

Biochemische und physiologische Charakterisierung der extrazellulären Matrix eines Modellbiofilms

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Romy Breitenbach
aus Merseburg

2018

Diese Arbeit wurde vom 01.03.2014 bis zum 28.02.2018 unter der Leitung von Prof. Anna A. Gorbushina an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Anna A. Gorbushina

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 13.09.2018

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt zunächst Prof. Dr. Anna A. Gorbushina für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen, sowie für ihre Betreuung und fachliche Unterstützung.

Ich danke Prof. Dr. Rupert Mutzel für die Tätigkeit als Zweitgutachter meiner Arbeit.

Dr. Jörg Toepel und Dr. Nicole Knabe möchte ich für die Unterstützung bei der Planung von Experimenten und für die wissenschaftliche Diskussion der Ergebnisse danken.

Ich danke Dr. Thomas Neu und Ute Kuhlicke für die Unterstützung bei den Lektin-Bindungsanalysen der Biofilme.

Ferner möchte ich Dr. Michael Bücken und Ines Feldmann für ihre Hilfe bei der Durchführung der Elektronenmikroskopie danken.

Ich danke außerdem Dr. Ute Schoknecht, Dr. Helena Mathies und Thomas Sommerfeld für die Bereitstellung von Geräten und Material, und die technische Unterstützung bei der Durchführung der HPLC- und GC-Messungen.

An dieser Stelle sei auch den weiteren Kollegen aus den Abteilungen 4.0 und 4.1 für die wissenschaftliche Zusammenarbeit gedankt.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Mutter und meinen Großeltern, sowie meinen Freunden Steffen, Melli, Phine, Silvio und Tino für die moralische Unterstützung und die abwechslungsreiche und motivierende Zeit außerhalb des Labors bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	1
Abstract	3
1 Einleitung	5
1.1 Biofilme und extrazelluläre polymere Substanzen (EPS)	5
1.1.1 Polysaccharide	7
1.1.2 Proteine	8
1.1.3 Weitere Bestandteile der extrazellulären Matrix.....	9
1.1.4 Funktionen der EPS	10
1.1.5 EPS in Pilzen	11
1.1.6 EPS in Cyanobakterien.....	13
1.2 Ein Modell für subaerische Biofilme	14
1.2.1 <i>Knufia petricola</i> als Vertreter für mikrokoloniale Pilze.....	16
1.2.1.1 Mikrokoloniale Pilze (MCF)	16
1.2.1.2 Melanin und Carotinoide als Schutzpigmente in mikrokolonialen Pilzen.....	17
1.2.2 <i>Nostoc punctiforme</i> als Vertreter für filamentöse Cyanobakterien.....	19
1.2.2.1 Photosynthetisch aktive Pigmente in Cyanobakterien	19
1.2.2.2 Lebenszyklus und Zelldifferenzierung von <i>N. punctiforme</i>	21
1.2.2.3 Symbiose von <i>N. punctiforme</i> mit eukaryotischen Organismen.....	23
1.3 Der sekundäre Botenstoff c-di-GMP	24
1.4 Zielstellung	26
2 Material	29
2.1 Geräte und Apparaturen	29
2.2 Verbrauchsmaterialien	30
2.3 Chemikalien	31
2.4 Enzyme und dazugehörige Puffer	33
2.5 Kits und fertige Lösungen	33

2.6	Hergestellte Lösungen und Puffer	34
2.6.1	Puffer	34
2.6.2	Lösungen.....	35
2.7	Hergestellte Medien.....	37
2.7.1	Medien zur Kultivierung bakterieller Zellen.....	37
2.7.2	Medium zur Kultivierung von <i>K. petricola</i>	38
2.8	Antikörper.....	38
2.9	Plasmide	39
2.10	Oligonukleotide.....	39
2.11	Nukleotide und Größenmarker	40
2.12	Organismen.....	40
2.12.1	Bakterienstämme	40
2.12.2	Eukaryotische Stämme	40
2.13	Sonstiges	41
2.14	PC-Software	41
3	Methoden	43
3.1	Molekularbiologische Methoden	43
3.1.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	43
3.1.2	Agarosegel-Elektrophorese von DNA und RNA.....	43
3.1.3	Ethanol-/PEG-Fällung.....	44
3.1.4	Transformation elektrisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	44
3.1.5	Triparentale Konjugation	44
3.1.6	Plasmid-DNA Präparation	45
3.1.7	Extraktion genomischer DNA aus <i>N. punctiforme</i>	46
3.1.8	Gesamt-RNA Extraktion aus <i>N. punctiforme</i>	46
3.1.9	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	47
3.1.10	Restriktionsanalyse	47
3.1.11	DNase-Behandlung von RNA-Extrakten.....	47
3.1.12	Reverse Transkription	48
3.1.13	Quantitative Real-Time PCR	48

3.2	Proteinbiochemische Methoden	50
3.2.1	Extraktion intrazellulärer Proteine	50
3.2.2	Extraktion extrazellulärer Proteine aus Biofilmen.....	50
3.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
3.2.4	Western Blot.....	51
3.2.5	Immunodetektion.....	51
3.2.6	Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford (1976).....	52
3.3	Zellbiologische Methoden	53
3.3.1	Kultivierung von <i>N. punctiforme</i>	53
3.3.2	Kultivierung von <i>K. petricola</i>	53
3.3.3	Chlorophyll <i>a</i> -Extraktion zur Bestimmung der Zellzahl von <i>N. punctiforme</i> ..	54
3.3.4	Phototaxis	54
3.4	Biochemische Methoden	56
3.4.1	Extraktion von c-di-GMP aus <i>N. punctiforme</i>	56
3.4.2	Identifizierung von c-di-GMP mittels HPLC	57
3.4.3	Isolierung freier und kapsulärer Exopolysaccharide aus Suspensionskulturen und Biofilmen	58
3.4.4	Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehalts	59
3.4.5	FTIR.....	60
3.4.6	Bestimmung neutraler Monosaccharide mittels GC-MS.....	60
3.4.7	Bestimmung der Bindungstypen der Monosaccharid-Einheiten.....	63
3.4.8	Synthese von Standards zur Identifizierung von permethylierten Alditolacetaten	66
3.5	Mikroskopie	67
3.5.1	ESEM mit Kritisch-Punkt-Trocknung	67
3.5.2	Kryo-ESEM	67
3.5.3	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	68
3.5.4	Lektin-Bindung und Konvokalmikroskopie	68
3.6	Statistische Auswertung	68

4	Ergebnisse und Diskussion	69
4.1	Einfluss von c-di-GMP auf die Zelldifferenzierung und Biofilmbildung von <i>Nostoc punctiforme</i>	69
4.1.1	Herstellung eines c-di-GMP überexprimierenden <i>N. punctiforme</i> Stammes...	69
4.1.1.1	Quantifizierung von c-di-GMP	73
4.1.1.2	Einfluss von c-di-GMP auf das <i>N. punctiforme</i> Wachstum	75
4.1.2	Zelldifferenzierung und Phototaxis	77
4.1.2.1	Phototaxis	77
4.1.2.2	Differenzierung von Hormogonien und Heterozysten.....	81
4.1.3	EPS Zusammensetzung und Biofilmbildung	89
4.1.4	Zusammenfassung und Ausblick	97
4.2	Isolierung und Charakterisierung der Exopolysaccharide und Exoproteine von <i>Knufia petricola</i>	99
4.2.1	Visualisierung, Extraktion und Quantifizierung der EPS	99
4.2.2	Strukturelle Charakterisierung	110
4.2.2.1	FTIR.....	110
4.2.2.2	Identifizierung der Monosaccharid-Einheiten	113
4.2.2.3	Identifizierung der Bindungstypen.....	117
4.2.3	Visualisierung und Charakterisierung der EPS durch Lektine	124
4.2.4	Isolierung und Visualisierung extrazellulärer Proteine	130
4.2.5	Zusammenfassung und Ausblick	132
5	Literatur	135
	Abbildungsverzeichnis	IX
	Tabellenverzeichnis	XIII
	Anhangsverzeichnis.....	XV
	Anhang.....	XVII
	Publikationen	XXXIX

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adsorption
AA	Alditolacetat
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
Ara	Arabinose
<i>bidest.</i>	zweifach destilliert
CCA	<i>complementary chromatic adaption</i>
c-di-GMP	bis-(3',5')-zyklisches di-Guanosinmonophosphat
Chl _a	Chlorophyll <i>a</i>
CPS	<i>capsular polysaccharide</i>
C _t	<i>threshold cycle</i>
Da	Dalton
DAD	<i>diode array detector</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGC	Diguanylatcyclase
eDNA	extrazelluläre Nukleinsäuren
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
ESEM	<i>environmental scanning electron microscopy</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
<i>f</i>	Furanose
FLBA	Fluoreszenz-Lektin-Bindungsanalyse
FLBC	Fluoreszenz-Lektin <i>Bar-Coding</i>
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
Fuc	Fucose
Gal	Galaktose

Abkürzungsverzeichnis

GC	Gaschromatographie
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
GPC/SEC	Gelpermeationschromatographie (engl. <i>size-exclusion chromatography</i>)
H	Hormogonien
Hc	Heterozysten
Hex	Hexose
HIF	Hormogonien-induzierender Faktor
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
HRF	Hormogonien-reprimierender Faktor
Ino	myo-Inositol
Kan	Kanamycin
Km	Kanamycin-Resistenz
LB	Luria-Bertani
Man	Mannose
MCF	<i>microcolonial fungi</i>
MS	Massenspektrometrie
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
N	Stickstoff
NMR	<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>
<i>N. p.</i>	<i>Nostoc punctiforme</i>
<i>p</i>	Pyranose
p. a.	<i>pro analysi</i>
PC	Phycocyanin
PDE	Phosphodiesterase
Pdg	Phytoen-Desaturase
PE	Phycoerythrin

Pen	Pentose
Pks	Polyketid-Synthase
pm9	<i>pink mutant 9</i>
PMAA	permethyliertes Alditolacetat
PS	Photosystem
REM	Rasterelektronenmikroskopie
Rha	Rhamnose
Rib	Ribose
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
Rpm	<i>rounds per minute</i>
RPS	<i>released polysaccharides</i>
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	quantitative <i>Real Time</i> -PCR
SAB	subaerischer Biofilm
Sdh	Scytalon-Dehydratase
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Tm	Transmission
U	<i>Unit</i>
WT	Wildtyp
Xyl	Xylose
z. S.	zur Synthese

ZUSAMMENFASSUNG

An der Grenzschicht zwischen einer festen Oberfläche und der umgebenden Luft wachsende subaerische Biofilme (SAB) zeichnen sich durch eine erhöhte Toleranz gegenüber extremen Umweltbedingungen und dem Eintrag von Bioziden aus. Dieser Schutz vor äußeren Umwelteinflüssen wird vornehmlich durch den Beitrag von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) und Pigmenten, wie Melanin und Carotinoiden, vieler unterschiedlicher Organismen gewährleistet. Deren Synthese wird wiederum durch intrazelluläre Botenstoffe reguliert. Das Cyanobakterium *Nostoc punctiforme* und der mikrokoloniale Pilz *Knufia petricola*, als Partner eines etablierten SAB-Modells und Vertreter zweier typischer Organismengruppen in SAB, wurden genutzt, um Botenstoffe und Pigmente genetisch zu manipulieren und die Biofilmmatrix dieser Mutanten strukturell zu untersuchen. In dieser Arbeit konnten erstmals die EPS beider Organismen extrahiert und die Struktur der extrazellulären Polysaccharide beschrieben werden. Daneben wurden die extrazellulären Polysaccharide von *K. petricola* Wildtyp mit denen verschiedener Pigmentmutanten verglichen. Das Fehlen des Schutzpigmentes Melanin führte zu einer ausgeprägteren extrazellulären Matrix in den Biofilmen. Gleichzeitig änderte sich die Struktur der extrazellulären Polysaccharide. Während der Wildtyp zu ~80% ein α -Glucan und zu ~20% ein α/β -Galaktomannan sekretierte, war der Anteil des Galaktomannans bei den Melaninmutanten erhöht. Das Ausschalten der Carotinoid-Synthese hatte jedoch keinen Einfluss auf die Beschaffenheit der extrazellulären Polysaccharide. Ein deutlich komplexeres extrazelluläres Polysaccharid aus acht verschiedenen Monosaccharid-Einheiten bildete *N. punctiforme*. Durch die Überproduktion des bakteriellen sekundären Botenstoffes c-di-GMP konnte zudem ein grundlegender Einfluss auf die Reaktion des Cyanobakteriums gegenüber externen Signalen und die damit verbundene Zelldifferenzierung gezeigt werden. Ein artifiziell erhöhtes c-di-GMP-Level in den Zellen führte zur Ausbildung eines sessilen Lebensstils durch Hemmung der Differenzierung motiler Hormogonien und vermehrte Produktion von EPS. Die Struktur der extrazellulären Polysaccharide wurde dadurch nicht verändert. Neben der strukturellen Analyse konnten die Veränderungen der extrazellulären Matrix beider Organismen zusätzlich durch mikroskopische Methoden visualisiert werden. Beide Organismen steuern komplexe Polymere, deren Produktion maßgeblich mit intrazellulären Faktoren verknüpft ist, zu der extrazellulären Matrix des Modellbiofilms bei.

ABSTRACT

Subaerial biofilms (SAB) at the interface between hard surfaces and the atmosphere are highly tolerant against extreme environmental conditions and antimicrobial substances. Many different organisms contribute to SAB various extracellular polymeric substances (EPS). The EPS and protective pigments (melanin, carotenoides) play a decisive role in inhabiting extreme environments. Both are regulated by intracellular pathways and second messengers. SAB are frequently composed of bacteria, phototrophic organisms and fungi. The cyanobacterium *Nostoc punctiforme* and the microcolonial black fungus *Knufia petricola* as partners of a well-established SAB model were used to genetically manipulate a second messenger and pigments and the biofilm matrix of different mutants was analyzed. In this work the EPS of *N. punctiforme* and *K. petricola* could be extracted and the structure of the extracellular polysaccharides was characterized for the first time. Additionally, the extracellular polysaccharides of *K. petricola* wild type and different pigment mutants were compared. In those mutants where the protective pigment melanin was knocked-out the EPS amount was elevated in the biofilms. Simultaneously, the polysaccharide structure was changed. Whereas the wild type produced mainly a α -glucan (~80%) and less α/β -galactomannan (~20%), the proportion of the galactomannan in the melanin mutants was clearly elevated. In contrast, the switch-off of the carotenoid synthesis had no effect on the extracellular polysaccharide structure. A more complex extracellular polysaccharide was excreted by *N. punctiforme*. With the overproduction of the bacterial second messenger c-di-GMP in this cyanobacterium the influence on the reaction to external signals on a basic level could be demonstrated. Moreover, the second messenger had a strong impact on the life cycle combined with cell differentiation in *N. punctiforme*. An artificial increase in the intracellular c-di-GMP level led to a sessile life style by inhibiting the differentiation to motile hormogonia and by increasing the EPS production rate. The structure of the extracellular polysaccharides remained unaffected. Besides the structural analysis, changes in the extracellular matrix of both organisms could be visualized by different microscopical techniques. Both organisms are contributing complex extracellular polymers to the model biofilm and the production and release of the EPS are strongly associated with intracellular mechanisms as pigmentation and synthesis of second messengers

1 EINLEITUNG

1.1 Biofilme und extrazelluläre polymere Substanzen (EPS)

Nahezu alle Mikroorganismen der Erde leben in Zellaggregaten an Grenzflächen in Form von morphologisch sehr unterschiedlichen Biofilmen. Die weit gefasste Bezeichnung der Biofilme umfasst dabei auch Flocken („schwebende Biofilme“) und Schlämme, also mobile Biofilme ohne Kontakt zu einem Substrat (Flemming und Wingender, 2010). In Biofilmen sind die Mikroorganismen in einer von ihnen selbst produzierten extrazellulären Matrix (EZM) aus Polysacchariden, Proteinen, Lipiden und DNA eingebettet (Wingender *et al.*, 1999). Neben diesen extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) können, je nach Art des Biofilms und der Umgebung, in der er wächst, zusätzlich Mineralien, Korrosions- oder Sedimentpartikel in der EZM gefunden werden (Donlan, 2002). Gemischte Biofilme aus Bakterien, Cyanobakterien, Archaeen, Pilzen und Algen lassen sich auf der Erde nahezu überall finden, im Boden, in Gewässern, auf Pflanzen und Tieren und in vielen technischen und medizinischen Systemen (Wingender *et al.*, 1999). Innerhalb eines Biofilms können die Bedingungen, wie pH-Wert, Viskosität oder auch Sauerstoffkonzentration stark schwanken, sodass sich verschiedene Habitate für spezialisierte Organismen innerhalb eines einzigen Biofilms finden lassen (de Beer *et al.*, 1994, Flemming *et al.*, 2016).

Die Bildung eines Biofilms und seiner EZM ist ein dynamischer Prozess, der von vielerlei Faktoren, wie Nährstoffverfügbarkeit, Platzangebot und Konkurrenz der Organismen untereinander abhängt (Flemming *et al.*, 2016). Am Anfang dieses Prozesses steht die Anheftung von Zellen an eine Oberfläche. Durch Zellteilung entstehen Mikrokolonien, und der Biofilm beginnt zu wachsen. Gleichzeitig beginnt durch Abgabe verschiedener Substanzen in den extrazellulären Raum die Bildung einer Matrix (Abb. 1.1A). Im späteren Verlauf können sich Mikroorganismen oder ganze Teile des Biofilms ablösen und an anderer Stelle erneut einen Biofilm bilden (Flemming und Wingender, 2010). In vielen Biofilmen macht die EZM, bestehend aus EPS und Wasser, vor den Mikroorganismen den größten Anteil aus. Die EPS schließen die Mikroorganismen ein, immobilisieren sie und verbinden die Zellen untereinander, sodass die Kommunikation der Zellen miteinander ermöglicht wird (Abb. 1.1B). Durch die Freilassung von Enzymen in die EZM entsteht zudem ein externes Verdauungssystem, das genutzt werden kann, um Nährstoffe aus der Oberfläche oder einzelne Komponenten lysierter Zellen verfügbar zu machen (Flemming und Wingender, 2010). Die am häufigsten vorkommenden Bestandteile der EZM sind Polysaccharide und Proteine.

Einleitung

Zusammen mit extrazellulärer DNA (eDNA), Lipiden und weiteren Substanzen, wie Huminstoffen, geben die EPS dem Biofilm seine spezifische Struktur und gewährleisten dessen Stabilität (Flemming *et al.*, 2007). Diese Stabilität wird durch reversible Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten erreicht. Drei nicht-kovalente Bindungstypen spielen dabei eine Rolle (Abb. 1.1C). Elektrostatische Bindungen herrschen zwischen entgegengesetzt geladenen Ionen in den EZM-Komponenten. Diese Bindung kann maßgeblich durch den pH-Wert und die Ionenkonzentration beeinflusst werden, was besonders für die Extraktion der EPS von Bedeutung ist (z. B. Erhöhung des pH-Wertes durch NaOH) (Mayer *et al.*, 1999). Daneben treten Wasserstoffbrückenbindungen häufig zwischen den Hydroxylgruppen der Polysaccharide und Proteine auf. Diese Bindungen können durch chaotrope Reagenzien wie Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid aufgehoben werden (Mayer *et al.*, 1999). Als dritte Bindung zwischen den EZM-Komponenten wirken unspezifische Van-der-Waals-Kräfte. Zusätzlich tragen Verschlaufungen zwischen großen Molekülen der EZM sowie Abstoßungsverhalten einzelner funktioneller Gruppen zur Stabilität des Biofilms und der ihn umgebenden Matrix bei (Flemming und Wingender, 2010, Mayer *et al.*, 1999).

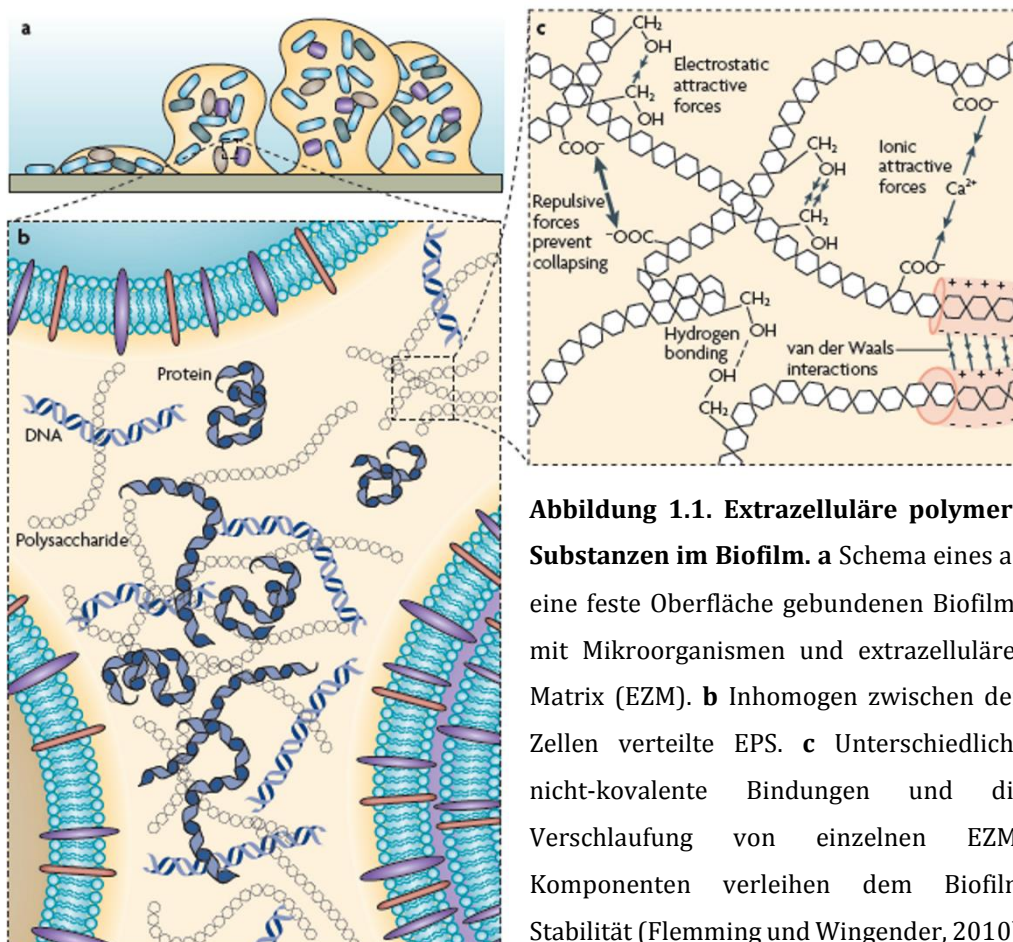


Abbildung 1.1. Extrazelluläre polymere Substanzen im Biofilm. a Schema eines an eine feste Oberfläche gebundenen Biofilms mit Mikroorganismen und extrazellulärer Matrix (EZM). b Inhomogen zwischen den Zellen verteilte EPS. c Unterschiedliche nicht-kovalente Bindungen und die Verschlaufung von einzelnen EZM-Komponenten verleihen dem Biofilm Stabilität (Flemming und Wingender, 2010).

1.1.1 Polysaccharide

Da in der EZM vieler Biofilme Polysaccharide den Hauptbestandteil bilden, wurden deren Struktur und Funktion in der Vergangenheit häufig untersucht. Extrazelluläre Polysaccharide sind sehr komplexe lineare oder verzweigte Polymere, die aus einem oder mehreren unterschiedlichen Monosaccharid-Typen zusammengesetzt sind. Es kann sich dabei um neutrale Monosaccharide, aber auch um Uronsäuren oder Aminozucker handeln, die durch organische (O-Acetyl-, N-Acetyl-, Succinyl- oder Pyruvyl-Gruppen) oder durch anorganische funktionelle Gruppen (Sulfat- oder Phosphatgruppen) substituiert sein können und untereinander über glykosidische Bindungen verknüpft sind (Flemming und Wingender, 2010, Sutherland, 1990). Polysaccharide sind strukturell sehr komplex, da jeder einzelne Monosaccharid-Baustein mehrere mögliche Bindungsstellen besitzt, an die wiederum weitere Monosaccharide mit weiteren Bindungsstellen geknüpft sind. Darüber hinaus finden sich unter den Monosacchariden solche, deren Konfiguration sich nur in einem asymmetrischen Zentrum unterscheidet (Epimere, z. B. Glucose, Mannose, Galaktose). Des Weiteren neigen Monosaccharide in wässriger Lösung zu Ringbildung, wobei bei jedem Monosaccharid zwei unterschiedliche Konfigurationen vorliegen können, die Pyranose- und die Furanose-Form. In der Ringform kann ein zusätzliches Stereozentrum gebildet werden, sodass das Monosaccharid wiederum in zwei anomeren Konfigurationen vorliegen kann. Der Unterschied liegt hier lediglich in der Stellung der Hydroxylgruppe an einem C-Atom. Je nach anomerer Konfiguration und Ringform ergibt sich eine α -Pyranose oder β -Pyranose, bzw. eine α -Furanose oder β -Furanose (Sasaki und Souza, 2013). Aufgrund der unterschiedlichen Konfigurationen der einzelnen Monosaccharide, die sich oftmals nur in der Stellung einer einzigen funktionellen Gruppe unterscheiden, und der sich daraus ergebenden unzähligen Möglichkeiten der Struktur eines Polymers, ist die strukturelle Charakterisierung von Polysacchariden sehr komplex. Viele Polysaccharide sind, bedingt durch Uronsäuren als Bestandteil, polyanionischer Natur (z. B. Alginat, Xanthan und häufig cyanobakterielle Polysaccharide)(Flemming und Wingender, 2010). Neutrale Polysaccharide finden sich oftmals in der EZM von Pilzen, aber auch Bakterien. Seltener werden polykationische Polysaccharide gebildet (Flemming und Wingender, 2010).

Polysaccharide lassen sich in zwei große Gruppen einteilen. Homopolysaccharide bestehen lediglich aus einer Art von Monosacchariden und werden entsprechend dieses Monosaccharids in Untergruppen eingeteilt. Unter den Homopolysacchariden finden sich fast ausschließlich Glucane, wie Cellulose (β -(1 \rightarrow 4)-Glucose) oder Curdlan

Einleitung

(β -(1→3)-Glucose) in Bakterien, und Pullulan (α -(1→4);(1→6)-Glucose) oder Scleroglucan (β -(1→3);(1→6)-Glucose) in Pilzen. Daneben wurden auch Fruktane, wie Levan (β -(2→6)-Fruktose) in Bakterien beschrieben (Flemming und Wingender, 2010, Sutherland, 1990). Viel häufiger als Homopolysaccharide produzieren Mikroorganismen jedoch Heteropolysaccharide bestehend aus einer Mischung verschiedener neutraler oder geladener Monosaccharide. Die bakterielle Synthese von Exopolysacchariden ist sehr gut untersucht. In den meisten Fällen finden die enzymatischen Schritte der Synthese von Polymer-Vorstufen intrazellulär statt, wobei drei unterschiedliche Synthesewege beschrieben werden. Die Vorstufen werden dann an der Zellhülle polymerisiert und über Transferasen sekretiert. Es sind jedoch auch Polymere bekannt (Dextran und Levan), die erst extrazellulär über Glucansucrasen aus sekretierten Disacchariden polymerisiert werden. Eine Übersicht der bekannten Synthesewege bakterieller Exopolysaccharide ist Schmid *et al.* (2015) zu entnehmen. Unter den Exopolysacchariden von Pilzen sind vor allem die Synthesewege der Glucane Pullulan und Scleroglucan gut untersucht (Cheng *et al.*, 2011; Schmid *et al.*, 2011). Aber auch die Synthese des Mannan-Glucan-Komplexes von *Candida albicans* und des Heteropolysaccharids von *Aspergillus fumigatus* wurden beschrieben (Sheppard und Howell, 2016).

1.1.2 Proteine

Neben Polysacchariden machen Proteine einen weiteren bedeutenden Anteil der EZM vieler Biofilme aus. Dabei lassen sich in der EZM von Biofilmen häufig ungebundene, an weitere EPS (z. B. Polysaccharide) gebundene sowie membran- oder zellwandgebundene Proteine mit sehr unterschiedlicher Funktion finden. Während Polysaccharide oftmals vor allem strukturgebende Funktion haben, treten extrazelluläre Proteine in Form von Enzymen in Wechselwirkung mit dem Substrat, dem umliegenden Medium, oder den EZM Komponenten selbst. Extrazelluläre Enzyme können von den Organismen des Biofilms aktiv in die EZM abgegeben werden, um Polymere zu degradieren und deren Bestandteile so für die Zellen verfügbar zu machen. Sie können aber auch indirekt durch Lyse einzelner Zellen nach außen gelangen (Hoffman und Decho, 1999, Wingender *et al.*, 1999). Viele der in Biofilmen gefundenen Enzyme nutzen wasserlösliche Polymere mit hohem Molekulargewicht (Polysaccharide, Proteine etc.), aber auch wasserunlösliche organische Substanzen (Cellulose, Chitin, Lipide) als Substrat und bauen diese ab. Die Abbauprodukte können in die Zelle aufgenommen und dort verstoffwechselt werden (Wingender *et al.*, 1999). Solche Enzyme, die die EZM Komponenten abbauen,

ermöglichen auch, dass sich einzelne Zellen des Biofilms ablösen und an anderer Stelle einen neuen Biofilm bilden können (Flemming und Wingender, 2010). Ebenso spielen extrazelluläre Enzyme beim Abbau von synthetischen Polymeren und bei der mikrobiell induzierten Korrosion verschiedener Oberflächen eine entscheidende Rolle (Landoulsi *et al.*, 2008, Shima, 2001). Neben Enzymen lassen sich aber in der EZM auch sehr häufig Strukturproteine finden, die maßgeblich an der Bildung und Stabilisierung des Biofilms beteiligt sind. Zu diesen Strukturproteinen zählen unter anderem Lektine, welche sich in vielen Bakterien, Pilzen, Viren und Pflanzen finden lassen. Es handelt sich dabei um membrangebundene, kohlenhydratbindende Proteine, die spezifisch an einzelne Polysaccharid-Strukturen in der EZM binden und so eine Verbindung zwischen EPS und Zelle herstellen (Flemming und Wingender, 2010). Aufgrund ihrer Bindungsspezifität an Kohlenhydrate werden isolierte Lektine verschiedener Organismen auch zur Visualisierung und Charakterisierung von Biofilmen genutzt (Neu und Kuhlicke, 2017).

1.1.3 Weitere Bestandteile der extrazellulären Matrix

Neben Polysacchariden und Proteinen kann in Biofilmen häufig auch extrazelluläre DNA (eDNA) gefunden werden. Zunächst ging man davon aus, dass diese DNA keine Funktion im Biofilm hat, sondern lediglich durch lysierte Zellen in die EZM gelangt. Später wurde jedoch deutlich, dass eDNA in schwebenden bakteriellen Biofilmen für die Ausbildung von Biofilmen benötigt wird. Watanabe *et al.* (1998) stellten fest, dass die enzymatische Entfernung von eDNA aus Biofilmen des photosynthetisch aktiven Bakteriums *Rhodovulum* sp. zur Auflösung der Biofilme führte. Auch in der EZM von *Pseudomonas aeruginosa* und *Bacillus cereus* ist eDNA für die Bildung und Anheftung der Biofilme an das Substrat von Bedeutung (Vilain *et al.*, 2009, Whitchurch *et al.*, 2002).

Ein weiterer Bestandteil der EZM vieler Biofilme sind Lipide und Lipidkonjugate. Dazu gehören Lipopeptide, Glycolipide, Fettsäuren und Phospholipide. Diese Substanzen wirken als Tenside, um die Löslichkeit hydrophiler Substanzen zu erhöhen und gleichzeitig die Verfügbarkeit und Aufnahme hydrophober Substanzen zu erleichtern (Santos *et al.*, 2016). Von besonderer Bedeutung für viele Biofilme sind Glycolipide. Sie können antimikrobielle Funktion besitzen (Haba *et al.*, 2003, Kulakovskaya *et al.*, 2005) und als Liposomen Transportfunktion übernehmen (Ueno *et al.*, 2007).

1.1.4 Funktionen der EPS

In erster Linie verleihen die EPS dem Biofilm mechanische Stabilität (Persat *et al.*, 2015). Darüber hinaus können einzelne Bestandteile der Matrix (z. B. bestimmte Enzyme) dazu verwendet werden, Nährstoffe aus dem umliegenden Medium oder dem Substrat aufzunehmen und für die Zelle verfügbar zu machen. Die Substanzen können in die Wasserphase des Biofilms absorbiert oder direkt an einzelne Komponenten der Matrix adsorbiert werden. Auf diese Weise tragen Mikroorganismen wesentlich zum Abbau schädlicher Substanzen in der Umwelt bei (Flemming *et al.*, 2016). Besonders durch die Fähigkeit der EPS, Metallionen adsorbieren zu können, sind Mikroorganismen aber auch an Verwitterungsprozessen von Gesteinsoberflächen und Monumenten sowie an der Bodenbildung beteiligt (Tourney und Ngwenya, 2014). Die gelartige Matrix zwischen den Zellen stellt die Kommunikation der Zellen untereinander sicher. So können Metabolite, Signalmoleküle oder genetisches Material (eDNA) ausgetauscht werden. Besonders letzteres wird in der EZM vor Nukleinsäure-abbauenden Enzymen geschützt und so konserviert (Flemming *et al.*, 2016). Weiterhin werden die EPS, im Besonderen extrazelluläre Strukturproteine auf der Zelloberfläche (z. B. Adhäsine), im Anfangsstadium der Biofilmbildung für die Anheftung der Zellen an die Oberfläche benötigt (Flemming und Wingender, 2010). In vielen Biofilmen sind nicht nur die extrazellulären Proteine, sondern auch die extrazellulären Polysaccharide unabdingbar für die Ausbildung eines Biofilms. Mutanten, ohne die Fähigkeit extrazelluläre Polysaccharide produzieren zu können, können häufig keine ausgereiften Biofilme produzieren (Danese *et al.*, 2000, Ma *et al.*, 2009). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion von Cyanobakterien an feste Oberflächen durch den hydrophoben Charakter der EPS erhöht wird. In Bakterien ist dies vor allem von der Menge der Deoxyhexosen Fucose und Rhamnose in den extrazellulären Polysacchariden abhängig (Neu und Marshall, 1990, Vieira *et al.*, 2008). Die EPS in Biofilmen können es Organismen zudem ermöglichen, Habitate mit extremen Bedingungen zu besiedeln. Sie können durch Rückhaltung von Wasser in trockenen Perioden vor Austrocknung schützen und eine Diffusionsbarriere gegen antimikrobielle Substanzen und Biozide bilden (Gorbushina, 2007). Sie schützen die Mikroorganismen aber auch vor sehr hohen oder sehr niedrigen Temperaturen und UV-Strahlung (Breitenbach *et al.*, 2016, Flemming *et al.*, 2016). In der EZM werden zudem vor Austrocknung schützende Enzyme und andere Substanzen stabilisiert. So konnte gezeigt werden, dass Disaccharide wie Trehalose, Membranen und Proteine vor dem Austrocknen schützen, indem sie den Verlust von Wasser in

Trockenperioden kompensieren (Sakamoto *et al.*, 2009). Dabei können Organismen in Biofilmen, die verschiedene Arten beherbergen, von den EPS eines anderen Organismus profitieren. So konnten Knowles und Castenholz (2008) zeigen, dass die extrazellulären Polysaccharide des gesteinsbewachsenden Cyanobakteriums *Nostoc* sp. einen positiven Effekt auf die Toleranz gegenüber Trockenheit bei dessen Biofilmpartnern haben.

