

Funktionelle Charakterisierung von Zellwandproteinen in der Zelldifferenzierung von Heterozysten bildenden Cyanobakterien der Ordnung Nostocales

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Susanne Berendt

aus Frankfurt/Oder

Tübingen

2011

Tag der mündlichen Qualifikation:

1.12.2011

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Karl Forchhammer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Friedrich Götz

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Ökologische Bedeutung und Verbreitung der Cyanobakterien	1
1.1.1 Systematik der Cyanobakterien	2
1.2 Vielzelligkeit bei Cyanobakterien	3
1.3 Zell-Zell-Kommunikation	4
1.3.1 SepJ	5
1.4 Zelldifferenzierung	6
1.4.1 Akineten	6
1.4.2 Heterocysten	7
1.4.2.1 Regulation der Heterocystendifferenzierung	8
1.4.2.2 Zellwandmodifikation während der Heterocystendifferenzierung	9
1.4.3 Hormogonien	10
1.5 Symbiotische Interaktionen der Cyanobakterien	11
1.6 Die Zellhülle der Cyanobakterien	13
1.7 Zellteilung	14
1.7.1 N-Acetyl-Muramyl-L-Alanin Amidasen	17
1.8 <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.....	18
1.9 <i>Nostoc punctiforme</i> ATCC 29133.....	19
1.10 Ziel der Arbeit	20
2. Material und Methoden	22
2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	22
2.2 Bakterienstämme	22
2.2.1 Cyanobakterien	22
2.2.2 <i>Escherichia coli</i>	23
2.3 Plasmide	23
2.4 Oligonukleotide	25
2.5 Wachstumsmedien.....	27
2.5.1 Kulturmedien zur Anzucht von Cyanobakterien	27
2.5.2 Kulturmedien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	28
2.5.3 Kulturmedien zur Anzucht von <i>Anthoceros punctatus</i>	28
2.6 Anzucht und Lagerung.....	29

2.6.1 Stammhaltung	29
2.6.2 Kultivierungsbedingungen	29
2.6.2.1 Kultivierungsbedingungen für Cyanobakterien	29
2.6.2.1.1 Induktion von Akineten.....	30
2.6.2.1.2 Heterocysteninduktion	30
2.6.2.1.3 Hormogonieninduktion	30
2.6.2.1.4 Etablieren der Symbiose	30
2.6.2.1.5 Induktion der Überexpression von <i>amiC1</i> und <i>amiC2</i>	31
2.6.2.2 Anzuchtsbedingungen für <i>E. coli</i>	31
2.6.2.3 Kultivierungsbedingungen für <i>A. punctatus</i>	31
2.7 Molekularbiologische Methoden	31
2.7.1 Isolierung genomischer DNA aus Cyanobakterien	31
2.7.2 Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E.coli</i>	32
2.7.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Cyanobakterien	32
2.7.4 Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	32
2.7.5 Semi-quantitative RT-PCR	33
2.7.6 Agarosegelelektrophorese	34
2.7.7 Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration	34
2.7.8 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	34
2.7.9 Ligation	34
2.8 Mutagenese.....	35
2.8.1 Herstellung von Insertionsmutanten in <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	35
2.8.2 Herstellung von Insertionsmutanten in <i>Nostoc punctiforme</i>	35
2.8.2.1 Inaktivierung von NpF0152	36
2.8.2.2 Inaktivierung von NpF0220	36
2.8.2.3 Inaktivierung von NpF4679	37
2.8.3 Konstruktion von Plasmiden zur Überexpression von <i>alr0092</i> und <i>alr0093</i>	38
2.8.4 Herstellung von Gfp-Konstrukten	38
2.8.4.1 Herstellung einer translationalen Fusion von <i>AmiC1</i> und <i>AmiC2</i> mit Gfp	38
2.8.4.1.1 Fusion von <i>AmiC1_{Ana}</i> und <i>AmiC2_{Ana}</i> von <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 mit Gfp	39
2.8.4.1.2 Fusion von <i>AmiC2</i> von <i>N. punctiforme</i> mit Gfp	40
2.8.4.2 Herstellung einer translationalen Fusion von <i>SepJ_N</i> mit Gfp	41
2.8.5 Komplementation der <i>amiC1</i> -Mutante von <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	42
2.8.6 Transformation von <i>E. coli</i>	42
2.8.6.1 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen	42

2.8.6.2 Transformation von elektrokompenten <i>E. coli</i> Zellen	42
2.8.7 Konjugation von Cyanobakterien	43
2.8.7.1 Konjugation von <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	43
2.8.7.2 Konjugation von <i>N. punctiforme</i>	43
2.8.8 Elektroporation von <i>N. punctiforme</i>	44
2.9 Analytische Methoden	45
2.9.1 Untersuchung der Wachstumsgeschwindigkeit	45
2.9.2 Bestimmung der Chlorophyllkonzentration	45
2.9.3 Dünnschichtchromatographie	45
2.10 Mikroskopie und Färbetechniken	46
2.10.1 FRAP-Analyse	46
2.10.2 Färbung mit Alcian-Blau	46
2.10.3 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	46
2.10.4 Elektronenmikroskopie	47
2.10.4.1 Probenvorbereitung	47
2.10.4.2 Herstellung von Ultradünnschnitten	47
3. Ergebnisse	48
3.1 Zellwand-Amidasen in Cyanobakterien	48
3.1.1 Funktionelle Charakterisierung von Zellwand-Amidasen von <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 .	49
3.1.1.1 Lokalisation von <i>AmiC1_{Ana}</i> und <i>AmiC2_{Ana}</i> in <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	49
3.1.1.2 Gezielte Mutagenese von <i>amiC1_{Ana}</i> und <i>amiC2_{Ana}</i> in <i>Anabaena</i> sp. PCC7120	51
3.1.1.3 Untersuchung der Wachstumseigenschaften von SR477 und SR478	53
3.1.1.4 Analyse der Heterocysten-spezifischen Zellhülle	56
3.1.1.5 Komplementation von SR477	57
3.1.1.6 Untersuchung der Lysozymempfindlichkeit von SR477 und SR478	58
3.1.1.7 Untersuchung der Ultrastruktur mittels Transmission-Elektronenmikroskopie	59
3.1.1.8 Expressionsanalyse Heterocysten-spezifischer Gene	62
3.1.1.9 Untersuchung der Zell-Zell-Kommunikation innerhalb des Filaments	63
3.1.1.10 Überexpression von <i>amiC1_{Ana}</i> und <i>amiC2_{Ana}</i>	66
3.1.2 Lokalisation von <i>AmiC2</i> in verschiedenen Differenzierungsstadien von <i>N. punctiforme</i>	68
3.2 Lokalisation von <i>SepJ_N</i> in verschiedenen Differenzierungsstadien von <i>N. punctiforme</i>	71
3.3 Funktionelle Charakterisierung von Zellwand betreffenden Genen in <i>N. punctiforme</i>	75
3.3.1 Herstellung der Insertionsmutanten von Zellwand betreffenden Genen in <i>N.</i>	

<i>punctiforme</i>	75
3.3.2 Sequenzanalyse von NpF0152, NpF0220 und NpF4679	76
3.3.3 Untersuchung des Differenzierungspotentials.....	78
3.3.3.1 Heterocystendifferenzierung und Wachstum auf N ₂	78
3.3.3.2 Hormogoniendifferenzierung	79
3.3.4 Etablieren der Symbiose mit <i>Anthoceros punctatus</i>	80
4. Diskussion.....	82
4.1 Die Bedeutung von Zellwand-Amidasen	82
4.1.1 Auswirkungen der Inaktivierung von <i>amiC1_{Ana}</i> und <i>amiC2_{Ana}</i> auf vegetatives Wachstum	83
4.1.2 Auswirkungen der Inaktivierung von <i>amiC1_{Ana}</i> und <i>amiC2_{Ana}</i> bei N-Entzug	83
4.1.3 Regulation der Heterocystendifferenzierung	85
4.1.4 Funktion von <i>amiC1_{Ana}</i> für die Zell-Zell-Kommunikation	87
4.1.5 Subzelluläre Lokalisation von <i>AmiC1_{Ana}</i> und <i>AmiC2_{Ana}</i>	88
4.1.6 Gestörte Integrität der äußeren Membran in SR477 und SR478	90
4.1.7 Relevanz von <i>AmiC1_{Ana}</i> und <i>AmiC2_{Ana}</i> für das Wachstum	91
4.2 Lokalisation von <i>AmiC2</i> in verschiedenen Differenzierungsstadien von <i>N. punctiforme</i>	92
4.3 Lokalisation von <i>SepJ_N</i> in verschiedenen Differenzierungsstadien von <i>N. punctiforme</i>	93
4.4 Charakterisierung von Insertionsmutanten von Zellwand-Genen in <i>N. punctiforme</i>	95
4.4.1 Untersuchung von NpF0152	96
4.4.2 Untersuchung von NpF0220	97
4.4.1 Untersuchung von NpF4679	99
4.5 Ausblick	100
5. Zusammenfassung	102
6. Literaturverzeichnis	104
7. Abkürzungsverzeichnis.....	120

1. Einleitung

1.1 Ökologische Bedeutung und Verbreitung der Cyanobakterien

Das Erscheinungsbild der Erde, wie wir es heute kennen, konnte nur durch die Anreicherung der Atmosphäre mit molekularem Sauerstoff entstehen. Der kontinuierliche Anstieg der O₂ - Konzentration begann wahrscheinlich vor etwa 2,4 bis 2,0 Mrd Jahren (Cloud, 1972; Farquhar *et al.*, 2000) und wurde von Cyanobakterien initiiert (Kasting, 2001). Der entscheidende evolutionäre Schritt dieser Mikroorganismen bestand in der Ausbildung der oxygenen Photosynthese. Bei dieser Umwandlung der Sonnenenergie in chemische Energie dient Wasser als Elektronendonator. Nach dessen Oxidation entsteht Sauerstoff als Abfallprodukt. Die freiwerdenden Elektronen werden zunächst auf das Chlorophyll *a* (Chl*a*) im Photosystem II, den Cytochrom-*b₆f*-Komplex, das Photosystem I und letztendlich auf NAD(P)⁺ übertragen (Vermaas, 2001). Die entstehenden Reduktionsäquivalente NAD(P)H werden als Elektronendonator für eine Vielzahl biosynthetischer Reaktionen benötigt. Darüber hinaus wird durch den lichtgetriebenen Elektronentransport eine protonenmotorische Kraft generiert, die über die ATP-Synthase zur Bildung von ATP genutzt wird. Der gesamte Prozess der oxygenen Photosynthese findet in einem intrazellulären Membransystem, der Thylakoidmembran statt (Krogmann, 1973). Strukturvergleiche der Photosyntheseapparate von Cyanobakterien und Chloroplasten der Pflanzen offenbaren strukturelle Gemeinsamkeiten (Cavalier-Smith, 1992). Zusätzlich bestätigen Sequenzanalysen der 16s RNA von Cyanobakterien und Chloroplasten die Endosymbiontentheorie (Giovannoni *et al.*, 1988). Diese postuliert den Ursprung der heutigen Chloroplasten und damit die photosynthetische Fähigkeit der Pflanzen in einer Endosymbiose von eukaryotischen Zellen mit den Vorfahren der heutigen Cyanobakterien (Cavalier-Smith, 1975).

Cyanobakterien sind weltweit verbreitet. Man findet sie sowohl in Süß-, Brack-, und Salzwasser, als auch in terrestrischen Habitaten. Neben der Fähigkeit, CO₂ in organische Verbindungen umzuwandeln, können einige Arten Luftstickstoff (N₂) fixieren und sind damit zum diazotrophen Wachstum fähig. Dadurch sind sie in der Lage, auch nährstoffarme Ökosysteme zu besiedeln. Einige Vertreter haben darüber hinaus verschiedene Anpassungsmechanismen entwickelt, um hohe Temperaturen, Trockenheit oder extreme Kälte zu überstehen (Whitton & Potts, 2000). So wurden Cyanobakterien bereits in verschiedenen Wüstenregionen, heißen Quellen von über 70 °C, aber auch in den Polarregionen nachgewiesen (Bündel *et al.*, 2009; Miller & Castenholz, 2000; Vincent *et al.*, 2000). Einige Arten können starke Toxine bilden und besitzen daher für den Menschen

gesundheitsschädliche Relevanz (Namikoshi & Rinehart, 1996). Vor allem in asiatischen Ländern finden Cyanobakterien auch als Nahrung Verwendung. Darüber hinaus rücken Cyanobakterien zunehmend ins Blickfeld der Öffentlichkeit, da sie als Produzenten von unterschiedlichsten Sekundärmetaboliten und Energieträgern (Biofuel) für die Biotechnologie von Interesse sind (Angermayr *et al.*, 2009).

1.1.1 Systematik der Cyanobakterien

Cyanobakterien bilden im Reich der Eubacteria ein eigenes Phylum, wobei diese phylogenetische Linie eine stark heterogene Gruppe mit einer beeindruckend vielfältigen Morphologie umfasst (Abb. 1). So gibt es einerseits einzellige Cyanobakterien, die zum Teil Kolonien bilden, aber auch verzweigt und unverzweigt filamentöse Cyanobakterien (Rippka *et al.*, 1979). Bedeutende Unterschiede existieren auch hinsichtlich der Größe von Cyanobakterien. Diese reicht von weniger als 1 μm bis mehr als 100 μm im Durchmesser. (Castenholz & Waterbury, 1989).

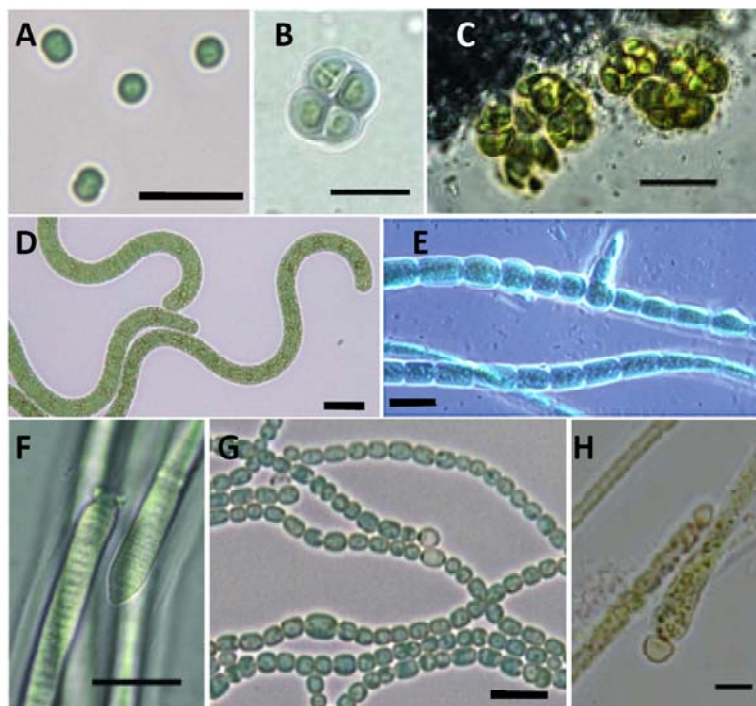


Abb. 1: Morphologische Vielfalt verschiedener Cyanobakterien: (A) *Synechocystis* PCC 6803, (B) *Chroococciopsis* sp., (C) *Enthophysalis* sp., (D) *Arthrospira platensis*, (E) *Fischerella* sp., (F) *Blennothrix* sp., (G) *Anabaena* sp. PCC 7120, (H) *Rivularia* sp.; Messbalken A,D,E,G,H = 10 μm B,C,F = 20 μm (entnommen aus Diez *et al.*, 2007; Finsinger *et al.*, 2008; Berrendero *et al.*, 2008)

Die ersten taxonomischen Einteilungen der Cyanobakterien berücksichtigten lediglich morphologische Kriterien. Für nachfolgende systematische Klassifizierungen wurden

zusätzlich physiologische Merkmale, wie Nährstoffanforderungen, Temperatur- und Salztoleranz, Pigmentzusammensetzung sowie genetische Analysen einbezogen. Die Taxonomie nach Rippka *et al.*, (1979) unterteilt die Cyanobakterien in fünf verschiedene Sektionen. In den Sektionen I und II werden dabei einzellige Cyanobakterien zusammengefasst. Die Sektionen III bis V beinhalten filamentöse Cyanobakterien. Cyanobakterien der Sektion IV und V besitzen die Fähigkeit zur Heterocystendifferenzierung und sind dadurch in der Lage, N_2 zu fixieren. Einige Arten besitzen darüber hinaus weiteres Differenzierungspotential.

1.2 Vielzelligkeit bei Cyanobakterien

Echte Mehrzeller zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Zelldifferenzierung aus (Rossetti *et al.*, 2009). Diese ermöglicht eine funktionale Spezialisierung der einzelnen Zelltypen, wodurch Arbeitsaufgaben sowie Synthese- und Stoffwechselwege effizienter bewältigt werden können. Dadurch sind sie gegenüber einzelligen Organismen im Vorteil. Auf der anderen Seite bedeutet die Aufgabenspezifität für die einzelne Zelle oft eine dauerhafte Abhängigkeit vom restlichen Zellverband. Der Übergang von einzelligen zu mehrzelligen Organismen ist unabhängig voneinander mehrmals erfolgt. Filamentöse Cyanobakterien gelten dabei als die ersten bekannten mehrzelligen Organismen (Kaiser, 2001).

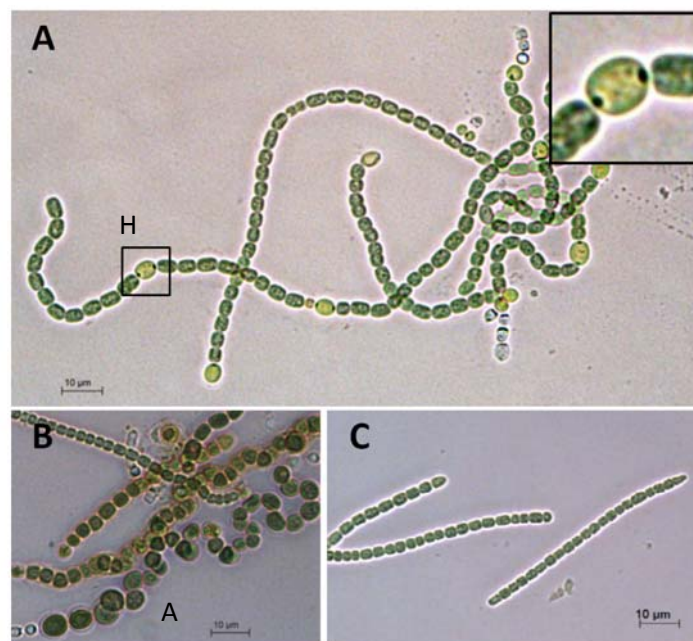


Abb. 2: Übersicht des Differenzierungspotentials von *Nostoc punctiforme*. (A) Vegetatives Filament mit Heterocysten, (B) Akineten, (C) bewegliche Hormogonien. H, Heterocyste; A, Akineten. Balken = 10 μ m.

Bei einigen Cyanobakterien der Sektionen IV und V sind bis zu vier verschiedene Zelltypen zu finden (Rippka *et al.*, 1979). Bei optimalem Wachstum, ohne Nährstofflimitation, wachsen sie als lange, in Sektion V als verzweigte Trichome, die aus hunderten von gleichartigen vegetativen Zellen bestehen. Bei Mangel an gebundenen Stickstoffverbindungen können Cyanobakterien der Sektionen IV und V einzelne vegetative Zellen zu Heterocysten differenzieren, die der Stickstofffixierung dienen (Abb. 2A). Einige Arten können zusätzlich Akineten als Überdauerungsstadien ausbilden (Abb. 2B). Die vierte Differenzierungsform, die bei Cyanobakterien vorkommen kann, sind Hormogonien (Abb. 2C). Diese beweglichen, verkürzten Filamente besitzen die Fähigkeit zur Photo- und Chemotaxis und dienen hauptsächlich der Verbreitung auf kurzer Distanz.

1.3 Zell-Zell-Kommunikation

Eine Arbeitsteilung und Aufgabenspezialisierung von Zellverbänden setzt einen Austausch von Nährstoffen zwischen den verschiedenen Zelltypen voraus. Die Koordination der Differenzierungsprozesse bedarf zudem der Weiterleitung von Signalmolekülen und regulatorischen Metaboliten (Mariscal & Flores, 2010; Maldener & Muro-Pastor, 2010; Flores & Herrero, 2010). Die genauen Mechanismen für eine Zell-Zell-Kommunikation bei Cyanobakterien sind zwar noch weitestgehend unbekannt, es wird jedoch über zwei verschiedene Routen diskutiert. Eine Möglichkeit für einen Informationsaustausch besteht in einem kontinuierlichen Periplasma, das den Transfer von Metaboliten durch Diffusion erlaubt (Abb. 3 blaue Pfeile). Eine Alternative für die Weiterleitung von Stoffen besteht über direkte Zell-Zell-verbundene Strukturen (Abb. 3 rote Pfeile).

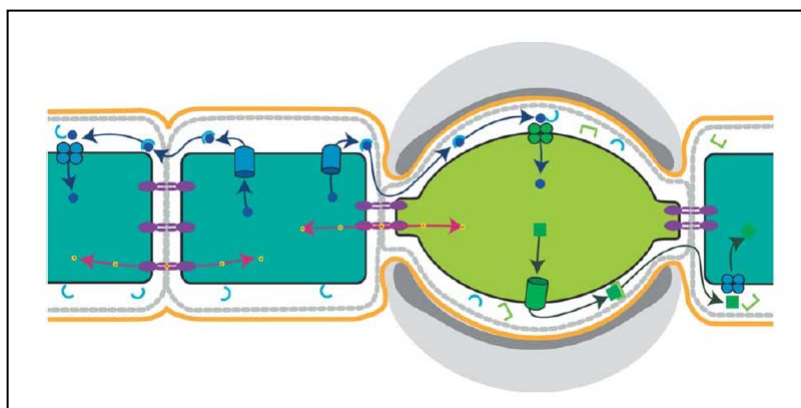


Abb. 3: Schematische Darstellung des zellulären Stoffaustausches in filamentösen Cyanobakterien der Sektion IV. Nährstoffe und regulatorische Metabolite könnten über das Periplasma im gesamten Filament verteilt oder über direkte Zell-Zell-Verbindungen ausgetauscht werden. Zylinder und Tetraeder repräsentieren Transporter. Proteinkomplexe im Septum sind als lila Strukturen dargestellt. Halbkreise stehen für periplasmatische Bindeproteine (entnommen aus Maldener & Muro-Pastor, 2010).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen filamentösen Cyanobakterien haben gezeigt, dass die äußere Membran das gesamte Filament umgibt und nicht ins Septum eindringt (Flores *et al.*, 2006, Hoiczky & Baumeister, 1995). Dies lässt auf das Vorhandensein eines kontinuierlichen Periplasmas schließen. Weitere Untersuchungen zeigten zudem, dass ein grün fluoreszierendes Protein (Gfp), das durch das Tat-System ins Periplasma transportiert wird, sich im periplasmatischen Raum ausbreiten kann. Das bedeutet, dass das Periplasma nicht nur strukturell sondern auch funktional kontinuierlich ist und Stoffe über diesen Weg entlang des Filaments ausgetauscht werden können (Mariscal *et al.*, 2007).

Zusätzlich geben elektronenmikroskopische Aufnahmen auch Hinweise auf die Existenz von direkten Zell-Zell-Verbindungen. Ultradünnschnitte zeigten Strukturen, die senkrecht zum Septum den periplasmatischen Raum durchspannen. Diese wurden, Bezug nehmend auf die Zell-Zell-Verbindungen in Pflanzen, als Microplasmodesmata bezeichnet (Lang & Fay, 1971). Im Gegensatz zu den pflanzlichen Plasmodesmata sind die bei den filamentösen Cyanobakterien entdeckten Verbindungen aber nicht von Cytoplasmamembran umgeben (Mariscal *et al.*, 2007, Flores & Herrero, 2010). Der direkte Nachweis der Weiterleitung von Molekülen von Cytoplasma zu Cytoplasma konnte durch FRAP-(*Fluorescence recovery after photobleaching*) Experimente bei *Anabaena* sp. PCC 7120 und *A. cylindrica* erbracht werden (Mullineaux *et al.*, 2008). Hingegen konnte bei *Oscillatoria terebriformis*, einem filamentösen Cyanobakterium der Sektion III ohne Differenzierungspotential, kein unspezifischer Stoffaustausch zwischen Nachbarzellen gemessen werden. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei diesen Zell-Zell-verbindenden Strukturen um spezifische Anpassungen für den Metabolit- und Signalaustausch in filamentösen Cyanobakterien mit der Fähigkeit zur Zelldifferenzierung handelt. Dafür sprechen auch erhöhte Austauschraten zwischen vegetativen Zellen während eines diazotrophen Wachstums (Mullineaux *et al.*, 2008). Ein potentieller Kandidat für die Beteiligung an Zell-Zell-verbindenden Strukturen ist das Membranprotein SepJ.

1.3.1 SepJ

Bei SepJ von *Anabaena* sp. PCC 7120, auch als FraG bezeichnet, handelt es sich um ein aus 751 Aminosäuren bestehendes Protein, das einen dreiteiligen Aufbau aufweist (Nayar *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2007). Einer N-terminalen coil-coil Domäne folgt eine Prolin- und Serinreiche Verbindungsdomäne und eine C-terminale Permease (Flores *et al.*, 2007; Mariscal *et al.*, 2011). In *Anabaena* sp. PCC 7120 zeigen SepJ Deletionsmutanten einen stark verringerten

Molekülaustausch von Zelle zu Zelle (Mullineaux *et al.*, 2008). Zusätzlich verursacht die Deletion von *sepJ* eine auffällige Fragmentierung der Filamente sowie einen frühen Abbruch der Heterocystendifferenzierung. Dies verdeutlicht die wichtige Funktion von SepJ für die Filamentstabilität und das diazotrophe Wachstum (Nayar *et al.*, 2007). Lokalisationsanalysen bei denen SepJ mit Gfp fusioniert wurde, zeigten eine Akkumulation von SepJ sowohl in den Septen zwischen vegetativen Zellen, als auch in den Septen zwischen vegetativen Zellen und Heterocysten (Flores *et al.*, 2007). Für die richtige Positionierung von SepJ im Septum werden die Proteine FraC und FraD benötigt (Merino-Perto *et al.*, 2010). Deren genaue Rolle bei der Ausbildung von Strukturen für die Zell-Zell-Kommunikation ist jedoch unklar. Beide Proteine verfügen N-terminal über transmembrane Bereiche. Während bei FraC der C-Terminus ins Cytoplasma ragt, hat FraD am C-Terminus eine längere periplasmatische Domäne (Merino-Puerto *et al.*, 2011). Denkbar wäre, dass SepJ, FraC und FraD zusammen einen Komplex für die Zell-Zell-Kommunikation bilden.

1.4. Zelldifferenzierung

1.4.1 Akineten

Akineten werden im Allgemeinen beim Erreichen der stationären Wachstumsphase aus vegetativen Zellen von diversen Vertretern der Nostocaceae differenziert (Adams & Duggan, 1999). Unter Laborbedingungen lassen sie sich gezielt durch Phosphatmangel induzieren (Meeks *et al.*, 2002). Akineten weisen eine erhöhte Resistenz gegenüber Kälte und Trockenheit auf und werden daher oft als Sporen-ähnlicher Zelltyp beschrieben. Im Gegensatz zu den Endosporen von Gram-positiven Bakterien sind Akineten jedoch nicht hitzestabil (Herdman, 1988). Dennoch spielen Akineten eine wichtige Rolle für das Überdauern von ungünstigen Umweltbedingungen. So wurde beispielsweise bei *A. cylindrica* gezeigt, dass Akineten bei -20 °C im Dunkeln bis zu 5 Jahre lebensfähig bleiben, wohingegen die vegetativen Zellen nicht länger als zwei Wochen unter gleichen Bedingungen überleben (Yamamoto, 1975). Die erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber Trockenheit und Kälte wird unter anderem durch eine verdickte Zellwand und einer extrazellulären Polysaccharidschicht erreicht. Die Zusammensetzung dieser äußeren Polysaccharidschicht variiert in verschiedenen Stämmen, weist aber Ähnlichkeiten mit der Zusammensetzung der Zellwand von Heterocysten auf (Argueta & Summers, 2005). Eine weitere Strategie für die Überlebensfähigkeit der Akineten liegt in der Einlagerung von Glycogen und Cyanophycin als Kohlenstoff- bzw. Stickstoffspeicher (Simon, 1987). Eine metabolische Aktivität bei Akineten ist vorhanden,

aber stark verringert (Thiel & Wolk, 1983). Microarray Daten von Akineten zeigen 497 spezifisch regulierte Gene bei *N. punctiforme*. Viele der im Vergleich zum vegetativen Wachstum aktivierten Gene haben bis jetzt jedoch keine bekannte Funktion. Die im Vergleich zum vegetativen Wachstum reprimierten Gene codieren hauptsächlich für Proteine des Grundmetabolismus (Campbell *et al.*, 2007).

Licht und optimale Nährstoffbedingungen stimulieren die Auskeimung der Akineten zu vegetativen Filamenten (Adams & Duggan, 1999).

1.4.2 Heterocysten

Bei der Fixierung von molekularem Stickstoff handelt es sich um einen extrem energieaufwendigen Prozess. Für die Reduktion eines N_2 -Moleküls zu NH_3 müssen 16 ATP aufgewendet werden (Kneip *et al.*, 2007). Das Schlüsselenzym bei der Stickstofffixierung ist die molybdänhaltige Nitrogenase, ein Enzymkomplex aus Dinitrogenase und Dinitrogenase-Reduktase, der äußerst Sauerstoff-empfindlich ist (Fay, 1992). Stickstofffixierende Cyanobakterien haben daher verschiedene Strategien entwickelt, die das Enzym vor irreversibler Deaktivierung durch Sauerstoff schützen. Einige Cyanobakterien fixieren N_2 nur in der Dunkelheit, wenn die durch die Photosynthese bedingte Sauerstoffproduktion unterbrochen ist und der Sauerstoff-Partialdruck zusätzlich durch die Atmung verringert wird (Bergman *et al.*, 1997).

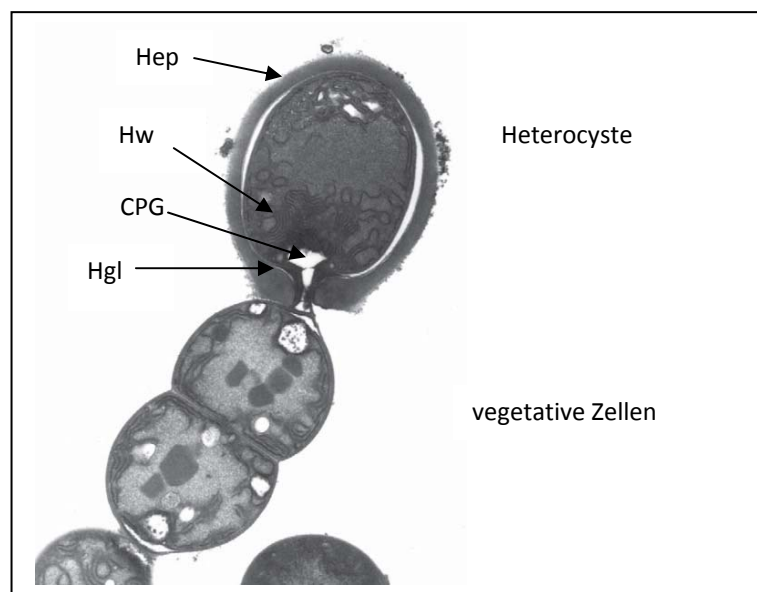


Abb. 4: Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Anabaena* sp. PCC 7120. CPG, Cyanophycin-Granulum; Hep, Heterocysten-Polysaccharid-Schicht; Hgl, Heterocysten-Glycolipid-Schicht; Hw, Honigwaben-membran (entnommen aus Maldener & Muro-Pastor, 2010).

In filamentösen Cyanobakterien der Sektion IV und V wird eine microaerobe Umgebung durch räumliche Trennung von oxygener Photosynthese und Stickstofffixierung generiert. Dazu werden in mehr oder weniger regelmäßigen Abständen vegetative Zellen zu sogenannten Heterocysten umgebildet (Abb. 4). Diese Zellen bilden eine spezielle Zellhülle, die den Einstrom von Sauerstoff in die Zelle stark reduziert. Zusätzlich wird durch die Bildung einer speziellen Verbindungsstruktur zu benachbarten vegetativen Zellen, dem sogenannten Halskanal, der Zustrom von Sauerstoff aus den vegetativen Nachbarzellen begrenzt. In einem späteren Differenzierungsstadium wird zudem das sauerstoffproduzierende Photosystem II abgebaut. Einströmender Sauerstoff aus den benachbarten, photosynthetisch aktiven vegetativen Zellen wird wahrscheinlich von Oxidasen an den Honigwabenmembranen („*honeycomb*“) (HW) reduziert (Wolk 1996).

1.4.2.1 Regulation der Heterocystendifferenzierung

Die Differenzierung von vegetativen Zellen zu Heterocysten dauert unter Laborbedingungen etwa 20 - 24 h und ist irreversibel (Kumar *et al.*, 2010). Der Vorgang der Differenzierung startet unmittelbar nach Wahrnehmung des Stickstoffhungers, der durch Anstieg des 2-Oxoglutaratspiegels (OG) in der Zelle angezeigt wird (Muro-Pastor *et al.*, 2001; Forchhammer, 2004). Als Antwort auf den Mangel an gebundenen Stickstoffquellen wird der globale Stickstoffregulator NtcA (*nitrogen transcription control*) aktiviert. NtcA gehört zur cAMP Rezeptor Proteinfamilie und wirkt sowohl als aktivierender als auch reprimierender Transkriptionsfaktor, der verschiedene Gene für den Stickstoffmetabolismus und die Heterocystendifferenzierung kontrolliert (Herrero *et al.*, 2001). Die Inaktivierung von *ntcA* verhindert den Eintritt in den Differenzierungsprozess (Frias *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 1994).

Die Heterocystendifferenzierung stellt sich als ein sehr komplexer Prozess dar, an dem eine Vielzahl regulatorischer Proteine beteiligt sind (Abb. 5). Sehr früh im Differenzierungsprozess wird die Expression von *hetR* aktiviert (Buikema & Hasselkorn, 1991, Black *et al.*, 1993). Die Deletion von *hetR* führt zum vollständigen Verlust des Heterocystendifferenzierungspotentials. HetR, ein DNA-Bindeprotein, nimmt wahrscheinlich die Rolle des Schlüsselregulators während der Heterocystendifferenzierung ein (Zhou *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2005). Entsprechend dem gegenwärtigen Model aktiviert HetR die Expression von *patS*. PatS oder ein PatS-Derivat diffundiert zu den Nachbarzellen und verhindert dort die Heterocystendifferenzierung durch Hemmung der HetR-DNA Bindung (Yoon & Golden, 2001, Zhang *et al.*, 2009). Die Konkurrenz zwischen Heterocysten-aktivierendem HetR und

-hemmendem PatS sorgt demnach für die Ausbildung eines regelmäßigen Heterocystenmusters (Zhang *et al.*, 2006). Die Aufrechterhaltung des Verhältnisses von Heterocysten zu vegetativen Zellen ist wichtig, da die reife Heterocyste die Fähigkeit zur CO₂-Fixierung verloren hat und daher von den angrenzenden vegetativen Zellen mit gebundenen Kohlenstoffverbindungen versorgt werden muss. Im Gegenzug erhalten die umgebenden vegetativen Zellen gebundenen Stickstoff aus den Heterocysten (Wolk, 1996, Maldener & Muro-Pasto, 2010).

Für die Reifung zu funktionsfähigen Heterocysten und für die Beibehaltung eines regelmäßigen Musters sind noch weitere Proteine, mit zum Teil noch unbekannter Funktion, nötig (Kumar *et al.*, 2010).

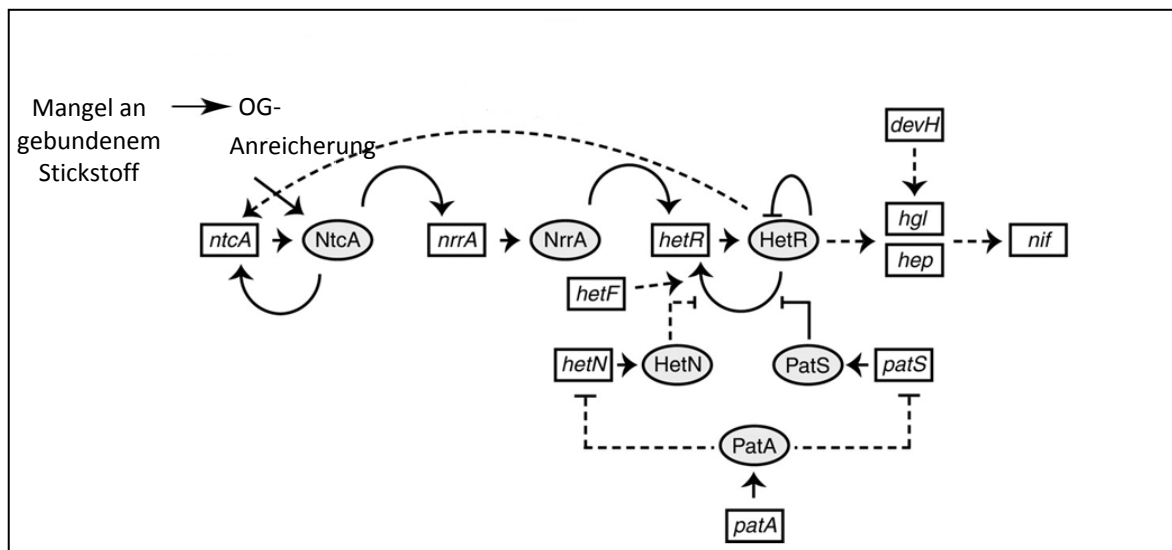


Abb. 5: Regulationskaskade bei der Heterocystendifferenzierung. Der Mangel an gebundenen Stickstoffverbindungen führt zur intrazellulären Anhäufung von OG und damit zur Aktivierung von NtcA. NtcA kontrolliert verschiedene Gene für den Stickstoffmetabolismus und aktiviert durch den Responsregulator NrrA die Expression von *hetR*. Der Schlüsselregulator der Heterocystendifferenzierung HetR aktiviert weitere Gene. Auf Pfeile oder Striche endende Linien repräsentieren positive bzw. negative Interaktionen; gestrichelte Linien deuten indirekte oder unbekannte Wechselwirkungen an. OG, 2-Oxoglutarat; (verändert nach Kumar *et al.*, 2010).

1.4.2.2 Zellwandmodifikation während der Heterocystendifferenzierung

Die auffälligste morphologische Veränderung während der Differenzierung von vegetativer Zelle zur Heterocyste betrifft die Zellhülle (Xu *et al.*, 2008). Die Heterocysten-Zellhülle besteht aus einer inneren laminaren Schicht aus Glycolipiden (Hgl) und einer darauf aufgelagerten Polysaccharid-Schicht (Hep-Schicht). Bereits etwa vier Stunden nach Induktion der Heterocystendifferenzierung beginnt die Auflagerung der Hep-Schicht auf die äußere Membran der sich entwickelnden Heterocyste (Wilcox *et al.*, 1973; Wolk 1996). Die Hep-

Schicht besteht aus einem Rückgrat der Wiederholungseinheiten (Man-Gluc-Gluc-Gluc)_n die mit verschiedenen Seitenverzweigungen substituiert sind (Wolk, 2000). In den letzten Jahren wurden mehrere Gene identifiziert, die an der Bildung der Hep-Schicht beteiligt sind. Das Gen *hepA* beispielsweise codiert für einen ABC-Transporter. HepA-Mutanten können noch die Hgl-Schicht bilden, zeigen aber weder die Synthese von Hep noch die Reorganisation der Thylakoid-Membran (Zhu *et al.*, 1998). Durch den Verlust der Aktivität der Glycosyltransferasen HepB und HepC werden ebenfalls Heterocysten ohne Hep-Schicht differenziert (Huang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007).

Im Anschluss an die Formation der Hep-Schicht wird die Hgl-Schicht synthetisiert (Wilcox *et al.*, 1973). Diese besteht aus einem Zuckeranteil aus Glucose, Galactose oder Mannose, der über glycosidische Bindungen mit einer C₂₆ oder C₂₈ Polyhydroxy-oder Ketohydroxy-Hydrocarbonkette verbunden ist (Awai *et al.*, 2009; Maldener & Muro-Pasto, 2010). Für den Export von Hgl zur Zellhülle werden der Transportkomplex DevBCA und das äußere Membranprotein TolC (HgdD) benötigt (Staron *et al.*, 2011). Bei einer Mutation im *devBCA*-Operon beginnen die Filamente zunächst die Heterocystendifferenzierung und lagern die Hep-Schicht auf die entstehende Heterocysten-Zellhülle, stoppen aber dann den Differenzierungsprozess. Die Bildung der Hgl-Schicht unterbleibt, ebenso wie die Reorganisation der Thylakoid-Membran und Bildung der Honigwabenmembran (Fiedler *et al.*, 1998).

Zusätzlich zur Auflagerung der Hgl- und Hep-Schicht auf die Zellwand kommt es während der Heterocystendifferenzierung zur Modifikation des Peptidoglycans (Nicolaisen *et al.*, 2009a). Die große Bedeutung des Peptidoglykanumbaues für die Heterocystendifferenzierung zeigt sich durch Inaktivierung verschiedener Penicillin-Bindeproteinen (Pbp), welche an der Synthese von Peptidoglykan beteiligt sind. Die Inaktivierung von *pbp2* (*alr5101*), *pbp3* (*all2981*) oder *pbp6* (*alr4579*) in *Anabaena* sp. PCC 7120 führte bei Stickstoffmangel zur Ausbildung nicht funktionsfähiger Heterocysten (Lazaro *et al.*, 2001; Leganes *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005).

1.4.3 Hormogonien

Hormogonien sind relativ kurze, bewegliche Filamente, die keine Heterocysten ausbilden und deren Einzelzellen sich von vegetativen Zellen durch eine kleine, charakteristische Form unterscheiden (Meeks & Elhai, 2002)(Abb. 2C). Hormogonien dienen der Ausbreitung auf kurzer Distanz. Durch Typ IV-Pili können sich die Zellen gleitend fortbewegen (Duggan *et al.*,

2007). Zusätzlich verfügen die Hormogonien einiger Arten über Gasvesikel, die ihnen einen gezielten Auftrieb im Wasser erlauben (Walsby, 1994). Bei symbiotisch lebenden Cyanobakterien spielen sie zusätzlich für die Besiedlung des Wirts eine entscheidende Rolle (Meeks *et al.*, 2002). Durch die Fähigkeit der positiven Photo- und Chemotaxis können belichtete Habitate bzw. Symbiosepartner erreicht werden (Meeks & Elhai, 2002).

Die Induktion der Hormogoniendifferenzierung kann durch verschiedene Faktoren erfolgen. Im Allgemeinen handelt es sich dabei um plötzliche Veränderungen der Umweltbedingung, wie eine Erhöhung oder Verringerung der Nährstoffkonzentration oder der Änderung in Menge und Zusammensetzung von Licht (Tandeau de Marsac, 1994). Bei Cyanobakterien die symbiotische Beziehungen mit Pflanzen eingehen, kann die Hormogoniendifferenzierung zusätzlich durch vom Wirt produzierte Signalstoffe erfolgen (Rasmussen, *et al.*, 1994).

Bei der Differenzierung von vegetativen Filamenten zu Hormogonien kommt es zur Zellteilung, die nahezu gleichzeitig in allen Zellen des Filaments beginnt. Da es während der gesamten Hormogoniendifferenzierung zu keinem Zuwachs von Biomasse kommt, führt die Zellteilung zur Verkleinerung der einzelnen Zellen im Hormogonium (Meeks & Elhai, 2002). Zusätzlich kommt es zur Verringerung der Synthese von Phycobiliproteinen (Damerval *et al.*, 1991), zur Abnahme der CO₂-Fixierung und NH₄⁺-Assimilation (Campbell & Meeks, 1989). Microarray Analysen bei *N. punctiforme* zeigen ein umfassendes Bild der spezifisch induzierten und reprimierten Gene während der Hormogoniendifferenzierung (Campbell *et al.*, 2008). Der Zustand der Hormogonien ist transient. Spätestens 96 h nach Induktion wandeln sich Hormogonien zurück zu vegetativen Filamenten (Meeks & Elhai, 2002).

1.5 Symbiotische Interaktionen der Cyanobakterien

Einige Cyanobakterien können mit eukaryotischen Organismen Symbiosen eingehen. Das Wirtsspektrum umfasst dabei Pilze, Pflanzen und sogar niedere Tieren wie Schwämme (*Porifera*) und Nesseltiere (*Cnidaria*) (Bergman *et al.*, 2007). Grundsätzlich versorgt das Cyanobakterium den Wirt mit gebundenem Stickstoff in Form von Nitrat oder Ammonium. Bei photosynthetisch nicht aktiven Wirten kann zusätzlich auch gebundener Kohlenstoff bereitgestellt werden (Venn *et al.*, 2008).

Cyanobakterien die mit Pflanzen Symbiosen eingehen, verfügen im Allgemeinen über zwei wichtige Charakteristika. Zum einen besitzen sie die Fähigkeit, Heterocysten zur N₂-Fixierung auszubilden, zum Anderen sind sie in der Lage, Hormogonien zu differenzieren. Diese spielen bei der Infektion des Wirts eine entscheidende Rolle. Die symbiotische Interaktion wird durch

die Pflanze initiiert. Unter Stickstoff limitierenden Bedingungen bildet sie einen Hormogonien induzierender Faktor (HIF), dessen genaue chemische Natur aber noch unbekannt ist (Meeks & Elhai, 2002). Für das Zustandekommen der Symbiose werden wahrscheinlich zusätzlich chemische Lockstoffe benötigt (Knight & Adams, 1996). Nachdem die vegetativen Filamente zu Hormogonien differenziert sind und sich zur Pflanze bewegen, bedarf es bestimmter Erkennungsmechanismen um sicherzustellen, dass nur geeignete Stämme Einlass bekommen. In der Wirtspflanze kommt es zur baldigen Rückdifferenzierung der Hormogonien zu vegetativen Filamenten, mit einem Heterocystenanteil, der bis zu 50 % des gesamten Filaments ausmacht (Adams & Duggan, 2008) (Abb. 6). Zu diesem Zeitpunkt produziert die Pflanze einen sogenannten Hormogonien reprimierenden Faktor (HRF), der die erneute Differenzierung zu Hormogonien unterdrückt.

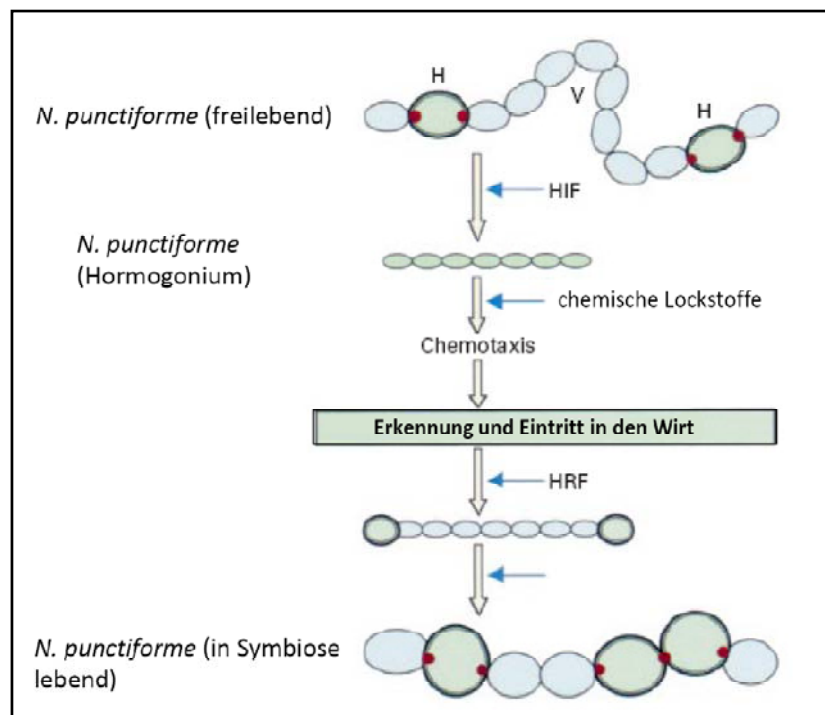


Abb. 6: Schematische Darstellung des Infektionsprozesses bei der Symbiose zwischen Cyanobakterien und Pflanzen. Bei Stickstoffmangel produziert die Pflanze einen HIF, der die Differenzierung in bewegliche Hormogonien initiiert. Von der Pflanze erzeugte chemische Lockstoffe weisen den Weg zum Wirt. Nach Eintritt in den pflanzlichen Wirt kommt es zur Rückdifferenzierung zu vegetativen Filamenten mit einem hohen Anteil an Heterocysten. H, Heterocyste; HIF, Hormogonien induzierender Faktor; HRF, Hormogonien reprimierender Faktor; V, vegetative Zelle (verändert nach Rai *et al.*, 2000).

