', *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(1), pp. 94-121; table of contents.
- Meeks, J. C., Elhai, J., Thiel, T., Potts, M., Larimer, F., Lamerdin, J., Predki, P. and Atlas, R. (2001) 'An overview of the genome of *Nostoc punctiforme*, a multicellular, symbiotic cyanobacterium', *Photosynth Res*, 70(1), pp. 85-106.
- Merino-Puerto, V., Mariscal, V., Mullineaux, C. W., Herrero, A. and Flores, E. (2010) 'Fra proteins influencing filament integrity, diazotrophy and localization of septal protein SepJ in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp', *Mol Microbiol*, 75(5), pp. 1159-70.
- Merino-Puerto, V., Mariscal, V., Schwarz, H., Maldener, I., Mullineaux, C. W., Herrero, A. and Flores, E. (2011a) 'FraH is required for reorganization of intracellular membranes during heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120', *J Bacteriol*, 193(24), pp. 6815-23.
- Merino-Puerto, V., Schwarz, H., Maldener, I., Mariscal, V., Mullineaux, C. W., Herrero, A. and Flores, E. (2011b) 'FraC/FraD-dependent intercellular molecular exchange in the filaments of a heterocyst-forming cyanobacterium, *Anabaena* sp', *Mol Microbiol*, 82(1), pp. 87-98.
- Metzner, I. (1955) '[Chemistry and submicroscopic structure of cell walls, sheaths, and gelatin of Cyanophyceae. II. Cell morphology and cell physiology of Cyanophyceae]', *Arch Mikrobiol*, 22(1), pp. 45-77.
- Meyvis, T. K., De Smedt, S. C., Van Oostveldt, P. and Demeester, J. (1999) 'Fluorescence recovery after photobleaching: a versatile tool for mobility and interaction measurements in pharmaceutical research', *Pharm Res*, 16(8), pp. 1153-62.
- Mullineaux, C. W. (2007) 'Localization and mobility of bacterial proteins by confocal microscopy and fluorescence recovery after photobleaching', *Methods Mol Biol*, 390, pp. 3-15.
- Mullineaux, C. W., Mariscal, V., Nenninger, A., Khanum, H., Herrero, A., Flores, E. and Adams, D. G. (2008) 'Mechanism of intercellular molecular exchange in heterocyst-forming cyanobacteria', *EMBO J*, 27(9), pp. 1299-308.

- Mullineaux, C. W. and Nürnberg, D. J. (2014) 'Tracing the path of a prokaryotic paracrine signal', *Mol Microbiol*, 94(6), pp. 1208-12.
- Möll, A., Dörr, T., Alvarez, L., Chao, M. C., Davis, B. M., Cava, F. and Waldor, M. K. (2014) 'Cell separation in *Vibrio cholerae* is mediated by a single amidase whose action is modulated by two nonredundant activators', *J Bacteriol*, 196(22), pp. 3937-48.
- Möll, A., Schlimpert, S., Briegel, A., Jensen, G. J. and Thanbichler, M. (2010) 'DipM, a new factor required for peptidoglycan remodelling during cell division in *Caulobacter crescentus*', *Mol Microbiol*, 77(1), pp. 90-107.
- Nakai, K. and Kanehisa, M. (1992) 'A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells', *Genomics*, 14(4), pp. 897-911.
- Nausch, H., Hausmann, T., Ponndorf, D., Hühns, M., Hoedtke, S., Wolf, P., Zeyner, A. and Broer, I. (2016a) 'Tobacco as platform for a commercial production of cyanophycin', *N Biotechnol*, 33(6), pp. 842-851.
- Nausch, H., Huckauf, J. and Broer, I. (2016b) 'Peculiarities and impacts of expression of bacterial cyanophycin synthetases in plants', *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(4), pp. 1559-65.
- Nayar, A. S., Yamaura, H., Rajagopalan, R., Risser, D. D. and Callahan, S. M. (2007) 'FraG is necessary for filament integrity and heterocyst maturation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120', *Microbiology*, 153(Pt 2), pp. 601-7.
- Nicolaisen, K., Mariscal, V., Bredemeier, R., Pernil, R., Moslavac, S., López-Igual, R., Maldener, I., Herrero, A., Schleiff, E. and Flores, E. (2009) 'The outer membrane of a heterocyst-forming cyanobacterium is a permeability barrier for uptake of metabolites that are exchanged between cells', *Mol Microbiol*, 74(1), pp. 58-70.
- Nierzwicki-Bauer, S. A., Balkwill, D. L. and Stevens, S. E. (1983) 'Three-dimensional ultrastructure of a unicellular cyanobacterium', *J Cell Biol*, 97(3), pp. 713-22.
- Nieves-Mori6n, M., Mullineaux, C. W. and Flores, E. (2017) 'Molecular Diffusion through Cyanobacterial Septal Junctions', *MBio*, 8(1).
- Nudleman, E., Wall, D. and Kaiser, D. (2006) 'Polar assembly of the type IV pilus secretin in *Myxococcus xanthus*', *Mol Microbiol*, 60(1), pp. 16-29.
- Nürnberg, D. J., Mariscal, V., Bornikoel, J., Nieves-Mori6n, M., Krauß, N., Herrero, A., Maldener, I., Flores, E. and Mullineaux, C. W. (2015) 'Intercellular diffusion of a fluorescent sucrose analog via the septal junctions in a filamentous cyanobacterium', *MBio*, 6(2), pp. e02109.
- Nürnberg, D. J., Mariscal, V., Parker, J., Mastroianni, G., Flores, E. and Mullineaux, C. W. (2014) 'Branching and intercellular communication in the Section V cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*, a complex multicellular prokaryote', *Mol Microbiol*, 91(5), pp. 935-49.
- Obst, M. and Steinbüchel, A. (2004) 'Microbial degradation of poly(amino acid)s', *Biomacromolecules*, 5(4), pp. 1166-76.
- Omairi-Nasser, A., Haselkorn, R. and Austin, J. (2014) 'Visualization of channels connecting cells in filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria', *FASEB J*, 28(7), pp. 3016-22.
- Omairi-Nasser, A., Mariscal, V., Austin, J. R. and Haselkorn, R. (2015) 'Requirement of Fra proteins for communication channels between cells in the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(32), pp. E4458-64.
- Onaga, S. and Taira, T. (2008) 'A new type of plant chitinase containing LysM domains from a fern (*Pteris ryukyuensis*): roles of LysM domains in chitin binding and antifungal activity', *Glycobiology*, 18(5), pp. 414-23.
- Pelczar, M. 1957. Manual for Microbiological Methods. McGraw-Hill: New York.
- Perez, R., Forchhammer, K., Salerno, G. and Maldener, I. (2016) 'Clear differences in metabolic and morphological adaptations of akinetes of two Nostocales living in different habitats', *Microbiology*, 162(2), pp. 214-23.
- Perez, R. Z. (2016) *Physiological and molecular studies on the akinete differentiation of filamentous cyanobacteria*. PhD, Universität Tübingen.
- Peters, N. T., Morlot, C., Yang, D. C., Uehara, T., Vernet, T. and Bernhardt, T. G. (2013) 'Structure-function analysis of the LytM domain of EnvC, an activator of cell wall remodelling at the *Escherichia coli* division site', *Mol Microbiol*, 89(4), pp. 690-701.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. and Nielsen, H. (2011) 'SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions', *Nat Methods*, 8(10), pp. 785-6.