1.1.5 EPS in Pilzen

Bei Pilzen lassen sich die extrazelluläre Matrix und die Zellwand häufig nicht vollkommen strukturell und räumlich voneinander abgrenzen. Pilz-Zellwände bestehen hauptsächlich aus dem Glucan Chitin und verzweigten β -Glucanen und Mannanen, die wiederum von einem komplexen Netz aus Polysacchariden, Glycoproteinen und Enzymen umgeben sind (Barreto-Bergter und Figueiredo, 2014). Viele der Zellwandbestandteile bei Pilzen sind löslich und können so auch an der Bildung der extrazellulären Matrix beteiligt sein. Chitin ist eine sehr bedeutende Komponente der Zellwand in Pilzen, da es die Integrität und die Stabilität der Zellwand gewährleistet (Bowman und Free, 2006). Es ist jedoch unlöslich in Wasser und nahezu allen organischen Lösungsmitteln, sodass es in der EZM keine Rolle spielt (Doering, 2009). Eine deacetylierte, wasserlöslichere Form des Chitins, das Chitosan, ist jedoch auch Bestandteil der EZM von *Cryptococcus neoformans* sowie bei Pilzen der Gattung *Mucorales* (Doering, 2009, Singh *et al.*, 2011). Als weitere strukturgebende Bestandteile der Zellwand sind in vielen Pilzen β -(1 \rightarrow 3)-Glucane und β -(1 \rightarrow 6)-Glucane über β -(1 \rightarrow 4)-Verbindungen an Chitin gebunden (Bowman und Free, 2006, Latge, 2007). Auch sind es vor allem Glucane, die in vielen Pilzen die extrazelluläre Matrix bilden [zusammengefasst in Breitenbach *et al.* (2016)]. Das wohl bekannteste α -Glucan ist Pullulan aus *Aureobasidium pullulans*. Dabei handelt es sich um ein neutrales Homopolysaccharid, bestehend aus Maltotriose-Einheiten (Abb. 1.2). Diese sind durch α -(1 \rightarrow 6)-Bindungen verknüpft. Die Glucosemoleküle innerhalb der Maltotriose-Einheiten sind über α -(1 \rightarrow 4)-Bindungen verbunden (Cheng *et al.*, 2011). Darüber hinaus enthalten Pullulan-Polymere unterschiedlicher Stämme zusätzlich geringe Mengen α -(1 \rightarrow 3)-, oder auch β -(1 \rightarrow 3)- und β -(1 \rightarrow 6)-Verbindungen (Bouveng *et al.*, 1962, Fujii, 1984, Sowa, 1963). Ein weiteres, strukturell sehr ähnliches α -Glucan, ist das Elsinan aus *Elsinoe leucospila* (Tsumuraya *et al.*, 1978). Im Vergleich zu den α -Glucanen sind β -Glucane in der EZM von Pilzen in größerer Variabilität vorhanden. Den meisten ist eine lineare Kette von β -(1 \rightarrow 3)-Glucose-Einheiten gemein. Sie unterscheiden sich jedoch in der Art und dem Grad der Verzweigungen sowie im Molekulargewicht (Breitenbach *et al.*, 2016).

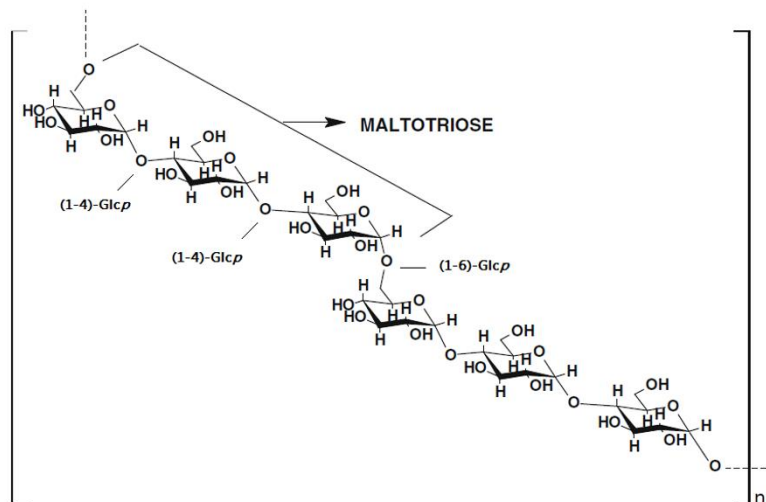


Abbildung 1.2. Struktur von Pullulan. Glucopyranosen innerhalb der Maltotriose-Einheiten sind über α -(1 \rightarrow 4)-Bindungen verknüpft, Maltotriose-Einheiten untereinander über α -(1 \rightarrow 6)-Bindungen [Singh und Saini (2012), modifiziert].

Manche Exopolysaccharide lassen sich ausschließlich in Hefen finden. So konnten Mannane, Exopolysaccharide aus Mannose-Einheiten, bisher ausschließlich in der EZM verschiedener Hefen nachgewiesen werden. Beispielsweise produziert die pathogene Hefe *Candida albicans* neben einem Glucan, wie viele andere Pilze, als Hauptbestandteil der EZM einen zusätzlichen Mannan-Glucan-Komplex aus α -(1 \rightarrow 2)-Mannose, α -(1 \rightarrow 6)-Mannose und β -(1 \rightarrow 6)-Glucose (Zarnowski *et al.*, 2014). Mannane mit variierenden Anteilen weiter Monosaccharide (z. B. Galakomannan, Glucomannan oder Glucuronoxylomannan) werden zudem von *C. neoformans*, *Exophiala* sp. und *Saccharomyces cerevisiae* produziert (Breitenbach *et al.*, 2016).

Neben Polysacchariden spielen auch Proteine in der EZM von Pilzen eine wichtige Rolle. Pilze sind zersetzende Organismen, die Enzyme nutzen, um Biomasse oder Substrat abzubauen und daraus Metabolite aufnehmen zu können (van Tilburg und Thomas, 1993). So geben viele Vertreter der Ascomyceten und Basidiomyceten verschiedene Enzyme, wie Lignocellulasen, Cellulasen, Hemicellulasen, Proteasen, Lipasen, Amylasen und Lignin-abbauende Enzyme zur Substratzersetzung ab (Adav *et al.*, 2015, Alfaro *et al.*, 2014, He *et al.*, 2013). Darüber hinaus bilden viele Vertreter die für Pilze einzigartigen Hydrophobine aus, die es ihnen unter anderem ermöglichen, sich an hydrophobe Oberflächen anzuhafte (Wosten und Scholtmeijer, 2015). Als weitere Matrix-Bestandteile bei Pilzen wurden außerdem verschiedene Glycolipide und Signalmoleküle zur interzellulären Kommunikation beschrieben (Breitenbach *et al.*, 2016).

1.1.6 EPS in Cyanobakterien

Als phototrophe Prokaryoten haben Cyanobakterien einen vergleichsweise geringen Nährstoffanspruch, der es ihnen ermöglicht, auch in oftmals unwirtlichen und extremen Standorten überleben zu können (Montoya, 2009, Seckbach, 2007). Diese Eigenschaft hat dazu geführt, dass Cyanobakterien bezogen auf die Häufigkeit ihres Vorkommens die bedeutendsten Organismen der Erde sind. Sie können, dort wo Licht verfügbar ist, auf der ganzen Erde in sehr unterschiedlichen Habitaten gefunden werden (Whitton und Potts, 2012). Als Bestandteile cyanobakterieller EPS wurden hauptsächlich Polysaccharide beschrieben und analysiert. Im Vergleich dazu befassen sich nur wenige Studien mit Exoproteinen als Bestandteil der cyanobakteriellen EPS (Oliveira *et al.*, 2015, Vilhauer *et al.*, 2014). Bei der Analyse der extrazellulären Polysaccharide von Cyanobakterien wird häufig unterschieden, ob diese als Kapsel um die Zellen vorliegen (*capsular polysaccharides*, CPS), oder ob sie in das umliegende Medium abgegeben werden (*released polysaccharides*, RPS). Die Zusammensetzung von RPS und CPS kann gleich sein, oder aber sich unterscheiden (Di Pippo *et al.*, 2013). Cyanobakterielle Exopolysaccharide besitzen eine Reihe von Eigenschaften, durch welche sie sich von anderen mikrobiellen Gruppen abgrenzen. So zeigen sie die unter den Bakterien einzigartige Eigenschaft des Vorhandenseins von Sulfatgruppen, wie sie sich auch bei Archeen und verschiedenen Eukaryoten finden lassen (Pereira *et al.*, 2009). Eine weitere Besonderheit ist das vergleichsweise häufige Vorkommen verschiedener Pentosen, wobei die Exopolysaccharide in der Regel sechs bis 15 verschiedene Monosaccharide aufweisen. Die Vertreter anderer bakterieller Gruppen produzieren zumeist weniger komplexe Exopolysaccharide mit bis zu vier unterschiedlichen Monosacchariden (Rossi und De Philippis, 2015). In mehr als 90% der untersuchten Exopolysaccharide fanden sich außerdem Uronsäuren. Diese verleihen den EPS einen anionischen Charakter, sodass Cyanobakterien als Organismen mit bedeutendem Beitrag zur Entfernung von Schwermetallionen aus wässrigen Lösungen betrachtet werden können (De Philippis *et al.*, 2011). Aufgrund der Komplexität der Exopolysaccharide gibt es eine Vielzahl verschiedener Studien zur Anzahl und Art der Monosaccharide vieler Cyanobakterien, aber häufig ist nur wenig über die komplexe Struktur bekannt (Pereira *et al.*, 2009). Komponenten der cyanobakteriellen EZM spielen bei Verwitterungsprozessen eine Rolle und werden bei vielen Vertretern für das Gleiten über die Oberfläche benötigt. Außerdem stellen die komplexen cyanobakteriellen EPS in gemischten Biofilmen eine wichtige Kohlenstoffquelle für die Biofilmpartner dar (Rossi und De Philippis, 2015).

1.2 Ein Modell für subaerische Biofilme

Biofilme bestehen häufig aus einer Vielzahl verschiedener Mikroorganismen, wobei jeder Organismus unterschiedliche Substanzen zu der extrazellulären Matrix des Biofilms beiträgt. Eine große Zahl unbekannter Parameter erschwert es demnach, die Zusammenhänge der Kommunikation, Stresstoleranz und Dynamik des Biofilms zu verstehen. Vor allem Pilze, heterotrophe Bakterien und Cyanobakterien findet man oftmals auf Gesteinen, Monumenten und in Höhlen, wo sie nachweislich an der Biodeterioration der Oberfläche beteiligt sind (Sterflinger und Pinar, 2013). Diese, an der Grenzschicht von einer festen Oberfläche und umgebender Luft wachsenden Biofilme werden auch als subaerische Biofilme (SAB) bezeichnet und sind historisch früher beschrieben worden, als andere Biofilme (Gorbushina und Broughton, 2009, Villa *et al.*, 2016). SAB zeichnen sich, aufgrund des vielfältigen Beitrags verschiedener Spezies zur EZM, durch erhöhte Resistenz gegenüber Bioziden, und den Schutz vor Nährstoff- und Wasserverlust aus (Stewart und Franklin, 2008, Villa *et al.*, 2016). Die EPS der teilhabenden Mikroorganismen, besonders der Pilze und Cyanobakterien, tragen aufgrund der Interaktion mit dem Substrat zur Verwitterung und Bodenbildung bei (Gadd, 2007). Sie ermöglichen es außerdem, in Interaktion mit symbiotischen Partnern zu treten und die Toleranz gegenüber einer Vielzahl verschiedener Stressarten zu erhöhen (Gorbushina und Broughton, 2009, Tourney und Ngwenya, 2014). Im Gegensatz zu den hauptsächlich aus Wasser (> 90%) bestehenden subaquatischen Biofilmen, in denen die EPS eine bedeutende Wasserspeicherfunktion haben, enthalten subaerische Biofilme häufig weniger als 0,5% Wasser. Stattdessen bestehen diese Biofilme, neben den Mikroorganismen, zu einem großen Teil aus höchst spezialisierten EPS (Gorbushina und Krumbein, 2000). Die Kompensation des Verlustes von Wasser durch das Disaccharid Trehalose stellt eine solche Anpassung an extreme Trockenheit dar (Sakamoto *et al.*, 2009). Neben heterotrophen Bakterien sind vor allem Cyanobakterien und mikrokoloniale Pilze wichtige Biofilmpartner in natürlichen Biofilmen (Gorbushina, 2007). Beide Gruppen beinhalten für die Biodeterioration bedeutende Organismen, die zum Beispiel die Struktur von Glas- oder Gesteinsoberflächen verändern können (Gorbushina und Palinska, 1999, Seiffert *et al.*, 2016). Um die Schwierigkeiten in der Analyse, welche durch die Komplexität natürlicher Biofilme hervorgerufen werden, zu vermindern, werden häufig Modellbiofilme aus zwei Organismen, z. B. einem Cyanobakterium und einem Pilz, untersucht. Sowohl die Cyanobakterien als auch die Pilze profitieren von einer solchen Gemeinschaft. Beispielsweise beeinflussen sich das

Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* und der Pilz *Rhodotorula glutinis* in ihrem Wachstum positiv, indem *S. elongatus* organischen Kohlenstoff und andere Nährstoffe für *R. glutinis* zur Verfügung stellt. Dieser wiederum vermindert die Entstehung giftiger reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und schützt somit auch *S. elongatus* (Li *et al.*, 2017).

Als Modell für SAB wurde in der Vergangenheit ein Biofilm aus dem Cyanobakterium *Nostoc punctiforme* und dem mikrokolonialen Pilz *Knufia petricola* etabliert (Abb. 1.3A). *N. punctiforme* repräsentiert in diesem Modellbiofilm die Eigenschaften und Beiträge der phototrophen und diazotrophen Biofilmpartner, *K. petricola* die der heterotrophen Teilnehmer. Cyanobakterien des Genus *Nostoc* sind sehr tolerant gegenüber Austrocknung (Potts, 1999), Biozidbehandlung (Lamprinou *et al.*, 2013) und UV-Strahlung (Garcia-Pichel und Castenholz, 1993). Darüber hinaus produzieren sie eine ausgeprägte und komplexe EZM (Pereira *et al.*, 2009) und weisen eine symbiotische Kompetenz auf (Meeks, 1998, Mollenhauer *et al.*, 1996). Die mikrokolonialen Pilze und dessen Vertreter *K. petricola* können, als Teil subaerischer Biofilme, das Substrat penetrieren (Sterflinger und Krumbein, 1997), und sind ebenso sehr tolerant gegenüber extremen Bedingungen wie Trockenheit (Gorbushina *et al.*, 2008). Auch die Fähigkeit Symbiosen eingehen zu können und EPS zu produzieren, wurde für mikrokoloniale Pilze beschrieben (Breitenbach *et al.*, 2018, Gorbushina *et al.*, 2005).

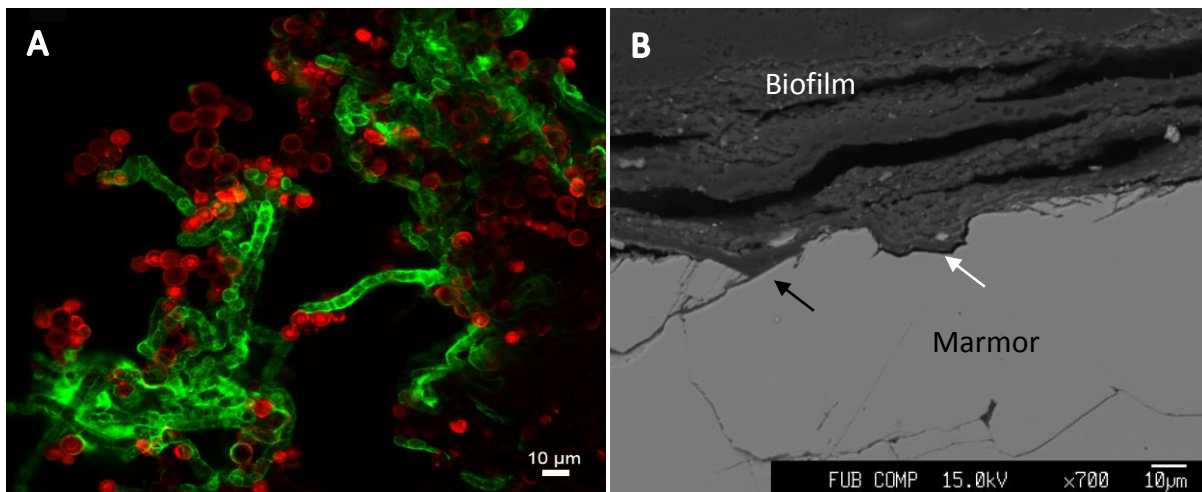


Abbildung 1.3. Modellbiofilm mit *N. punctiforme* und *K. petricola*. **A** Durch Lektin-Bindung visualisierte Zellverbände beider Biofilmpartner. *K. petricola*-Zellen erscheinen durch UDA(TRITC)-Bindung rot, *N. punctiforme*-Zellen erscheinen durch LEA(A488)-Bindung grün. **B** Mikrosondenaufnahme eines Querschnitts an der Grenzfläche des Modellbiofilms und eines Marmors. Ebene Kanten (schwarzer Pfeil) wurden durch physikalische Faktoren verursacht. Unebene Kanten (weißer Pfeil) stammen vermutlich aus biologischem Angriff (Seiffert, 2014).

Einleitung

Seiffert *et al.* (2014) konnten zeigen, dass die gemeinsame Kultivierung von *N. punctiforme* und *K. petricola* im Vergleich zur separaten Kultivierung die Verwitterung von Gestein begünstigt (Abb. 1.3B). Besonders die Elemente Kalzium, Magnesium und Mangan wurden unter Einfluss des Modellbiofilms aus dem Gestein gelöst (Seiffert *et al.*, 2016). Beide Organismen bilden zudem eine geschichtete Biofilm-Struktur aus, wobei *K. petricola* im unteren Teil des Biofilms mit Kontakt zur Gesteinsoberfläche wächst und *N. punctiforme* oben aufliegt (Seiffert, 2014). *N. punctiforme* hat so ausreichend Kontakt zum Licht, um Photosynthese betreiben zu können. Die Mechanismen dieser Koexistenz und welche extrazellulären Substanzen zu diesem Modellbiofilm aus *N. punctiforme* und *K. petricola* jeweils beigetragen werden, von denen der Biofilmpartner profitieren kann, sind jedoch bisher nicht bekannt.

1.2.1 *Knufia petricola* als Vertreter für mikrokoloniale Pilze

1.2.1.1 Mikrokoloniale Pilze (MCF)

Mikrokoloniale Pilze (MCF) zeichnen sich durch eine hohe Toleranz gegenüber einer Vielzahl von stressauslösenden Faktoren aus. Aufgrund einer Reihe von Anpassungen, darunter die Produktion verschiedener Schutzpigmente und extrazellulärer Substanzen, können MCF überall auf der Erde, besonders aber in extremen Habitaten überleben (Gorbushina, 2003, Zakharova *et al.*, 2013). So wurden Vertreter auf Gesteinsoberflächen in Gebieten mit extrem hohen oder niedrigen Temperaturen und geringer Luftfeuchte gefunden (Ruibal *et al.*, 2008, Selbmann *et al.*, 2005; Staley *et al.*, 1982). Aber auch anthropogene Nischen, wie Geschirrspüler und Solaranlagen (Gorbushina, 2007, Zupancic *et al.*, 2016), oder Monumente (Diakumaku *et al.*, 1995, Gorbushina *et al.*, 1993), werden besiedelt. Zusätzlich gibt es unter den MCF auch humanpathogene Vertreter (Chowdhary *et al.*, 2015). Mikrokoloniale Pilze stellen keine monophyletische Gruppe dar, sondern sind in verschiedenen Klassen (Dothideomyceten und Eurotiomyceten) innerhalb der Ascomyceten zu finden. Häufig finden sich bei Pilzen dieser Gruppe verschiedene Formen des Wachstums, und je nach Nährstoffverfügbarkeit, Umgebungsbedingungen oder abhängig vom Lebenszyklus, kann meristematisches, hefeartiges und hyphenartiges Wachstum stattfinden (Sterflinger *et al.*, 1997, Wollenzien *et al.*, 1997). Die Produktion von Schutzpigmenten und extrazellulären Substanzen ermöglicht den Organismen die Toleranz gegenüber starken Temperaturschwankungen, Trockenheit, UV-Strahlung und Nährstofflimitierung

(Gorbushina *et al.*, 2008, Kuncheva *et al.*, 2013, Selbmann *et al.*, 2014). Besonders die EPS der mikrokolonialen Pilze sind maßgeblich an der Bildung von Biofilmen mit Algen, Cyanobakterien und heterotrophen Bakterien beteiligt (Gorbushina und Broughton, 2009). Der in dieser Arbeit als Vertreter für die mikrokolonialen schwarzen Pilze verwendete Pilz *K. petricola* gehört zur Ordnung *Chaetothyriales* innerhalb der Klasse der Eurotiomyceten und kann, da er alle charakteristischen Merkmale von MCF aufweist, als Modell für gesteinsbewachsende schwarze Pilze genutzt werden (Gorbushina *et al.*, 2008). Nährstoffbedarf und optimale Wachstumsbedingungen wurden bereits charakterisiert (Nai *et al.*, 2013), außerdem konnte die zuverlässige genetische Transformierbarkeit des Pilzes demonstriert werden (Noack-Schonmann *et al.*, 2014a). Pokharel *et al.* (2017) zeigten zudem, dass *K. petricola* Magnesium-Isotope abhängig vom pH-Wert fraktionieren kann und so einen bedeutenden Beitrag zum Magnesium-Zyklus zwischen Atmosphäre, Biosphäre und Lithosphäre in den besiedelten Gebieten leisten kann. Gorbushina *et al.* (2008) gelang es bereits, eine ausgeprägte EPS-Schicht in *K. petricola* Biofilmen zu visualisieren, die den Zellen eine erhöhte Toleranz gegenüber Austrocknung mit anschließender Re-Hydrierung verlieh. Bisher wurden die EPS des Pilzes jedoch weder extrahiert noch strukturell charakterisiert.

1.2.1.2 Melanin und Carotinoide als Schutzpigmente in mikrokolonialen Pilzen

Melanin, als bedeutendes Schutzpigment, wird von vielen Pilzen produziert und ist namensgebend für die schwarzen Pilze. Es kann den Organismus vor zahlreichen Stressarten schützen (Butler und Day, 1998). So erhöht Melanin die Toleranz gegenüber extremen Temperaturen (Robinson, 2001), schützt vor Austrocknung, osmotischem Stress (Fernandez und Koide, 2013, Kejzar *et al.*, 2013), schädlicher Strahlung und reaktiven Sauerstoffspezies (Eisenman und Casadevall, 2012, Hill, 1992).

Melanin ist in der Zellwand eingelagert und führt so zur dunklen Färbung der Pilze. Einige der schwarzen Pilze produzieren Melanin über den L-DOPA-Syntheseweg mittels L-3,4-Dihydroxyphenylalanin. Dies entspricht auch der Synthese tierischen Melanins (Eisenman und Casadevall, 2012). Viele Pilze, darunter auch *K. petricola*, stellen Melanin jedoch über den DHN-Syntheseweg her. Dabei wird aus einem Vorgängermolekül (Acetyl-CoA oder Malonyl-CoA) unter Einsatz einer Polyketid-Synthase (PKS) und verschiedener Zwischenprodukte 1,8-Dihydroxynaphtalin (DHN) und daraus durch Polymerisierung Melanin produziert (Eisenman und Casadevall, 2012). Die Struktur von DHN-Melanin ist nicht bis ins Detail geklärt, da die Substanz weitestgehend unlöslich in wässrigen und

Einleitung

organischen Lösungsmitteln ist und somit viele der Analysemethoden nicht anwendbar sind. Eines der Zwischenprodukte in der Synthese von DHN-Melanin ist Scytalon. Auf dem Weg zur fertigen Substanz wird es durch die Scytalon-Dehydratase (SDH) in 1,3,8-Trihydroxynaphtalin umgebaut. Wird die SDH ausgeschaltet, kann diese Umwandlung nicht mehr stattfinden, sodass kein Melanin entsteht. Stattdessen wird die Vorstufe Scytalon als Endprodukt gebildet. Scytalon ist, im Gegensatz zu Melanin, braun und wasserlöslich und wird bei der Kultivierung von *K. petricola* in das umliegende Medium abgegeben (*K. petricola* Δsdh ; Knabe *et al.*, unveröffentlicht). Da die PKS früh im Syntheseweg Anwendung findet, kann durch Ausschalten dieses Enzyms die Melanin-Synthese in *K. petricola* vollständig inhibiert werden. Die sonst überdeckten Carotinoide werden so sichtbar (*K. petricola* Δpks ; Knabe *et al.*, unveröffentlicht). In diesem Fall entstehen keinerlei Zwischenprodukte und ein solcher Stamm erscheint orange.

Neben Melanin sind Carotinoide weitere wichtige Schutzpigmente in Pilzen, aber auch in Algen und Cyanobakterien. Im Gegensatz zu einer begrenzten Anzahl strukturell unterschiedlicher Melanin-Arten gibt es jedoch eine Vielzahl verschiedener Carotinoide (Avalos und Limon, 2015). Auch *K. petricola* produziert verschiedene Carotinoide, die jedoch durch das Melanin überdeckt sind. Gorbushina *et al.* (2008) konnten β -Carotin, ζ -Carotin, Phytoen, Torularhodin und Torulen in *K. petricola* nachweisen. Innerhalb des Synthese-Weges der Carotinoide ist Phytoen, nach einer Reihe vorhergehender Schritte, das erste Molekül mit der für Carotinoide charakteristischen linearen Struktur. Phytoen wird dann durch die Phytoen-Desaturase (PDG) über weitere Zwischenprodukte in die verschiedenen Carotinoide umgewandelt (Avalos und Limon, 2015). Wird dieses Enzym ausgeschaltet, können keine Carotinoide mehr produziert werden. Ist die Melanin-Synthese in *K. petricola* über Ausschalten der PKS gleichzeitig unterbrochen, resultiert dies in einer Albino-Mutante, die keinerlei Schutzpigmente mehr produziert (*K. petricola* $\Delta pks/\Delta pdg$; Knabe *et al.*, unveröffentlicht). Funktioniert die Melanin-Synthese dagegen noch, unterscheidet sich eine Δpdg -Mutante visuell nicht von einem Wildtyp, da das Melanin das Fehlen der Carotinoide im Hintergrund überdeckt (Breitenbach *et al.*, unveröffentlicht). Carotinoide haben in Mikroorganismen vor allem eine antioxidative Funktion gegen reaktive Sauerstoffspezies, die durch UV-Strahlung gebildet werden (Young und Lowe, 2001). Im Gegensatz zu Melanin, welches konstitutiv als strukturgebendes Pigment in der Zellwand eingelagert ist (Eisenmann und Casadevall, 2012), sind Carotinoide in der Zellmembran lokalisiert. Zudem kann deren Zusammensetzung in einigen Organismen, entsprechend der äußeren

Einflüsse, dynamisch angepasst werden. So nahm zum Beispiel im Cyanobakterium *N. commune* die Carotinoid-Konzentration (ebenso wie die EPS-Produktion) um bis zu 50% zu, wenn die Zellen mit UV-B-Strahlung behandelt wurden (Ehling-Schulz *et al.*, 1997). Sakaki *et al.* (2002) stellen einen ähnlichen Zusammenhang in der Hefe *R. glutinis* fest. Unter Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies bildete die Hefe eine größere Menge des Carotinoids Torularhodin. *K. petricola* reguliert die Synthese der Carotinoid-Vorstufe Phytoen unter Trockenstress (Gorbushina *et al.*, 2008). Auch viele andere Pilze erhöhen häufig die Produktion eines spezifischen Carotinoids, wenn sie Stress ausgesetzt sind (Iigusa *et al.*, 2005, Jeong *et al.*, 1999, Liu und Wu, 2006). Dies spiegelt die Bedeutsamkeit der unterschiedlichen Carotinoide als Schutz vor verschiedenen Umwelteinflüssen wider.

Jedoch spielt nicht nur die dynamische Anpassung der Carotinoid-Zusammensetzung eine wichtige Rolle bei der Reaktion auf Strahlung oder oxidativen Stress. In der Vergangenheit wurden in mikrokolonialen, melanisierten Pilzen auch Mycosporine als Schutzsubstanzen gegen UV-Strahlung (Gorbushina *et al.*, 2003, Volkmann *et al.*, 2003) und osmotischen Stress (Oren, 1997) beschrieben. Mycosporine und Mycosporin-ähnliche Aminosäuren finden sich aber auch in anderen gesteinsbewachsenden Organismen, wie Cyanobakterien (Büdel *et al.*, 1997). Ein komplexes Zusammenspiel von Pigmenten und anderen Schutzsubstanzen in den Organismen gesteinsbewachsender Biofilme ermöglicht es ihnen demnach, auf extreme Umwelteinflüsse schnell reagieren und so auch unwirtliche Habitate besiedeln zu können.

1.2.2 *Nostoc punctiforme* als Vertreter für filamentöse Cyanobakterien

1.2.2.1 Photosynthetisch aktive Pigmente in Cyanobakterien

Cyanobakterien stellen eine morphologisch sehr heterogene Gruppe dar, die einzellige und filamentöse Vertreter umfasst. Letztere zählen zu den komplexesten Prokaryoten der Erde. Als photosynthetisch aktive Organismen spielen sie eine bedeutende Rolle im Kohlenstoffzyklus der Erde. So wird bei der oxygenen Photosynthese Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt, welche wiederum genutzt wird, um aus anorganischem Kohlenstoff (atmosphärisches CO₂) energiereiche organische Verbindungen herzustellen. Dabei entsteht der gesamte atmosphärische Sauerstoff der Erde, wobei 30% dessen durch die Photosynthese der Cyanobakterien freigesetzt wird (DeRuyter und Fromme, 2008). Um Licht erfassen zu können, besitzen alle Cyanobakterien Antennensysteme mit

Einleitung

mehreren Pigmentkomplexen. Diese sind in der Lage, Licht unterschiedlicher Wellenlängen wahrzunehmen. Nach Anregung der Antennenkomplexe wird diese Energie in das Photosystem II und weiter über den Cytochrom *b₆f* Komplex und Plastocyanin in das Photosystem I geleitet, wo die einzelnen Reaktionen der Photosynthese stattfinden (DeRuyter und Fromme, 2008). Eines der photosynthetisch aktiven Pigmente in Cyanobakterien ist Chlorophyll *a* (Chl*a*). Dieses absorbiert jedoch nur Licht der Wellenlängen um 670 nm und vermag nicht die gesamte Breite des Spektrums zu nutzen. Aus diesem Grund verwenden Cyanobakterien zusätzlich das Phycobilisom, einen wasserlöslichen Antennenkomplex mit mehreren

Pigmentproteinen (Phycobiliproteinen), welche in Wellenlängen-Bereichen absorbieren, die nicht von Chl*a* abgedeckt werden (DeRuyter und Fromme, 2008) (Abb. 1.4). So können Cyanobakterien einen breiten Bereich des Lichtspektrums für die Photosynthese nutzen. Der Kern eines Phycobilisoms wird durch Allophycocyanin (APC) gebildet. Nach außen hin schließen sich Phycocyanin (PC) und Phycoerythrin (PE) an (Wolf und Schüßler, 2005). Cyanobakterien, die PE synthetisieren können, sind zu chromatischer Adaptation fähig (Houmard und de Marsac, 1988). Dabei kann der Organismus, je nach verfügbarer Lichtqualität, die Zusammensetzung der Pigmentproteine anpassen, um die größtmögliche Absorption des Lichts zu ermöglichen. Unter grünem Licht dominiert dann das rote PE, unter rotem Licht das blaugrüne PC (DeRuyter und Fromme, 2008). Die chromatische Adaptation spielt auch im Lebenszyklus des Cyanobakteriums *N. punctiforme* eine entscheidende Rolle. Die variierende Pigmentzusammensetzung im Lebenszyklus des Cyanobakteriums kann bei der Identifizierung der Zelltypen mittels Fluoreszenzmikroskopie herangezogen werden.

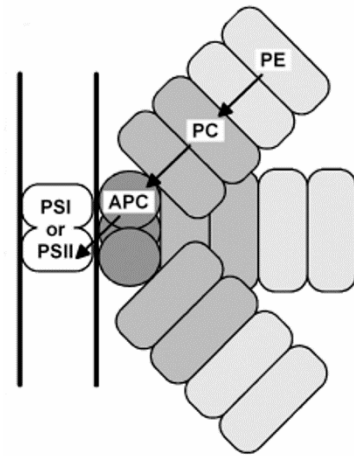


Abbildung 1.4. Schematische Darstellung eines Phycobilisoms. Pfeile repräsentieren die Richtung des Energieflusses. PE, Phycoerythrin, PC, Phycocyanin, APC, Allophycocyanin (Wolf und Schüßler, 2005).