Die Lokalisation des Cyanobakteriums in der Wirtspflanze kann intrazellulär (Gunnera) oder extrazellulär (*Bryophyten*) sein (Rai *et al.*, 2000). Die Symbiosepartner sind jedoch stets im engen Kontakt miteinander, um den Austausch der Nährstoffe und Metabolite zu garantieren.

Ein weiterer wichtiger Punkt für die Aufrechterhaltung einer stabilen Symbiose besteht in der Angleichung der Wachstumsgeschwindigkeit beider Symbiosepartner (Endelin & Meeks, 1983). Wächst der cyanobakterielle Symbiont (Cyanobiont) zu langsam, gefährdet dies eine ausreichende Versorgung mit fixiertem Stickstoff. Ein zu schnelles Wachstum des Cyanobakteriums birgt jedoch die Gefahr der Konkurrenz um Licht und Nährstoffe (Meeks & Elhai, 2002). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Verdopplungszeit in symbiotisch lebenden Cyanobakterien im Gegensatz zu freilebenden Stämmen stark verringert ist (Hill, 1989). Der genaue Mechanismus dieser Wachstumsregulation ist unbekannt. Diskutiert wird eine Kombination aus Verfügbarkeit von Nährstoffen und Energie für das cyanobakterielle Wachstum und einer Wirts-kontrollierten Regulation über die cyanobakterielle Zellteilung. Eine Besonderheit stellt die obligate Symbiose zwischen dem Algenfarn *Azolla filiculoides* Lam. und dem Cyanobakterium *Nostoc azollae* 0708 dar. Im Laufe der Co-Evolution dieser Lebensgemeinschaft hat das Cyanobakterium die Fähigkeit zum freilebenden Wachstum außerhalb der Pflanze verloren (Ekman *et al.*, 2008). In eine neue Pflanzengeneration wird es durch vegetative Fragmentierung der Pflanze oder durch Transfer von der Elterngeneration auf die Nachkommen übertragen. Dabei gelangen die beweglichen Hormogonien in die pflanzlichen Sporangien, differenzieren zu Akineten und verbleiben in diesem überdauerungsfähigen Zellstadium bis zum Auskeimen der Spore (Zheng *et al.*, 2009).

1.6 Die Zellhülle der Cyanobakterien

Die Zellhülle ist die Schnittstelle zwischen der Umwelt und dem Zellinneren. Sie dient einerseits dem Schutz vor chemischen und physischen Beanspruchungen, andererseits muss jedoch auch ein gerichteter Stoff-, Energie- und Informationsaustausch gewährleistet werden. Dies wird durch die Einlagerung von vielfältigen Zellwandproteinen sichergestellt. Bei Cyanobakterien besteht die Zellhülle einerseits aus Peptidoglykan, welches auch als Murein bezeichnet wird. Wie bei den meisten Bakterien besteht es aus einem Rückgrat aus alternierenden Einheiten von N-Acetylglycosamin (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc), die β -1,4 glykosidisch miteinander verknüpft sind. Die einzelnen Disaccharidketten sind durch Peptidbrücken, die mit einem Lactylrest am MurNAc verbunden sind, untereinander vernetzt. Auf diese Peptidoglykanschicht ist bei Cyanobakterien wie bei allen Gram-negativen Bakterien zusätzlich noch eine äußere Membran aufgelagert. Dabei handelt es sich um eine asymmetrische Lipiddoppelschicht, bestehend aus einer inneren Lage Phospholipiden und einer äußeren Lage Lipopolysacchariden. Nach dem klassischen

Modell gehören sie damit zur Gruppe der Gram-negativen Bakterien. Allerdings vernachlässigt diese Klassifizierung einige Besonderheiten bei der Zellwand von Cyanobakterien (Hoiczky & Hansel, 2000). So ist beispielsweise die Peptidoglycanschicht von Cyanobakterien viel dicker als bei den meisten Vertretern Gram-negativer Bakterien. Die Ausmaße reichen von etwa 10 nm bei *Synechococcus*, einem einzelligen Cyanobakterium, bis zu 15 - 35 nm beim filamentösen Cyanobakterium *Phormidium uncinatum*. Bei *Oscillatoria princeps* erreicht die Mureinschicht sogar Größenordnungen bis 700 nm (Woitzik *et al.*, 1988; Hoiczky & Baumeister, 1995). Eine weitere Besonderheit besteht im hohen Vernetzungsgrad der einzelnen Peptidoglycanketten. Bei den bislang gut untersuchten einzelligen Cyanobakterien *Synechocystis* sp. PCC 6714 und *Synechococcus* sp. PCC 6307 liegt der Grad der Querverknüpfung bei etwa 56 % bzw. 57 % (Woitzik *et al.*, 1988; Jürgens *et al.* 1983) und erreicht damit eher Größenordnungen, die bei Gram-positiven Bakterien dokumentiert sind (Vollmer & Seligman, 2010). Beim filamentösen Cyanobakterium *A. cylindrica* wurde zwar L-Lysin als Bestandteil der Zellwand identifiziert (Kodani *et al.*, 1999), bei den meisten bisher untersuchten Cyanobakterien wird die Verknüpfung der Peptidoglycanketten jedoch durch die bei Gram-negativen Bakterien typische meso-Diaminopimelinsäure realisiert (Golecki, 1977; Schneider & Jürgens, 1991; Woitzik *et al.*, 1988; Jürgens *et al.*, 1983). Ein weiteres Detail in der Organisation der Zellwand von Cyanobakterien, das deren Sonderstellung verdeutlicht, sind Polysaccharide die wie bei Gram-positiven Bakterien über Phosphodiester-Bindungen kovalent ans Peptidoglycan gebunden sind (Jürgens & Weckesser, 1986). Des Weiteren beinhalten die Lipopolysaccharide kleine Mengen von gebundenen Phosphaten, wohingegen Ketodesoxyoctonsäure häufig fehlt (Schmidt *et al.*, 1980; Mikheyskaya *et al.*, 1977).

1.7 Zellteilung

Zellwachstum ist ein grundlegendes Merkmal des Lebens. Bei den meisten einzelligen Prokaryoten wächst die einzelne Zelle so lange weiter, bis sie sich in zwei neue Tochterzellen teilt. Grundsätzlich läuft die Zellteilung bei allen Zellen nach demselben Muster ab. Besonders gut ist die Zellteilung jedoch bei *Escherichia coli* untersucht. Zunächst kommt es durch die Replikation zur Verdopplung des genetischen Materials. Nachdem die DNA zu den entgegengesetzten Polen transportiert wurde, erfolgt die Einschnürung des Septums (Buddelmeijer & Beckwith, 2002). Für die korrekte Positionierung der Teilungsebene sind vor allem die Proteine MinC, MinD und MinE verantwortlich (Lutkenhaus, 2007).

Das erste Zellteilungsprotein, das an der zukünftigen Teilungsebene lokalisiert, ist FtsZ (Bi & Lutkenhaus, 1991). Zudem ist FtsZ auch das am stärksten konservierte Protein der Zellteilung. Homologe finden sich in den meisten Bakterien und vielen Archaeen. Sogar in Chloroplasten und einigen Mitochondrien konnte FtsZ bereits nachgewiesen werden (Osteryoung & Vierling, 1995; Osteryoung, 2001). Obwohl es nur geringe Sequenzhomologie zu Tubulin, einem der Hauptbestandteile des eukaryotischen Zytoskeletts, aufweist, ist die strukturelle Übereinstimmung zwischen FtsZ und Tubulin jedoch bemerkenswert (Löwe & Amos, 1998). Wie Tubulin besitzt FtsZ GTPase-Aktivität und polymerisiert GTP-abhängig in lange Filamente (de Boer *et al.*, 1992). *In vivo* lagern sich FtsZ-Polymere zu Beginn der Zellteilung an der Innenseite der Cytoplasmamembran zum sogenannten Z-Ring zusammen. Dieser dient dann als Gerüst, an das sich nacheinander weitere Proteine zum Zellteilungsapparat anlagern und das sogenannte Divisom bilden (Abb. 7).

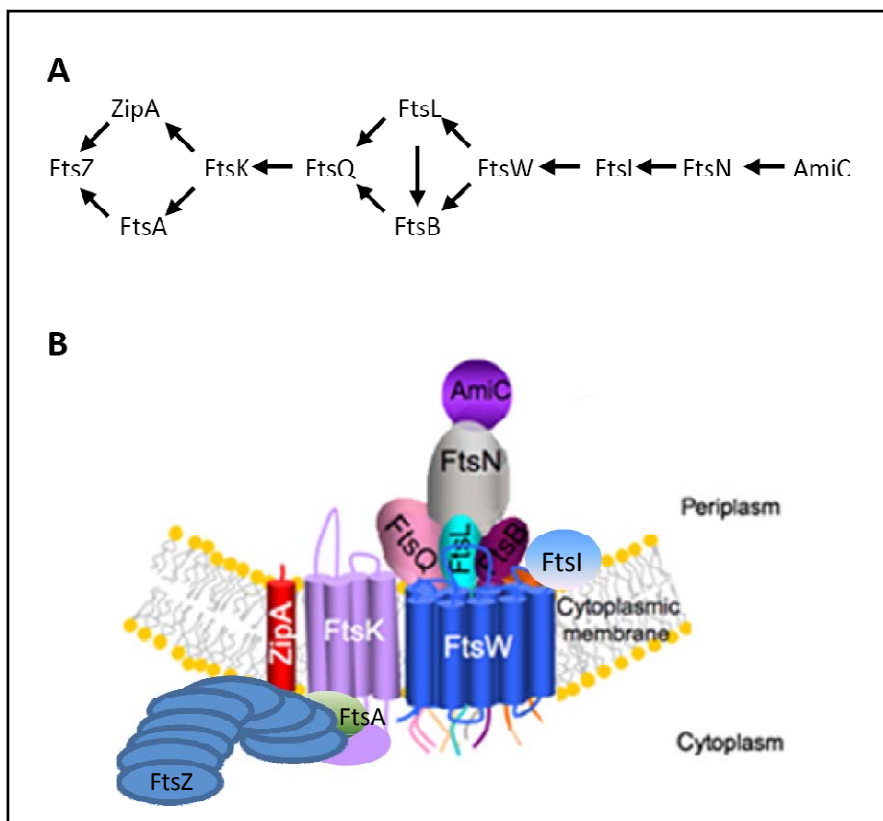


Abb. 7: Rekrutierungskaskade der an der Zellteilung beteiligten Proteine und schematische Darstellung des Divisoms. (A) Während der Zellteilung erscheint zunächst FtsZ an der Teilungsebene. Nacheinander lagern sich weitere Proteine zum Divisom zusammen. Die Pfeilspitzen zeigen jeweils zu den Proteinen die für die Lokalisation des Proteins am Pfeilende benötigt werden (aus Buddelmeijer & Beckwith, 2002). (B) Schematische Zeichnung der bei *E. coli* bekannten Zellteilungsproteine (bearbeitet nach den Blaauwen *et al.*, 2008).

Als erstes binden FtsA und ZipA an den Z-Ring. ZipA ist dabei über einen N-terminalen Anker in der Cytoplasmamembran befestigt (Hale & de Boer, 1997). Durch eine C-terminale amphipatische Helix ist auch FtsA, obwohl cytoplasmatisch, mit der Membran assoziiert (Pichoff & Lutkenhaus, 2005). Man vermutet daher, dass sowohl ZipA als auch FtsA den Z-Ring stabilisieren und ihn an der Membran fixieren. Nachdem ZipA und FtsA an den Z-Ring gebunden haben, werden nacheinander weitere Proteine an den Z-Ring rekrutiert. FtsK ist an der Chromosomensegregation beteiligt (Bigot *et al.*, 2004). FtsQ, FtsL und FtsB bilden zunächst einen eigenen Komplex und begeben sich dann zur Teilungsebene, wo sie durch membrandurchspannende Domänen an der Membran fixiert werden (Buddelmeijer & Beckwith, 2004). Die genaue Funktion des FtsQLB-Komplexes ist zwar noch unklar, für FtsQ wird jedoch eine Rolle bei der Zellwandsynthese diskutiert (Buddelmeijer & Beckwith, 2002). Ein weiteres integrales Membranprotein, das spät zur Teilungsebene rekrutiert wird, ist FtsW. Das Protein ist essentiell für die Bereitstellung der Transpeptidase FtsI, die maßgeblich bei der Zellwandsynthese am Septum beteiligt ist (Mercer & Weiss, 2002). Als eines der letzten Proteine erreicht FtsN das Divisom, es ist bei der Rekrutierung von AmiC beteiligt. Derzeit gilt die Amidase als das letzte Enzym bei der Zellteilung (Weiss, 2004).

In Cyanobakterien ist die Zellteilung weit weniger gut untersucht. Es ist bekannt, dass der Zellzyklus und die Expression von *ftsZ* durch Licht beeinflusst werden (Holtzendorff *et al.*, 2001). Dies deutet darauf hin, dass die Regulation der Zellteilung bei Cyanobakterien besondere molekulare Mechanismen erfordert. Durch vergleichende Genomanalysen konnte gezeigt werden, dass Cyanobakterien homologe Gene zu *ftsZ*, *ftsE*, *ftsI*, *ftsQ*, *ftsW*, *amiC*, *minC*, *minD* sowie *minD* aufweisen. Im Genom von *Anabaena* sp. PCC 7120 wurde zusätzlich *ftsK* gefunden (Miyagishima *et al.*, 2005). Zusätzlich identifizierten Transposonmutagenesen weitere an der Zellteilung beteiligte Gene. Dabei codieren einige Gene für Proteinhomologe, die bei der Zellteilung in Gram-positiven Bakterien beteiligt sind. Beispielsweise zeigt das Gen *cdv3* von *Synechococcus elongatus* PCC 7942 und *Synechocystis* PCC 6803 Homologien zu DivIVA. Dieses Protein reguliert in Gram-positiven Bakterien die Positionierung des MinCD-Komplexes (Miyagishima *et al.*, 2005; Marbouty *et al.*, 2009c). Es konnten aber auch Gene identifiziert werden, die spezifisch für Cyanobakterien zu sein scheinen. Ein Beispiel hierfür ist Ftn6. Das Protein besitzt eine DnaD-ähnliche Domäne, die normalerweise an der DNA Interaktion beteiligt ist (Marbouty *et al.*, 2009a). Ftn6 ist an der Zellteilungsebene lokalisiert und spielt möglicherweise eine Rolle bei der Koordination der Chromosom-Replikation mit der Zellteilung (Marbouty *et al.*, 2009b; Marbouty *et al.*, 2009a).

1.7.1 N-Acetyl-Muramyl-L-Alanin Amidasen

Zellwand-Hydrolasen sind Enzyme, die das Recycling oder den Abbau von Peptidoglycan katalysieren (Höltje, 1995). Zur Gruppe der Zellwand-Hydrolasen gehören die lytischen Transglycosylasen, N-Acetylglucosaminidasen, N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidasen, Carboxypeptidasen und Endopeptidasen (Höltje & Tuomanen, 1991) (Abb. 8).

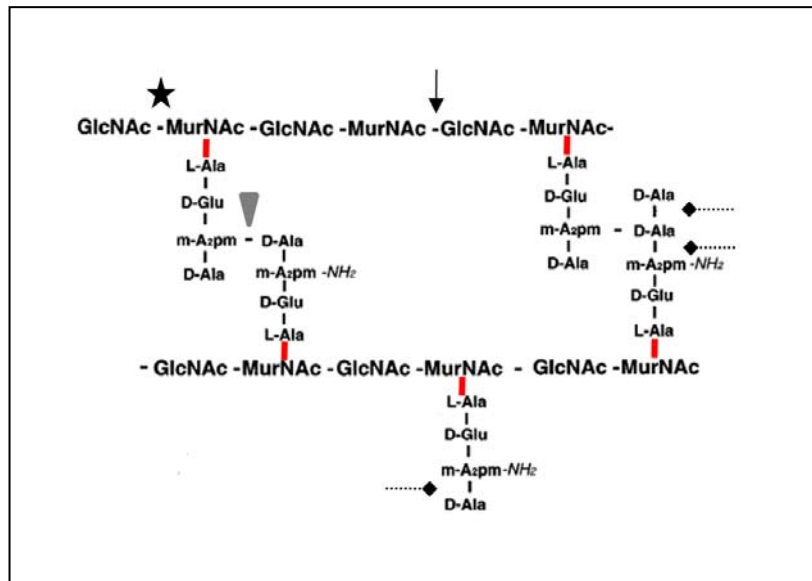


Abb. 8: Übersicht der spezifischen Spaltungsorte der Zellwand-Hydrolasen. ↓ lytischen Transglycosylasen, ★ N-Acetylglucosaminidasen, ▽ Carboxypeptidase, ◻ Endopeptidasen, | N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidasen

Die essentielle Rolle von Peptidoglycan Hydrolasen bei der Zellteilung wurde bereits ausführlich dokumentiert (Fein & Rogers, 1976; Shungu, 1979; Forsberg & Rogers, 1971; Kajimura *et al.*, 2005; Heidrich *et al.*, 2001). In *E. coli* sind vor allem die N-Acetyl-Muramyl-L-Alanin Amidasen AmiA, AmiB und AmiC an der letztendlichen Trennung der Tochterzellen beteiligt (Heidrich *et al.*, 2001). AmiA, AmiB und AmiC zeigen einen ähnlichen Proteinaufbau mit einer Amidase Domäne am C-Terminus. AmiC verfügt im Gegensatz zu AmiA und AmiB N-terminal über eine AMIN (Amidase N-terminal) Domäne, die wahrscheinlich die korrekte Lokalisation am Septum vermittelt (de Souza *et al.*, 2008; Bernhardt & de Boer, 2003). Von AmiA und AmiC konnte gezeigt werden, dass sie durch das Tat-Translokationssystem ins Periplasma transportiert werden (Bernhardt & de Boer, 2003). Während AmiA im gesamten periplasmatischen Raum erscheint, akkumuliert AmiC an der Teilungsebene in sich teilenden Zellen. Die Deletion von *amiA* bzw. *amiC* bewirkt eine partielle Filamentbildung bei den jeweiligen Mutanten. Bei Doppelmutanten verstärkt sich dieser Defekt in der Trennung der Einzelzellen. Bei einer Mutante mit Defekten in allen 3 Genen bilden 90 - 100 % der Zellen

Filamente von 6 - 24 Zellen pro Filament (Heidrich *et al.*, 2001). Dies verdeutlicht den hohen Grad der funktionalen Redundanz der Amidasen.

Die Fähigkeit zur Spaltung kovalenter Bindungen innerhalb des Murein Sacculus macht Amidasen zu potentiell autolytischen Enzymen (Heidrich *et al.*, 2001). Zur Vermeidung der Zelllyse ist es daher für das Bakterium essentiell, die Aktivität der Amidasen genauestens zu kontrollieren. Trotzdem ist erstaunlich wenig über die Regulation der Amidasen bekannt. Für die Rekrutierung von AmiC zum Z-Ring wird FtsN benötigt, dadurch wird die Begrenzung der lytischen Aktivität auf die Zellteilungsebene gewährleistet (Bernhardt & de Boer, 2003). Vor kurzem wurden mit EnvC und NlpD zwei weitere Faktoren für die Regulation der Amidasen bei *E. coli* identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass beide Proteine an der Zellteilungsebene lokalisiert sind (Uehara *et al.*, 2009) und als Divisom-assoziierte Aktivatoren von AmiA, AmiB bzw. AmiC fungieren (Uehara *et al.*, 2010).

Auch in Cyanobakterien wurden Gene identifiziert, die für Zellwand-Amidasen codieren. In *Synechocystis* PCC 6803 hatte die Inaktivierung dreier unterschiedlicher *amiC*-Homologe keine Auswirkungen auf die Zellmorphologie (Marbouty *et al.*, 2009c). Dies deutet auch hier auf eine überlappende Funktion der Zellwand-Amidasen hin. Im filamentösen Cyanobakterium *Anabaena* sp. PCC 7120 wurde gezeigt, dass eine Transposon-Insertion in das *amiC*-Homolog *hcwA* (*alr0093*) bei Mangel an gebundenen Stickstoffverbindungen eine verringerte *hepA* Expression und die Unfähigkeit zur Ausbildung reifer Heterocysten verursacht (Zhu *et al.* 2001). Im nah verwandten Cyanobakterium *N. punctiforme* hatte die Inaktivierung von *amiC2* ebenfalls den Verlust des gesamten Differenzierungspotentials zur Folge. Es wird vermutet, dass AmiC2 hier bei der Ausbildung von Strukturen für eine funktionale Zell-Zell-Kommunikation eine entscheidende Rolle spielt. Zusätzlich kam es bei der *amiC2*-Mutante von *N. punctiforme* zur Filamentdystrophie und zu verschobenen Teilungsebenen (Lehner *et al.*, 2011).

1.8 *Anabaena* sp. PCC 7120

Wie die meisten Cyanobakterien ist *Anabaena* sp. PCC 7120 obligat photo-autotroph, so dass Licht die einzig nutzbare Quelle für den Energiestoffwechsel darstellt. Als akzessorische Pigmente dienen Phycoerythrocyanin (PEC), Phycocyanin (PC) und Allophycocyanin (APC) (Ducret *et al.*, 1996). CO₂ dient als Kohlenstoffquelle und wird über den Calvin-Zyklus fixiert. In Anwesenheit von reduzierten Stickstoffverbindungen wie Nitrat (NO₃⁻) oder Ammonium (NH₄⁺) wächst *Anabaena* sp. PCC 7120 mit einer Verdopplungszeit von etwa 19 h bzw. 21 h in

langen Filamenten aus bis zu 100 identischen ovalen, vegetativen Einzelzellen (Meeks *et al.*, 1983). Sind keine gebundenen Stickstoffquellen vorhanden, werden innerhalb von etwa 24 h Heterocysten ausgebildet. Bei *Anabaena* können sie 5 - 10 % des gesamten Filamentes ausmachen und endständig oder interkalar innerhalb des Filaments angeordnet sein (Wolk *et al.*, 1994).

Das Genom von *Anabaena* sp. PCC 7120 codiert für etwa 6000 offene Leseraster und ist auf einem Chromosom (6.413.771 bp) und 6 Plasmiden (5.584 - 408.101 bp) verteilt.

1.9 *Nostoc punctiforme* ATCC 29133

Das nichtverzweigte, filamentöse Cyanobakterium *Nostoc punctiforme* wird überwiegend in terrestrischen Habitaten vorgefunden. Mit einer genetischen Ausstattung von nahezu 10 Mb verfügt es über eines der größten bekannten bakteriellen Genome (Meeks, *et al.*, 2001). Die Erbinformation verteilt sich dabei auf ein großes zirkuläres Chromosom und fünf Plasmide und codiert insgesamt für etwa 8000 offene Leseraster. Dieses umfangreiche genetische Potential spiegelt gleichzeitig die vielfältigen Differenzierungsmöglichkeiten und die verschiedenen alternativen Stoffwechsellmöglichkeiten wieder, zu denen *N. punctiforme* befähigt ist (Anderson *et al.*, 2006; Meeks *et al.*, 2002). Wie alle Cyanobakterien deckt *N. punctiforme* seinen Energie- und Kohlenstoffhaushalt in belichteten Habitaten zunächst über eine photo-autotrophe Lebensweise. Im Dunkeln kann *N. punctiforme* aber auch heterotroph auf Saccharose, Glukose oder Fruktose wachsen, wobei hauptsächlich der oxidative Pentose-Phosphat Weg zu deren Verstoffwechslung beiträgt (Summers *et al.*, 1995). Als Stickstoffquelle wird NH_4^+ bevorzugt, da es direkt über den GS-GOGAT Zyklus assimiliert werden kann. Ist NH_4^+ nicht vorhanden kann NO_3^- als N-Quelle genutzt werden. Als dritte Alternative kann auch molekularer Stickstoff (N_2) fixiert werden. Dazu werden 5 – 10 % der vegetativen Zellen für die Stickstofffixierung zu Heterocysten umgebildet. Darüber hinaus besitzt *N. punctiforme* weiteres Differenzierungspotential (Abb. 2). Bei Energie- oder Nährstofflimitation, z.B durch Phosphatmangel, werden Akineten ausgebildet. Als Antwort auf verschiedene Stresssignale kann *N. punctiforme* das gesamte vegetative Trichom zu kürzeren beweglichen Hormogonien umbilden. Neben der Fähigkeit des gezielten Ortswechsels spielen Hormogonien für die Ausbildung symbiotischer Beziehungen mit verschiedenen Pflanzen eine essentielle Rolle.

1.9 Ziel der Arbeit

Zellwand-Amidasen hydrolysieren die Peptidbindung zwischen MurNAC und dem N-terminalen L-Alanin. In einzelligen Bakterien haben Zellwand-Amidasen eine essentielle Funktion bei der Abtrennung der entstehenden Tochterzellen am Ende der Zellteilung. Die Zellwand-Amidase AmiC gilt gegenwärtig als das letzte an der Zellteilung beteiligte Protein. Homologe von *amiC* sind auch in filamentbildenden Cyanobakterien vorhanden. Da die Trennung in Tochterzellen bei filamentösen Cyanobakterien unterbleibt, ist hier die Aufgabe dieser Enzyme noch unbekannt. Im filamentösen Cyanobakterium *N. punctiforme* kommt es durch die Inaktivierung von *amiC2* zum Verlust des gesamten Differenzierungspotentials. Darüber hinaus bewirkt die Mutation dort Filamentdystrophie und verschobene Teilungsebenen (Lehner *et al.*, 2010). Es wird vermutet, dass AmiC2 hier bei der Ausbildung von Strukturen für eine funktionale Zell-Zell-Kommunikation beteiligt ist (Lehner *et al.*, 2010). Die genaue Funktion die AmiC2 für den Informationsaustausch von Zelle zu Zelle übernimmt, ist jedoch noch ungeklärt. Im nah verwandten Cyanobakterium *Anabaena* sp. PCC 7120 führte die Transposon-Insertion in das *amiC2*-Homolog *hcwA* (*alr0093*) zwar ebenfalls zum Verlust der Heterocystendifferenzierung, sie hatte aber keine Auswirkungen auf die Filament-Morphologie.

Ziel dieser Arbeit war die genauere Untersuchung der Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Wirkungsweise von Amidasen in filamentösen Cyanobakterien. Für ein breiteres Verständnis der Funktion der Amidasen in filamentösen Cyanobakterien sollten daher zunächst die *amiC*-Homologe *alr0092* und *alr0093* in *Anabaena* sp. PCC 7120 inaktiviert und die entstandenen Mutanten phänotypisch charakterisiert werden. Zusätzlich sollte die subzelluläre Lokalisation von AmiC1 und AmiC2 in *Anabaena* sp. 7120 und von AmiC2 in *N. punctiforme* analysiert und miteinander verglichen werden. In *Anabaena* sp. PCC 7120 wurde SepJ als möglicher Kandidat für die Ausbildung von Strukturen für die Zell-Zell-Kommunikation identifiziert (Flores *et al.*, 2007; Mullineaux *et al.*, 2008). Aufgrund des größeren Differenzierungspotentials sollte die subzelluläre Lokalisation von SepJ in verschiedenen Differenzierungsstadien von *N. punctiforme* verfolgt werden.

Um eine Unterscheidung der untersuchten Proteine von *N. punctiforme* und *Anabaena* sp. PCC 7120 zu erleichtern, werden die Zellwand-Amidasen von *Anabaena* sp. PCC 7120 im Folgenden als AmiC1_{Ana} bzw. AmiC2_{Ana} bezeichnet. SepJ von *N. punctiforme* wird als SepJ_N gekennzeichnet.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Symbiose zwischen *N. punctiforme* und dem Hornmoos *Anthoceros punctatus*. Die Zellwand von *N. punctiforme* spielt dabei für das Zustandekommen der symbiotischen Beziehung mutmaßlich eine wichtige Rolle. Unter anderem vermittelt sie die Weiterleitung von extrazellulären Signalen und nimmt eine essentielle Rolle bei der Wirtserkennung ein. Ziel des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit war die nähere Charakterisierung von Genen die in Hormogonien aktiviert werden und die für Zellwandproteine codieren. Dazu sollten Insertionsmutanten angefertigt und phänotypisch charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Sämtliche Chemikalien, Detergenzien, Lösungsmittel und Antibiotika wurden von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München), Serva (Heidelberg), Fluka (Neu Ulm) und Voigt Global Distribution Inc. (Lawrence, USA) bezogen.

Enzyme und DNA-Standards stammten von MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Promega (Mannheim), Sigma-Aldrich (München), NEB Biolabs (Ipswich, England), Genaxxon (Ulm) und Finnzymes (Vantaa, Finnland). Kits für Plasmid Präparationen und RNA Aufreinigungen wurden von den Firmen Roche (Mannheim), Macherey & Nagel (Düren, Deutschland) oder Peqlab (Erlangen) bezogen. Für die Konjugation wurden Nitrocellulose-Membranen von der Firma Millipore (HATF 08250) verwendet.

2.2 Bakterienstämme

2.2.1 Cyanobakterien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Cyanobakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Verwendete Stämme von *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 und *Anabaena* sp. PCC 7120

Stamm	Relevanter Genotyp; Resistenz	Herkunft/Referenz
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	WT	Pasteur Culture Collection
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 (pIM471)	$P_{amiC1,2}$ - <i>tat</i> - <i>alr0092</i> - <i>gfp</i> ; Sm/Sp	diese Arbeit
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 (pIM472)	$P_{amiC1,2}$ - <i>tat</i> - <i>alr0093</i> - <i>gfp</i> ; Sm/Sp	diese Arbeit
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 SR477	<i>alr0092</i> ::pIM477; Sm/Sp	diese Arbeit
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 SR478	<i>alr0093</i> ::pIM478; Sm/Sp	diese Arbeit
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 SR484	P_{petE} + <i>alr0092</i> ; Sm/Sp	diese Arbeit
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 SR485	P_{petE} + <i>alr0093</i> ; Sm/Sp	diese Arbeit
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 (pIM496)	<i>tat</i> - <i>amiC1</i> _{Ana} (<i>alr0092</i>)- <i>gfp</i> in pRL1049+C.K3; Sm/Sp, Km	diese Arbeit
<i>Nostoc punctiforme</i> ATCC 29133 (PCC 73102)	WT	American Type Culture Collection
<i>N. punctiforme</i> DR288a	NpF0220::C.K3 (for); Nm	diese Arbeit
<i>N. punctiforme</i> DR288b	NpF0220::C.K3 (rev); Nm	diese Arbeit
<i>N. punctiforme</i> DR293a	NpF0152::C.K3 (for); Nm	diese Arbeit

<i>N. punctiforme</i> DR293b	NpF0152::C.K3 (rev); Nm	diese Arbeit
<i>N. punctiforme</i> DR306a	NpF4679::C.K3 (for); Nm	diese Arbeit
<i>N. punctiforme</i> DR306b	NpF4679::C.K3 (rev); Nm	diese Arbeit
<i>N. punctiforme</i> (pIM469)	NpF1846- <i>gfp</i> ; Amp	diese Arbeit
<i>N. punctiforme</i> (pIM474)	NpR1723- <i>gfp</i> ; Amp	diese Arbeit

2.2.2 *Escherichia coli*

Die für Klonierungen und Konjugationen genutzten *E. coli* Stämme sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tab. 2 : Verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Relevanter Genotyp	Herkunft/Referenz
DH5 α	F ⁻ , ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>), U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>gal- phoA</i> , <i>supE44</i> λ - <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1985
DH10B	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara, leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galk</i> , λ - <i>rpsL</i> , <i>nupG</i>	Hanahan <i>et al.</i> , 1991
HB101	F ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>hsdS20</i> (rB ⁻ , mB ⁻), <i>supE44</i> , <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galk2</i> , <i>rpsL20</i> (strr), <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i>	Sambrock <i>et al.</i> , 1988
J53 (RP-4)	R ⁺ , <i>met</i> , <i>pro</i> (RP-4: <i>Ap, Tc, Km, Tra+</i> , <i>IncP</i>)	Wolk <i>et al.</i> , 1984

2.3 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 3 beschrieben.

Tab. 3: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung; Resistenz	Referenz
pCSEL19	pGEM-T Vektor mit integriertem <i>gfp</i> ; Amp	Muro-Pastor <i>et al.</i> , 2006
pCSEL24	mobilisierbares Plasmid, integriert in die <i>nucA-nuiA</i> Region des α -Megaplasmids von <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	Olmedo-Verd <i>et al.</i> , 2006
pGEM-T	AT-Klonierungs- und Expressionsvektor	Promega
pIM279	1334 bp großes, internes Fragment von NpF0220 in pJET; Amp	diese Arbeit
pIM280	652 bp großes, internes Fragment von NpF0152 in pJET; Amp	diese Arbeit
pIM284	pIM279 mit C.K3 Kasette in <i>PsiI</i> -Schnittstelle in Leserichtung von NpF0220; Amp, Km	diese Arbeit
pIM285	pIM279 mit C.K3 Kasette in <i>PsiI</i> -Schnittstelle	diese Arbeit

Material und Methoden

	gegen die Leserichtung von NpF0220; Amp, Km	
pIM288a	<i>Xho</i> I-Fragment von pIM284 in pRL271; Cm, Km	diese Arbeit
pIM288b	<i>Xho</i> I-Fragment von pIM285 in pRL271; Cm, Km	diese Arbeit
pIM292	pIM280 mit C.K3 Kasette in <i>A</i> /el-Schnittstelle in Leserichtung von NpF0152; Amp, Km	diese Arbeit
pIM293a	<i>Xho</i> I-Fragment von pIM292 in pRL271; Cm, Km	diese Arbeit
pIM293b	<i>Xho</i> I-Fragment von pIM299 in pRL271; Cm, Km	diese Arbeit
pIM299	pIM280 mit C.K3 Kasette in <i>A</i> /el-Schnittstelle gegen die Leserichtung von NpF0152; Amp, Km	diese Arbeit
pIM303	1150 bp großes, internes Fragment von NpF4679 in pGEM-T; Amp	diese Arbeit
pIM304	pIM303 mit C.K3 Kasette in <i>Hind</i> III-Schnittstelle in von NpF4679; Amp, Km	diese Arbeit
pIM305	pIM303 mit C.K3 Kasette in <i>Hind</i> III-Schnittstelle gegen die Genleserichtung von NpF4679; Amp, Km	diese Arbeit
pIM306a	<i>Xho</i> I-Fragment von pIM304 in pRL271; Cm, Km	diese Arbeit
pIM306b	<i>Xho</i> I-Fragment von pIM305 in pRL271; Cm, Km	diese Arbeit
pIM364	NpR1723 in pJET; Amp	diese Arbeit
pIM365	NpF1846 in pJET; Amp	diese Arbeit
pIM366	NpF1846 in pCSEL19; Amp	diese Arbeit
pIM367	NpF1846 in pSCR202; Amp	diese Arbeit
pIM369	$P_{amiC1,2}$ -NpF1846 in pCSCR202; Amp	diese Arbeit
pIM375	NpR1723 in pCSEL19; Amp	diese Arbeit
pIM417	NpR1723 in pSCR202; Amp	diese Arbeit
pIM451	<i>tat-amiC1_{Ana}</i> (<i>alr0092</i>)-Fusionsprodukt in pGEM-T; Amp	diese Arbeit
pIM452	<i>tat-amiC1_{Ana}</i> (<i>alr0092</i>)- <i>gfp</i> in pGEM-T; Amp	diese Arbeit
pIM453	<i>tat-amiC1_{Ana}</i> (<i>alr0092</i>)- <i>gfp</i> in pRL1049; Sm/Sp	diese Arbeit
pIM454	<i>tat-amiC2_{Ana}</i> (<i>alr0093</i>)- <i>gfp</i> in pJET; Amp	diese Arbeit
pIM455	<i>tat-amiC2_{Ana}</i> (<i>alr0093</i>)- <i>gfp</i> in pRL1049; Sm/Sp	diese Arbeit
pIM471	$P_{amiC1,2}$ - <i>tat-amiC1_{Ana}</i> (<i>alr0092</i>) in pRL1049; Sm/Sp	diese Arbeit
pIM472	$P_{amiC1,2}$ - <i>tat-amiC2_{Ana}</i> (<i>alr0093</i>) in pRL1049; Sm/Sp	diese Arbeit
pIM474	P_{sepJ} -NpR1723 in pSCR202; Amp	diese Arbeit
pIM475	576 bp großes, internes Fragment von <i>alr0092</i> in pJET; Amp	diese Arbeit
pIM476	461 bp großes, internes Fragment von <i>alr0093</i> in pJET; Amp	diese Arbeit
pIM477	<i>Xho</i> I-Fragment von pIM475 in pRL277; Sm/Sp	diese Arbeit
pIM478	<i>Xho</i> I-Fragment von pIM476 in pRL277; Sm/Sp	diese Arbeit
pIM480	<i>alr0092</i> in pJET; Amp	diese Arbeit
pIM481	<i>alr0093</i> in pJET; Amp	diese Arbeit
pIM482	P_{petE} + <i>alr0092</i> in pJET; Amp	diese Arbeit
pIM483	P_{petE} + <i>alr0093</i> in pJET; Amp	diese Arbeit
pIM484	P_{petE} + <i>alr0092</i> in pCSEL24; Sm/ Sp	diese Arbeit

pIM485	$P_{petE}+alr0093$ in pCSEL24; Sm/ Sp	diese Arbeit
pIM496	$P_{amiC1,2} -tat-amiC1_{Ana}(alr0092)-gfp$ in pRL1049+C.K3; Sm/Sp, Km	diese Arbeit
pJET	Klonierungsvektor; Amp	Fermentas
pRK2013	RK2 Derivat mit ColE1 <i>oriV</i> ; Km	Figurski & Helinski, 1979
pRL271	Integrationsvektor mit <i>sacB</i> -Gen; Cm, Em	Black <i>et al.</i> , 1993
pRL277	Integrationsvektor mit <i>sacB</i> -Gen; Sm/Sp	Black <i>et al.</i> , 1993
pRL442	C.K3-Kassette tragender Vektor	Elhai & Wolk 1988
pRL528	Helferplasmid für die Konjugation von Cyanobakterien; Cm, Em	Elhai & Wolk 1988
pRL1049	Selbstreplizierendes Plasmid für <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	Black & Wolk, 1994
pSCR202	Selbstreplizierendes Plasmid für Klonierung in <i>N. punctiforme</i> ; Amp	Summers <i>et al.</i> , 1995

2.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion international AG (Martinsried) synthetisiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle 4 zusammengefasst.

Tab. 4 : Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5` - 3`)	Schnittstelle
Klonierungsprimer		
Oligo1	GGCTGTTTGGGTAATCCC GCGAACTTGAATATTGGCGTTTT G	
Oligo2	CCCGGGACGCTGTAAGTATTTTAGGATG	<i>SmaI</i>
Oligo3	CCCGGGCCTTCAAAGGAGATATTATGACAG	<i>SmaI</i>
Oligo4	CATCAAACGCCAATATTCAAGTTTCGCGGGATTACCCAAAC AGCCTTAAGGAA	
Oligo5	GCATGCGGCGTAACTTTGAATTTCCACAG	<i>SphI</i>
Oligo6	GCATGCTCTAGATAGCTCGCCTCTG	<i>SphI</i>
Oligo455	TCTAGAGACTGAGTTGCCAAACGTTT	<i>XbaI</i>
Oligo464	CTCGAGACTGACTTGACGCGAACTAC	<i>XhoI</i>
Oligo465	CTCGAGGAAGCCGTTATTGAGCAG AC	<i>XhoI</i>
Oligo466	CTCGAGCAGTTAGCCCAAACGCAATC	<i>XhoI</i>
Oligo512	CTCGAGTCAAGACGGGTCTGGTTATG	<i>XhoI</i>
Oligo513	CTCGAGAGTGGCACTGGAAAGGTTAG	<i>XhoI</i>
Oligo518	CTCGAGGCGGTAAAGTCCAGAGGTTT	<i>XhoI</i>
Oligo625	CCCGGGTATCGTCAAGGTGTTAGAGG	<i>SmaI</i>
Oligo626	CCCGGGATTCGTGTTACTGGAGGGTTT	<i>SmaI</i>

Material und Methoden

Oligo698	GAATTC CCCCAGAGTTAATATGCCAAAG	<i>EcoRI</i>
Oligo699	GGCGACGATAGTAATAAGACAGTTCCAACCTTTGGCAATAGT GGCATGAGTCAG	
Oligo700	CTCATGCCACTATTGCCAAAGTTGGAAGTGTCTTATTACTATC GTCG	
Oligo703	GATGGTTCCAACCGTACCGGATAGTTTGGCAATAGTGGCAT GAGTC	
Oligo704	CACTGACTCATGCCACTATTGCCAACTATCCGGTACGGTTG GAAC	
Oligo706	GGATCCCAGGTCTGGACATTTATTTGTATAG	<i>BamHI</i>
Oligo727	CCCGGGTCGTTTGAGGTACTGAAGAATACCG	<i>SmaI</i>
Oligo730	CAATATTTAAAGAGACAGCCCGGGGATATCCATATGAGTAA AGGAGAAG	
Oligo731	CTTCTCCTTACTCATATGGATATCCCCGGGCTGTCTCTTTAA ATATTG	
Oligo767	GAATTCGCTGAGGTACTGAGTACAC	<i>EcoRI</i>
Oligo768	AGATCTGTTCTCCTAACCTGTAGTTTTATTTTC	<i>BglII</i>
Oligo800	CTCGAGCAGTGGTGGCAATCCTCAAG	<i>XhoI</i>
Oligo801	CTCGAGGGCTGGACGAGAACAACACTAC	<i>XhoI</i>
Oligo802	CTCGAGTTACGAGTTACAGGCGATG	<i>XhoI</i>
Oligo807	GAATTCAGAGTGCTGTAGGCAGATG	<i>EcoRI</i>
Oligo808	GAATCCAATCCATTCTCTGATTTGC	<i>EcoRI</i>
Oligo809	GCATGCGGCGTAACTTTGAATTTCCACAG	<i>SphI</i>
Oligo810	GCATGCTCTAGATAGCTCGCCTCTG	<i>SphI</i>
Oligo815	AGATCTGTGAAATTACACTGGTTACTATCTGG	<i>BglII</i>
Oligo816	CTGCAGCTATCGTTTGAGGTACTGAAG	<i>PstI</i>
Oligo817	AGATCTGTGAAATTACACTGGTTACTATCCG	<i>BglII</i>
Oligo818	CTGCAGTTACTGTCTCTTTAAATATTGCAGGATACC	<i>PstI</i>
Primer für RT-PCR		
Oligo846 (<i>amiC1</i> -for)	CCCAGGAGCCATTGGTATTG	
Oligo847 (<i>amiC1</i> -rev)	GCGTTAGCGTGGATACTGAC	
Oligo848 (<i>amiC2</i> -for)	TAAAGATTCTGGCGCTCCTG	
Oligo849 (<i>amiC2</i> -rev)	AGACGTAGAACCGAGCTTTG	
Oligo850 (<i>hepA</i> -for)	ACATGATTTTGGCTGCTGATGC	
Oligo851 (<i>hepA</i> -rev)	GCTAAAACAACCTTTGATAGCTGC	
Oligo857 (<i>ntcA</i> -for)	CAGGAAACAAGTCGGATAGG	
Oligo858	AACAGTAACGCGAGTAGAGC	

(<i>ntcA</i> -rev)		
Oligo696 (<i>hetR</i> -for)	CCGGATGACCGGACATTTGC	
Oligo697 (<i>hetR</i> -rev)	CTGAGCGTCGGGAAGATTGC	
Oligo130 (<i>rnpB</i> -for)	GGGGAGGAAAGTCCGGGCTCC	
Oligo129 (<i>rnpB</i> -rev)	TAAGCCGGGTTCTGTTCTCTG	

2.5 Wachstumsmedien

2.5.1 Kulturmedien zur Anzucht von Cyanobakterien

Cyanobakterien wurden im BG11-Medium nach Rippka *et al.*, (1979) oder im Allen und Arnon (A+A)-Medium (Allen & Arnon, 1955) kultiviert. A+A Flüssigmedien wurden in vierfacher Verdünnung verwendet (A+A/4). Für A+A oder BG11 Festmedien wurde 1,5 % Bacto-Agar zugefügt. Gebundener Stickstoff wurde in Form von 17,2 mM NaNO₃ (BG11), 5 mM KNO₃ oder 2,5 mM NH₄Cl, 5,0 mM MOPS (pH 7,4) (A+A) beigefügt.

BG11-Medium:

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

A+A-Medium:

A+A-Grundmedium: (Endkonzentration)	MgSO ₄ x 7H ₂ O	1	mM
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,5	mM
	NaCl	4	mM
	K ₂ HPO ₄	2	mM
Spurenelementlösung:	MnCl ₂ x 4H ₂ O	9,24	µM

Material und Methoden

(Endkonzentration)	MoO ₃	1,25	μM
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,77	μM
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,32	μM
	H ₃ BO ₃	46	μM
	KOH	39	μM
	Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	23	μM
	FeSO ₄ x 7H ₂ O	21	μM
	NH ₄ VO ₃	0,20	μM
	CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,17	μM

Zur Aufrechterhaltung der Mutationen wurden je nach Bakterienstamm folgende Antibiotikakonzentrationen zugesetzt:

	<i>N. punctiforme</i>	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120
Ampicillin:	10 μg/ml	
Neomycin:	25 μg/ml	50 μg/ml
Spectinomycin:		5 μg/ml
Streptomycin:		5 μg/ml

2.5.2 Kulturmedien zur Anzucht von *E. coli*

Luria-Bertani (LB) Medium für die Anzucht von *E. coli* setzte sich aus 1 % Pepton, 0,5 % Hefeextrakt und 0,5 % NaCl zusammen (Sambrock *et al.*, 1989). LB-Platten wurden zusätzlich 1,5 % Agar zugefügt. Zur Plasmidselektion wurden dem Nährmedium Antibiotika folgender Konzentration zugefügt.

Ampicillin:	100 μg/ml
Chloramphenicol:	25 μg/ml
Kanamycin:	50 μg/ml
Spectinomycin:	100 μg/ml
Streptomycin:	25 μg/ml

2.5.3 Kulturmedien zur Anzucht von *Anthoceros punctatus*

Das Hornmoos *A. punctatus* wurde in Hutner's Medium (Enderlin & Meeks, 1983) angezogen. Für ein Symbiont-freies Wachstum wurde dem Medium 2,5 mM NH₄NO₃, 0,5 % Glukose sowie 5 mM MES, pH 6,4 zugefügt. Stammkulturen von *A. punctatus* wurden mit 5 mM MES, pH 6,4 inkubiert.

Grundmedium :	MgSO ₄ x H ₂ O	0,83	mM
(Endkonzentration)	CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,90	mM
	K ₂ HPO ₄	0,73	mM
Spurenelementlösung:	KOH	0,53	mM
(Endkonzentration)	H ₃ BO ₃	0,16	mM
	EDTA	0,17	mM
	MnCl ₂ x 4H ₂ O	25,7	µM
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O	0,81	µM
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	79,1	µM
	CoCl ₂ x 6H ₂ O	6,30	µM
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	44,8	µM
	FeSO ₄ x 7H ₂ O	20,0	µM
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	6,0	µM

2.6 Anzucht und Lagerung

2.6.1 Stammhaltung

Für eine dauerhafte Stammerhaltung der Cyanobakterien wurden Kryopräparate angefertigt. Dafür wurde 1 ml einer dicht gewachsenen Cyanobakterien-Kultur mit einer Endkonzentration von 5 % sterilem DMSO versetzt und bei -80 °C gelagert.

Zur Herstellung von *E. coli* Dauerkulturen wurden 500 µl einer Übernacht (ÜN)-Kultur mit einer Endkonzentration von 20 % Glycerin gemischt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.6.2 Kultivierungsbedingungen

2.6.2.1 Kultivierungsbedingungen für Cyanobakterien

Die Anzucht der Cyanobakterien erfolgte in Erlenmeyerkolben ohne Schikane bei 27 °C unter konstanter Beleuchtung von 20 – 40 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ (Lumilux de Lux, Daylight, Osram). Für eine optimale Belüftung wurden die Kulturen auf dem Schüttler bei 130 – 140 rpm angezogen.

2.6.2.1.1 Induktion von Akineten

Für die Induktion von Akineten wurde eine vegetative Kultur von *N. punctiforme* in Phosphat-freies Medium überführt und für zwei Wochen ohne Schütteln bei RT und geringer Beleuchtung inkubiert.

2.6.2.1.2 Heterocysteninduktion

Für die Induktion von Heterocysten wurden Kulturen verwendet, die zuvor in NH₄Cl-haltigem Medium mit 2 % CO₂-Begasung gewachsen waren. Der Entzug der gebundenen Stickstoffquelle erfolgte durch dreimaliges Waschen der Zellen mit stickstofffreiem Medium. Anschließend wurden die Zellen im Ausgangsvolumen aufgenommen und unter 2 % CO₂-Begasung kultiviert.

2.6.2.1.3 Hormogonieninduktion

Für die Induktion der Hormogonien durch die von *A. punctatus* produzierten Exsudate musste der HIF zunächst im Medium angereichert werden. Dazu wurde das Hornmoos *Anthoceros punctatus* zunächst für eine Woche in stickstofffreiem A+A-Medium inkubiert. Die Induktion erfolgte durch Überführen einer *Nostoc*-Kultur mit einer Konzentration von etwa 2 - 3 µg Chlorophyll *a*/ml in das mit HIF angereicherte und vom Moos befreite Medium.