- Plominsky, Á., Delherbe, N., Mandakovic, D., Riquelme, B., González, K., Bergman, B., Mariscal, V. and Vásquez, M. (2015) 'Intercellular transfer along the trichomes of the invasive terminal heterocyst forming cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* CS-505', *FEMS Microbiol Lett*, 362(5).
- Priyadarshini, R., de Pedro, M. A. and Young, K. D. (2007) 'Role of peptidoglycan amidases in the development and morphology of the division septum in *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 189(14), pp. 5334-47.
- Pugsley, A. P. (1993) 'The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria', *Microbiol Rev*, 57(1), pp. 50-108.
- Pédelacq, J. D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C. and Waldo, G. S. (2006) 'Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein', *Nat Biotechnol*, 24(1), pp. 79-88.
- Rao, N. N., Gómez-García, M. R. and Kornberg, A. (2009) 'Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival', *Annu Rev Biochem*, 78, pp. 605-47.
- Rigden, D. J. and Galperin, M. Y. (2008) 'Sequence analysis of GerM and SpoVS, uncharacterized bacterial 'sporulation' proteins with widespread phylogenetic distribution', *Bioinformatics*, 24(16), pp. 1793-7.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. and Stanier, R. Y. 1979. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*.
- Risser, D. D., Chew, W. G. and Meeks, J. C. (2014) 'Genetic characterization of the hmp locus, a chemotaxis-like gene cluster that regulates hormogonium development and motility in *Nostoc punctiforme*', *Mol Microbiol*, 92(2), pp. 222-33.
- Risser, D. D. and Meeks, J. C. (2013) 'Comparative transcriptomics with a motility-deficient mutant leads to identification of a novel polysaccharide secretion system in *Nostoc punctiforme*', *Mol Microbiol*, 87(4), pp. 884-93.
- Rivers, O. S., Videau, P. and Callahan, S. M. (2014) 'Mutation of sepJ reduces the intercellular signal range of a hetN-dependent paracrine signal, but not of a patS-dependent signal, in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120', *Mol Microbiol*, 94(6), pp. 1260-71.
- Rocaboy, M., Herman, R., Sauvage, E., Remaut, H., Moonens, K., Terrak, M., Charlier, P. and Kerff, F. (2013) 'The crystal structure of the cell division amidase AmiC reveals the fold of the AMIN domain, a new peptidoglycan binding domain', *Mol Microbiol*, 90(2), pp. 267-77.
- Rudolf, M., Tetik, N., Ramos-León, F., Flinner, N., Ngo, G., Stevanovic, M., Burnat, M., Pernil, R., Flores, E. and Schleiff, E. (2015) 'The Peptidoglycan-Binding Protein SjcF1 Influences Septal Junction Function and Channel Formation in the Filamentous Cyanobacterium *Anabaena*', *MBio*, 6(4), pp. e00376.
- Sager, R. and Lee, J. Y. (2014) 'Plasmodesmata in integrated cell signalling: insights from development and environmental signals and stresses', *J Exp Bot*, 65(22), pp. 6337-58.
- Sammons, R. L., Slynn, G. M. and Smith, D. A. (1987) 'Genetical and molecular studies on gerM, a new developmental locus of *Bacillus subtilis*', *J Gen Microbiol*, 133(12), pp. 3299-312.
- Santini, C. L., Ize, B., Chanal, A., Müller, M., Giordano, G. and Wu, L. F. (1998) 'A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*', *EMBO J*, 17(1), pp. 101-12.
- Schleifer, K. H. and Kandler, O. (1972) 'Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications', *Bacteriol Rev*, 36(4), pp. 407-77.
- Schoumans, O. F., Bouraoui, F., Kabbe, C., Oenema, O. and van Dijk, K. C. (2015) 'Phosphorus management in Europe in a changing world', *Ambio*, 44 Suppl 2, pp. S180-92.
- Schubert, K. 2014. *RE: Nach der Behandlung der Zellen mit meinem Click-on Chemistry-Protokoll ist die Fluoreszenz an den besonders stark. Dies ist der Ort, an dem neues Material in das vorhandene Mureingerüst eingebaut wird.*
- Setlow, P. (2006) 'Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals', *J Appl Microbiol*, 101(3), pp. 514-25.
- Settles, A. M. and Martienssen, R. (1998) 'Old and new pathways of protein export in chloroplasts and bacteria', *Trends Cell Biol*, 8(12), pp. 494-501.

- Simon, R. D. (1971) 'Cyanophycin Granules from the Blue-Green Alga *Anabaena cylindrica*: A Reserve Material Consisting of Copolymers of Aspartic Acid and Arginine', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68(2), pp. 265-7.
- Simon, R. D. (1973a) 'Measurement of the cyanophycin granule polypeptide contained in the blue-green alga *Anabaena cylindrica*', *J Bacteriol*, 114(3), pp. 1213-6.
- Simon, R. D. (1973b) 'The effect of chloramphenicol on the production of cyanophycin granule polypeptide in the blue green alga *Anabaena cylindrica*', *Arch Mikrobiol*, 92(2), pp. 115-22.
- Singh, S. K., Parveen, S., SaiSree, L. and Reddy, M. (2015) 'Regulated proteolysis of a cross-link-specific peptidoglycan hydrolase contributes to bacterial morphogenesis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(35), pp. 10956-61.
- Slynn, G. M., Sammons, R. L., Smith, D. A., Moir, A. and Corfe, B. M. (1994) 'Molecular genetical and phenotypical analysis of the gerM spore germination gene of *Bacillus subtilis* 168', *FEMS Microbiol Lett*, 121(3), pp. 315-20.
- Spaink, H. P. (2004) 'Specific recognition of bacteria by plant LysM domain receptor kinases', *Trends Microbiol*, 12(5), pp. 201-4.
- Sprent, J. I. and Meeks, J. C. (2013) 'Cyanobacterial nitrogen fixation in association with feather mosses: moss as boss?', *New Phytol*, 200(1), pp. 5-6.
- Steen, A., Buist, G., Leenhouts, K. J., El Khattabi, M., Grijpstra, F., Zomer, A. L., Venema, G., Kuipers, O. P. and Kok, J. (2003) 'Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents', *J Biol Chem*, 278(26), pp. 23874-81.
- Stohl, E. A., Lenz, J. D., Dillard, J. P. and Seifert, H. S. (2015) 'The Gonococcal NlpD Protein Facilitates Cell Separation by Activating Peptidoglycan Cleavage by AmiC', *J Bacteriol*, 198(4), pp. 615-22.
- Stragier, P. and Losick, R. (1996) 'Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*', *Annu Rev Genet*, 30, pp. 297-41.
- Stumpf, J. D. and Foster, P. L. (2005) 'Polyphosphate kinase regulates error-prone replication by DNA polymerase IV in *Escherichia coli*', *Mol Microbiol*, 57(3), pp. 751-61.
- Sukenik, A., Kaplan-Levy, R. N., Welch, J. M. and Post, A. F. (2012) 'Massive multiplication of genome and ribosomes in dormant cells (akinetes) of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria)', *ISME Journal*, 6(3), pp. 670-679.
- Summers, M. L., Wallis, J. G., Campbell, E. L. and Meeks, J. C. (1995) 'Genetic evidence of a major role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in nitrogen fixation and dark growth of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain ATCC 29133', *J Bacteriol*, 177(21), pp. 6184-94.
- Tarayre, C., Nguyen, H. T., Brognaux, A., Delepierre, A., De Clercq, L., Charlier, R., Michels, E., Meers, E. and Delvigne, F. (2016) 'Characterisation of Phosphate Accumulating Organisms and Techniques for Polyphosphate Detection: A Review', *Sensors (Basel)*, 16(6).
- Thiel, T. and Wolk, C. P. (1983) 'Metabolic activities of isolated akinetes of the cyanobacterium *Nostoc spongiaforme*', *J Bacteriol*, 156(1), pp. 369-74.
- Uehara, T., Dinh, T. and Bernhardt, T. G. (2009) 'LytM-domain factors are required for daughter cell separation and rapid ampicillin-induced lysis in *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 191(16), pp. 5094-107.
- Uehara, T., Parzych, K. R., Dinh, T. and Bernhardt, T. G. (2010) 'Daughter cell separation is controlled by cytokinetic ring-activated cell wall hydrolysis', *EMBO J*, 29(8), pp. 1412-22.
- Villanueva, M. A. (2008) 'Electrotransfer of proteins in an environmentally friendly methanol-free transfer buffer', *Anal Biochem*, 373(2), pp. 377-9.
- Vischer, N. O., Verheul, J., Postma, M., van den Berg van Saparoea, B., Galli, E., Natale, P., Gerdes, K., Luirink, J., Vollmer, W., Vicente, M. and den Blaauwen, T. (2015) 'Cell age dependent concentration of *Escherichia coli* divisome proteins analyzed with ImageJ and ObjectJ', *Front Microbiol*, 6, pp. 586.
- Vollmer, W. and Höltje, J. V. (2004) 'The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)?', *J Bacteriol*, 186(18), pp. 5978-87.
- von Heijne, G. (1985) 'Signal sequences. The limits of variation', *J Mol Biol*, 184(1), pp. 99-105.
- Walsby, A. E. (2007) 'Cyanobacterial heterocysts: terminal pores proposed as sites of gas exchange', *Trends Microbiol*, 15(8), pp. 340-9.