1.2.2.2 Lebenszyklus und Zelldifferenzierung von *N. punctiforme*

N. punctiforme ist ein terrestrisches, biofilmbildendes, filamentöses Cyanobakterium, das bei Fehlen von gebundenem Stickstoff solchen aus der Atmosphäre fixieren kann. Es durchläuft einen Lebenszyklus, welcher durch eine Reihe äußerer Faktoren beeinflusst wird. Im Laufe dieses Zyklus werden neben den vegetativen Zellen drei weitere Zelltypen differenziert. Durch den Einfluss verschiedener externer Signale können stickstofffixierende Heterozysten, sporenähnliche Akineten und motile Hormogonien ausgebildet werden (Abb. 1.5) (Meeks *et al.*, 2002). Diese Zelltypen nehmen wichtige Funktionen im Lebenszyklus des Cyanobakteriums und bei der Bildung von Symbiosen mit Pflanzen ein (Khayatan *et al.*, 2017). Ist im umliegenden Medium kein gebundener Stickstoff verfügbar, aktiviert dies eine Reihe intrazellulärer Prozesse in *N. punctiforme*, die etwa zwölf Stunden nach der Induktion die Differenzierung beweglicher Hormogonien auslösen (Christman *et al.*, 2011, Cohen *et al.*, 1994). Dabei handelt es sich um zumeist kurze Filamente mit kleineren Zellen, wobei die endständigen Zellen konisch zugespitzt sind (Meeks *et al.*, 2002). Neben dem Fehlen von gebundenem Stickstoff kann

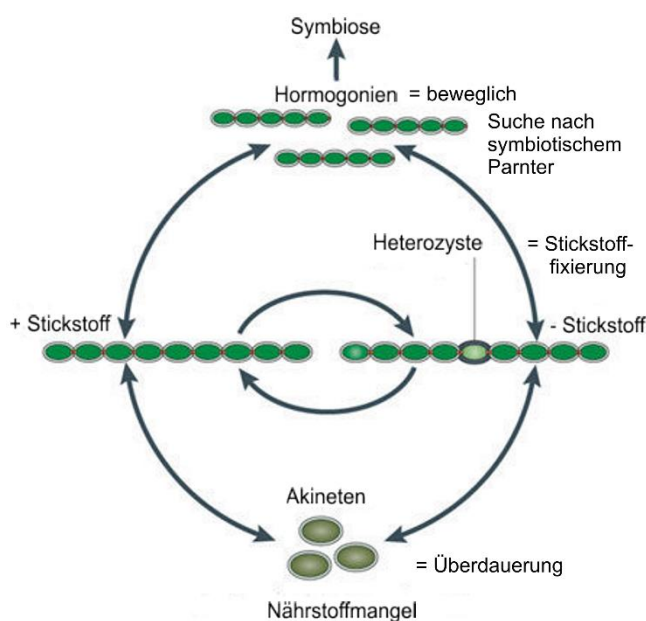


Abbildung 1.5. Lebenszyklus von *N. punctiforme*. Filamente mit vegetativen Zellen können zu motilen Filamenten, den Hormogonien, differenziert werden. Hormogonien werden für die Bildung von Symbiosen mit Pflanzen benötigt. Bei Stickstoffmangel werden stickstofffixierende Heterozysten differenziert, bei Nährstoffmangel sporenähnliche Akineten [Flores und Herrero (2010), modifiziert].

diese Differenzierung auch durch andere externe Signale ausgelöst werden. Ein solches Signal stellt beispielsweise die Lichtqualität dar. Ein hoher Anteil roten Lichts ermöglicht ebenso wie Stickstoffmangel die Induktion der Hormogonien-Differenzierung in manchen Cyanobakterien der Gattung *Nostocales* (Damerval *et al.*, 1991, Wolf und Schüßler, 2005). So konnten Wolf und Schüßler (2005) in *N. punctiforme* die Differenzierung von Hormogonien durch Applikation von Rotlicht induzieren, wobei unter diesen Bedingungen das Phycoerythrin, nicht aber das Phycocyanin, in den Zellen abgebaut wurde. Dies führte zu einer reduzierten Fluoreszenz der Zellen

Einleitung

(Wolf und Schüßler, 2005). Die besondere Form, verbunden mit einer speziellen EPS-Schicht, ermöglicht es den Hormogonien eine Gleitfähigkeit auszubilden, welche etwa bis 72 Stunden nach deren Induktion erhalten bleibt (Christman *et al.*, 2011). Das Stadium, in dem die Hormogonien bereits unbeweglich sind, aber die Zellteilung noch nicht begonnen hat, wird als „Primordium“ bezeichnet (Meeks *et al.*, 2002). Zunächst werden nur die endständigen Zellen der Hormogonien zu stickstofffixierenden Heterozysten differenziert. Eine Vielzahl verschiedener Gene ist an dem komplexen Prozess der Heterozysten-Differenzierung beteiligt (Meeks *et al.*, 2002). Kommt es zu einzelnen Mutationen von frühen oder späten Genen in dieser Kaskade, werden entweder keine oder unreife Heterozysten gebildet (Kumar *et al.*, 2010, Meeks *et al.*, 2002). Im weiteren Verlauf beginnen sich die Zellen zu teilen und die Filamente verlängern sich. Dabei werden die vegetativen Zellen von den Heterozysten mit gebundenem Stickstoff versorgt. Die Heterozysten erhalten wiederum gebundenen Kohlenstoff (Kohlenhydrate) aus der Photosynthese der vegetativen Zellen (Kumar *et al.*, 2010). Um die ausreichende Versorgung aller Zellen zu gewährleisten, werden entlang der Filamente weitere Heterozysten in einem festgelegten Intervall von je einer Heterozyste pro 15-20 vegetativen Zellen gebildet.

Das Enzym Nitrogenase, welches für die Fixierung des Stickstoffs verantwortlich ist, ist empfindlich gegenüber Sauerstoff und muss demnach von der sauerstoffproduzierenden Photosynthese, welche in den vegetativen Zellen stattfindet, separiert werden. Deswegen werden in den Heterozysten alle photosynthetisch aktiven Pigmente, wie Chl_a, Phycocyanin und Phycoerythrin abgebaut. So kann in den Heterozysten keine oxygene Photosynthese mehr stattfinden, die die Nitrogenase inaktivieren würde (Kumar *et al.*, 2010). Um auch die Diffusion von Sauerstoff von außen in die Zellen zu verhindern, sind Heterozysten zudem durch zwei zusätzliche Schichten abgeschirmt. An den Heterozysten des Cyanobakteriums *Anabaena* PCC 7120 konnte eine heterozystenspezifische innere Schicht aus Glycolipiden und eine äußere Schicht aus Polysacchariden nachgewiesen werden (Cardemil und Wolk, 1979, Nicolaisen *et al.*, 2009). Bei Kältestress und Nährstoffmangel bildet *N. punctiforme* außerdem Akineten als Überdauerungszellen. In diesen werden Glykogen und Cyanophycin (Stickstoffspeicher) eingelagert (Meeks *et al.*, 2002). Der komplexe Lebenszyklus verbunden mit der Fähigkeit spezialisierte Zelltypen zu differenzieren, ermöglicht es *N. punctiforme*, auf eine Vielzahl verschiedener Umwelteinflüsse zu reagieren. Jedoch wird ein ebenso komplexes intrazelluläres Reaktionssystem benötigt,

an dessen Ende die Differenzierung der spezialisierten Zellen steht. Dies und die Lebensform in Biofilmen und Symbiosen machen *N. punctiforme* zu einem interessanten Organismus, um externe Signale in Kombination mit intrazellulären Botenstoffen, als Teil eines solchen Reaktionssystems, und deren Einfluss auf die Zelldifferenzierung verbunden mit der Biofilmbildung zu untersuchen.

1.2.2.3 Symbiose von *N. punctiforme* mit eukaryotischen Organismen

N. punctiforme wurde ursprünglich aus einer Symbiose mit dem Palmfarn *Macrozamia* sp. isoliert. Es geht aber auch Symbiosen mit Leber- und Hornmoosen und Pflanzen der Gattung *Gunnera* ein. Die einzige bekannte Cyanobakterien-Pilz-Symbiose, bei der *N. punctiforme* innerhalb der Zellen eines Pilzes wächst, ist die mit *Geosiphon pyriformis* (Mollenhauer *et al.*, 1996, Schüßler, 2012). In den Cyanobakterien-Pflanzen- bzw. Cyanobakterien-Pilz-Symbiosen ist die Hormogonien-Entwicklung zusammen mit der Ausbildung einer intakten EPS-Schicht essentiell für den Infektionsprozess, da der eukaryotische Partner zumeist unbeweglich ist, und *N. punctiforme* sich zu ihm hinbewegen muss, um die Symbiose einzugehen (Bergman *et al.*, 2008). Der Prozess beginnt, indem der Symbiosepartner einen Hormogonien-induzierenden Faktor (HIF) abgibt, welcher in *N. punctiforme* zur Ausbildung von Hormogonien aus dem überwiegenden Teil der Filamente führt. Wenn der Infektionsprozess abgeschlossen ist, beeinflusst die Pflanze maßgeblich die Entwicklung des Cyanobionten. In *N. punctiforme* wurde gezeigt, dass nach erfolgreicher Aufnahme des Cyanobionten in die Pflanzenzelle die Differenzierung beweglicher Hormogonien durch einen Hormogonien-reprimierenden Faktor (HRF) unterdrückt wird (Cohen und Meeks, 1997). Zusätzlich wird die Wachstumsrate des Cyanobionten verlangsamt und die Zellgröße verringert. In einer *Nostoc-Gunnera*-Symbiose ist außerdem nahezu kein Licht verfügbar. Da *N. punctiforme* fakultativ heterotroph ist, wird in diesem Fall die Photosynthese nahezu vollständig zu Gunsten einer deutlich erhöhten Heterozysten-Zahl, zur Fixierung von Stickstoff, eingestellt, da die Pflanze den Cyanobionten mit Nährstoffen versorgt (Bergman *et al.*, 2008). Während freilebende *N. punctiforme* Kolonien etwa 10% Heterozysten differenzieren, sind es in Symbiose mit Pflanzen bis zu 80% (Bergman *et al.*, 2008, Silvester, 1976). Durch seine Fähigkeit, Symbiosen mit Pflanzen zu bilden und auch assoziiert mit anderen Organismen wie Bakterien, Pilzen und Cyanobakterien in Biofilmen zu leben, eignet sich *N. punctiforme* sehr gut als Vertreter phototropher Organismen im Modellbiofilm mit *K. petricola*.

1.3 Der sekundäre Botenstoff c-di-GMP

Bis heute wurden viele bakterielle sekundäre Botenstoffe beschrieben, die wichtige Funktionen bei der Weiterleitung und Beantwortung externer Signale übernehmen (Agostoni und Montgomery, 2014). C-di-GMP (bis-(3'-5')-di-Guanosinmonophosphat) ist ein sekundärer Botenstoff, dessen Beteiligung an regulatorischen intrazellulären Prozessen in einer Vielzahl von Bakterien nachgewiesen wurde (Romling *et al.*, 2013). Ausgehend von zwei Molekülen GTP wird c-di-GMP durch eine Diguanylatcyclase (DGC) synthetisiert und durch eine Phosphodiesterase (PDE) in pGpG (5'-Phosphoguanylyl-(3'-5')-Guanosin) und schließlich in zwei Moleküle GMP gespalten (Abb. 1.6). Die Aktivität der DGC ist an GGDEF Domänen, die der PDE an EAL oder HD-GYP Domänen geknüpft (Hengge, 2009).

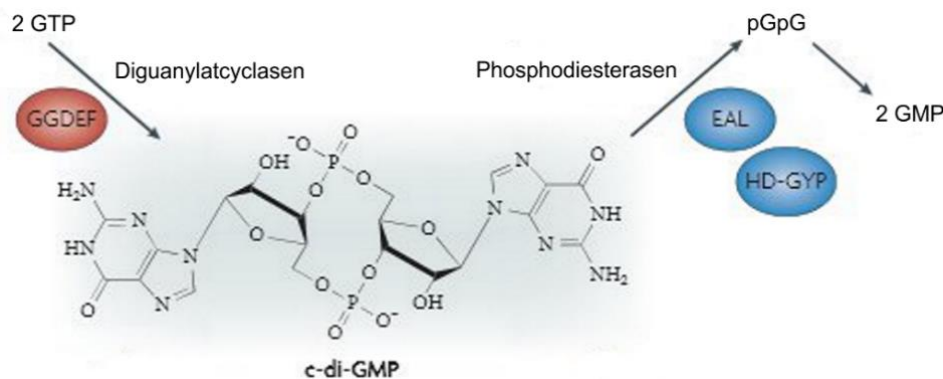


Abbildung 1.6. Struktur von c-di-GMP. C-di-GMP wird aus zwei GTP durch Diguanylatcyclasen mit GGDEF Domänen (rot) produziert und durch Phosphodiesterasen mit EAL oder HD-GYP Domänen (blau) in pGpG abgebaut, welches wiederum in zwei GMP gespalten wird. pGpG, 5'-Phosphoguanylyl-(3'-5')-Guanosin, c-di-GMP, bis-(3'-5')-di-Guanosinmonophosphat [Hengge (2009), modifiziert].

C-di-GMP reguliert grundlegende Prozesse in vielen gramnegativen Bakterien, darunter den Wechsel zwischen der motilen und sessilen Lebensform, die Biofilmbildung in Verbindung mit der Produktion extrazellulärer Substanzen, oder die Virulenz einzelner Stämme [zusammengefasst in Romling *et al.* (2013)]. Die genauen Funktionen von c-di-GMP in einzelligen und filamentösen Cyanobakterien sind noch nicht vollständig untersucht. Bis heute sind lediglich drei Proteine in Cyanobakterien bekannt, aus denen c-di-GMP hervorgeht. Für das Protein, welches durch *all2874* in *Anabaena* kodiert wird, das Phytochrom *cph2* aus *Synechocystis* und das Cyanobakteriochrom *SesA* aus

Thermosynechococcus elongates wurde eine DGC Aktivität nachgewiesen (Montgomery, 2007). Besonders gut ist das cph2-Phytochrom aus *Synechocystis* untersucht. Dabei handelt es sich um ein Hybridmolekül aus drei Photorezeptoren und drei c-di-GMP-Regulatordomänen (GAF-GAF-GGDEF-EAL-GAF-GGDEF) (Abb. 1.7)(Savakis *et al.*, 2012). Der N-terminale Teil umfasst die vier Domänen GAF1 und GAF2 als Rezeptoren für rotes und hellrotes Licht, sowie GGDEF1 und EAL, aus denen die Enzyme Diguanylatcylase (DGC) und Phosphodiesterase (PDE) zur Produktion bzw. zum Abbau von c-di-GMP hervorgehen. Es wird jedoch angenommen, dass GGDEF1 katalytisch inaktiv ist (Savakis *et al.*, 2012). Im C-terminalen Abschnitt des Phytochroms sind zudem eine katalytisch aktive GGDEF2 Domäne und eine GAF3 Domäne, als Photorezeptor für blaues Licht, lokalisiert. Die Verbindung des GAF3 Rezeptors und der GGDEF2 Domäne führt unter dem Einfluss blauen Lichts zu einer signifikanten Erhöhung der c-di-GMP Synthese in *Synechocystis* (Agostoni *et al.*, 2013). Savakis *et al.* (2012) zeigten zudem, dass das cph2-Phytochrom in *Synechocystis* die Phototaxis zu blauem Licht inhibieren kann.

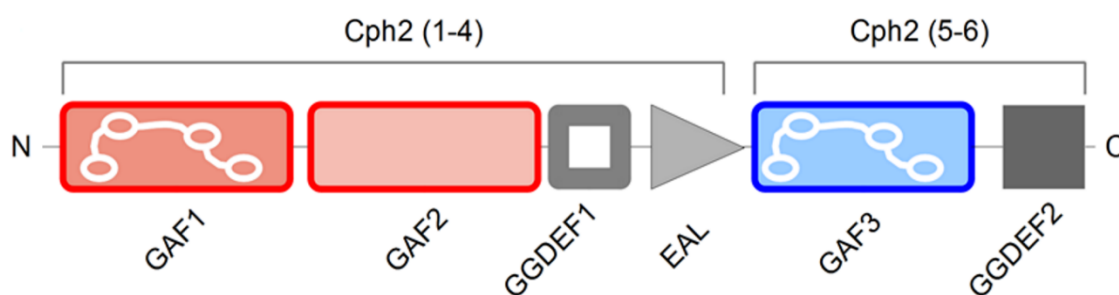


Abbildung 1.7. Cph2-Phytochrom aus *Synechocystis* sp. PCC 6803. Organisation der Domänen des *cph2* Gens mit N-terminalem Rezeptor für rotes und hellrotes Licht, katalytisch inaktiver GGDEF1 Domäne und EAL (1-4) sowie C-terminalem Rezeptor für blaues/grünes Licht und GGDEF2 Domäne (5-6), (Savakis *et al.*, 2012).

Neunuebel und Golden (2008) zeigten, dass c-di-GMP in dem filamentösen Cyanobakterium *Anabaena* für die Entwicklung von Heterozysten von Bedeutung ist. Dies ist jedoch die einzige Studie zur Funktion von c-di-GMP in filamentösen, stickstofffixierenden Cyanobakterien. Zu dessen Funktion in *N. punctiforme* ist bisher nichts bekannt. Wie im cph2-Phytochrom von *Synechocystis* sind in vielen Cyanobakterien die c-di-GMP Regulatordomänen an Photorezeptordomänen gekoppelt. Genomanalysen von *N. punctiforme* ATCC 29133 zeigten elf Gene mit der GGDEF Domäne, zehn Gene mit GGDEF und EAL Domäne, ein Gen mit nur der EAL Domäne und zwei Gene mit der HD-GYP Domäne. Eine im Vergleich zu anderen Cyanobakterien hohe Zahl von

Photorezeptoren (insgesamt 13) ist in *N. punctiforme* an die c-di-GMP Regulatordomänen gebunden (zwei GAF, zehn PYP und ein LOV Photorezeptor) (Agostoni *et al.*, 2013). Die hohe Zahl von Photorezeptoren in Kombination mit c-di-GMP Regulatordomänen ermöglicht es vielen Cyanobakterien, auf unterschiedliche externe Signale mit einer spezifischen intrazellulären Antwort zu reagieren. So zeigten Agostoni *et al.* (2016), dass die Lichtqualität die Produktion von c-di-GMP sowohl im einzelligen Cyanobakterium *Synechocystis*, als auch im filamentösen Cyanobakterium *Fremyella diplosiphon* steuern kann. Die Kopplung einer vergleichsweise großen Zahl der entsprechenden Domänen in *N. punctiforme* lässt vermuten, dass der Lebenszyklus und die damit verbundene Zelldifferenzierung dieses Cyanobakteriums maßgeblich von dem Einfluss des sekundären Botenstoffs in Kombination mit der Qualität des Lichtes abhängig sind.

1.4 Zielstellung

In der Vergangenheit konnte bereits die gegenseitige positive Beeinflussung des Cyanobakteriums *N. punctiforme* und des mikrokolonialen Pilzes *K. petricola* als Partner eines Modellbiofilms demonstriert werden. Auf welche Weise beide Biofilmpartner voneinander profitieren, ist nicht bekannt, jedoch gibt es andere Beispiele aus der Literatur, bei denen eine erhebliche Beteiligung der extrazellulären Substanzen an der Koexistenz der Biofilmpartner gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 1.2). Zu Beginn der Arbeit war ebenfalls nicht bekannt, ob und welche extrazellulären Polymere von beiden Organismen in den Modellbiofilm abgegeben werden. Demnach sollten beide Organismen einzeln hinsichtlich ihrer jeweiligen sekretierten EPS, mit dem Fokus auf den extrazellulären Polysacchariden, untersucht werden. Die Biofilme beider Organismen und deren EPS sollten zunächst mikroskopisch visualisiert, dann sollten Methoden für die Extraktion der extrazellulären Polysaccharide gefunden werden. Für beide Organismen sollte zudem die Struktur der Polymere hinsichtlich ihrer neutralen Monosaccharid-Zusammensetzung und deren Bindungstypen charakterisiert werden.

K. petricola als Vertreter der mikrokolonialen schwarzen Pilze gilt zudem als sehr resistent gegenüber einer Vielzahl von Stressfaktoren. Diese Eigenschaft wird vor allem seinen Schutzpigmenten Melanin und den verschiedenen Carotinoiden und Mycosporinen zugeschrieben. Jedoch spielen auch die EPS in vielen Organismen eine bedeutende Rolle bei der Resistenz gegenüber extremen Umweltbedingungen, antimikrobiellen Substanzen und freien Radikalen. In der Vergangenheit konnte bereits eine von *K. petricola* gebildete EPS-Schicht durch Gorbushina *et al.* (2008) visualisiert

werden. Diese wurde jedoch bisher weder extrahiert noch strukturell charakterisiert. Daher sollte in dieser Arbeit zunächst eine Methode zur quantitativen Isolierung der EPS gefunden und danach eine strukturelle Analyse der isolierten Exopolysaccharide durchgeführt werden. Es stellte sich außerdem die Frage, ob die in der Arbeitsgruppe vorhandenen Pigmentmutanten des Pilzes den Verlust eines Teils oder aller Schutzpigmente durch eine Veränderung der EPS-Menge oder -Struktur ausgleichen. Demnach sollten die Visualisierung und Struktur-Analyse der EPS im Vergleich zu der des Wildtyps erfolgen. Im Rahmen der EPS-Charakterisierung sollten zudem erste Untersuchungen zu möglichen Extraktionsmethoden extrazellulärer Proteine und zur Identifizierung des Exoproteoms von *K. petricola* durchgeführt werden.

Der phototrophe Biofilmpartner *N. punctiforme* ist in seinen natürlichen Habitaten überwiegend in Symbiose anzutreffen, wobei der Lebenszyklus und die damit verbundene Zelldifferenzierung sowie EPS-Bildung des Cyanobakteriums in hohem Maße von den Symbiose-Partnern beeinflusst werden kann. Ebenso konnte ein solcher Einfluss auf die EPS-Synthese durch den intrazellulären sekundären Botenstoff c-di-GMP in anderen Bakterien gezeigt werden. In dieser Arbeit sollte zusätzlich zur Charakterisierung der extrazellulären Polysaccharide untersucht werden, inwieweit die Zelldifferenzierung, die Bildung von EPS und die Struktur der extrazellulären Polysaccharide von *N. punctiforme* von diesem intrazellulären Botenstoff abhängig ist. Um dies zu überprüfen, sollten zwei eigene, neue Mutanten von *N. punctiforme* produziert werden, welche den sekundären Botenstoff c-di-GMP überproduzieren bzw. übermäßig abbauen sollten. Die erzeugten Mutanten sollten bezüglich ihrer Zelldifferenzierung in Verbindung mit der Expression von dafür benötigten Schlüsselgenen sowie im Hinblick auf Menge und Struktur der EPS, insbesondere aber der extrazellulären Polysaccharide, untersucht werden. Des Weiteren sind nach derzeitigem Kenntnisstand keine Informationen zur Struktur der Exopolysaccharide von *N. punctiforme* bekannt, sodass erstmals die Struktur des Exopolysaccharids von *N. punctiforme* beschrieben werden sollte.

2 MATERIAL

2.1 Geräte und Apparaturen

Agarosegel-Apparatur	Helixx Technologies
Autosampler vials <i>screw cap</i> + Deckel mit Septum und Insert <i>100 µl mit Polymerfuß</i>	Agilent
Binokular <i>Stemi2000-C</i> mit Kamera <i>AxioCam ERc5s</i>	Zeiss
Brutschrank	Memmert
Elektronische Präzisionswaage/Feinanalysewaage	Sartorius
Elektroporationsapparat <i>Gene Pulser Xcell™</i>	BIO-RAD
Elektronenmikroskop <i>XL30 ESEM System</i>	FEI/Phillips
Fluoreszenzmikroskop <i>Axio Imager. Mm2</i> mit <i>AxioCam ICc5 Kamera</i>	Zeiss
Fluoreszenz-Illuminierungssystem <i>HXP 120 V</i>	Zeiss
FTIR Mikroskop <i>Hyperion 3000</i>	Bruker Optics
FTIR Spektrometer <i>Vertex 70</i>	Bruker Optics
FTIR Zinkselenid (<i>ZnSe</i>) Kristalle <i>13mm x 2 mm</i>	Korth Kristalle GmbH
Gaschromatograph <i>6890N Network</i>	Agilent
Geldokumentation <i>ChemiDoc™ XRS+</i>	BIO-RAD
HPLC/DAD 1100 Series HPLC System	Agilent
Inkubationsschüttler <i>Climo-Shaker ISF1-X</i>	Kühner
Klimakammern <i>LT-36VL / CU-22L</i>	Percival Scientific
Kryo-Transfersystem <i>Alto 1000</i>	Gatan
Kühlzentrifuge <i>5430R / 5415R</i>	Eppendorf
Lichtmikroskop <i>PrimoStar</i>	Zeiss
Mahlbecher <i>Stahl/Kunststoff MM400 50 ml</i>	Retsch®
Mahlkugeln <i>Stahl/Glas Ø 5mm</i>	VWR International
Massenspektrometer <i>5973 Network (GC)</i>	Agilent
<i>6130 Quadrupole LC/MS system (HPLC)</i>	Agilent
Nanodrop <i>2000c</i>	Qiagen
pH-Meter <i>Ultra Basic 5</i>	Denver Instrument
Photometer <i>Genesys 10S UV-VIS</i>	ThermoFisher Scientific

Material

Polyacrylamidgelelektrophorese- und Transferapparatur

Mini-PROTEAN® Tetra Cell & Mini Trans-Blot

Electrophoretic Transfer Cell

BIO-RAD

Ribolyser

Hybaid GmbH

Schwingmühle *MM400*

Retsch®

Sterilwerkbank *Safeflow 1.8*

BioAir

Thermocycler *C1000™ Thermal Cycler*

für RT-qPCR mit *CFX™ Real-Time System*

BIO-RAD

Tischzentrifuge *5418*

Eppendorf

Ultraschallbad *Transsonic 420*

Elma®

Vakuumpzentrifuge *Concetrator Plus*

Eppendorf

Zählkammer *0,100 mm Tiefe; 0,0025 mm²/0,00625 mm²*

Neubauer

Zentrifuge *Avanti J-26XP*

Beckmann

2.2 Verbrauchsmaterialien

Dialyseschlauch *ZelluTrans, MWCO 3,500*

Carl Roth

Faltenfilter *Ø 150 mm, MN 615 ¼*

Macherey-Nagel

Farbfolien *Rosco Neutral Density #209 / Deep Blue #120 /*

Popella Licht- und

Moss Green #089 / Medium Red # 027

Tontechnik

Filtereinheit *Minisart® Spritzenfilter Cellulose Acetate 0,2 µm*

Sartorius

Glasperlen *Ø 0,5 mm / 0,1 mm*

Carl Roth

Glasperlen *Ø 0,5 – 0,75 mm*

Retsch®

Klebeband *vinyl schwarz 2,5 cm*

VWR

Klebefolie *Microseal® 'B' seals*

BIO-RAD

(UV) Küvetten *halbmikro*

Brand®

Multiwell-Platten *Multiplate PCR Plates™ 96-well*

BIO-RAD

Nitrocellulose-Transfermembran *Roti®-NC 0,2 µm*

Carl Roth

Petrischalen *quadratisch 100x100x20 mm*

Sarstedt

Rundfilter *Cellulose Acetate 0,45 µm*

Sartorius

Schraubdeckelgefäße mit Gummidichtung im Deckel *2,0 ml*

Brand®

Whatman™ -Papier

Whatman™ GE Healthcare

Zentrifugen-Filtereinheit *Amicon® Ultra 4 ml*

Merck Millipore

Zentrifugen-Filtereinheit *Ultrafree®-MC, 0,22 µm*

Merck Millipore

2.3 Chemikalien

Aceton p.a.	Chemsolute
Acetonitril <i>HPLC grade</i>	NeoLab
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth
Agarose <i>UltraPure™</i>	Invitrogen
Alcianblau 8 GS <i>für die Mikroskopie</i>	Carl Roth
Ammoniaklösung (NH_4OH) 10%	Carl Roth
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	Merck
Ammoniumeisen-III-citrat	Merck
Ammoniumperoxidsulfat (<i>APS</i>)	Carl Roth
Ammoniumsulfamat [$NH_4(SO_3NH_2)$]	Sigma-Aldrich
Arabinose, D(-)	Merck
Bariumhydroxid-octahydrat ($BaOH \cdot 8 H_2O$) >98% p.a.	Carl Roth
Bariumoxid (BaO)	Carl Roth
BCIP (<i>5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat</i>)	Carl Roth
Borsäure (H_3BO_3)	Scharlau
Bromphenolblau-Na Salz	SERVA
Calciumchlorid-Dihydrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	AppliChem
c-di-GMP	BIOLOG
Chloroform >99,8%	Sigma-Aldrich
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	AppliChem
Citrat-Monohydrat	Merck
Cobald(II)chlorid -Heptahydrat ($CoCl_2 \cdot 6 H_2O$)	Sigma-Aldrich
DEPC-treated water	Ambion®
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Applichem
DMF (<i>N,N-Dimethylformamid</i>)	Applichem
DMSO (<i>Dimethylsulfoxid</i>)	Sigma-Aldrich
EDTA (<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>) >99%	Carl Roth
Essigsäure (Eisessig, p.a.)	Chemsolute
Essigsäureanhydrid >99% z.S.	Carl Roth
Formaldehyd 36%	VWR
Fucose, L(-)	Carl Roth
Galaktose, D(+)	Fluka
GelRed® <i>in Wasser (10.000x Konzentrat)</i>	Genaxxon BioScience

Material

Glucose, D(+)	Merck
Glucuronsäure- γ -lacton, D(+)	Carl Roth
Glycerin, wasserfrei	AppliChem
Glycin	Carl Roth
Hefeextrakt, granuliert	Merck
Iodmethan <i>purum 99% (GC)</i>	Sigma-Aldrich
Isopropanol (<i>2-Propanol</i>) p.a.	AppliChem
Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	Merck
Kanamycinsulfat	Carl Roth
Kupfersulfat-Pentahydrat ($CuSO_4 \cdot 5 H_2O$)	Merck
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$)	Merck
Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat ($MnCl_2 \cdot 4 H_2O$)	Sigma-Aldrich
2 (β) Mercaptoethanol	Carl Roth
Malzextrakt, bakteriologisch	Carl Roth
Mannose, D(+)	AppliChem
Methanol p.a.	Fisher Scientific
Milchpulver, <i>blotting grade</i>	Carl Roth
MOPS <i>Pufferan</i> ® >99,5%	Carl Roth
<i>myo</i> -Inosit	Merck
Natriumbordeuterid ($NaBD_4$) 98Atom%D	Carl Roth
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	AppliChem
Natriumhydroxid ($NaOH$)	AppliChem
Natriummolybdat-Dihydrat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	AppliChem
Natriumnitrat ($NaNO_3$)	AppliChem
Natriumtetraborat ($Na_2B_4O_7$)	Th. Geyer
NBT (<i>Nitroblautetrazoliumchlorid</i>)	Carl Roth
Pepton <i>from Casein</i>	Merck
2-Phenylphenol	Sigma-Aldrich
Polyethylenglykol (PEG) 6000	AppliChem
Pyridin >99% z.S.	Carl Roth
R2A-Agar	Merck

Rhamnose, L(+)	AppliChem
Ribose	Carl Roth
Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin, BSA</i>)	Sigma-Aldrich
Roti®-Aqua Phenol	Carl Roth
Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth
Salzsäure (<i>HCl</i>) rauchend (37%)	Merck
Schwefelsäure (<i>H₂SO₄</i>) >95%	VWR
SDS (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>) fest / Lösung 10%	AppliChem
TEMED (<i>Tetramethylethylenediamin</i>)	Carl Roth
Titriplex®III (<i>Na₂-EDTA</i>)	Merck
Toluol	Carl Roth
Trifluoressigsäure (<i>TFA</i>) >99%	VWR
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (<i>Tris</i>)	Merck
Triton X-100	AppliChem
Trypton	Difco Laboratories
Tween®20	AppliChem
Xylose, D(+) p.a.	Janssen Chemica
Zinksulfat-Heptahydrat (<i>ZnSO₄ · 7 H₂O</i>)	AppliChem

2.4 Enzyme und dazugehörige Puffer

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
<i>Taq</i> DNA Polymerase 5 U/μl	New England Biolabs
10x NEB-Puffer 1.1, 2.1, 3.1, CutSmart	New England Biolabs
10x <i>Taq</i> Standardpuffer	New England Biolabs
DNase I 2 U/μl	New England Biolabs
10x DNase I Puffer	New England Biolabs

2.5 Kits und fertige Lösungen

QIAGEN® Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
Bradford Reagent	Sigma-Aldrich
TRIzol® Reagent	Invitrogen

Material

2x RNA Loading Dye	Thermo Scientific
iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR	BIO-RAD
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	BIO-RAD
Methanolic HCl (3N) Kit	Supelco
Roti®-Blue Kolloidale Coomassie-Färbung	Carl Roth

2.6 Hergestellte Lösungen und Puffer

Alle aufgeführten Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit *Aqua bidest.* angesetzt.

2.6.1 Puffer

AP-Inkubationspuffer (<i>Western Blot</i>)	100 mM 5 mM 100 mM	NaCl MgCl ₂ Tris-HCl (pH 9,5)
10x DNA-Ladepuffer	0,25% [w/v] 25% [w/v] 10 mM	Bromphenolblau Ficoll Typ 400 EDTA
PBS (pH 7,4)	8 mM 2 mM 150 mM	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ NaCl
Phosphatpuffer (Sörensen, pH7,2) (<i>Fixierung ESEM</i>)	0,2 M 0,2 M	KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O
Protein-Transferpuffer (pH 8,0)	25 mM 192 mM 20% [v/v]	Tris Glycin Methanol
10x SDS-Laufpuffer (pH 8,8)	0,25 M 1,9 M 0,5% [w/v]	Tris Glycin SDS

2x SDS-Proteinprobenpuffer	0,1 M	Tris-HCl (pH 7,5)
	2 mM	EDTA
	20% [v/v]	Glycerin
	4% [w/v]	SDS
	10% [w/v]	2-Mercaptoethanol
	0,02% [w/v]	Bromphenolblau
SDS-Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,75 M	Tris
	0,4% [v/v]	SDS
SDS-Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M	Tris
	0,4% [v/v]	SDS
50x TAE-Puffer (pH 8,5)	2 M	Tris
	50 mM	EDTA
	5,7% [v/v]	Eisessig
TBS (pH 7,5)	20 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	140 mM	NaCl
TBS-T	0,1% [w/v]	Tween® 20 in 1x TBS
1x TE-Puffer	10 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	1 mM	EDTA (pH 8,0)
TNE-Puffer (pH 8,0)	100 mM	Tris
	50 mM	EDTA
	500 mM	NaCl
2.6.2 Lösungen		
Acetylierungslösung (<i>Derivatisierung</i>)	50 % [v/v]	Pyridin
	50 % [v/v]	Essigsäureanhydrid
Alcian Blau-Lösung	0,05% [w/v]	Alcian blue 8GX
	3% [v/v]	Eisessig

Material

AP-Substratlösung (<i>Western Blot</i>)	0,66% [v/v] 0,33% [v/v]	NBT-Stammlösung BCIP-Stammlösung in AP-Inkubationspuffer
BCIP-Stammlösung (<i>Western Blot</i>)	5% [w/v]	BCIP-p-Toluidinsalz in DMF
Blocklösung (<i>Western Blot</i>)	6% [w/v]	Milchpulver in 1x TBS
c-di-GMP Extraktionslösung	40% [v/v] 40% [v/v]	Acetonitril Methanol
Fixierlösung (<i>ESEM</i>)	4% [v/v]	Glutaraldehyd in Phosphatpuffer
Kanamycin-Stammlösung	50 mg/ml	Kanamycinsulfat
Milchlösung (<i>Antikörper-Verdünnung</i>)	6% [w/v] 0,3% [w/v]	Milchpulver Tween® 20 in 1x TBS
NBT-Stammlösung (<i>Western Blot</i>)	5% [w/v]	NBT in 70% DMF
PEG/NaCl-Lösung (<i>DNA-Fällung</i>)	30% 1,6 M	PEG6000 NaCl
Reduktionslösung (<i>Derivatisierung</i>)	10 mg/ml	NaBD ₄ in 1 M Ammoniumhydroxid
Stopplösung (<i>Western Blot</i>)	20 mM	EDTA in 1x PBS
Tris-HCl-Lösung (pH 7,0 - 9,5)	0,5 M bzw. 1 M	Tris (mit HCl eingestellt)

2.7 Hergestellte Medien

Wenn nicht anders angegeben, wurde den Medien zur Herstellung von Agar-Platten vor dem Autoklavieren 1% [w/v] Agar zugegeben.