Bezüglich der Induktion der Hormogonienindifferenzierung durch NSI (*Nitrogen stress induction*) wurden die Zellen dreimal mit A+A Medium gewaschen und anschließend im Ausgangsvolumen aufgenommen.

Die Induktion der Hormogonienindifferenzierung durch Verdünnung erfolgte durch Animpfen einer stationären Kultur in frisches, stickstofffreies Medium in einem Verhältnis von 1:50.

In Hinblick auf eine Hormogonieninduktion durch Rotlicht wurden die Kulturen bei Rotlicht (≥ 600 nm) inkubiert.

2.6.2.1.4 Etablieren der Symbiose

Für die Etablierung der Symbiose wurde jeweils 3 g Moos in Hutner's-Medium ohne gebundene Stickstoffquelle überführt und mit *N. punctiforme* (60 µg Chlorophyll *a*/ml) für 2 Wochen bei 22 °C, 80 rpm und hell-dunkel Rhythmus von 12 h co-inkubiert.

Zur Bestimmung der Infektionsfrequenz wurden die im Moosgewebe sichtbaren *Nostoc*-Kolonien ausgezählt.

2.6.2.1.5 Induktion der Überexpression von *amiC1* und *amiC2*

Die Überexpression von *amiC1_{Ana}* bzw. *amiC2_{Ana}* erfolgte durch Zugabe von 1 – 2 μM CuSO_4 (Hu *et al.*, 2007). Dazu wurden die Zellen auf eine OD_{750} von 0,1 angeimpft und auf BG11-Agar-Platten mit verschiedenen CuSO_4 -Konzentrationen getropft. Der Effekt der Überexpression auf das Wachstum wurde nach Zugabe von 2 μM CuSO_4 zu Kulturen mit einer OD_{750} von 0,2 photometrisch bestimmt.

2.6.2.2 Anzuchtbedingungen für *E. coli*

Die verwendeten *E. coli* Zellen wurden in LB-Medium bei 37 °C schüttelnd kultiviert. Die Anzucht erfolgte in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben mit Schikane.

2.6.2.3 Kultivierungsbedingungen für *A. punctatus*

Das Hornmoos *A. punctatus* wurde in Erlenmeyerkolben ohne Schikane bei 22 °C und einem hell-dunkel Rhythmus von 12 h kultiviert. Für eine optimale Belüftung wurden die Kulturen auf dem Schüttler bei 80 rpm angezogen.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Isolierung von genomischer DNA aus Cyanobakterien

Für die Isolierung der genomischen DNA wurden 50 ml einer gut bewachsenen Kultur durch Zentrifugation (4000 rpm, 5 min, RT) geerntet und mit TE-Puffer (10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) gewaschen. Das Zellpellet wurde in 400 μl TE-Puffer aufgenommen und zusammen mit etwa 150 μl Gasperlen (0,10 - 0,11 mm Durchmesser) in ein Eppendorfgefäß mit Schraubverschluss überführt. Dieser Ansatz wurde mit 20 μl 10 % SDS und 450 μl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und in der FastPrep-24 (MP Biomedicals, Heidelberg) homogenisiert. Nicht aufgeschlossene Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 13.000 rpm, 5 min, 4 °C entfernt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und nochmals mit 450 μl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol vermischt und zentrifugiert (13.000 rpm, 10 min, 4°C). Die DNA im Überstand wurde in ein weiteres Eppendorfgefäß pipettiert und zweimal durch Zugabe von je 400 μl Chloroform extrahiert. Die Fällung der DNA erfolgte nach Zugabe von 40 μl 3 M Natriumacetat und 800 μl 100 % Ethanol bei -80 °C für 30 min. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (13.000 rpm,

10 min, 4°C) wurde das DNA-Pellet mit 1 ml 70-% igem Ethanol gewaschen im Vakuumkonzentrator getrocknet, in 50 µl TE-Puffer resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

2.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* erfolgte jeweils aus 3 – 5 ml einer ÜN- Kultur mit Hilfe des „E.N.Z.A. Plasmid Miniprep I“ von Peqlab (Erlangen) nach Angaben des Herstellers. Hinsichtlich einer nachfolgenden Sequenzierung wurden die Plasmide jedoch mit doppelt destilliertem Wasser von der Säule gewaschen.

2.7.3 Isolierung der Gesamt-RNA aus Cyanobakterien

Für eine Isolierung der RNA wurden die Zellen geerntet, mit 200 µl eiskaltem PBS Puffer gewaschen und in 350 µl Lyse-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl auf 65 °C erwärmtes Phenol wurden die Zellen für 10 min bei 65 °C inkubiert und jede Minute gründlich gemischt. Zu dieser Suspension wurde anschließend 300 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) pipettiert. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 14.000 rpm und 4 °C, wurde die obere RNA-haltige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µl Chloroform versetzt. Nach einer anschließenden weiteren Zentrifugation (5 min, 14.000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Gefäß übertragen und mit 250 µl 96 % Ethanol versetzt. Die nachfolgenden Schritte wurden mit dem High Pure RNA Isolation Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

Lyse-Puffer

4 M Guanidinthiocyanat
20 mM Na-Acetat, pH 5,2
0,1 mM DTT
0,5 % N-Lauryl-Sarcosin

PBS-Puffer (pH 7,4)

140 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
2 mM KH₂PO₄
β-Mercaptoethanol 10 µl/ml

2.7.4 Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die Amplifikation von definierten DNA-Abschnitten wurde der PCR „RedMastermix“ von Genaxxon oder die „Phusion High-Fidelity“ von Finnzymes (Vantaa, Finnland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die PCR-Reaktion wurde in 0,2 ml Eppendorfgefäßen im „Labcyler,, (SensoQuest, Göttingen) durchgeführt. Die Standard-PCR erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. Initiale Denaturierung: 5 min 94 °C
2. 30 x 3 Schritt-Zyklus:
 - Denaturierung: 1 min 94 °C
 - Hybridisierung: 1 min Primer-spez. Temp.
 - Synthese: 1 - 5 min 72 °C
3. Endsynthese: 5 min 72°C

Für die Fusion von DNA-Fragmenten wurde folgendes Protokoll verwendet:

1. Initiale Denaturierung: 2 min 94 °C
2. 8 x 3 Schritt-Zyklus:
 - Denaturierung: 30 s 94 °C
 - Hybridisierung: 1 min 50 °C
 - Synthese: 1 min 72 °C
3. 30 x 3 Schritt-Zyklus:
 - Denaturierung: 1 min 94 °C
 - Hybridisierung: 1 min Primer-spez. Temp.
 - Synthese: 1 - 5 min 72 °C
4. Endsynthese: 5 min 72°C

2.7.5 Semi-quantitative RT-PCR

Zur Untersuchung der Expression ausgewählter Gene wurde semi-quantitative RT-PCR mittels dem „OneStep RT-PCR Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde im ersten Programmschritt die eingesetzte RNA (60 ng) durch die Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Nach anschließender Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte eine Standard-PCR. Die RT-PCR wurde in 0,2 ml Eppendorgefäßen im „Labcycler“ (SensoQuest, Göttingen) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. RT-Reaktion 30 min 50 °C
2. Inaktivierung der rev. Transkriptase 15 min 95 °C
3. 18 - 30 x 3 Schritt-Zyklus:
 - Denaturierung: 1 min 94 °C
 - Hybridisierung: 1 min Primer-spez. Temp.
 - Synthese: 1 - 5 min 72 °C
4. Endsynthese: 5 min 72°C

2.7.6 Agarosegelelektrophorese

Die analytische Auftrennung von DNA bzw. RNA erfolgte mittels horizontaler Gelelektrophorese. Dazu wurden die Proben mit 6 x Laufpuffer (40 % Saccharose, 0,25 % Bromphenolblau in H₂O) versetzt und auf 1 % Agarosegele aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei konstanter Spannung von 100 V. Im Anschluss daran wurden die Gele für 10 min in einer Ethidiumbromidlösung inkubiert, so dass die Banden der Nukleinsäuren unter UV-Licht sichtbar wurden.

TAE-Puffer 10 x, pH 7,9

48,4 g Tris

11,4 ml Essigsäure

20 ml EDTA [0,5 M] , pH 8,0

2.7.7 Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration

Die DNA- bzw. RNA-Konzentration wurde im Specord 205 (Analytik Jena) photometrisch gemessen. Nukleinsäuren weisen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}) auf. Bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht A_{260} von 1,0 einer Konzentration von ca. 50 ng/ μ l doppelsträngiger DNA bzw. 40 ng/ μ l RNA.

2.7.8 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von Plasmid-DNA mittels Restriktionsendonukleasen wurde unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Für einen präparativen Ansatz wurde 3 μ g DNA verwendet. Nach Inkubation bei der enzymespezifischen Temperatur für eine Stunde wurden die entstandenen DNA Fragmente mittels Gelelektrophorese getrennt. Das gewünschte DNA Fragment wurde aus dem Gel geschnitten und im Anschluss mit dem „NucleoSpin ExtractII Kit“ (Macherey & Nagel) gereinigt.

2.7.9 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte bei 22°C für 1 Stunde oder ÜN bei 14 °C durch die T4 DNA Ligase (Fermentas). Sowohl vom Vektor als auch vom zu klonierende Fragment wurden 50 ng für die Reaktion eingesetzt. Nach erfolgter Ligation wurde die T4 DNA Ligase bei 65 °C für 10 min inaktiviert.

2.8 Mutagenese

2.8.1 Herstellung von Insertionsmutanten in *Anabaena* sp. PCC 7120

Zur Inaktivierung von *alr0092* und *alr0093* wurden interne Fragmente beider Gene mittels Standard PCR amplifiziert. Für *alr0092* wurden dabei Oligo800 und Oligo801 verwendet. Zur Amplifizierung des Fragmentes von *alr0093* dienten Oligo802 und Oligo518 als Primer. Die entsprechenden DNA Fragmente wurden in pGEM-T ligiert, woraus die Plasmide pIM475 bzw. pIM476 resultierten. Nach einem anschließenden *Xho*I Verdau wurden die internen Fragmente von *alr0092* und *alr0093* gereinigt und in den mit *Xho*I behandelten, mobilisierbaren Vektor pRL277 ligiert (Abb. 9). Die daraus entstehenden Plasmide pIM477 und pIM478 wurden durch Konjugation in *Anabaena* sp. PCC 7120 transferiert und durch einfache Rekombination ins Genom integriert (2.8.7.1). Die daraus entstehenden *Anabaena* Stämme wurden entsprechend den eingefügten Plasmiden als SR477 und SR478 bezeichnet.

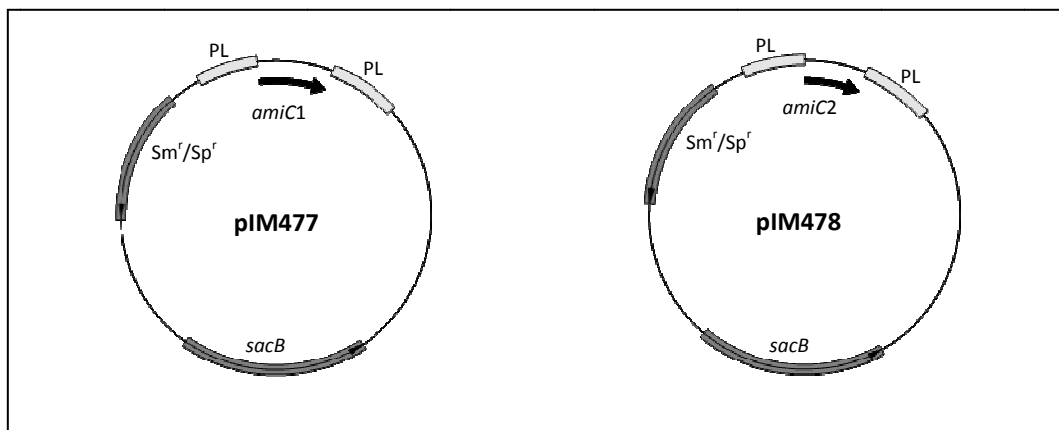


Abb. 9: Schematische Darstellung von pIM477 und pIM478. PL, Polylinker.

2.8.2 Herstellung von Insertionsmutanten in *Nostoc punctiforme*

Um Aussagen über die Funktion verschiedener Gene treffen zu können, wurden Insertionsmutanten erzeugt. Dabei wird durch das Einfügen einer Resistenzkassette das Leseraster des Genes unterbrochen und die Genfunktion inaktiviert. Für diese gezielte Mutagenese stehen verschiedene Resistenzkassetten zur Verfügung (Elhai & Wolk, 1988). Die C.K3 Kasette beispielsweise enthält das über den starken *psbA*-Promotor kontrollierte *npt*-Gen. Es kodiert für die Neomycinphosphotransferase und vermittelt damit eine Neomycin- bzw. Kanamycin-Resistenz. Um polare Effekte durch den starken Promotor der Kasette auf nachfolgende Gene auszuschließen wurde die Kasette, die kein Stoppsignal enthielt, jeweils in zwei Orientierungen integriert.

Die C.K3 Kasette wurde durch doppelte Rekombination der homologen Bereiche auf beiden Seiten der Resistenzkasette ins Genom integriert. Für die Selektion der doppelt rekombinanten Klone diente das auf dem Cargo-Plasmid vorhandene *sacB*-Gen aus *Bacillus subtilis*, welches für die Levansucrase codiert (Cai & Wolk, 1990). Die Levansucrase wandelt Saccharose in das für Gram-negative Bakterien toxische Levan um. Bei Zugabe von 5 % Saccharose zum Medium kommt es daher zum Absterben der einfach rekombinanten Exkonjuganten.

2.8.2.1 Inaktivierung von NpF0152

Zur Inaktivierung von NpF0152 wurde zunächst mittels der Primer Oligo464 und Oligo465 und *Nostoc*-DNA als Matrize ein 652 bp großes Fragment amplifiziert und in den pJet-Vektor ligiert. Das entstehende Plasmid pIM280 wurde mit *AleI* linearisiert und die durch *SmaI* aus pRL442 isolierte C.K3 Kasette eingefügt. Dabei entstanden Konstrukte, bei denen die C.K3 Kasette in Leserichtung (pIM299), sowie gegen die Genleserichtung (pIM292) ins Gen integriert wurde. Das mit der C.K3 Kasette unterbrochene Gen wurde durch *XhoI* aus pIM299 bzw. pIM292 herausgeschnitten und in dem mit *XhoI* behandelten pRL271 ligiert. Die entstehenden Konstrukte pIM293a (Abb. 9) bzw. pIM293b wurden durch Konjugation in *N. punctiforme* transferiert (2.8.7.2). Die durch diese Mutagenese generierten *Nostoc* Stämme wurden entsprechend den verwendeten Plasmiden als DR293a und DR293b bezeichnet.

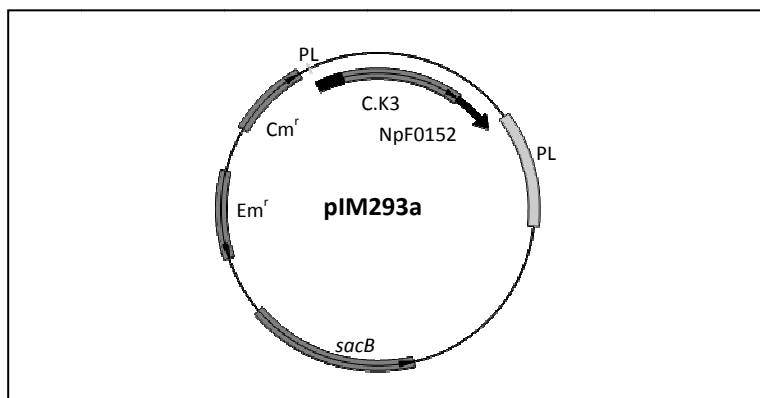


Abb. 10: Schematische Darstellung von pIM293a. In pIM293b wurde die C.K3 Kasette entgegen der Leserichtung von NpF0152 integriert. PL, Polylinker.

2.8.2.2 Inaktivierung von NpF0220

Für die Herstellung einer NpF0220-Mutante wurde zunächst ein 1334 bp großes Fragment amplifiziert. Als Matrize diente dabei genomische DNA von *N. punctiforme*, als Primer wurden Oligo466 und Oligo455 verwendet. Das NpF0220-Fragment wurde in pJET ligiert (pIM279)

und mit *PsiI* verdaut. In die Schnittstelle wurde anschließend die mit *SmaI* aus pRL442 isolierte C.K3 Kasette eingefügt. Dabei entstanden Konstrukte, bei denen die C.K3 Kasette in Leserichtung (pIM284), bzw. gegen die Genleserichtung (pIM285) ins Gen integriert wurde. Das mit der C.K3 Kasette unterbrochene Gen wurde durch *XhoI* und *XbaI* aus pIM284 bzw. pIM285 herausgeschnitten und in den mit *XhoI* und *XbaI* behandelten pRL271 ligiert. Die entstehenden Plasmide pIM288a (Abb. 11) und pIM288b wurden durch Konjugation in *N. punctiforme* transferiert (2.8.7.2), wodurch die Stämme DR288a und DR288b entstanden.

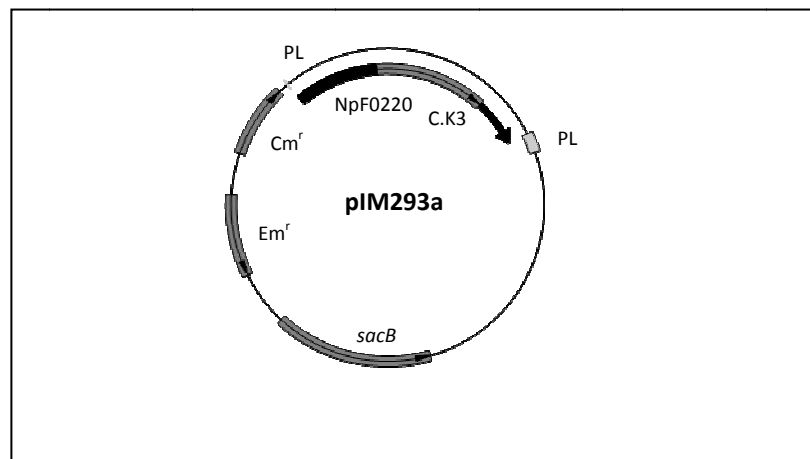


Abb. 11: Schematische Darstellung von pIM288a. In pIM288b wurde die C.K3 Kasette entgegen der Leserichtung von NpF0220 integriert. PL, Polylinker.

2.8.2.3 Inaktivierung von NpF4679

Für die gezielte Mutagenese von NpF4679 wurde ein 1150 bp großes internes Fragment von NpF4679 zunächst in einer PCR mit Hilfe der Primer Oligo512 und Oligo513 an *Nostoc*-DNA amplifiziert und anschließend in pGEM-T ligiert, wodurch das Plasmid pIM303 entstand. Nach dem Verdau von pIM303 mit *HindIII* wurde die ebenfalls mit *HindIII* aus pRL442 geschnittene C.K3 Kasette in zwei Orientierungen integriert. Im Plasmid pIM304 ist die C.K3 Kasette in Genleserichtung integriert, wohingegen im Plasmid pIM305 die Resistenzkasette entgegen der Genleserichtung vorliegt. Durch die in den Primern enthaltenen *XhoI*-Schnittstellen konnten die Gene mit der integrierten Resistenzkasette aus den Konstrukten pIM304 bzw. pIM305 herausgeschnitten werden und in den zuvor ebenfalls verdauten pRL271 ligiert werden. Die entstehenden Plasmide pIM306a (Abb. 12) bzw. pIM306b wurden mittels Konjugation in *N. punctiforme* transferiert (2.8.7.2) und über doppelte Rekombination ins Genom integriert. Die entstandenen *Nostoc* Stämme wurden als DR306a und DR306b bezeichnet.

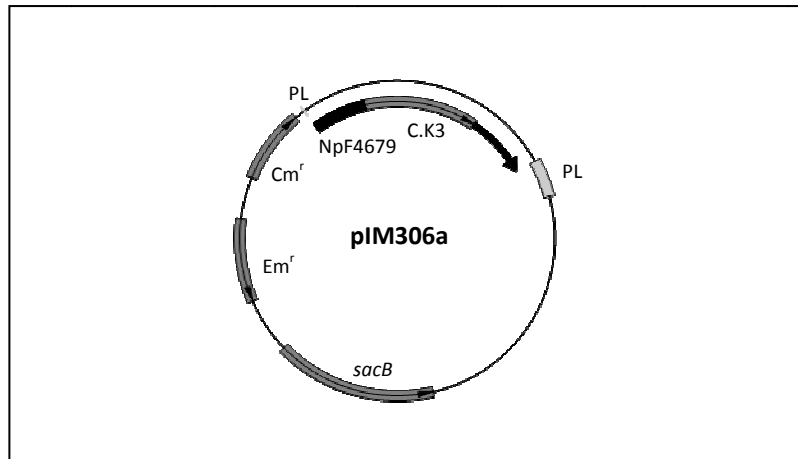


Abb. 12: Schematische Darstellung von pIM306a. In pIM306b wurde die C.K3 Kassetten entgegen der Leserichtung von NpF4679 integriert. PL, Polylinker.

2.8.3 Konstruktion von Plasmiden zur Überexpression von *alr0092* und *alr0093*

Zur Überexpression von *amiC1_{Ana}* bzw. *amiC2_{Ana}* in *Anabaena* sp. PCC 7120 wurde das gesamte offene Leseraster von *alr0092* bzw. *alr0093* durch eine Standard-PCR mittels der Primerpaare Oligo815/Oligo816 bzw. Oligo817/Oligo818 amplifiziert. Als Matrize wurde genomische DNA von *Anabaena* sp. PCC 7120 verwendet. Die PCR-Produkte wurden in pJET kloniert, wodurch die Plasmide pIM480 bzw. pIM481 entstanden. Zur Amplifizierung des *petE* Promotors wurden die Primer Oligo767 und Oligo768 und genomische DNA von *Anabaena* sp. PCC 7120 verwendet. Das resultierende 358 bp große Fragment wurde anschließend mit *EcoRV/BglII* verdaut und in die *EcoRV/BglII*-Schnittstellen von pIM480 bzw. pIM481 ligiert. Die daraus resultierenden Plasmide pIM482 und pIM483 wurden mit *PstI* und *EcoRI* verdaut und das isolierte P_{petE} -*amiC1_{Ana}* bzw. P_{petE} -*amiC2_{Ana}* wurde in den *PstI* und *EcoRI* verdauten pCSEL24 ligiert. Die entstanden Plasmide pIM484 und pIM485 wurde durch Konjugation in *Anabaena* sp. PCC 7120 übertragen (2.8.7.1). Die homologen Bereiche auf pCSEL24 rekombinieren dabei mit der *nucA-nuiA* Region des α -Megaplasmids von *Anabaena* sp. PCC 7120, was zum Einbau der Fusionsprodukte führt. Die entstandenen *Anabaena* Stämme wurden entsprechend der integrierten Plasmide als SR484 und SR485 bezeichnet.

2.8.4 Herstellung von Gfp-Konstrukten

2.8.4.1 Herstellung einer translationalen Fusion von AmiC1 und AmiC2 mit Gfp

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von AmiC1 in *Anabaena* sp. PCC 7120 sowie AmiC2 in *N. punctiforme* und *Anabaena* sp. PCC 7120 wurden Konstrukte hergestellt, die für eine translationale Fusion der Amidasen mit einem C-terminalen grün

fluoreszierenden Protein (Gfp) codieren. Datenbankanalysen sagen voraus, dass es sich bei AmiC1 und AmiC2 um periplasmatische Proteine handelt, die mittels Sec-Transportsystem exportiert werden. Da Gfp jedoch bereits im Cytoplasma in seine aktive, fluoreszierende Form gefaltet wird, wurde die Sec-Signalsequenz von AmiC1 bzw. AmiC2 durch die Tat-Translokationssignalsequenz (Tat) des periplasmatischen Nitrat-Bindeproteins NrtA ersetzt. Mariscal *et al.*, (2007) fusionierten Tat von NrtA an Gfp und konnten zeigen, dass das Gfp ins Periplasma transportiert wird.

2.8.4.1.1 Fusion von AmiC1_{Ana} und AmiC2_{Ana} von *Anabaena* sp. PCC 7120 mit Gfp

Zur Herstellung von AmiC1_{Ana}-Gfp wurde *amiC1_{Ana}* ohne die vorhergesagte Sec-Signalsequenz, aber mit Überhängen für die Tat-Sequenz von *nrtA* (*all3333*) mittels Oligo700 und Oligo727 durch PCR an *Anabaena*-DNA amplifiziert. Oligo698 und Oligo699 wurden in einer weiteren PCR genutzt, um die Tat-Sequenz von *all3333* mit Überhängen von *amiC1_{Ana}* zu generieren. Unter Verwendung der Primer Oligo698 und Oligo727 wurden die zuvor erhaltenen DNA-Fragmente in einer dritten PCR miteinander fusioniert (Abb. 13) und anschließend in den Vektor pGEM-T kloniert, wodurch das Plasmid pIM451 entstand.

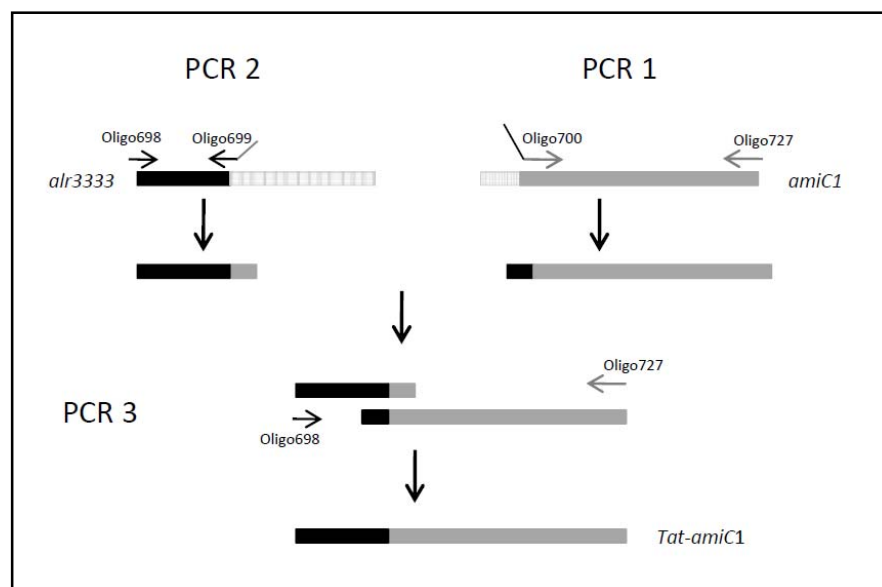


Abb. 13: Schematische Darstellung der Herstellung von *tat-amiC1_{Ana}* durch Fusions-PCR.

Ein promotorloses Gfp wurde durch *EcoRV* und *PstI*-Verdau aus pCSEL19 herausgeschnitten und in den *EcoRV* und *PstI*-behandelten pIM451 ligiert. Um das entstehende *tat-amiC1_{Ana}-gfp* (pIM452) in das selbstreplizierende Plasmid pRL1049 einfügen zu können, wurde zunächst durch PCR mit Hilfe der Primer Oligo698 und Oligo706 eine *Bam*HI Schnittstelle eingefügt.

Durch die Ligation von *tat-amiC1_{Ana}-gfp* in den *EcoRI-BamHI*- geschnittenen pRL1049 Vektor entstand das Plasmid pIM453.

Für die Herstellung eines *AmiC2_{Ana}-Gfp* Fusionsproteins wurde *amiC2_{Ana}* ohne die vorhergesagte Sec-Signalsequenz, aber mit Überhängen für die *tat*-Sequenz von *all3333* mit Hilfe von Oligo704 und Oligo731 durch PCR amplifiziert. Die *tat*-Sequenz von *all3333* mit Überhängen von *amiC2_{Ana}* wurde mittels Oligo698 und Oligo703 vervielfältigt. Gfp mit Überhängen von *amiC2_{Ana}* wurde aus dem Vektor pCSEL19 mit Hilfe der Primer Oligo730 und Oligo706 amplifiziert. In einer nachfolgenden PCR, unter Verwendung von Oligo698 und Oligo706 wurden die einzelnen DNA-Fragmente miteinander fusioniert und in pJet ligiert. Aus dem entstehenden Plasmid pIM454 wurde *tat-amiC2_{Ana}-gfp* nach *EcoRI* und *BamHI* Verdau isoliert und in den ebenfalls mit *EcoRI* und *BamHI* behandelten pRL1049 inseriert, wodurch das Plasmid pIM455 resultierte.

Die Region 653 bp vor dem Startcodon von *amiC1_{Ana}*, die wahrscheinlich die Promotorregion enthält, wurde in einer PCR mit den Primern Oligo807 und Oligo808 amplifiziert und durch die in den Primern enthaltenen *EcoRI* Schnittstellen in die ebenfalls mit *EcoRI* behandelten pIM453 bzw pIM455 kloniert. Die entstehenden Plasmide pIM471 (Abb. 14) und pIM472 wurden durch Konjugation in *Anabaena* sp. PCC 7120 transferiert (2.8.7.1).

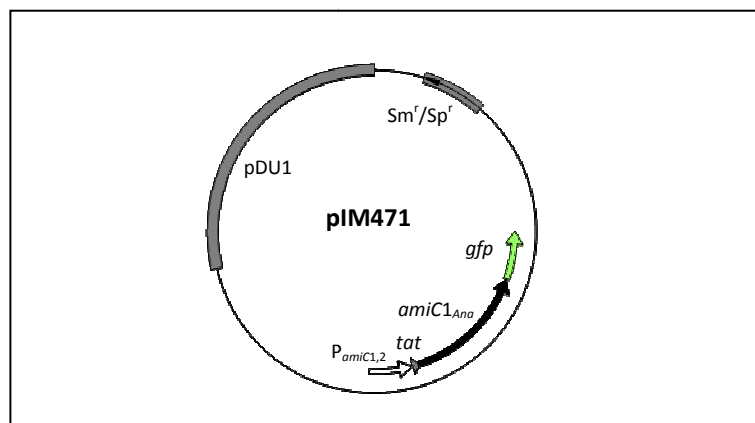


Abb. 14: Schematische Darstellung von pIM471. *P_{amiC1,2}-tat-amiC1_{Ana}-gfp* wurde in den selbstreplizierenden Vektor pRL1049 kloniert. pDU1 erlaubt die Replikation in *Anabaena* sp. PCC 7120.

2.8.4.1.2 Fusion von *AmiC2* von *N. punctiforme* mit Gfp

Zur Erzeugung von *AmiC2-Gfp* wurde zunächst in einer ersten PCR mittels Oligo3 und Oligo4 die *Tat*-Sequenz von NpR2356 (117 bp), mit Überhängen von *amiC2* synthetisiert. Np2356 codiert für das periplasmatische Nitrat-Bindeprotein NrtA. In einer zweiten PCR wurde *amiC2* ohne die Sec-Signalsequenz, aber mit Überhängen für die *Tat*-Sequenz, unter Verwendung

von Oligo1 und Oligo2, amplifiziert. Als Matrize diente jeweils genomische DNA von *N. punctiforme*. In einer anschließenden Fusions-PCR, bei der die Produkte aus PCR 1 und 2 als Matrize dienten, wurden beide Fragmente miteinander verbunden. Das entstehende *tat-amiC2* wurde zunächst in pJET ligiert, woraus das Plasmid pIM365 resultierte. Für eine C-terminale Fusion von Gfp an Tat-AmiC2 wurde *tat-amiC2* durch Verdau von pIM365 mit *SmaI* isoliert und in den mit *EcoRV* verdauten pCSEL19 ligiert. Das entstehende Plasmid pIM366 wurde mit *PstI* verdaut, wodurch das gereinigte *tat-amiC2-gfp* Fragment in pSCR202 ligiert werden konnte (= pIM367). Die vorausgesagte Promotorregion von *amiC2* wurde durch eine PCR mit Oligo5 und Oligo6 amplifiziert und nach Verdau mit *SphI* in pIM367 ligiert. Das resultierende Plasmid pIM469 (Abb. 15) wurde durch Elektroporation in *N. punctiforme* transferiert (2.8.8).

2.8.4.2 Herstellung einer translationalen Fusion von SepJ_N mit Gfp

Zur Herstellung des Konstrukts, das für eine translationale Fusion von SepJ von *N. punctiforme* (SepJ_N = NpR1723) mit Gfp codiert, wurde *sepJ_N* ohne Stop-Codon zunächst in einer PCR mittels der Primer Oligo625 und Oligo626 amplifiziert. Das resultierende 2379 bp große PCR Produkt wurde in pJET kloniert (pIM364). Durch einen anschließenden *SmaI* Verdau von pIM364 wurde *sepJ_N* isoliert und in einen zuvor mit *EcoRV* verdauten pCSEL19 ligiert (pIM375). Das dadurch entstehende *sepJ_N-gfp*-Fusionsprodukt wurde durch Verdau mit *PstI* aus dem Vektor isoliert und in pSCR202 transferiert. In einem letzten Schritt wurde die Promotorregion von NpR1723 mittels Oligo809 und Oligo810 amplifiziert, mit *SphI* verdaut und in den ebenfalls *SphI* behandelten pIM417, in Leserichtung vor *sepJ_N* ligiert. Das resultierende Plasmid pIM474 (Abb. 15) wurde durch Elektroporation in *N. punctiforme* transferiert (2.8.8).

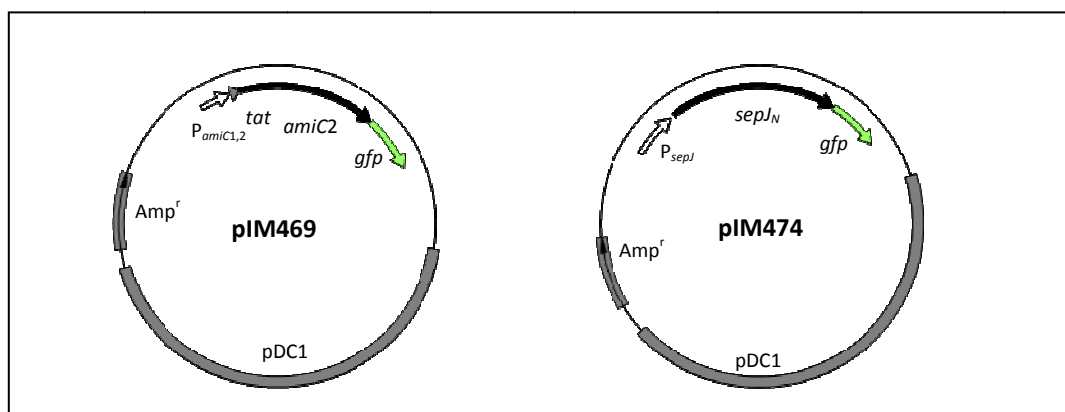


Abb. 15: Schematische Darstellung von pIM469 und pIM474. pDC1 erlaubt die Replikation in *N. punctiforme*.

2.8.5 Komplementation der *amiC1*_{Ana}-Mutante von *Anabaena* sp. PCC 7120

Zur Komplementation der *amiC1*-Mutante diente das mit *gfp* fusionierte *amiC1*. Da der dafür codierende Vektor pIM471 wie die Mutante über eine Sm/Sp-Resistenz verfügt, musste zunächst ein weiterer Selektionsmaker in pIM471 eingefügt werden. Dazu wurde pIM471 mit *StuI* verdaut und mit der mit *SmaI* aus pRL442 geschnittenen C.K3 Kasette ligiert. Das entstandene Konstrukt pIM496 wurde durch Konjugation in *Anabaena* sp. PCC 7120 gebracht (2.8.7.1).

2.8.6 Transformation von *E. coli*

2.8.6.1. Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen wurden 500 ml LB-Flüssigmedium mit 5 ml einer ÜN-Kultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Eiswasserbad für 10 min abgekühlt und durch Zentrifugation bei 4000 rpm, für 10 min und 4 °C geerntet. Um Salze und andere Bestandteile des Mediums zu entfernen, wurden die Zellen zunächst 2-mal mit eiskaltem, destilliertem Wasser gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4000 rpm, für 20 min und 4 °C erfolgte die Resuspension der Zellen in 40 ml eiskaltem 10 % Glycerin. Nach der letzten Zentrifugation bei 4000 rpm, für 20 min und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Zellpellet in 15 % eiskaltem Glycerin aufgenommen, abschließend zu 40 µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.8.6.2 Transformation von elektrokompenten *E. coli* Zellen

Für die Transformation wurden zu den elektrokompenten *E. coli* Zellen je 1 µl Plasmid gegeben, eine Minute auf Eis inkubiert und das Gemisch in eine vorgekühlte Küvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei einer Einstellung von 2,5 kV, 25 µF und 200 Ohm. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml LB aufgenommen und 1 Stunde im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 4000 rpm für 3 min und 4 °C wurden die Pellets im eigenen Rücklauf resuspendiert und auf Selektionsplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Das Wachstum der Transformanten erfolgte ÜN bei 37 °C.

2.8.7 Konjugation von Cyanobakterien

Um DNA in Cyanobakterien hinsichtlich einer Gen-Rekombination zu transferieren, erfolgte die Konjugation als „*triparental mating*“. Bei dieser Methode werden jeweils drei Bakterienstämme benötigt: das zu konjugierende Cyanobakterium, ein *E. coli* Stamm mit dem zu übertragenden Konstrukt und ein *E. coli* Stamm mit dem für den Transfer notwendigen Helfer- und Konjugationsplasmid. Als Helferplasmid wurde pRL528 verwendet (Ehai & Wolk, 1988). Dieses Plasmid wird für die Methylierung der *AvaI*-, *AvaII*- und *AvaIII*-Schnittstellen des Cargoplasmides benötigt, um zu verhindern, dass die zu transferierende Fremd DNA erkannt und abgebaut wird. Das konjugative Plasmid codiert für die *tra*-Gene, die für eine Konjugation notwendig sind.

2.8.7.1 Konjugation von *Anabaena* sp. PCC 7120

Die Konjugation in *Anabaena* sp. PCC 7120 erfolgte nach Wolk *et al.* (1984). Dazu musste zunächst das zu übertragende Konstrukt in den *E. coli* Stamm HB101, der bereits das Helferplasmid pRL528 enthielt, transformiert werden. Das konjugative Plasmid RP-4 wurde durch den *E. coli* Stamm J53 bereitgestellt. Für die Konjugation wurden für jedes zu übertragende Konstrukt jeweils 30 ml LB beider *E. coli* Stämme aus einer Übernackkultur angeimpft und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, mit Antibiotika-freiem LB-Medium gewaschen, auf jeweils 500 µl aufkonzentriert und miteinander vereinigt. Für den konjugativen Transfer zwischen den *E. coli* Stämmen erfolgte ein einstündiger Inkubationsschritt im Dunkeln, bei 30 °C ohne Schütteln. Parallel wurden 10 ml einer gut gewachsenen Kultur des Rezipienten-*Anabaena* Stammes geerntet und in 200 µl A+A/4 + NO₃ resuspendiert. Aus diesem Ansatz wurden 1:10 und 1:100 Verdünnungen generiert. 100 µl der verschiedenen *Anabaena*-Ansätze wurden mit 200 µl der *E. coli* Suspension vermischt und mittels steriler Glasperlen auf eine HATF-Filter belegte A+A/4 + NO₃-Platte verteilt und ÜN bei 28 °C und geringer Lichtintensität inkubiert. Anschließend wurde der Filter auf Selektionsplatten, die Antibiotika enthielten, überführt. Nach etwa 2 Wochen Inkubation konnten Exkonjuganten gepickt werden.

2.8.7.2 Konjugation von *N. punctiforme*

Um DNA in *N. punctiforme* für eine Gen-Rekombination zu transferieren, wurde die Methode des „*triparentalen mating*“ nach Cohen *et al.* (1994) angewandt. Dazu wurde *N. punctiforme* aus einer exponentiell wachsenden Kultur auf eine Konzentration von 75 bis 100 µg/ml

eingestellt. Die beiden Plasmid-enthaltenden *E. coli* Stämme DH5 α (mit dem zu übertragenden Konstrukt) und HB101 (mit dem Helferplasmid pRL528 und dem konjugativen Plasmid pRK2013) wurden in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz bis zur mittleren exponentiellen Phase bei 37 °C angezogen. Zur Entfernung der Antibiotika wurden die Zellen zweimal mit frischem LB-Medium gewaschen, zur gleichen Menge miteinander gemischt und auf eine OD₆₀₀ von 9 – 10 konzentriert. Für die Konjugation wurden je 0,5 ml der *N. punctiforme*-Suspension und 0,5 ml der gemischten *E. coli*-Kulturen miteinander vermischt, bei 4000 rpm und RT für 2 min pelletiert und nach Entfernung von 800 μ l des Überstandes im Restvolumen resuspendiert. Der Konjugationsansatz wurde mit Glasperlen auf eine mit HATF-Filter belegte A+A + 5 mM MOPS + 2,5 mM NH₄Cl + 0,5 % LB Agarplatte verteilt und ÜN bei 28 °C und geringer Lichtintensität inkubiert. Anschließend wurden die Filter auf A+A + 5 mM MOPS + 2,5 mM NH₄Cl Agarplatten überführt, mit Parafilm verschlossen und bei 28 °C und geringer Lichtintensität inkubiert. Tags darauf erfolgte die Erhöhung der Lichtintensität auf etwa 20 – 30 μ E. Zur Selektion von Exkonjuganten wurden die HATF-Filter am vierten Tag auf A+A-Platten mit den entsprechenden Antibiotika übertragen und zum Wachstum bei 28 °C inkubiert. Nach ca. 3 Wochen konnten Klone gepickt und auf neue A+A Platten ausgestrichen werden.

2.8.8 Elektroporation von *N. punctiforme*

Selbstreplizierende Plasmide wurden durch Elektroporation in *N. punctiforme* transferiert (Summers *et al.*, 1995). Dazu wurde zunächst eine gut gewachsene Kultur auf 20 ml konzentriert und im Branson Sonifier 250 einer Ultraschallbehandlung (Beschallungsintensität Stufe 3; Beschallungszyklus von 50 %) in Intervallen von 3 mal 20 s mit je 60 s Pause unterzogen. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und zur Regeneration für 4 h in A+A + NH₄Cl Medium inkubiert.

Für die Elektroporation wurden die Zellen pelletiert, 4-mal mit 20 ml doppelt destilliertem, raumtemperiertem Wasser gewaschen und auf eine Chlorophyll *a*-Konzentration von 50 – 100 μ g Chl *a*/ml eingestellt. Pro Transformation wurden 400 μ l Zellen mit 10 μ g DNA gemischt und in eisgekühlte, sterile Elektroporationsküvetten mit 2 mm Elektrodenabstand (PepLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) pipettiert. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 1,6 kV, einer Kapazität 25 μ F und 600 Ω Parallelwiderstand. Die Zeitkonstanten lagen bei optimaler Durchführung im Bereich von 11 - 13 ms. Sofort nach dem Elektroschock wurden die Zellen in 2 ml A+A/4 Medium mit 2,5 mM NH₄Cl + 5 mM MOPS + 20 mM MgCl₂

resuspendiert und ÜN bei RT, leichtem Schütteln und wenig Licht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Ansätze auf mit HATF-Filter belegte Selektivagarplatten verteilt. Nach etwa 2 Wochen konnten Klone gepickt und auf neue A+A Platten ausgestrichen werden.

2.9 Analytische Methoden

2.9.1 Untersuchung der Wachstumsgeschwindigkeit

Zum Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit wurde die Zelldichte der Cyanobakterien bei einer OD_{750} verfolgt.

2.9.2 Bestimmung der Chlorophyllkonzentration

Die Bestimmung der Chlorophyll a -Konzentration einer Kultur erfolgte entsprechend der Methode nach MacKinney (1941). Dazu wurde 1 ml der entsprechenden Kultur bei RT, 13.000 rpm für 4 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Methanol aufgenommen und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Suspension erneut zentrifugiert und der Überstand bei 665 nm gegen Methanol gemessen. Für die Berechnung der Chlorophyll a -Menge wurde folgende Gleichung verwendet:

$$\text{mg Chlorophyll } a \text{ /ml} = \frac{OD_{665} \times (V_{Probe} + V_{MetOH})}{74,5 \times V_{Probe}}$$

2.9.3 Dünnschichtchromatographie

Die Extraktion der Glykolipide wurde entsprechend der Methode nach Winkenbach *et al.* (1972) durchgeführt. Dazu wurden die Lipide aus jeweils einer 50 ml *Anabaena*-Kultur durch ein Methanol-Chloroform Gemisch (1:1) extrahiert und unter Pressluft eingedampft. Die aufkonzentrierten Glykolipid-Extrakte wurden anschließend in 200 μ l Chloroform aufgenommen. 50 μ l der Probe wurde auf eine Dünnschicht-Silica-Platte (Merck) aufgetragen und in einer mobilen Phase aus Chloroform:Methanol:Essigsäure:Wasser (85:15:10:3,7) aufgetrennt. Die Detektion der Lipide erfolgte durch Aufsprühen von 25 % H_2SO_4 und anschließendem Erhitzen der Silica Platte bei 220 °C für 1 bis 2 min.

2.10 Mikroskopie und Färbetechniken

2.10.1 FRAP-Analyse

Der intrazelluläre Austausch von Molekülen innerhalb eines Filaments wurde durch FRAP-Experimente entsprechend der Methode nach Mullineaux *et al.*, (2008) verfolgt. Dabei wurden zunächst 0,5 ml einer gut gewachsenen Kultur geerntet, mehrmals mit frischem BG11-Medium bei RT gewaschen und mit 10 µl von Calcein-AM (1mg/ml in DMSO; Invitrogen Molecular Probes) für 90 min bei 30 °C im Dunkeln inkubiert. Nachdem der Ansatz anschließend erneut dreimal gewaschen wurde, erfolgte eine weitere Inkubation für 90 min bei 30 °C im Dunkeln. Für die FRAP-Messungen wurden die Zellen auf Agar-beschichtete Objektträger überführt und am Konfokalen Mikroskop LSM 710 von Zeiss bei RT analysiert. Für die mikroskopischen Aufnahmen und für die *bleaching* Experimente wurde eine 50 µm Lochblende verwendet. Die Autofluoreszenz (Anregung: 488 nm; Emission: 665-710 nm) sowie die Calcein-AM-Fluoreszenz (Anregung: 488 nm; Emission: 505-550 nm) wurden gleichzeitig aufgenommen. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurden folgende Parameter verwendet: Laser-Intensität: 0,3 %, *frame*-Größe: 36 Pixel x 60 Pixel, Pixel-Größe: 0,45 µm x 0,45 µm, Expositionszeit: 22,5 µs, *averaging*: 2 x *line agerage*. Für das Ausbleichen der gewünschten Region wurden folgende Parameter verwendet: Laser Intensität: 100 %, ROI: 0,9 µm x 0,9 µm, Pixel-Größe: 0,45 µm x 0,45 µm, Expositionszeit: 22,5 µs, *averaging*: keine, 300 Iterationen.

Die Verarbeitung und Quantifizierung der Bilder wurden entsprechend Fungler *et al.*, (2007) durchgeführt.

2.10.2 Färbung mit Alcian-Blau

Durch Alcian-Blau lassen sich Heterocysten-spezifische Polysaccharide nachweisen. Dazu wurden 1 ml Zellen mit 2 µl Alcian-Blau (1,5 % (w/v) in H₂O) für 5 min bei RT inkubiert und anschließend am Lichtmikroskop dokumentiert.

2.10.3 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurde am Leica DM 5500B Mikroskop mit angeschlossener Leica DFC420C Kamera für Farbmikroskopie bzw. mit der Leica DFC360 FX Monochromkamera angefertigt. Die Autofluoreszenz der Cyanobakterien wurde bei einer Anregungswellenlänge von 535/50 nm und mit einem Emissionsfilter von 610 – 675 nm

aufgenommen. Die GFP-Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 470/40 nm mit einem Emissionsfilter von 525/50 nm aufgenommen.

Für eine 3D Deconvolution wurde zunächst eine Serie von Bildern durch die gesamte Focusebene aufgenommen und mittels der Deconvolution Software von Leica LAS AF berechnet.

2.10.4 Elektronenmikroskopie

2.10.4.1 Probenvorbereitungen

Zur Anfertigung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden jeweils 2 – 5 ml einer gut gewachsenen Kultur pelletiert und im ersten Fixierungsschritt mit Glutaraldehyd, in einer Endkonzentration von 2,5 %, für 5 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit 5 mM HEPES, pH 8,0 wurden die Proben mit 2 % Kaliumpermanganatlösung bei 4 °C ÜN nachfixiert. Dieser Schritt diente gleichzeitig der besseren Kontrastierung der Glycolipidschicht. Anschließend wurden die Zellen 10-mal mit Wasser gewaschen und in 2 % Sea Kem Agarose (FMC Bioproducts, Rockland, USA) eingebettet. Die entstandenen Agaroseblöckchen wurden in kleine Würfel mit einer Kantenlänge von ca. 2 mm geschnitten und entwässert. Dazu wurden sie in einer aufsteigenden Ethanolreihe von 70 %, 80 %, 90 % bzw. 95 % Ethanol zunächst je 2-mal für 10 min und anschließend dreimal für je 20 min in 100 % Ethanol inkubiert. Für eine erfolgreiche Infiltration des Epon in die Proben wurden diese zunächst durch eine 15 minütige Inkubation mit Propylenoxid vorbehandelt. Nach einer ersten Infiltration für 60 min bei RT mit einem 1:2 Gemisch aus Propylenoxid und Epon erfolgte eine weitere Infiltration für 90 min bei RT mit einem 1:3 Gemisch aus Propylenoxid und Epon. Abschließend wurden die Agarosewürfel in reinem Epon eingebettet, für 24 h bei 40 °C und für 48 h bei 60 °C ausgehärtet.