- Watzer, B., Engelbrecht, A., Hauf, W., Stahl, M., Maldener, I. and Forchhammer, K. (2015) 'Metabolic pathway engineering using the central signal processor PII', *Microb Cell Fact*, 14, pp. 192.
- Weidel, W., Frank, H. and Martin, H. H. (1960) 'The rigid layer of the cell wall of Escherichia coli strain B', *J Gen Microbiol*, 22, pp. 158-66.
- Wilfert, P., Kumar, P. S., Korving, L., Witkamp, G. J. and van Loosdrecht, M. C. (2015) 'The Relevance of Phosphorus and Iron Chemistry to the Recovery of Phosphorus from Wastewater: A Review', *Environ Sci Technol*, 49(16), pp. 9400-14.
- Wilk, L., Strauss, M., Rudolf, M., Nicolaisen, K., Flores, E., Kühlbrandt, W. and Schleiff, E. (2011) 'Outer membrane continuity and septosome formation between vegetative cells in the filaments of Anabaena sp. PCC 7120', *Cell Microbiol*, 13(11), pp. 1744-54.
- Wolk, C. P. (1968) 'Movement of carbon from vegetative cells to heterocysts in Anabaena cylindrica', *J Bacteriol*, 96(6), pp. 2138-43.
- Wolk, C. P., Vonshak, A., Kehoe, P. and Elhai, J. (1984) 'Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from Escherichia coli to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(5), pp. 1561-5.
- Yahashiri, A., Jorgenson, M. A. and Weiss, D. S. (2015) 'Bacterial SPOR domains are recruited to septal peptidoglycan by binding to glycan strands that lack stem peptides', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(36), pp. 11347-52.
- Yan, X. H., Liu, G. and Tan, H. R. (2007) '[Cloning and characterization of gerM gene involved in germination in Bacillus thuringiensis]', *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 47(1), pp. 17-21.
- Yang, D. C., Tan, K., Joachimiak, A. and Bernhardt, T. G. (2012) 'A conformational switch controls cell wall-remodelling enzymes required for bacterial cell division', *Mol Microbiol*, 85(4), pp. 768-81.
- Yao, X., Jericho, M., Pink, D. and Beveridge, T. (1999) 'Thickness and elasticity of gram-negative murein sacculi measured by atomic force microscopy', *J Bacteriol*, 181(22), pp. 6865-75.
- Ye, Y., Gan, J. and Hu, B. (2015) 'Screening of Phosphorus-Accumulating Fungi and Their Potential for Phosphorus Removal from Waste Streams', *Appl Biochem Biotechnol*, 177(5), pp. 1127-36.
- Zhang, W., Du, Y., Khudyakov, I., Fan, Q., Gao, H., Ning, D., Wolk, C. P. and Xu, X. (2007) 'A gene cluster that regulates both heterocyst differentiation and pattern formation in Anabaena sp. strain PCC 7120', *Mol Microbiol*, 66(6), pp. 1429-43.
- Zheng, Z., Omairi-Nasser, A., Li, X., Dong, C., Lin, Y., Haselkorn, R. and Zhao, J. (2017) 'An amidase is required for proper intercellular communication in the filamentous cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120', *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Ziegler, K., Deutzmann, R. and Lockau, W. (2002) 'Cyanophycin synthetase-like enzymes of non-cyanobacterial eubacteria: characterization of the polymer produced by a recombinant synthetase of Desulfitobacterium hafniense', *Z Naturforsch C*, 57(5-6), pp. 522-9.
- Ziegler, K., Stephan, D. P., Pistorius, E. K., Ruppel, H. G. and Lockau, W. (2001) 'A mutant of the cyanobacterium Anabaena variabilis ATCC 29413 lacking cyanophycin synthetase: growth properties and ultrastructural aspects', *FEMS Microbiol Lett*, 196(1), pp. 13-8.

## 9 Anhang

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1</i> Gegenüberstellung der stereotypen Zellhüllen gramnegativer und grampositiver Bakterien. Cyanobakterien besitzen eine äußere Membran und zusätzlich ein vielschichtiges Peptidoglykan wie grampositive Bakterien (Brown et al., 2015). .....	15
<i>Abbildung 2:</i> Differenzierungsformen von <i>N. punctiforme</i> WT. A) vegetative Zellen, B) vegetative Zellen einer späteren Wachstumsphase und ein Hormogonium (weiße Pfeilspitze), gut zu erkennen ist eine der beiden konisch geformten terminalen Zellen des Hormogoniums C) vegetative Zellen und Akineten (orangene Pfeilspitzen), D) vegetative Zellen und Heterozysten (tiefröte Pfeilspitzen). Größenstandard. 5 µm.....	17
<i>Abbildung 3:</i> TEM-Aufnahme der Schnittstelle zwischen vegetativer Zelle und Heterozyste. Die Heterozyste (oben) ist über einen Halskanal mit der benachbarten vegetativen Zelle verbunden. Größenstandard: 900 nm. 18	
<i>Abbildung 4:</i> Schematische Darstellung der zwei Routen intrafilamentöser Kommunikation. In Blau und Grün dargestellt sind Transporter und Metabolite, welche die Route des Stoffaustauschs über das Periplasma nehmen. In Lila sind septumsüberspannende, proteinöse Zell-Zell-Verbindungen dargestellt, welche die den direkten Stoffaustausch ermöglichen. Bild aus (Maldener and Muro-Pastor, 2010). .....	21
<i>Abbildung:</i> 5 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Septums vegetativer Nachbarzellen von <i>N. punctiforme</i> . Der Nanopore Array besteht aus ca. 150 Poren von 20 nm Durchmesser (Lehner et al., 2013). In der Peripherie des Septums sind keine Poren vorhanden. Größenstandard: 300 nm.....	22
<i>Abbildung 6:</i> FRAP-Aufnahmen, TEM-Aufnahmen und Hellfeldmikroskopie der <i>amiC2</i> -Mutante (2) im Vergleich mit dem <i>N. punctiforme</i> WT (1). A) FRAP- Aufnahmen. Die gebleichten Zellen sind durch weiße Pfeilspitzen gekennzeichnet. Nach wenigen Sekunden ist die Zelle des WT wieder mit dem Fluorophor gefüllt, während die Zelle der Mutante dunkel bleibt. Größenstandard: 5 µm (Lehner et al., 2011). B) TEM-Aufnahmen des septalen Peptidoglykans. Das Septum des WT verfügt über den Nanopore Array, welcher den Stoffaustausch von Zelle zu Zelle ermöglicht. Das Septum der Mutante besitzt keinen Nanopore Array. Größenstandard: 300 nm (Lehner et al., 2013). C) Die Hellfeldaufnahmen zeigen die Filamentmorphologien der Zellen. Der WT bildet reguläre Filamente, die Mutante wächst in aberranten Filamenten mit schiefen Teilungsebenen. Größenstandard: 5 µm. ....	24
<i>Abbildung 7:</i> Mikro dialyse von DNA-Lösungen. Auf einen Filter passen bis zu neun verschiedene Proben. Ein kleiner Wassertropfen am Rand des Filters (schwarze Pfeilspitze) dient der Orientierung. ....	45
<i>Abbildung 8:</i> Hayashi-Assay mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen. Nur bei geringen SDS-Konzentrationen ist die Schwerphase (Chloroform) nicht blau gefärbt. Gezeigt ist eine Reihe aufsteigender SDS-Konzentrationen von links nach rechts (Angaben in % (w/v): 0 / $2 \cdot 10^{-3}$ / $4 \cdot 10^{-3}$ / $6 \cdot 10^{-3}$ / $8 \cdot 10^{-3}$ / $12 \cdot 10^{-3}$ / $16 \cdot 10^{-3}$ ). .....	53
<i>Abbildung 9:</i> Schematische Darstellung von AmiC2. Das Volllängenprotein besitzt zwei AMIN-Domänen (AMIN-A und AMIN-B), die katalytische Domäne ist durch eine lange, flexible Region verbunden, der Modulator. Die verschiedenen Domänen werden mit einem Buchstaben abgekürzt und als Subskript an die Proteinbezeichnung angehängt. Trunkierte Versionen von AmiC2 werden im Folgenden durch fehlende Buchstaben eindeutig gekennzeichnet. Sind keine Subskripte vorhanden, wird sich immer die Volllängenvariante von AmiC2 bezogen. ....	60
<i>Abbildung 10:</i> Aminosäuresequenzen der Peptidantikörper und der AmiC1 und AmiC2-Proteine von <i>N. punctiforme</i> in Blöcken von 10 AS. Die Signalsequenzen sind fett und unterstrichen, Die AMIN-Domänen (pfam11741) sind hellgrau unterlegt, die katalytische Amidase_3 Domäne (pfam01520) ist dunkelgrau unterlegt. Einzelne hervorgehobene Aminosäuren sind für die Aktivität der katalytischen Domäne wichtig. Die schwarz unterlegten AS koordinieren das Zinkion; das grau gekennzeichnete Glutamat koordiniert ein Wassermolekül. Die Peptidantikörper richten sich gegen die eingerahmten Sequenzabschnitte.....	61