2.7.1 Medien zur Kultivierung bakterieller Zellen

LB-Medium (pH 7,0)	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl
LB-Medium/Kan	50 µg/ml	Kanamycinsulfat in LB-Medium
BG11-Medium (pH 7,5)	17,65 mM	NaNO ₃
	0,18 mM	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O
	0,3 mM	MgSO ₄ · 7H ₂ O
	0,25 mM	CaCl ₂ · 2H ₂ O
	0,003 mM	Na ₂ -EDTA
	0,19 mM	Na ₂ CO ₃
	0,029 mM	Citrat · H ₂ O
	0,03 mM	Ammoniumeisen-III-citrat
	46 µM	H ₃ BO ₃
	0,17 µM	CoCl ₂ · 6H ₂ O
	0,32 µM	CuSO ₄ · 5H ₂ O
	9,2 µM	MnCl ₂ · 4H ₂ O
	1,6 µM	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O
0,77 µM	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	
BG11 ₀ -Medium (pH 7,5)	wie BG11-Medium, ohne NaNO ₃	
BG11-CuSO ₄ -Medium (pH 7,5)	wie BG11-Medium, ohne CuSO ₄ · 5H ₂ O	
BG11 + CuSO ₄ -Medium (pH 7,5)	wie BG11-Medium, mit 0,6 µM CuSO ₄ · 5H ₂ O	

Material

BG11-Medium/Kan	12,5 µg/ml	Kanamycinsulfat in BG11-Medium
-----------------	------------	-----------------------------------

Für BG11-Agarplatten mit Kanamycin wurde die doppelte Menge (25 µg/ml) Kanamycin verwendet.

BG11/MOPS/NH ₄ Cl-Medium (pH 7,8)	5 mM 2,5 mM	MOPS NH ₄ Cl in BG11-Medium
---	----------------	--

BG11/MOPS/NH ₄ Cl/LB-Medium (pH 7,8)	0,5% [v/v]	LB-Medium in BG11/MOPS/NH ₄ Cl-Medium
--	------------	---

2.7.2 Medium zur Kultivierung von *K. petricola*

MEB-Medium	2% [w/v]	Glucose-Monohydrat
	2% [w/v]	Malzextrakt
	0,1% [w/v]	Pepton

Nach Zugabe von 2% [w/v] Agar wird dieses Medium als MEA bezeichnet.

2.8 Antikörper

Primärantikörper:

Monoklonaler ANTI-FLAG® M2 Antikörper (F3165) aus Maus Sigma-Aldrich

Sekundärantikörper:

anti Maus-Antikörper aus Kaninchen Thermo Scientific
(Alkalische Phosphatase-markiert)

2.9 Plasmide

Tabelle 2.1. Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pUR-cph2(5-6)	Domänen 5 (GAF3) und 6 (GGDEF2) von cph2 aus <i>Synechocystis</i> 6803 unter petJ-Promotor-Kontrolle; FLAG-Tag; Km	AG Wilde (<i>Universität Freiburg</i>)
pUR-cph2(1-4)	Domänen 1-4 von cph2 aus <i>Synechocystis</i> 6803 unter petJ-Promotor-Kontrolle; FLAG-Tag; Km	AG Wilde (<i>Universität Freiburg</i>)
pRK2013	ColE1-Replicon TraRK2 ⁺ Mob ⁺ ; Helferplasmid für Konjugation; Km	Figurski und Helinski (1979)

2.10 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen biomers.net oder Thermo Fisher Scientific synthetisiert.

Tabelle 2.2. Verwendete Primer

Primer	Sequenz	annealing-Temperatur	Größe Fragment	Referenz
petJ_F	TGAGGATTTTACTCTCCATGGCAT	55	1095 bp	diese Arbeit
cph2_R	AATAAGTAGCGGTTACCCACTTGG			diese Arbeit
backbone_3	CTCGGAGATCATCAGGTGGC	55	1065 bp	diese Arbeit
backbone_4	TAGCTGGTCTATTCGCTGCG			diese Arbeit
16S_F	CACACTGGGACTGAGACAC	60	191 bp	Pinto <i>et al.</i> (2012)
16S_R	CTGCTGGCACGGAGTTAG			
rnpA_F	CCATCGAACACCTCAGCTTG	60	137 bp	diese Arbeit
rnpA_R	GTTTGCTGCCAGATTAGCG			diese Arbeit
rnpB_F	GTAAGAGCGCACCAGCAGTA	60	133 bp	diese Arbeit
rnpB_R	CGCTTGTTACCAAACGCCTC			diese Arbeit
nifH_F	TTCACTTTGTCCCCGTGAC	60	153 bp	diese Arbeit
nifH_R	TAGGTGTAGGAACGGCGAGA			diese Arbeit
nifD_F	AACCGTGATAAGGACCGGAG	60	156 bp	diese Arbeit
nifD_R	TGGGTCTACCTTCCGTCOA			diese Arbeit
hetR_F	AAGTATCCTTGGCAACCGGG	60	172 bp	diese Arbeit
hetR_R	AGTCTTCTTGGGATCGCCTG			diese Arbeit

Material

2.11 Nukleotide und Größenmarker

Nukleotide:

Deoxynucleotide (dNTP) Solution Set (100mM) New England Biolabs

DNA-Größenmarker:

MassRuler™ DNA Ladder Mix *ready-to-use* Thermo Scientific

RNA-Größenmarker:

RiboRuler High Range RNA Ladder Thermo Scientific

Protein-Größenmarker:

Roti® Mark BICOLOR Carl Roth

2.12 Organismen

2.12.1 Bakterienstämme

E. coli DH5 α : Charakteristika: *F*⁻, ϕ 80 Δ lacZM15, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*, *phoA*,
supE44, *gyrA96*, *relA1*, λ ⁻ (Hanahan, 1983)

E. coli Cel40: trägt das für die Triparentale Konjugation benötigte Helferplasmid
pRK2013; Charakteristika: *Tra*⁺ (*pRK2013*), *Km*^R

Nostoc punctiforme ATCC 29133: filamentöses, N₂-fixierendes Cyanobakterium, zur
Verfügung gestellt von John C. Meeks (Universität
Kalifornien, Davis, USA)

2.12.2 Eukaryotische Stämme

Knufia petricola A95: Mikrokolonialer, gesteinsbewachsender Pilz; isoliert von
Marmoroberfläche in Athen, Griechenland; hinterlegt im
CBS-KNAW Fungal Diversity Centre, Utrecht, Die Niederlande
(CBS 123.872) und an der BAM (A95) (Gorbushina *et al.*,
2008, Wollenzien *et al.*, 1997)

K. petricola A95 Δ *pks*: Deletionsmutation der Polyketid-Synthase im Melanin-
Syntheseweg (Knabe *et al.*, unveröffentlicht)

- K. petricola* A95 Δpdg : Deletionsmutation der Phytoen-Desaturase im Carotinoid-Syntheseweg (Breitenbach *et al.*, unveröffentlicht)
- K. petricola* A95 pm9: unbekannte Spontanmutation, durch die die Melanin-Synthese unterbrochen ist
- K. petricola* A95 pm9 Δpdg : basierend auf Spontanmutante pm9 wurde die Phytoen-Desaturase ausgeschaltet
- K. petricola* A95 Δsdh : Deletionsmutation der Scytalon-Dehydratase im Melanin-Syntheseweg (Knabe *et al.*, unveröffentlicht)
- K. petricola* A95 $\Delta pks/\Delta pdg$: Deletionsmutation der Polyketid-Synthase und der Phytoen-Desaturase in beiden Pigment-Synthesewegen (Knabe *et al.*, unveröffentlicht)

2.13 Sonstiges

Kugelgemisch in 2 ml Schraubdeckelgefäßen zum Zellaufschluss von *N. punctiforme*:

1 g Glaskugeln gemischt aus Glasperlen $\varnothing 0,5 \text{ mm}$ (0,33g)

$\varnothing 0,1 \text{ mm}$ (0,33g)

$\varnothing 0,5 - 0,75 \text{ mm}$ (0,33g), autoklaviert.

2.14 PC-Software

Adobe Photoshop Elements 7.0	Microsoft Excel 2016
ImageLab 4.1	Microsoft Word 2016
ChemStation B.01.03	OpenChrom Community Edition (Mattauch)
ChemStation D.02.00	Bio-Rad CFX Manager 3.0
OPUS 6.5	Picolay (Heribert Cypionka)
ZEN (blue edition)	Corel PHOTO-PAINT X5
JMP 13 (Statistik)	

3 METHODEN

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Abschnitten wurde in dieser Arbeit die *Taq* DNA Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet. Für die PCR-Reaktionen wurden 25 µl Ansätze in *Aqua bidest.* wie folgt angesetzt: 10 ng Plasmid-DNA oder 100 ng genomische DNA, 2,5 µl 10x *Taq* Standard Puffer, je 0,5 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer (10 pmol), 0,5 µl dNTP's (10 mM) und 0,125 µl *Taq* DNA Polymerase (5 U/µl). Die Reaktionen wurden nach dem *Cycler*-Protokoll in Tabelle 3.1 durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese (3.1.2) aufgetrennt.

Tabelle 3.1. PCR *Cycler*-Protokoll

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	30 s	1
Denaturierung	95°C	30 s	30
<i>annealing</i>	55-60°C	30 s	30
Elongation	68°C	1 min/kb	30
Elongation	68°C	5 min	1
Aufbewahrung	8°C	∞	1

3.1.2 Agarosegel-Elektrophorese von DNA und RNA

Zur Auftrennung der durch PCR oder Restriktion gewonnenen Fragmente wurden 0,8%-ige Agarosegele in 0,5x TAE angesetzt. Alle DNA-Proben wurden nach Zugabe von 10x Ladepuffer aufgetragen. Um nach erfolgter Gelelektrophorese die Fragmentgrößen abschätzen zu können, wurde der *MassRuler™ DNA Ladder Mix* von Thermo Scientific verwendet. Bei einer angelegten Spannung von 100 V konnte das Gel nach ca. 30 min zur Anfärbung der DNA-Banden für 20 min in GelRed™-Lösung geschüttelt, dann unter kurzzeitigem UV-Licht dokumentiert werden. Zur Auftrennung von RNA-Proben wurden 2 µl der RNA-Extrakte (3.1.8) mit derselben Menge *2x RNA Loading Dye* gemischt, 10 min bei 70°C erhitzt und nach Abkühlung auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Zur Abschätzung der Bandengröße wurde der *RiboRuler* von Thermo Scientific mitgeführt. Nach 30 min bei 100 V konnten die Banden ohne separate Anfärbung direkt unter kurzzeitigem UV-Licht dokumentiert werden.

Methoden

3.1.3 Ethanol-/PEG-Fällung

Bei einer Ethanolfällung wurde das 2,5-fache des Probenvolumens an absolutem Ethanol hinzugefügt und 10 min bei -80°C inkubiert. In einigen Fällen wurde zusätzlich zum Ethanol 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat zugegeben, um die DNA-Fällung zu verbessern. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 16.100 g und 4°C zentrifugiert. Bei einer PEG-Fällung wurde das 2-fache des Probenvolumens einer 30% PEG/1,6 M NaCl-Lösung zugegeben, 24 h bei 4°C inkubiert und, wie oben aufgeführt, zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und noch einmal unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nachdem das Ethanol entfernt worden war, wurde das Pellet für 30 min an der Luft getrocknet und in $50\ \mu\text{l}$ 1x TE-Puffer gelöst.

3.1.4 Transformation elektrisch kompetenter *E. coli* Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden für Transformationen *Escherichia coli* Zellen des Stammes DH5 α verwendet. Für die Elektroporation wurden die Zellen zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden $50\ \mu\text{l}$ der Zellen und ca. 200 ng Plasmid-DNA in eine Elektroporationsküvette gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Elektroschock bei 2,5 kV ($25\ \mu\text{F}$; $200\ \Omega$) für 5 ms. Sofort wurden $500\ \mu\text{l}$ vorgewärmtes LB-Medium zugegeben, in ein Reaktionsgefäß überführt und 30 min unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde der Transformationsansatz 1:100 verdünnt und $200\ \mu\text{l}$ wurden auf LB-Platten mit Selektionsantibiotika (Kanamycin) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden potentiell positive Klone gepickt und die Plasmide präpariert (3.1.6).

3.1.5 Triparentale Konjugation

Um DNA in *N. punctiforme* zu transferieren, ist die Triparentale Konjugation die bevorzugte Methode (Cohen *et al.*, 1998). Es werden dafür drei bakterielle Stämme benötigt. Ein *E. coli* Helfer-Stamm ermöglicht mit Hilfe eines Mobilitäts- und Helferplasmids (pRK2013), dass das zu transferierende Plasmid eines *E. coli* Donor-Stammes in *N. punctiforme* überführt werden kann. Für die Triparentale Konjugation wurden am Vortag Vorkulturen der beiden *E. coli* Stämme [ein Stamm mit Helferplasmid pRK2013; ein Stamm welcher zuvor mit pUR-cph2 transformiert worden ist (3.1.4)] angeimpft. Dafür wurde mit einer Pipettenspitze etwas aus einem -80°C Glycerinstock abgekratzt, in 3 ml LB/Kan-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Am Tag der Konjugation wurden *E. coli* Kulturen in LB/Kan-Medium

1:100 mittels der Vorkulturen überimpft und bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Optische Dichte der Kultur bei 600 nm (OD_{600}) wurde sofort und dann erst stündlich, später halbstündlich bis zu einer OD_{600} von 0,6 bis 0,7 photometrisch bestimmt. Parallel wurden ca. 100 ml *N. punctiforme* Kultur (späte exponentielle Phase) mit Hilfe einer Schwingmühle zerkleinert (3.3.1) und nach Zentrifugation für 10 min bei 2000 g in 50 ml BG11/MOPS/NH₄Cl-Medium resuspendiert. Zur Regeneration wurde die Zellsuspension unter standardisierten Bedingungen (3.3.1) ca. 3 h inkubiert. Gegen Ende der Regenerationsphase wurde der Chlorophyll *a* - Gehalt (Chl_a) der Zellsuspension bestimmt (3.3.3) und die Kultur auf einen Wert von 75 µg Chl_a /ml mit BG11/MOPS/NH₄Cl-Medium konzentriert. Bei einer OD_{600} von ca. 0,7 wurden die *E. coli* Helfer- und *Donor*-Stämme zu gleichen Teilen gemischt, für 10 min bei 2000 g zentrifugiert und mit LB-Medium auf eine OD_{600} von 10 konzentriert. Ein Cellulose Acetat-Filter wurde auf eine BG11/MOPS/NH₄Cl/LB-Platte gelegt. Pro Konjugationsansatz wurden 500 µl des *E. coli* Gemischs mit 500 µl konzentrierter *N. punctiforme* Suspension gemischt und für 30 s bei 4000 g pelletiert. Der Überstand wurde bis auf 200 µl verworfen, sodass das Pellet in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert und auf die Konjugationsplatten mit Filter verteilt werden konnte. Diese wurden für 24 h bei geringer Lichtintensität ($20 \mu\text{mol}/\text{m}^2 * \text{s}$) inkubiert. Daraufhin wurden die Filter auf Konjugationsplatten ohne LB-Medium transferiert und weitere zwei Tage bei geringer Lichtintensität gehalten, bevor die Lichtintensität auf $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2 * \text{s}$ erhöht wurde. Nach zwei weiteren Tagen wurden die Filter auf BG11/Kan-Platten gegeben. Resistente Kolonien wurden separat auf BG11/Kan-Platten bis zur weiteren Verwendung angezogen.

3.1.6 Plasmid-DNA Präparation

Mit Hilfe der Plasmidpräparation können extrachromosomal vorliegende Plasmide aus transformierten Bakterien isoliert werden. Dafür wurden nach der Transformation von *E. coli* (3.1.4) einzelne Kolonien in LB/Kan-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Plasmide wurden mittels des *QIAGEN® Plasmid Midi Kit* oder *QIAPrep® Spin Miniprep Kit* von Qiagen nach den Herstellerangaben isoliert. Nach der Isolierung wurde die Konzentration der DNA-Lösung bestimmt (3.1.9) sowie die korrekte Identität des Plasmids mittels Restriktion (3.1.10) überprüft.

3.1.7 Extraktion genomischer DNA aus *N. punctiforme*

In Folge der Triparentalen Konjugation (3.1.5) wurde aus den Zellen der konjugierten Kulturen genomische DNA, modifiziert nach Griffiths *et al.* (2000), extrahiert. Dafür wurden bis zu 10 ml einer einwöchigen, exponentiell wachsenden *N. punctiforme* Kultur bei 7197 g für 10 min zentrifugiert, das Zellpellet in 600 µl TNE-Puffer resuspendiert und in ein Schraubdeckelgefäß mit 1 g Kugelgemisch (2.13) überführt. Nach Zugabe von 600 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 50 µl 10% SDS wurden die Zellen im Ribolyser bei Stufe 6 für 3x 20 s aufgeschlossen, dann auf Eis abgekühlt. Nach Zentrifugation bei 13.200 g und 4°C für 15 min wurde die wässrige Phase mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die genomische DNA wurde nach nochmaligem Zentrifugieren mit PEG/NaCl gefällt (3.1.3).

3.1.8 Gesamt-RNA Extraktion aus *N. punctiforme*

Zur Extraktion von Gesamt-RNA aus *N. punctiforme* wurden zunächst 2 ml Schraubdeckelgefäße mit Kugelgemisch (2.13) und 1,5 ml Reaktionsgefäße separat autoklaviert, um die Kontamination mit RNasen möglichst gering zu halten. Außerdem wurden ausschließlich vorgesteckte Pipettenspitzen mit Filter genutzt. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Für die Extraktion wurden 15 ml Suspensionskulturen in 15 ml Reaktionsgefäßen 10 min bei 7197 g pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden sofort in 1 ml TRIzol® Reagent resuspendiert und in 2 ml Schraubdeckelgefäße überführt. Die Zellen wurden dann 3x für 20 s bei Stufe 5,5 im Ribolyser aufgeschlossen, bevor die homogenisierten Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren wurden. Nachdem die Proben bei Raumtemperatur langsam aufgetaut worden sind, wurden Zelltrümmer für 10 min bei 12.000 g pelletiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, dann einige Male leicht geschüttelt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA-Proben wurden 15 min bei 12.000 g zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Daraus wurde die RNA durch Zugabe von 500 µl 2-Propanol, anschließende 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugieren für 10 min bei 12.000 g gefällt. Das RNA-Pellet wurde im Folgenden mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen (Zentrifugation 7500 g, 5 min) und ca. 20 min an der Luft getrocknet.

Die Gesamt-RNA wurde in 30 µl DEPC-H₂O aufgenommen und durch Erhitzen bei 55°C (10 min) gelöst. Nachdem die Konzentration und die Qualität (über Agarosegel-Elektrophorese; 3.1.2) der RNA-Extrakte bestimmt worden ist, wurden diese bei -80°C gelagert.

3.1.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurden 2 µl der Plasmid- oder genomischen DNA bzw. der RNA mittels Nanodrop photometrisch gemessen. 1x TE-Puffer (DNA) oder DEPC-H₂O (RNA) wurden dabei als Leerwert verwendet. Gemessen wurde die optische Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm. Das Verhältnis von A_{260}/A_{280} gibt den Reinheitsgrad der DNA/RNA an und sollte bei 1,8 bzw. 2,0 liegen.

3.1.10 Restriktionsanalyse

Zur Überprüfung der korrekten Identität der klonierten Plasmide wurden analytische Restriktionsansätze der Plasmid-Präparationen (3.1.6) in *Aqua bidest.* mit einem Gesamtvolumen von 10 µl wie folgt hergestellt: 1 µg Plasmid-DNA, 1 µl 10x Puffer (NEB) und 10 U je Enzym. Die Ansätze wurden für 1 h bei dem Temperaturoptimum der Enzyme inkubiert. Nach Zugabe von 10x Ladepuffer wurden die Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt und dokumentiert (3.1.2).

3.1.11 DNase-Behandlung von RNA-Extrakten

Zur Entfernung genomischer DNA aus RNA-Extrakten wurden diese mit DNase I für 30 min bei 37°C behandelt. Die Ansätze wurden in DEPC-H₂O mit einem Gesamtvolumen von 30 µl wie folgt angesetzt: 10 µg RNA, 3 µl 10x DNase I Puffer und 4 µl DNase I (2 U/µl). Um eine mögliche Degradation der RNA durch die folgende Hitzeinaktivierung zu verhindern, wurden jedem Ansatz 3 µl 50 mM EDTA (Endkonzentration 5 mM) zugegeben, dann wurde zur Inaktivierung des Enzyms für 10 min auf 75°C erhitzt. Bevor die RNA für die Reverse Transkription (3.1.12) verwendet werden konnte, wurde die Konzentration der RNA erneut bestimmt (3.1.9).

3.1.12 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription der RNA wurde mit dem *iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR* von BIO-RAD durchgeführt. Pro Ansatz wurden 500 ng RNA, nach der DNase I-Behandlung (3.1.11), entsprechend den Herstellerangaben transkribiert. Die resultierende cDNA wurde direkt nach der Reaktion 1:10 mit DEPC-H₂O verdünnt. Um die Qualität der cDNA zu überprüfen, wurden 5 µl in eine konventionelle PCR mit den Primern 16S_F/16S_R eingesetzt (3.1.1 und 3.1.2).

3.1.13 Quantitative *Real-Time* PCR

Mittels quantitativer *Real-Time* PCR (qRT-PCR) lassen sich spezifische Nukleinsäure-Abschnitte in Echtzeit quantifizieren. Dabei werden die gleichen Komponenten wie bei der konventionellen PCR (3.1.1) benötigt. Zusätzlich wird jedoch ein fluoreszierender Farbstoff hinzugegeben. Der Thermocycler besitzt eine optische Einheit, an der die Detektion der PCR-Produkte stattfindet. Nach jedem Zyklus wird die Fluoreszenz, die von der Probe ausgeht, gemessen. Abhängig von der DNA-Menge im Reaktionsansatz, hebt sich die Fluoreszenz nach einer bestimmten Anzahl an Zyklen von der Hintergrundfluoreszenz ab. Dies wird von einer Software dokumentiert. Dadurch lassen sich vergleichende quantitative Aussagen über die Ausgangsmenge einer bestimmten Nukleinsäure-Sequenz in verschiedenen Proben treffen. Für die PCR wurde der *iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix* von BIO-RAD verwendet. Als fluoreszierender Farbstoff ist hier SYBR Green I enthalten, welches nach der Elongationsphase an die gebildete doppelsträngige DNA bindet und grünes Licht emittiert. Die Ansätze für die qRT-PCR wurden wie folgt in *Aqua bidest.* mit einem Gesamtvolumen von 10 µl in 96-well Platten pipettiert: 2 µl cDNA, je 0,25 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (10 pmol) und 5 µl Supermix. Die Platte wurde mit Klebefolie verschlossen, kurz bei geringer Geschwindigkeit abzentrifugiert und im Thermocycler (Tabelle 3.2) inkubiert.

Tabelle 3.2. qRT-PCR Cyclor-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	3 min	1
Denaturierung	95°C	5 s	40
Annealing/Elongation	60°C	30 s	40
Schmelzkurve	65-95°C in 0,5°C-Schritten	5 s/Schritt	1

Die Quantifizierung der Zielsequenzen erfolgte über deren Verhältnis zu endogenen Referenz-Transkripten. Dabei werden Ziel- und Referenzgene aus derselben Probe in getrennten Reaktionen amplifiziert. Jeder PCR-Ansatz wurde in drei technischen Replikaten durchgeführt, der Mittelwert der für jeden Ansatz erhaltenen C_t -Werte wurde für die weitere Berechnung herangezogen. Die Formeln zur Berechnung der $\Delta\Delta C_t$ -Werte als Maß für das Verhältnis der Expressionsrate des Zielgens zum Referenzgen sind Abbildung 3.1 zu entnehmen. Es wurden zwei biologische Replikate pro Versuch und insgesamt drei identische unabhängige Versuche durchgeführt.

$$\Delta C_t = C_{t_{Zielgen}} - C_{t_{Referenzgen}}$$

$$\Delta\Delta C_t = 2^{\Delta C_t}$$

Abbildung 3.1. Formel zur Berechnung der $\Delta\Delta C_t$ -Werte in der qRT-PCR.

Vor der ersten Verwendung der qRT-PCR Primer (2.10) wurden diese hinsichtlich ihrer Effizienz überprüft. Dazu wurden pro Primer-Paar sieben PCR-Ansätze jeweils in Duplikaten mit einer der cDNA-Proben aus 2.2.12, wie oben angegeben, angesetzt. Die cDNA wurde unverdünnt und in sechs Verdünnungsstufen (1:5 bis 1:500) eingesetzt. Die Effizienz der Primer wurde mit dem Programm CFX Manager (BIO-RAD) bestimmt. Bei einer Primer-Effizienz $E \geq 90\%$ wurde das Primer-Paar für die Quantifizierung der Zielsequenz in den cDNA-Proben verwendet.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Extraktion intrazellulärer Proteine

Zur Gesamtproteinextraktion wurden 1 – 2 ml einer Zellkultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden daraufhin 5 min bei 4000 g zentrifugiert und anschließend mit 100 - 200 µl Proteinprobenpuffer versetzt. Das darin enthaltende 2 (β)-Mercaptoethanol dient dem Aufbrechen der Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine durch Reduktion der Disulfidbrücken. Nach dem Aufkochen der Proben für 5 min bei 95°C, welches zur vollständigen Denaturierung führt, konnten diese in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.2.3) aufgetrennt oder bei -20°C aufbewahrt werden.

3.2.2 Extraktion extrazellulärer Proteine aus Biofilmen

Extrazelluläre Proteine wurden auf zwei Wegen aus Biofilmen extrahiert. Biofilme wurden zunächst auf Cellulose Acetat-Filtern kultiviert, dann wurden diese von der Oberfläche vorsichtig abgekratzt, in ein Reaktionsgefäß überführt und großzügig mit 0,05% NaCl-Lösung bedeckt. Biofilme von drei Filtern wurden zu einer Probe vereinigt, und pro Extraktionsmethode wurden drei parallele Proben bearbeitet. Für eine physikalische Extraktion wurde das Reaktionsgefäß einige Male geschwenkt, dann 25 min bei 4°C und 7197 g zentrifugiert, um die EPS so mechanisch abzulösen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für eine chemische Extraktion wurde die Biofilm-Suspension mit 1/100 Volumen 36% Formaldehyd versetzt und 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde mit 1 M NaOH ein pH-Wert von 10 eingestellt und weitere 3 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde wie angegeben zentrifugiert. In beiden Fällen wurden die Proteine aus dem Überstand durch Zugabe von 0,6 g/ml Ammoniumsulfat über Nacht bei 4°C gefällt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 7197 g wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 4 ml *Aqua bidest.* aufgenommen. Die Proteinlösung wurde über Amicon® Ultra Filtereinheiten entsalzt und auf ein Volumen von 100 µl konzentriert. Die so aufgereinigten und konzentrierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung (3.2.3) visualisiert.

3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Die Proteine wurden in einem 4,5%-igen Sammelgel gesammelt, dann in einem 10%-igen Trenngel bei 100 V (350 mA) aufgetrennt. Die

Zusammensetzung der Gele ist Tabelle 3.3 zu entnehmen. Um später die Größen der Proteinbanden abschätzen zu können, wurden 2,5 µl des *Roti®-Mark BICOLOR* Markers von Carl Roth mitgeführt. Dieser enthält vorgefärbte Markerproteine in zwei unterschiedlichen Farben. Nachdem die blaue Farbstofffront das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Auftrennung beendet, und die Proteine konnten auf eine Membran transferiert werden (3.2.4). Alternativ wurde das SDS-Gel mit kolloidalem Coomassie (*Roti®-Blue*) von Carl Roth nach Herstellerangaben gefärbt.

Tabelle 3.3. Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Substanz	Trenngel 10%	Sammelgel 4,5 %
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	5 ml	1,5 ml
Trenngelpuffer (pH 8,8)	3,75 ml	-
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	-	2,5 ml
<i>Aqua bidest.</i>	6,15 ml	5,9 ml
10 % APS	100 µl	100 µl
TEMED	20 µl	20 µl

3.2.4 Western Blot

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proteine aus den SDS-Polyacrylamid-Gelen mittels elektrophoretischem *Wet-Blot*-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Der Transfer wurde mit der *Mini Trans-Blot® Eletrophoretic Transfer Cell* von BIO-RAD gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Proteine wurden 1,5 h bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 350 mA transferiert.

3.2.5 Immunodetektion

Nachdem die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert wurden, müssen zunächst unspezifische Proteinbindestellen mit Hilfe einer Milchlösung geblockt werden. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C schüttelnd in dieser Lösung inkubiert. Nach dem Blocken folgte die Bindung eines antigenspezifischen unmarkierten Primärantikörpers. Dazu wurde der Primärantikörper in TBS/6% Milch/0,3% Tween verdünnt (α FLAG 1:1000). Die Membran wurde 1,5 h in dieser Lösung schwenkend inkubiert. Zur Entfernung von überschüssigem Antikörper wurde die Membran dreimal 5 min in TBS-T schwenkend gewaschen. Detektiert wird mit einem speziesspezifischen, markierten Sekundärantikörper, der an den Primärantikörper

Methoden

bindet. Dazu wurde die Membran 1,5 h bei Raumtemperatur in Sekundärantikörper-Lösung (α Maus-Antikörper mit Alkalischer Phosphatase markiert; 1:2500 in TBS/6% Milch/0,3% Tween) geschwenkt. Auch hier wurde zur Entfernung von überschüssigem Antikörper zweimal 5 min und einmal 10 min in TBS-T gewaschen.

Die Visualisierung erfolgte über den NBT/BCIP Reaktionsmechanismus. Diese basiert auf einer, von der Alkalischen Phosphatase katalysierten, Umsetzung von NBT und BCIP zu einem blauen Farbstoff. Es wurden 10 ml einer AP-Substratlösung pro 15 x 15 cm² Membranfläche frisch angesetzt und auf die Membran gegeben. Dann wurde schwenkend inkubiert, bis Banden sichtbar wurden. Die Reaktion konnte dann durch Waschen mit *Aqua bidest.* beendet werden.

3.2.6 Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford (1976)

Zur Quantifizierung der nach der Extraktion in den EPS-Lösungen (3.4.3) bzw. nach c-di-GMP Extraktion in den verbleibenden Zellpellets (3.4.1) enthaltenen Proteine wurde das Bradford Reagenz von Sigma Aldrich nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Bestimmungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte durch Abgleich der erhaltenen Absorptionswerte mit einer zuvor angefertigten Kalibrierfunktion. Für diese wurde BSA als Standardsubstanz in Konzentrationen zwischen 20 μ g/ml und 600 μ g/ml ebenso wie die zu analysierenden Proben behandelt. Die daraus resultierende Kalibriergerade ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Alle zu messenden Proben wurden in zweifacher Ausführung bestimmt.

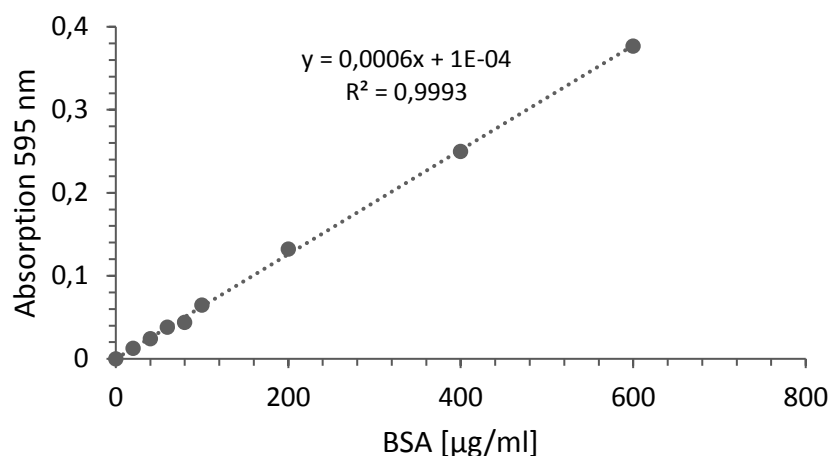


Abbildung 3.2. BSA-Eichgerade zur Proteinquantifizierung nach Bradford (1976)

3.3 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden.

3.3.1 Kultivierung von *N. punctiforme*

Kultiviert wurde *N. punctiforme* in BG11-Medium (Rippka *et al.*, 1979) sowohl auf BG11-Agar-Platten als auch in Suspension bei 25°C, 100 rpm und 50 $\mu\text{mol Photonen/m}^2 \cdot \text{s}$. Zur Langzeitaufbewahrung wurde eine Kultur mit sterilem DMSO (Endkonzentration 5%) versetzt und in 1 ml *Aliquots* bei -80°C gelagert. Um Veränderungen des Stammes zu vermeiden, wurden daraus regelmäßig neue Kulturen angeimpft, indem ein *Aliquot* bei Raumtemperatur aufgetaut und dann in 40 ml BG11-Medium gegeben wurde. Wöchentlich wurden die *N. punctiforme* Filamente einer 20 ml Suspensionskultur mit Hilfe einer Schwingmühle vereinzelt. Dafür wurde die gesamte Zellkultur in einen Mahlbecher aus Plastik mit vier Glas-Mahlkugeln gegeben und 5 min bei 25 Hz geschüttelt. Neue Kulturen wurden dann 1:100 in BG11-Medium angeimpft. Zur Kontaminationskontrolle wurde zusätzlich etwas von der Kultur mit einer Impföse auf R2A-Platten ausgestrichen. Nach 48 h bei 25°C wurden so mögliche Kontaminationen sichtbar. Parallel wurde *N. punctiforme* auf BG11-Agar-Platten kultiviert und regelmäßig neu ausgestrichen. Für Stämme mit Resistenz wurde dem Medium ein Antibiotikum zugegeben. Für die aufgeführten Experimente wurden Kulturen nach 7-14 d Wachstum verwendet. Die Zellzahl wurde über Messung der Chlorophyll *a*-Konzentration (3.3.3) bestimmt. Der in dieser Arbeit hergestellte cph2(5-6)-Stamm wurden ebenso behandelt, jedoch in BG11-Cu-Medium/Kan kultiviert.

3.3.2 Kultivierung von *K. petricola*

K. petricola wurde in MEB-Medium bei 25°C und 100 rpm in Suspension kultiviert. Zur Langzeitaufbewahrung wurden außerdem Kulturen in Schrägagarröhrchen bei 4°C gelagert. Um Veränderungen des Stammes zu vermeiden, wurden regelmäßig (alle 12 Wochen) neue Kulturen angeimpft. Sowohl in Vorbereitung des wöchentlichen Passagierens der Kultur als auch für Experimente wurden 10 ml einer Zellkultur in einen Stahl-Mahlbecher mit 8 Stahl-Mahlkugeln überführt und 10 min bei 30 Hz in einer Schwingmühle geschüttelt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml – Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit BG11-Medium gewaschen (Zentrifugation 10 min; 7197 g). Neue Kulturen wurden dann 1:100 in MEB-Medium angeimpft. Es wurden für die

Methoden

aufgeführten Experimente Kulturen nach 7 d Wachstum verwendet. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde die Zellsuspension 1:100 mit BG11-Medium verdünnt und mit Hilfe der Zählkammer ausgezählt. Biofilme wurden auf Rundfiltern aus Cellulose Acetat auf MEA-Platten für 7 d kultiviert. Diese wurden nach Homogenisierung mit 1 ml Zellsuspension angeimpft.