2.10.4.2 Herstellung von Ultradünnschnitten

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 minütiger Behandlung in Bleicitrat (1 %) wurden die Proben kontrastiert. Die Analyse der Präparate erfolgte im Transmissions Elektronenmikroskop (TEM) Philips Tecnai10 bei 80 kHz.

3. Ergebnisse

3.1 Zellwand-Amidasen in Cyanobakterien

Acetylmuramyl-L-Alanin Amidasen (Zellwand-Amidasen) spalten die Peptidbindung zwischen dem N-terminalen L-Alanin und MurNAC. In einzelligen Bakterien spielen Zellwand-Amidasen für die letztendliche Spaltung der Tochterzellen während der Zellteilung eine entscheidende Rolle. Die Zellwand-Amidase AmiC gilt derzeit als das letzte an der Zellteilung beteiligte Protein. Auch in verschiedenen filamentösen Bakterien wurden *amiC*-Homologe identifiziert. Da eine Spaltung in Tochterzellen bei filamentbildenden Bakterien unterbleibt, ist hier die Bedeutung dieser Enzyme noch unklar.

Grundsätzlich zeigen die AmiC-Homologen der filamentösen Cyanobakterien einen vergleichbaren Domänenaufbau (Abb. 16). Am N-Terminus befindet sich für den post-translationalen Proteintransport eine Signalsequenz für das Sec-Translokationssystem. Während die katalytische Domäne sich am C-Terminus des Proteins befindet, ist N-terminal die AMIN (Amidase N-terminal) Domäne lokalisiert. Von AMIN Domänen ist bekannt, dass diese die korrekte Positionierung von periplasmatischen oder extrazellulären Proteinen zu spezifischen Regionen der Zellhülle vermitteln (de Souza *et al.*, 2008; Bernhard *et al.* 2003).

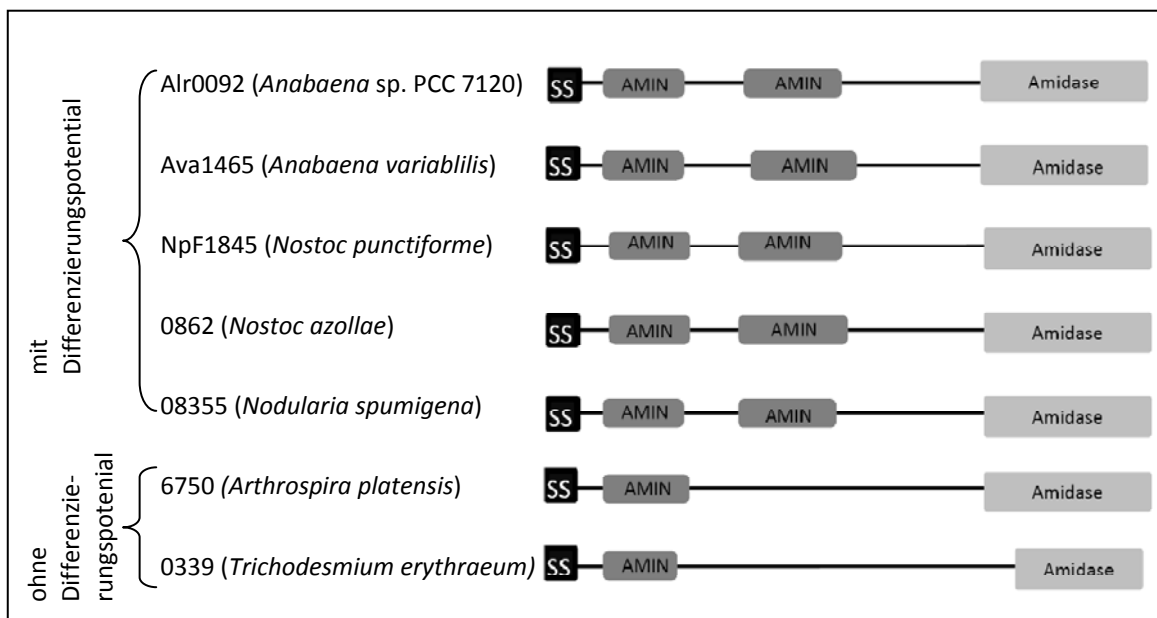


Abb. 16: Schematischer Aufbau von AmiC in verschiedenen filamentösen Cyanobakterien. SS, Sec-Signalsequenz; AMIN, Amidase N-terminale Domäne

Bemerkenswert ist zudem, dass in den AmiC-Homologen aller bis jetzt sequenzierten Heterocysten bildenden Cyanobakterien jeweils zwei dieser AMIN Domänen vorhanden sind.

Im Gegensatz dazu verfügen die Amidasen der filamentösen Cyanobakterien ohne Differenzierungspotential *Arthrospira platensis* und *Trichodesmium erythraeum* nur jeweils über eine AMIN Domäne. Eine weitere Gemeinsamkeit bei Heterocysten bildenden Cyanobakterien besteht in der genomischen Organisation der Amidase-Region. In *Anabaena* sp. PCC 7120, *A. variabilis*, *N. punctiforme* und *N. azollae* findet sich ein konserviertes Gencluster mit *kefB* (K⁺-Exporter) gefolgt von zwei Amidasegenen und einem Gen für die Glutamat Racemase (*murl*). Nur in *Nodularia spumigena* codiert in der entsprechenden Region nur ein Gen für eine Amidase (Abb. 17).

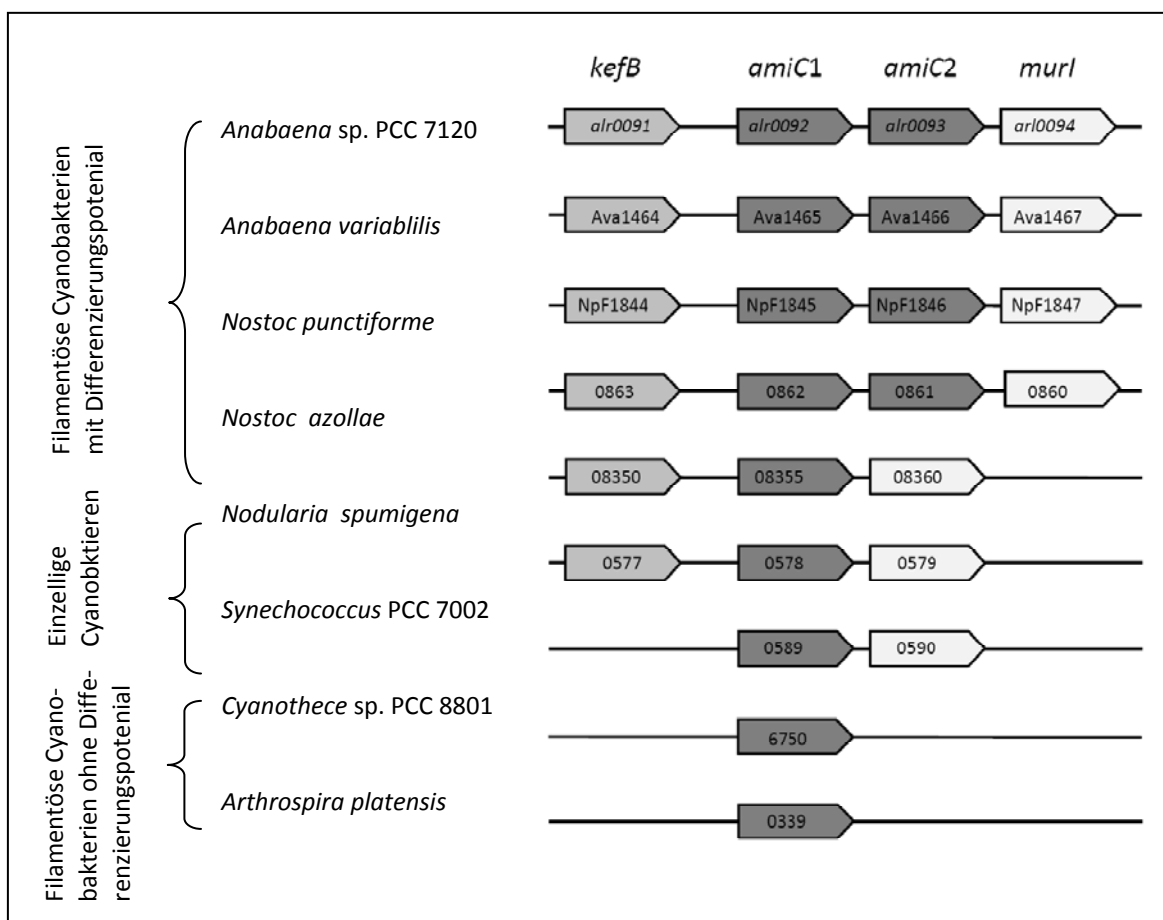


Abb. 17: Schematische Darstellung der *amiC*-Region in verschiedenen Cyanobakterien.

3.1.1 Funktionelle Charakterisierung von Zellwand-Amidasen von *Anabaena* sp. PCC 7120

3.1.1.1 Lokalisation von *AmiC1_{Ana}* und *AmiC2_{Ana}* in *Anabaena* sp. PCC 7120

Zur Analyse der subzellulären Lokalisation der Zellwand-Amidasen *AmiC1_{Ana}* (Alr0092) und *AmiC2_{Ana}* (Alr0093) innerhalb des Filaments von *Anabaena* sp. PCC 7120 wurden Konstrukte

angefertigt, die für eine C-terminale translationale Fusion mit einem Gfp auf dem mobilisierbaren, selbst-replizierbaren Vektor pRL1049 codieren. Da Gfp nur im Cytoplasma zum aktiven, fluoreszierenden Protein gefaltet werden kann und daher als vollständig gefaltetes Protein transportiert werden muss, wurde die Sec-Signalsequenz der Amidasen durch die Signalsequenz für das Tat-Translokationssystem eines periplasmatischen Bindeproteins (All3333) ersetzt (Abb. 13). Um die Amidasen unter den natürlichen Bedingungen zu exprimieren, wurde zusätzlich die Promotorregion von *amiC1_{Ana}* und *amiC2_{Ana}* in Leserichtung vor *tat-amiC1_{Ana}-gfp* bzw. *tat-amiC2_{Ana}-gfp* kloniert. Die entstehenden Konstrukte pIM471 und pIM471 wurden in den WT-Hintergrund transformiert. Der Nachweis der Funktionalität von *tat-amiC1_{Ana}-gfp* konnte durch die Komplementation der *amiC1_{Ana}*-Mutante erbracht werden (3.1.1.5; Abb. 23; 25). Demnach hatte weder der Austausch der Signalsequenz Einfluss auf die Lokalisation des Proteins, noch verursachte die Fusion von Gfp an *AmiC1_{Ana}* einen Verlust der Amidase-Aktivität.

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von *tat-amiC1_{Ana}-gfp* und *tat-amiC2_{Ana}-gfp* wurden die Zellen in flüssigem Medium unter Standardbedingungen angezogen. Die Gfp-Fluoreszenz war deutlich außerhalb der roten Autofluoreszenz zu erkennen. Beim exponentiellen Wachstum mit NO_3^- im Medium konnte *AmiC1_{Ana}-Gfp* bzw. *AmiC2_{Ana}-Gfp* deutlich an den Septen zwischen Nachbarzellen detektiert werden (Abb. 18). Dabei war zu beobachten, dass sich die Gfp-Fluoreszenz bereits zu Beginn der Zellteilung bei sich neu einschnürenden Tochterzellen anhäuft (Abb. 18 siehe Pfeil). Insgesamt schien das Signal von *AmiC1_{Ana}-Gfp* an den Septen etwas fokussierter zu sein als das Signal von *AmiC2_{Ana}-Gfp*.

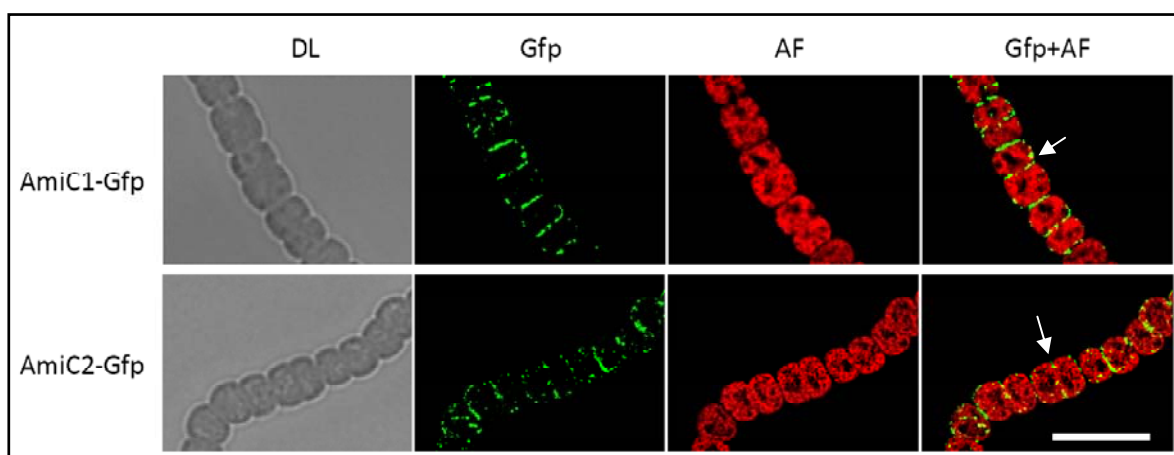


Abb. 18: Subzelluläre Lokalisation von *AmiC1_{Ana}* und *AmiC2_{Ana}* in vegetativen Filamenten von *Anabaena* sp. PCC 7120 (pIM471) bzw. *Anabaena* sp. PCC 7120 (pIM472). DL, Durchlicht; Gfp, Gfp-Fluoreszenz; AF, Autofluoreszenz; Gfp+AF, Überlagerung des Gfp-Signals mit der Autofluoreszenz. Balken = 10 μm

Etwa 12 h nach Induktion von Heterocysten durch Überführen der Kultur in stickstofffreies Medium (im Folgenden als N-Entzug bezeichnet) erschien die Gfp-Fluoreszenz in den Zellwänden von Proheterocysten (Abb. 19). Zu diesem Zeitpunkt waren wenige Gfp-Fluoreszenzsignale an den angrenzenden Nachbarzellen zu erkennen. Nach dem N-Entzug, bevor die Heterocysten mit der N₂-Fixierung beginnen, erfolgt keine Zellteilung im Filament, da kein gebundener Stickstoff zur Verfügung steht. Amidasen werden wahrscheinlich in sich nicht teilenden vegetativen Zellen nicht benötigt. In reifen Heterocysten war ebenfalls keine Gfp-Fluoreszenz zu erkennen. Jedoch konnten im diazotrophen Wachstum *AmiC1_{Ana}-Gfp* und *AmiC2_{Ana}-Gfp* wieder an den Septen zwischen vegetativen Zellen im Filament detektiert werden (Abb. 19).

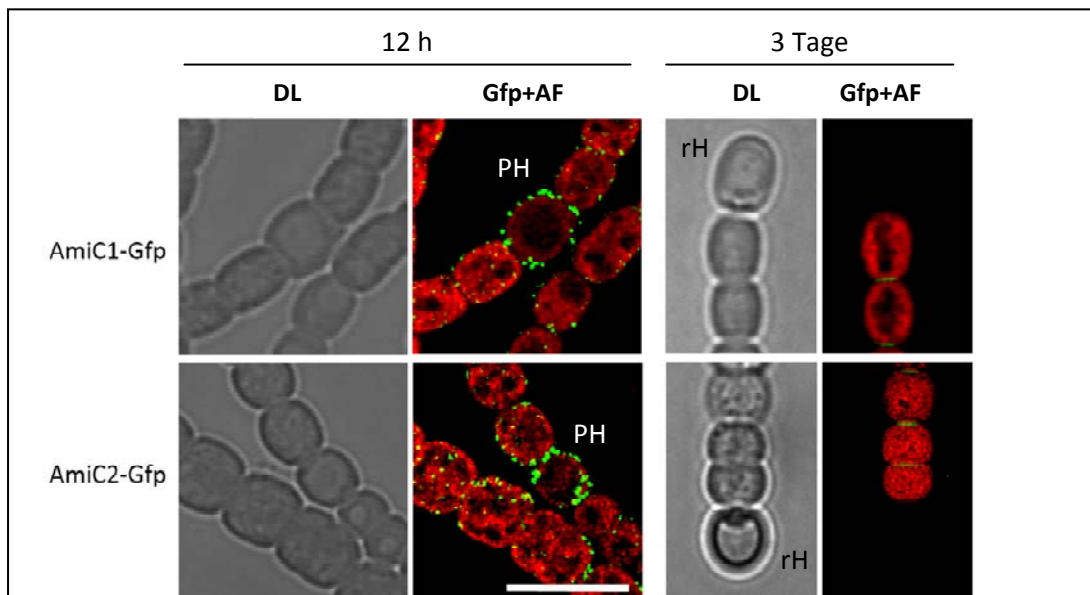


Abb. 19: Subzelluläre Lokalisation von *AmiC1_{Ana}* und *AmiC2_{Ana}* in Filamenten von *Anabaena sp. PCC 7120 (pIM471)* bzw. *Anabaena sp. PCC 7120 (pIM472)* 12 h und 3 Tage nach N-Entzug. Die Zellen wurden in BG11-Medium unter Dauerlicht angezogen und anschließend in BG11₀-Medium überführt. DL, Durchlicht; Gfp+AF, Überlagerung des Gfp-Signals mit der Autofluoreszenz. PH, Proheterocyste; rH, reife Heterocyste; Balken = 10 µm

3.1.1.2 Gezielte Mutagenese von *amiC1_{Ana}* und *amiC2_{Ana}* in *Anabaena sp. PCC 7120*

Im filamentösen Cyanoobakterium *N. punctiforme* konnte gezeigt werden, dass das AmiC-Homologe *AmiC2* (NpF1846) essentiell für die Zell-Zell-Kommunikation innerhalb des Filaments, die filamentöse Morphologie, sowie für die Aufrechterhaltung des Differenzierungspotenzials ist (Lehner *et al.*, 2011). Die Inaktivierung von *amiC1* in *N. punctiforme* war im Gegensatz dazu nicht möglich.

Um die Funktion von Zellwand-Amidasen weiterer filamentöser Cyanobakterien miteinander vergleichen zu können, sollte die Auswirkung der Inaktivierung der orthologen Amidasegene

in *Anabaena* sp. PCC 7120 untersucht werden. In *Anabaena* sp. PCC 7120 zeigen die Gene *alr0092* und *alr0093* Sequenzübereinstimmungen zu *amiC1* bzw. *amiC2* von *N. punctiforme* (61 % Übereinstimmung bzw. 71 % Übereinstimmung). Durch Transposon Mutagenese wurde bereits von Zhu *et al.* (2001) eine *alr0093* Mutante isoliert. Die Mutation führte bei Mangel an gebundenen Stickstoffverbindungen zu einer verringerten *hepA* Expression und zum Verlust der Fähigkeit zur Ausbildung reifer Heterocysten. Aufgrund des Effekts auf die Heterocystendifferenzierung wurde das Gen daher als *hcwA* (*heterocyst cell wall*) bezeichnet. Die Mutante wurde jedoch von jener Arbeitsgruppe nicht näher charakterisiert.

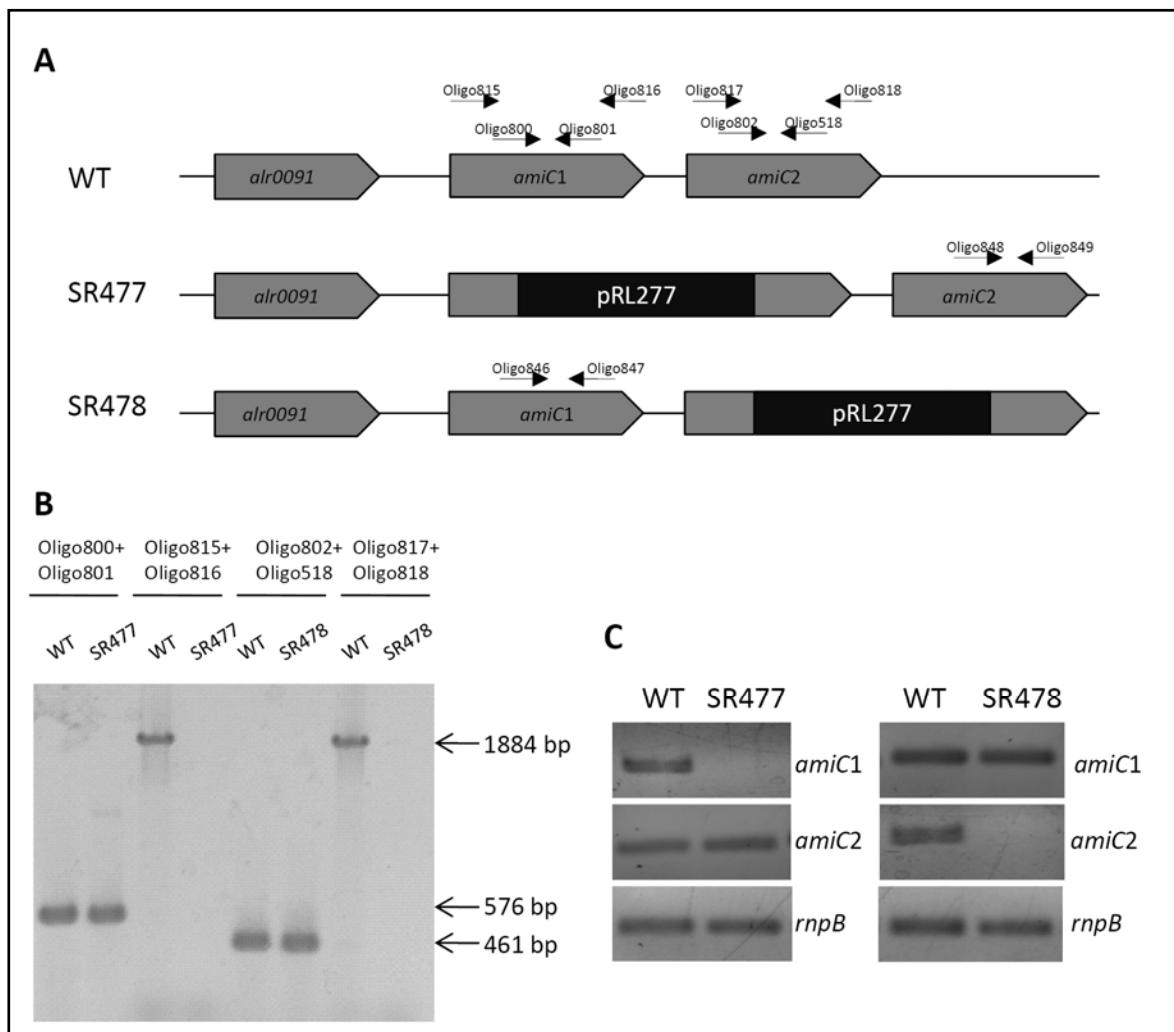


Abb. 20: Generierung von SR477 und SR478. (A) Schematische Darstellung der genomischen Organisation der chromosomalen *amiC*-Region beim WT und den Mutanten. Die Gene *amiC1_{Ana}* und *amiC2_{Ana}* wurden jeweils durch Insertion des Vektors pRL277 inaktiviert. Die Bindestellen der verwendeten Primerpaare sind angedeutet. (B) PCR-Analyse von WT und Mutanten. (C) RT-Analyse von *amiC1_{Ana}* und *amiC2_{Ana}* in WT und Mutanten. Für die Expressionsanalyse von *amiC1_{Ana}* wurden die Primer Oligo846 und Oligo847 verwendet. Die Expression von *amiC2_{Ana}* wurde mittels der Primer Oligo848 und Oligo849 überprüft. Als Beladungskontrolle diente *rnpB* (Oligo130 und Oligo129).

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit eine gezielte Mutagenese von *alr0093* durchgeführt. Zudem sollte die Auswirkung einer Mutation von *amiC1_{Ana}* in *Anabaena* sp. PCC 7120 (*alr0092*) untersucht werden. Für die gezielte Mutagenese wurden interne Fragmente von *alr0092* (*amiC1_{Ana}*) und *alr0093* (*amiC2_{Ana}*) in den mobilisierbaren Vektor pRL277 kloniert und anschließend durch Konjugation in *Anabaena* sp. PCC 7120 transferiert (2.8.7.1). Die Insertion des Vektors und damit die Inaktivierung der entsprechenden Gene wurde durch einfache Rekombination realisiert. Der *Anabaena* Stamm SR477 trägt dabei eine Insertion in *amiC1_{Ana}*, SR478 verfügt über die Plasmid-Insertion in *amiC2_{Ana}* (Abb. 20A).

Durch eine PCR-Analyse konnte bestätigt werden, dass die *amiC1_{Ana}*-Mutante SR477 über keine Gesamtlängen-Kopie von *alr0092* verfügt. Das mutierte Gen war mit pRL277 zu lang, um in der PCR amplifiziert zu werden. Ebenso wurde keine Gesamtlängen-Kopie von *alr0093* in der *amiC2_{Ana}*-Mutante SR478 detektiert (Abb. 20B). Dementsprechend wurde in einer semi-quantitativen RT-PCR kein *amiC1*-Produkt in SR477 erhalten. SR478 zeigte keine Expression von *amiC2* (Abb. 20C). Zusätzlich wurde mittels semi-quantitativer RT-PCR getestet, ob die Inaktivierung eines Genes Auswirkungen auf die Expression des anderen Genes hat. Wie in Abb. 20C zu sehen ist, findet in SR477 die Expression von *amiC2_{Ana}* noch statt. Die Inaktivierung von *amiC2_{Ana}* hat ebenfalls keinen Effekt auf die Expression von *amiC1_{Ana}*.

3.1.1.3 Untersuchung der Wachstumseigenschaften von SR477 und SR478

Anabaena sp. PCC 7120 wächst in langen Filamenten, die aus mehreren 100 Einzelzellen bestehen. Die Mutation in *amiC1_{Ana}* bzw. *amiC2_{Ana}* hatte keine Auswirkungen auf die Filamentmorphologie, so dass SR477 und SR478 weiterhin als langkettige Trichome wuchsen (Abb. 22). Um zu testen, ob die zu untersuchenden Zellwand-Amidasen möglicherweise für das Zellwachstum notwendig sind, wurden Wachstumstests durchgeführt. Da die Erhöhung der Zell-Zahl proportional zur Erhöhung der optischen Dichte ist, kann diese als Wachstumsparameter dienen. Zum Vergleich des Wachstums wurden die Zellen in BG11-Medium auf eine OD₇₅₀ von 0,05 angeimpft und unter Dauerlicht bei einer Lichtintensität von 20 – 40 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ angezogen. Das Wachstum wurde bei einer OD₇₅₀ verfolgt. Wie in Abbildung 21A zu erkennen ist, hatte die Inaktivierung von *amiC1_{Ana}* bzw. *amiC2_{Ana}* kaum Auswirkungen auf die Wachstumsgeschwindigkeit. Sowohl SR477 als auch SR478 hatten ein mit dem WT vergleichbares Wachstumsverhalten auf NO_3^- als gebundene Stickstoffquelle. Dies zeigt, dass *AmiC1_{Ana}* und *AmiC2_{Ana}* auf das vegetative Wachstum keinen Einfluss haben. Zusätzlich wurde das Wachstum auf N_2 als einziger Stickstoffquelle untersucht. Dazu wurden

Ergebnisse

NO_3^- gewachsene Kulturen mit stickstofffreiem Medium gewaschen und in BG11_0 -Medium aufgenommen. Im Gegensatz zu der von Zhu *et al.* (2001) hergestellten *amiC2*-Transposonmutante konnte SR478 wie der WT ohne gebundenen Stickstoff wachsen. Hingegen führte der Entzug der gebundenen Stickstoffquelle bei SR477 innerhalb von 48 h zum Ausbleichen der Zellen und Absterben der Kultur (Abb. 21B). Dieser Phänotyp wird als Fox^- bezeichnet, da die Stickstofffixierung in Anwesenheit von Sauerstoff nicht mehr erfolgt (Ernst *et al.*, 1992).

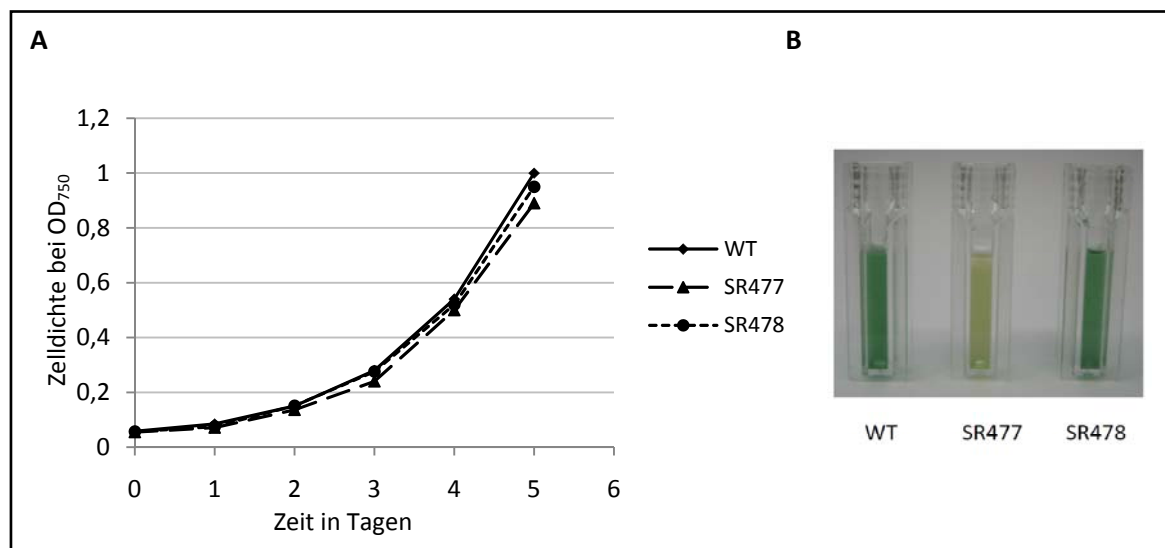


Abb. 21: Wachstumsanalyse. (A) Wachstum auf BG11 -Medium. WT, SR477 und SR478 wurden auf eine OD_{750} von 0,05 angeimpft und unter Standardbedingungen weiter kultiviert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis. (B) Küvetten mit Kulturen nach 72 h Inkubation in BG11_0 -Medium.

Um die Ursache des Fox^- -Phänotyps zu klären, wurden die Filamente lichtmikroskopisch untersucht. Bereits 24 h nach Entzug der gebundenen Stickstoffquelle konnten im WT reife Heterocysten von den vegetativen Zellen unterschieden werden. Neben den morphologischen Unterschieden zu vegetativen Zellen können Heterocysten deutlich durch den Verlust der durch die Phycobiliproteine hervorgerufenen Autofluoreszenz identifiziert werden (Abb. 22). SR478 reagierte ebenfalls innerhalb von 24 – 48 h auf den Entzug der gebundenen Stickstoffquelle und differenziert reife Heterocysten (Abb. 22). Der Anteil der Heterocysten im gesamten Filament lag 24 h nach N-Entzug bei 3,7 % bzw. 3,5 % bei WT und SR478. Nach 48 h zeigten beide Stämme einen Anteil von 7,6 % bzw. 7,8 % Heterocysten im Filament (Abb. 23).

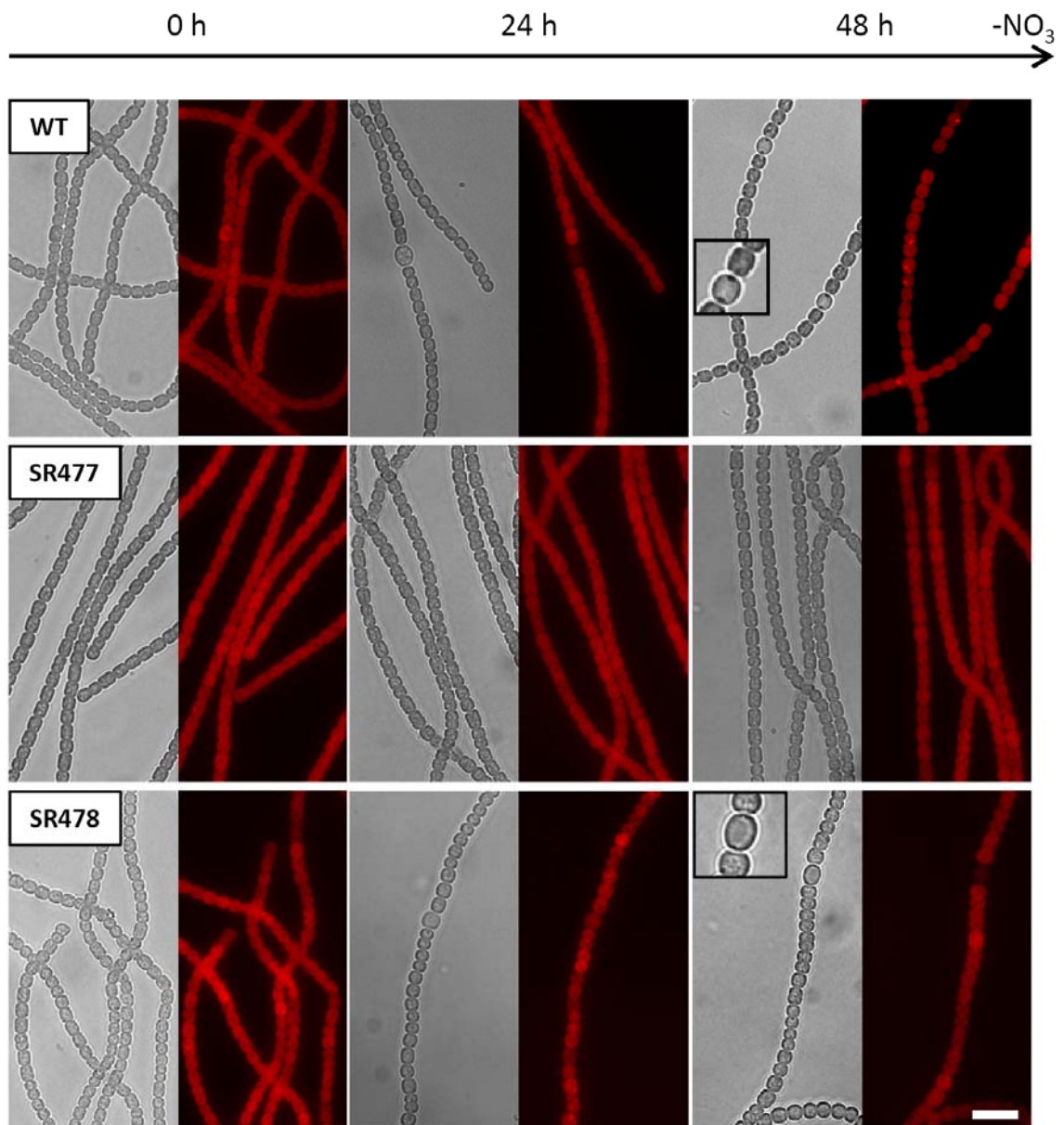


Abb. 22: Lichtmikroskopische Aufnahmen von WT, SR477 und SR478 nach Stickstoffentzug. Die Zellen wurden dreimal mit stickstofffreiem Medium gewaschen und anschließend in BG11₀-Medium aufgenommen. Durchlicht (links), Autofluoreszenz (rechts). Balken = 10 μm .

Hingegen war die Fähigkeit zur Differenzierung von Heterocysten bei SR477 stark beeinträchtigt. 24 h nach Induktion konnten weder Heterocysten detektiert, noch konnte der Beginn der Heterocystendifferenzierung durch Abnahme der Autofluoreszenz beobachtet werden (Abb. 22). Da der Abbau der Phycobiliproteine normalerweise sehr früh während der Heterocystendifferenzierung erfolgt, deuten die Ergebnisse auf eine sehr frühe Beeinträchtigung der Heterocystendifferenzierung bei SR477 hin. Auch 48 h nach Überführung der Kultur in BG11₀-Medium war der Heterocystenanteil innerhalb des Filaments im Vergleich zum WT stark verringert. Der Anteil der Heterocysten betrug nur 0,4 %

(Abb. 23). Die Klassifizierung als Heterocyste erfolgte aufgrund von licht- und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen. Daher ist nicht auszuschließen, dass die als Heterocysten identifizierten Zellen, dennoch nicht funktionsfähig waren, da die Kultur nicht wachsen konnte.

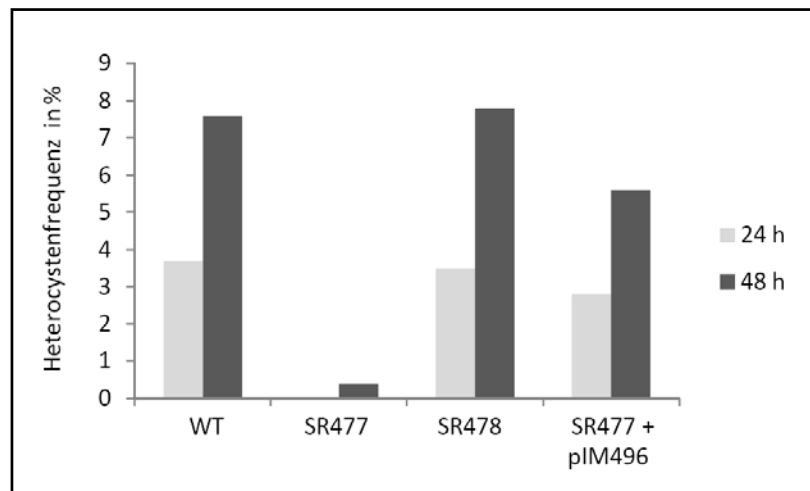


Abb. 23: Heterocystenfrequenz von WT, SR477, SR478 und SR477+pIM496 (*tat-amiC1_{Ana}-gfp*) 24 h und 48 h nach Stickstoffentzug. Für die Kalkulation der Heterocystenfrequenz wurden jeweils etwa 2000 Zellen ausgezählt.

3.1.1.4 Analyse der Heterocysten-spezifischen Zellhülle

Heterocysten sind zum Schutz der Sauerstoff-empfindlichen Nitrogenase mit einer besonderen Zellhülle ausgestattet. Eine laminare Hgl-Schicht verhindert den Einstrom von Sauerstoff. Der Schutz dieser Sauerstoffbarriere vor physikalischer und mechanischer Beanspruchung wird wiederum durch eine Schicht aus Heterocysten-spezifischen Polysacchariden (Hep) gewährleistet. Beide Bestandteile der Heterocysten-Zellhülle lassen sich spezifisch nachweisen. Die äußere Hep-Schicht kann durch Behandlung mit Alcian-Blau angefärbt werden. Die Glycolipide der Heterocysten können durch eine Chloroform-Methanol-Extraktion isoliert und über eine Dünnschichtchromatographie aufgetrennt werden. WT und SR478 zeigten nach Alcianblau-Behandlung eine deutliche Blaufärbung der Heterocystenhülle und bilden somit die Hep-Schicht. Bei der *amiC1*-Mutante SR477 war kein Anfärben einzelner Zellen im Filament sichtbar (Abb. 24A). In SR477 wird also keine Hep-Schicht synthetisiert.

Zur Analyse der Hgls wurden zunächst die Gesamtlipide 48 h nach Heterocysteninduktion isoliert. Zum Vergleich wurden zusätzlich die Glycolipide aus NH_4^+ -gewachsenen Kulturen extrahiert. Die Hgl-Synthese ist ein recht früher Prozess. Im WT können Hgls bereits 3 h nach N-Entzug nachgewiesen werden (Moslavac *et al.*, 2007). Die mit N_2 -gezogenen Filamente von

WT und SR478 synthetisierten die zwei Heterocysten-spezifischen Glycolipide (Pfeile Abb. 23B). Bei *Anabaena* sp. PCC 7120 handelt es sich dabei um 1-(O- α -D-glucopyranosyl)-3,25-hexacosanediol und 1-(O- α -D-glucopyranosyl)-3-keto-25-hexacosanol (Gambacorta *et al.*, 1996). Durch Zugabe von NH_4^+ zum Medium wurde die Differenzierung der Heterocysten und damit die Synthese beider Hgls unterdrückt. Bei SR477 hingegen konnten auch bei den in stickstofffreies Medium überführten Kulturen keine Hgls auf der Dünnschicht-Platte detektiert werden (Abb. 24B). Es unterblieb also die Synthese dieser Lipide in der SR477 Mutante.

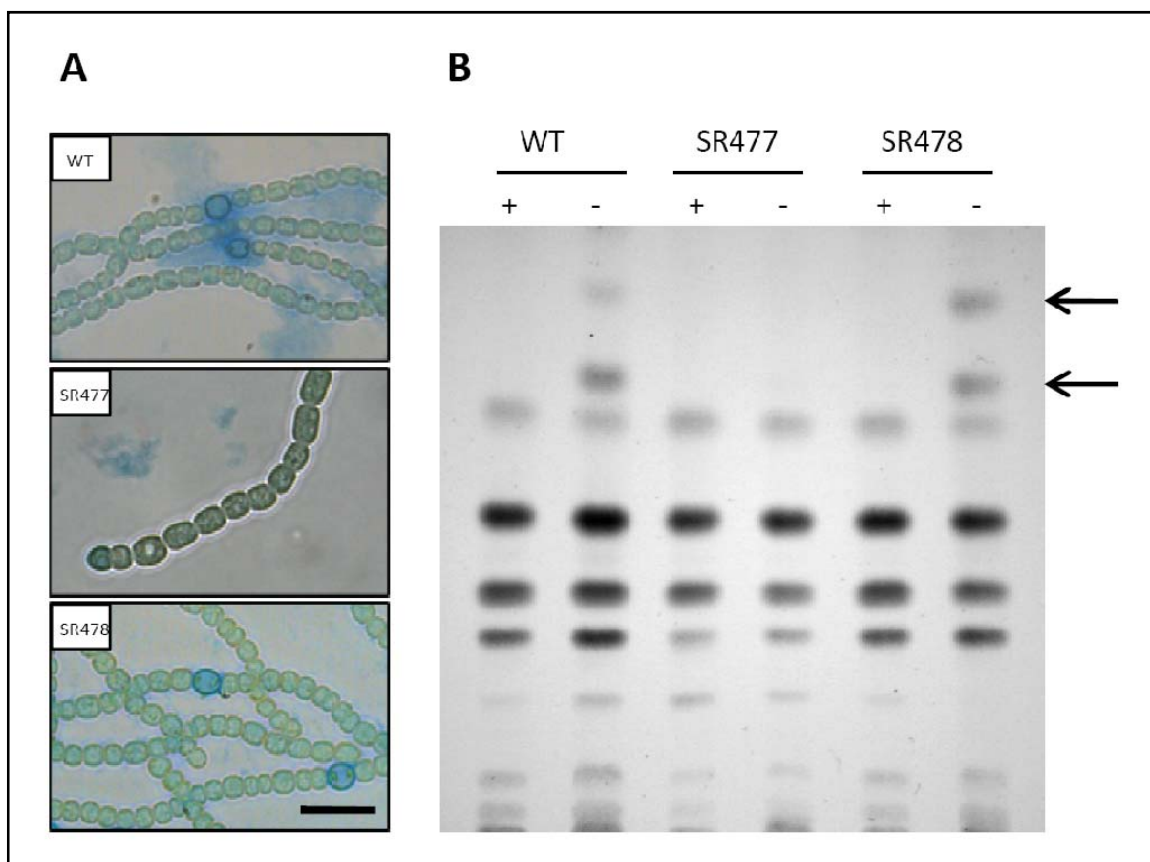


Abb. 24: Analyse der Heterocysten-spezifischen Zellhülle. (A) Alcianblau-Färbung der Filamente 48 h nach N-Entzug. (B) Dünnschichtchromatographie der Gesamtlipide vor (+) und 48 h nach (-) Stickstoffentzug. Die Pfeile markieren die Position der Heterocysten-spezifischen Glycolipide; Balken 10 μm

3.1.1.5 Komplementation von SR477

Um zu verifizieren, dass der Phänotyp tatsächlich durch Integration des Vektors in *alr0092* hervorgerufen wurde, wurde SR477 komplementiert. Dazu wurde in das Plasmid pIM471 ($P_{amiC1,2}$ -*tat-amiC1_{Ana}-gfp*-Konstrukt) ein weiterer Selektionsmarker eingefügt und das resultierende Plasmid pIM496 in die *amiC1_{Ana}*-Mutante transformiert (2.8.5). Der mit $P_{amiC1,2}$ -

tat-amiC1_{Ana}-gfp komplementierte Stamm SR477 war wieder zum diazotrophen Wachstum in der Lage und zeigte mit 2,8 % nach 24 h und mit 5,6 % nach 48 h eine annähernd gleiche Heterocystenfrequenz wie der WT (Abb. 23; 25).

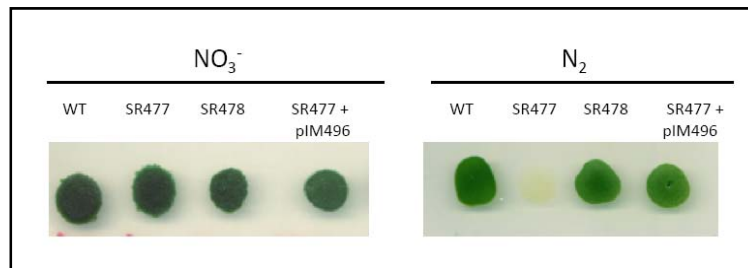


Abb. 25: Wachstumstest auf Agar-Medium mit NO_3^- oder N_2 als Stickstoffquelle. Jeweils 10 μl Zellen mit einer Konzentration von 1 μg Chl a /ml wurden auf Agarplatten getropft und unter Standardbedingungen für 7 Tage inkubiert.

3.1.1.6 Untersuchung der Lysozymempfindlichkeit von SR477 und SR478

Lysozym spaltet die β 1,4-glycosidische Bindung zwischen GlcNAc und MurNAc. Bei Gram-negativen Bakterien wirkt die äußere Membran jedoch als natürliche Barriere für Lysozym und verhindert den enzymatischen Peptidoglykan-Abbau durch das Enzym. Eine veränderte Empfindlichkeit gegenüber Lysozym deutet daher auf eine Abweichung der ursprünglichen Integrität der äußeren Membran hin (Heidrich *et al.*, 2002). Zum Vergleich der Lysozymempfindlichkeit von WT, SR477 und SR478 wurden jeweils 300 μl Zellen einer Chlorophyll a (Chl a)-Konzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mittels Glasperlen auf eine BG11-Agarplatte verteilt. Anschließend wurden Cellulosetestplättchen auf die angeimpfte Platte platziert und mit jeweils 10 μl verschiedener Lysozymkonzentrationen (0,1; 0,5; 1; 2; 4 mg Lysozym/ml) versetzt. Die Platten wurden eine Woche bei 27 °C inkubiert.

Beim WT hatten Lysozymkonzentrationen von 0,1 und 0,5 mg/ml keine Auswirkung auf das Wachstum. Erst eine Lysozymkonzentration von 1 mg/ml verursachte beim WT einen Hemmhof (Abb. 26). Die Inaktivierung von *amiC1_{Ana}* und *amiC2_{Ana}* verursachte hingegen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Lysozym. Bei SR477 zeigte bereits eine Lysozymkonzentration von 0,1 mg/ml leichte Auswirkungen auf das Wachstum (Abb. 26). Bei SR478 war der Effekt auf Zugabe von Lysozym nicht so groß. Hier zeigte sich die antimikrobielle Wirkung des Lysozyms ab einer Konzentration von 0,5 mg/ml (Abb. 26). Die gesteigerte Lysozymempfindlichkeit der Mutanten deutet auf eine gestörte Barrierefunktion der äußeren Membran hin.



Abb. 26: Untersuchung der Lysozymempfindlichkeit. Jeweils 300 μ l einer Chl a -Konzentration von 2 μ g/ml wurden auf Agar-Platten verteilt und mit Celluloseplättchen verschiedener Lysozymkonzentration (in mg/ml) für eine Woche inkubiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis.

3.1.1.7 Untersuchung der Ultrastruktur mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie

Zellwand-Amidasen katalysieren die Hydrolyse spezifischer Bindungen im Murein und sind damit potentiell strukturverändernde Enzyme (Singh & Montgomery, 2011). Mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie sollte die Ultrastruktur der Filamente von SR477 und SR478 im Vergleich zum WT untersucht werden. Bei filamentösen Cyanobakterien umgibt die äußere Membran das gesamte Filament und generiert dadurch ein kontinuierliches Periplasma (Flores *et al.*, 2006). Diese durchgängige äußere Membran war auch bei SR477 und SR478 zu erkennen (Abb. 27). Den Wachstumsexperimenten entsprechend zeigte die Ultrastruktur der Amidase-Mutanten keine Beeinträchtigung bei der Zellteilung. Eine koordinierte Einschnürung der Tochterzellen, zu beiden Seiten des entstehenden Septums war sichtbar (Abb. 27B). Im Vergleich zum WT erschienen in Filamenten von SR477 die Septen zwischen älteren Nachbarzellen oft etwas breiter (Abb. 27 B). Zur Quantifizierung wurden

daher jeweils 10 Septen zwischen vegetativen Zellen von WT bzw. SR477 ausgemessen. Im Durchschnitt zeigte SR477 um 20 % dickere Septen als der WT. Es gilt jedoch zu beachten, dass die Breite der Septen in den TEM-Präparaten auch stark von der Schnittebene abhängt.