- Abbildung 11: Western Blot mit den Peptidantikörpern gegen die spezifischen Regionen von AmiC1 und AmiC2 aus *N. punctiforme*. Von Zellextrakten der vegetativen Zellen des WT und der *amiC2*-Mutante wurden je 20 µg Protein eingesetzt. Von dem gereinigten AmiC2-Protein wurden je 10 ng verwendet. Beide Proteine besitzen ohne Signalsequenz eine Größe von ca. 67 kDa, daneben werden von den Peptidantikörpern auch verkürzte Varianten der Amidasen erkannt..... 62
- Abbildung 12: Immunfluoreszenzmarkierung von AmiC1 in *N. punctiforme* WT Filamenten. AF) Autofluoreszenz FITC) Detektion von AmiC1 durch FITC-gekoppelte Antikörper im GFP-Kanal. Die Übereinanderlagerung zeigt die zelluläre Lokalisation von AmiC1. Es befindet sich in der Zellwand und dort vermehrt an den jungen Septen (weiße Pfeile). Größenstandard: 10 µm. .... 63
- Abbildung 13: Immunfluoreszenzmarkierung von AmiC1 in der *amiC2*-Mutante von *N. punctiforme*. HF) Hellfeld. FITC) Lokalisierung von AmiC1 mit FITC-gekoppeltem Antikörper. Die Überlagerung der Kanäle zeigt die zelluläre Lokalisation von AmiC1. Das Protein befindet sich in der Zellwand (rote Pfeile) und speziell auch an naszenten Septen (weißer Pfeil). Größenstandard: 10 µm. .... 64
- Abbildung 14: Immunfluoreszenzmarkierung von AmiC2 in *N. punctiforme* WT. AF) Autofluoreszenz der vegetativen Zellen. FITC) Lokalisierung von AmiC2 mit FITC-gekoppeltem sekundären Antikörper. Die Übereinanderlegung der Kanäle zeigt die zelluläre Lokalisation von AmiC2. Die Amidase lokalisiert der Zellwand, besonders stark ist das Signal in jungen Septen (weiße Pfeile). Das Protein ist schon vorhanden, wenn das Septum noch in der Entstehung ist (roter Pfeil), in älteren Septen verschwindet das Signal (blauer Pfeil). Größenstandard: 10 µm..... 65
- Abbildung 15: Immunfluoreszenzlokalisierung von AmiC2 im Septum. Die 3D Rekonstruktion erlaubt den Einblick auf das Septum, das um 90° gedreht wurde. A) junges Septum im Beginn der Entstehung. Die Amidase AmiC2 ist ringförmig lokalisiert und stellt damit das periplasmatische Pendant zu dem cytoplasmatischen FtsZ-Ring dar. B) Beginn der Septumbildung. Die ringförmige Lokalisation von AmiC2 verjüngt sich nach innen. C) AmiC2 bedeckt das junge Septum zwischen zwei Tochterzellen komplett. .... 66
- Abbildung 16: Lokalisierung von sfGFP unter dem Einfluss verschiedener Sec-Sequenzen in *Anabaena* PCC 7120. Größenstandard: 7,5 µm. .... 69
- Abbildung 17: Übersicht zur Lokalisation verschiedener trunkierter AmiC2-Versionen. Die Autofluoreszenz (rot) und die Lokalisation der Proteine (grün) ist überlagert dargestellt. Alle Plasmide basieren auf dem Vektor pSCR202, besitzen dieselbe Promotorsequenz und dieselbe Tat-Sequenz zum Export der Proteine. Größenstandard: 7,5 µm..... 72
- Abbildung 18: Sacculi von Hormogonien. A) Das Peptidoglykan ist über das gesamte Hormogonium zusammenhängend. Der schwarze Kasten markiert die Vergrößerung im zweiten Bildabschnitt. Größenstandard: 2,2 µm. B) Detailansicht eines Septums von Hormogonien mit lateralem Peptidoglykan. Eine Kette kleiner Poren umringt das Septum (schwarze Pfeile). Größenstandard: 400 µm. .... 73
- Abbildung 19: Septum von vegetativen Zellen (A) und Hormogonien (B) im Vergleich. Größenstandard: 300 µm. .... 74
- Abbildung 20: Septen von Hormogonien zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Septumgenese. A) Das Septum besteht nur aus einem verdickten Ring und wenig Peptidoglykan, dass innen angelagert wurde. B) Die Entstehung des Septums ist weiter vorangeschritten, mehr Peptidoglykan wurde innen angelagert, sodass das Septum weiter eingeschnürt ist. C) Die Septumsscheibe ist komplett, aber noch ist kein Nanopore Array zu erkennen. Größenstandard: 400 µm. .... 75
- Abbildung 21: Aktivität der AmiC2<sub>C</sub> bei verschiedenen Temperaturen. Als Kontrolle der Dye-Release-Assays diente Lysozym. Die Enzyme wurden in äquimolaren Konzentrationen eingesetzt. AmiC2<sub>C</sub> ist über alle getestete Temperaturen aktiv. Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung..... 76
- Abbildung 22: Kristallstruktur (A) und schematische Darstellung (B) von AmiC2<sub>C</sub> in *N. punctiforme*. Jeweils grün mit Sternchen hervorgehoben sind die Reste des katalytischen Zentrums. Mit gelbem Sternchen ist das konservierte Glutamat an Position 578 markiert. .... 77