3.3.3 Chlorophyll *a* – Extraktion zur Bestimmung der Zellzahl von *N. punctiforme*

Zur Bestimmung der Zellzahl einer *N. punctiforme* Kultur wurde entweder direkt oder nach Vereinzeln (3.3.1) 1 ml Zellsuspension in ein Schraubdeckelgefäß mit 1 g Glasperlenmischung (2.13) gegeben und 5 min bei 16.873 g zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde 1 ml eiskaltes 80% Aceton zugegeben und die Zellen durch Schütteln bei Stufe 5,5 für 3x 20 s im Ribolyser aufgeschlossen. Die Suspension wurde nochmals wie angegeben zentrifugiert und der Überstand in eine für UV-Licht geeignete Küvette überführt. Die Extinktion der Lösung wurde gegen 80% Aceton als Leerwert bei 646 nm, 663 nm und 750 nm bestimmt. Nachdem die Extinktion bei 750 nm von den beiden anderen Werten subtrahiert worden ist, wurde die Chl_a-Konzentration in mg/ml mit folgender Formel nach Porra (2002) berechnet: $c_{\text{Chla}} = [(0,01225 \times E_{663}) - (0,00255 \times E_{646})]$. Die Zellzahl pro ml kann durch Multiplikation dieses Wertes mit 5.714.286 erhalten werden.

3.3.4 Phototaxis

Etwa dreiviertel der filamentösen Cyanobakterien können sich über einen Gleitmechanismus, entweder mittels ihrer vegetativen Filamente oder aber durch speziell differenzierte Filamente – den Hormogonien –, fortbewegen (Campbell *et al.*, 2015). Auch *N. punctiforme* zählt zu diesen Cyanobakterien und muss zur Bewegung motile Hormogonien differenzieren. Zur Induktion der Hormogonien-Differenzierung wurden einwöchige 20 ml Suspensionskulturen in 50 ml Reaktionsgefäße überführt, 10 min bei 7197 g zentrifugiert, zweimal mit BG11₀-Cu-Medium gewaschen und nochmals wie angegeben zentrifugiert. Die Zellen wurden in BG11₀-Medium mit und ohne Kupfersulfat resuspendiert und zunächst 3 d unter standardisierten Bedingungen (3.3.1) kultiviert. Die Differenzierung von Hormogonien kann in einigen Cyanobakterien durch Rotlicht induziert werden (Damerval *et al.*, 1991, Nilsson *et al.*, 2006, Wolf und Schüßler, 2005). Um die Möglichkeit zur Induktion und die damit verbundene Fähigkeit zur Phototaxis in *N. punctiforme* zu testen, wurde eine aus Rosco Farbfolie #027 *medium red* selbst

hergestellte Haube über die Kolben gestülpt (Abb. 3.3A) und für weitere 48 h inkubiert. Diese Farbfolie hat ein Transmissionsmaximum von ca. 80% bei einer Wellenlänge ab 700 nm (Anhang B1) und ermöglicht so die Bildung von Hormogonien. Die Suspensionskultur wurde zur Konzentrierung der Hormogonien für 10 min bei 7197 g zentrifugiert, und der Überstand wurde vollständig abgenommen.

Auf quadratische Petrischalen mit BG11₀/-Cu-Medium oder BG11₀/+Cu-Medium, jeweils mit 0,5% Agar verfestigt, wurden 10 µl der konzentrierten Zellen gegeben. Überschüssiges Medium wurde vorsichtig abgesaugt, sodass die Zellen direkten Kontakt zum Medium hatten. Die Petrischalen wurden, bis auf einen ca. 1,5 cm breiten Bereich der später lichtzugewandten Seite, mit schwarzem Klebeband abgeklebt und in Phototaxis-Boxen gestellt (Abb. 3.3B und C). Für diese Boxen wurde von Pappschachteln (24 x 12,5 x 7 cm) jeweils eine schmale Seite entfernt und durch eine von vier Farbfolien ersetzt. Getestet wurde die Phototaxis in Abhängigkeit von blauem (T_m: 440 nm; 51%), grünem (T_m: 520 nm; 52%) und rotem (T_m: 700 nm; 80%) Licht (Anhang B1-B3). Für eine Kontrolle mit weißem Licht musste die Transmission ebenfalls mit einer Folie (360 – 700 nm ~50%; ab 700 nm ~80%) herabgesetzt werden. Die Boxen wurden im Klimaschrank bei 25°C und 90 µmol Photonen/m² * s für 7 d inkubiert, wobei das Licht von der Seite des Klimaschranks abgegeben wurde und somit direkt von vorne auf die Farbfolien der Boxen treffen konnte (Abb. 3.3D). Die Boxen wurden zudem so positioniert, dass innerhalb der Box hinter der Farbfolie bei allen Farbvarianten eine gleiche Photonenstärke zu verzeichnen war. So wurde gewährleistet, dass alle Platten der gleichen Lichtintensität ausgesetzt waren. Die Beweglichkeit der Hormogonien ist bis ca. 48 h nach deren Differenzierung gegeben. Danach bilden sich wieder Filamente (Christman *et al.*, 2011). Die eigentliche Bewegung zur Lichtquelle war so nach zwei Tagen abgeschlossen. Um jedoch kontrastreichere Fotos zu erhalten, wurden die Platten noch einige Tage länger inkubiert. So konnten an dem Ort, zu welchem die Hormogonien gegliedert sind, neue Filamente wachsen.

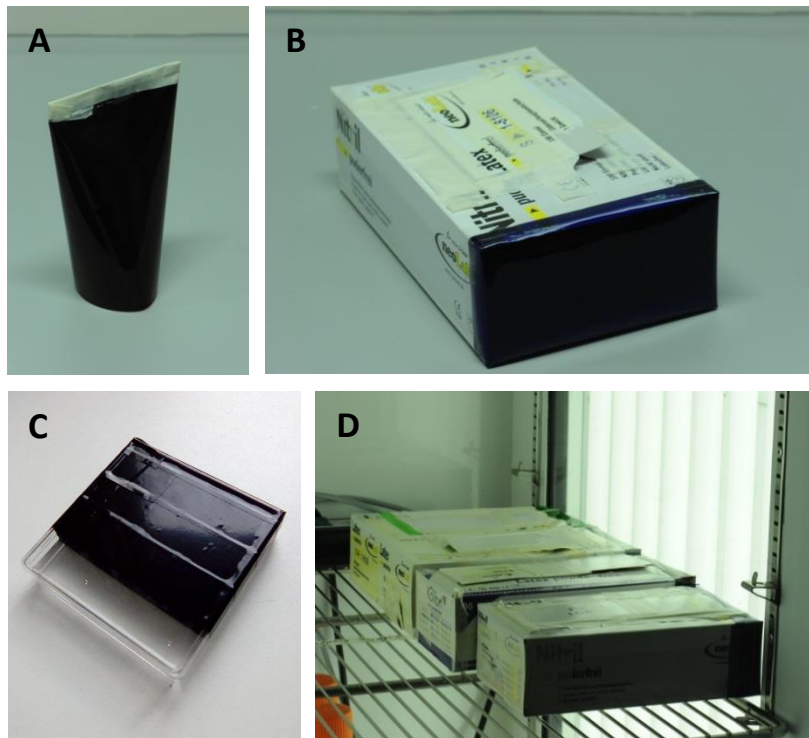


Abbildung 3.3. Phototaxis. **A** Haube aus roter Farbfolie zur Induktion von Hormogonien; **B** Phototaxis-Box mit Farbfolie auf einer Seite; **C** Phototaxis-Platte, mit schwarzem Klebeband abgeklebt; für den gerichteten Lichteinfall bleibt ein 1,5 cm freier Rand auf einer Seite; **D** Boxen im Klimaschrank mit Licht von vorne.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Extraktion von c-di-GMP aus *N. punctiforme*

Die Extraktion des sekundären Botenstoffs c-di-GMP aus *N. punctiforme* wurde nach Spangler *et al.* (2010) mit geringen Modifikationen durchgeführt. Dazu wurden 10 ml einer Zellkultur in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nachdem 2 ml für eine Gesamtproteinextraktion und anschließende SDS-PAGE und Western Blot (3.2.3 – 3.2.5) abgenommen worden waren, wurde die Zellsuspension für 10 min bei 7197 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand zügig entnommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in 300 µl c-di-GMP Extraktionslösung durch Vortexen resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann 10 min bei 95°C erhitzt und anschließend 5 min bei 7197 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zunächst auf Eis zurückbehalten. Die Extraktion wurde noch zweimal mit 200 µl Extraktionslösung wiederholt, wobei der Schritt bei 95°C ausgelassen wurde. Die jeweiligen Überstände wurden vereinigt und zunächst bei -80°C eingefroren. Kurz vor der Analyse der Proben mittels HPLC (3.4.2) wurden diese in der Vakuumzentrifuge bei 30°C

vollständig getrocknet. Das zurückgebliebene Zellpellet wurde unter dem Abzug ebenfalls vollständig getrocknet, dann in 200 µl 0,1 M NaOH resuspendiert und 15 min bei 95°C erhitzt. Nachdem unlösliche Zellbestandteile kurz abzentrifugiert worden sind, wurde der Proteingehalt im Überstand nach Bradford (3.2.6) bestimmt. Der Gehalt an c-di-GMP wurde dann auf die Menge an bakteriellem Protein bezogen.

3.4.2 Identifizierung von c-di-GMP mittels HPLC

Zur Identifizierung von c-di-GMP wurden die getrockneten Proben (3.4.1) in 200 µl *Aqua bidest.* resuspendiert. Die Proben wurden durch Vortexen gemischt, anschließend wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation für 1 min bei 11.000 g pelletiert. Es wurden 100 µl des Überstands in *Autosampler Vials* mit 100 µl Insert gegeben und, wie in Tab. 3.4 und 3.5 angegeben, analysiert. Zur Quantifizierung des c-di-GMP-Gehalts in den Proben wurde bei jeder Messung eine c-di-GMP Eichgerade mit Konzentrationen von 5-50 pmol/µl mitgeführt (Abb. 3.4).

Tabelle 3.4. Geräteparameter HPLC c-di-GMP

HPLC Anlage	Agilent 1100 System mit DAD
Trennsäule	Phenomenex Synergi 4u Hydro RP 80A 150 x 2.0 mm
Injektionsvolumen	20 µl
Detektor	DAD: 253 nm, 2,5 Hz MS: 6130 Quadrupole LC/MS system Ionisation: ESI in positive mode (m/z +691)
Flussrate	0,25 ml/min
Mobile Phase	A: 10 mM Ammoniumacetat mit 3% Methanol B: 10 mM Ammoniumacetat in Methanol
Säulentemperatur	30°C

Tabelle 3.5. Elutionsgradient HPLC c-di-GMP

Zeit (min)	Laufmittel A (%)	Laufmittel B (%)
0	100	0
6	100	0
10	90	10
14	10	90
17	100	0
22	100	0

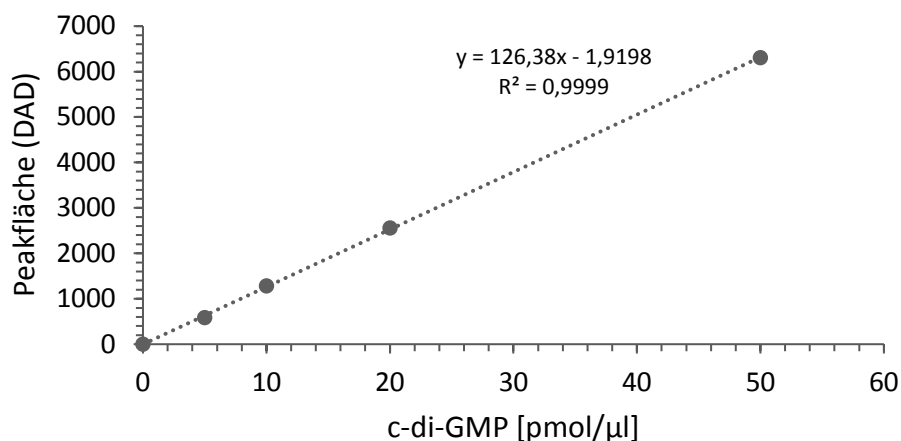


Abbildung 3.4. Eichgerade zur Quantifizierung von c-di-GMP.

3.4.3 Isolierung freier und kapsulärer Exopolysaccharide aus Suspensionskulturen und Biofilmen

Zur Isolierung freier EPS (RPS – *released polysaccharides*) wurde die Suspensionskultur ggf. auf mehrere 50 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei 7197 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand, welcher die freien Exopolysaccharide enthält, wurde zunächst mittels Filtration sterilisiert (0,2 μm), dann zum Entfernen von Salzen, Proteinen und niedermolekularen Kohlenhydraten in einen Dialyseschlauch (3500 Da MWCO) überführt und drei Tage gegen *Aqua bidest.* dialysiert. Letzteres wurde dabei täglich ausgetauscht. Nach der Dialyse wurden die Exopolysaccharide durch vollständiges Trocknen im Heizblock bei 45°C konzentriert. Die Quantifizierung der EPS erfolgte über die Bestimmung der Trockenmasse des EPS-Pellets in Relation zur Trockenmasse der zurückgebliebenen Zellpellets (Leergewicht der Reaktionsgefäße wurde vor der Extraktion bestimmt). Dabei war zu beachten, dass das EPS-Pellet bei maximal 45°C zu trocknen war, da bei höherer Temperatur die Struktur der Exopolysaccharide zerstört werden würde und keine weitere Strukturanalyse durchgeführt werden könnte. Erst nach der Trockenmasse-Bestimmung wurde das EPS-Pellet in *Aqua bidest.* resuspendiert.

Um kapsuläre Exopolysaccharide (CPS – *capsular polysaccharides*) aus Biofilmen zu extrahieren, wurde der Biofilm mit einer Lanzettnadel abgekratzt und in ein 15 ml oder 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Nachdem, je nach Zellmenge (Zellen sollten vollständig mit Medium bedeckt sein), BG11-Medium zugegeben worden ist, wurden die Exopolysaccharide mit Formaldehyd/NaOH abgelöst. Nach Zugabe von 1/100 Volumen Formaldehyd wurde zunächst 1 h bei 4°C inkubiert, dann wurden 0,4 Volumen 1 M NaOH

zugegeben. Daraufhin wurde die Zellsuspension weitere 3 h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert, anschließend wurde 10 min bei 7197 g zentrifugiert. Der Überstand wurde zum Ausfällen der Exopolysaccharide mit eiskaltem absolutem Ethanol bis zu einer Endkonzentration von 70% versetzt, durch Vortexen gemischt und 24 h bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 20 min bei 7197 g und 4°C wurde das Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und dann in *Aqua bidest.* aufgenommen.

Das, nach der Extraktion verbliebene Zellpellet wurde nochmals vorsichtig in BG11-Medium resuspendiert. Eine kleine Menge dieser Suspension wurde mikroskopisch untersucht, um ausschließen zu können, dass die Zellen während der Extraktion zerstört wurden und somit keine Kontamination mit intrazellulärem Material stattgefunden hat. Die Quantifizierung der CPS erfolgte analog zu der der RPS.

3.4.4 Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehalts

Der Gesamtkohlenhydratgehalt wurde photometrisch nach Dubois *et al.* (1956) bestimmt. Diese Methode beruht auf der Umsetzung der Kohlenhydrate mittels Schwefelsäure zu Furanderivaten und anschließender Reaktion mit Phenol zu gefärbten Komplexen, welche photometrisch detektiert werden können.

Zur Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehalts wurden 150 µl der EPS-Lösung (3.4.3) mit derselben Menge 5% [v/v] Phenollösung versetzt und durch Vortexen gemischt. Sofort wurden 750 µl konzentrierte Schwefelsäure zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach nochmaligem Vortexen und weiteren 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung in UV-geeignete Küvetten überführt und die Absorption bei 490 nm im Photometer gemessen. Die Quantifizierung erfolgte durch Abgleich der erhaltenen Absorptionswerte mit einer zuvor angefertigten Kalibrierfunktion. Für diese wurde Glucose als Standardsubstanz in Konzentrationen zwischen 10 µg/ml und 150 µg/ml wie oben angegeben vorbehandelt. Die daraus resultierende Kalibriergerade ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Alle zu messenden Proben wurden in dreifacher Ausführung bestimmt.

Methoden

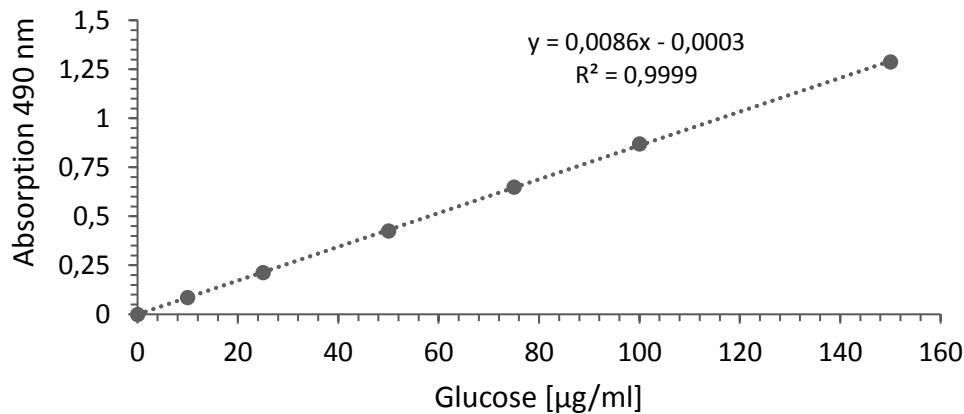


Abbildung 3.5. Glucose-Eichgerade zur Quantifizierung von Kohlenhydraten nach Dubois *et al.* (1956).

3.4.5 FTIR

Für die FTIR Spektroskopie wurden 10 µl der EPS-Lösung auf ein ZnSe-Kristall-Plättchen gegeben und bei 45°C für 30 min getrocknet. Die Infrarotspektren wurden mit einem FTIR Spektrometer und gekoppeltem Mikroskop im Absorptionsmodus in einem Frequenzbereich von 4000-800 cm⁻¹ und einer Auflösung von 4 cm⁻¹ aufgenommen. Der Mittelwert aus fünf aufgenommenen Spektren wurde gebildet, dieses Spektrum wurde mittels Grundlinienkorrektur modifiziert, und die CO₂-Bande wurde entfernt.

3.4.6 Bestimmung neutraler Monosaccharide mittels GC-MS

Teil der Strukturanalyse von Polysacchariden ist die Bestimmung der Monosaccharid-Einheiten. Zunächst müssen diese durch Aufspalten der glykosidischen Bindungen zwischen den Einheiten freigesetzt werden. Die am häufigsten verwendeten Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von Monosacchariden sind die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) sowie die Gaschromatographie (GC). Während die Polysaccharid-Lösung bei der HPLC direkt oder mit nur wenigen Aufreinigungsschritten analysiert werden kann, bedarf die Analyse mit GC einer aufwendigeren Prozedur. Um eine Substanz mit GC untersuchen zu können, muss diese flüchtig sein. Monosaccharide sind jedoch nicht flüchtig und müssen erst in solche Substanzen umgewandelt werden. Zahlreiche analysierbare Derivate sind beschrieben worden (Ruiz-Matute *et al.*, 2011). Eine häufig angewandte Methode ist die Derivatisierung zu Alditolacetaten (AA). Dabei werden die neutralen Monosaccharide durch Reduktion zu Alditolen umgesetzt, dann acetyliert (Cui, 2005).

3.4.6.1 Hydrolyse

In dieser Arbeit wurde zum Spalten der glykosidischen Bindungen die von Albersheim beschriebene saure Hydrolyse mit 2 M TFA verwendet (Albersheim, 1979). Da nicht alle Bindungen mit derselben Geschwindigkeit gespalten werden, ist es notwendig, zunächst eine Hydrolyse-Zeit zu ermitteln, bei der möglichst wenige bereits freigesetzte Monosaccharide zersetzt, aber trotzdem eine ausreichende Hydrolyse-Rate der vorhandenen Bindungen erzielt wird (Cui, 2005). Vor der eigentlichen Analyse der Exopolysaccharide wurden daher verschiedene Hydrolyse-Zeiten getestet. Als Optimum zwischen Zersetzung und Freisetzung erwies sich eine Hydrolyse-Dauer von 3 h.

Für die Hydrolyse der Polysaccharide wurden in einem Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel 50 µg Exopolysaccharide und 5 µg des internen Standards *myo*-Inositol bei 45°C über Nacht getrocknet, dann in 200 µl 2 M TFA resuspendiert und 3 h bei 100°C hydrolysiert. Die resultierende Monosaccharid-Lösung wurde auf Eis abgekühlt, kurz zentrifugiert, um mögliches Kondensat aus dem Deckel zu entfernen, und dann bei 45°C in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Um TFA-Reste, welche die folgenden Reaktionen stören würden, zu entfernen, wurde zweimal mit 50% Isopropanol gewaschen und wie angegeben getrocknet.

3.4.6.2 Reduktion und Acetylierung

Zur Reduktion und Acetylierung wurde die Methode nach Albersheim (1979) modifiziert. Nach der Hydrolyse wurden die Monosaccharide in 100 µl Reduktionslösung (NaBD₄ in 1 M Ammoniumhydroxid; 10 mg/ml) gelöst und 18 h bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Neutralisierung erfolgte daraufhin mit einigen Tropfen 30% Essigsäure. Die Lösung wurde bei 45°C vollständig in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Um NaBD₄-Reste zu entfernen folgten dreimaliges Waschen mit 100% Methanol, dreimaliges Waschen mit 10% Essigsäure in Methanol und abschließend drei Waschungen mit 100% Methanol. Zwischen jedem Waschschrift wurde wie angegeben getrocknet. Zur Acetylierung wurden die Alditole in Acetylierungslösung (50% Essigsäureanhydrid; 50% Pyridin) gelöst, 1 h bei 100 °C inkubiert und währenddessen regelmäßig durch Vortexen gemischt. Die Acetylierungslösung wurde im Folgenden bei Raumtemperatur in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Um mögliches *peak tailing* in den Chromatogrammen durch Pyridin-Reste zu vermeiden, wurden die Alditolacetate nochmals mit 100% Toluol gewaschen, wie angegeben getrocknet und zunächst in 500 µl 100% Aceton

Methoden

aufgenommen. Um eine vollständige Resuspension zu gewährleisten, wurde die Lösung für 5 min bei 30°C mit Ultraschall behandelt, dann durch Vortexen nochmals gemischt und für 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Vor der Messung wurde der Überstand nochmals mit 100% Aceton 1:5 – 1:10 verdünnt.

3.4.6.3 Gaschromatographische Trennung

Die gaschromatographische Trennung der Alditolacetate erfolgte mittels einer HP-5ms Kapillarsäule. Zur Detektion wurde ein Massenspektrometer (MS) verwendet. Das Temperaturprogramm und weitere Geräteparameter sind Tabelle 3.6 und Tabelle 3.7 zu entnehmen. Zur Quantifizierung wurde bei jeder Derivatisierung ein Standard-Mix aus den Monosacchariden Rhamnose, Fucose, Ribose, Arabinose, Xylose, Mannose, Glucose, Galaktose und *myo*-Inositol mitgeführt. Über die Peakflächen des entsprechenden Monosaccharids und des internen Standards im Mix wurde für jedes Monosaccharid ein für den jeweiligen Messdurchgang geltender *response factor* ermittelt. Dieser wurde dann zur Quantifizierung des Monosaccharids in der Probe herangezogen (Abb. 3.6). Die Identifizierung der Alditolacetate erfolgte über deren Massenspektren und Retentionszeiten, bezogen auf den internen Standard *myo*-Inositol, sowie auf die jeweilige Standardsubstanz im mitgeführten Standard-Mix.

$$F = \frac{A_p \cdot C_s}{C_p \cdot A_s} \quad C_p = \frac{A_p \cdot C_s}{F \cdot A_s}$$

Abbildung 3.6. Formel zur Berechnung der Konzentration von Monosacchariden aus GC-MS Chromatogrammen. *F* *response factor*; A_p Peakfläche (*Area*) des Monosaccharids; C_p Konzentration des Monosaccharids; A_s Peakfläche (*Area*) des internen Standards; C_s Konzentration des internen Standards.

Tabelle 3.6. Geräteparameter GC-MS

Gaschromatograph: 6890N Network GC	
Säule:	HP-5ms Kapillarsäule [(5%-Phenyl)-methylpolysiloxan]; Länge 30 m; ID 0,25 mm; Filmdicke 0,25 µm (Agilent)
Injektor:	<i>pulsed splitless</i> , 220°C
Injektionsvolumen:	1 µl
Detektor:	5973 Network Quadrupol-Massenspektrometer, 230°C Ionisation: EI (<i>electron ionization</i>) Scanbereich: <i>m/z</i> 40 – <i>m/z</i> 500
Trägergas:	Helium

Tabelle 3.7. Temperaturprogramm zur Auftrennung von Alditolacetaten

Bedingung	Aufheizrate (°C/min)	Endtemperatur (°C)	Haltezeit (min)
Beginn		100	2
Level 1	10	180	2
Level 2	1	190	4
Level 3	10	240	5
Level 4	20	280	5

3.4.7 Bestimmung der Bindungstypen der Monosaccharid-Einheiten

Zur Bestimmung der Bindungstypen der Monosaccharid-Einheiten innerhalb von Polysacchariden wird häufig die Methylierungsanalyse verwendet (Cui, 2005, Sasaki und Souza, 2013). Mit diesem Verfahren werden die Polysaccharide zu flüchtigen permethylierten Alditolacetaten (PMAA) derivatisiert und können dann mittels GC-MS aufgetrennt und identifiziert werden. Im Gegensatz zur Derivatisierung zu Alditolacetaten (3.4.6) werden alle freien Hydroxylgruppen der zu analysierenden Polysaccharide zunächst methyliert. Erst dann folgen die säurehydrolytische Spaltung der glykosidischen Bindungen und die Freisetzung der partiell methylierten Monosaccharid-Einheiten. Die freien Hydroxylgruppen anstelle der glykosidischen Bindungen werden analog zur AA-Derivatisierung (3.4.6) acetyliert (Cui, 2005).

Methoden

3.4.7.1 Methylierung

In der Literatur wurden bisher verschiedene neutrale und alkalische Methylierungsverfahren beschrieben (Ciucanu, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde zur Methylierung freier Hydroxylgruppen ein alkalisches Verfahren, basierend auf der Methode von Ciucanu und Caprita (2007), mit geringen Modifikationen verwendet. Diese Methode beinhaltet das Lösen des Polysaccharids in einer geringen Menge Wasser, bevor das eigentliche organische Lösungsmittel zugefügt wird. Dies ermöglicht auch die Methylierung von Polysacchariden, welche sich eher schlecht in organischen Lösungsmitteln lösen lassen. Von dem zu untersuchenden Polysaccharid wurden 2 mg in einem 15 ml Reaktionsgefäß getrocknet und zunächst in 20 µl *Aqua bidest.* resuspendiert, dann wurden 900 µl DMSO zugegeben. Um das Polysaccharid vollständig zu lösen, wurde die Probe für 45 min mit Ultraschall bei Raumtemperatur (RT) behandelt. Parallel wurden NaOH-Pellets in einem zuvor auf 100°C erhitzten Mörser mit Pistill pulverisiert. Das NaOH-Pulver wurde bis zur Verwendung in einer Vakuumzentrifuge mit Dessicatorfunktion bei 60°C aufbewahrt. Zu der Polysaccharid-Lösung wurden 30 mg NaOH-Pulver und zusätzlich ca. 60 mg NaOH-Pellets gegeben, weitere 45 min (RT) mit Ultraschall behandelt, dann 45 min (RT) auf dem Vortex gemischt. Nach Zugabe von 350 µl Iodmethan wurde die Lösung nochmals 30 min (RT) mit Ultraschall behandelt. Um die möglichst vollständige Methylierung aller freien Hydroxylgruppen zu gewährleisten, wurden weitere 100 µl Iodmethan zugegeben und nochmals 45 min durch Vortexen gemischt. Zur Extraktion des permethylierten Polysaccharids wurde auf Eis 1 ml *Aqua bidest.* und 1 ml Chloroform zugegeben und durch Vortexen gemischt. Nach Zentrifugation für 2 min bei 2000 g (RT) wurde die wässrige Phase entfernt. Zum Waschen der organischen Phase wurden 5 ml *Aqua bidest.* zugegeben, durch Vortexen gemischt und wie angegeben zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt. Die organische Phase wurde in ein Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel überführt, und die permethylierten Polysaccharide wurden unter dem Abzug oder in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

3.4.7.2 Hydrolyse

Wie bereits für die Bestimmung neutraler Monosaccharide mittels GC-MS (3.4.6.1) beschrieben, werden nicht alle glykosidischen Bindungen mit derselben Geschwindigkeit gespalten, sodass eine möglichst optimale Hydrolyse-Zeit ermittelt werden sollte. Im Rahmen der Methylierungsanalyse muss außerdem eine durch die Hydrolyse verursachte Demethylierung vermieden werden. Für die Hydrolyse innerhalb der Methylierungsanalyse wurde ebenfalls die von Albersheim beschriebene saure Hydrolyse mit 2 M TFA verwendet (Albersheim, 1979). Um das Risiko der Demethylierung zu reduzieren wurde jedoch eine Hydrolyse-Zeit von 2 h gewählt.

Für die Hydrolyse wurden die permethylierten Polysaccharide (3.4.7.1) in 200 µl 2 M TFA resuspendiert und 2 h bei 100°C hydrolysiert. Die resultierenden permethylierten Monosaccharide wurden auf Eis abgekühlt, kurz zentrifugiert um mögliches Kondensat aus dem Deckel zu entfernen, und dann bei 45°C in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Um TFA-Reste zu entfernen, wurde zweimal mit 50% Isopropanol gewaschen und wie angegeben getrocknet.

3.4.7.3 Reduktion und Acetylierung

Reduktion und Acetylierung wurden wie für die Bestimmung neutraler Monosaccharide (3.4.6.2) beschrieben, mit geringen Veränderungen durchgeführt. Alle Trocknungsschritte in der Vakuumzentrifuge wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, da bereits die nach der Reduktion entstandenen permethylierten Alditole sehr flüchtige Substanzen sind, und bei höheren Temperaturen verloren gehen würden.

3.4.7.4 Gaschromatographische Trennung und Identifizierung permethylierter

Alditolacetate

Die gaschromatographische Trennung der permethylierten Alditolacetate erfolgte mittels einer HP-5ms Kapillarsäule. Zur Detektion wurde ein Massenspektrometer (MS) verwendet. Die Geräteparameter, analog zur Bestimmung der Monosaccharide, sind Tabelle 3.6, das Temperaturprogramm ist Tabelle 3.8 zu entnehmen. Die Identifizierung der PMAAs erfolgte über deren Massenspektren sowie Retentionszeiten im Vergleich zu synthetisierten PMAA Standards (3.4.8). Der Anteil des Bindungstyps im Polysaccharid wurde anhand der integrierten Fläche des entsprechenden Peaks im Verhältnis zu der Gesamtfläche aller Peaks ermittelt.

Tabelle 3.8. Temperaturprogramm zur Auftrennung von permethylierten Alditolacetaten

Bedingung	Aufheizrate (°C/min)	Endtemperatur (°C)	Haltezeit (min)
Beginn		80	0
Level 1	5	120	1
Level 2	3	230	1
Level 3	20	280	5

3.4.8 Synthese von Standards zur Identifizierung von permethylierten Alditolacetaten

Monosaccharide mit gleichem Substitutionsmuster aber unterschiedlicher Stereochemie (z. B. Mannose, Glucose, Galaktose) führen zu gleichen Massenspektren, aber unterschiedlichen Retentionszeiten während der Analyse mittels GC-MS. Im Rahmen der Methylierungsanalyse (3.4.7) ist über die Massenspektren demnach eine Identifizierung des Bindungstyps [z. B. 1→4 – oder 1→6 – verknüpfte Hexopyranose (oder –furanose)], jedoch nicht des entsprechenden Monosaccharids möglich. Für eine vollständige Identifizierung muss somit auch die Retentionszeit hinzugezogen werden. Da diese von der verwendeten Säule abhängig und daher ein Vergleich mit Literaturdaten nur bedingt möglich ist, empfiehlt sich die Synthese von Standard-PMAAs zur individuellen Erfassung der Retentionszeiten und Massenspektren. Eine Übersicht der für die Arbeit relevanten Massenspektren findet sich in Anhang C.

PMAA Standards wurden in Anlehnung an Sasaki *et al.* (2005) mit Modifikationen von Wang *et al.* (2007) synthetisiert. Von jedem Monosaccharid wurden separat 60 mg in je ein Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel gegeben, in 1 ml 2% MeOH-HCl gelöst und 16 h bei 70°C inkubiert. Die Lösung wurde durch Zugabe von NaHCO₃ neutralisiert, durch einen Faltenfilter filtriert und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Methylglykoside wurden in 2 ml DMF resuspendiert, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 200 mg BaO, 10 mg Ba(OH)₂ · 8 H₂O und 1 ml Iodmethan versetzt. Im Folgenden wurden die Lösungen, zur Verdunkelung abgedeckt mit Aluminiumfolie, durch Vortexen gemischt. In Intervallen von 60 min wurden *Aliquots* von 300 µl abgenommen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und, wie in 3.4.7.2 bis 3.4.7.4 beschrieben, derivatisiert und analysiert. Die Mannose - und Glucose-*Aliquots* nach 3 h sowie das Galaktose-*Aliquot* nach 4 h enthielten alle Methylierungsmuster, welche für die Analyse der Bindungstypen in den EPS-Proben benötigt wurden. Für die Zuordnung des Bindungstyps wurden die

Massenspektren mit solchen aus der Literatur verglichen. Es wurden Massenspektren von Sasaki und Souza (2013) sowie von der frei zugänglichen Datenbank des *Complex Carbohydrate Research Centers* der Universität Georgia, USA (Carbohydrate Research Center, 2016) verwendet. Nachdem jedem Bindungstyp die Retentionszeit zugeordnet worden war, konnten diese Informationen zur vollständigen Identifizierung der Bindungstypen in den EPS-Proben verwendet werden.

3.5 Mikroskopie

3.5.1 ESEM mit Kritisch-Punkt-Trocknung

K. petricola Biofilme wurden sieben Tage auf Cellulose Acetat-Filtern kultiviert. Für die Fixierung wurden kleine Stücke (ca. 5 x 5 mm) der Filter ausgeschnitten, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit Fixierlösung (4% Glutaraldehyd in Phosphatpuffer) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Proben mit drei Wiederholungen für 10 min in Phosphatpuffer gewaschen und anschließend über eine Ethanolreihe dehydriert. Im Rahmen der Ethanolreihe wurden die Proben wie folgt behandelt: 30 min in 30% Ethanol, 30 min in 50% Ethanol, über Nacht in 70% Ethanol, 30 min in 80% Ethanol, 1 h in 90% Ethanol, 30 min in 100% Ethanol und zum Abschluss noch einmal 30 min in 100% Ethanol. Anschließend erfolgte die Kritisch-Punkt-Trocknung, gefolgt von einer Gold-Bedampfung, bevor die Proben mittels ESEM (*environmental scanning electron microscopy*) mit einem XL30 ESEM System untersucht werden konnten.