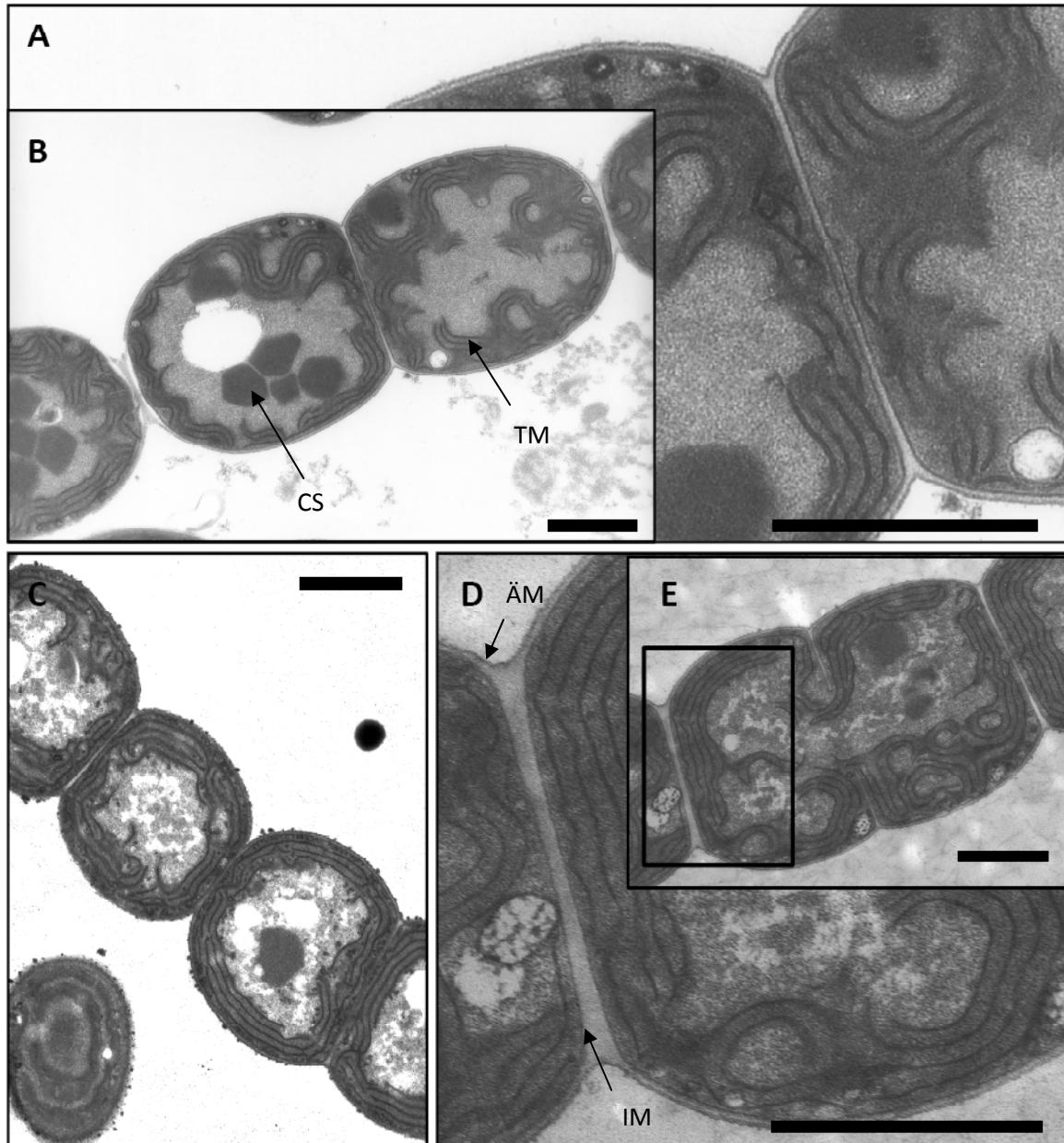


Abb. 27: Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von WT, SR477 und 478 bei Wachstum auf NO_3^- . (A) Vergrößerungsausschnitt von B, (B) WT, (C) SR478, (D) Vergrößerungsausschnitt von E, (E) SR477. ÄM, äußeren Membran; CS, Carboxysomen; IM, innere Membran; TM, Thylakoid-Membran. Balken = 1 μm . (Aufnahmen A & B von Iris Maldener zur Verfügung gestellt.)

Die Heterocysten von SR478, unterschieden sich nicht in der Ultrastruktur der Heterocysten vom WT (Abb. 28A,C). Die Zellhülle der Heterocysten verfügte sowohl über die Hgl-, als auch über die Hep-Schicht. Die Pole der Heterocysten waren zu den benachbarten vegetativen Zellen typisch verjüngt (Halskanal). Auch die intrazelluläre Umorientierung der Thylakoid-

Membranen war bei SR478 in den Heterocysten zu beobachten. Darüber hinaus erfolgte am Halskanal die Einlagerung des polaren Cyanophycin-Granulums und die Rekrutierung der Honigwabenmembran. Im Lichtmikroskop konnten nur sehr wenige Heterocysten in SR477 beim Stickstoffmangel identifiziert werden. In den hoch aufgelösten Aufnahmen der Filamente wurden keinerlei Vorstufen von Heterocysten ausgemacht. In den Zellen von SR477 waren zahlreiche Glycogen Granula sichtbar, ein typisches Merkmal von Fox^- -Mutanten (Valladares *et al.*, 2007). Da Stickstoff als wichtiger Wachstumsfaktor fehlt, wird überschüssiger Kohlenstoff als Speicherstoff eingelagert (Ernst *et al.*, 1984).

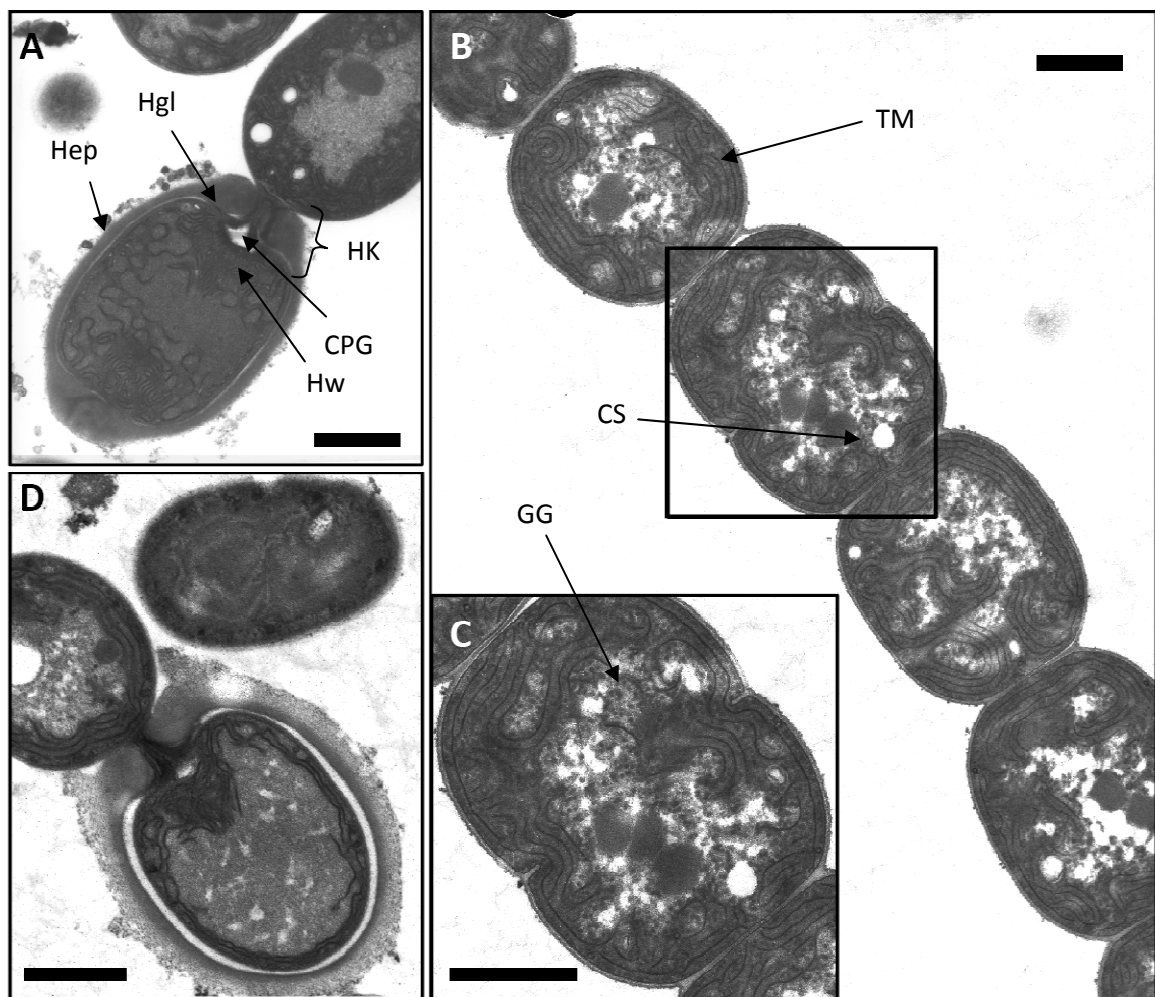


Abb. 28: Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von WT, SR477 und SR478 48 h nach N-Entzug. (A) WT, (B) SR477, (C) Vergrößerungsausschnitt von (B), (D) SR478. CPG, Cyanophycin-Granulum; CS, Carboxysomen; GG, Glycogen Granula; Hep, Heterocysten-Polysaccharide; Hgl, Heterocysten-Glycolipide; Hw, Honigwabenmembran; HK, Halskanal; TM, Thylakoid-Membran; Balken = 1 µm.

3.1.1.8 Expressionsanalyse Heterocysten-spezifischer Gene

Die Fixierung von Luftstickstoff ist ein sehr energieaufwendiger Prozess. Einerseits müssen für die Reduktion eines N₂-Moleküls zu NH₃ 16 ATP bereitgestellt werden (Kneip *et al.*, 2007). Andererseits verbrauchen filamentösen Cyanobakterien wie *Anabaena* sp. PCC 7120 zusätzlich für die Ausbildung von Heterocysten Energie und Baustoffe. Durch eine genau festgelegte Regulationskaskade wird sicher gestellt, dass dieser Weg nur bei Mangel an gebundenen Stickstoffverbindungen initiiert wird. Der globale Stickstoffregulator NtcA wirkt als aktivierender Transkriptionsfaktor auf Gene des Stickstoffmetabolismus und der Heterocystendifferenzierung. Nach Wahrnehmung des Stickstoffhungers, der durch Anstieg des 2-Oxoglutaratspiegels (OG) angezeigt wird, aktiviert NtcA die Expression von *hetR* (Herrero *et al.*, 2001). HetR kontrolliert anschließend Heterocysten-spezifische Gene, darunter Gene für die Ausbildung der Heterocystenhülle. Beide Faktoren wirken auf die Expression der meisten bekannten Heterocysten-spezifischen Gene (Kumar *et al.*, 2010).

Um zu untersuchen ob in der Mutante SR477 die Heterocystendifferenzierung auf Ebene der Expression dieser beiden regulatorischen Gene gestört ist, wurde eine semi-quantitative RT-PCR durchgeführt werden. Dazu wurde Gesamt-RNA aus dem WT, SR477 und SR478 von verschiedenen, definierten Zeitpunkten nach Heterocysteninduktion aufgereinigt. Zur Bestätigung des vollständigen DNA Verdaus während der RNA-Präparation, wurde eine Standard-PCR mit RNA als Matrize durchgeführt. Als Kontrolle der verwendeten RNA wurde die RT-PCR mit Primern für *rnpB* wiederholt. Bei *rnpB* handelt es sich um die katalytische RNA der RNase P, die konstitutiv exprimiert wird.

Innerhalb der ersten drei Stunden nach N-Entzug wurde die Expression von *ntcA* im WT gesteigert. Diese Regulation konnte auch in SR477 und SR478 gefunden werden. Während die Genexpression von *ntcA* im WT und bei SR478 9h nach Induktionsbeginn das Maximum aufweist, war bei SR477 dieses leicht nach hinten verschoben (Abb. 29). Ebenso scheint die Regulation von *hetR* durch die Inaktivierung von *amiC1_{Ana}* oder *amiC2_{Ana}* nicht beeinträchtigt. Drei Stunden nach Entzug der gebundenen Stickstoffquelle war im WT, in SR477 und auch in SR478 Induktion von *hetR* sichtbar.

Zusätzlich zur Expression der regulatorischen Gene *ntcA* und *hetR* wurde die Expression von *hepA* untersucht. Das Gen codiert für einen ABC-Transporter und ist essentiell für die Auflagerung der Hep-Schicht (Zhu *et al.*, 2001). Der WT zeigte etwa 6 h nach Heterocysteninduktion den Beginn der *hepA*-Expression. Bei SR478 konnte ein mit dem WT vergleichbarer Expressionsverlauf von *hepA* detektiert werden. Im Gegensatz dazu war die

hepA Expression in SR477 gestört. Erst nach 24 h zeigte SR477 eine stark verspätet, aber vorhanden Expression von *hepA* (Abb. 29).

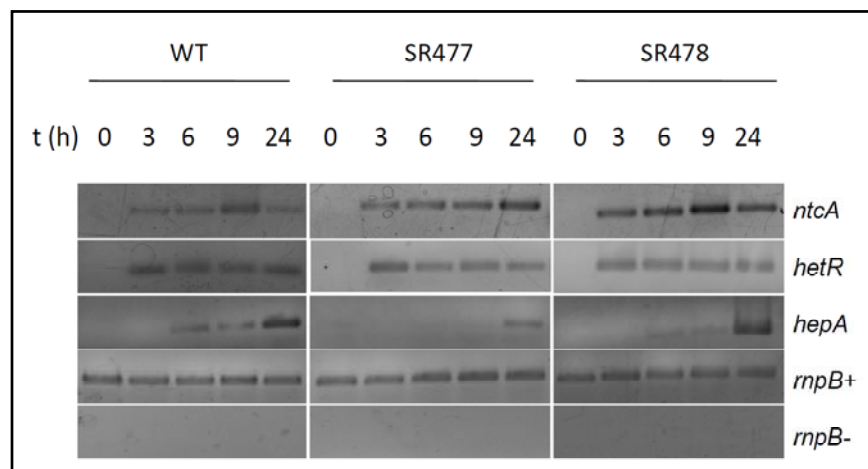


Abb. 29: Expressionsanalyse von *ntcA*, *hetR* und *hepA* in WT, SR477 und SR478 nach N-Entzug. Die angegebene Zeit in h entspricht dem Zeitpunkt nach Heterocysteninduktion. Die Expression von *ntcA* wurden mittels der Primer Oligo857 und Oligo858 verfolgt. Für die Expressionsanalyse von *hetR* wurden Oligo696 und Oligo897 verwendet. Der Expressionsverlauf von *hepA* wurde mithilfe der Primer Oligo850 und Oligo851 überprüft. Als Auftragskontrolle diente *rnpB* (Oligo130 und Oligo129).

3.1.1.9 Untersuchung der Zell-Zell-Kommunikation innerhalb des Filaments

Für die Differenzierung von vegetativen Zellen zu Heterocysten ist eine funktionierende Zell-Zell-Kommunikation wahrscheinlich essentiell. Die Koordination des Differenzierungsprozess bedarf des Austausches und der Weiterleitung von Signalmolekülen und regulatorischen Metaboliten. Zur Beurteilung der intrazellulären Zell-Zell-Kommunikation der Mutanten wurden FRAP-Experimente durchgeführt (2.10.1). Nach Aufnahme des nicht-fluoreszierenden Calcein-AM-Derivats wird durch intrazelluläre Esterasen daraus das 626 Da große, fluoreszierende Calcein gebildet. Der entstehende hydrophile Farbstoff kann die cytoplasmatische Membran nicht mehr passieren und verbleibt in der Zelle. Für die FRAP-Experimente wurde der fluoreszierende Calcein-Farbstoff in einzelnen Zellen innerhalb des Filaments durch einen gezielten Laserstrahl ausgebleicht und der Rückfluss des fluoreszierenden Calceins beobachtet. Da durch die Laserbehandlung ausgebleichtes Calcein nicht mehr in seine fluoreszierende Form revertiert, zeigt demnach die wiedererlangte Fluoreszenz den Einstrom von aktivem Calcein aus Nachbarzellen über direkte Zell-Zell-Kontakte (Mullineaux *et al.*, 2008).

Im WT wurde nach dem Ausbleichen einzelner Zellen im Filament die Fluoreszenz sehr schnell wieder hergestellt (Abb. 30). Bereits in weniger als 10 s war der Rückfluss von fluoreszierendem Calcein von den Nachbarzellen in die gebleichte Zelle sichtbar. Innerhalb

von 80 s konnte eine vollständige Regenerierung der Calcein-Fluoreszenz beobachtet werden. Im Gegensatz dazu erfolgte innerhalb des gemessenen Zeitraums (80 s) keine Wiederherstellung der Calcein-Fluoreszenz in den ausgebleichten Zellen der *amiC1_{Ana}*-Mutante SR477 (Abb. 30). Die Quantifizierung der FRAP-Ergebnisse von unterschiedlichen Filamenten verdeutlicht die starke Beeinträchtigung des Calcein-Austausches bei SR477 im Vergleich zum WT (Tab. 5).

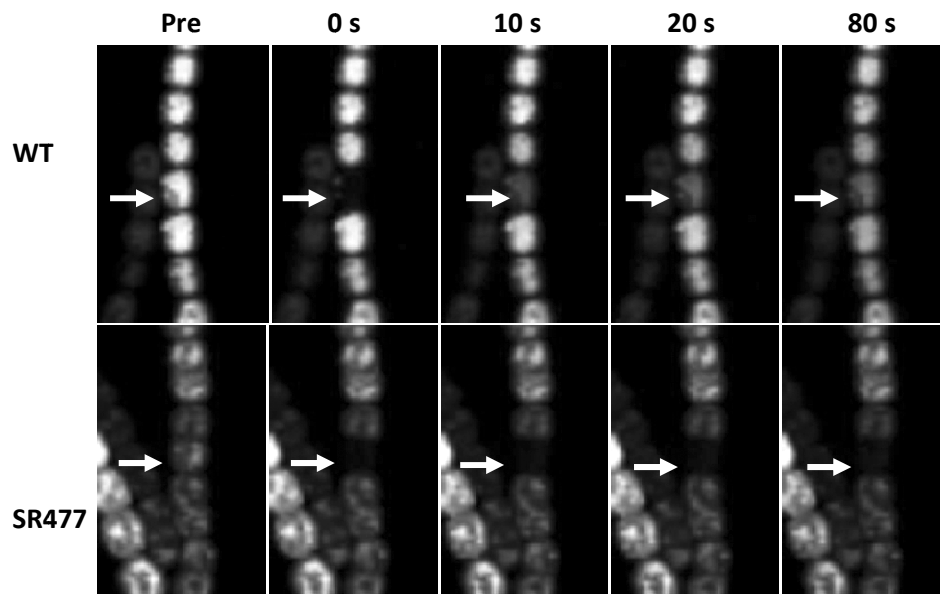


Abb. 30: FRAP-Analysen mit Calcein-beladenen Zellen von WT und SR477. Jeweils 0,5 ml Zellen wurden mit 10 μ l Calcein-AM (1mg/ml) inkubiert und auf Agar-beschichtete Objektträger überführt. Die Abbildung zeigt ein Filament vor (pre), direkt nach (0 s) und 10 s, 20 s bzw. 80 s nach dem Ausbleichen der Zelle. Der Pfeil deutet auf die gebleichte Zelle.

Tab. 5: Quantifizierung der FRAP-Ergebnisse von WT und SR477. Zur Quantifizierung der FRAP-Ergebnisse wurde die Zeit berechnet, bei der $\frac{1}{4}$ des Gleichgewichts (vollständiger Rückfluss in die gebleichte Zelle) erreicht wurde (= $t_{\frac{1}{4}}$).

	$t_{\frac{1}{4}}$ (in s)		$t_{\frac{1}{4}}$ (in s)
WT-1	4,8	SR477-1	> 80
WT-2	1,4	SR477-2	> 80
WT-3	2,4	SR477-3	> 80
WT-4	10,2	SR477-4	> 80
WT-5	11,5	SR477-5	> 80
WT-6	0,8	SR477-6	> 80
WT-7	1,6	SR477-7	> 80
Durchschnitt	4,67	Durchschnitt	> 80

In einem parallelen Experiment wurde der intrazelluläre Stoffaustausch bei WT und SR478 untersucht. Es wurde deutlich, dass der Calcein-Austausch in der *amiC2_{Ana}*-Mutante SR478

weder im vegetativen Wachstum noch bei Wachstum auf N₂ gestört war (Abb. 31, 32). Bereits in weniger als 20 s konnte die vollständige Regenerierung von fluoreszierendem Calcein beobachtet werden.

Zur Quantifizierung der FRAP-Ergebnisse wurde die Zeit berechnet, bei der $\frac{1}{4}$ des Gleichgewichts (vollständiger Rückfluss) erreicht wurde ($t_{\frac{1}{4}}$) (Tab. 6).

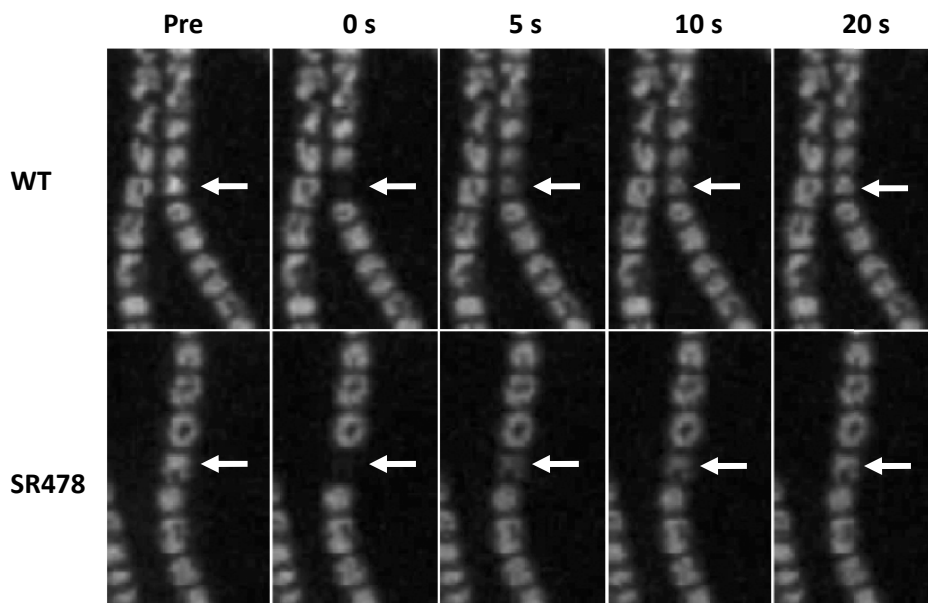


Abb. 31: FRAP-Analysen mit Calcein-beladenen Zellen von WT und SR478. Jeweils 0,5 ml Zellen wurden mit 10 μ l Calcein-AM (1mg/ml) inkubiert und auf Agar-beschichtete Objektträger überführt. Die Abbildung zeigt ein Filament vor (pre), direkt nach (0 s) und 5 s, 10 s bzw. 20 s nach dem Ausbleichen der Zelle. Der Pfeil deutet auf die gebleichte Zelle.

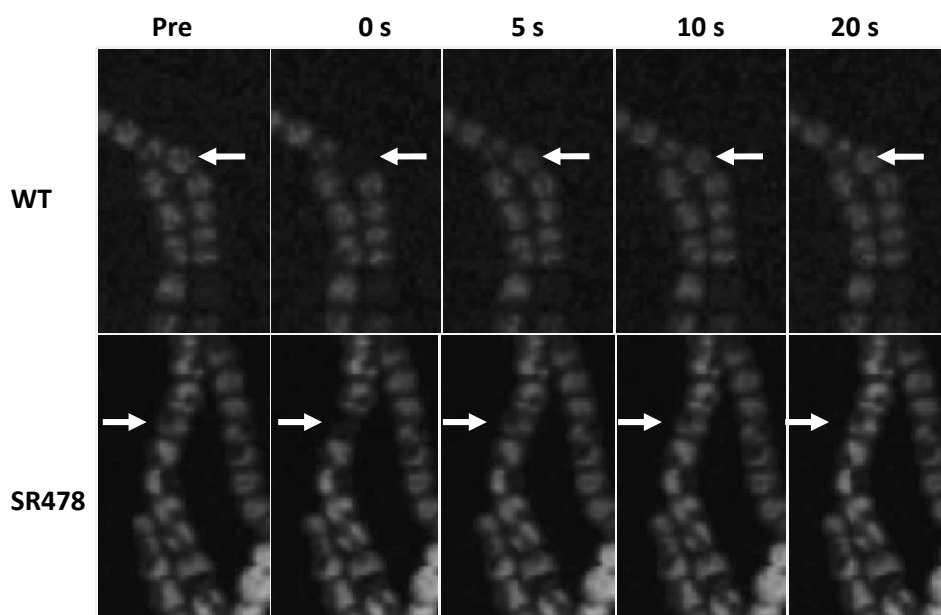


Abb. 32: FRAP-Analysen mit Calcein-beladenen Zellen von WT und SR478 nach N-Entzug. Jeweils 0,5 ml Zellen wurden mit 10 μ l Calcein-AM (1mg/ml) inkubiert und auf Agar-beschichtete Objektträger überführt. Die Abbildung zeigt ein Filament vor (pre), direkt nach (0 s) und 5 s, 10 s bzw. 20 s nach dem Ausbleichen der Zelle. Der Pfeil deutet auf die gebleichte Zelle.

Tab. 6: Quantifizierung der FRAP-Ergebnisse von WT und SR478. Zur Quantifizierung der FRAP-Ergebnisse wurde die Zeit berechnet, bei der $\frac{1}{4}$ des Gleichgewichts (vollständiger Rückfluss in die gebleichte Zelle) erreicht wurde (= $t \frac{1}{4}$).

Wachstum mit gebundener Stickstoffquelle				Wachstum ohne gebundene Stickstoffquelle			
	$t \frac{1}{4}$ (in s)		$t \frac{1}{4}$ (in s)		$t \frac{1}{4}$ (in s)		$t \frac{1}{4}$ (in s)
WT-1	3,1	SR478-1	1,9	WT-1	1	SR478-1	0,8
WT-2	1,6	SR478-2	2,2	WT-2	0,6	SR478-2	2,5
WT-3	0,9	SR478-3	3	WT-3	0,7	SR478-3	1,5
WT-4	0,9	SR478-4	1,8	WT-4	0,4	SR478-4	1,2
WT-5	2,1	SR478-5	2,3	WT-5	1,7	SR478-5	0,8
WT-6	0,8	SR478-6	3,4	WT-6	1,7	SR478-6	0,6
		SR478-7	3	WT-7	1,2	SR478-7	
		SR478-8	2,6				
Durchschnitt	1,57	Durchschnitt	2,52	Durchschnitt	1,04	Durchschnitt	1,23

3.1.10 Überexpression von *amiC1* und *amiC2*

Für die Überexpression von *amiC1_{Ana}* und *amiC2_{Ana}* wurden Stämme generiert, bei denen *amiC1_{Ana}* (SR484) bzw. *amiC2_{Ana}* (SR485) unter Kontrolle des Cu²⁺ induzierbaren *petE*-Promotors steht (2.8.3). Das Gen *petE* codiert für Plastocyanin dessen Expression durch Kupfer induziert wird (Hu *et al.*, 2007). RT-PCR-Analysen bestätigten, dass die Transkripte von *amiC1_{Ana}* und *amiC2_{Ana}* in SR484 bzw. SR485 nach Zugabe von 2 μ M CuSO₄ stark erhöht waren (Abb. 33). Darüber hinaus zeigte diese Analyse, dass die Überexpression einer Amidase keinen Einfluss auf die Expression der zweiten Amidase hatte.

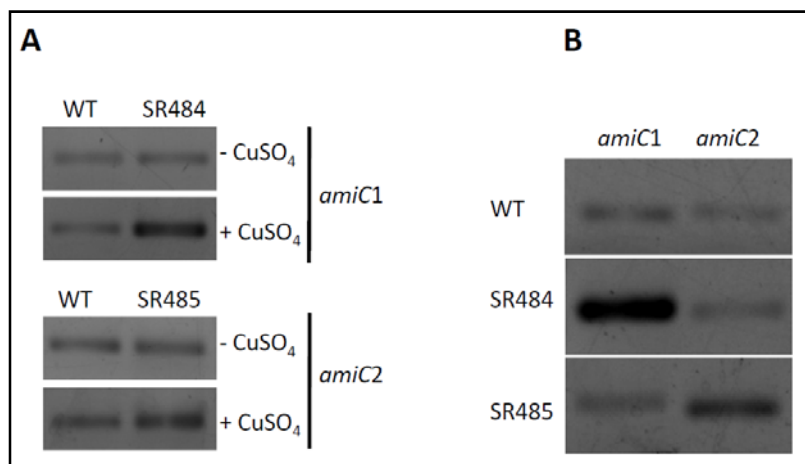


Abb. 33: Expressionsanalyse mittels RT-PCR von den Überexpressionsstämmen SR484 und SR485 im Vergleich zum WT. Für die Expressionsanalyse von *amiC1_{Ana}* wurden die Primer Oligo846 und Oligo847 verwendet. Die Expression von *amiC2_{Ana}* wurde mittels der Primer Oligo848 und Oligo849 überprüft.

Die Überexpression der Amidasen *AmiC1_{Ana}* und *AmiC2_{Ana}* wurden durch Zugabe von Cu^{2+} induziert (2.6.2.15). In SR484 verursachte die Überexpression von *amiC1_{Ana}* eine Hemmung des Wachstums auf Agar-Platten. In Flüssigmedium stieg die Zell-Zahl 24 h nach Zugabe von CuSO_4 auf ein dem WT vergleichbares Niveau. Danach nahm die Zell-Zahl jedoch schnell wieder ab (Abb. 34). Die Überexpression von *amiC1_{Ana}* führte also nicht nur zum Wachstumsstopp, vielmehr verursachte sie den Zelltod.

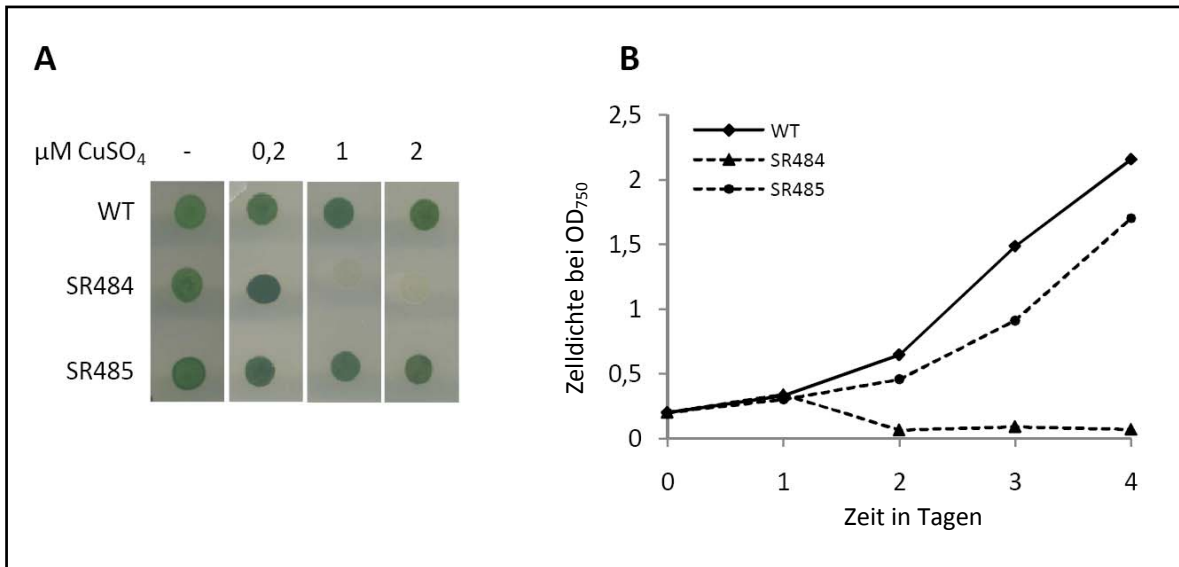


Abb. 34: Überexpression von *amiC1_{Ana}* und *amiC2_{Ana}*. (A) Tropfttest auf Agarplatten mit verschiedener CuSO_4 -Konzentration. Jeweils 10 μl Zellen mit einer Konzentration von 1 μg Chla/ml wurden aufgetropft. (B) Wachstum in flüssigem Medium. Die Kulturen wurden auf eine OD_{750} von 0,2 angeimpft und mit 2 μM CuSO_4 induziert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis.

Lichtmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die Zellen von SR484 innerhalb des Filaments durch die Überexpression von *amiC1_{Ana}* stark gestaucht waren. Zusätzlich waren die Filamente fragmentiert und bestanden größtenteils aus 10 – 20 Zellen (Abb. 35). Die Überexpression von *amiC2_{Ana}* hatte nur geringe Auswirkungen auf das Wachstum. SR485 zeigte keine Wachstumsdefizite auf Festmedium. Die Wachstumsgeschwindigkeit im flüssigen Medium war etwas verringert im Vergleich zum WT (Abb. 34). Mikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die Überexpression von *amiC2_{Ana}* nicht zur Fragmentierung der Filamente führte, die einzelnen Zellen im Filament von SR485 wiesen jedoch ebenfalls eine gestauchte Morphologie auf. Diese gedrungene Zellform war auch schon vor Induktion mit 2 μM CuSO_4 bei beiden Stämmen sichtbar (Abb. 35). Die Überexpressionskonstrukte wurden in den WT-Hintergrund transformiert, so dass zusätzlich zu den Cu^{2+} -induzierbaren Amidase-Genen, auch das WT-Gen mit dem nativen Promotor existierte. Da die vollständige Entfernung von Kupfer

aus dem Medium schwierig ist, kommt es wahrscheinlich schon ohne Extrazugabe von CuSO_4 zur geringen *amiC1*- bzw. *amiC2*-Überexpression.

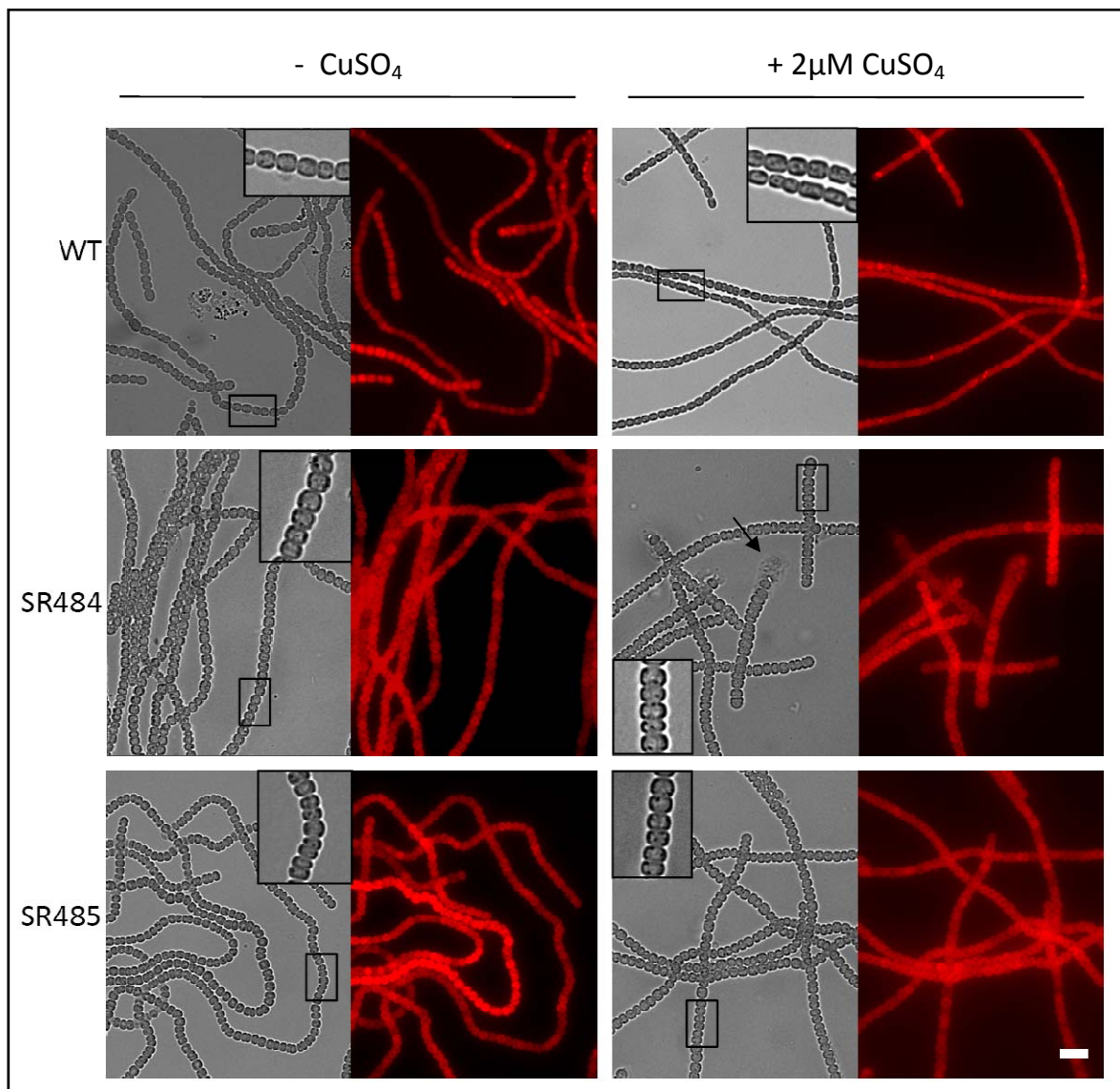


Abb. 35: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Filamenten des WT und der Mutanten SR484 und SR485 vor und 2 Tage nach Zugabe von CuSO_4 . Durchlicht (links), Autofluoreszenz (rechts). Pfeil deutet auf lysierende Zellen hin. Balken 10 μm .

3.1.2 Lokalisation von AmiC2 in verschiedenen Differenzierungsstadien von *N. punctiforme*

In *N. punctiforme* wurde gezeigt, dass die Inaktivierung von *amiC2* den Verlust des gesamten Differenzierungspotentials zur Folge hat (Lehner *et al.*, 2011). Da die Zellwand-Amidase also scheinbar für die Zelldifferenzierung eine essentielle Rolle spielt, sollte die Lokalisation von AmiC2 in *N. punctiforme* in vegetativen Filamenten und den Differenzierungsformen

Heterocysten, Hormogonien und Akineten untersucht werden. Dazu wurde ein Konstrukt angefertigt, das für eine C-terminal translationale Fusion von AmiC2 mit einem Gfp auf dem mobilisierbaren, selbst-replizierbaren Vektor pSCR202 codiert. Da Gfp nicht im Periplasma zum aktiven, fluoreszierenden Protein gefaltet werden kann (Feilmeier *et al.*, 2000) und damit als bereits gefaltetes Protein transportiert werden muss, wurde die Sec-Signalsequenz von AmiC2 durch die Tat-Signalsequenz eines periplasmatischen Bindeproteins (NpR2356) ersetzt. Um die Amidase unter den nativen Bedingungen zu exprimieren, wurde zusätzlich die wahrscheinliche Promotorregion in Leserichtung vor *tat-amiC2-gfp* kloniert (pIM469). Wie bei *Anabaena* sp. PCC 7120 lokalisierte AmiC2-Gfp in vegetativen Filamenten von *N. punctiforme* in den Septen junger Tochterzellen und an den sich einschnürenden Tochterzellen (Abb. 36). Zur Induktion von Heterocysten, wurde die Kultur in stickstofffreies Medium überführt. Nach etwa 12 h war die Gfp-Fluoreszenz in den Zellwänden von Proheterocysten zu erkennen (Abb. 37). An den angrenzenden Nachbarzellen war 12 h nach N-Entzug hingegen keine Gfp-Fluoreszenz mehr detektierbar (Abb. 37).

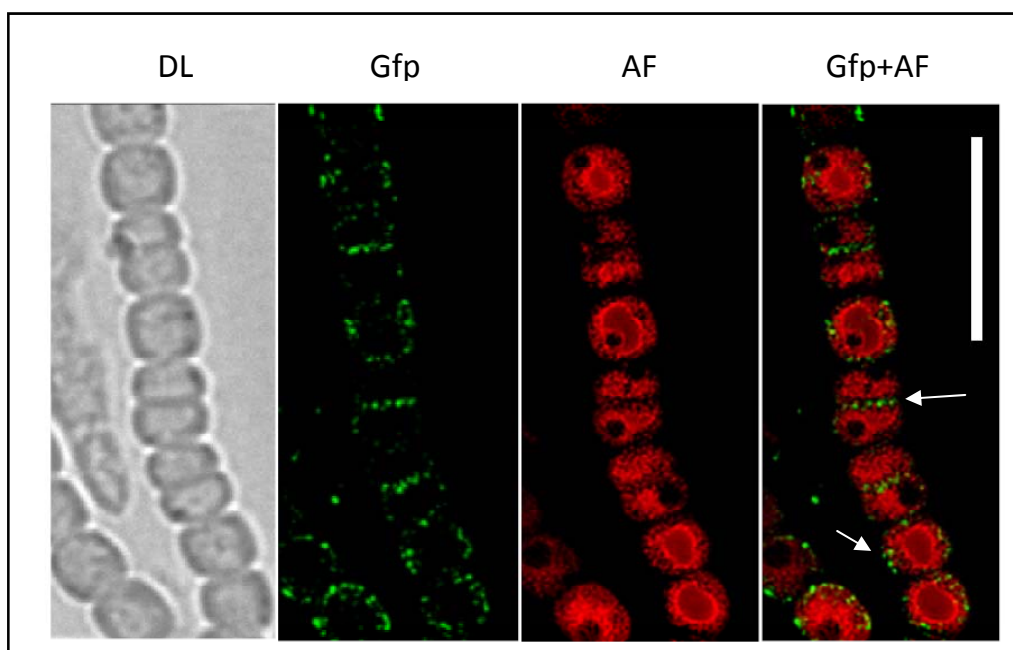


Abb. 36: Subzelluläre Lokalisation von AmiC2 in vegetativen Filamenten von *N. punctiforme*. DL, Durchlicht; Gfp, Gfp-Fluoreszenz; AF, Autofluoreszenz; Gfp+AF, Überlagerung des Gfp-Signals mit der Autofluoreszenz. Die Pfeile deuten auf Septen junger Tochterzellen sowie auf eine sich beginnende Einschnürung. Balken = 10 µm

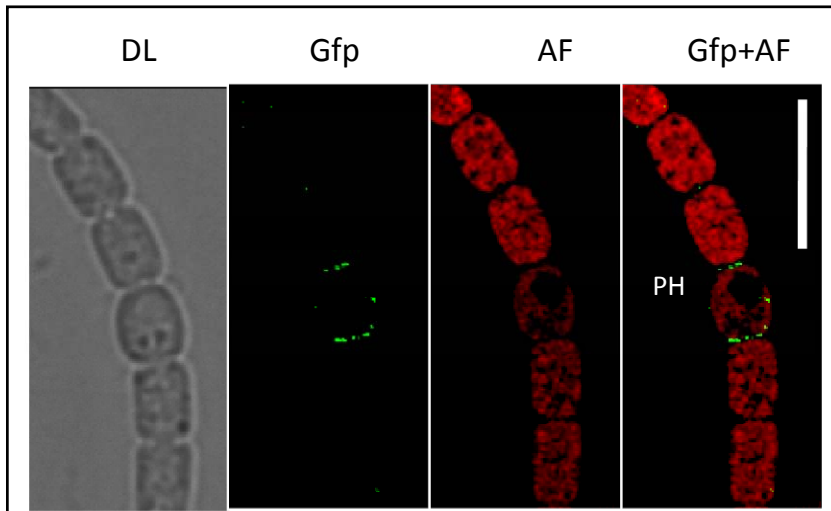


Abb. 37: Subzelluläre Lokalisation von AmiC2 von *N. punctiforme* nach N-Entzug. DL, Durchlicht; Gfp, Gfp-Fluoreszenz; AF, Autofluoreszenz; Gfp+AF, Überlagerung des Gfp-Signals mit der Autofluoreszenz. PH, Proheterocyste. Balken = 10 μ m

Die Untersuchung der AmiC2 Lokalisation erfolgte 24 h nach Hormogonieninduktion durch Verdünnung einer vegetativen Kultur in frisches stickstoffreies A+A/4 Medium. Die Zelldifferenzierung von vegetativen Filamenten zu Hormogonien geht mit einer nahezu gleichzeitigen Zellteilung aller Zellen des Filaments einher. In Abbildung 38 sieht man deutlich, dass sich die Gfp-Fluoreszenz außerhalb der intrazellulären Autofluoreszenz befindet, und sich über das gesamte Septum erstreckt. Zusätzlich akkumuliert sich AmiC2-Gfp an der Spitze der endständigen Zelle des Filaments (Abb. 38).

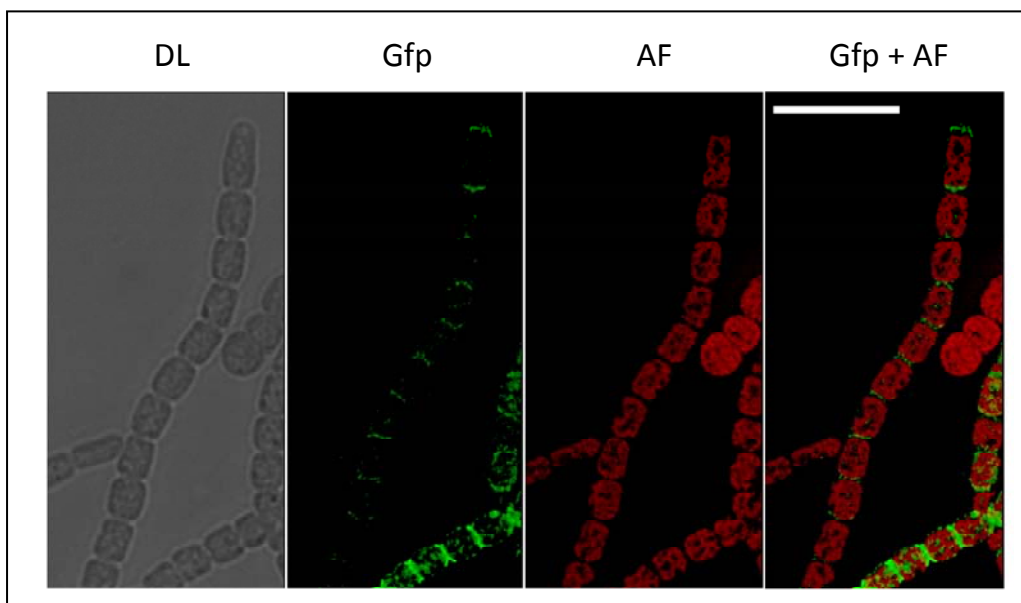


Abb. 38: Subzelluläre Lokalisation von AmiC2 in Hormogonien von *N. punctiforme*. Hormogonien-differenzierung wurde durch Verdünnung der Ausgangskultur induziert. Die Lokalisationsanalysen wurden 24 h nach Induktionsbeginn durchgeführt. DL, Durchlicht; Gfp, Gfp-Fluoreszenz; AF, Autofluoreszenz; Gfp+AF, Überlagerung des Gfp-Signals mit der Autofluoreszenz. Balken = 10 μ m

Zur Analyse der Lokalisation von AmiC2 in reifen Akineten wurde eine vegetative Kultur von *N. punctiforme* in Phosphat-freies Medium überführt und nach zwei Wochen untersucht. In der Kultur waren reife Akineten deutlich durch die intrazellulären Granula und die erleichterte Fragmentierung von vegetativen Filamenten zu unterscheiden. In reifen Akineten wurde keine Gfp-Fluoreszenz detektiert (Abb. 39).