- Abbildung 23: Detailansicht des aktiven Zentrums von AmiC2<sub>C</sub> und DRA mit Punktmutanten von AmiC2<sub>C</sub> und AmiC2<sub>BMC</sub>. A) Im aktiven Zentrum wird ein Zinkion durch zwei Histidine und ein Glutamat koordiniert. Das Wasser für den nukleophilen Angriff wird durch A516 und E578 stabilisiert. B) Dye-Release-Assay. Der Austausch des konservierten Glutamats (E587) führt zum Verlust der Aktivität von AmiC2<sub>C</sub> und AmiC2<sub>BMC</sub>. Dreifachbestimmung mit Mittelwert und Standardabweichung. .... 78
- Abbildung 24: Identifikation der flexiblen Region zwischen AMIN-B und Katalytischer Domäne (AmiC2<sub>C</sub>) als Modulator der Aktivität von AmiC2 in vitro. A) Übersicht der verschiedenen trunkierten Versionen von AmiC2. AmiC2<sub>ABMC</sub> entspricht dem Volllängenprotein ohne Signalsequenz. B) Dye-Release-Assay. AmiC2<sub>BMC</sub> ist weniger aktiv als AmiC2<sub>C</sub>, AmiC2<sub>AB</sub> zeigt keine Aktivität. Die Zugabe von AmiC2<sub>AB</sub> beeinflusst weder AmiC2<sub>C</sub> noch AmiC2<sub>BMC</sub> in der Aktivität. C) Dye-Release-Assay. Der Modulator muss kovalent an die katalytische Domäne gebunden sein um die Aktivität dieser zu vermindern D) Dye-Release-Assay. Die Aktivität von AmiC2<sub>MC</sub> und AmiC2<sub>BMC</sub> ist identisch Alle Werte sind Mittelwerte von Dreifachmessungen mit Standardabweichung. .... 79
- Abbildung 25: BLAST-P-Analyse der AS-Sequenz von GerM aus *N. punctiforme*. .... 81
- Abbildung 26: AS-Sequenz von GerM (203 AS). Die Transmembranhelix (AS 12-24) ist durch graue, kursive Schrift und unterstrichen gekennzeichnet. Die Germane-Domäne (AS 67-179, pfam10646) ist grau unterlegt... 81
- Abbildung 27: Verifizierung der gerM-Mutante. A) Schematische Darstellung der doppelten Rekombination. Durch zwei Rekombinationsereignisse wird das gerM-Gen im Genom von *N. punctiforme* durch die Resistenzkassette (C.K3t4) B) Agarosegelelektrophorese der Kolonie-PCR. Die Oligos 1342 und 1343 binden in den flankierenden Seiten für die homologe Rekombination. Dient das WT-Allel als Matritze, so entsteht ein Amplifikat von 889 bp, bei erfolgter Integration von C.K3t4-Kassette ist das Amplifikat 1946 bp lang. Die gerM-Mutante ist vollständig segregiert. .... 82
- Abbildung 28: Differenzierungspotential der gerM-Mutante in *N. punctiforme*. A) vegetative Zellen B) Heterozysten C) Hormogonien. Zellen mit besonders großen oder vielen Speichergranula sind mit einem weißen Pfeil versehen, Heterozysten sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Rote Pfeile weisen auf Filamenthüllen hin. Größenstandard: 10 µm. .... 83
- Abbildung 29: Verlauf der Akinetendifferenzierung der gerM-Mutante in *N. punctiforme*. Das kleine Bild zeigt eine Übersicht der Kultur, die größere Aufnahme zeigt die Filamente im Detail. Zum Vergleich ist der Verlauf der Akinetendifferenzierung des WT gezeigt. Größenstandard: 10 µm. .... 85
- Abbildung 30: Vergleich von *N. punctiforme* WT und gerM-Mutante. Zur Detektion von Polyphosphat (dunkelblau) wurde die Neisser-Färbung verwendet (Hellfeld). Der Speicherstoff Cyanophycin wurde durch die Sakaguchi-Reaktion rot angefärbt (Hellfeld). Die Lokalisation von Lipidtröpfchen und der Einbau neuer Bausteine in das Peptidoglykangerüst wurde durch Überlagerung der Autofluoreszenz der Filamente und dem GFP-Kanal sichtbar. Größenstandard: 7,5 µm. .... 87
- Abbildung 31: Ultrastruktur der gerM-Mutante im Vergleich zum WT in *N. punctiforme*. Der Dünnschnitt der gerM-Mutante zeigt Zellen in verschiedenen Stadien der Auflösung (I-IV). PP: Polyphosphat; EP: Exopolysaccharid; schwarze Pfeile: Glykogengranula; rote Pfeile: Membranvesikel; Größenstandard: 1,1 µm. .... 89
- Abbildung 32: Detailansicht des Septums in Ultradünnschnitten. *N. punctiforme* WT und gerM-Mutante weisen beide Septal Junctions auf (weiße Pfeilspitzen). Größenstandard: 1,1 µm. .... 90
- Abbildung 33: BLAST-P Analyse der AS-Sequenz von Npf5024 aus *N. punctiforme*. .... 91
- Abbildung 34: AS-Sequenz des Npf5024-Proteins. In Fett und Unterstrichen ist die Sec-Signalsequenz (AS 1-31). Dunkelgrau unterlegt ist die LysM-Domäne (AS 45-91) und hellgrau ist die LytM-Domäne (AS 192-291) markiert. Der gesamte Bereich von LysM bis LytM wird in BLAST-P als NlpD erkannt. .... 91
- Abbildung 35: Verifizierung der npf5024-Mutante in *N. punctiforme*. A) Schematische Darstellung der genomischen Umgebung und der homologen Rekombination mit pIM647. B) Agarosegelelektrophorese einer Kolonie-PCR. Mit den Oligos 1369 und 1370 entstand im WT ein Amplifikat von 1428 bp, nach erfolgter Insertion der Resistenzkassette C.K3t4 war das Amplifikat 2204 bp lang. Wasser diente als Kontrolle der PCR. Die npf5024-Mutante ist vollständig segregiert. .... 92