3.5.2 Kryo-ESEM

Die Rasterelektronenmikroskopie intakter Biofilme, gekoppelt mit vorheriger Aufarbeitung durch Kryo-Technologie (*Cryo environmental scanning electron microscopy – Cryo ESEM*) wurde mit einem XL30 ESEM System und einem Alto 1000 Cryo-Transfer System durchgeführt. Dazu wurden *K. petricola* Biofilme sieben Tage auf Cellulose Acetat-Filtern auf MEA-Platten inkubiert. *N. punctiforme* Biofilme wurden aufgrund des langsameren Wachstums fünf Wochen auf BG11-Agar-Platten kultiviert. Zur Analyse wurde ein Stück des Filters (ca. 5 x 5 mm) ausgeschnitten und ohne zusätzliche Aufarbeitung dem Kryo-System zugeführt.

3.5.3 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Hellfeld- und Epifluoreszenzmikroskopie wurden mit einem Axio Imager.M2m Mikroskop mit 40x Objektiv und einem HXP 120 V Fluoreszenz-Illuminierungssystem durchgeführt. Mit einer AxioCam ICc5 Kamera wurden Bilder im Einzelmodus oder als Z-Stapel aufgenommen. Letztere wurden nachträglich mit der Software Picolay (Cypionka, 2017) zusammengeführt.

3.5.4 Lektin-Bindung und Konvokalmikroskopie

Die Lektin-Bindungsanalysen wurden am UFZ Magdeburg in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Neu und Ute Kuhlicke, wie von Neu und Kuhlicke (2017) beschrieben, durchgeführt. Für das Screening wurden kleine Stücke (ca. 5 x 5 mm) von *K. petricola* Biofilmen nach 7 d Inkubation auf Cellophan-Folien auf MEA ausgeschnitten und auf einem Objektträger platziert. Auf jeden Biofilm wurden einige Tropfen der Lektin-Lösungen gegeben und 20 min im Dunkeln inkubiert. Durch Waschen mit Wasser und anschließendes Absaugen desselben wurden ungebundene Lektine entfernt. Die Biofilme wurden mit einem Deckglas abgedeckt, und die Bindung der Lektine wurde mittels konvokaler Laser-Scanning-Mikroskopie, wie in Neu und Kuhlicke (2017) aufgeführt, überprüft.

3.6 Statistische Auswertung

Wenn nicht anders angegeben, wurde jeder Versuch dreimal wiederholt (biologische Replikate; n=3). Bei jeder Wiederholung wurden zudem zwei technische Replikate analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit *One-Way* ANOVA und anschließendem Tukey-HSD-Test mit einem Konfidenzintervall von 95%.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Einfluss von c-di-GMP auf die Zelldifferenzierung und Biofilmbildung von *Nostoc punctiforme*

Der sekundäre Botenstoff c-di-GMP steuert eine Vielzahl von Prozessen gramnegativer Bakterien. Der Wechsel zwischen motilem und sessilem Lebensstil wird ebenso beeinflusst wie die Produktion extrazellulärer Substanzen und damit einhergehend auch die Biofilmbildung. Zu den wenigen Proteinen in Cyanobakterien mit einer nachgewiesenen Aktivität der Diguanylatcyclase (DGC) zur Synthese von c-di-GMP gehört das cph2-Phytochrom von *Synechocystis* sp. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der C-terminale Abschnitt des Phytochroms erfolgreich in *N. punctiforme* transformiert und stabil in das Genom integriert. *N. punctiforme* ist fähig, neben den vegetativen Zellen drei weitere Zelltypen zu differenzieren. Der Lebenszyklus und die damit verbundene Zelldifferenzierung wurden in Abhängigkeit des sekundären Botenstoffs c-di-GMP betrachtet. Mit Hilfe des DGC-überproduzierenden *N. punctiforme* Stammes [*N. p.* cph2(5-6)] wurde im Vergleich zum Wildtyp sowohl der Einfluss auf die EPS-Produktionsraten, -struktur und die Art der Biofilmbildung, als auch auf die Differenzierung der einzelnen Zelltypen untersucht. Die Biofilmbildung wurde mittels REM, die Zelldifferenzierung mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Zudem konnten erstmals die Monosaccharid-Zusammensetzung und die Bindungstypen im Exopolysaccharid des *N. punctiforme* Wildtyps (und im Vergleich dazu auch des Überproduktionsstammes) beschrieben werden.

4.1.1 Herstellung eines c-di-GMP überexprimierenden *N. punctiforme* Stammes

Um die Auswirkungen des Signalmoleküls c-di-GMP auf die Biofilmbildung und Zelldifferenzierung von *N. punctiforme* untersuchen zu können, sollte sowohl ein Stamm, in dem das Molekül in hohem Maße produziert wird, als auch einer, in dem keinerlei c-di-GMP vorhanden ist, generiert werden. Zu Beginn der Arbeit lagen bereits zwei für ein breites Wirtsspektrum ausgelegte Plasmide vor. Diese wurden freundlicherweise von Prof. Annegret Wilde (Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt. Die Plasmide pUR-cph2(1-4) (Anhang A1) und pUR-cph2(5-6) (Anhang A2) kodieren für jeweils ein Fragment des cph2-Phytochroms aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Savakis *et al.*, 2012). Das Plasmid pUR-cph2(1-4) enthält die N-terminalen Domänen 1-4 zum Abbau von c-di-GMP, das Plasmid pUR-cph2(5-6) die c-terminalen Domänen 5 und 6 zur Synthese

Ergebnisse und Diskussion

des Signalmoleküls. In beiden Plasmiden steht die Expression der Enzyme unter der Kontrolle eines *petJ* Promotors aus *Synechocystis* sp., zudem sind die Fragmente durch ein Flag-Motiv markiert. Beide Plasmide sollten mittels Triparentaler Konjugation in *N. punctiforme* ATCC 29133 transformiert werden. Über die Konjugation mit dem Plasmid pUR-chp2(5-6) konnte ein transgener *N. punctiforme* Stamm mit den *cph2*-Domänen 5-6 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 hergestellt werden [im Folgenden *N. p. cph2*(5-6)]. Dieser Stamm trägt die GAF3 und die daran gekoppelte GGDEF2 Domäne, markiert durch ein Flag-Tag und gesteuert durch den *petJ* Promotor (Abb. 4.1).

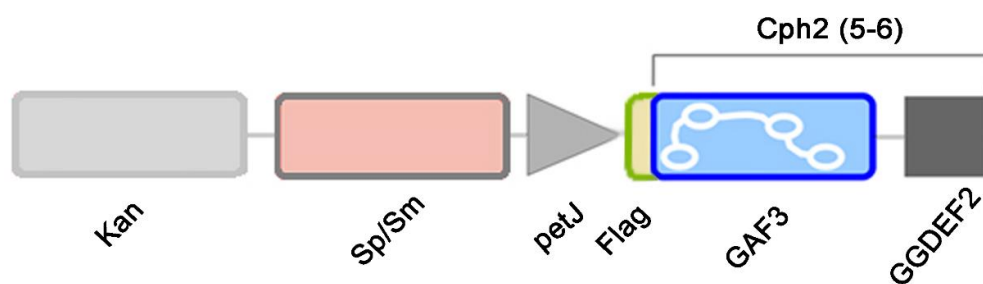


Abbildung 4.1. In *N. punctiforme* transferierter C-terminaler Teil des Cph2-Phytochroms aus *Synechocystis* sp. PCC 6803. Transformierte Domänen 5 (GAF3) und 6 (GGDEF2), markiert mit Flag-Motiv unter Kontrolle des kupferregulierten *petJ* Promotors, Kanamycin-Resistenzgen (Kan) und Spectinomycin-Resistenzgen (Sp/Sm).

Das konjugierte Plasmid vermittelt eine Kanamycin-Resistenz, welche die Selektion der Konjuganten ermöglicht. Einen ersten Hinweis auf eine erfolgreich verlaufene Konjugation gab demnach die Resistenz der Kolonie gegenüber Kanamycin. Zusätzlich wurde die genomische DNA des Stammes, und im Vergleich dazu, die des Wildtyps extrahiert. Mit spezifischen Primern für das Transgen wurde dessen Präsenz überprüft (Abb. 4.2). Die Primer *petJ_F* und *cph2_R* binden im Bereich des *petJ* Promotors bzw. des *cph2*-Gens und wurden, wie erwartet, nur im transgenen Stamm und der Positivkontrolle pUR-cph2(5-6) mit einer Bande bei 1095 bp nachgewiesen. Im Wildtyp war keine Bande sichtbar. Das Plasmid wurde ursprünglich so konstruiert, dass der etwa 4200 bp große und das Kanamycin-Resistenzgen sowie *cph2*-Gen und Promotor umfassende Abschnitt über homologe Rekombination in *Synechocystis* sp. PCC6803 spezifisch zwischen die Gene *parA* (slr1597) und *hspA* (sll1514) integriert wird (Savakis *et al.*, 2012). Diese ortsspezifische Integration ist in *N. punctiforme* nicht möglich. Somit ist es am wahrscheinlichsten, dass das Plasmid an einer Position geöffnet und dann zufällig an

einen Ort im Genom integriert wurde, oder ektopisch exprimiert wird. Auch der Bruch an mehreren Stellen und die Integration an unterschiedlichen Positionen und in mehreren Kopien ist möglich. Aufgrund dessen ist eine Lokalisierung schwierig. Um zunächst zu überprüfen, ob auch der *backbone* des Plasmids enthalten ist, wurde zusätzlich eine PCR mit den Primern *backbone* 3 und 4 durchgeführt (Abb. 4.2). Die Bande bei 1065 bp sowohl in der Spur des Plasmids, als auch bei *N. p. cph2(5-6)* zeigt, dass sich neben den zu integrierenden Fragmenten auch weitere Teile des Plasmids in dem generierten Stamm befinden. Entweder wurde das Plasmid zusammenhängend oder mehrere Fragmente einzeln integriert. Durch die zufällige Integration des Plasmids kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass andere Gene zerstört wurden, was den durch die Überproduktion von c-di-GMP hervorgerufenen Phänotyp beeinflussen könnte. Das Plasmid besitzt eine Größe von 10.531 bp. Ein Southern Blot zur Lokalisierung und Überprüfung der Häufigkeit der Integration wurde durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Bei dieser Methode wird das Transgen inklusive angrenzender Genomabschnitte aus dem Genom geschnitten und mittels einer Sonde detektiert, was abhängig von der Bandenzahl, Auskunft über die Häufigkeit der Integration gibt. Gegebenenfalls kann über Sequenzierung der Fragmente auch der Integrationsort bestimmt werden. Da das Plasmid jedoch inklusive angrenzender Genomabschnitte Banden mit Größen über 10,5 kb liefert, konnten diese nicht zuverlässig aufgetrennt werden. Im Falle der Integration von Bruchstücken des Plasmids an mehreren Stellen im Genom, könnten mit einer solchen Sonde auch nicht alle integrierten Fragmente nachgewiesen werden.

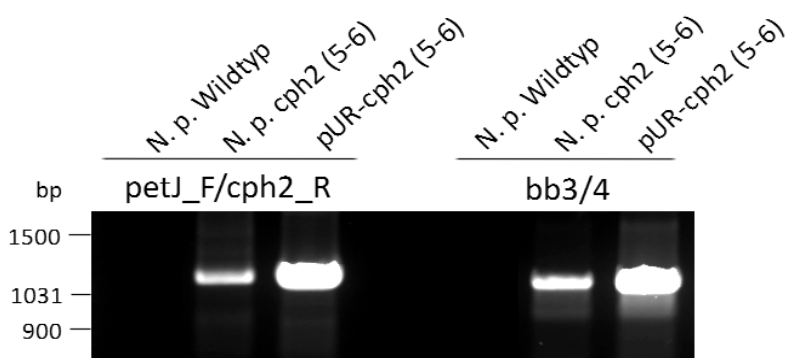


Abbildung 4.2. PCR zur Überprüfung der erfolgreichen Konjugation in *N. punctiforme*.

Die Primer *petJ_F* und *cph2_R* generieren ein 1095 bp Fragment, das den Promotor und die zu transformierenden Domänen umfasst. Nachweisbar war dieses Fragment in der Positivkontrolle

pUR-cph2(5-6) und im transgenen Stamm *N. p. cph2(5-6)*. Eine Bande bei 1065 bp mit den Primern *backbone* 3 und 4, die im Rückgrat des Plasmids binden, zeigen, dass vermutlich das gesamte Plasmid, zusammenhängend oder in mehreren Fragmenten, bei der Konjugation übertragen wurde.

Ergebnisse und Diskussion

Ausschlaggebend für weitere Analysen war, ob die DGC, ausgehend von dem kupferregulierten *petJ* Promotor und der GGDEF2 Domäne, exprimiert wird. Um dies zu überprüfen, wurden sowohl der Wildtyp als auch *N. p. cph2(5-6)* unter Kupfermangel-Bedingungen und mit Kupfer in Form von CuSO_4 inkubiert, dann wurden Gesamtproteinextrakte mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht (Abb. 4.3). Zur Visualisierung wurde ein primärer Antikörper verwendet, welcher an das Flag-Motiv der DGC bindet. Wie erwartet, konnte in den Extrakten des Wildtyps keine DGC nachgewiesen werden. Entgegen den Erwartungen wurde die DGC (ca. 50 kDa) in den Extrakten des *cph2(5-6)*-Stammes unter beiden Bedingungen detektiert. Ein Unterschied in der Bandenstärke konnte nicht festgestellt werden. In *Synechocystis sp. PCC 6803* kann dagegen durch Zugabe von Kupfer eine vollständige Repression des *petJ* Promotors ermöglicht werden (Tous *et al.*, 2001). Die Ergebnisse der Western Blots zeigen, dass die Regulation des Promotors in *N. punctiforme* nicht möglich ist. Sowohl mit, als auch ohne Kupfer im Kulturmedium wurde die DGC kontinuierlich exprimiert.

Während der Arbeit zeigte sich zudem, dass die Expression der DGC während der Kulturzeit immer wieder stoppte. Dieser Umstand trat vor allem dann auf, wenn der Stamm nicht mit Kanamycin im Medium kultiviert wurde. Die Kulturen wurden über einen Zeitraum von zwölf Wochen einmal wöchentlich passagiert. Erst nach diesem Zeitraum wurde aus einem Glycerinstock neu angeimpft. Wiederholt war die sonst kontinuierlich exprimierte DGC in den Proteinextrakten nicht mehr nachzuweisen. PCR Analysen zeigten, dass das Fragment noch im Stamm nachweisbar war, auch die weiterhin vorhandene Kanamycin-Resistenz bestätigte dies, jedoch wurde die DGC ausgehend vom *petJ* Promotor nicht mehr exprimiert. Aufgrund dessen wurden zur Sicherheit bei jedem Experiment parallel zu den gezogenen Proben auch Proteinextrakte der Kulturen angefertigt und mit Western Blot auf Präsenz der DGC überprüft.

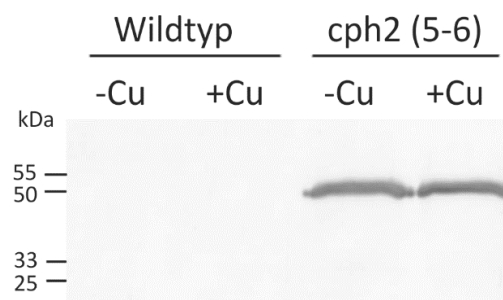


Abbildung 4.3. Western Blot zur Detektion der DGC in *N. punctiforme*. Nachweis der durch den *petJ* Promotor exprimierten DGC über ein Flag-Motiv. Die DGC wurde sowohl bei Anwesenheit (+Cu) als auch bei Abwesenheit von CuSO_4 (-Cu) exprimiert. Das Enzym war nicht nachweisbar in Proteinextrakten des Wildtyps.

Trotz mehrerer Versuche gelang die Konjugation mit dem Plasmid pUR-cph2(1-4), welches die Domäne für den Abbau von c-di-GMP trägt, nicht. Dies kann möglicherweise auf eine Letalität, ausgelöst durch den Verlust von c-di-GMP in den Zellen, zurückzuführen sein, womit die Herstellung eines solchen Stammes unmöglich wäre. Dagegen spricht jedoch, dass in dem filamentösen Cyanobakterium *F. diplosiphon* ein EAL-überproduzierender Stamm mit einem konstitutiv aktiven Promotor generiert werden konnte (Agostoni *et al.*, 2016). Für *Nostoc* sp. ist in diesem Zusammenhang jedoch nichts bekannt. Da der petJ Promotor aber nicht regulierbar und damit permanent aktiv war, wurde möglicherweise auch zelleigenes c-di-GMP sofort nach der Transformation vollständig abgebaut, sodass die *N. punctiforme* Zellen unmittelbar absterben könnten. In diesem Fall könnte unter Verwendung eines regulierbaren Promotors möglicherweise ein entsprechender Stamm hergestellt werden.

4.1.1.1 Quantifizierung von c-di-GMP

Zur Quantifizierung des von *N. p.* cph2(5-6) produzierten c-di-GMPs wurden die Filamente von einwöchigen (7 d) Kulturen dieses Stammes sowie des Wildtyps zerkleinert, in BG11-Medium ohne CuSO₄ gewaschen und auf BG11-Medium mit und ohne CuSO₄ aufgeteilt. Um auch einen Hinweis auf einen möglichen zeitlichen Zusammenhang der Produktion zu erhalten, wurde c-di-GMP nach 24 und 48 Stunden des Wachstums extrahiert und quantifiziert. Um sicherzustellen, dass die DGC auch exprimiert wird, wurden bei jedem Durchgang parallel Gesamtproteinextrakte gewonnen und mittels Western Blot analysiert. Nachweis und Quantifizierung des c-di-GMP erfolgten über HPLC durch Mitführen einer Eichgeraden aus kommerziell erhältlichem c-di-GMP.

Einhergehend mit den Ergebnissen aus dem Western Blot zur Verifizierung des Überproduktionsstammes (Abb. 4.3) wird auch aus den Quantifizierungsergebnissen deutlich, dass unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Kupfer im Kulturmedium, c-di-GMP produziert wurde (Abb. 4.4). Dies entspricht insofern den Erwartungen, als dass die konstitutive Überexpression einer funktionellen DGC auch zu einer Überproduktion von c-di-GMP führen sollte. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Bedingungen festgestellt werden. Jedoch wird deutlich, dass die c-di-GMP-Produktion einer zeitlichen Abhängigkeit unterliegt. Während nach 24 Stunden durchschnittlich 7,54 pmol c-di-GMP pro mg bakteriellem Protein ($7,90 \pm 2,29$ pmol/mg bei -CuSO₄ und $7,18 \pm 1,30$ pmol/mg bei +CuSO₄) in den Zellen gebildet wurde, stieg die c-di-GMP-Menge nach 48 Stunden bereits auf durchschnittlich 19,08 pmol pro mg bakteriellem Protein an

($19,36 \pm 3,35$ pmol/mg bei $-CuSO_4$ und $18,80 \pm 4,76$ pmol/mg bei $+CuSO_4$). Unabhängig von der getesteten Bedingung lag demnach eine signifikante ($p < 0,01$) zeitliche Abhängigkeit der c-di-GMP Produktion vor. Im Wildtyp konnte lediglich nach 48-stündiger Kultur in BG11-Medium $-CuSO_4$ in einer Probe eine geringe Menge von 0,38 pmol c-di-GMP pro mg bakteriellem Protein nachgewiesen werden.

Agostoni *et al.* (2013) konnten im Genom von *N. punctiforme* elf Proteine mit GGDEF Domäne und zehn Proteine sowohl mit GGDEF als auch EAL Domäne identifizieren. Das Vorhandensein von c-di-GMP-assoziierten Domänen und der Nachweis von c-di-GMP in einer der analysierten Wildtyp-Proben deutet darauf hin, dass *N. punctiforme* auch natürlicherweise c-di-GMP produziert, dessen Level jedoch zu gering ist, um eine zuverlässige Detektion mit den angewandten Methoden zu erlauben. In anderen Studien konnte bereits festgestellt werden, dass eine zuverlässige c-di-GMP-Detektion in verschiedenen Bakterienstämmen häufig nur in DGC-überproduzierenden Mutanten erfolgen kann (Spangler *et al.*, 2010). In unveränderten Stämmen ist die c-di-GMP-Produktion vor allem zeitlich abhängig vom Stadium des Wachstums und der Biofilmbildung, und unterliegt dabei häufigen Schwankungen, was die Extraktion und Detektion erschwert (Simm *et al.*, 2004, Spangler *et al.*, 2010).

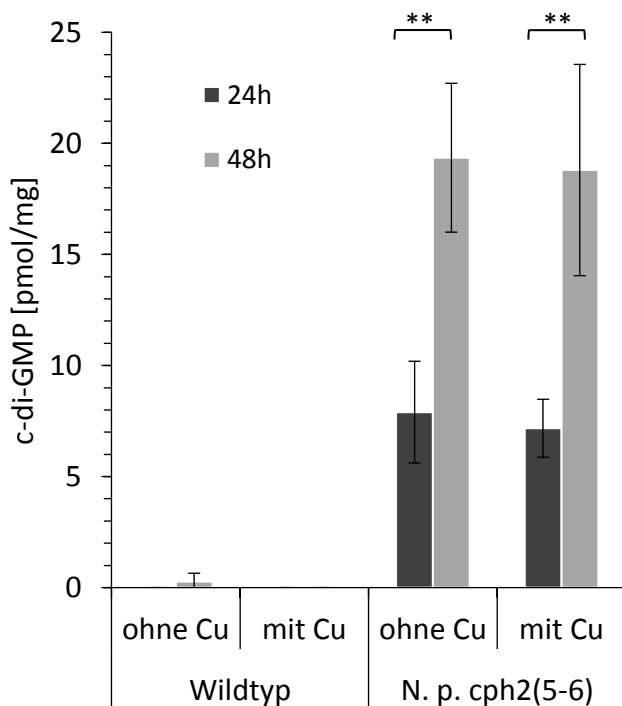


Abbildung 4.4. Nachweis und Quantifizierung von c-di-GMP mittels HPLC/DAD/MS. Einwöchige Kulturen wurden gewaschen und auf Kolben mit BG11-Medium ohne und mit $CuSO_4$ (Cu) aufgeteilt. Nach 24 Stunden und 48 Stunden wurde c-di-GMP nach Spangler *et al.* (2010) extrahiert und über eine Eichgerade quantifiziert. Die Menge an c-di-GMP wurde auf das nach der Extraktion im Zellpellet vorhandene bakterielle Gesamtprotein bezogen, $n=3$, $**p < 0,01$.

4.1.1.2 Einfluss von c-di-GMP auf das *N. punctiforme* Wachstum

Um einen möglichen Einfluss von c-di-GMP auf das Wachstum von *N. punctiforme* zu untersuchen, wurden Filamente einwöchiger (7 d) Kulturen beider Stämme zerkleinert, in 50 ml Medium +CuSO₄, mit und ohne NaNO₃, angeimpft und für insgesamt 21 Tage inkubiert. Die Kulturen wurden mit einer Zelldichte von 0,05 µg/ml Chl_a angeimpft. Alle drei bis vier Tage wurde daraus in Doppelbestimmungen der Chl_a-Gehalt als Maß für die Anzahl der Zellen bestimmt. Die Wachstumskurven zeigten eine Anlauf- (*lag*) und eine exponentielle Phase (*log*) (Abb. 4.5). Jedoch wurde deutlich, dass die Zellen etwa ab Tag elf langsam in eine lineare Phase übergangen. Eine typische stationäre Phase (bedingt durch Nährstoffmangel), wie sie bei vielen Bakterien vorkommt, lässt sich bei Cyanobakterien so nicht finden. Die relativ lange lineare Wachstumsphase ergibt sich bei Cyanobakterien durch die Limitierung des Lichts bei einer dichter werdenden Kultur in den Kolben. Geht man davon aus, dass die Zellen sich bis Tag vier in einer *lag*-Phase befanden und das logarithmische Wachstum von Tag vier bis elf stattfand, ergibt sich für den Wildtyp +N eine Wachstumsrate $\mu=0,48/d^{-1}$ und eine Verdopplungszeit $t=1,43$ d, für den Wildtyp -N war die Wachstumsrate niedriger ($\mu=0,34/d^{-1}$ und $t=2,03$ d). Ein zum Wildtyp -N vergleichbares Verhalten zeigte das Wachstum des *N. p. cph2(5-6)*-Stammes +N. Die Wachstumsrate betrug $0,38/d^{-1}$, die Verdopplungszeit 1,83 d. Im Gegensatz dazu war bei der Überproduktionsmutante -N eine eindeutige *lag*-Phase bis Tag vier zu erkennen. In diesem Zeitraum veränderte sich die Zellzahl nicht. Das logarithmische Wachstum startete an Tag vier und blieb bis Tag 18 bestehen. Die Wachstumsrate betrug demnach $0,40/d^{-1}$ und die Verdopplungszeit 1,75 d, und lag somit über der des Wildtyps bei vergleichbaren Bedingungen. Besonders fällt auf, dass *N. p. cph2(5-6)* -N in den ersten vier Tagen kein Wachstum zeigte, die Zellzahl danach jedoch schneller zunahm, als bei einem Wachstum +N. Schließlich wurde die Kultur +N sogar von der Kultur -N ab ca. Tag elf im Wachstum überholt. Die Ergebnisse zeigen, dass *N. p. cph2(5-6)* im Vergleich zum Wildtyp ein verzögertes Wachstum aufweist, welches unter diazotrophen Bedingungen noch stärker ausgeprägt ist. Ursache für diese Verzögerung kann eine längere Anpassungsdauer an die N-freie Umgebung sein. Darauf deutet auch die unterschiedliche Morphologie der Mutanten unter beiden Bedingungen hin (Abb. 4.6).

Ergebnisse und Diskussion

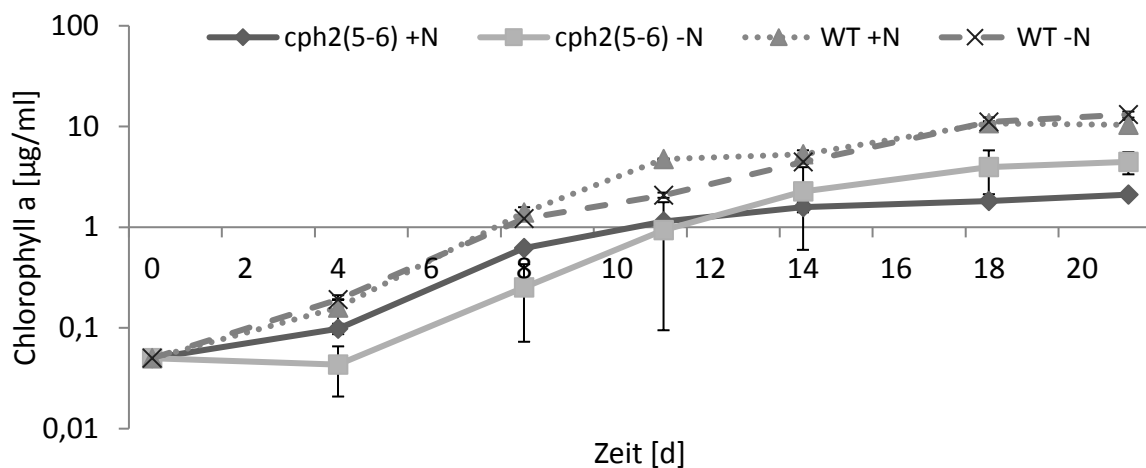


Abbildung 4.5. Wachstumskurve von *N. punctiforme* Wildtyp und *N. p. cph2(5-6)*. Über einen Zeitraum von drei Wochen wurde der Chl_a-Gehalt je ml der Zellkultur von *N. punctiforme* Wildtyp (WT) und *cph2(5-6)* bestimmt. Zellen wurden in BG11-Medium oder BG11₀-Medium +CuSO₄ kultiviert, n=3.

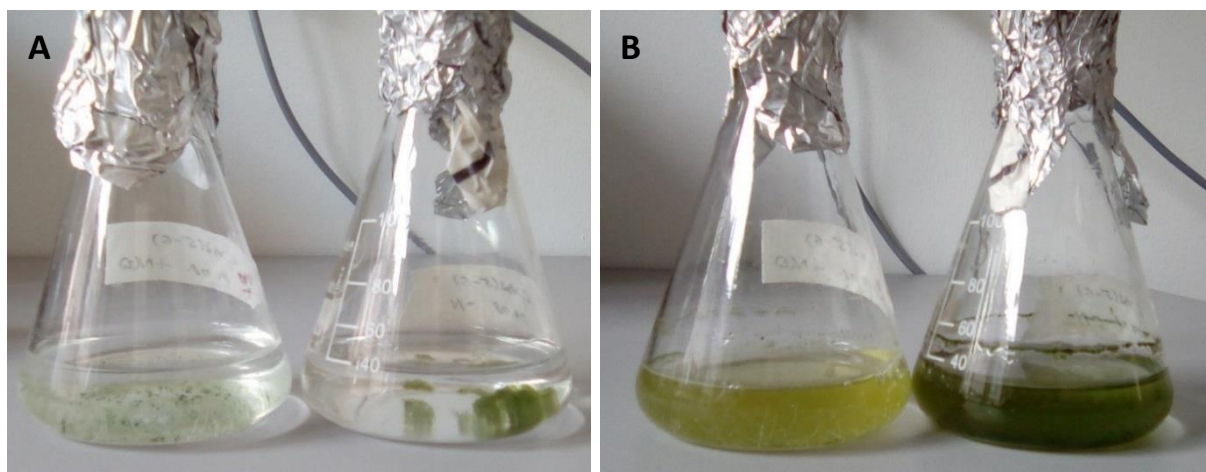


Abbildung 4.6. Morphologie von *N.p. cph2(5-6)* Suspensionskulturen. Nach fünf Tagen (A) und 18 Tagen (B) Inkubation in BG11 +CuSO₄ (links) und BG11₀ +CuSO₄ (rechts).

Diazotrophe Bedingungen führten in den ersten fünf Tagen der Kultivierung zu einem schleimigeren und klumpigen Phänotyp, welcher auf eine erhöhte EPS-Produktion hindeutet (Abb. 4.6A). Diese ermöglicht vermutlich später ein besseres Wachstum, da sie die Zellen vor Sauerstoff von außen schützen kann, und so indirekt die Stickstofffixierung durch die sauerstoffempfindliche Nitrogenase unterstützt (Nicolaisen *et al.*, 2009) (vgl. Abschnitt 4.1.3). *N. p. cph2(5-6)* +N entwickelt diesen zusätzlichen Schutz offenbar nicht in ausreichendem Maße, und kann, wenn der Stickstoff im Medium aufgebraucht ist, möglicherweise nicht genug Stickstoff fixieren. Nach 18 Tagen Kulturdauer war unter diazotrophen Bedingungen ein Biofilm am Kolbenrand zu sehen. Insgesamt hatte die

Kultur eine intensiv grüne Farbe, im Gegensatz zur Kultur +N (Abb. 4.6B). C-di-GMP führt, wie es auch in dieser Arbeit bei *N. punctiforme* gezeigt werden konnte, in einigen Bakterien zur Verlangsamung des Wachstums. Agostoni *et al.* (2016) untersuchten den Einfluss von c-di-GMP auf das einzellige Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 sowie auf das filamentöse Cyanobakterium *Fremyella diplosiphon*. Dabei konnten sie bei einem DGC-überproduzierenden *F. diplosiphon* Stamm ein verringertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp und dem PDE überproduzierenden Stamm feststellen. Zudem war die Verlangsamung des Wachstums auch abhängig von der Kanamycin-Konzentration. Je höher die Konzentration von Kanamycin im Kulturmedium war, desto langsamer sind die Zellen gewachsen (Agostoni *et al.*, 2016). Eine erhöhte Konzentration von Antibiotika wurde in der Vergangenheit mit einer Zunahme der Expressionsrate ausgehend vom Plasmid in Verbindung gebracht (Bangen *et al.*, 2004). Die Menge an produziertem c-di-GMP bei einer Überexpression der DGC in *F. diplosiphon* nahm mit zunehmender Kanamycin-Konzentration ab. Zu Bedenken ist dabei jedoch auch, dass in dieser Studie der *F. diplosiphon* Wildtyp im Vergleich zum DGC-Stamm mehr c-di-GMP produziert hat, sodass hier nicht von einer Überexpression der DGC auf eine Überproduktion von c-di-GMP geschlossen werden kann (Agostoni *et al.*, 2016).

4.1.2 Zelldifferenzierung und Phototaxis

4.1.2.1 Phototaxis

Unablässig für den Prozess der Phototaxis - der Bewegung hin zu einer Lichtquelle, oder davon weg - ist die Differenzierung motiler Hormogonien. In dieser Arbeit wurde die Fähigkeit zu phototaktischem Verhalten des *N. punctiforme* Wildtyps und des cph2(5-6)-Stammes nach Induktion der Hormogonien-Differenzierung durch diazotrophe Bedingungen in Kombination mit Rotlicht untersucht. Verglichen wurden diese zudem in Bezug auf den Einfluss von Kupfer und unterschiedlichen Lichtqualitäten. Unabhängig von der Anwesenheit von Kupfer im Kulturmedium zeigte der Wildtyp positive Phototaxis gegenüber weißem, grünem und rotem Licht (Abb. 4.7A-C und E-G). Morphologie und Laufweite unterschieden sich jedoch kupferabhängig (Tab. 4.1). Übereinstimmend mit Campbell *et al.* (2015) bildete der Wildtyp bei weißem Licht mit Kupfer eine fächerartige Form (Abb. 4.7A). Ohne Kupfer nahm die Laufweite unter den drei genannten Lichtqualitäten zu (Tab. 4.1) und die Form war fadenartiger (Abb. 4.7E-G). Besonders aber bei Anwesenheit von Kupfer unterschied sich das Aussehen des Wildtyps unter

Ergebnisse und Diskussion

grünem und rotem Licht deutlich von dem unter weißem Licht. Grünes Licht führte zu dunkelgrünen, fadenartigen Filamenten in Richtung der Lichtquelle (Abb. 4.7B), während rotes Licht zu einem hellgrünen, wolkenartigen Phänotyp führte (Abb. 4.7C). Die hellgrüne Farbe unter rotem Licht ist das Ergebnis einer komplementären chromatischen Adaption (CCA). Dabei wird in *N. punctiforme* und anderen Cyanobakterien die Synthese des photosynthetisch aktiven Phycobiliproteins Phycoerythrin inhibiert (siehe Abschnitt 1.2.2.1), sodass die sonst dunkelgrünen Filamente bläulich-hellgrün erscheinen (Hirose *et al.*, 2010). Unter blauem Licht bewegte sich der Wildtyp in geringem Maße in alle Richtungen, zeigte jedoch keine Phototaxis (Abb. 4.7D und H). Keinerlei Bewegung unabhängig von Lichtqualität oder Kupfergehalt konnte bei *N. p. cph2(5-6)* dokumentiert werden. Mikroskopische Analysen nach Induktion der Hormogonien-Produktion mit Rotlicht und diazotrophen Bedingungen ergaben, dass im c-di-GMP-überproduzierenden Stamm, im Gegensatz zum Wildtyp, keine eindeutig erkennbaren Hormogonien gebildet wurden. Insgesamt ist auch hier zu erkennen, dass der Wildtyp unter diazotrophen Bedingungen besonders in den ersten Tagen der Inkubation einen stärkeren Biomasse-Zuwachs zeigt, als *N. p. cph2(5-6)* (vergleichend Abschnitt 4.1.1.2 und Abb. 4.5). Im Wildtyp waren viele kurze Filamente sichtbar, bei *N. p. cph2(5-6)* lagen dagegen lange Filamente, eingebettet in eine große Menge EPS vor (Abb. 4.8). Durch die fehlende Differenzierung motiler Hormogonien konnte sich der *cph2(5-6)*-Stamm vermutlich während der Phototaxis-Experimente nicht bewegen. Diese Ergebnisse zeigen, dass c-di-GMP in *N. punctiforme* einen sessilen Lebensstil verbunden mit der Synthese umfangreicher EPS fördert.