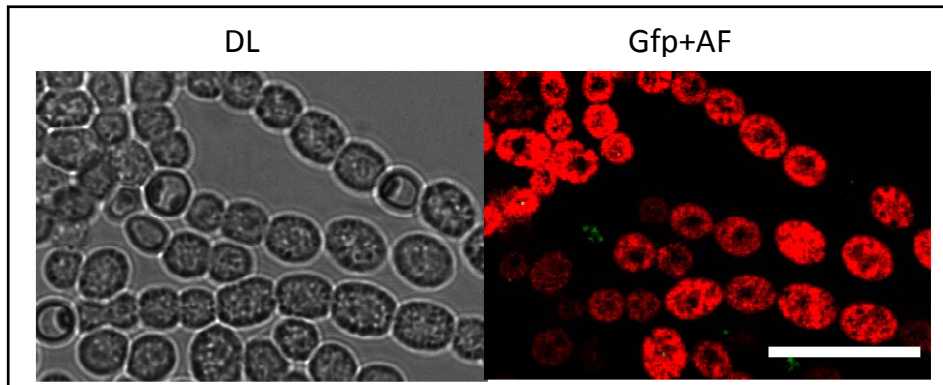


Abb. 39: Subzelluläre Lokalisation von AmiC2 in Akineten. Akinetendifferenzierung wurde durch Überführung einer vegetativen Kultur in Phosphat-freies Medium induziert. Die Lokalisationsanalysen wurden zwei Wochen nach Induktionsbeginn durchgeführt. DL, Durchlicht; Gfp+AF, Überlagerung des Gfp-Signals mit der Autofluoreszenz. Balken = 10 μ m

3.2 Lokalisation von SepJ_N in verschiedenen Differenzierungsstadien von *N. punctiforme*

Das Protein SepJ ist möglicherweise Teil von Zell-Zell-verbindenden Strukturen oder an dessen Ausbildung beteiligt (Flores *et al.*, 2007; Mullineaux *et al.*, 2008). Bei *Anabaena* sp. PCC 7120 konnte gezeigt werden, dass SepJ (Alr2338) in den Septen zwischen vegetativen Zellen sowie zwischen vegetativen Zellen und Heterocysten lokalisiert ist (Flores *et al.*, 2007). Um die Rolle von SepJ-ähnliche Proteinen in weiteren filamentösen Cyanobakterien zu untersuchen, sollte zunächst ein SepJ-Homologes in *N. punctiforme* identifiziert werden. Durch Computer-gestützte BLAST-Vergleiche von Alr2238 mit der Proteindatenbank von *N. punctiforme* konnte ein Protein identifiziert werden, das eine hohe Sequenzübereinstimmung zu Alr2238 aufweist. NpR1723 wird durch ein 2340 bp großes Gen kodiert und besteht damit aus 779 Aminosäuren. Wie Alr2338 ist NpR1723 aus drei Domänen aufgebaut (Abb. 40). N-terminal besteht NpR1723 aus einer coiled-coil Domäne, gefolgt von einer Prolin- und Serin-reichen Verbindungsdomäne. Am C-terminalen Ende befindet sich eine Permease mit zehn transmembranen Helices. Bezüglich der Aminosäuresequenz zeigen beide Proteine auf der gesamten Länge eine Übereinstimmung von 53 %. Die Homologie

innerhalb der einzelnen Domänen weist jedoch teilweise starke Unterschiede auf. Während die coiled-coil Domänen untereinander zu etwa 69 % übereinstimmen, sind die Verbindungsdomänen nur zu 22 % homolog zueinander. Die membrandurchspannende Permeasedomänen verfügen über 58 % Sequenzübereinstimmung.

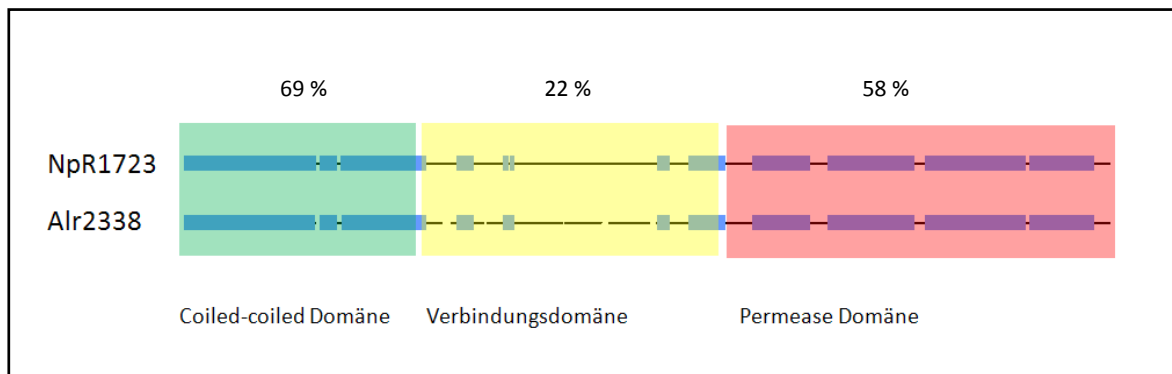


Abb. 40: Schematischer Vergleich der SepJ-Homologe Alr2338 in *Anabaena sp. PCC 7120* und NpR1723 von *N. punctiforme*. Die blau-hervorgehobenen Bereiche zeigen Abschnitte mit mehr als 60 % Übereinstimmung. Die farbigen Boxen repräsentieren die verschiedenen Domänen. Grün = coiled-coiled Domäne; gelb = Verbindungsdomäne; rot = Permease Domäne. Die Domänenanordnung wurde mittels InterProScan (Version 4.8) kalkuliert.

In dieser Arbeit sollte die Lokalisation von SepJ_N in den verschiedenen Differenzierungsformen verfolgt werden. Dazu wurde ein Konstrukt hergestellt, das für eine C-terminale, translationale Fusion von SepJ_N mit einem Gfp codiert (2.8.4.2). Das konstruierte, selbstreplizierende Plasmid pIM474 wurde durch Elektroporation in *N. punctiforme* transferiert. Topologie-Analysen von SepJ_N (NpR1723) entsprechend ist durch die C-terminale Fusion das Gfp an der Innenseite der cytoplasmatischen Membran verankert. Im Stamm *N. punctiforme* (pIM474) war die Gfp-Fluoreszenz deutlich im Septum zwischen vegetativen Zellen sichtbar (Abb. 41). SepJ_N scheint jedoch erst relativ spät während der Zellteilung zum Septum rekrutiert zu werden, da das Gfp-Signal erst sichtbar wurde, wenn sich die Tochterzellen nahezu vollständig voneinander getrennt hatten.

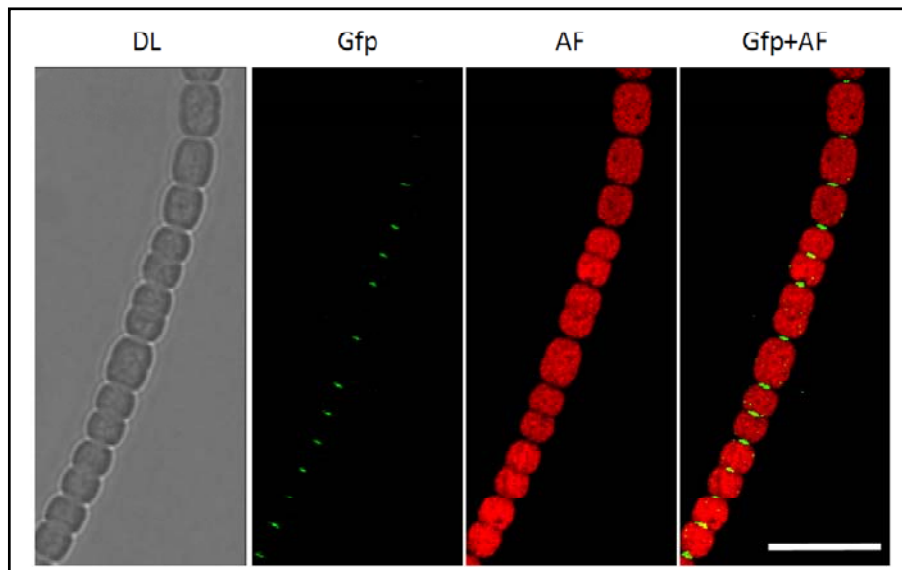


Abb. 41: Subzelluläre Lokalisation von $SepJ_N$ in vegetativen Filamenten von *N. punctiforme*. Zellen wurden in A+A/4 Medium mit NH_4Cl als Stickstoffquelle unter Dauerlicht angezogen. DL, Durchlicht; Gfp, Gfp-Fluoreszenz; AF, Autofluoreszenz; Gfp+AF, Überlagerung des Gfp-Signals mit der Autofluoreszenz. Balken = 10 μm

Im diazotrophen Wachstum war die Gfp-Fluoreszenz zusätzlich zu den Septen zwischen vegetativen Zellen auch zwischen vegetativen Zellen und reifen Heterocyste deutlich erkennbar (Abb. 42). Im Gegensatz zu den $SepJ_N$ -Gfp-Signalen zwischen vegetativen Zellen, konnte man zwischen vegetativen Zellen und Heterocysten jedoch deutlich zwei Fluoreszenzspots unterscheiden (Abb. 42).

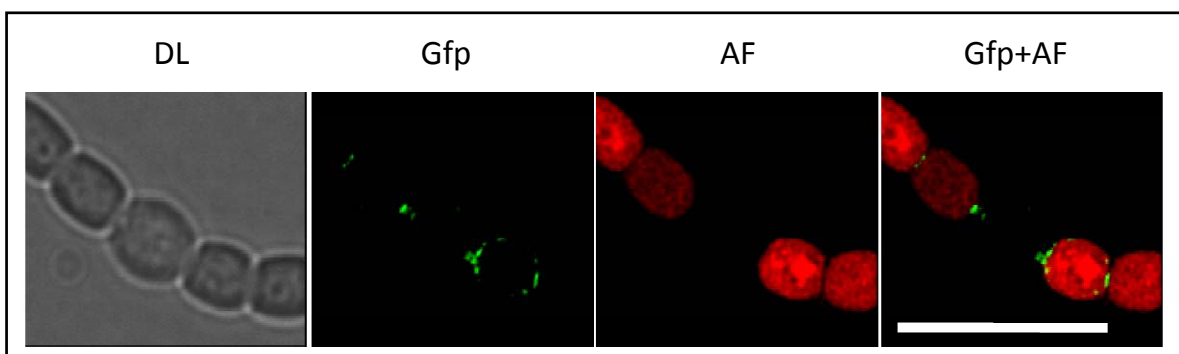


Abb. 42: Subzelluläre Lokalisation von $SepJ_N$ in diazotroph gewachsenen Zellen. Die Kultur wurde für 2 Tage in A+A/4 Medium ohne gebundenen Stickstoff inkubiert. DL, Durchlicht; Gfp, Gfp-Fluoreszenz; AF, Autofluoreszenz; Gfp+AF, Überlagerung des Gfp-Signals mit der Autofluoreszenz. Balken = 10 μm

Die Lokalisation von $SepJ_N$ -Gfp in Hormogonien wurde 24 h nach Hormogonien-induktion durch Verdünnung untersucht. Wie in vegetativen Filamenten akkumuliert $SepJ_N$ -Gfp in den beweglichen Hormogonien ebenfalls in den Septen zwischen den einzelnen Zellen (Abb. 43).

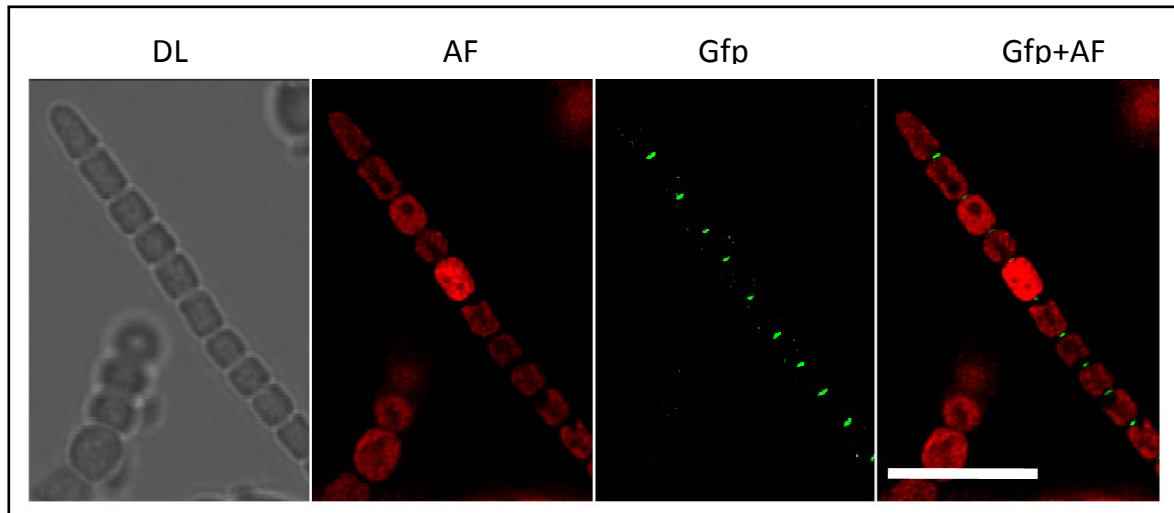


Abb. 43: Subzelluläre Lokalisation von SepJ_N in Hormogonien von *N. punctiforme*. Hormogonidifferenzierung wurde durch eine 1:50 fache Verdünnung der Ausgangskultur induziert. Die Lokalisationsanalysen wurden 24 h nach Induktionsbeginn durchgeführt. DL, Durchlicht; Gfp, Gfp-Fluoreszenz; AF, Autofluoreszenz; Gfp+AF, Überlagerung des Gfp-Signals mit der Autofluoreszenz. Balken = 10 µm

Zur Analyse der SepJ_N-Verteilung in Akineten, wurde eine stationäre Kultur verwendet. In Abbildung 44 ist ein Filament bestehend aus vegetativen Zellen und mehreren Akineten mit verschiedenem Alter zu sehen. Bei *N. punctiforme* werden die ersten Akineten normalerweise zwischen zwei Heterocysten ausgebildet (Meeks *et al.*, 2002). Die Differenzierung weiterer Akineten vollzieht sich dann in beide Richtungen auf die Heterocyste zu. Die Akineten näher an der Heterocyste sind daher meist jünger. Im Durchlichtbild sind die Akineten gut durch die größere Zellform und die intrazellulären Granula von den vegetativen Zellen zu unterscheiden. Während SepJ_N deutlich in den Septen zwischen den vegetativen Zellen erscheint, verringert sich die Gfp Fluoreszenz in Septen der entstehenden Akineten. In reifen Akineten, verschwindet SepJ_N vollständig. Dabei kann SepJ_N selbst in Akineten, die noch mit dem Filament verbunden sind, nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 44, Pfeil).

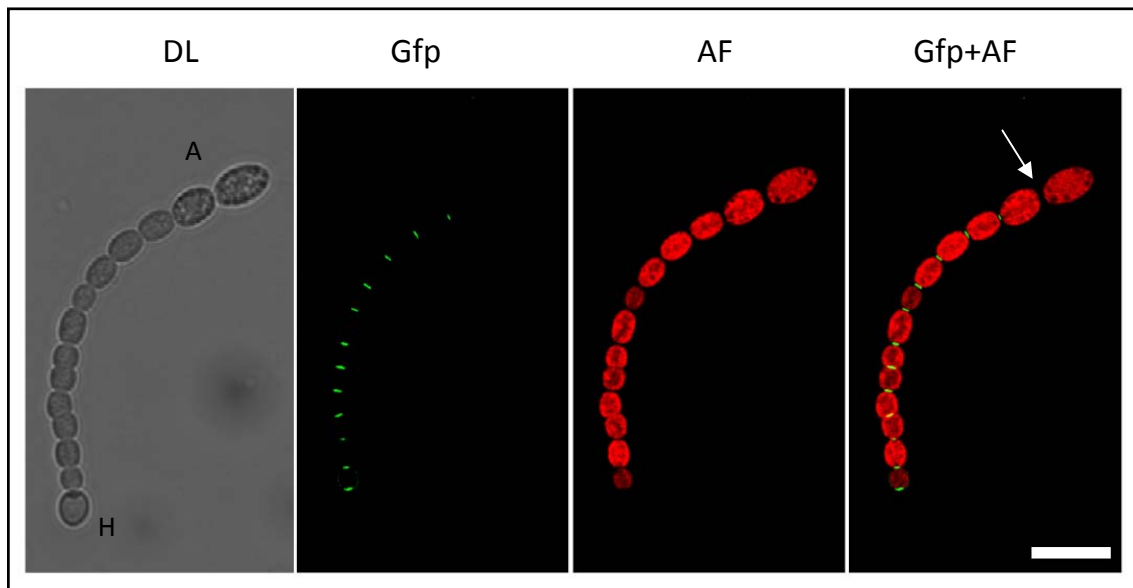


Abb. 44: Subzelluläre Lokalisation von SepJ_N in Akineten von *N. punctiforme*. Filament mit Akineten unterschiedlichsten Alters. DL, Durchlicht; Gfp, Gfp-Fluoreszenz; AF, Autofluoreszenz; Gfp+AF, Überlagerung des Gfp-Signals mit der Autofluoreszenz. A, ältester Akinet; H, Heterocyste. Pfeil deutet auf fehlendes SepJ_N zwischen zwei Akineten. Balken = 10 μm

3.3 Funktionelle Charakterisierung von Insertionsmutanten von Zellwand betreffenden Genen in *N. punctiforme*

3.3.1 Herstellung der Insertionsmutanten von Zellwand betreffenden Genen in *N. punctiforme*

Das Cyanobakterium *N. punctiforme* kann mit einer Vielzahl von Pflanzen symbiotische Beziehungen eingehen. Für die Besiedlung des pflanzlichen Wirtes ist die Differenzierung der vegetativen Filamente in bewegliche Hormogonien essentiell. Zum Einen können sich die, zu gleitender Bewegung fähigen, Trichome aktiv zur Wirtspflanze bewegen. Zum Anderen spielen Hormogonien bei der direkten Infektion der Pflanze eine entscheidende Rolle (Meeks, 1998). Der Focus dieser Arbeit lag auf der Bedeutung der Zellwand für das Zustandekommen von symbiotischen Interaktionen. Die Zellwand vermittelt die Weiterleitung von extrazellulären Signalen, zusätzlich spielt sie wahrscheinlich eine bedeutende Funktion für die Wirtserkennung. Neben AmiC2 übernehmen vermutlich weitere Zellwandproteine wichtige Aufgaben bei diesen Prozessen. Daher wurden Gene ausgewählt, die möglicherweise für die Zellwand relevant sind und die in Hormogonien bzw. während der Hormogonienentwicklung hochreguliert sind. Bei den ausgewählten Genen handelt es sich um NpF0152, NpF0220 und NpF4679. Für deren Inaktivierung wurde durch den Einbau einer Kanamycinresistenz-Kassette, das Leseraster des entsprechenden Genes unterbrochen und damit die Genfunktion

zerstört (siehe 2.8.2) Um polare Effekte durch den starken Promotor der Resistenzkassette ausschließen zu können, wurde die Kassette jeweils in beiden Orientierungen ins Zielgen integriert (Abb. 45). Die vollständige Segregation der Mutanten wurde durch PCR bestätigt. Zusätzlich wurden Konstrukte für die Inaktivierung der Gene NpR2919 (RXT-Protein), NpR6586 (beinhaltet FG-GAP-Motiv) und NpR6096 (S-Layer Protein) angefertigt. Nach dem „triparental mating“ wurden jedoch keine Exkonjuganten erhalten.

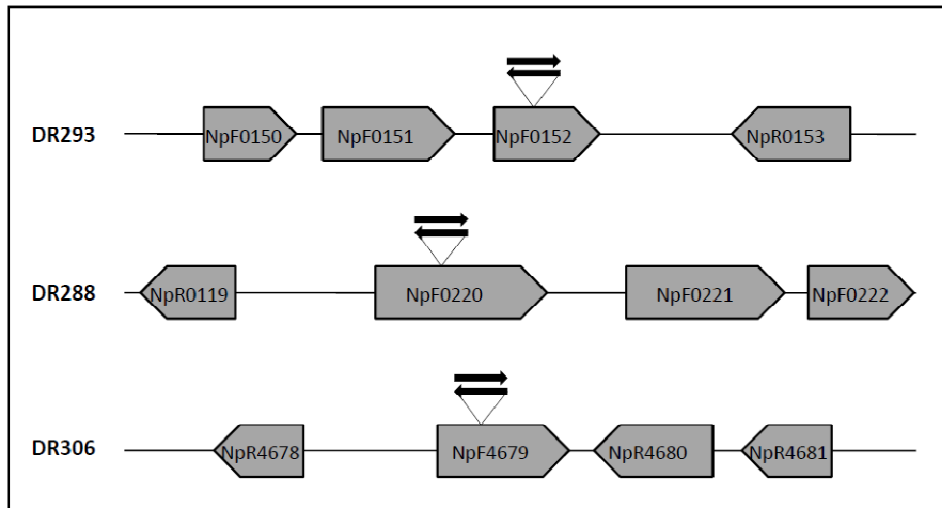


Abb. 45: Genomische Organisation der untersuchten Gene in *N. punctiforme* und die jeweilige Insertionsstelle der Resistenzkassette. Die Pfeilrichtung deutet die Orientierung der Leserichtung an.

3.4.2. Sequenzanalyse von NpF0152, NpF0220 und NpF4679

Das Gen NpF0152 umfasst 735 bp und codiert für ein 244 Aminosäuren großes Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von etwa 24,8 kDa, das ursprünglich als Zellwandprotein annotiert wurden war (Campbell *et al.*, 2007). Das Protein verfügt über keine bekannten konservierte Domänen. Bioinformatische Analysen sagen jedoch eine transmembrane Domäne von Aminosäure 75 bis Aminosäure 97 voraus. Sequenzvergleiche mit Proteinsequenzdatenbanken zeigen Homologien zu den hypothetischen Proteinen Ava 2737 von *Anabaena variabilis* (54 % Übereinstimmung) und Alr0248 von *Anabaena* sp. PCC 7120 (51 % Übereinstimmung). NpF0152 wird etwa 18 h nach Beginn der Hormogonidifferenzierung stark induziert (39fach) (Campbell *et al.*, 2008). Zusätzlich wird NpF0152 auch in Akineten und Heterocysten moderat hochreguliert (2,6fach) (Campbell *et al.*, 2007).

NpF0220 liegt in einem Gencluster mit Genen die für Enzyme codieren, welche die Zellwand modifizierenden. NpF0220 besteht aus 2451 bp und codiert damit für ein 816 Aminosäuren

großes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 93,3 kDa. Die Aminosäuresequenz von NpF0220 zeigt Sequenzhomologin mit der UDP-Galactopyranose-Mutase von *Cyanotheca* sp. PCC 7425 (76 % Übereinstimmung), einem einzelligen Cyanobakterium. Darüber hinaus finden sich Sequenzübereinstimmungen mit Smed_5685 von *Sinorhizobium medicae* WSM419. *Sinorhizobium medicae* WSM419 gehört zur Familie der Knöllchenbakterien (Rhizobien) und geht mit verschiedenen Leguminosen Symbiosen ein (Rome *et al.*, 1996). Bei NpF0220 ist die UDP-Galactopyranose-Mutase (Glf) Domäne C-terminal am Protein lokalisiert. Es ist bekannt, dass Enzyme mit dieser Domäne die Umwandlung von Uridin **D**iphospho-**G**alactopyranose (UDP-Galp) zu Uridin **D**iphospho-**G**alactofuranose (UDP-Galf) katalysieren (Abb. 46). UDP-Galf ist das Vorläufermolekül von Galf, welches ein wichtiger Bestandteil bakterieller und parasitärer Zellwände darstellt (Sanders *et al.*, 2001). Bei der Expression von NpF0220 während der Hormogoniendifferenzierung ist bemerkenswert, dass das Gen nicht hochreguliert wird, wenn die Induktion durch den Hormogonien induzierenden Faktor (HIF) erfolgte. In Hormogonien, deren Differenzierung durch den Entzug einer gebundenen Stickstoffquelle induziert wurde, kommt es jedoch zu einer Steigerung der Genexpression (Campbell *et al.*, 2008).

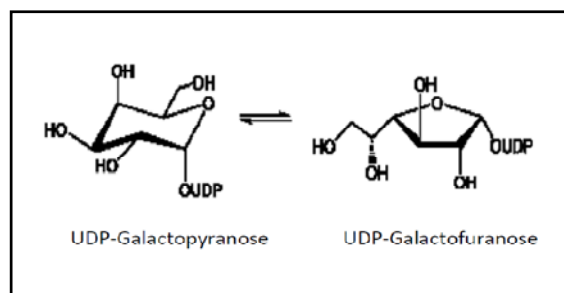


Abb. 46: Schematische Darstellung der durch die UDP-Galactopyranose Mutase katalysierte Reaktion. (entnommen aus Sanders *et al.*, 2001).

NpF4679 umfasst 4794 bp. Das translatierte Protein besteht aus 1597 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 163,2 kDa. Unabhängig von der Art der Hormogonien-Induktion wird das Gen aktiviert. Der HIF verursacht bereits nach einer halben Stunde eine 6fach erhöhte Expression des Gens im Vergleich zu vegetativen Filamenten. NpF4679 gehört zur Proteinfamilie der RTX (*Repeat in toxin*) Proteine. Diese Proteine sind durch das sich wiederholende, konservierte Sequenzmotiv GGxGxD[L/I/V/W/Y/F]x (wobei x eine beliebige Aminosäure darstellt) charakterisiert (Lally *et al.*, 1999), welches der Ca^{2+} -Bindung dient (Kuhnert *et al.*, 1997). Proteine der RTX-Familie haben unterschiedlichste Funktionen und werden durch einen Mechanismus nach außen exportiert, der keine N-terminale Signalsequenz benötigt (Economou *et al.*, 1990).

3.3.3 Untersuchung des Differenzierungspotentials

3.3.3.1 Heterocystendifferenzierung und Wachstum auf N_2

Für die Ausbildung einer funktionalen Symbiose zwischen Cyanobakterium und Pflanze ist die Fähigkeit zur Differenzierung von Heterocysten wichtig. Das Cyanobakterium fixiert in hohen Raten Luftstickstoff und versorgt den Wirt mit gebundenen Stickstoffverbindungen.

Zur Charakterisierung des Phänotyps wurden die Mutanten DR293, DR288 und DR306 bezüglich ihres Wachstums untersucht. Es traten keine signifikanten Unterschiede beim Wachstum auf NH_4^+ auf. Alle untersuchten Mutanten waren zudem in der Lage auf N_2 zu wachsen, da sie vollständige Heterocysten ausbilden konnten (Abb. 47).

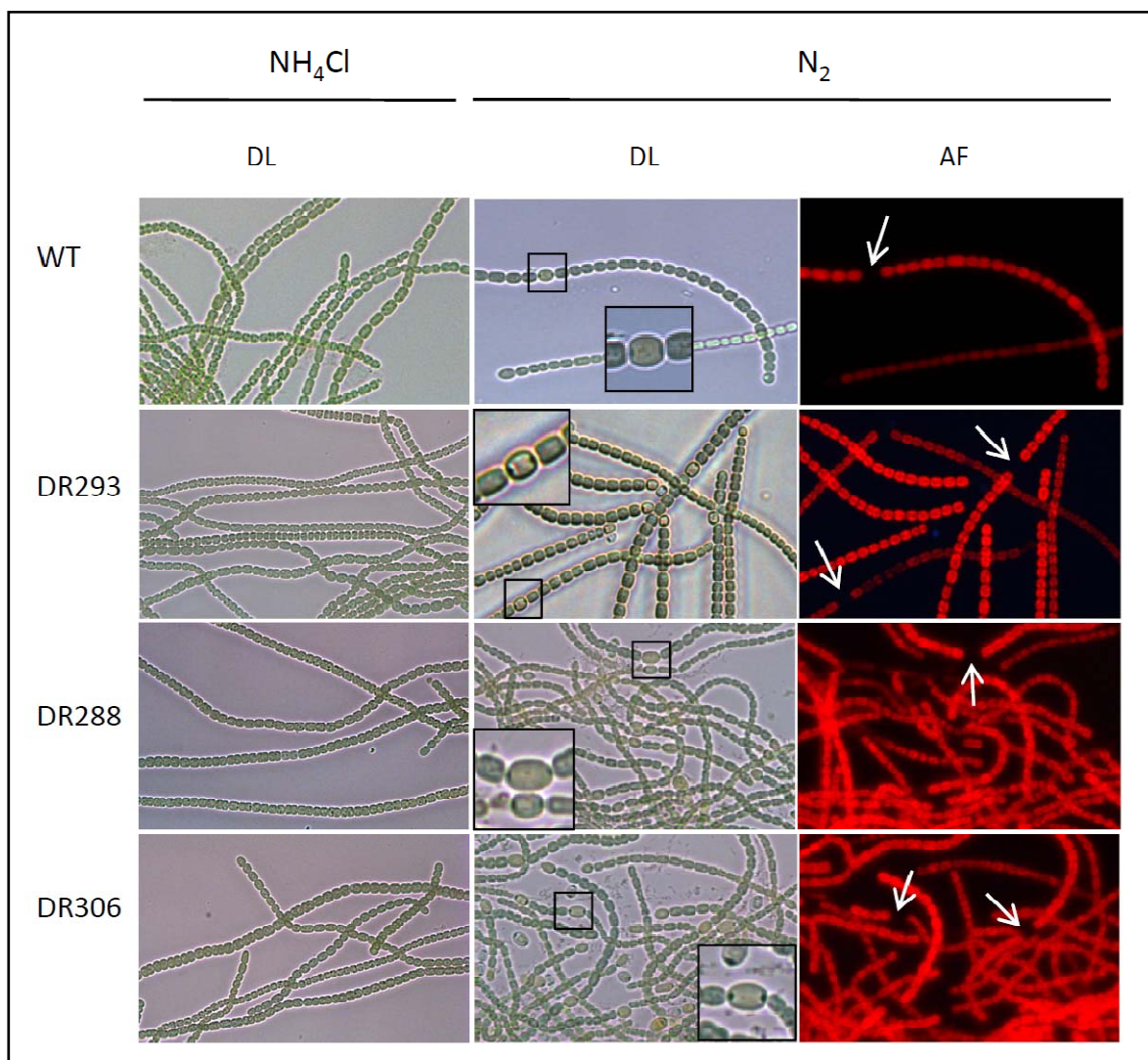


Abb. 47: Lichtmikroskopische Aufnahmen von WT, DR293, DR288, und DR306 während Wachstum auf NH_4Cl oder N_2 . Pfeile deuten auf reife Heterocysten.

Wie in Abbildung 47 zu sehen ist, zeigten die vegetativen Filamente der verschiedenen Mutanten keine phänotypischen Auffälligkeiten. Die Trichome bestanden aus mehreren

Hundertern von ovalen Einzelzellen. Bei Mangel an einer gebundenen Stickstoffquelle bildeten sich in regelmäßigen Abständen im Filament Heterocysten. Zudem deutete der Verlust der roten Autofluoreszenz in den Heterocysten auf den Abbau der Phycobiliproteine hin.

3.3.3.2 Hormogoniendifferenzierung

Die Hormogoniendifferenzierung bei *N. punctiforme* kann unter Laborbedingungen durch verschiedene Methoden induziert werden (Tandeau de Marsac, 1994). Um zu testen, ob die Mutationen in den einzelnen Genen Auswirkungen auf die Effizienz oder die Art der Hormogonieninduktion haben, wurden die verschiedenen Stämme vier verschiedenen Induktionsmethoden unterzogen: Zugabe des pflanzlichen HIF, Induktion durch Überführen der exponentiell wachsenden Kultur in stickstofffreies Medium (NSI), Verdünnung einer stationär wachsenden Kultur in frisches, stickstofffreies Medium und Induktion durch Rotlicht. Für die Bemessung der Effizienz des Differenzierungsstimulus wurde der Anteil der Hormogonien in der Kultur 24 h nach Induktion ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Effizienz der unterschiedlichen Induktionsmethoden voneinander unterscheidet. Bei Zugabe des, durch das Hornmoos produzierten, Faktors HIF differenzieren nahezu 100 % der vegetativen Filamente in kürzere, bewegliche Hormogonien. Hingegen vollzieht sich nur bei etwa jeder zweiten durch NSI induzierten Kultur die vollständige Differenzierung der vegetativen Trichome in Hormogonien. Ebenso war die Induktion durch Rotlichtexposition nur bedingt geeignet. Die Verdünnung einer stationär wachsenden Kultur in frisches, stickstofffreies Medium ist eine zuverlässige Methode, jedoch entwickeln sich nach 24 h nur etwa 60 - 80 % der Ausgangsfilamente zu Hormogonien. Die Effizienz der Hormogoniendifferenzierung von DR293, DR288 und DR306 bei den verschiedenen Induktionsversuchen war jedoch stets mit der des WT vergleichbar.

Nach der Induktion wurden die Hormogonien morphologisch untersucht. Die Hormogonien von DR293, DR288 und DR306 zeigten keine Unterschiede zu denen des WT. Die Hormogonien waren kürzer als die vegetativen Filamente und wiesen die typische Zellform auf. Die Endzellen waren spitz zulaufend. Darüber hinaus waren die Hormogonien aller untersuchten Mutanten zu gleitender Bewegung auf glatten Oberflächen fähig (Abb. 48). Die Durchschnittsgeschwindigkeit von jeweils 20 untersuchten Filamenten lag beim WT bei 0,67 $\mu\text{m/s}$, bei DR293 bei 0,66 $\mu\text{m/s}$, bei DR288 bei 0,66 $\mu\text{m/s}$ und bei DR306 bei 0,64 $\mu\text{m/s}$ und zeigte damit keine signifikanten Unterschiede.

Tab. 7: Effizienz der Hormogoniendifferenzierung durch verschiedene Induktionsmethoden. Für die Induktion mittels HIF und NSI wurde die entsprechende Kultur eine Woche in A+A Medium mit NH₄Cl angezogen und anschließend in HIF haltigem A+A Medium bzw. A+A-Medium überführt. Für die Rotlicht-Induktion wurden die Zellen unter Rotlicht inkubiert. Für die Verdünnungsinduktion wurde 1 ml einer stationär wachsenden Kultur in 50 ml A+A-Medium angeimpft. HIF, Hormogonien induzierender Faktor; NSI, *nitrogen stress induction*. +++ 90 – 100 %, ++ 80 - 60 %, + 60 - 40 %

Stamm / In- duktionsart	WT	DR293	DR288	DR306
HIF	+++	+++	+++	+++
NSI	++(+)	++(+)	++(+)	++(+)
Verdünnung	++	++	++	++
Rotlicht	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)

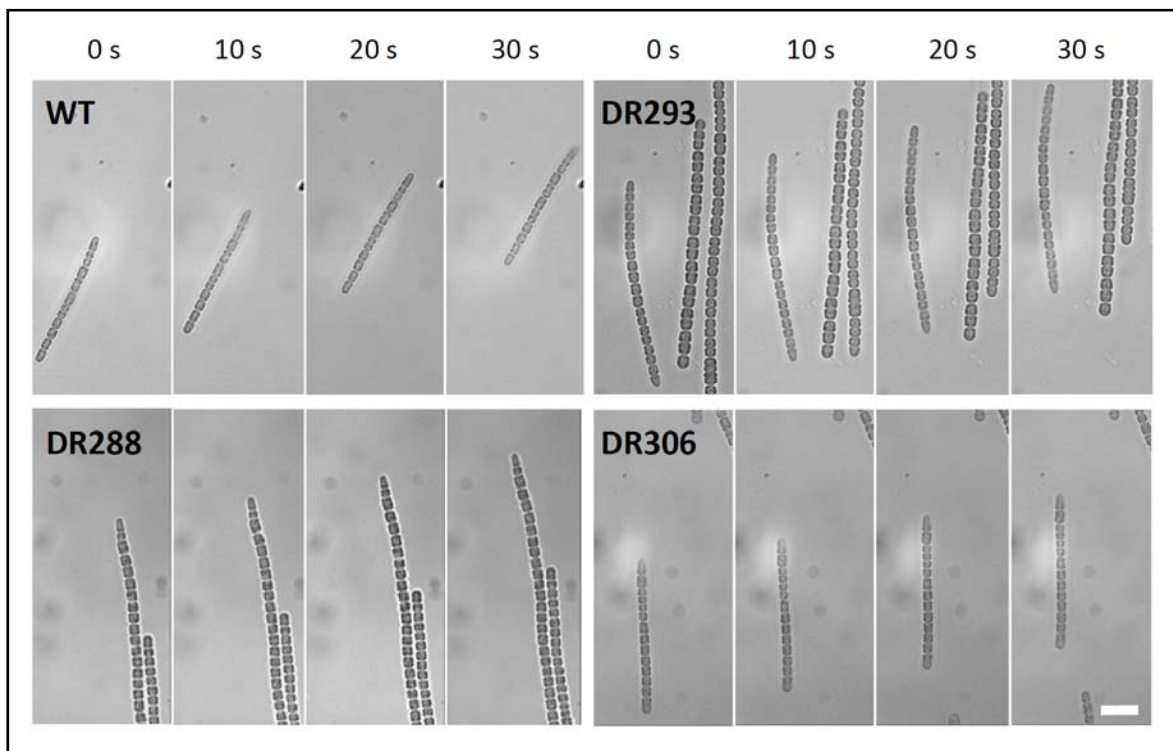


Abb. 48: Zeitraffer-Aufnahmen von Hormogonien.

3.3.4 Etablieren der Symbiose mit *Anthoceros punctatus*

Die Infektion der Pflanze ist ein durch den Wirt gesteuerter Prozess. Nur wirtsspezifischen Cyanobakterien wird Einlass gewährt. Zur Analyse, ob durch die einzelnen Mutationen die Cyanobiont-Wirtserkennung beeinflusst wird, wurden Rekonstitutionsexperimente durchgeführt. Dazu wurden jeweils 3 g von *A. punctatus* in stickstofffreies Medium überführt

und mit je 60 µg Chlorophyll *a*/ml *Nostoc*-Zellen inkubiert. Nach 2 wöchiger Inkubation wurde die Infektionsfrequenz bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 49 zusammengefasst.

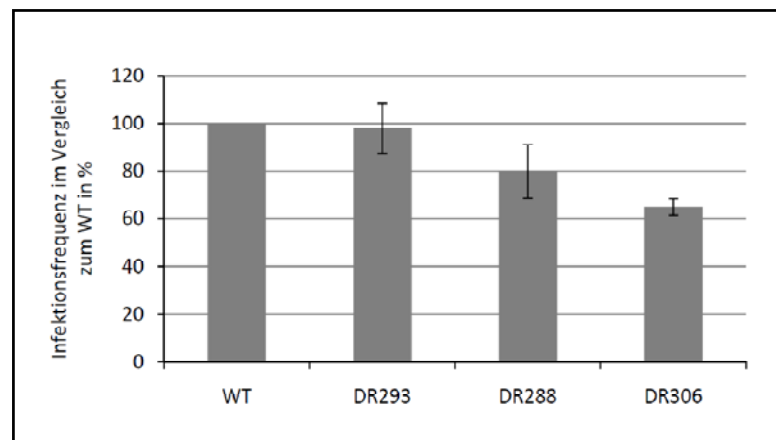


Abb. 49: Untersuchung der Infektionsfrequenz. Bestimmung der Infektionsfrequenz von WT, DR293, DR288 und DR306 wurden jeweils 3 g von *A. punctatus* in stickstoffreies Medium überführt und mit je 60 µg Chlorophyll *a*/ml Zellen für zwei Wochen inkubiert.

DR293 (98 %) und DR288 (80 %) zeigen nur minimale Unterschiede in der Besiedlung des Mooses im Vergleich zum WT. Durch die Mutation in NpF4679 sinkt die Rate der Besiedlungsereignisse auf 65 % des WT. Bei allen untersuchten Mutanten ist die Symbiose jedoch funktionell. Nach 30 Tagen der co-Kultivierung sieht man, dass das Moos in der meristemischen Region wächst (Abb. 50). Das heißt, das Cyanobakterium ist in der Lage den N₂ zu fixieren und den Wirt in ausreichenden Mengen mit gebundenem Stickstoff zu versorgen.

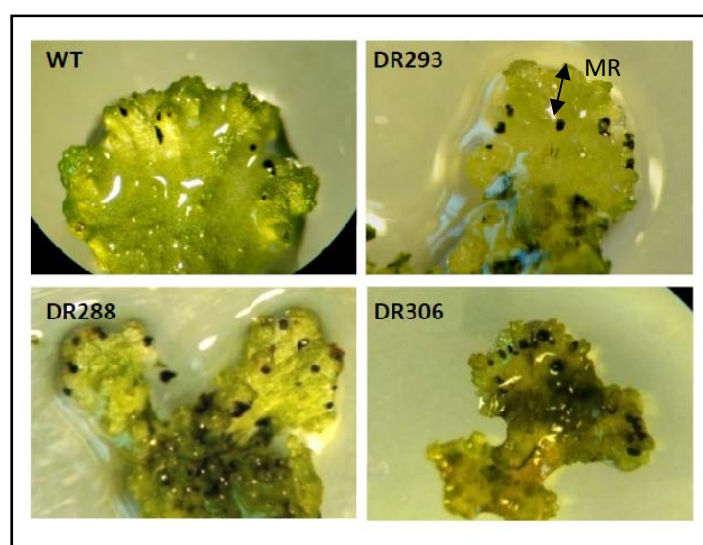


Abb. 50: Etablierung der Symbiose. Jeweils 3 g von *A. punctatus* in stickstoffreies Medium überführt und mit je 60 µg Chlorophyll *a*/ml von WT, DR293, DR288 und DR306 für 30 Tage inkubiert. MR, meristemische Region.

4. Diskussion

4.1 Die Bedeutung von Zellwand-Amidasen

Zellwand-Hydrolasen katalysieren die Spaltung spezifischer Bindungen innerhalb des Peptidoglykan-Sacculus und/oder dessen löslicher Fragmente und übernehmen damit eine Reihe unterschiedlichster physiologischer Funktionen (Vollmer *et al.*, 2008). Zusätzlich zu Prozessen während der Zell-Verlängerung und der Zellteilung, konnte eine Beteiligung von Zellwand-Hydrolasen an der Sporenbildung, der Proteinsekretion und der Beweglichkeit nachgewiesen werden (Heidrich *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2000). Je nachdem welche spezifische Bindung innerhalb des Mureins hydrolysiert wird, unterscheidet man in lytische Transglycosylasen, N-Acetylglucosaminidasen, N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidasen, Carboxypeptidasen und Endopeptidasen (Höltje & Tuomanen, 1991) (Abb. 7). Zellwand-Amidasen spalten die Peptidbindung zwischen dem N-terminalen L-Alanin und MurNAC. *E. coli* verfügt über 5 Zellwandamidasen, von denen AmiA, AmiB und AmiC eine wichtige Rolle bei letztendlicher Spaltung der Tochterzellen während der Zellteilung ausüben (Heidrich *et al.*, 2001; Heidrich *et al.*, 2002). Auch in verschiedenen filamentösen Cyanobakterien konnten Gene für Zellwand-Amidasen identifiziert werden (Abb. 16). Da hier die Abschnürung der Tochterzellen unterbleibt, wird über die genaue Funktion dieser Enzyme diskutiert. In *N. punctiforme*, einem filamentösen Cyanoabakterium der Sektion IV, konnte gezeigt werden, dass das AmiC-Homologe AmiC2 (NpF1846) für die Reifung der Zellwand zu einer Zell-Zell-Kommunikations-Struktur in neu synthetisierten Septen essentiell ist (Lehner *et al.*, 2011). Wie in den Genomen der meisten bisher sequenzierten Heterocysten bildenden Cyanobakterien sind auch bei *N. punctiforme* zwei Amidase-Gene in einem konservierten Gen-Cluster organisiert (Abb. 17). In *N. punctiforme* war die Inaktivierung von *amiC1* nicht möglich (Lehner *et al.*, 2011). Für ein besseres Verständnis der Wirkungsweise der Amidasen in filamentösen Cyanobakterien sollten auch die AmiC-Homologe in dem gut charakterisierten und genetisch zugänglichen Stamm *Anabaena* sp. PCC 7120 untersucht werden. Da der Nutzen von zwei hintereinander liegenden Amidasegenen noch unbekannt ist, wurden beide Amidasen im Gencluster inaktiviert und die Auswirkungen auf Wachstum und Differenzierungspotential untersucht. In der Mutante SR477 wurde *amiC1_{Ana}* inaktiviert, im Stamm SR478 ist *amiC2_{Ana}* nicht mehr funktionsfähig.

4.1.1 Auswirkungen der Inaktivierung von *amiC1_{Ana}* und *amiC2_{Ana}* auf vegetatives Wachstum

Während der Zellteilung kommt es in filamentösen Cyanobakterien ähnlich wie in einzelligen Bakterien zunächst zur Verlängerung der einzelnen Zellen, gefolgt von der Invagination der inneren Membrane und der Neusynthese von Peptidoglykan (Weiss, 2004). Die Abtrennung der Tochterzellen unterbleibt jedoch, sodass die Zellen als Filament miteinander verbunden bleiben. Trotzdem werden Zellwand-Hydrolasen wahrscheinlich für die Insertion der neu synthetisierten Zellwandbestandteile im Murein-Sacculus während der Zellverlängerung benötigt.

Die Inaktivierung der Amidasegene *amiC1_{Ana}* oder *amiC2_{Ana}* hatte keine Auswirkung auf die Geschwindigkeit des Wachstums in Anwesenheit einer gebundenen Stickstoffquelle (Abb. 21). Eine Beteiligung von *AmiC1_{Ana}* oder *AmiC2_{Ana}* an Prozessen zur Zellverlängerung ist daher unwahrscheinlich. Im Gegensatz zu *N. punctiforme* hatte die Inaktivierung der Amidasen von *Anabaena* sp. PCC 7120 auch keine Auswirkungen auf die Filament-Morphologie. In *N. punctiforme* führte der Verlust der Amidase *AmiC2* zur Filamentdystrophie und zu verschobenen Teilungsebenen (Lehner *et al.*, 2011). *AmiC2* scheint demnach bei *N. punctiforme* eine Rolle bei der Festlegung der Position des neuen Z-Rings zu spielen. Im Genom von *Anabaena* sp. PCC 7120 existiert ein weiteres Amidase-Gencluster (*all4999*, *all4998*). Möglicherweise übernehmen *All4999* und/oder *All4998* die entsprechende Funktion für die Bestimmung der Zellorientierung in *Anabaena* sp. PCC 7120.

4.1.2 Auswirkungen der Inaktivierung von *amiC1_{Ana}* und *amiC2_{Ana}* bei N-Entzug

Die *amiC2_{Ana}*-Mutante SR478 war zur Ausbildung reifer Heterocysten und damit zum Wachstum auf N₂ befähigt. Der Phänotyp der durch Transposon-Mutagenese von Zhu *et al.* (2001) isolierten *hcwA* (*amiC2*)-Mutante in *Anabaena* sp. PCC 7120 konnte demnach nicht bestätigt werden. Die *hcwA* Transposon-Mutante zeigte bei Mangel an gebundenen Stickstoffverbindungen eine verringerte *hepA* Expression und die Unfähigkeit zur Heterocystendifferenzierung.

Im Gegensatz zur *amiC2*-Inaktivierung durch ein Transposon wurde in der vorliegenden Arbeit die gezielte Mutation durch einfache Rekombination erreicht (2.8.1). Diese Methode ist bei Cyanobakterien weithin anerkannt und wurde schon vielfach erfolgreich angewendet (Golden & Wiest, 1988; Koksharova & Wolk, 2002). Eine vollständige Inaktivierung eines

Genproduktes sollte eigentlich nicht zu unterschiedlichen Phänotypen führen. Ungeachtet dessen wurde dieses Phänomen bereits bei anderen Cyanobakterien beschrieben (Chapman *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2004).

Zhu *et al.* (2001) konnten durch Komplementation der *hcwA*-Mutante mit einer intakten Kopie von *amiC2_{Ana}* die Expression von *hepA* bei Stickstoffmangel nur zum Teil zurück erlangen. Zudem führte schon die Rekonstitution der *hcwA* Transposonmutante zur Ausbildung von funktionslosen aber morphologisch unauffälligen Heterocysten und damit zu einem etwas anderen Phänotyp als die ursprüngliche Transposonmutante. Ein sekundärer Effekt der dort verwendeten Mutationsmethoden kann daher nicht ganz ausgeschlossen werden. Auf der anderen Seite konnte in der vorliegenden Arbeit zwar bestätigt werden, dass SR478 über keine vollständige *amiC2_{Ana}*-Kopie mehr verfügt (Abb. 20), eine Expression von *amiC2_{Ana}*-Bereichen und deren Wechselwirkung mit potentiellen Interaktionspartnern kann dennoch nicht ganz ausgeschlossen werden. In weiterführenden Studien sollte daher das gesamte Leseraster deletiert werden.

Bei der *amiC1_{Ana}*-Mutante SR477 führte der Verlust der Genaktivität von *amiC1_{Ana}* nach Entzug einer gebundenen Stickstoffquelle zum Ausbleichen der Kultur und nach kurzer Zeit zum Absterben der Zellen. RT-Analysen konnten einen polaren Effekt auf nachfolgende Gene durch die Insertion des Vektors ausschließen. Darüber hinaus konnte durch Komplementation mit einem funktionsfähigen *AmiC1_{Ana}*-Derivat (*tat-amiC1_{Ana}-gfp*) die Fähigkeit zum diazotrophen Wachstum wiederhergestellt werden.