- Abbildung 36: Differenzierungspotential der npf5024-Mutante in *N. punctiforme*. A) vegetative Zellen B) Heterozysten C) bewegungsfähige Hormogonien. Granula sind durch weiße Pfeilspitzen gekennzeichnet. Sogar in den Hormogonien sind diese Granula vorhanden. Die schwarzen Pfeilspitzen in Teilbild B heben die Heterozysten hervor. Größenstandard: 10  $\mu\text{m}$ . ..... 93
- Abbildung 37: Vergleich verschiedener Zellkomponenten des *N. punctiforme* WT und der npf5024-Mutante. Zur Detektion von Polyphosphat (dunkelblau) wurde die Neisser-Färbung verwendet (Hellfeld). Der Speicherstoff Cyanophycin wurde durch die Sakaguchi-Reaktion rot angefärbt (Hellfeld). Die Lokalisation von Lipidtröpfchen und der Einbau neuer Bausteine in das Peptidoglykangerüst wurde durch Überlagerung der Autofluoreszenz der Filamente und dem GFP-Kanal sichtbar. Größenstandard: 7,5  $\mu\text{m}$ . ..... 96
- Abbildung 38: Ultradünnschnitt von vegetativen Zellen des WT und der npf5024-Mutante in *N. punctiforme*. In vielen vegetativen Zellen der npf5024-Mutante sind große Phosphatgranula (PP) zu sehen. Größenstandard: 1,1  $\mu\text{m}$ . ..... 97
- Abbildung 39: Detailansicht des Septums in Ultradünnschnitten. *N. punctiforme* WT und npf5024-Mutante weisen beide Septal Junctions auf (weiße Pfeilspitzen). Größenstandard: 1,1  $\mu\text{m}$ . ..... 97
- Abbildung 40: Lokalisation des Npf5024sfGFP in vegetativen Filamenten von *N. punctiforme*. AF) Autofluoreszenz der vegetativen Zellen sfGFP) Lokalisation des Npf5024sfGFP. Durch die Überlagerung der beiden Kanäle wird deutlich, dass Npf5024sfGFP in der Zellwand lokalisiert. Die Verteilung ist gleichmäßig; es gibt keine Präferenz für die Region des Septums. Größenstandard: 7,5  $\mu\text{m}$ . ..... 98
- Abbildung 41: Dye-Release-Assays mit verschiedenen AmiC2-Versionen und Npf5024 und verschiedenen Kontrollproteinen. Alle Proteine wurden in äquimolaren Konzentrationen eingesetzt. (A) AmiC2 mit Npf5024 (B) AmiC2 mit dem Kontrollprotein TnrA (C) AmiC2 mit dem Kontrollprotein Ovalbumin (D) AmiC2 mit dem Kontrollprotein Karbnische Anhydrase. Alle Protinpartner zeigten alleine im Dye-Release-Assay keine Aktivität (nicht gezeigt). Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung. .... 99
- Abbildung 42: BLAST-P Analyse der AS-Sequenz von SlpD. aus *N. punctiforme*. ..... 100
- Abbildung 43: AS-Sequenz von SlpD aus *N. punctiforme*. Die Sec-Signalsequenz ist unterstrichen und fett. Die vier PG-Bindedomänen (pfam01471) sind grau unterlegt (AS 28-84, AS 119-175, AS 188-243, AS 267-323, AS). Die schwarz unterlegte Sequenz wurde als SPOR-Domäne erkannt (pfam05036). ..... 101
- Abbildung 44: Verifizierung der slpD-Mutante in *N. punctiforme*. A) Schematische Darstellung der genomischen Umgebung und homologen Rekombination. Npun\_F1577 kodiert für die Exonuclease SbcC und Npun\_R1579 kodiert für ein SH3 Typ3 Protein. B) Agarosegelelektrophorese der Kolonie-PCR. Die Oligos 1363 und 1364 binden in den Bereichen der homologen Rekombination. Es entsteht ein Amplifikat von 1877 bp, wenn das WT-Allel die Matrize ist, in der Mutante ist slpD durch die Resistenzkassette C.K3t4. Das Amplifikat hat eine Größe von 2204 bp, wenn das mutierten Allel als Matrize für die PCR dient. Wasser wurde als Negativkontrolle der PCR verwendet. Die slpD-Mutante ist vollständig segregiert. .... 101
- Abbildung 45: Differenzierungspotential der slpD-Mutante in *N. punctiforme*. A) Vegetative Filamente bilden häufig Aseriaten (weiße Pfeilspitze) und beinhalten kleine Speichergranula (orangefarbene Pfeilspitzen). B) Heterozysteninduktion. Viele Filamente fragmentieren. Es gibt vermehrt endständige Heterozysten, welche häufig eine konische Form aufweisen (schwarze Pfeilspitzen). In Aufnahme B1 konnte zusätzlich ein Hormogonium identifiziert werden (rote Pfeilspitze) Größenstandards: Links: Übersicht (25  $\mu\text{m}$ ), rechts Detailaufnahme (10  $\mu\text{m}$ ). ..... 102
- Abbildung 46: Lokalisation von SlpD in *Nostoc punctiforme*. AF) Autofluoreszenz sfGFP) Aufnahme zur Detektion des Fusionsproteins SlpDsfGFP. Größenstandard: 7,5  $\mu\text{m}$ . ..... 103
- Abbildung 47: BLAST-P der AS-Sequenz von SlpB aus *N. punctiforme*. ..... 104
- Abbildung 48: AS-Sequenz von SlpB aus *N. punctiforme*. Grau unterlegt sind die beiden PG-Bindedomänen (AS 33-135 und AS 109-165). ..... 104

- Abbildung 49: Verifizierung der *slpB*-Mutante in *N. punctiforme*. A) Schematische Darstellung der doppelten Rekombination von *pIM649* in das Genom von *N. punctiforme*. Die *C.K3t4*-Kassette ersetzt *slpB* nahezu vollständig. B) Agarosegelelektrophorese der Kolonie-PCR zur Verifizierung der Mutante. Die verwendeten Oligos 1357 und 1358 binden in den Bereichen der homologen Rekombination. Das WT-Allel als Matrize der PCR bedingt ein Amplifikat von 1370 bp. Bei Integration der *C.K3t4*-Kassette wird ein Amplifikat von 2204 bp gebildet. Die Mutante ist vollständig segregiert, es ist keine Bande bei 1357 bp zu erkennen. Wasser diente als Kontrolle der PCR. .... 105
- Abbildung 50: Differenzierungspotential der *slpB*-Mutante in *N. punctiforme*. A) vegetative Zellen, Speichergranula sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet (Abb. A und B) B) Heterozysten 96 h nach Transfer auf stickstofffreies Medium (schwarze Pfeile) C) motiles Hormogonium. Die *slpB*-Mutante bildet vermehrt Aseriaten (gelber Pfeil). Größenstandard: 10  $\mu\text{m}$ ..... 106
- Abbildung 51: Akinetendifferenzierung der *slpB*-Mutante in *N. punctiforme* durch Phosphatentzug. Der Verlauf zeigt die Kultur vor Induktion der Akinetendifferenzierung und zu mehreren Zeitpunkten nach Phosphatentzug im Vergleich zum *N. punctiforme* WT. Während der Differenzierung zu Akineten bildet die Mutante wesentlich größere unizelluläre Zellen ohne Granula. Größenstandard: 10  $\mu\text{m}$ . .... 108
- Abbildung 52: Charakterisierung der *slpB*-Mutante aus *N. punctiforme* mittels verschiedener Färbungen. Mit dem NEISSER-Verfahren wird Polyphosphat angefärbt. Die Sakaguchi-Reaktion färbt Cyanophycin rot. Mit BODIPY werden Lipidtröpfchen sichtbar und mit VanFL wird der Ort der Peptidoglykangense angefärbt. Größenstandard: 7,5  $\mu\text{m}$ ..... 110
- Abbildung 53: Ultrastruktur der *slpB*-Mutante in *N. punctiforme* im Vergleich zum WT. Auch auf zellulärer Ebene gibt es keinen Unterschied zwischen WT und *slpB*-Mutante. Schwarze Pfeilspitzen: Glykogengranula; PP: Polyphosphat, CS: Carboxysomen; Größenstandard: 1,1  $\mu\text{m}$ . .... 111
- Abbildung 54: Detailansicht des Septums in Ultradünnschnitten. *N. punctiforme* WT und *slpB*-Mutante weisen beide Septal Junctions auf (weiße Pfeilspitzen). Größenstandard: 1,1  $\mu\text{m}$ ..... 112
- Abbildung 55: Lokalisation des *SlpBsfGFP* in *Nostoc punctiforme*. AF) Autofluoreszenz vegetativer Zellen eines Filamentes *sfGFP* Aufnahme mittels GFP-Kanals zur Lokalisation des Fusionsproteins (*SlpBsfGFP*). Größenstandard: 7,5  $\mu\text{m}$ ..... 112
- Abbildung 56: Darstellung der Konservierung der Oberfläche von verschiedenen Amidasen. A) Darstellung der Oberfläche der Amidase-Domäne von *AmiC* aus *E. coli*, von *AmiC2* aus *N. punctiforme* und von *AmiA* aus *Staphylococcus aureus* (Amidase\_2-Familie). B) Nur bei dem Enzym aus *S. aureus* konnte durch eine definierte Bindetasche eine Substratbindung interpretiert werden (Büttner et al., 2016). .... 121
- Abbildung 57: Lokalisation von *SlpD* (A), *SlpB* (B) und *SleB* von *Bacillus subtilis* (C) im Vergleich. *SlpD* wird in vegetativen Zellen stark exprimiert, aber kaum in das Periplasma transportiert. Obwohl *SlpB* keine Signalsequenz besitzt, ist es stärker im Periplasma lokalisiert als *SlpD*. Auch in der Region naszenter Septen ist das Signal vorhanden (weißer Pfeil, Größenstandards: 7,5  $\mu\text{m}$ ). Während der Sporulation wird *SleB* exprimiert und ist hier unter (C) als GFP-Fusion zu sehen. Aufnahmen nach Induktion der Sporulation (0 h, 13 h, 24 und 48 h) im Hellfeld (oberes Paneel) und im GFP-Kanal (unteres Paneel). Erst in der Vospore ist ein Signal zu erkennen (Pfeil). Das Protein ist zunächst an den Polen und in der reifen Spore im Kortex um die Spore gleichmäßig verteilt. Größenstandard: 1  $\mu\text{m}$ . (Masayama et al., 2006). .... 127
- Abbildung 58: Elektronenmikroskopieaufnahmen von *Bacillus thuringiensis* BMB171, WT und *sleB171*-Mutante im Vergleich. A) Rasterelektronenmikroskopieaufnahme nach 48 h Inkubation. Vegetative Zellen des WT wachsen einzellig (a), während die *sleB171*-Mutante in Zellketten wächst (b). B) Transelektronenmikroskopieaufnahmen von Zellen nach 48 h (a+b) und nach 72 h (c+d) Inkubation. Auch während der Sporulation bleiben die Zellen der *sleB171*-Mutante im Filament verbunden. Die Sporenentwicklung der Mutante ist verzögert. Nach 72 h Inkubation zeigt der WT reife Sporen (s) (Li et al., 2016). .... 128
- Abbildung 59: *E. coli* Transformanten mit einem Reporterkonstrukt für *GerM*. A) Nur eine kleine Kolonie fluoresziert auf der Selektionsagarplatte. BF) Hellfeldaufnahme der fluoreszenten Kolonie GFP) Aufnahme der Kolonie im GFP-Kanal. Wenige Zellen fluoreszieren, diese dafür aber sehr stark. Zusätzlich bilden diese *E. coli*-Zellen Filamente mit Inklusionskörperchen. Andere Zellen mit einem normalen, stäbchenförmigen Habitus fluoreszieren nicht. Größenstandard: 10  $\mu\text{m}$ . .... 151