Tabelle 4.1. Laufdistanzen des *N. punctiforme* Wildtyps während der Phototaxis

Medium	Lichtqualität			
	Weiß	Grün	Rot	Blau
BG11₀ + CuSO₄	1,5 cm	3,5 cm	5,0 cm	-
BG11₀ - CuSO₄	2,5 cm	4,0 cm	5,5 cm	-

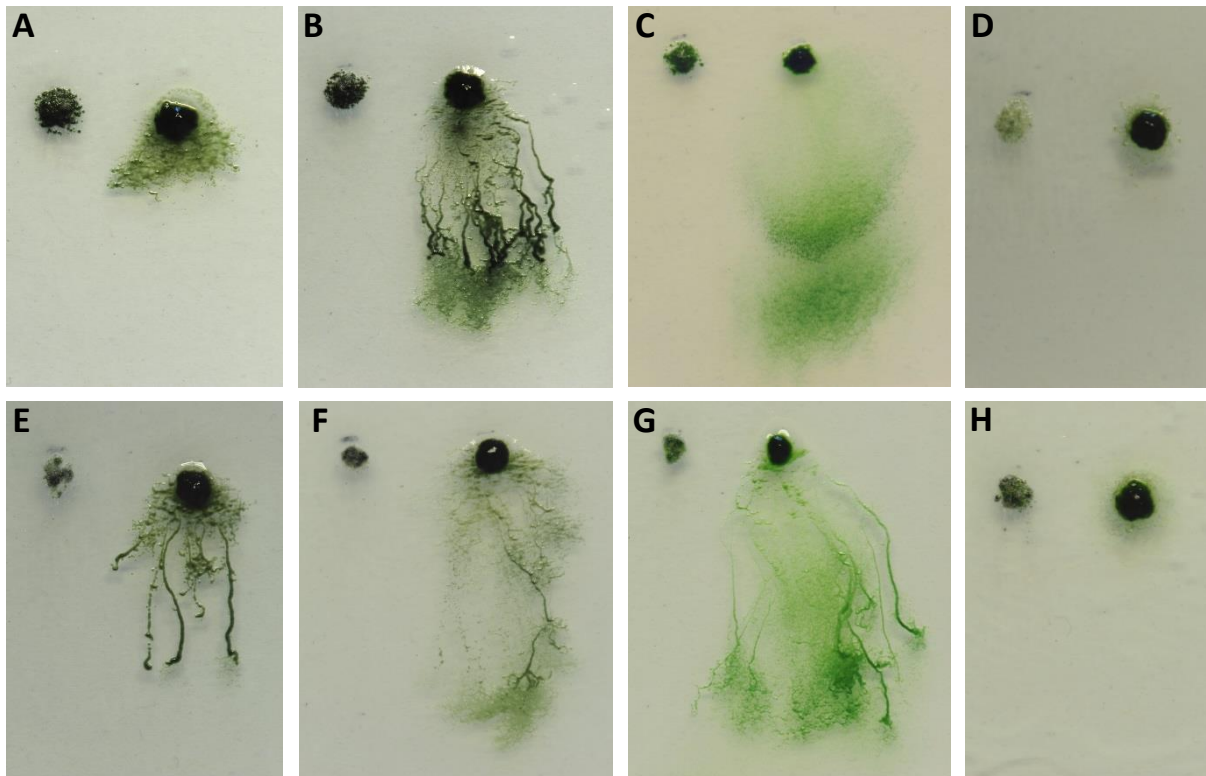


Abbildung 4.7. Phototaktische Bewegung zu Lichtquellen unterschiedlicher Qualitäten. A-D BG110-Medium mit $0,6 \mu\text{M}$ CuSO_4 . E-H BG110-Medium ohne CuSO_4 . Die Lichtquelle wurde vom unteren Rand des Bildausschnitts appliziert. Die Stämme wurden nach Hormogonien-Induktion weißem (360-700 nm; **A und E**), grünem (520 nm; **B und F**), rotem (700 nm; **C und G**) sowie blauem Licht (440 nm; **D und H**) ausgesetzt und 7 d inkubiert. Der Wildtyp befindet sich jeweils rechts im Bild, *N. p. cph2(5-6)* links. Das Experiment wurde zweimal wiederholt.

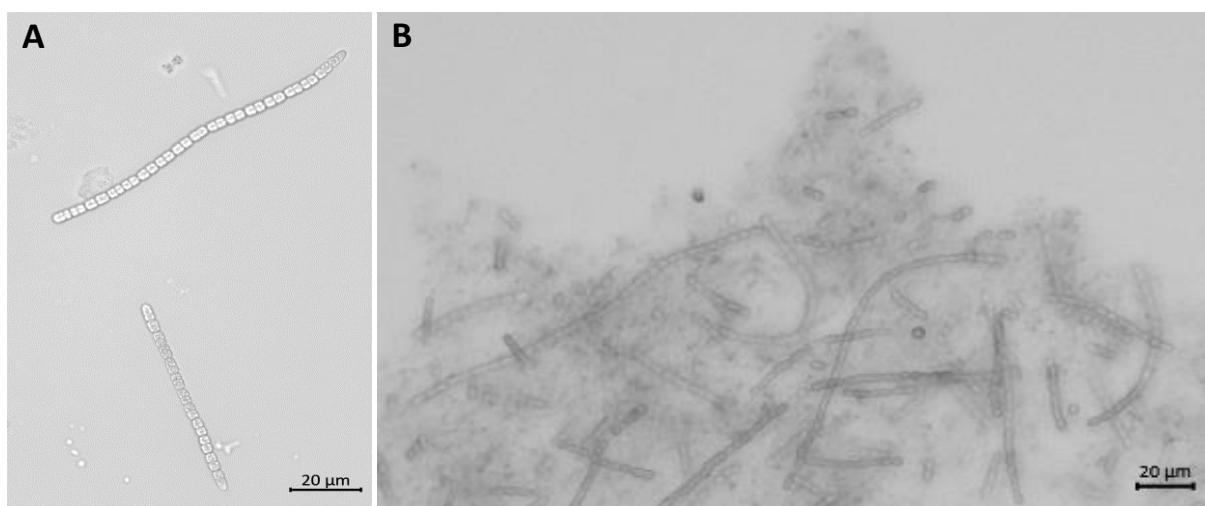


Abbildung 4.8. Lichtmikroskopische Aufnahmen von *N. punctiforme* Wildtyp und *N. p. cph2(5-6)* nach Hormogonien-Induktion. Die Differenzierung von Hormogonien wurde durch diazotrophe Kulturbedingungen und Applikation von Rotlicht induziert. **A** Wildtyp; In der gesamten Kultur waren die kurzen Filamente frei verteilt. **B** *N. p. cph2(5-6)*; Keine eindeutig identifizierbaren Hormogonien waren in *N. p. cph2(5-6)* sichtbar. Stattdessen wurde eine große Menge EPS gebildet.

Die Kopplung lichtsensorischer Domänen an c-di-GMP Regulator-Domänen im cph2-Phytochrom ermöglicht *Synechocystis* PCC 6803 eine lichtabhängige Regulation der PDE oder DGC Aktivität (Savakis *et al.*, 2012). Eine solche blaulicht-abhängige Regulation der GGDEF Domäne konnte auch in *Rhodobacter sphaeroides* gefunden werden (Tarutina *et al.*, 2006). In *Synechococcus elongatus* und *Klebsiella pneumoniae* wird dagegen die PDE-Aktivität durch blaues Licht reguliert (Barends *et al.*, 2009, Cao *et al.*, 2010). Die Verbindung des Blaulichtensors mit der GGDEF-Domäne im cph2-Phytochrom (Domänen 5-6) führt dazu, dass der *Synechocystis* PCC 6803 Wildtyp keine blaulicht-abhängige Phototaxis zeigt, da unter diesen Bedingungen mehr c-di-GMP gebildet wird. Dieses wiederum fördert einen sessilen Lebensstil (Agostoni *et al.*, 2013, Wilde *et al.*, 2002). Eine $\Delta cph2$ Mutante zeigte unter blauem Licht Phototaxis, eine mit dem c-terminalen Teil des Phytochroms komplementierte Mutante $\Delta cph2/cph2(5-6)$ zeigte dagegen lediglich unter nicht-induzierten Bedingungen phototaktische Bewegung. Unter induzierten Bedingungen bewegte sich diese Mutante nicht (Savakis *et al.*, 2012).

Bezogen auf den in dieser Arbeit untersuchten *N. p.* cph2(5-6)-Stamm bedeutet dies, dass im Falle einer Regulierbarkeit des Promotors, unter nicht-induzierten Bedingungen bei allen Lichtqualitäten Bewegung hätte stattfinden müssen. Das Bewegungsbild hätte in diesem Falle dem des Wildtyps entsprechen müssen, da die c-di-GMP-Produktion nicht erhöht worden wäre. Weil aber die Produktion von c-di-GMP aufgrund eines nicht-induzierbaren Promotors mit und ohne Kupfer etwa gleich hoch war (Abb. 4.4), war kein Unterschied bei der Phototaxis festzustellen. Nach der Induktion von Hormogonien (Abb. 4.8) waren diese im Wildtyp, nicht aber in der Mutante, eindeutig identifizierbar. Risser *et al.* (2014) konnten das *hmp* Gen-Cluster als ein Element identifizieren, welches die Hormogonien-Bildung maßgeblich beeinflusst. Aber auch die Ausbildung einer intakten Polysaccharid-Schicht, gesteuert durch die *hps* Gene (Risser und Meeks, 2013), sowie die Expression Phototaxis-bezogener Gene (*ptx*) (Campbell *et al.*, 2015), ist essentiell für die Beweglichkeit und Phototaxis in *N. punctiforme*. Eine Deletion von Teilen des *hmp* Clusters resultierte in fehlender Differenzierung zu Hormogonien unter Standardbedingungen. Wurde die Differenzierung aber aktiv induziert, konnten die Mutanten trotzdem Hormogonien ausbilden, die jedoch unbeweglich waren (Risser *et al.*, 2014). Um festzustellen, ob schon die Differenzierung von Hormogonien, oder aber lediglich deren Beweglichkeit in *N. p.* cph2(5-6) eingeschränkt war, sollten daher weitere mikroskopische Analysen durchgeführt werden.

4.1.2.2 Differenzierung von Hormogonien und Heterozysten

Wird *N. punctiforme* die Stickstoffquelle entzogen, führt dies dazu, dass nach etwa zwölf Stunden ca. 10% der Filamente zu beweglichen Hormogonien differenziert werden. Nach ca. 48 Stunden werden die endständigen Zellen wiederum zu Heterozysten umgewandelt, und die Filamente beginnen sich auszubilden und zu verlängern (Risser *et al.*, 2014). Um die Zelldifferenzierung im *N. punctiforme* Wildtyp und im *cph2(5-6)*-Stamm vergleichend zu verfolgen, wurde den Stämmen nach sieben Tagen Inkubation unter Standardbedingungen die Stickstoffquelle entzogen und der Differenzierungsprozess 24 bis 96 Stunden nach dem Stickstoffentzug mikroskopisch dokumentiert.

Wie erwartet, konnten im Wildtyp nach 24 Stunden Hormogonien beobachtet werden (Abb. 4.9A). Im Vergleich zur Intensität der Fluoreszenz der Filamente zu den späteren Zeitpunkten fiel auf, dass die Filamente nach 24 Stunden eine geringere Fluoreszenz aufwiesen. Nicht alle Filamente zeigten die für Hormogonien typischen zugespitzten Zellen an den Enden, jedoch waren die Zellen im Vergleich zu denen der späteren Zeitpunkte im gesamten Filament kleiner. Während der Differenzierung zu Hormogonien wird die Produktion des Phycobilins Phycoerythrin eingestellt, sodass eine verminderte und manchmal „fleckige“ Fluoreszenz in den Zellen sichtbar wird (Wolf und Schüßler, 2005). Demnach kann es sich bei nahezu allen Filamenten in Abbildung 4.9A um potentielle Hormogonien handeln. Nach 48 Stunden wurden diese zurückgebildet und waren auch nach 72 Stunden nicht sichtbar (Abb. 4.9B-C). Nach 96 Stunden wurden dann erneut Hormogonien differenziert, die am Rande der Filament-Anhäufungen sichtbar waren (Abb. 4.9D). Ebenso, wie nach der gezielten Induktion von Hormogonien durch Rotlicht, waren in *N. p. cph2(5-6)* zu keinem Zeitpunkt nach Entfernen der Stickstoffquelle eindeutig Hormogonien mit kleineren und endständig zugespitzten Zellen identifizierbar. Stattdessen variierten die Zellen sehr stark in ihrer Größe (Abb. 4.9E). Eine solche Variation lässt keine eindeutige Abgrenzung von vegetativen Zellen, Hormogonien und Heterozysten aufgrund visueller Merkmale zu. Zwar wurden Filamente mit kleinen Zellen gebildet, wie es auch für Hormogonien typisch ist, aber diese konnten dennoch nicht eindeutig als solche identifiziert werden, da sie sehr lang waren und nicht die typischen triangulären Zellen an den Enden aufwiesen. Eine ungleichmäßige und teils schwächere Fluoreszenz, welche für Hormogonien spricht, trat aber dennoch auf, und wurde mit zunehmender Kulturzeit deutlicher ausgeprägt (Abb. 4.9E-H).

Im Gegensatz zu Hormogonien zeichnen sich Heterozysten durch ein sauerstoffarmes Zellinneres aus, das durch die Inaktivierung aller Photosynthese-relevanter Pigmente sowie eine zusätzlich verdickte Zellhülle in Kombination mit einer besonderen Polysaccharid-Schicht aufrechterhalten wird (Xu *et al.*, 2008). In den vegetativen Zellen des Wildtyps führen die Photosynthese-Pigmente zur Autofluoreszenz der Zellen. Aufgrund deren Inaktivierung fluoreszieren die Heterozysten nicht und sind in der Fluoreszenzmikroskopie zuverlässig identifizierbar. Nach 24 Stunden waren im Wildtyp keine ausgereiften Heterozysten sichtbar (Abb. 4.9A). Erst nach 48 Stunden konnten erstmals Heterozysten beobachtet werden (Abb. 4.9B). Nach 72 und 96 Stunden lagen diese in einem festgelegten Intervall von ca. 15 vegetativen Zellen zwischen zwei Heterozysten vor (Abb. 4.9C und D). Dies entspricht in etwa dem für *N. punctiforme* typischen Intervall (Meeks *et al.*, 2002). In *N. p. cph2(5-6)* ließen sich dagegen visuell keine Heterozysten identifizieren, jedoch wurden besondere Strukturen in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar. Nahezu alle Zellen wiesen bereits nach 24 Stunden einen gefleckten Phänotyp auf, was auf die Inaktivierung von Phycobilinen deutet, wie es für Hormogonien typisch ist (Wolf und Schüßler, 2005). Wie beim Wildtyp die Heterozysten, blieb dieser Phänotyp bis 96 Stunden nach Stickstoffentzug bestehen (Abb. 4.9F-H). Lediglich Teile der Zellen fluoreszierten und einige Zellen erschienen regelrecht geteilt. Obgleich *N. p. cph2(5-6)* offenbar keine reifen Heterozysten ausbilden konnte, wies dieser Stamm eine höhere Wachstumsrate als der Wildtyp unter diazotrophen Bedingungen auf (vgl. Abschnitt 4.1.1.2). Es muss diesem Stamm also möglich gewesen sein, den für das Wachstum benötigten Stickstoff zu erhalten. Demnach stellte sich die Frage, ob der *cph2(5-6)*-Stamm eine Nitrogenase auch außerhalb vollständig ausgebildeter Heterozysten herstellen kann.

Der Prozess der Zelldifferenzierung ist sehr gut in *N. punctiforme* untersucht (Christman *et al.*, 2011, Xu *et al.*, 2008). Eine Vielzahl verschiedener Gene sind an diesem Prozess beteiligt (Christman *et al.*, 2011). Erst wenn die Differenzierung der Heterozysten abgeschlossen ist, werden die Nitrogenase-Gene (*nif*) exprimiert und infolge dessen Stickstoff fixiert. In *N. punctiforme* wird die Expression der *nif*-Gene 18 bis 24 Stunden nachdem die Stickstofflimitierung eingeleitet wurde, gestartet (Christman *et al.*, 2011). Dementsprechend kann die Quantifizierung der Transkripte des *nifH*-Gens innerhalb des *nifHDK*-Operons, welches für die strukturellen Proteine der Nitrogenase kodiert, genutzt werden, um die Abundanz des Enzyms zu messen.

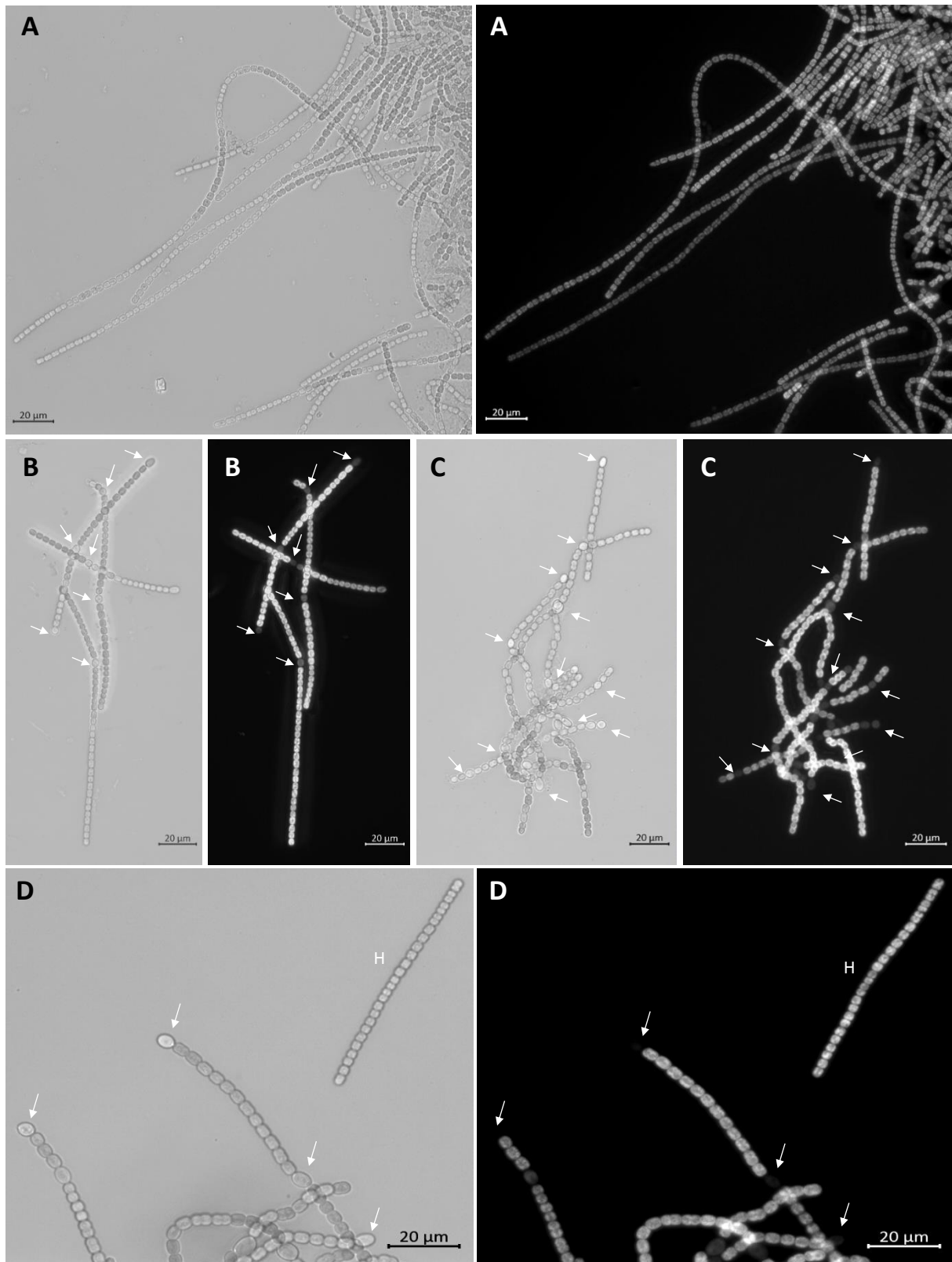


Abbildung 4.9. Licht- und Fluoreszenzmikroskopie in diazotrophen Medium. *N. punctiforme* Wildtyp und *cph2(5-6)* Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase wurden in BG11₀-Medium mit CuSO₄ überführt und Aufnahmen wurden 24 h (A und E), 48 h (B und F), 72 h (C und G) und 96 h (D und H) nach Entfernen der Stickstoffquelle gemacht. A-D Wildtyp, E-H *cph2(5-6)*; Heterozysten sind durch Pfeile markiert, H Hormogonien (Fortsetzung auf nächster Seite).

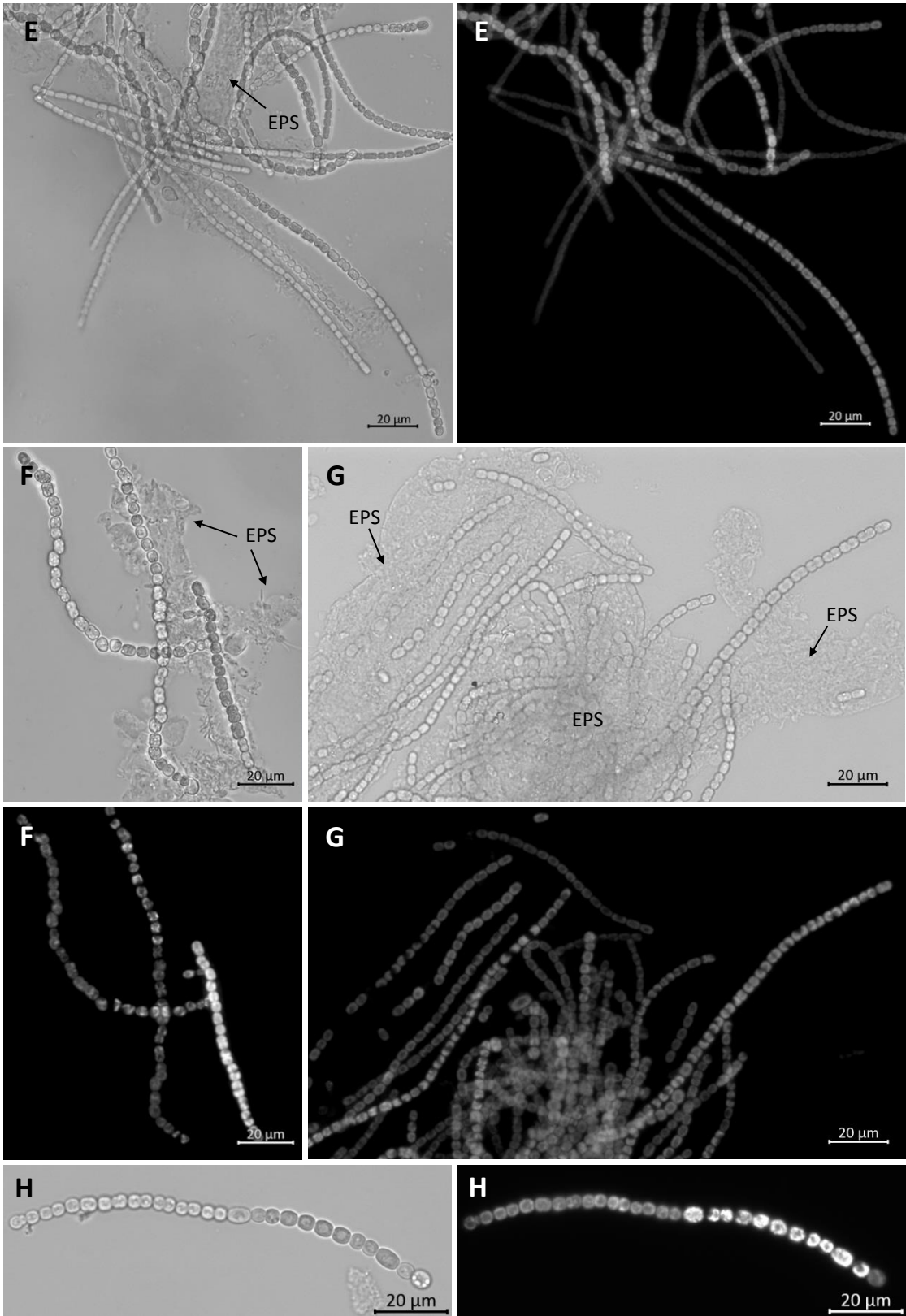


Abbildung 4.9. Fortsetzung

Um die Menge der *nifH*-Transkripte im Wildtyp und *N. p. cph2(5-6)* mittels RT-qPCR bestimmen zu können, wurde parallel zu den mikroskopischen Analysen 24 bis 96 Stunden nach der Stickstofflimitierung RNA extrahiert. Pinto *et al.* (2012) haben eine Auswahl möglicher Referenzgene für die RT-qPCR in Cyanobakterien bezüglich ihrer Stabilität unter verschiedenen Bedingungen getestet. Dabei zeigte sich, dass sich bei dauerhafter Lichtgabe und diazotrophen Bedingungen das Gen *rrn16S* der 16S ribosomalen RNA sowie die Gene *rnpA* und *rnpB* der Protein- bzw. RNA-Untereinheit der Ribonuklease P als Referenzgene für die Quantifizierung eignen (Pinto *et al.*, 2012). Um die Bindung der Primer möglichst spezifisch zu gestalten, wurden alle Primer, außer für *rrn16S*, individuell mit Hilfe der Genomsequenz von *N. punctiforme* ATCC 29133 (*N. punctiforme* PCC 73102; GCA_000020025.1; Cyanobase) entworfen. Die drei möglichen Referenzgene wurden dann hinsichtlich ihrer Stabilität zwischen den Proben analysiert (Abb. 4.10). In der RT-qPCR beschreibt der C_t -Wert die Anzahl der Zyklen, die benötigt werden, um erstmals einen Anstieg der Fluoreszenzsignale über einen Schwellenwert zu erreichen. Je geringer der C_t -Wert ausfällt, desto höher war die Konzentration der Zielsequenz in der Probenlösung. Wie aus Abbildung 4.10 zu entnehmen ist, war das *rrn16S* Gen ein stark exprimiertes Gen mit einem C_t -Wert unter fünf. Außerdem schwankte die Expression des Gens zwischen den Proben erheblich. Das *rrn16S* Gen wurde dementsprechend als Referenzgen ausgeschlossen. Eine deutlich stabilere Expression wiesen dagegen die Gene *rnpA* und *rnpB* auf. Diese wurden als Referenzgene genutzt. Mit einem durchschnittlichen C_t -Wert von 17, welcher den Werten der zu untersuchenden Gene ähnlich war, wurde schließlich *rnpB* für die abschließende Quantifizierung herangezogen.

Ergebnisse und Diskussion

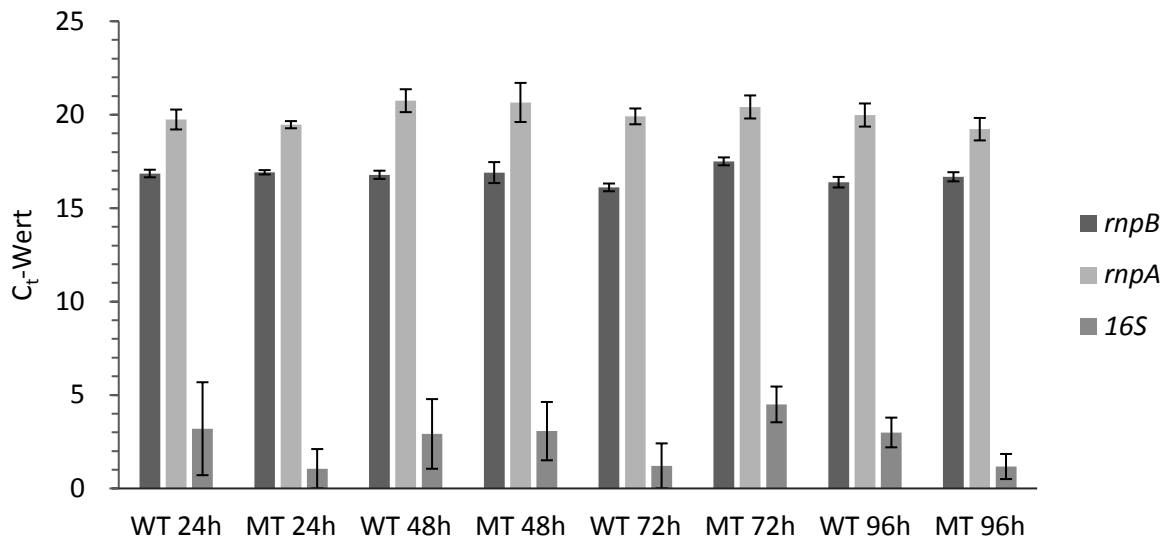


Abbildung 4.10. Stabilität möglicher Referenzgene für die RT-qPCR. Nach RNA Extraktion und cDNA Synthese wurde die Expression der Gene *rrn16S*, *rnpA* und *rnpB* in allen Proben bestimmt. Die Gene *rnpA* und *rnpB* zeigten nur geringe Schwankungen, *rrn16S* eignete sich aufgrund starker Schwankungen nicht als Referenzgen, WT: *N. punctiforme* Wildtyp, MT: *N. p. cph2*(5-6).

In Abbildung 4.11 ist die Expression von *nifH* in *N. punctiforme* Wildtyp und *N. p. cph2*(5-6) dargestellt. Im Wildtyp war die Abundanz der *nifH*-Transkripte nach 24 Stunden im Vergleich zu nicht-diazotrophen Bedingungen zunächst nicht erhöht. Danach stieg die Transkript-Menge zeitabhängig bis auf eine ca. vierfache Menge 96 Stunden nach Stickstoffentzug an (4.11A). Christman *et al.* (2011) zeigten dagegen für diesen Wildtyp-Stamm einen Anstieg der *nifH*-Expression bereits nach 24 Stunden und nur noch eine geringfügige Erhöhung im folgenden Zeitverlauf. Die Reaktion des in dieser Arbeit verwendeten Wildtyp-Stammes auf den Stickstoffentzug ist im Vergleich zum durch Christman *et al.* (2011) untersuchten Stamm langsamer.

Ein zeitabhängiger Anstieg der Transkript-Menge von 24 bis 96 Stunden fand in *N. p. cph2*(5-6) nicht statt, jedoch zeigen die Ergebnisse der RT-qPCR, dass die Menge der *nifH*-Transkripte in der Mutante, im Vergleich zum Wildtyp, zu jedem Zeitpunkt deutlich höher war (Abb. 4.11B), obgleich die Schwankungen zwischen den wiederholten Messungen in der Mutante vergleichsweise hoch ausfielen. So war die Transkript-Menge verglichen mit dem Wildtyp durchschnittlich 30-fach höher.

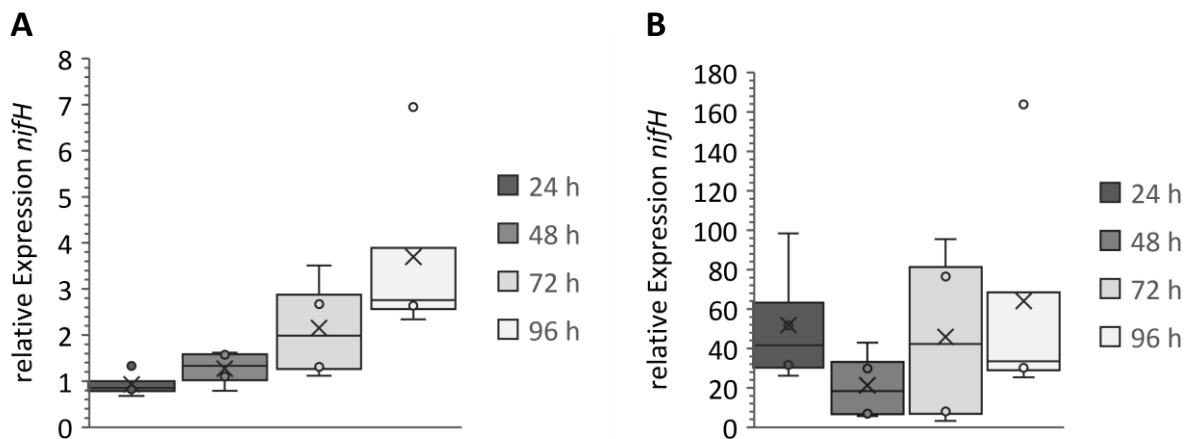


Abbildung 4.11. Expression des Nitrogenase-Gens *nifH*. **A** *N. punctiforme* Wildtyp und **B** *N. p. cph2(5-6)* wurden in BG11₀ mit CuSO₄ und zur Kontrolle in BG11 (+N) mit CuSO₄ kultiviert. RNA wurde aus den Kulturen mit N und 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Stickstofflimitierung extrahiert und zu cDNA transkribiert. Die C_t-Werte von *nifH* und *rnpB* wurden bestimmt und die Expression von *nifH* wurde auf die Expression von *rnpB* normalisiert. Die dargestellten Werte nach Stickstoffentzug wurden auf den Expressionswert unter +N Bedingungen bezogen. Die Boxen stehen für 25-75% der Werte, horizontale Linien repräsentieren den Median. Whisker stehen für Werte zwischen 10% und 90%, n=3.

Vegetative Zellen durchlaufen bei der Differenzierung zu Heterozysten komplexe Veränderungen, wobei eine Vielzahl verschiedener Gene an diesem Prozess beteiligt sind (Kumar *et al.*, 2010, Meeks *et al.*, 2002). Wird eine Mutation ausgelöst, bilden sich, abhängig davon ob diese Mutation in einem frühen oder späten Gen in der Entwicklung besteht, keine oder lediglich unreife Heterozysten aus (Muro-Pastor und Hess, 2012). Ein früher Schlüssel-Regulator in der Heterozystenentwicklung ist HetR. Bei einer Mutation von *hetR* werden auch unter stickstofflimitierten Bedingungen keine Heterozysten gebildet (Buikema und Haselkorn, 1991). Eine Mutation von später in der Kaskade geschalteten Genen kann dagegen zu unvollständig ausgebildeten, unreifen Heterozysten führen (Kumar *et al.*, 2010).