Die Ursache für die Unfähigkeit des Wachstums auf N₂ von SR477 liegt im fast vollständigen Verlust der Differenzierungsfähigkeit. Dabei ist die Umbildung von vegetativen Zellen zu Heterocysten in einem sehr frühen Differenzierungsstadium gestört. Die Mutante zeigte nicht einmal den in der Differenzierung sehr frühen Abbau der Phycobiliproteine. Ebenso konnten keine Anzeichen für eine Umbildung der Zellwandhülle identifiziert werden. Es kommt weder zur Auflagerung der Hep-Schicht auf die Zellwand, noch werden Hgl synthetisiert. Insgesamt sehen alle Zellen des Filaments nach N-Entzug auch im TEM aus wie vegetative Zellen mit mehr Glykogen-Granula (Abb. 28). Im Allgemeinen ist der Stickstoffmangel bei Cyanobakterien der Sektion IV und V nur vorübergehend. Nachdem die Heterocysten ausgereift sind, kommt es in ihnen zur Fixierung von N₂ und damit zur Erschließung einer neuen Stickstoffquelle. Bei SR477 hingegen dauerte der Stickstoffmangel aufgrund der Unfähigkeit zur Heterocystendifferenzierung an, was durch die Einlagerung von Glycogen-Granula sichtbar wurde. Glycogen-Granula dienen als Kohlenstoff-Speicher,

wenn durch die Photosynthese-getriebene CO₂ Fixierung genügend gebundener Kohlenstoff zur Verfügung steht, aber nicht verwendet werden kann, weil Stickstoff als wichtiger Wachstumsfaktor fehlt (Ernst *et al.*, 1984). Bei längerer Kultivierung der Zellen ohne gebundenen Stickstoff bleichen die Filamente aus, da die Phycobiliproteine als einzige N-Quelle abgebaut werden.

Die Inaktivierung eines einzigen Genes hatte damit drastische Auswirkungen bezüglich der Heterocystendifferenzierung. Von lytischen Transglycosidasen ist bekannt, dass sie bei unterschiedlichen Gram-negativen Bakterien an der Insertion von Sekretionssystemen des Typs II, III und IV in den Peptidoglykan-Sacculus beteiligt sind (Koraimann, 2003). Denkbar wäre, dass Hydrolasen in Heterocysten bildenden Cyanobakterien in ähnlicher Weise das Peptidoglykan modifizieren und damit erst die Einlagerung von Transportsystemen zur Sekretion von Heterocysten-spezifischen Komponenten oder Enzymen gewährleisten. Beispiele für ein bei der Heterocystendifferenzierung beteiligtes Transportsystemen sind DevBCA (Fiedler *et al.*, 1998) und der ABC-Transporter HepA (Huang *et al.*, 2005, Zhu *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurden weitere Transportproteine identifiziert, die für die Heterocystenfunktion essentiell sind (Nicolaisen *et al.* 2009a).

Im Unterschied zu den verschiedenen Mutationen in den Heterocysten-spezifischen Transportsystemen führt die Mutation in *amiC1_{Ana}* allerdings zu einem sehr frühen Differenzierungsarrest. Das vollständige Ausbleiben der Differenzierung wurde bisher nur bei Mutationen in regulatorischen Genen dokumentiert. So führt eine Mutation in *ntcA* zum vollständigen Verlust der Heterocystendifferenzierung (Frias *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 1994). Die Inaktivierung von *hetR* verhindert ebenfalls den Eintritt in den Differenzierungsprozess (Buikema & Hasselkorn, 1991).

4.1.3 Regulation der Heterocystendifferenzierung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei der *amiC1_{Ana}* Mutante SR477 die Regulation der Heterocystendifferenzierung nicht grundlegend gestört ist (Abb. 29). Obwohl SR477 die Fähigkeit des diazotrophen Wachstums verloren hat und nur sehr wenige Heterocysten differenziert, wird der Stickstoffhunger nach Entzug der Stickstoffquelle erkannt. Bei Cyanobakterien wird der Mangel an Stickstoff durch Anstieg von OG angezeigt (Luque & Forchhammer, 2008). Da Cyanobakterien das Enzym α -Ketoglutarat-Dehydrogenase fehlt, ist der Citrat-Zyklus bei Cyanobakterien unvollständig (Stanier & Cohen-Bazire, 1977). OG dient damit ausschließlich als Kohlenstoffgerüst für die Assimilation von Ammonium durch den

GS-GOGAT Zyklus (Vazquez-Bermudez *et al.*, 2000). Bei Stickstoffmangel akkumuliert daher OG im Cytoplasma und verbessert die DNA-Bindung von NtcA an bestimmte Promotorregionen (Laurent *et al.*, 2005). Daraufhin werden einerseits verschiedene Gene des Stickstoffmetabolismus und der Heterocystendifferenzierung exprimiert, zusätzlich wird die eigene Expression gesteigert (= Autoregulation) (Luque *et al.*, 1994). Laut Ehira & Omori (2006) werden in *Anabaena* sp. PCC 7120 während der Heterocystendifferenzierung 691 Gene spezifisch reguliert. Neuere Daten identifizierten 12 h nach Heterocysteninduktion 434 aktivierte und 32 reprimierte Gene (Flaherty *et al.*, 2011).

In SR477 konnte nach Entzug der gebundenen Stickstoffquelle die Autoregulation von NtcA beobachtet werden. Ebenso erfolgte die Induktion von *hetR* nach N-Entzug. HetR bestimmt als Schlüsselregulator für die Heterocystendifferenzierung die Expression von Heterocysten-spezifischen Genen, darunter Gene für die Ausbildung der Heterocystenhülle. Der Verlust der Heterocystendifferenzierungspotentials wird daher wahrscheinlich nicht zu Beginn der Genregulationskaskade erzeugt. Selbst die Expression von *hepA* wurde in der *amiC1_{Ana}*-Mutante SR477 noch initiiert. Die Transkription von *hepA* alleine reicht aber anscheinend nicht aus für die Bildung der Hep-Schicht. Obwohl in SR477 der Stickstoffhunger erkannt wird und es zur differentiellen Expression Heterocysten-spezifischer Gene kommt, finden keine morphologischen Veränderungen statt.

Die genaue Regulationskaskade während der Differenzierung von vegetativen Zellen zu Heterocysten ist in weiten Teilen noch unbekannt. Da die Differenzierung von Heterocysten und die Fixierung von Luftstickstoff sehr energieaufwendig ist (Kneip *et al.*, 2007), sind möglicher Weise im Differenzierungsprozess verschiedene regulatorische Kontrollpunkte integriert, um unnötige Differenzierung zu vermeiden. Denkbar wäre eine „*criss-cross*“ Regulation wie sie seit langem bei der Sporulation von *Bacillus subtilis* bekannt ist (Losick & Stragier, 1992). Bei dieser Art der Kontrolle von Zelldifferenzierungen wird erst ein neuer Entwicklungsschritt begonnen, wenn der vorheriger bereits beendet wurde. Die Auswirkungen der Mutation von *amiC1_{Ana}* lassen eine wichtige Rolle des Amidase-gesteuerten Peptidoglykan-Umbaus für die Heterocysten-differenzierung vermuten (Abb. 51). Es ist vorstellbar, dass die Modifizierung des Mureins zu Beginn der Heterocystendifferenzierung einen essentiellen Schritt für die Heterocystendifferenzierung darstellt. So könnte es bei Ausbleiben des Peptidoglykan-Umbaus zur regulatorischen Feedback-Hemmung des gesamten Differenzierungsprozesses auf post-transkriptionaler

Ebene kommen. Die verspätete Expression von *hepA* in SR477, deutet darauf hin, dass die Inaktivierung von *amiC1_{Ana}* auch indirekte Auswirkungen auf die Transkriptionsebene hat.

Die große Bedeutung des Peptidoglykanumbaus für die Heterocystendifferenzierung zeigt sich auch durch Inaktivierung von *pbp2* (*alr5101*), *pbp3* (*all2981*) oder *pbp6* (*alr4579*) in *Anabaena* sp. PCC 7120. Eine Deletion der für Penicillin-Bindeproteinen (Pbp) codierenden Gene führte bei Stickstoffmangel zur Ausbildung nicht funktionsfähiger Heterocysten (Lazaro *et al.*, 2001; Leganes *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005).

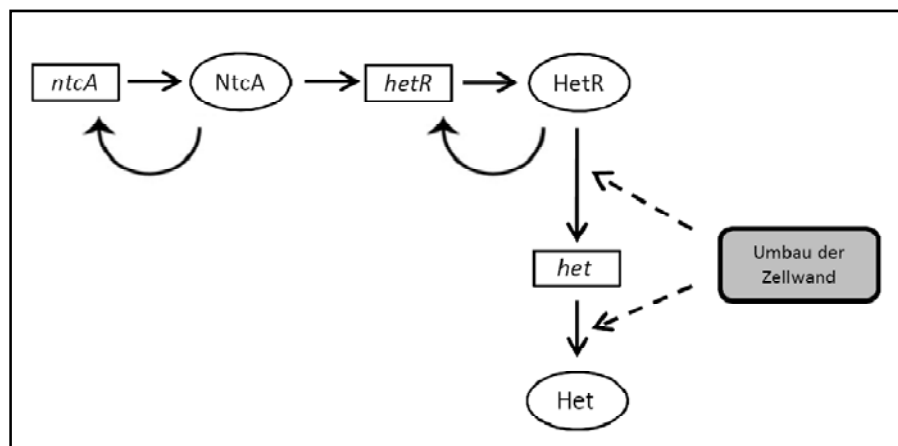


Abb. 51: Möglicher regulatorischer Effekt der Modulation der Zellwand auf die Heterocystendifferenzierung. Gene sind als Rechtecke dargestellt, Proteine sind als Kreise angedeutet. Pfeile repräsentieren positive Interaktionen. Gestrichelte Linien deuten noch unbekannte Wechselwirkungen an. Het/het, Heterocysten-spezifische Gene bzw. Proteine.

4.1.4 Funktion von *amiC1_{Ana}* für die Zell-Zell-Kommunikation

Der Peptidoglykan-Sacculus bei filamentösen Cyanobakterien ist kontinuierlich und umschließt das gesamte Filament (Lehner *et al.*, 2011). Für jegliche Art der Modifizierung von Peptidoglykan muss das Polymer zunächst aufgeschnitten werden (Schwarz *et al.*, 1969). Erst dann ist beispielsweise die Einlagerung von Strukturen für eine Zell-Zell-Kommunikation möglich. Eine funktionierende Zell-Zell-Kommunikation ist wichtig für die Zelldifferenzierung, da die Arbeitsteilung der verschiedenen Zelltypen den Austausch von Nährstoffen voraussetzt. Die Koordination der Differenzierungsprozesse bedarf zudem der Weiterleitung von Signalmolekülen und regulatorischen Metaboliten (Mariscal & Flores, 2010). Die bereits von Mullineaux *et al.* (2008) beschriebenen erhöhten Austauschraten zwischen vegetativen Zelle während diazotrophen Wachstum, konnten bei uns ebenfalls bei WT und SR478 beobachtet werden (Abb. 32).

In dieser Arbeit konnten FRAP-Untersuchungen zeigen, dass der Calcein-Austausch zwischen Nachbarzellen in SR477 stark beeinträchtigt war (Abb.30, Tab. 5). Das heißt, durch die Mutation in *amiC1_{Ana}* war der unspezifische Transfer niedermolekularer Stoffe über direkte Zell-Zell-Verbindungen gestört. Da die direkte Zell-Zell-Kommunikation wahrscheinlich eine spezifische Anpassung an die Zelldifferenzierung ist (Mullineaux *et al.*, 2008), ist es nachvollziehbar, dass die Inaktivierung von *amiC1_{Ana}* keine Auswirkungen auf das vegetativen Wachstum der Cyanobakterien hatte.

Auch in *N. punctiforme* hatte die Inaktivierung von *amiC2* eine starke Beeinträchtigung des unspezifischen Austausches von Zelle zu Zelle zur Folge (Lehner *et al.*, 2011).

Es ist denkbar, dass Zellwand-Amidasen in filamentösen Cyanobakterien bei der Einlagerung von Zell-Zell-Verbindenden-Strukturen am Septum beteiligt sind. Der Verlust der Amidaseaktivität führt demnach zum Defizit von Strukturen für die Zell-Zell-Kommunikation und damit zur Beeinträchtigung der Heterocystendifferenzierung. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Analyse der Subzellulären Lokalisation von *AmiC1_{Ana}* und *AmiC2_{Ana}* und *AmiC2*.

4.1.5 Subzelluläre Lokalisation von *AmiC1_{Ana}* und *AmiC2_{Ana}*

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation wurde *AmiC1_{Ana}* bzw. *AmiC2_{Ana}* an Gfp fusioniert. Datenbank-gestützte Sequenzanalysen ergaben, dass es sich bei *AmiC1_{Ana}* und *AmiC2_{Ana}* um periplasmatische Proteine handelt, die über das Sec-Translokationssystem ins Periplasma transportiert werden. Da Gfp jedoch nur im Cytoplasma zum aktiven, fluoreszierenden Protein gefaltet werden kann und dementsprechend als vollständig gefaltetes Protein transportiert werden muss, wurde die Sec-Signalsequenz der Amidasen durch die Signalsequenz für das Tat-Translokationssystem eines periplasmatischen Bindeproteins ersetzt. Mariscal *et al.* (2007) konnten zeigen, dass ein mit einer Tat-Sequenz fusioniertes Gfp ins Periplasma transportiert wird, sich entlang des gesamten Filaments ausbreitet und nicht an einer bestimmten Stelle akkumuliert. Zudem konnte demonstriert werden, dass es keine Unterschiede in der Lokalisation des genetisch hergestellten Tat-EnvC-Gfp und des mittels nativer Sec-Sequenz transportieren EnvC-mCherry gibt (Bernhardt & de Boer, 2004; Uehara *et al.*, 2009). Es ist daher unwahrscheinlich, dass durch den Austausch der Signalsequenzen die Lokalisation von *AmiC1_{Ana}* oder *AmiC2_{Ana}* beeinflusst wurde. Die Fähigkeit von *tat-amiC1_{Ana}-gfp* zur Komplementation von SR477 bestätigte

zudem die Funktionalität der Konstrukte. Die Fusion der Zellwand-Amidasen mit Gfp sowie mit dem Tat-Signalpeptid beeinträchtigte demnach nicht deren Aktivität.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl $\text{AmiC1}_{\text{Ana}}$ -Gfp als auch $\text{AmiC2}_{\text{Ana}}$ -Gfp in den Septen zwischen zwei vegetativen Zellen akkumulieren. Dabei erscheinen beide Amidasen bereits zu Beginn der Einschnürung der Tochterzellen zu beiden Seiten des Z-Ringes. Die Lokalisation von $\text{AmiC1}_{\text{Ana}}$ und $\text{AmiC2}_{\text{Ana}}$ stimmt damit mit der von AmiC in *E. coli* überein (Bernhardt & de Boer, 2003).

Die septale Lokalisation von $\text{AmiC1}_{\text{Ana}}$ und $\text{AmiC2}_{\text{Ana}}$ entspricht der Beobachtung, dass die Inaktivierung von $\text{amiC1}_{\text{Ana}}$ oder $\text{amiC2}_{\text{Ana}}$ keine Auswirkungen auf das Zellwachstum haben. Die durch Peptidoglykan Synthese realisierte Zellverlängerung vollzieht sich über die gesamte Zelle, jedoch nicht an den Zell-Polen (den Blaauwen *et al.*, 2008). Zellwand-hydrolysierende Enzyme, die für die Insertion der gebildeten Murein-Bausteine, das Peptidoglykan aufschneiden, sollten also ebenfalls über den gesamten Zell-Sacculus verteilt sein. Darüberhinaus bestärken die Ergebnisse der subzellulären Lokalisation von $\text{AmiC1}_{\text{Ana}}$ die Vermutung, dass die Zellwand-Amidasen für die Ausbildung von Strukturen für den direkten Zell-Zell-Transport notwendig sind (Abb. 52).

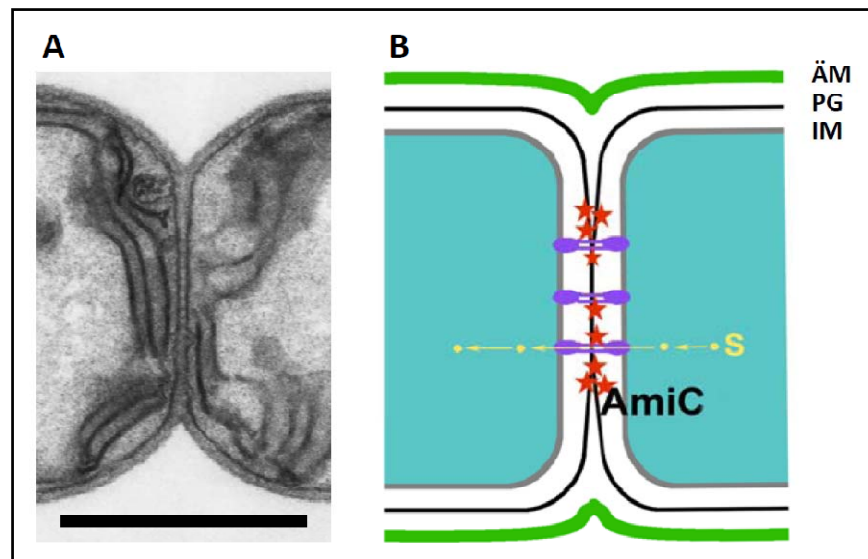


Abb. 52: Subzelluläre Lokalisation von AmiC in filamentösen Cyanobakterien. (A) Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahmen vom Septum eines filamentösen Cyanobakterium. (B) Schematische Darstellung des Septums und mögliche Interaktionsstelle von AmiC . Rote Sterne repräsentieren Zellwand-Amidasen; Strukturen zur Zell-Zell-Kommunikation sind in blau dargestellt. ÄM, äußere Membran, IM, innere Membran; PG, Peptidoglykan; S, niedermolekulare Stoffe. Balken 1 μm ; (B entnommen aus Lehner *et al.*, 2011).

Bei Mangel an gebundenen Stickstoffverbindungen akkumulierten $\text{AmiC1}_{\text{Ana}}\text{-Gfp}$ und $\text{AmiC2}_{\text{Ana}}\text{-gfp}$ in *Anabaena* sp. PCC 7120 sowohl in den Septen zwischen vegetativen Zellen und Proheterocysten als auch im Bereich des Halskanals (Abb. 19). TEM-Aufnahmen deuten darauf hin, dass im Bereich des Halskanals die laminare Hgl-Schicht viel dicker ist als an der restlichen Zellhülle. Denkbar wäre, dass die gesteigerte Menge von Hgl am Halskanal durch die Einlagerung von besonders vielen Hgl-Exportern erreicht wird. Die Einlagerung dieser Exporter wiederum, bedarf möglicherweise der Modulation des Peptidoglykan und damit der Aktivität von Amidasen.

Zusätzlich lassen die Ergebnisse der Lokalisationsanalysen vermuten, dass auch die Bildung des Halskanals selbst durch Amidase-katalysierten Peptidoglykan-Abbau erfolgt. Durch diese Verkleinerung der Zell-Zell-Verbindungen zwischen vegetativen Zellen und Heterocysten wird wahrscheinlich der Zustrom von Sauerstoff aus den Nachbarzellen begrenzt (Awei *et al.*, 2009).

4.1.6 Gestörte Integrität der äußeren Membran in SR477 und SR478

Untersuchungen ergaben eine erhöhte Sensitivität gegenüber Lysozym bei SR477 und SR478 im Vergleich zum WT. Lysozym ist ein 14 kDA großen Enzym, das die β 1,4-glycosidische Bindung zwischen GlcNAc und MurNAc spaltet und somit antibakteriell wirkt. Bei Gram-negativen Bakterien stellt die äußere Membran jedoch eine natürliche Barriere dar und verhindert den Peptidoglykan-Abbau durch das Lysozym (Heidrich *et al.*, 2002). Die Inaktivierung von $\text{amiC1}_{\text{Ana}}$ und $\text{amiC2}_{\text{Ana}}$ in *Anabaena* sp. PCC 7120 hatte demnach Auswirkungen auf die natürliche Integrität der äußeren Membran, so dass große Moleküle die Membran überwinden können. Dieser Effekt der gestörten Barrierefunktion bei Hydrolase-Mutanten wurde bereits bei *E. coli* beschrieben (Heidrich *et al.*, 2002). Auch dort verursachte die Inaktivierung von verschiedenen Zellwand-Hydrolasen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Lysozym. Es wurde auch gezeigt, dass nicht die Integrität des Mureins selber beeinträchtigt war. Der Grund für die erhöhte Sensitivität gegenüber Lysozym muss demnach bei der äußeren Membran liegen. Diese ist eine asymmetrische Lipid-doppelschicht, die sich aus einer inneren Lage Phospholipiden und einer äußeren Lage Lipopolysacchariden zusammensetzt. Das Peptidoglykan ist mit der äußeren Membran durch eine Vielzahl von Proteinen verbunden, wobei das Braun'sche Lipoprotein bei *E. coli* das mit Abstand mit der höchsten Kopien-Zahl vertretene ist (Braun & Rehn, 1969). Eine Deletion

des Braun'schen Lipoproteins führt zum Verlust der Integrität der äußeren Membran (Suzuki et al., 1978; Yem & Wu, 1978). Bezogen auf SR477 und SR478 könnte auch die Mutation von *amiC1_{Ana}* bzw. *amiC2_{Ana}* einen Verlust der Integrität der äußeren Membran durch eine gestörte Vernetzung der äußeren Membran mit dem Peptidoglykan hervorrufen. Ein anderer Kandidat für eine Wechselwirkung zwischen äußerer Membran und Peptidoglykan ist das Lipoprotein NlpD. Jedoch konnte in *E. coli* gezeigt werden, dass beide Proteine unabhängig voneinander zum Divisom rekrutiert werden (Peters et al., 2011).

Alternativ dazu könnte die Ursache bei der äußeren Membran selber liegen. Obwohl die Synthese von Murein an die Synthese von Phospholipiden gekoppelt ist (Ehlert & Höltje, 1996; Rodionov & Ishiguro, 1996) könnte die Inaktivierung der Amidasen zum gestörten Zusammenbau der äußeren Membran führen und damit zum partiellen Verlust der Barriere Funktion. In *Anabaena* sp. PCC 7120 resultiert die Inaktivierung von *alr2270*, welches bei der Lipid A Biosynthese beteiligt ist, in einer erhöhten Sensitivität gegenüber Lysozym im Vergleich zum WT (Nicolaisen et al., 2009b).

4.1.7 Relevanz von *AmiC1_{Ana}* und *AmiC2_{Ana}* für das Wachstum

Die Spaltung kovalenter Bindungen innerhalb des Murein-Sacculus ist für viele Prozesse essentiell, andererseits birgt sie die Gefahr der Autolyse (Heidrich et al., 2001). Die Kontrolle der Aktivität der Amidasen muss daher ein essentieller Schritt für den Fortbestand der Zellen sein. Über die Regulation der Amidasen in filamentösen Cyanobakterien ist noch nichts bekannt. In Genom von *Anabaena* sp. PCC 7120 codiert jedoch ein Gen für NlpD (*alr3353*). Ob das Protein für die Aktivierung von *AmiC1_{Ana}* und/oder *AmiC2_{Ana}* eine ähnliche Rolle spielt wie in *E. coli*, ist nicht bekannt und bedarf noch weiteren Untersuchungen. Ein Homologes zu FtsN, das bei *E. coli* für die Rekrutierung von *AmiC* zum Divisom essentiell ist, wurde bisher weder in *Anabaena* sp. PCC 7120 noch in einem anderen Cyanobakterium gefunden.

In *Anabaena* sp. PCC 7120 führte die Überexpression von *amiC1_{Ana}* zur Zelllyse. Die Überexpression von *amiC2_{Ana}* wirkt sich zwar durch eine gestauchte Morphologie der Zellen aus, scheint aber für die Zelle noch verkraftbar. Verglichen mit den Ergebnissen der Inaktivierung, bestätigt die Untersuchung der Überexpression von *amiC1_{Ana}* und *amiC2_{Ana}* einen Unterschied bezüglich der Relevanz der Zellwand-Amidasen. Sowohl bei der Inaktivierung der Genfunktion, als auch bei der Überexpression signalisieren die Ergebnisse eine größere Bedeutung von *amiC1_{Ana}* im Vergleich zu *amiC2_{Ana}*. Möglicherweise gibt es

Unterschiede bezüglich der Aktivität von $AmiC1_{Ana}$ und $AmiC2_{Ana}$, oder $AmiC2_{Ana}$ ist als Protein weniger stabil. Weiterhin zeigen neue Untersuchungen der transkribierten RNA bei Stickstoffmangel, dass $amiC1_{Ana}$ viel stärker induziert wird als $amiC2_{Ana}$ (Flaherty *et al.*, 2011). Scheinbar ist $amiC1$ das dominantere Gen. Bei Inaktivierung von $amiC2_{Ana}$ kann $amiC1_{Ana}$ möglicherweise die Funktion übernehmen. Der Verlust der Genfunktion von $amiC1_{Ana}$ kann von $amiC2_{Ana}$ aber scheinbar nur bedingt ausgeglichen werden.

4.2 Lokalisation von AmiC2 in verschiedenen Differenzierungsstadien von *N. punctiforme*

In *N. punctiforme* spielt AmiC2 (NpF1846) für die Ausbildung von funktionalen Zell-Zell-Kommunikationsstrukturen in neu synthetisierten Septen eine entscheidende Rolle (Lehner *et al.*, 2011). In dieser Arbeit sollte die subzelluläre Lokalisation von AmiC2 in den verschiedenen Differenzierungsformen verfolgt werden.

In vegetativen Filamenten akkumulierte AmiC2-Gfp in den Septen junger Tochterzellen und an den sich einschnürenden Tochterzellen. Nach dem Entzug von gebundenen Stickstoffverbindungen erschien AmiC2-Gfp im Bereich des Septums von Proheterocysten, wo im Laufe der Differenzierung der Halskanal entsteht (Abb. 37). Da bei Stickstoffmangel die Zellteilung unterbrochen wird, konnten zu diesem Zeitpunkt keine Gfp-Fluoreszenzsignale in den Septen der vegetativen Zellen detektiert werden. Da Amidasen potentiell autolytisch wirken können, wird AmiC2 wahrscheinlich bei Wachstums-limitierenden Bedingungen abgebaut. Auch in den Zellwänden reifer Heterocysten war keine Gfp-Fluoreszenz erkennbar. Die Lokalisation von $AmiC1_{Ana}$ und $AmiC2_{Ana}$ von *Anabaena* sp. PCC 7120 stimmt damit mit der Lokalisation von AmiC2 in *N. punctiforme* überein. Bei der Differenzierung in bewegliche Hormogonien kommt es zur annähernd gleichzeitigen Zellteilung in den Zellen des gesamten Filaments (Meeks & Elhai, 2002). In Übereinstimmung damit lokalisierte AmiC2 in allen Septen vom Hormogonium. Zusätzlich konnte Fluoreszenz von AmiC2-Gfp an der Spitze der endständigen Zelle des Filaments beobachtet werden. Hormogonien sind viel kürzer als vegetative Filamente, wahrscheinlich um Bewegung zu erleichtern. Im Gegensatz zu der sonstigen Zellteilung im vegetativen Filament, werden also hier einige Tochterzellen voneinander getrennt und zugespitzt. An der Trennung der Filamente zu Hormogonien könnte demnach auch AmiC2 beteiligt sein, was jedoch eine strikte räumliche Regulation voraussetzt. Denn nur zwischen jeder ca. 20igsten Zelle soll ein komplettes Durchschnüren der Tochterzellen erfolgen. Die Aufklärung dieser

Regulationsmechanismen gilt es in der nächsten Zeit voranzubringen. In reifen Akineten konnte keine Gfp-Fluoreszenz detektiert werden. Möglicherweise ist AmiC2 bei der Abschnürung der einzelnen Akineten aus dem Filament beteiligt. In fertig ausgebildeten Stadien haben sie jedoch keine Funktion und werden wahrscheinlich abgebaut.

4.3 Lokalisation SepJ_N in verschiedenen Differenzierungsstadien von *N. punctiforme*

Cyanobakterien der Sektion IV und V sind als echte Mehrzeller zu betrachten mit der Fähigkeit zur Differenzierung spezialisierter Zelltypen. Eine Reihe von Proteinen vermittelt wahrscheinlich den notwendigen Austausch von Nährstoffen und den Transfer von regulatorischen Metaboliten (Mariscal & Flores, 2010). In *Anabaena* sp. PCC 7120 konnte gezeigt werden, dass SepJ (FraG, Alr2338) sowohl für die Filament Integrität, die Heterocystendifferenzierung, als auch für die Weiterleitung von Signalmolekülen wichtig ist (Nayar *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2007). An der richtigen Positionierung von SepJ im Septum sind wahrscheinlich FraC und FraD beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass FraC und FraD für den Austausch von Signalmolekülen essentiell sind, aber nicht für die Differenzierung von Heterocysten (Merino-Perto *et al.*, 2010).

Durch vergleichende BLAST-Analysen konnte in *N. punctiforme* ein SepJ Homologes (53 % Übereinstimmung) identifiziert werden. Das entsprechende Gen NpR1723 zeigt wie *alr2338* den typischen dreiteiligen Aufbau: Eine N-terminale coil-coil Domäne, gefolgt von einer Prolin- und Serin-reichen Verbindungsdomäne und einer C-terminalen Permease. Die coil-coil Domäne ist für die korrekte Lokalisation von SepJ essentiell, dem entspricht auch die vergleichsweise hohe Sequenzhomologie (Mariscal *et al.*, 2011). Hingegen scheint die Verbindungsdomäne weniger stark konserviert zu sein und offenbart mehr Sequenzunterschiede. Analysen mit verkürzten Proteinen zeigen, dass die Verbindungsdomäne nicht für Filamentstabilität notwendig ist, jedoch die Größe des gebildeten Kanals beeinflusst (Mariscal *et al.*, 2011). Die Ausschlussgrenze der zu transportierenden Stoffe beruht daher wahrscheinlich nicht auf einer bestimmten konservierten Aminosäuresequenz als vielmehr auf der Länge der Verbindungsdomäne. Durch SepJ-Gfp Fusionsproteine konnte in *Anabaena* sp. PCC 7120 gezeigt werden, dass SepJ spezifisch an den Septen zwischen vegetativen Zellen im Filament lokalisiert ist. Darüber hinaus wird es im diazotrophen Wachstum auch zwischen vegetativen Zellen und

Heterocysten gefunden (Flores *et al.*, 2007). Da *N. punctiforme* neben der Fähigkeit zur Ausbildung von Heterocysten weiteres Differenzierungspotential besitzt, sollte auch hier die Lokalisation von SepJ in den verschiedenen Entwicklungsstadien verfolgt werden. Während SepJ bei *Anabaena* sp. PCC 7120 während Zellteilung zunächst als Ring organisiert ist und erst nach Abschluss der Zellteilung im Septum erscheint, wird SepJ_N in *N. punctiforme* erst nach vollständiger Zellteilung zum Septum rekrutiert. SepJ_N-Gfp konnte ebenfalls zwischen vegetativen Zellen und Heterocysten detektiert werden. Dabei sind jeweils zwei einzelne Gfp-Spots zwischen der vegetativen Zelle und der Heterocysten zu unterscheiden. Von der klaren Abgrenzung der zwei getrennten Gfp-Signale wurde bereits bei *Anabaena* sp. PCC 7120 berichtet (Flores *et al.*, 2007). Durch die C-terminale Fusion ist das Gfp an der inneren Seite der cytoplasmatischen Membran verankert. Aufgrund der größeren Distanz zwischen vegetativen Zellen und Heterocyste sind hier wahrscheinlich die Gfp-Signale deutlicher zu unterscheiden. Die Intensität des Gfp-Signals ist zwischen vegetativer Zelle und Heterocyste geringer als zwischen zwei vegetativen Zellen (Abb. 42). Dies deckt sich mit der Tatsache, dass die Heterocyste einen Kompromiss zwischen dem Austausch von Nährstoffmetaboliten und dem Schutz der Nitrogenase vor einströmenden Sauerstoff bewerkstelligen muss. Zum Einen wird die Verbindung von vegetativen Zellen und Heterocysten durch Verkleinerung der Halsregion der Heterocyste verringert. Die Intensität der Gfp-Fluoreszenz deutet zusätzlich darauf hin, dass die Anzahl von direkten Zell-Zell-verbindenden Strukturen ebenfalls reduziert wird.

Bei der Differenzierung von vegetativen Filamenten zu Hormogonien kommt es zur Zellteilung, die nahezu gleichzeitig in allen Zellen des Filaments beginnt. Der Differenzierungsprozess muss daher synchronisiert werden. Zell-Zell-verbindende Proteine spielen daher möglicherweise für diese synchrone Initiation und Regulation der Zellteilung und Differenzierung eine wichtige Rolle und sollten daher während der Hormogoniendbildung sichtbar werden. Der vorgeschlagenen Funktion von SepJ als Kanal für Zell-Zell-Kommunikation entsprechend, akkumuliert SepJ-Gfp in Septen zwischen den einzelnen Zellen der beweglichen Hormogonien. Während der Differenzierung von Akineten verschwindet SepJ. Die Abnahme des SepJ-Gfp-Signals in den sich entwickelnden Akineten stimmt dabei gut mit dem Fortschritt der Akinetenreifung überein. Dieses Ergebnis entspricht der Funktion der Akineten als einzelligem Überdauerungsstadium, die keine Kommunikation mit dem Filament benötigen. Möglicherweise wird SepJ degradiert, da eine

Zell-Zell-Kommunikation nicht mehr notwendig ist und weil SepJ bei der Abtrennung der Akineten aus dem Filament stört.

4.4 Charakterisierung von Insertionsmutanten von Zellwand-Genen in *N. punctiforme*

Einige Cyanobakterien können molekularen Stickstoff zu Ammonium reduzieren. Diese Fähigkeit macht Cyanobakterien als Symbiosepartner attraktiv. Vor allem Pflanzen haben Strategien entwickelt, um mit Cyanobakterien symbiotische Interaktionen einzugehen und sich dadurch deren Fähigkeit der N₂-Fixierung zu Nutze machen zu können. Während der Symbiont den pflanzlichen Wirt mit gebundenem Stickstoff versorgt, stellt die Pflanze eine geeignete Umgebung und bei Bedarf gebundene Kohlenstoffverbindungen bereit (Adams & Duggan, 2008). Für die Untersuchung der Symbiose zwischen Cyanobakterien und Pflanzen hat sich *N. punctiforme* ATCC 29133 als Modelorganismus bewährt. Die gesamte Genomsequenz ist unter: <http://genome.ornl.gov/microbial/npun/> verfügbar und *N. punctiforme* ist für genetische Manipulation zugänglich. *N. punctiforme* kann freilebend kultiviert werden, ist aber unter Laborbedingungen noch kompetent für die Symbiose mit verschiedenen Pflanzen (Enderlin & Meeks, 1983; Knight & Adams, 1996; Johansson & Bergman, 1994).

Cyanobakterien-Stämme die mit Pflanzen stabile Symbiosen eingehen können haben im Allgemeinen zwei Gemeinsamkeiten: die Fähigkeit zur Heterocystendifferenzierung sowie das Potential zur Ausbildung von beweglichen Hormogonien (Adams & Duggan, 2008). Auf der einen Seite können sich die zu gleitender Bewegung fähigen Filamente aktiv zur Wirtspflanze bewegen. Zusätzlich spielen Hormogonien bei der direkten Infektion der Pflanze eine entscheidende Rolle (Meeks, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Pili-Proteinen die symbiotische Kompetenz für die Ausbildung der Nostoc-Blasia Symbiose stark reduzieren (Duggan *et al.*, 2007). Allerdings genügt dieses Differenzierungspotential allein für die Ausbildung einer Symbiose nicht aus. Verschiedene Nostoc Stämme scheitern an der Infektion der Wirtspflanze, obwohl mehr als 90 % der vegetativen Filamente zu Hormogonien differenzieren (Campbell & Meeks, 1989). Das Wissen über die genauen molekularen Abläufe während der Symbiose ist gering. Microarray Analysen zeigen zwar den Expressionsverlauf des gesamten Genoms (Campbell *et al.*, 2008). Die gesamte Regulation bleibt bis jetzt indes weitestgehend unverstanden.

Bei der Differenzierung von vegetativen Filamenten zu Hormogonien kommt es zur sichtbaren Veränderung der Zellmorphologie und damit der Zellwand (Carballido-Lopez & Formstone, 2007). Die Zellwand ist die Schnittstelle zwischen der Zelle und deren Umwelt. Signale die Differenzierung auslösen, müssen die Zellwand passieren. Der Eintritt in den Wirt muss ohne das Auslösen von Abwehrreaktionen der Pflanze geschehen. Während der Symbiose beeinflusst der Wirt den Cyanobionten in seiner Physiologie: das Wachstum und die photosynthetische Aktivität wird verringert, gleichzeitig wird die N₂-Fixierung erhöht (Hill, 1989; Adams & Duggan, 2008). In dieser Arbeit sollten Zellwandgene, auf die Funktion für die Hormogonidifferenzierung und die Ausbildung der Symbiose untersucht werden. Folgende Gene die während der Hormogonidifferenzierung aktiviert werden, wurden ausgewählt: NpF0152, NpF0220, NpF4679, NpR2919, NpR6586 und NpR6096. Von NpR2919, NpR6586 und NpR6096 wurden jedoch keine Exkonjuganten erhalten.

4.4.1 Untersuchung von NpF0152

Das Gen NpF0152 codiert für ein etwa 24,8 kDa großes Protein mit einer transmembranen Domäne, das als Zellwandprotein annotiert wurden war (Campbell *et al.*, 2007). Die Inaktivierung von NpF0152 zeigte in DR293 keine Beeinträchtigung der Differenzierungseffizienz bei verschiedenen Induktionsmethoden. Weder bei der Hormogonieninduktion durch HIF, NSI, Verdünnung oder Rotlicht traten Unterschiede zur Differenzierungseffizienz im Vergleich zum WT auf. Allerdings war dies auch nicht zu erwarten, da NpF0152 sowohl bei HIF als auch bei NSI nach 12 h bzw. 18 h nach Induktion hoch reguliert wird. Zu diesem Zeitpunkt ist die Differenzierung der vegetativen Filamente zu den beweglichen, kürzeren Hormogonien aber bereits abgeschlossen. DR293 differenziert morphologisch unauffällige Hormogonien, die zu gleitenden Bewegungen auf festen Oberflächen befähigt sind. Dies bestätigt, dass NpF0152 wahrscheinlich nicht für die Differenzierung zu Hormogonien notwendig ist. Zur Untersuchung ob die Mutation in NpF0152 Auswirkungen auf die Ausbildung der Symbiose hat, wurden Cyanobakterien mit Moos inkubiert und auf Ausbildung der Symbiose untersucht. Die Infektionsfrequenz war mit der des WT vergleichbar. Durch Inaktivierung von NpF0152 wurde also der Eintritt in die Pflanze nicht beeinträchtigt. Auch die symbiotische Interaktion konnte trotz der Mutation von NpF0152 stattfinden. Das heißt, dass das Cyanobakterium weiterhin ausreichend Stickstoff fixierte und den Wirt mit gebundenen Stickstoffverbindungen versorgte.

Im Genom von *N. punctiforme* konnten zwar keine Homologen zu NpF0152 identifiziert werden, dennoch ist es möglich, dass die Funktion von NpF0152 von anderen Proteinen übernommen wird. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass trotz starker Induktion des Genes bei Hormogonien die Genfunktion für symbiotische Interaktionen nicht essentiell ist.

4.4.2 Untersuchung von NpF0220

Vergleichende BLAST-Analysen sagen NpF0220 als UDP-Galactopyranose-Mutase voraus. Mitglieder dieser Enzymfamilie katalysieren die Umwandlung von UDP-Galp zu UDP-Galf. UDP-Galf bzw. Galf sind wichtige Zellwandbestandteile bei verschiedenen Gram-negativen Bakterien, darunter potentiell human-Pathogenen wie *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae* und eukaryotischen Parasiten (Sanders *et al.*, 2001). Galf ist beispielsweise Bestandteil des O-Antigen vom Lipopolysaccharid (LPS), welches eine wichtige Rolle beim Schutz gegenüber dem Wirtsimmunsystem einnimmt (Sanders *et al.*, 2001). Dementsprechend spielt die UDP-Galactopyranose-Mutase eine entscheidende Rolle für die Überlebensfähigkeit in Wirt-Parasit-Beziehungen (Pan *et al.*, 2001). Auch bei Pflanzen sind LPS und extrazelluläre Polysaccharide für die Wirts-Pathogen-Erkennung wichtig, da sie die Immunantwort sowohl auslösen als auch unterdrücken können (Silipo *et al.*, 2010). Auf ähnliche Weise gewähren Glykokonjugate als Oberflächenbestandteile der Zellhülle bei symbiotischen Lebensgemeinschaften die Wirt-Symbiont-Erkennung. Als gut untersuchtes Beispiel gilt hierbei die Symbiose zwischen Leguminosen und *Rhizobien* (Knöllchenbakterien). Vor der Infektion der Pflanze kommt es durch Anlagerung der spezifischen bakteriellen extrazellulären Polysaccharide an pflanzliche Lectine zur Wirt-Symbiont-Erkennung (Dazzo *et al.*, 1984). Wahrscheinlich unterdrücken die extrazellulären Polysaccharide die Wirtsabwehr und ermöglichen damit erst die Symbiose (Downie, 2010). Die spezifische Erkennung von geeigneten Symbiosepartnern könnte auch bei Symbiose zwischen Cyanobakterien und Pflanzen über spezifische Polysaccharide erfolgen. Tatsächlich zeigt NpF0220 Sequenzübereinstimmungen mit Smed_5685 von *Sinorhizobium medicae* WSM419, das mit verschiedenen Leguminosen Symbiosen eingeht (Rome *et al.*, 1996). Bei der Besiedlung von Weizen (*Triticum vulgare*) konnte die wichtige Rolle der extrazellulären Polysaccharide von *N. punctiforme* bereits demonstriert werden (Gantar *et al.*, 1995).

Es ist bekannt, dass sich in *N. punctiforme* die Zusammensetzung der extrazellulären Glykokonjugate der Zellhülle im Laufe des Differenzierungsprozesses verändert (Schüßler *et*

al., 1997). Die spezifische Differenzierungsstadium-abhängige Zusammensetzung der Zellhülle, könnte ein wichtiges Element bei der Zell-Zell-Erkennung sein. Bei Symbiosen zwischen Pflanzen und Cyanobakterien wird nur Hormogonien Einlass gewährt. Jedoch gibt es auch Cyanobakterien, die zwar Hormogonien differenzieren können, von denen aber trotzdem keine Symbiosen mit Pflanzen bekannt ist. Interessant wäre es daher die Zusammensetzung der extrazellulären Polysaccharidschicht von symbiotischen Stämmen und nicht symbiotischen Stämmen zu vergleichen.

Die Inaktivierung von NpF0220 durch Insertion der C.K3 Resistenzkassette hatte keine Auswirkung auf das Wachstumsverhalten der Kultur und die Morphologie der Filamente bei Wachstum auf Medium mit oder ohne gebundene Stickstoffquelle. Die Differenzierung von Hormogonien erfolgte bei DR288 auf unterschiedlichste Stimuli mit der gleichen Effizienz wie beim WT. Zudem waren die Hormogonien morphologisch unauffällig und zur gleitenden Bewegung auf festen Oberflächen fähig. Trotz Inaktivierung von NpF0220 konnten die Hormogonien das Moos noch infizieren. Die Infektionsfrequenz war dabei etwas geringer als beim WT. Nach Eintritt in das Moos konnte jedoch eine stabile Symbiose ausgebildet werden, was auf einen nicht beeinträchtigten Transfer der Fixierungs- und Stoffwechselprodukte hindeutet.

Interessanterweise ist bei dem obligat symbiotisch lebenden Cyanobakterium *N. azollae* 0708 das Gen das für das Homologe der UDP-Galactopyranose-Mutase codiert, durch Transposon-Insertion unterbrochen. Bei der Symbiose zwischen dem Algenfarn *Azolla filiculoides* Lam. und *N. azollae* 0708 wird das Cyanobakterium durch vegetative Fragmentierung der Pflanze oder durch den Transfer in die Megasporangien in eine neue Pflanzengeneration weitergegeben (Zheng *et al.*, 2009; Ran *et al.*, 2010). Denkbar wäre, dass durch die dauerhafte Beherbergung die Wirt-Symbiont-Erkennung nicht mehr notwendig ist.

Bei der Expression von NpF0220 während der Hormogonien-differenzierung ist bemerkenswert, dass das Gen innerhalb der ersten 24 h nicht hochreguliert wird, wenn die Induktion durch HIF erfolgte. In Hormogonien, deren Differenzierung durch den Entzug einer gebundenen Stickstoffquelle induziert wurde, kommt es jedoch zu einer Steigerung der Genexpression (Campbell *et al.*, 2008).

4.4.3 Untersuchung von NpF4679

NpF4679 gehört zur Familie der RTX-Proteine. Mitglieder dieser Familie zeichnen sich durch das konservierte Sequenzmotiv GGxGxD[L/I/V/W/Y/F]x aus, welches der Ca^{2+} Bindung dient (Lally *et al.*, 1999). In Gram-negativen Pathogenen von Menschen und Tieren spielen RTX-Proteine als Poren-formende Toxinen eine wichtige Rolle bei der Virulenz (Kuhnert *et al.*, 1997). Die meisten derzeit bekannten Toxine sind in einem Operon zusammen mit einem Gen für die Toxinaktivierung und Genen für den Transport organisiert (Kuhnert *et al.*, 1997). Beispiele hierfür sind Hämolyisin (Hyla) von *E. coli* (Felmee *et al.*, 1985) oder *frpC* von *Neisseria meningitidis* (Thompson *et al.*, 1993). Neben diesen RTX-Proteinen von pathogenen Bakterien existieren nichttoxische RTX-Proteine (Sakiyama *et al.*, 2006). Beispielsweise verfügen SwimA von *Synechococcus* sp. WH8102 und Ocillin von *Phormidium uncinatum* über das konservierte Sequenzmotiv GGxGxD[L/I/V/W/Y/F]x (Brahamsha, 1996; Hoiczky & Baumeister, 1997). SwimA wird für schwimmende Bewegung bei *Synechococcus* sp. WH8102 benötigt (McCarren & Brahamsha, 2009). Von Ocillin konnte die essentielle Bedeutung für gleitende Bewegung bei *Phormidium uncinatum* nachgewiesen werden (Hoiczky & Baumeister, 1997). Im Gegensatz zu der eben beschriebenen essentiellen Rolle von RTX-Proteinen für die Bewegung, verursacht in *Synechocystis* sp PCC 6803 eine Akkumulation vom RTX-Protein HLP an der Zell-Oberfläche den Verlust der Beweglichkeit (Sakiyama *et al.*, 2006).

Auch in Rhizobien konnte ein Protein identifiziert werden, das die typische Ca^{2+} -binde Sequenz aufweist und weitere Sequenzübereinstimmungen mit Haemolysin von *E. coli* besitzt. Dabei handelt es sich um NodO. NodO wird ohne Abschneiden der N-terminalen Region ins Medium transportiert (Economou *et al.*, 1990). *In vitro* Studien zeigten, dass NodO Kationen-spezifische Kanäle im lipid-bilayer formen kann (Sutton *et al.*, 1994). Eine genaue Funktion konnte dem Protein aber bisher nicht zugeordnet werden. Möglicherweise stimuliert NodO einen Ionen-Einstrom über die Plasmamembran, der dann eine weitere Regulation verursacht. NodO begünstigt zwar die Infektion, ist aber dazu nicht zwingend notwendig (Walker & Downie, 2000).

Die Inaktivierung von NpF4679 durch Einfügen der C.K3 Resistenzkassette hatte keine Auswirkung auf das Wachstumsverhalten der Kultur oder die Morphologie der Filamente bei Wachstum auf stickstoffhaltigen oder stickstofffreiem Medium. Die Differenzierung von

Hormogonien erfolgte auf unterschiedlichste Stimuli mit der gleichen Effizienz wie beim WT. Die Hormogonien waren morphologisch unauffällig, zur gleitenden Bewegung auf festen Oberflächen fähig und konnten darüber hinaus auch noch das Moos infizieren. Allerdings war die Infektionsfrequenz etwas geringer als beim WT. Nach Eintritt in das Moos konnte eine stabile Symbiose ausgebildet werden, was auf einen nicht beeinträchtigten Transfer der Fixierungs- und Stoffwechselprodukte hindeutet.

Anhand der Ergebnisse ist es unwahrscheinlich dass NpF4679 an der Hormogonien-Bewegung beteiligt ist. Die Bewegung auf festen Oberflächen wird bei *N. punctiforme* wahrscheinlich hauptsächlich über Typ IV Pili gewährleistet (Duggan *et al.*, 2007). Möglich ist aber eine indirekte Beteiligung bei der Infektion, ähnlich wie sie von NodO beschrieben wurde (Walker & Downie, 2000). Die geringe Auswirkung der Inaktivierung von NpF4679 könnte aber auch durch eine funktionelle Redundanz hervorgerufen werden. Das Genom von *N. punctiforme* codiert mit NpR2919 für ein weiteres RTX-Toxin, dass während der Hormogonien Differenzierung stark induziert ist. Möglicherweise kann NpR2919 in DR306 teilweise die Funktion von NpF4679 übernehmen.

Insgesamt verdeutlichten die Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung der Insertionsmutanten von Zellwand betreffenden Genen in *N. punctiforme*, dass Expressionsanalysen kritisch hinterfragt werden müssen. Die starke Expression eines Genes drückt nicht automatisch dessen große Bedeutung für den Organismus aus.