Abbildung 60: Schematische Darstellung der homologen Rekombination des Reporterkonstrukt pIM672 zur Lokalisierung von GerM. ....	152
--	-----

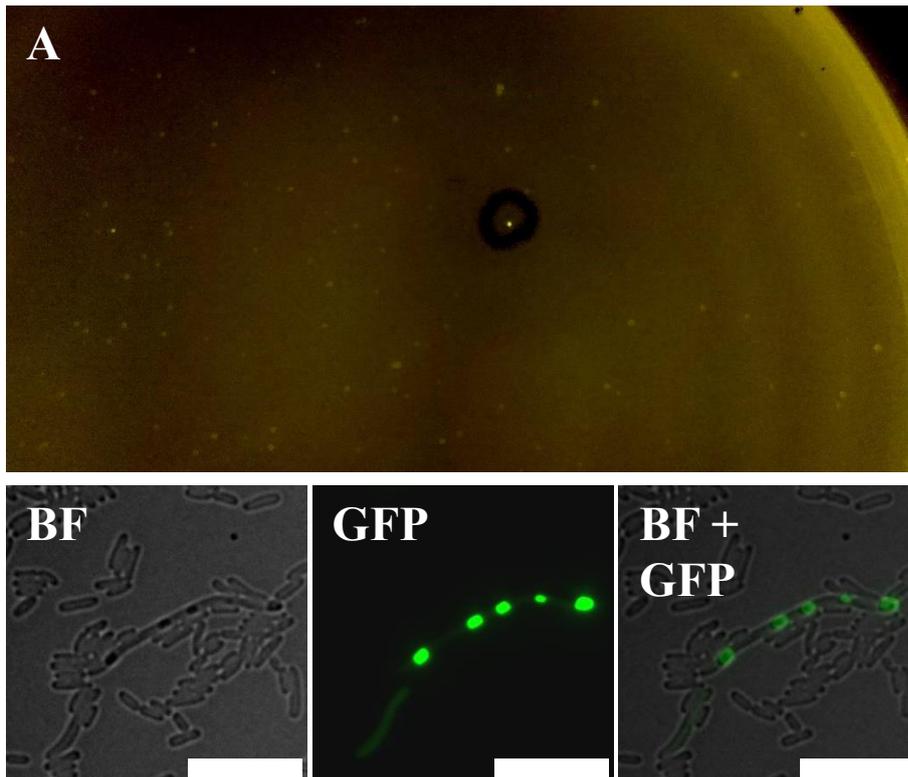
## 9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme. ....	27
Tabelle 2: Verwendete Cyanobakterien. ....	27
Tabelle 3: Plasmide für die triparentale Konjugation. ....	27
Tabelle 4: pGEX-basierte Plasmide. Der N-terminale GST-Tag lässt sich bei den 4T-3 Plasmiden durch Thrombin entfernen, bei den 6P-1 Plasmiden wird der Tag mittels PreScission Protease <sup>TM</sup> entfernt. ....	28
Tabelle 5: pET15b-basierte Plasmide. ....	28
Tabelle 6: pET28a(+)-GFPe-basierte Plasmide. Da diese Plasmide für den Pulldown bestimmt sind wurde durch die Klonierung der His-Tag des Leervektors entfernt. ....	28
Tabelle 7: pRL271-basierte Plasmide. Durch das sacB-Gen ist die Selektion auf Doppelte Rekombination möglich. ....	28
Tabelle 8: pSCR202-basierte Plasmide. Bei den Reporterkonstrukten von Npf5024, SlpD, SlpB und GerM wurde die jeweils native Promotorregion dem Fusionsgen vorgeschaltet. Das Plasmid pIM650 ist mit Ausrufezeichen gekennzeichnet, weil die Promotorregion von gerM in <i>E. coli</i> so stark erkannt wurde, dass der Wirt das Plasmid modifiziert. ....	28
Tabelle 9: pRL1049-basierte Plasmide. Für alle Konstrukte wurde die vektorinterne Promotorsequenz verwendet. ....	29
Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide. Grundsätzlich erfolgte die Namensgebung in Leserichtung des Gens. Oligonukleotide für Gibson-Klonierungen sind nach ihren Überhängen benannt. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen oder Modifikationen sind fett markiert. „Linker“ stellt der veraltete Name des Modulators von AmiC2 dar. „EZD“ ist die alte Bezeichnung für die katalytische Domäne von AmiC2. ....	29
Tabelle 11: Konzentrationen verwendeter Antibiotika. ....	38
Tabelle 12: TE-Puffer. ....	40
Tabelle 13: 6x DNA-Probenpuffer. ....	43
Tabelle 14: TAE-Puffer. ....	43
Tabelle 15: Gibson-Mastermix. ....	44
Tabelle 16: PBS-Puffer. ....	51
Tabelle 17: Puffer 1 für die Reinigung von Peptidoglykan aus <i>E. coli</i> . ....	52
Tabelle 18: Puffer 2 für die Reinigung von Peptidoglykan aus <i>E. coli</i> . ....	52
Tabelle 19: Stammlösungen der Enzyme für die Reinigung von Peptidoglykan aus <i>E. coli</i> . ....	52
Tabelle 20: Friendly-Towbin-Puffer. ....	56
Tabelle 21: GTE-Puffer. ....	57
Tabelle 22: NEISSER I. ....	58
Tabelle 23: NEISSER II. ....	59
Tabelle 24: NEISSER III. ....	59
Tabelle 25: AS-Sequenzen der Sec-Signale. ....	67
Tabelle 26: Der Nanopore Array von vegetativen Zellen und Hormogonien im Vergleich. ....	74
Tabelle 27: Identifikation putativer Interaktionspartner von AmiC2. Die Tabelle gibt an wie viele Peptide der Proteine gefunden wurden. ....	80

### 9.3 Reporterkonstrukte zur Lokalisation von GerM

Zur Lokalisation der putativen Interaktionspartner wurden die nativen Promotorregionen der jeweiligen Gene ermittelt. Diese Region wurde zusammen mit dem jeweiligen Gen, das über Gibson-Klonierung (QUER) mit *sfgfp* fusioniert wurde, in pSCR202 eingefügt. Dieser Vektor verbleibt in *N. punctiforme* als Replikon. Die Selektion auf Transformanten erfolgt durch Ampicillin. Da die *KO*-Mutation der Gene durch Insertion der Neomycinresistenzkassette erfolgte, ist mit dieser Kombination grundsätzlich auch die Komplementation der Mutation durch Transformation des Reporterkonstrukts in die entsprechende Mutante möglich. Der native Promotor des Reporterkonstrukts sorgt dabei für eine möglichst unverfälschte Expression des Proteins. Zur Herstellung der Reporterkonstrukte wurde *E. coli* als Wirt verwendet. Viele Promotor von Cyanobakterien werden auch in *E. coli* erkannt. Fluoreszente *E. coli*-Kolonien nach der Transformation der Gibson-Klonierung (Gibson et al., 2009) waren ein gutes Indiz einer erfolgreichen Klonierung.

Bei der Herstellung des Reporterkonstrukts zur Lokalisation des Membranproteins GerM-Proteins fluoreszierte nach der Transformation lediglich eine einzige *E. coli*-Kolonie, die deutlich kleiner war als die übrigen Kolonien. Auf Agarplatten konnte bei der Kultivierung dieser Kolonie wiederholt der Verlust der Fluoreszenz beobachtet werden. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigte *E. coli*-Zellen, welche GerMsfGFP so stark exprimierten, dass Zellketten und Inklusionskörperchen entstanden. Daneben waren normalgestaltige *E. coli*-Zellen, die keine Fluoreszenz zeigten (Abbildung 59). Wahrscheinlich wird der native Promotor von GerM aus *N. punctiforme* von *E. coli* so stark erkannt, dass GerMsfGFP in toxischen Mengen produziert wird. Die Überexpression vieler Membranproteine ist für *E. coli* problematisch. Da viele Zellen einen normalen unizellulären und stäbchenförmigen Habitus aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass *E. coli* den *gerM*-Promotor mutiert, damit die Zellen weniger oder gar kein GerMsfGFP exprimieren.



**Abbildung 59:** *E. coli* Transformanten mit einem Reporterkonstrukt für GerM. **A)** Nur eine kleine Kolonie fluoresziert auf der Selektionsagarplatte. **BF)** Hellfeldaufnahme der fluoreszenten Kolonie **GFP)** Aufnahme der Kolonie im GFP-Kanal. Wenige Zellen fluoreszieren, diese dafür aber sehr stark. Zusätzlich bilden diese *E. coli*-Zellen Filamente mit Inklusionskörperchen. Andere Zellen mit einem normalen, stäbchenförmigen Habitus fluoreszieren nicht. Größenstandard: 10  $\mu\text{m}$ .

Um den Promotor von *gerM* nicht durch Klonierungsvorgänge in *E. coli* einzubringen, wurde versucht, das Gen für *sfYFP* durch doppelte Rekombination an *gerM* zu fusionieren (Abbildung 60). Die Bereiche der homologen Rekombination umfassen 500 bp. Der Abstand von *gerM* (*Npun\_F0437*) zu dem nächsten annotierten Gen ist so gering, dass ein kleiner Teil des *gerM* auch in dem unteren Rekombinationsbereich vorhanden ist. Durch diesen Ansatz ist zwar keine Komplementation der *gerM*-Mutante möglich, aber durch die Verwendung von *sfYFP* statt *sfGFP* wäre eine co-Lokalisierung eines zweiten Proteins, das mit *sfCFP* fusioniert ist, möglich. Der entstandene Vektor *pIM672* wurde durch triparentale Konjugation in *N. punctiforme* eingebracht. Die Exkonjuganten zeigten keine Fluoreszenz im Bereich von *sfYFP*. Möglicherweise verhindert das Fusionsprotein die Funktion von GerM. In *E. coli* gab es zwar ein starkes Signal des dort verwendeten *GerM:sfGFP*, jedoch hauptsächlich in Inklusionskörperchen und nicht an der Membran.

Für die Lokalisation von GerM könnte in nächsten Versuchen eine Linker-Region zwischen GerM und *sfYFP* eingefügt werden. Falls die direkte Fusion der Proteine tatsächlich die Funktion von GerM beeinflusst, sollte die Lokalisation so möglich sein.

N-terminal ist GerM cytoplasmatisch. Eine weitere Möglichkeit wäre, das fluoreszente Protein an den N-Terminus zu fusionieren. Es könnte sich jedoch als schwierig gestalten, in der Klonierungsstrategie zusätzlich auf die Promotorsequenz zu verzichten.

Eine dritte Möglichkeit könnte die Verwendung eines fremden Promotors darstellen. Ein induzierbarer Promotor umgeht die Expression im Klonierungswirt, liefert in *N. punctiforme* jedoch keine Aussagen über das native Expressionsmuster im komplexen Lebenszyklus des Cyanobakteriums.

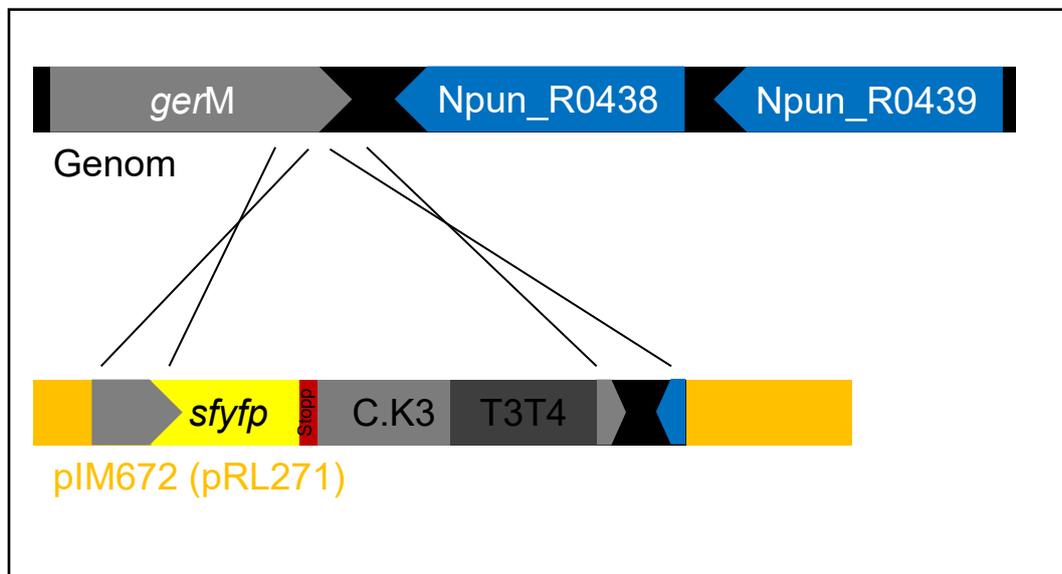


Abbildung 60: Schematische Darstellung der homologen Rekombination des Reporterkonstrukt pIM672 zur Lokalisierung von GerM.