4.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte durch FRAP-Experimente gezeigt werden, dass die Inaktivierung von *amiC1_{Ana}* zum Verlust der Zell-Zell-Kommunikation führt. Unklar bleibt jedoch, ob die Mutation die Einlagerung bestimmter intrazellulärer Transportsysteme verhindert, oder ob es durch den Verlust der Amidase-Aktivität allgemein zur Verdichtung und Anhäufung von Peptidoglykan im Bereich des Septums kommt, wodurch weitere Modifikationen nicht mehr möglich sind. Bei der Beantwortung dieser Frage könnte eine erst seit kurzem verfügbare Methode zur *in vivo*-Markierung der Zellwand behilflich sein. Dabei wird an das Murein-Tripeptid (L-alanyl- γ -D-glutamyl-L-lysine) am Lysinrest N-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl (AeK-NBD) gebunden. Bietet man den Zellen AeK-NBD extrazellulär im Medium an, wird es aufgenommen und über das Zellwand-Recycling System in den bestehenden Murein-

Sacculus eingebaut (Olrichs *et al.*, 2011). Die Verteilung von AeK–NBD kann dann durch Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden. In *E. coli* konnte durch diese Strategie bereits bestätigt werden, dass es in der *amiABC*-Dreifachmutante zur Akkumulation von Murein im Septum kommt.

Eine weitere Frage die im Laufe dieser Arbeit aufgekommen ist, betrifft die Funktion *amiC1_{Ana}* bzw. *amiC2_{Ana}* für die Filamentmorphologie. Wie bereits diskutiert, könnte das Gencluster *all4999*, *all4998* eine potentielle Rolle für die Bestimmung der Zellorientierung in *Anabaena* sp. PCC 7120 einnehmen. Interessant wäre daher die Inaktivierung dieser Gene und eine funktionelle Charakterisierung der entstehenden Mutanten. Da Amidasen oft eine hohe Redundanz aufweisen, sollten ebenfalls Mehrfachmutanten aller Amidasegene angefertigt werden.

Für einen größeren Überblick über die Aufgabe von Amidasen in filamentösen Cyanobakterien wäre es interessant die Auswirkungen auf die Deletion von Amidase-Homologen in weiteren filamentösen Cyanobakterien zu untersuchen. Ein Kandidat hierfür wäre *A. variabilis*, wo die Gene Ava1465 und Ava1466 für *amiC1* bzw *amiC2* codieren. *A. variabilis* ist wie *N. punctiforme* zur Ausbildung von Heterocysten und Akineten befähigt. Das Potenzial zur Differenzierung von Hormogonien ist nicht vorhanden.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zellwand-Amidasen *AmiC1_{Ana}* und *AmiC2_{Ana}* eine unterschiedliche Relevanz für das diazotrophe Wachstum bei *Anabaena* sp. PCC 7120 besitzen. Während die Inaktivierung von *amiC2_{Ana}* keine Auswirkungen auf die Differenzierung von Heterocysten hatte, führte die Mutation in *amiC1_{Ana}* zum stark eingeschränkten Differenzierungspotential. Dabei war der gesamte Prozess der Heterocystendifferenzierung bereits in einem sehr zeitigen Stadium beeinträchtigt. Die *amiC1_{Ana}*-Mutante zeigte zum Einen keinen Abbau der Phycobiliproteine. TEM-Studien bestätigten zudem, dass in SR477 keine Umbildung der intrazellulären Thylakoid-Membran stattfand. Darüber hinaus wurde durch die Inaktivierung von *amiC1_{Ana}* der Aufbau der Heterocysten-spezifischen Zellwandhülle verhindert, so dass weder die Auflagerung von Hep auf die Zellwand noch die Synthese der Hgl stattfanden.

Durch semi-quantitative RT-Analysen konnte demonstriert werden, dass die Ursache des Differenzierungsdefizits nicht in einer gestörten Aktivierung der Heterocysten-spezifischen Regulatoren beruht. Vielmehr zeigten FRAP-Untersuchungen, dass in SR477 der unspezifische Transfer niedermolekularer Stoffe über direkte Zell-Zell-Verbindungen stark beeinträchtigt war. Dies verdeutlicht die große Bedeutung der Zell-Zell-Kommunikation für die Initiation der Heterocystendifferenzierung.

Obwohl die Aktivität der Zellwand-Amidasen *AmiC1_{Ana}* und *AmiC2_{Ana}* nicht für das vegetative Wachstum auf gebundenen Stickstoffquellen benötigt wird, hatte die Inaktivierung der Amidasen Auswirkungen auf die natürliche Integrität der äußeren Membran.

Durch Lokalisationsstudien von *AmiC2* von *N. punctiforme* und von *AmiC1_{Ana}* und *AmiC2_{Ana}* von *Anabaena* sp. PCC 7120 die mittels Gfp-Fusionen durchgeführt wurden, konnte die Hypothese bekräftigt werden, dass die Zellwand-Amidasen eine spezifische Funktion bei Modifikation des Peptidoglykan am Septum junger Tochterzellen einnehmen. Die Lokalisation von Zellwand-Amidasen in Proheterocysten lässt zusätzlich auf eine Funktion der Amidasen beim Peptidoglykan-Abbau zur Bildung des Halskanals vermuten. Die Lokalisation von *AmiC2* von *N. punctiforme* an der Spitze der endständigen Zelle der Hormogonien deutet darauf hin, dass *AmiC2* noch zur vollständigen Abschnürung des Septums während der Zellteilung, wie sie beispielsweise in *E. coli* auftritt, befähigt ist. Dies verdeutlicht auch die starke Kontrolle der Zellwand-Amidasen im vegetativen Wachstum.

Bei der Untersuchung der subzellulären Lokalisation von SepJ_N in *N. punctiforme* konnte demonstriert werden, dass SepJ_N, der postulierten Funktion als Kanal für Zell-Zell-Kommunikation entsprechend, in den Septen der Einzel-Zellen im vegetativen Filamenten als auch im Hormogonien-Filament akkumuliert. Während der Reifung von vollständig ausgebildeten Akineten verschwindet SepJ_N. Dieses Ergebnis entspricht der Funktion der Akineten als einzelliges Überdauerungsstadium, die keine Kommunikation mit dem Filament benötigen.

Die durchgeführte Inaktivierung von NpF0152, NpF0220 und NpF4679 hatte kaum Folgen auf das Wachstumsverhalten von *N. punctiforme* oder dessen Fähigkeit zum Eingehen der Symbiose mit *A. punctatus* und verdeutlicht damit vermutlich die hohe Redundanz dieser Proteine.

6. Literaturverzeichnis

Adams, D. G., & Duggan, P. S. (1999). Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytologist* **144**, 3-33.

Allen, M. B. & Arnon, D. I. (1955). Studies on Nitrogen-Fixing Blue-Green Algae. I. Growth and Nitrogen Fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. *Plant Physiol.* **30**, 366-372.

Anderson, D. C., Campbell, E. L. & Meeks, J. C. (2006). A Soluble 3D LC/MS/MS Proteome of the Filamentous Cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Journal of Proteome Research* **5**, 3096-3104.

Angermayr, S. A., Hellingwerf, K. J., Lindblad, P. & Teixeira de Mattos, M. J. (2009). Energy biotechnology with cyanobacteria. *Current Opinion in Biotechnology* **20**, 257-263.

Argueta, C. & Summers, M. L. (2005). Characterization of a model system for the study of *Nostoc punctiforme* akinetes. *Archives of Microbiology* **183**, 338-346.

Awai, K., Lechno-Yossef, S. & Wolk, C. P. (2009). Heterocyst Envelope Glycolipids. Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions **179**, Wada and N. Murata (eds.), pp.179–202., Springer Science + Business Media B.V.

Bergman, B., Gallon, J. R., Rai, A. N. & Stal, L. J. (1997). N₂ Fixation by non-heterocystous cyanobacteria 1, Vol. **19**, pp. 139-185. Blackwell Publishing Ltd.

Bergman, B., Rasmussen, U. & Rai, A. N. (2007). Cyanobacterial associations. In: Elmerich C, Newton WE, eds. Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Bernhardt, T. G. & P. A. J. de Boer (2003). The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Molecular Microbiology* **48**, 1171-1182.

Bernhardt, T. G. & de Boer, P. A. J. (2004). Screening for synthetic lethal mutants in *Escherichia coli* and identification of EnvC (YibP) as a periplasmic septal ring factor with murein hydrolase activity. *Molecular Microbiology* **52**, 1255-1269.

Berrendero, E., Perona, E. & Mateo, P. (2008). Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 447-460.

Bi, E. & Lutkenhaus, J. (1991). FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **354**, 161-164.

Bigot, S., Corre, J., Louarn, J.-M., Cornet, F. & Barre, F.-X. (2004). FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein. *Molecular Microbiology* **54**, 876-886.

- Black, T. A., Cai, Y. & Wolk, C. P. (1993).** Spatial expression and autoregulation of *hetR*, a gene involved in the control of heterocyst development in *Anabaena*. *Molecular Microbiology* **9**, 77-84.
- Black, T. A. & 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**, 2282-2292.
- Brahamsha, B. (1996).** An abundant cell-surface polypeptide is required for swimming by the nonflagellated marine cyanobacterium *Synechococcus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 6504-6509.
- Braun, V. & Rehn, K. (1969).** Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the *E. coli* cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure. *Eur J Biochem.* **10**, 426-38.
- Buddelmeijer, N. & Beckwith, J. (2002).** Assembly of cell division proteins at the *E. coli* cell center. *Current Opinion in Microbiology* **5**, 553-557.
- Buddelmeijer, N. & Beckwith, J. (2004).** A complex of the *Escherichia coli* cell division proteins FtsL, FtsB and FtsQ forms independently of its localization to the septal region. *Molecular Microbiology* **52**, 1315-1327.
- Büdel, B., Darienko, T., Deutschewitz, K., Dojani, S., Friedl, T., Mohr, K., Salisch, M., Reisser, W. & Weber, B. (2009).** Southern African Biological Soil Crusts are Ubiquitous and Highly Diverse in Drylands, Being Restricted by Rainfall Frequency. *Microbial Ecology* **57**, 229-247.
- Buikema, W. & Haselkorn, R. (1991).** Characterization of a gene controlling heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Genes Dev* **5**, 321 - 330.
- Cai, Y. P. & Wolk, C. P. (1990).** Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *J. Bacteriol.* **172**, 3138-3145.
- Campbell, E., Summers, M., Christman, H., Martin, M. & Meeks, J. (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**, 5247 - 5256.
- Campbell, E. L., Christman, H. & Meeks, J. C. (2008).** DNA Microarray Comparisons of Plant Factor- and Nitrogen Deprivation-Induced Hormogonia Reveal Decision-Making Transcriptional Regulation Patterns in *Nostoc punctiforme*. *J. Bacteriol.* **190**, 7382-7391.
- Campbell, E. L. & Meeks, J. C. (1989).** Characteristics of Hormogonia Formation by Symbiotic *Nostoc* sp. in Response to the Presence of *Anthoceros punctatus* or Its Extracellular Products. *Appl Environ Microbiol* **55**, 125-31.

Campbell, E. L., Christman, H. & Meeks, J. C. (2008). DNA microarray comparisons of plant factor- and nitrogen deprivation-induced Hormogonia reveal decision-making transcriptional regulation patterns in *Nostoc punctiforme*. *J Bacteriol.* **190**, 7382-91.

Campbell, E. L., Summers, M. L., Christman, H., Martin, M. E. & 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**, 5247-5256.

Carballido-López, R. & Formstone, A. (2007). Shape determination in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology* **10**, 611-616.

Castenholz, R. W. & Waterbury, J. B. (1989). Group I. Cyanobacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. **3**, pp. 1710–1728. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.

Cavalier-Smith, T. (1975). The origin of nuclei and of eukaryotic cells. *Nature* **256**, 463-468.

Cavalier-Smith, T. (1992). The number of symbiotic origins of organelles. *Biosystems* **28**, 91-106.

Chapman, K. E., Duggan, P. S., Billington, N. A. & Adams, D. G. (2008). Mutation at Different Sites in the *Nostoc punctiforme* *cyoC* Gene, Encoding the Multiple-Domain Enzyme Adenylate Cyclase, Results in Different Levels of Infection of the Host Plant *Blasia pusilla*. *J. Bacteriol.* **190**, 1843-1847.

Cloud, P. (1972). A working model of the primitive Earth. *Am J Sci* **272**, 537-548.

Cohen, M. F., Wallis, J. G., Campbell, E. L. & Meeks, J. C. (1994). Transposon mutagenesis of *Nostoc* sp. strain ATCC 29133, a filamentous cyanobacterium with multiple cellular differentiation alternatives. *Microbiology* **140**, 3233-3240.

Damerval, T., Guglielmi, G., Houmard, J. & de Marsac, N. T. (1991). Hormogonium Differentiation in the Cyanobacterium *Calothrix*: A Photoregulated Developmental Process. *The Plant Cell Online* **3**, 191-201.

Dazzo, F. B., Truchet, G. L., Sherwood, J. E., Hrabak, E. M., Abe, M. & Pankratz, S. H. (1984). Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. *Appl Environ Microbiol* **48**, 1140-50.

de Boer, P., Crossley, R. & Rothfield, L. (1992). The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature* **359**, 254-256.

de Souza, R. F., Anantharaman, V., de Souza, S. J., Aravind, L. & Gueiros-Filho, F. J. (2008). AMIN domains have a predicted role in localization of diverse periplasmic protein complexes. *Bioinformatics* **24**, 2423-2426.

den Blaauwen, T., de Pedro, M. A., Nguyen-Distèche, M. & Ayala, J. A. (2008). Morphogenesis of rod-shaped sacculi. *FEMS Microbiology Reviews* **32**, 321-344.

- Diez, B., Bauer, K. & Bergman, B. (2007).** Epilithic Cyanobacterial Communities of a Marine Tropical Beach Rock (Heron Island, Great Barrier Reef): Diversity and Diazotrophy. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 3656-3668.
- Downie, J. A. (2010).** The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiology Reviews* **34**, 150-170.
- Ducret, A., Sidler, W., Wehrli, E., Frank, G. & Zuber, H. (1996).** Isolation, Characterization and Electron Microscopy Analysis of A Hemidiscoidal Phycobilisome Type from the Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *European Journal of Biochemistry* **236**, 1010-1024.
- Duggan, P. S., Gottardello, P. & Adams, D. G. (2007).** Molecular Analysis of Genes in *Nostoc punctiforme* Involved in Pilus Biogenesis and Plant Infection. *J. Bacteriol.* **189**, 4547-4551.
- Economou, A., Hamilton, W. D., Johnston, A. W. & Downie, J. A. (1990).** The Rhizobium nodulation gene *nodO* encodes a Ca²⁽⁺⁾-binding protein that is exported without N-terminal cleavage and is homologous to haemolysin and related proteins. *EMBO J* **9**, 349-54.
- Ehira, S., Ohmori, M. & Sato, N. (2006).** Genome-wide Expression Analysis of the Responses to Nitrogen Deprivation in the Heterocyst-forming Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *DNA Research* **10**, 97-113.
- Ehlert, K. & Holtje, J. (1996).** Role of precursor translocation in coordination of murein and phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**, 6766-6771.
- Ekman, M., Tollback, P. & Bergman, B. (2008).** Proteomic analysis of the cyanobacterium of the *Azolla* symbiosis: identity, adaptation, and NifH modification. *J Exp Bot* **59**, 1023-34.
- Elhai, J. & 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**, 119-138.
- Endelin, C. & Meeks, J. (1983).** Pure culture and reconstitution of the *Anthoceros-Nostoc* symbiotic association. *Planta* **158**, 157 - 165.
- Ernst, A., Black, T., Cai, Y., Panoff, J., Tiwari, D. & Wolk, C. (1992).** Synthesis of nitrogenase in mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 affected in heterocyst development or metabolism. *J Bacteriol* **174**, 6025.
- Ernst, A., Kirschenlohr, H., Diez, J. & Böger, P. (1984).** Glycogen content and nitrogenase activity in *Anabaena variabilis*. *Archives of Microbiology* **140**, 120-125.
- Farquhar, J., Bao, H. & Thiemens, M. (2000).** Atmospheric Influence of Earth's Earliest Sulfur Cycle. *Science* **289**, 756-758.
- Fay, P. (1992).** Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol Reviews* **56**, 340 - 373.

- Feilmeier, B. J., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H. & Phillips, G. J. (2000).** Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**, 4068-76.
- Fein, J. E. & Rogers, H. J. (1976).** Autolytic enzyme-deficient mutants of *Bacillus subtilis* 168. *J. Bacteriol.* **127**, 1427-1442.
- Felmlee, T., Pellett, S. & Welch, R. A. (1985).** Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. *J. Bacteriol.* **163**, 94-105.
- Fiedler, G., Arnold, M., Hannus, S. & Maldener, I. (1998).** The DevBCA exporter is essential for envelope formation in heterocysts of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Molecular Microbiology* **27**, 1193-1202.
- Figurski, D. H. & 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 USA* **76**, 1648-52.
- Finsinger, K., Scholz, I., Serrano, A., Morales, S., Uribe-Lorio, L., Mora, M., Sittenfeld, A., Weckesser, J. & Hess, W. R. (2008).** Characterization of true-branching cyanobacteria from geothermal sites and hot springs of Costa Rica. *Environmental Microbiology* **10**, 460-473.
- Flaherty, B., Van Nieuwerburgh, F., Head, S. & Golden, J. (2011).** Directional RNA deep sequencing sheds new light on the transcriptional response of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to combined-nitrogen deprivation. *BMC Genomics* **12**, 332.
- Flores, E. & Herrero, A. (2010).** Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nat Rev Micro* **8**, 39-50.
- Flores, E., Herrero, A., Wolk, C. P. & Maldener, I. (2006).** Is the periplasm continuous in filamentous multicellular cyanobacteria? *Trends in Microbiology* **14**, 439-443.
- Flores, E., Pernil, R., Muro-Pastor, A. M., Mariscal, V., Maldener, I., Lechno-Yossef, S., Fan, Q., Wolk, C. P. & 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**, 3884-3890.
- Forchhammer, K. (2004).** Global carbon/nitrogen control by P_{II} signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets. *FEMS Microbiology Reviews* **28**, 319-333.
- Forsberg, C. & Rogers, H. J. (1971).** Autolytic Enzymes in Growth of Bacteria. *Nature* **229**, 272-273.
- Frias, J. E., Flores, E. & Herrero, A. (1994).** Requirement of the regulatory protein NtcA for the expression of nitrogen assimilation and heterocyst development genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Molecular Microbiology* **14**, 823-832.

- Fuger, P., Behrends, L.B., Mertel, S., Sigrist, S.J., & Rasse, T.M. (2007).** Live imaging of synapse development and measuring protein dynamics using two-color fluorescence recovery after photo-bleaching at *Drosophila* synapses. *Nat Protoc* **2**: 3285–3298.
- Gambacorta, A., Romano, I., Trincone, A., Soriente, A., Giordano, M. and Sodano, G., (1996).** The heterocyst glycolipids of cyanobacteria. 5. Heterocyst glycolipids from five nitrogen-fixing cyanobacteria. *Gazz. Chim. Ital.*, 126,653–656.
- Gantar, M., Rowell, P. & Kerby, N. W., (1993).** Role of extracellular polysaccharide in the colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) roots by N₂-fixing cyanobacteria. *Biol Fertil Soils* **19**, 41-48.
- Giovannoni, S. J., Turner, S., Olsen, G. J., Barns, S., Lane, D. J. & Pace, N. R. (1988).** Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* **170**, 3584-3592.
- Golden, J. W. & Wiest, D. R. (1988).** Genome rearrangement and nitrogen fixation in *Anabaena* blocked by inactivation of *xisA* gene. *Science* **242**, 1421-3.
- Golecki, J. R. (1977).** Studies on ultrastructure and composition of cell walls of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Archives of Microbiology* **114**, 35-41.
- Hanahan, D. (1985).** Techniques for transformation of *Escherichia coli*. *DNA Cloning: A Practical Approach* **1**, 109-135.
- Hanahan, D., J. Jessee & F. R. Bloom, (1991).** Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* **204**: 63-113.
- Hale, C. A. & de Boer, P. A. J. (1997).** Direct Binding of FtsZ to ZipA, an Essential Component of the Septal Ring Structure That Mediates Cell Division in *E. coli*. *Cell* **88**, 175-185.
- Heidrich, C., Templin, M. F., Ursinus, A., Merdanovic, M., Berger, J., Schwarz, H., de Pedro, M. A. & Höltje, J.-V. (2001).** Involvement of N-acetylmuramyl-l-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **41**, 167-178.
- Heidrich, C., Ursinus, A., Berger, J., Schwarz, H. & Holtje, 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**, 6093-6099.
- Herdman, M. (1988)** Cellular differentiation: akinetes, *Methods in Enzymology* **167**, 222-232.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A. M. & Flores, E. (2001).** Nitrogen Control in Cyanobacteria. *J. Bacteriol.* **183**, 411-425.
- Hill, D. J. (1989).** The control of the cell cycle in microbial symbionts. In *New Phytologist*, Vol. **112**, pp. 175-184.

Hoiczky, E. & Baumeister, W. (1995). Envelope structure of four gliding filamentous cyanobacteria. *J Bacteriol* **177**, 2387-2395.

Hoiczky, E. & Baumeister, W. (1997). Oscillin, an extracellular, Ca²⁺-binding glycoprotein essential for the gliding motility of cyanobacteria. *Mol Microbiol* **26**, 699-708.

Hoiczky, E. & Hansel, A. (2000). Cyanobacterial Cell Walls: News from an Unusual Prokaryotic Envelope. *J. Bacteriol.* **182**, 1191-1199.

Höltje, J.-V. (1995). From growth to autolysis: the murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology* **164**, 243-254.

Höltje, J.-V. & Tuomanen, E. I. (1991). The murein hydrolases of *Escherichia coli*: properties, functions and impact on the course of infections in vivo. *J Gen Microbiol* **137**, 441-454.

Holtzendorff, J., Partensky, F., Jacquet, S., Bruyant, F., Marie, D., Garczarek, L., Mary, I., Vaultot, D. & Hess, W. R. (2001). Diel Expression of Cell Cycle-Related Genes in Synchronized Cultures of *Prochlorococcus* sp. Strain PCC 9511. *J. Bacteriol.* **183**, 915-920.

Hu, B., Yang, G., Zhao, W., Zhang, Y. & Zhao, J. (2007). MreB is important for cell shape but not for chromosome segregation of the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Molecular Microbiology* **63**, 1640-1652.

Huang, G., Fan, Q., Lechno-Yossef, S., Wojciuch, E., Wolk, C., Kaneko, T. & Tabata, S. (2005). Clustered genes required for the synthesis of heterocyst envelope polysaccharide in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **187**, 1114 - 1123.

Johansson, C. & Bergman, B. (1994). Reconstitution of the symbiosis of *Gunnera manicata* Linden: cyanobacterial specificity. *New Phytol* **126**, 643-652.

Jürgens, U. J., Drews, G. & Weckesser, J. (1983). Primary structure of the peptidoglycan from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6714. *J. Bacteriol.* **154**, 471-478.

Jürgens, U. J. & Weckesser, J. (1986). Polysaccharide covalently linked to the peptidoglycan of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6714. *J. Bacteriol.* **168**, 568-573.

Kaiser, D. (2001). Building a multicellular organism. *Annu Rev Genet* **35**, 103-23.

Kajimura, J., Fujiwara, T., Yamada, S., Suzawa, Y., Nishida, T., Oyamada, Y., Hayashi, I., Yamagishi, J. i., Komatsuzawa, H. & Sugai, M. (2005). Identification and molecular characterization of an N-acetylmuramyl-l-alanine amidase Sle1 involved in cell separation of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* **58**, 1087-1101.

Kasting, J. F. & Siefert, J. L. (2002). Life and the Evolution of Earth's Atmosphere. *Science* **296**, 1066-1068.

- Kim, Y. H., Park, Y. M., Kim, S.-J., Park, Y.-I., Choi, J.-S. & Chung, Y.-H. (2004).** The role of Slr1443 in pilus biogenesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803: involvement in post-translational modification of pilins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **315**, 179-186.
- Kneip, C., Lockhart, P., Voss, C. & Maier, U.-G. (2007).** Nitrogen fixation in eukaryotes - New models for symbiosis. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 1-12.
- Knight, C. D. & Adams, D. G. (1996).** A method for studying chemotaxis in nitrogen fixing cyanobacterium-plant symbioses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **49**, 73-77.
- Kodani, S., Ishida, K. & Murakami, M. (1999).** Occurrence and identification of UDP-N-acetylmuramyl-pentapeptide from the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *FEMS Microbiology Letters* **176**, 321-325.
- Koksharova, O. A. & Wolk, C. P. (2002).** Genetic tools for cyanobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 123-37.
- Koraimann, G. (2003).** Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 2371-2388.
- Krogmann, D. W. (1973).** Photosynthetic Reactions and Components of Thylakoids. In *The Biology of Blue-green Algae*, 80-98. Edited by N. Carr & B. Whitton: Oxford, Blackwell Scientific.
- Kuhnert, P., Heyberger-Meyer, B., Burnens, A. P., Nicolet, J. & Frey, J. (1997).** Detection of RTX toxin genes in gram-negative bacteria with a set of specific probes. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2258-2265.
- Kumar, K., Mella-Herrera, R. & Golden, J. (2009).** Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, 1-19.
- Lally, E. T., Hill, R. B., Kieba, I. R. & Korostoff, J. (1999).** The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends in Microbiology* **7**, 356-361.
- Lang, N. J. & Fay, P. (1971).** The Heterocysts of Blue-Green Algae. II. Details of Ultrastructure. *Proc R Soc Lond B* **178**, 193-203.
- Laurent, S., Chen, H., Bedu, S., Ziarelli, F., Peng, L. & Zhang, C. C. (2005).** Nonmetabolizable analogue of 2-OG elicits heterocyst differentiation under repressive conditions in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 9907-9912
- Lazaro, S., Fernandez-Pinas, F., Fernandez-Valiente, E., Blanco-Rivero, A. & Leganes, F. (2001).** *pbpB*, a Gene Coding for a Putative Penicillin-Binding Protein, Is Required for Aerobic Nitrogen Fixation in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC7120. *J. Bacteriol.* **183**, 628-636.
- Leganes, F., Blanco-Rivero, A., Fernández-Piñas, F., Redondo, M., Fernández-Valiente, E., Fan, Q., Lechno-Yossef, S. & Wolk, C. (2005).** Wide variation in the cyanobacterial complement of presumptive penicillin-binding proteins. *Archives of Microbiology* **184**, 234-248.

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

Losick, R. & Stragier, P. (1992). Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *B. subtilis*. *Nature* **355**, 601-604.

Löwe, J. & Amos, L. A. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* **391**, 203-206.

Luque, I., Flores, E. & Herrero, A. (1994). Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *EMBO J* **13**, 2862-9.

Luque, I. & Forchhammer, K. (2008). Nitrogen Assimilation and C/N Balance Sensing. In *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*. Edited by A. Herrero & E. Flores: Caister Academic Press.

Lutkenhaus, J. (2007). Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annu Rev Biochem* **76**, 539 - 62.

Maldener, I. & Muro-Pastor, A. M. (2010). Cyanobacterial Heterocysts. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd.

Marbouty, M., Saguez, C. & Chauvat, F. (2009a). The cyanobacterial cell division factor Ftn6 contains an N-terminal DnaD-like domain. *BMC Structural Biology* **9**, 54.

Marbouty, M., Saguez, C., Cassier-Chauvat, C. & Chauvat, F. (2009b). Characterization of the FtsZ-interacting septal proteins SepF and Ftn6 in the spherical-celled cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *J Bacteriol.* **191**, 6178-6185.

Marbouty, M., Saguez, C., Cassier-Chauvat, C. & Chauvat, F. (2009c). ZipN, an FtsA-like orchestrator of divisome assembly in the model cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Molecular Microbiology* **74**, 409-420.

Mariscal, V. & Flores, E. (2010). Multicellularity in a Heterocyst-Forming Cyanobacterium: Pathways for Intercellular Communication. In *Recent Advances in Phototrophic Prokaryotes* **675**, pp. 123-135. Springer New York.

Mariscal, V., Herrero, A., Flores, E. (2007). Continuous periplasm in a filamentous, heterocyst-forming cyanobacterium. *Mol Microbiol* **65**, 1139-45

Mariscal, V., Herrero, A., Nenninger, A., Mullineaux, C. W. & Flores, E. (2011). Functional dissection of the three-domain SepJ protein joining the cells in cyanobacterial trichomes. *Molecular Microbiology* **79**, 1077-1088.

Mackinney, G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of Biological Chemistry* **140**, 315-322.

- McCarren, J. & Brahamsha, B. (2009).** Swimming motility mutants of marine *Synechococcus* affected in production and localization of the S-layer protein SwmA. *J. Bacteriol.* **191**, 1111-1114.
- Meeks, J. (1998).** Symbiosis between nitrogen-fixing cyanobacteria and plants. *BioScience* **48**, 266 - 276.
- Meeks, J., Campbell, E., Summers, M. & Wong, F. (2002).** Cellular differentiation in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Archives of Microbiology* **178**, 395-403.
- Meeks, J. & Elhai, J. (2002).** Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 94 - 121.
- Meeks, J., Elhai, J., Thiel, T., Potts, M., Larimer, F., Lamerdin, J., Predki, P. & Atlas, R. (2001).** An overview of the genome of *Nostoc punctiforme*, a multicellular, symbiotic cyanobacterium. *Photosynthesis Research* **70**, 85-106.
- Meeks J. C., Chapman J. S & Enderlin C. S. (1983).** Regulation of expression of nitrate and dinitrogen assimilation by *Anabaena* species. *Appl Environ Microbiol.* **45**, 1351-9.
- Mercer, K. L. N. & Weiss, D. S. (2002).** The *Escherichia coli* Cell Division Protein FtsW Is Required To Recruit Its Cognate Transpeptidase, FtsI (PBP3), to the Division Site. *J. Bacteriol.* **184**, 904-912.
- Merino-Puerto, V., Mariscal, V., Mullineaux, C. W., Herrero, A. & Flores, E. (2010).** Fra proteins influencing filament integrity, diazotrophy and localization of septal protein SepJ in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. *Molecular Microbiology* **75**, 1159-1170.
- Merino-Puerto, V., Schwarz, H., Maldener, I., Mariscal, V., Mullineaux, C. W., Herrero, A. & Flores, E. (2011).** FraC/FraD-dependent intercellular molecular exchange in the filaments of a heterocyst-forming cyanobacterium, *Anabaena* sp. *Molecular Microbiology*. In Press.
- Mikheyskaya, L. V., Ovodova, R. G. & Ovodov, Y. S. (1977).** Isolation and characterization of lipopolysaccharides from cell walls of blue-green algae of the genus *Phormidium*. *J. Bacteriol.* **130**, 1-3.
- Miller, S. R. & Castenholz, R. W. (2000).** Evolution of Thermotolerance in Hot Spring Cyanobacteria of the Genus *Synechococcus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4222-4229.
- Miyagishima, S.-y., Wolk, C. P. & Osteryoung, K. W. (2005).** Identification of cyanobacterial cell division genes by comparative and mutational analyses. *Molecular Microbiology* **56**, 126-143.
- Moslavac, S., Nicolaisen, K., Mirus, O., Al Dehni, F., Pernil, R., Flores, E., Maldener, I. & Schleiff, E. (2007).** A TolC-Like Protein Is Required for Heterocyst Development in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **189**, 7887-7895.
- Mullineaux, C. W., Mariscal, V., Nenninger, A., Khanum, H., Herrero, A., Flores, E. & Adams, D. G. (2008).** Mechanism of intercellular molecular exchange in heterocyst-forming cyanobacteria. *EMBO J* **27**, 1299-1308.

Muro-Pastor, A., Olmedo-Verd, E. & Flores, E. (2006). All4312, an NtcA-regulated two-component response regulator in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *FEMS Microbiology Letters* **256**, 171 - 177.

Muro-Pastor, M. I., Reyes, J. C. & Florencio, F. J. (2001). Cyanobacteria Perceive Nitrogen Status by Sensing Intracellular 2-Oxoglutarate Levels. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 38320-38328.

Namikoshi, M. & Rinehart, K. L. (1996). Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology* **17**, 373-384.

Nayar, A., Yamaura, H., Rajagopalan, R., Risser, D. & Callahan, S. (2007). FraG is necessary for filament integrity and heterocyst maturation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Microbiology* **153**, 601-607.

Nicolaisen, K., Hahn, A. & Schleiff, E. (2009a). The cell wall in heterocyst formation by *Anabaena* sp. PCC 7120. *Journal of Basic Microbiology* **49**, 5-24.

Nicolaisen, K., Mariscal, V., Bredemeier, R., Pernil, R., Moslavac, S., López-Igual, R., Maldener, I., Herrero, A., Schleiff, E. & Flores, E. (2009b). The outer membrane of a heterocyst-forming cyanobacterium is a permeability barrier for uptake of metabolites that are exchanged between cells. *Molecular Microbiology* **74**, 58-70.

Olmedo-Verd, E., Muro-Pastor, A. M., Flores, E. & Herrero, A. (2006). Localized Induction of the *ntcA* Regulatory Gene in Developing Heterocysts of *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **188**, 6694-6699.

Olricks, N. K., Aarsman, M. E. G., Verheul, J., Arnusch, C. J., Martin, N. I., Hervé, M., Vollmer, W., de Kruijff, B., Breukink, E. & den Blaauwen, T. (2011). A Novel in vivo Cell-Wall Labeling Approach Sheds New Light on Peptidoglycan Synthesis in *Escherichia coli*. *ChemBioChem* **12**, 1124-1133.

Osteryoung, K. W. (2001). Organelle fission in eukaryotes. *Current Opinion in Microbiology* **4**, 639-646.

Osteryoung, K. W. & Vierling, E. (1995). Conserved cell and organelle division. *Nature* **376**, 473-474.

Pan, F., Jackson, M., Ma, Y., and McNeil, M. (2001). Cell Wall Core Galactofuran Synthesis Is Essential for Growth of Mycobacteria, *J. Bacteriol.* **183**, 3991-3998.

Rai, A., Söderbäck, E. & Bergman, B. (2000). Cyanobacterium-plant symbioses. Tansley Review No. 116. *New Phytol* **147**, 449 - 481.

Ran, L., Larsson, J., Vigil-Stenman, T., Nylander, J. A. A., Ininbergs, K., Zheng, W.-W., Lapidus, A., Lowry, S., Haselkorn, R. & Bergman, B. (2010). Genome Erosion in a Nitrogen-Fixing Vertically Transmitted Endosymbiotic Multicellular Cyanobacterium. *PLoS ONE* **5**, e11486.

- Rasmussen, U., Johansson, C. & Bergman, B. (1994).** Early communication in the *Gunnera-Nostoc* symbiosis: plant induced cell differentiation and protein synthesis in the cyanobacterium. *Mol Plant-Microbe Interact* **7**, 696 - 702.
- Peters, N. T., Dinh, T. & Bernhardt, T. G. (2011).** A Fail-Safe Mechanism in the Septal Ring Assembly Pathway Generated by the Sequential Recruitment of Cell Separation Amidases and Their Activators. *J. Bacteriol.* **193**, 4973-4983.
- Pichoff, S. & Lutkenhaus, J. (2005).** Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Molecular Microbiology* **55**, 1722-1734.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. & Stanier, R. Y. (1979).** Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* **111**, 1-61.
- Rodionov, D. G. & Ishiguro, E. E. (1996).** Dependence of peptidoglycan metabolism on phospholipid synthesis during growth of *Escherichia coli*. *Microbiology* **142**, 2871-2877.
- Rome, S., Fernandez, M. P., Brunel, B., Normand, P. & Cleyet-Marel, J.-C. (1996).** *Sinorhizobium medicae* sp. nov., Isolated from *Medicago* spp.. *Annual Int J Syst Bacteriol* **46**, 972-980.
- Rossetti, V., Schirromeister, B. E., Bernasconi, M. V., Bagheri, H. C. (2010).** The evolutionary path to terminal differentiation and division of labor in cyanobacteria. *Journal of Theoretical Biology* **262**, 23-34.
- Sakiyama, T., Ueno, H., Homma, H., Numata, O. & Kuwabara, T. (2006).** Purification and Characterization of a Hemolysin-Like Protein, Sll1951, a Nontoxic Member of the RTX Protein Family from the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **188**, 3535-3542.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989).** In: Ford N, Nolan C (eds) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanders, D. A. R., Staines, A. G., McMahon, S. A., McNeil, M. R., Whitfield, C. & Naismith, J. H. (2001).** UDP-galactopyranose mutase has a novel structure and mechanism. *Nat Struct Mol Biol* **8**, 858-863.
- Schmidt, W., Drews, G., Weckesser, J., Fromme, I. & Borowiak, D. (1980).** Characterization of the lipopolysaccharides from eight strains of the cyanobacterium *Synechococcus*. *Archives of Microbiology* **127**, 209-215.
- Smith, T. J., Blackman, S. A. & Foster, S. J. (2000).** Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology* **146**, 249-262.
- Schneider, S. & Jürgens, U. J. (1991).** Cell wall and sheath constituents of the cyanobacterium *Gloeobacter violaceus*. *Arch Microbiol* **156**, 312 - 318

Schüßler, A., Meyer, A., Gehring, T., & Kluge, M. (1997). Variations of lectin binding sites in extracellular glycoconjugates during the life cycle of *Nostoc punctiforme*, a potentially endosymbiotic cyanobacterium. *European Journal of Phycology* **32**, 233-239.

Schwarz, U., Asmus, A. & Frank, H. (1969). Autolytic enzymes and cell division of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **41**, 419-426.

Shungu, D. L., Cornett, J. B. & Shockman, G. D. (1979). Morphological and physiological study of autolytic-defective *Streptococcus faecium* strains. *J. Bacteriol.* **138**, 598-608.

Silipo, A., Erbs, G., Shinya, T., Dow, J. M., Parrilli, M., Lanzetta, R., Shibuya, N., Newman, M.-A. & Molinaro, A. (2010). Glyco-conjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiology* **20**, 406-419.

Simon, R.D. (1987) Inclusion bodies in the cyanobacteria: cyanophycin, polyphosphate, polyhedral bodies, In: The cyanobacteria, Fay, P., Van Baalen, C. (eds.), 199-225, Elsevier Science Publishers

Singh, S. P. & Montgomery, B. L. (2011). Determining cell shape: adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology. *Trends in Microbiology* **19**, 278-285.

Stanier, R. Y. & Cohen-Bazine, G. (1977). Phototrophic Prokaryotes: The Cyanobacteria. *Annual Review of Microbiology* **31**, 225-274.

Staron, P., Forchhammer, K. & Maldener, I. (2011). A novel ATP-driven pathway of glycolipid export involving TolC. *Journal of Biological Chemistry*. In Press.

Summers, M., Wallis, J., Campbell, E. & Meeks, J. (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**, 6184-6194.

Sutton, J. M., Lea, E. J. & Downie, J. A. (1994). The nodulation-signaling protein NodO from *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae forms ion channels in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 9990-9994.

Suzuki, H., Nishimura, Y., Yasuda, S., Nishimura, A., Yamada, M., Hirota, Y. (1978). Murein-lipoprotein of *Escherichia coli*: a protein involved in the stabilization of bacterial cell envelope. *Mol Gen Genet.* **167**, 1-9.

Tandeau de Marsac, N. (1994). *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, 825-842.

Thiel, T. & Wolk, C. P. (1983). Metabolic activities of isolated akinetes of the cyanobacterium *Nostoc spongiaeforme*. *J. Bacteriol.* **156**, 369-374.

Thompson, S. A., Wang, L. L., and Sparling, P. F. (1993). Cloning and nucleotide sequence of *frpC*, a second gene from *Neisseria meningitidis* encoding a protein similar to RTX cytotoxins, *Molecular Microbiology* **9**, 85-96.

- Uehara, T., Dinh, T., Bernhardt, T. G (2009).** LytM-Domain Factors Are Required for Daughter Cell Separation and Rapid Ampicillin-Induced Lysis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **191**, 5094-5107.
- Uehara, T., Parzych, K. R., Dinh, T. & Bernhardt, T. G. (2010).** Daughter cell separation is controlled by cytokinetic ring-activated cell wall hydrolysis. *EMBO J* **29**, 1412-1422.
- Valladares, A., Maldener, I., Muro-Pastor, A. M., Flores, E. & Herrero, A. (2007).** Heterocyst Development and Diazotrophic Metabolism in Terminal Respiratory Oxidase Mutants of the Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **189**, 4425-4430.
- Vazquez-Bermudez, M. F., Herrero, A. & Flores, E. (2000).** Uptake of 2-Oxoglutarate in *Synechococcus* Strains Transformed with the *Escherichia coli* *kgtP* Gene. *J. Bacteriol.* **182**, 211-215.
- Venn, A. A., Loram, J. E. & Douglas, A. E. (2008).** Photosynthetic symbioses in animals. *J. Exp. Bot.* **59**, 1069-1080.
- Vermaas, W. (2001).** Photosynthesis and respiration in cyanobacteria. *Encyclopedia of Life Science*, John Wiley & Sons, Ltd.
- Vincent, W. F., Gibson, J. A., Pienitz, R., Villeneuve, V., Broady, P. A., Hamilton, P. B. & Howard-Williams, C. (2000).** Ice shelf microbial ecosystems in the high arctic and implications for life on snowball earth. *Naturwissenschaften* **87**, 137-41.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P. & Foster, S. (2008).** Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews* **32**, 259-286.
- Vollmer, W. & Seligman, S. J. (2010).** Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends in Microbiology* **18**, 59-66.
- Walker, S. A. & Downie, J. A. (2000).** Entry of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* into Root Hairs Requires Minimal Nod Factor Specificity, but Subsequent Infection Thread Growth Requires *nodO* or *nodE*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 754-762.
- Walsby, A. E. (1994).** Gas vesicles. *Microbiol Rev* **58**, 94-144.
- Wang, Y., Lechno-Yossef, S., Gong, Y., Fan, Q., Wolk, C. P. & Xu, X. (2007).** Predicted Glycosyl Transferase Genes Located outside the HEP Island Are Required for Formation of Heterocyst Envelope Polysaccharide in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **189**, 5372-5378.
- Wei, T. F., Ramasubramanian, T. S. & Golden, J. W. (1994).** *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *ntcA* gene required for growth on nitrate and heterocyst development. *J. Bacteriol.* **176**, 4473-4482.
- Weiss, D. S. (2004).** Bacterial cell division and the septal ring. *Molecular Microbiology* **54**, 588-597.
- Wilcox, M., Mitchison, G. J. & Smith, R. J. (1973).** Pattern Formation in the Blue-Green Alga *Anabaena*. *Journal of Cell Science* **13**, 637-649.

Williams, C. (2000). Ice shelf microbial ecosystems in the high arctic and implications for life on snowball earth. *Naturwissenschaften* **87**(3): 137-141.

Winkenbach, F., Wolk, C. P. & Jost, M. (1972). Lipids of membranes and of the cell envelope in heterocysts of a blue-green alga. *Planta* **107**, 69-80.

Whitton, B. & Potts, M. (2000). Introduction to the cyanobacteria. *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*, 1–11.

Woitzik, D., Weckesser, J., Jürgens, U. J. (1988). Isolation and Characterization of Cell Wall Components of the Unicellular Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 6307. *Journal of General Microbiology* **134**, 619-627

Wolk, C. P. (1996). Heterocyst formation. *Annual Review of Genetics* **30**, 59-78.

Wolk, C. P. (2000). Heterocyst formation in *Anabaena* Prokaryotic Development Edited by Brun Y.V., S., L. Washington: Am Soc Microbiol Press.

Wolk, C. P., Ernst, A., Elhai, J. (1994). Heterocyst metabolism and development. In D. A. Bryant, (ed.), *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 769–823.

Wolk, C. P., Vonshak, A., Kehoe, P., Elhai, J. (1984). Construction of shuttle vectors capable of conjunctive transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 1561-1565.

Xu, X., Elhai, J. & Wolk, C. (2008). Transcriptional and developmental responses by *Anabaena* to deprivation of fixed nitrogen. *The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*, 383 - 422.

Yamamoto, Y. (1975). Effect of desiccation on the germination of akinetes of *Anabaena cylindrica*. *Plant and Cell Physiology* **16**, 749-752.

Yem, D. W. & Wu, H. C. (1978). Physiological characterization of an *Escherichia coli* mutant altered in the structure of murein lipoprotein. *J. Bacteriol.* **133**, 1419-1426.

Yoon, H. & Golden, J. (2001). PatS and products of nitrogen fixation control heterocyst pattern. *J Bacteriol* **183**, 2605 - 2613.

Zhang, C., Laurent, S., Sakr, S., Peng, L. & Bedu, S. (2006). Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: a chorus of signals. *Mol Microbiol* **59**, 367 - 375.

Zhang, J.-Y., Chen, W.-L. & Zhang, C.-C. (2009). *hetR* and *patS*, two genes necessary for heterocyst pattern formation, are widespread in filamentous nonheterocyst-forming cyanobacteria. *Microbiology* **155**, 1418-1426.

Zheng, W., Bergman, B., Chen, B., Zheng, S., Xiang, G. & Rasmussen, U. (2009). Cellular responses in the cyanobacterial symbiont during its vertical transfer between plant generations in the *Azolla microphylla* symbiosis. *New Phytologist* **181**, 53-61.

Zhu, J., Jager, K., Black, T., Zarka, K., Koksharova, O. & Wolk, C. P. (2001). HcWA, an Autolysin, Is Required for Heterocyst Maturation in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **183**, 6841-6851.

Zhu, J., Kong, R. & Wolk, C. P. (1998). Regulation of *hepA* of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 by Elements 5' from the Gene and by *hepK*. *J. Bacteriol.* **180**, 4233-4242.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption	HRF	Hormogonien unterdrückender Faktor
A+A	Allen und Arnon	Hw	Honigwabenmembran
Abb.	Abbildung	kDa	kilo-Dalton
ABC	<i>ATP-binding-cassette</i>	Km	Kanamycin
Amp	Ampicillin	LB	Luria-Bertani
APC	Allophycocyanin	LPS	Lipopolysaccharid
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	M	Molar
ATP	Adenosintriphosphat	Mb	Megabasenpaare
bp	Basenpaare	MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
bzw.	beziehungsweise	min	Minute
°C	Grad Celsius	MOPS	3-Morpholino-1-Propan-sulfonsäure
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat	Mrd	Milliarden
Chla	Chlorophyll <i>a</i>	MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
Cm	Chloramphenicol	N₂	Luftstickstoff
DMSO	Dimethylsulfoxid	NADP	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	nm	Nanometer
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate	Nm	Neomycin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	NSI	<i>Nitrogen stress induction</i>
et al.	und andere	OD	optische Dichte
Fox⁻	keine N ₂ -Fixierung unter aeroben Bedingungen	OG	Oxoglutarat
FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>	Pbp	Penicillin-binde-Protein
Galf	Galactofuranose	PCC	<i>Pasteur Culture Collection</i>
Galp	Galactopyranose	PC	Phycocyanin
Gfp	grün fluoreszierendes Protein	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
GlcNAc	N-Acetylglycosamin	PEC	Phyoerythrocyanin
GOGAT	Glutamat-Synthase	RNA	Ribonukleinsäure
GS	Glutamin-Synthetase	rpm	Umdrehungen pro Minute
GTP	Guanosintriphosphat	RT	Raumtemperatur
h	Stunde	RTX	<i>Repeat in toxin</i>
Hep	Heterocysten-Polysaccharide	Sm	Streptomycin
Hgl	Heterocysten-Glycolipide	Sp	Spectinomycin
HIF	Hormogonien induzierender Faktor	Tab.	Tabelle
		TAT	<i>twin arginine translocation</i>
		TEM	Transmissions Elektronenmikroskop

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
UDP	Uridin-Diphospho
WT	Wildtyp
w/v	Masse/Volume

Publikationen

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

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Karl Forchhammer für die Möglichkeit bedanken, diese Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Seine umfangreichen Erfahrungen haben zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt zusätzlich Frau PD Dr. Iris Maldener für die unmittelbare Betreuung der Arbeit, die damit verbundene vielfältige Unterstützung und die vielen fruchtbaren Diskussionen.

Vielen Dank an Prof. Dr. Fritz Götz für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Ein weiteres Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. T. Rasse und Y. Zhang für die Möglichkeit bzw. die Hilfe bei den FRAP-Experimenten.

Bei Prof. Dr. John (Jack) Meeks und Elsie Campbell möchte ich mich dafür bedanken, dass ich während des Gastaufenthalts im *Nostoc*-Labor in Davis viele Erfahrungen sammeln konnte.

Den „Filamentösen“ Josef, Peter und Claudia sei hier für die vielfältige Unterstützung und den lustigen Stunden im Labor gedankt. Auch beim Rest der Tübinger Arbeitsgruppe Grit, Sascha, Max, Su, Dai, Javi, Beate und Christina möchte ich mich für das wunderbare und erfrischende Arbeitsklima und die Tee-, Kaffee- und Bananenpausen bedanken. Michaela: Danke für die Unterstützung im Verwaltungschaos. Für die nette Aufnahme in das Laborleben in Tübingen und die Diskussionsbereitschaft danke ich Herrn Prof. Dr. Klaus Hantke.

Vielen Dank an Grit für die sorgfältige Korrektur meiner Arbeit.

Darüber hinaus gilt mein herzlicher Dank meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und Motivation in den letzten Jahren.