Nachdem festgestellt werden konnte, dass die *nifH*-Expression in *N. p. cph2(5-6)* deutlich erhöht war, aber keine Heterozysten sichtbar waren, sollte mit einer weiteren RT-qPCR überprüft werden, ob die Differenzierung bereits begonnen hatte und unterbrochen wurde, oder ob sie unmittelbar unterbunden worden ist. Dazu wurde zusätzlich die Expression des *hetR* Gens 24 und 48 Stunden nach Stickstofflimitierung quantifiziert. Die Ergebnisse der RT-qPCR zeigen, dass die Expression vergleichbar mit der des Wildtyps war (Abb. 4.12). Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die

Differenzierung der Heterozysten induziert worden ist, da *hetR* in *N. p. cph2(5-6)* ebenso wie im Wildtyp nach Stickstofflimitierung exprimiert wurde. Die Ausbildung wurde möglicherweise in einem späteren Schritt der Gen-Kaskade unterbrochen, sodass unreife Heterozysten entstanden sind.

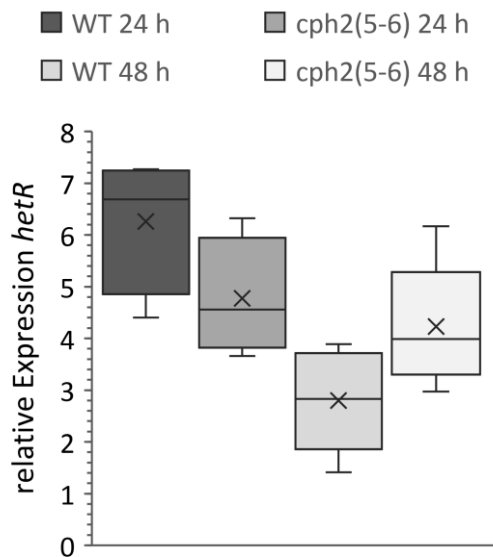


Abbildung 4.12. Expression des Heterozysten-Gens *hetR*. *N. punctiforme* Wildtyp (WT) und *N. p. cph2(5-6)* wurden in BG11₀ mit CuSO₄ kultiviert (Kontrolle mit N). RNA wurde aus der Kultur mit N bzw. 24 h und 48 h nachdem die Stickstoffquelle entfernt worden ist, extrahiert und zu cDNA transkribiert. Die C_T-Werte von *hetR* und *rnpB* wurden mit RT-qPCR bestimmt und die Expression von *hetR* auf die Expression von *rnpB* normalisiert. Die Expressionswerte wurden dann auf die Werte unter +N Bedingungen bezogen. Boxen stehen für 25-75% der Werte, horizontale Linien repräsentieren den Median. Whisker stehen für Werte zwischen 10% und 90% und Werte außerhalb dieses Bereichs sind als Punkte markiert, n=3.

Eine Erhöhung der *nifH*-Expression bei zum Wildtyp vergleichbarer *hetR*-Expression in möglicherweise unreifen Heterozysten ist ungewöhnlich, da die Nitrogenase normalerweise nur in vollständig ausgebildeten Heterozysten Stickstoff fixiert (Ernst *et al.*, 1992). Wie Christman *et al.* (2011) aber zeigen konnten, werden die Nitrogenase-Gene in *N. punctiforme* nicht nur in Heterozysten, sondern auch in Hormogonien exprimiert. Die verringerte und teils „fleckige“ Fluoreszenz zu allen Zeitpunkten in *N. p. cph2(5-6)* verbunden mit der erhöhten Abundanz von *nifH*-Transkripten, aber dem Fehlen von vollständig ausgebildeten Heterozysten, lässt den Schluss zu, dass die Mutante zwar Hormogonien differenzieren kann, diese jedoch möglicherweise unvollständig ausgebildet sind. Die erhöhte Abundanz von *nifH*-Transkripten könnte so auf die Hormogonien und nicht auf Heterozysten zurückzuführen sein. Jedoch fanden sich nach Hormogonien-Induktion durch Stickstoffentzug und Rotlicht keine eindeutig identifizierbaren Hormogonien, und auch während der Phototaxis-Experimente war keine Bewegung in *N. p. cph2(5-6)* zu erkennen. Das Unvermögen, bewegliche Hormogonien auszubilden, führte in der Mutante letztendlich dazu, dass sie sich nicht zur Lichtquelle bewegen konnte, unabhängig von der

Lichtqualität. Die Differenzierung beider Zelltypen ist im Lebenszyklus von *N. punctiforme* eng miteinander verbunden. Aus den endständigen Zellen der Hormogonien werden die Heterozysten gebildet (Christman *et al.*, 2011). Da aber in *N. p. cph2(5-6)* keine vollständig ausgebildeten Hormogonien mit diesen typischen Zellen ausgebildet wurden, kann vermutlich auch die Differenzierung von Heterozysten nicht vollständig stattfinden. So kann davon ausgegangen werden, dass unter dem Einfluss des c-di-GMP in der Mutante nicht nur die Differenzierung eines Zelltyps, sondern die Zelldifferenzierung insgesamt durch den sekundären Botenstoff beeinflusst wurde.

4.1.3 EPS Zusammensetzung und Biofilmbildung

In vielen Bakterien konnte gezeigt werden, dass c-di-GMP die Synthese extrazellulärer Substanzen beeinflusst und die Polysaccharid-Produktion reguliert (Perez-Mendoza und Sanjuan, 2016). Das Bakterium *Sinorhizobium meliloti* 8530 produziert bei einer künstlichen Erhöhung des intrazellulären c-di-GMP Levels zudem ein Exopolysaccharid, welches sich strukturell von dem des Wildtyps unterscheidet (Perez-Mendoza *et al.*, 2015). Dies zeigt, dass das Signalmolekül c-di-GMP nicht nur die Biofilmbildung verbunden mit der EPS-Produktionsrate, sondern auch die Zusammensetzung der Exopolysaccharide beeinflussen kann.

In dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob die Überproduktion von c-di-GMP auch in *N. punctiforme* eine erhöhte EPS-Synthese bewirkt. Dafür wurden einwöchige Suspensionskulturen homogenisiert, in BG11₀-Medium -CuSO₄ gewaschen und stark konzentriert. Einige Tropfen dieser Konzentrate wurden auf BG11₀-Agarplatten +CuSO₄ platziert und eine Woche inkubiert. Zusätzlich wurden Biofilme auf Cellulose Acetat-Filtern angeimpft, fünf Wochen inkubiert und mit Kryo-REM analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass neben der Zelldifferenzierung auch die Biofilmbildung und die Morphologie des Biofilms durch c-di-GMP beeinflusst wird. Wie Abbildung 4.13A zeigt, bildete der Wildtyp einen homogenen, hellgrünen Biofilm. Der Biofilm hatte zudem ein vorwiegend trockenes Aussehen. An den Rändern war in geringem Maße eine Bewegung der Filamente nach außen zu beobachten. Die Morphologie des Biofilms von *N. p. cph2(5-6)* unterschied sich von der des Wildtyps (Abb. 4.13B). Dieser erschien dunkelgrün, war deutlich zusammengezogen und inhomogen. Es haben sich Zellpakete gebildet, welche von einer größeren, glänzend erscheinenden Menge EPS umgeben waren. Dies deutet, wie auch die Beobachtung einer größeren EPS-Menge in den mikroskopisch analysierten Kulturen nach Induktion der Hormogonien (Abb. 4.8), darauf

hin, dass von *N. p. cph2(5-6)* mehr EPS in den extrazellulären Raum abgegeben wird, als vom Wildtyp. Eine Bewegung der Filamente nach außen war nicht zu beobachten, was durch die Beeinflussung der Hormogonien-Differenzierung erklärt werden kann (Abschnitt 4.1.2.2). Vielmehr zogen sich die Zellen des ausplattierten Biofilms im Laufe der Inkubationszeit zusammen.

Nahaufnahmen der Biofilmstruktur mittels Kryo-REM bestätigten dieses Bild. Der Wildtyp-Biofilm war über den gesamten Filter ausgebreitet. Dennoch waren auch hier kleinere Zellpakete in regelmäßiger Verteilung sichtbar, welche über EPS-Fäden und einzelne Filamente miteinander verbunden waren (Abb. 4.13C und E). Insgesamt bildete dieser Biofilm eine homogene Struktur aus. Im Gegensatz dazu waren die Zellpakete in *N. p. cph2(5-6)* sehr deutlich ausgebildet (Abb. 4.13D). Sie bildeten scheinbar in sich geschlossene „Hügel“ aus, ohne untereinander über Filamente verbunden zu sein. Während an der obersten Schicht dieser Anhäufungen die Filamente deutlich und geordnet zu erkennen waren (Abb. 4.13F), waren die unteren Schichten von EPS bedeckt. Außerdem bildete sich ein „Wall“ um die Zellpakete, und die EPS war auf der gesamten Filteroberfläche verteilt. Sind Nährstoffe oder Platzangebot an der Position der ersten Besiedlung, also dem Ort des Beimpfens, aufgebraucht, ermöglicht die Differenzierung von beweglichen Hormogonien *N. punctiforme* die Besiedlung neuer Orte. Eine solche Differenzierung findet jedoch in der c-di-GMP-überproduzierenden Mutante nicht statt (siehe Abschnitt 4.1.2.2), sodass die Filamente vermutlich an dem Ort verweilen, wo sie angeimpft wurden. Dort können sie sich nicht über den Filter verteilen, sondern wachsen stattdessen in die Höhe und bilden Kuppeln, wie in Abb. 4.13D zu sehen.

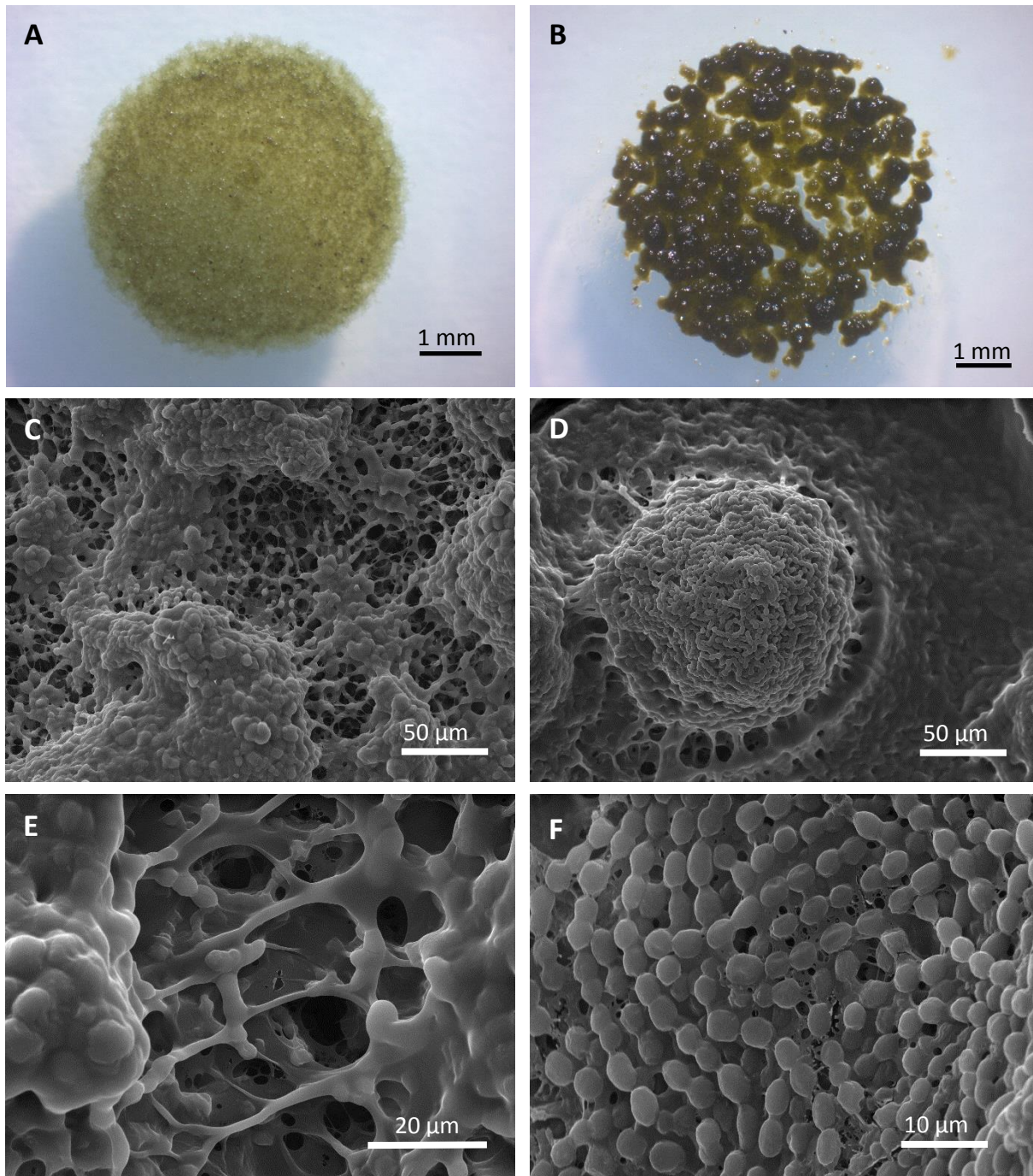


Abbildung 4.13. Morphologie der Biofilme von *N. punctiforme* Wildtyp und *N. p. cph2(5-6)*. Einige Tropfen einer Suspension aus zerkleinerten Filamenten einwöchiger Kulturen [A Wildtyp; B *cph2(5-6)*] wurden auf BG110-Agarplatten +CuSO₄ gegeben, das Medium vollständig entfernt und sieben Tage inkubiert. Biofilme auf Filtern [C und E Wildtyp; D und F *cph2(5-6)*] wurden nach fünf Wochen Inkubation mit Kryo-REM analysiert.

Ergebnisse und Diskussion

Im weiteren Verlauf sollten die extrazellulären Substanzen extrahiert und quantifiziert werden, um zu überprüfen, ob die Menge der EPS in *N. p. cph2(5-6)*, wie bereits durch die mikroskopischen Analysen vermutet, höher ist. Dazu wurden beide Stämme zwei Wochen in BG11₀-Medium +CuSO₄ (100 ml) kultiviert, dann wurden die freien Exopolysaccharide (RPS, *released polysaccharides*) extrahiert und deren Trockengewicht in Bezug zum Trockengewicht der Zellen bestimmt. Die Quantifizierung der RPS bestätigte, was bereits aus Abbildung 4.13 sichtbar wurde. Die von *N. p. cph2(5-6)* gebildete RPS-Menge (2,34 mg/g) war 1,5 mal höher im Vergleich zum Wildtyp (1,64 mg/g) ($p < 0,01$) (Abb. 4.14). Die 1,5-fache Menge RPS erscheint gering in Anbetracht der vergleichsweise großen EPS-Mengen, welche in den vorhergehenden mikroskopischen Analysen sichtbar wurden (Abb. 4.13). Jedoch muss hier die unterschiedliche Art und Dauer der Kultivierung einbezogen werden. Für die Kryo-REM wurden die Kulturen als Biofilme für die Dauer von fünf Wochen angezogen, für die EPS-Extraktion wurden jedoch zweiwöchige Suspensionskulturen genutzt. Außerdem wurden nur RPS in den Kulturüberständen quantifiziert. Die Ablösung kapsulärer Polysaccharide sowohl in Suspensionskultur, als auch in Biofilmen benötigt häufig eine physikalische oder chemische Behandlung der Zellen (Liu und Fang, 2002). Sobald diese Methoden eingesetzt werden, besteht jedoch die Gefahr, dass bei der Extraktion Zellen zerstört und die Extrakte mit intrazellulärem Material verunreinigt werden (siehe Abschnitt 4.2.1). Besonders bei Bakterien und Cyanobakterien, denen die zusätzliche Stabilität einer Zellwand fehlt, ist die Gefahr der Zellyse erhöht. Trotz der ausschließlichen Analyse der RPS konnte ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) zwischen dem Wildtyp und dem *cph2(5-6)*-Stamm gezeigt werden (Abb. 4.14). Dies bestätigt, dass die Überexpression der DGC und ein damit verbundenes höheres c-di-GMP-Level in *N. punctiforme* zu einer erhöhten EPS-Produktionsrate führt. Ähnliche Beobachtungen konnten bereits in einer

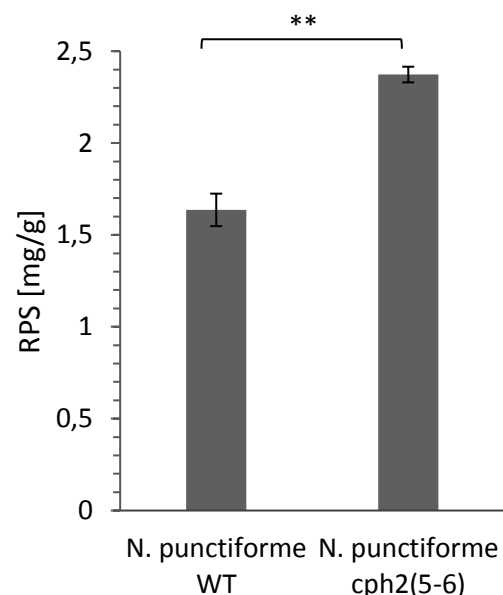


Abbildung 4.14. RPS-Menge produziert von *N. punctiforme* Wildtyp und *N. p. cph2(5-6)*. RPS wurden aus Kulturüberstand gewonnen, dialysiert, getrocknet und gewogen. Das Trockengewicht der EPS wurde auf Trockengewicht der Zellepellets bezogen $n=3$, $**p < 0,01$.

Vielzahl anderer Bakterien gemacht werden (Nakhamchik *et al.*, 2008, Perez-Mendoza *et al.*, 2014, Schaeper *et al.*, 2016, Wu *et al.*, 2015). Neben *S. meliloti* (Perez-Mendoza *et al.*, 2015) konnte auch in *Vibrio vulnificus* gezeigt werden, dass c-di-GMP eine Änderung in der Zusammensetzung der Exopolysaccharide hervorruft (Nakhamchik *et al.*, 2008). Um eine mögliche Modulation der EPS-Zusammensetzung des transgenen Stammes im Vergleich zum Wildtyp feststellen zu können, wurden die Exopolysaccharide in ihre Monosaccharide aufgespalten und analysiert (Abb. 4.15).

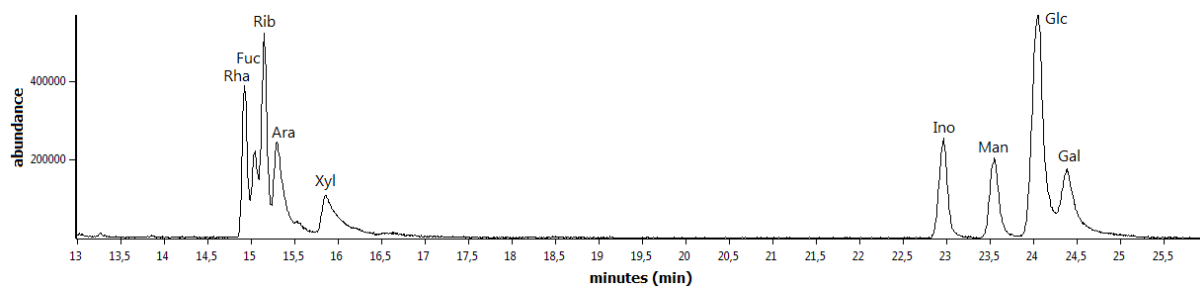


Abbildung 4.15. Ausschnitt eines, zur strukturellen Charakterisierung der *N. punctiforme* Exopolysaccharide herangezogenen GC-MS Chromatogramms. Aufgetrennt wurden die durch Derivatisierung erhaltenen Alditolacetate. TIC (Massenbereich m/z 40-500); Ino = interner Standard myo-Inositol, Rha = Rhamnose, Fuc = Fucose, Rib = Ribose, Ara = Arabinose, Xyl = Xylose, Man = Mannose, Glc = Glucose, Gal = Galaktose.

Die Exopolysaccharide, welche für die Quantifizierung der RPS extrahiert worden sind, wurden hydrolysiert, um die Monosaccharide freizusetzen. Dann wurden diese derivatisiert und mittels GC-MS identifiziert und quantifiziert. Ein beispielhaftes Chromatogramm einer analysierten Probe ist in Abbildung 4.15 dargestellt. Die Massenspektren der Monosaccharide sind Anhang C zu entnehmen. Es konnten acht neutrale Monosaccharide im Exopolysaccharid beider Stämme identifiziert werden (Abb. 4.16). Eine Besonderheit cyanobakterieller Exopolysaccharide ist, dass sie in den meisten Fällen sechs und mehr unterschiedliche Monosaccharide enthalten. Bakterien anderer Gruppen produzieren in der Regel weniger als vier verschiedene Einheiten (Rossi und De Philippis, 2015). Eine Identifizierung der in den *N. punctiforme* ATCC 29133 Exopolysacchariden enthaltenen Monosaccharide wurde bisher nicht beschrieben, jedoch gibt es zahlreiche Informationen über weitere *Nostoc* Stämme, darunter *N. commune*, *N. insulare* und *N. flagelliforme*. In den untersuchten Stämmen wurden durchschnittlich sechs bis acht verschiedene Monosaccharid-Einheiten identifiziert [ausführliches *review* in Pereira *et al.* (2009)]. Eine weitere Besonderheit ist, dass sich in cyanobakteriellen

Ergebnisse und Diskussion

Exopolysacchariden neben Hexosen sehr häufig auch Pentosen und Deoxyhexosen finden lassen (Rossi und De Philippis, 2015). Dies trifft auch auf jene aus *N. punctiforme* zu (Abb. 4.16). Den größten Anteil aller Monosaccharid-Einheiten am Exopolysaccharid bildete Glucose (43,77%), gefolgt von Mannose (16,87%) und Galaktose (13,11%). Neben diesen Hexosen konnten außerdem die drei Pentosen Xylose (8,15%), Arabinose (3,35%) und Ribose (3,23%) sowie die Deoxyhexosen Fucose (7,45%) und Rhamnose (5,07%) identifiziert werden. Die Monosaccharid-Zusammensetzung von *N. p. cph2(5-6)* unterschied sich nicht von der des Wildtyps. Auch hier wurde als häufigstes Monosaccharid Glucose (45,36%), gefolgt von Mannose (19,22%), Galaktose (13,45%), Xylose (9,64%), Fucose (5,19%), Arabinose (2,46%), Rhamnose (2,44%) und Ribose (2,25%) gefunden.

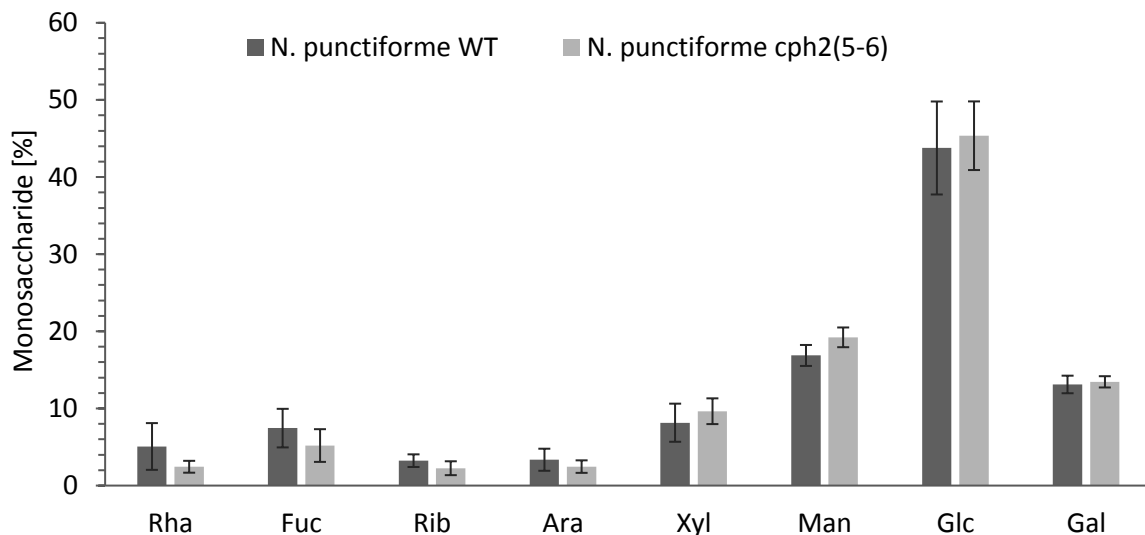


Abbildung 4.16. Zusammensetzung der Exopolysaccharide produziert von *N. punctiforme* Wildtyp und *N. p. cph2(5-6)*. Analysiert wurden RPS beider Stämme mit GC-MS und myo-Inositol als internem Standard. Rha, Rhamnose; Fuc, Fucose; Rib, Ribose; Ara, Arabinose; Xyl, Xylose; Man, Mannose; Glc, Glucose; Gal, Galaktose; n=3.

Über die genaue Struktur cyanobakterieller Exopolysaccharide ist, aufgrund ihrer Komplexität und der damit verbundenen Schwierigkeiten bei der Strukturanalyse, bisher nur wenig bekannt (Pereira *et al.*, 2009). Die Charakterisierung der Bindungstypen des *N. punctiforme* Wildtyps und des *cph2(5-6)*-Stammes wurde mit Hilfe der Methylierungsanalyse durchgeführt. Wie bereits von den Ergebnissen der Monosaccharid-Analysen vermutet, wiesen die Exopolysaccharide beider Stämme dieselben Bindungstypen in vergleichbarer Menge auf (Tab. 4.2). Es wurden fünf

endständige Einheiten gefunden, die durch die Derivate 2,3,4,6-Me₄-Glc_p (T-Glc_p), 2,3,4,6-Me₄-Gal_p (T-Gal_p), 2,3,4,6-Me₄-Man_p (T-Man_p), 2,3,5-Me₃-Pen_f (T-Pen_f, kann Xyl_f, Rib_f oder Araf sein) und 2,3,4-Me₃-Deoxy-Hex_p (T-Hex_p, kann Fuc_p oder Rhap sein) repräsentiert werden. Die Derivate 2,3-Me₂-Glc_p [(1→4,6)-Glc_p] und 2,6-Me₂-Gal_p [(1→3,4)-Gal_p] lassen auf ein verzweigtes Heteropolysaccharid schließen. Die Bindungstypen in beiden Stämmen mit dem größten Anteil am Exopolysaccharid waren (1→4)-Glc_p, (1→2)-Deoxy-Hex_p und (1→4)-Pen_p, repräsentiert durch die Derivate 2,3,6-Me₃-Glc_p, 3,4-Me₂-Deoxy-Hex_p und 2,3-Me₂-Pen_p. Weiterhin wurde eine geringe Menge 2,3,4-Me₃-Gal_p detektiert, welches eine (1→6)-Gal_p Verbindung anzeigt. Es fällt jedoch auf, dass drei verschiedene Pentosen bei der Analyse der Monosaccharide gefunden wurden (Abb. 4.16), jedoch lediglich zwei Pentose-zugehörige Bindungstypen in der Methylierungsanalyse nachgewiesen werden konnten (Tab. 4.2). Im Exopolysaccharid von *N. punctiforme* bilden die Pentosen nur einen geringen Anteil im Vergleich zu den Hexosen und Deoxyhexosen (Abb. 4.16). So ist es wahrscheinlich, dass eine der Pentosen in zu geringer Menge vorkommt, um deren Bindungstypen während der Methylierungsanalyse detektieren zu können. Da PMAA Standards in dieser Arbeit nur für die drei Hexosen Glucose, Galaktose und Mannose hergestellt werden konnten, können auch nur deren Bindungstypen sicher zugeordnet werden. Ausgehend von den Anteilen der Monosaccharide am Exopolysaccharid, handelt es sich jedoch bei dem Derivat 3,4-Me₂-Deoxy-Hex_p vermutlich um (1→2)-Fuc_p, bei 2,3,4-Me₃-Deoxy-Hex_p um T-Rhap und bei 2,3-Me₂-Pen_p um (1→4)-Xyl_p. Obwohl die Charakterisierung der Bindungstypen wahrscheinlich nicht vollständig ist, ergibt sich daraus ein Eindruck über die Struktur des Exopolysaccharids von *N. punctiforme*.

Tabelle 4.2. Anteil glykosidischer Bindungen an Exopolysacchariden von *N. punctiforme* Wildtyp und *N. p. cph2(5-6)*. Pen, Pentose; Hex, Hexose; Glc, Glucose; Gal, Galaktose; Man, Mannose; *p*, Pyranoseform; *f*, Furanoseform; Sp, Spuren.

Permethyliertes Alditolacetat	<i>N. punctiforme</i> (Mol%)		glykosidische Bindung
	WT	cph2(5-6)	
2,3,5-Me₃-Pen_f	Sp	Sp	Pen _f -(1→
2,3,4-Me₃6-Deoxy-Hexp	3,2	2,0	Deoxy-Hexp-(1→
2,3,4,6-Me₄-Glc_p	7,8	6,4	Glc _p -(1→
2,3,4,6-Me₄-Man_p	1,9	3,1	Man _p -(1→
2,3,4,6-Me₄-Gal_p	6,5	4,7	Gal _p -(1→
3,4-Me₂6-Deoxy-Hexp	15,0	16,7	2→)-Deoxy-Hexp-(1→
2,3-Me₂-Pen_p	11,4	11,5	4→)-Pen _p -(1→
2,3,6-Me₃-Glc_p	45,4	46,3	4→)-Glc _p -(1→
2,3,4-Me₃-Gal_p	2,3	2,1	6→)-Gal _p -(1→
2,6-Me₂-Gal_p	5,3	6,4	3,4→)-Gal _p -(1→
2,3-Me₂-Glc_p	1,2	0,8	4,6→)-Glc _p -(1→

Diese vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass in *N. punctiforme* keine Beeinflussung der Zusammensetzung der Exopolysaccharide durch c-di-GMP stattfindet, jedoch führte ein höheres c-di-GMP-Level in den Zellen zu einer höheren Menge produzierter EPS. C-di-GMP stimuliert in vielen Bakterien die Synthese extrazellulärer Substanzen oder deren Abgabe in die EZM (Perez-Mendoza und Sanjuan, 2016). Üblicherweise sind die gegen Sauerstoff empfindlichen Heterozysten durch eine verdickte Zellmembran und eine spezielle EPS-Schicht vor dem Eindringen von Sauerstoff geschützt (Kumar *et al.*, 2010). Für das ebenfalls Heterozysten-differenzierende Cyanobakterium *Anabaena cylindrica* konnte die Zusammensetzung der Heterozysten-spezifischen Polysaccharid-Schicht (HEP-Schicht) ermittelt werden (Nicolalsen *et al.*, 2009). Die aus Mannose, Glucose, Galaktose und Xylose bestehenden Polysaccharide bilden eine mechanische Schutzschicht und eine Diffusionsbarriere gegen Sauerstoff (Cardemil und Wolk, 1979, Nicolalsen *et al.*, 2009). Diese Monosaccharid-Einheiten wurden ebenfalls in dieser Arbeit in den RPS von *N. punctiforme* und dem cph2(5-6)-Stamm gefunden. Die Bindungstypen der HEP-Schicht von *A. cylindrica* unterscheiden sich jedoch von den in *N. punctiforme* gefundenen Bindungstypen. Cardemil und Wolk (1979) beschreiben ein Polymer, das hauptsächlich aus (1→3)-Glucose und (1→3)-Mannose aufgebaut ist. Dieses Polymer ist außerdem deutlich stärker verzweigt, als das in dieser Arbeit analysierte Polymer. Dunn und Wolk (1970) stellten zudem fest, dass die EPS-Hülle der vegetativen Zellen eine größere Menge Xylose aber eine geringere Menge Glucose enthält, verglichen mit der

Heterozysten-spezifischen EPS-Hülle. Neben *A. cylindrica* wurden auch die Exopolysaccharide einer Reihe anderer Heterozysten-bildender Cyanobakterien analysiert, wobei deutlich wird, dass die Struktur der EPS sehr divers ist. Teilweise wurden auch die selben Bindungstypen wie in dieser Arbeit beschrieben (Garozzo *et al.*, 1998, Helm *et al.*, 2000, Volk *et al.*, 2007). Ebenso konnten Hinweise auf unterschiedliche EPS-Zusammensetzung verschiedener *N. punctiforme* Zell- bzw. Filamenttypen durch Schüßler *et al.* (1997) gefunden werden. Mittels Lektin-Bindungsanalyse konnte eine Hormogonien-spezifische EPS-Schicht visualisiert werden, welche im Besonderen Galaktose- und Fucose-Einheiten enthielt (Schüßler *et al.*, 1997). In dieser Arbeit wurde bei der Extraktion und Analyse der RPS von *N. punctiforme* nicht zwischen der Hülle vegetativer Zellen, Heterozysten oder Hormogonien unterschieden, sodass die Ergebnisse einen Mix aller Varianten darstellen können. Eine direkte Verbindung zwischen der Struktur der Exopolysaccharide von Heterozysten und der Sauerstoffdurchlässigkeit wurde bisher nicht beschrieben. Jedoch werden einige Exopolysaccharide, vornehmlich von Pilzen (Pullulan und Chitosan), in der Medizin- und Lebensmittelindustrie als essbare Umhüllungen von Kapseln verwendet, um den Inhalt vor Sauerstoff und damit verbundener Oxidation zu schützen (Ferreira *et al.*, 2016).

Obwohl keine eindeutige Verbindung zur Sauerstoffpermeabilität gezogen werden kann, wurde gezeigt, dass *N. p. cph2(5-6)* eine größere Menge dieser Exopolysaccharide produziert und trotz der gestörten Differenzierung von stickstofffixierenden Heterozysten unter diazotrophen Bedingungen ein zum Wildtyp vergleichbares Wachstum zeigt. Die höhere Menge sekretierter EPS in *N. p. cph2(5-6)* verringert dabei möglicherweise den Sauerstoffdruck, welcher von außen auf die Zellen wirkt. Gleichzeitig wird eine Fixierung von Stickstoff aber nicht verhindert. Eine Möglichkeit ist demnach, dass die Zellen trotz unvollständiger Differenzierung von Heterozysten durch die c-di-GMP induzierte EPS-Synthese einem geringeren Sauerstoffdruck ausgesetzt sind und so dennoch vermehrt Nitrogenase produzieren können.

4.1.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Überproduktion von c-di-GMP in *N. punctiforme* hat einen grundlegenden Einfluss auf die Reaktion gegenüber externen Signalen und die damit verbundene Zelldifferenzierung. In der in dieser Arbeit erstellten Mutante *N. p. cph2(5-6)* führte ein artifiziell erhöhtes c-di-GMP-Level in den Zellen zur Ausbildung eines sessilen Lebensstils durch Hemmung der Differenzierung motiler Hormogonien und vermehrte Produktion von EPS. Außerdem

zeigte *N. p. cph2(5-6)* eine erhöhte Expression des Nitrogenase-Gens *nifH*, obgleich die Menge differenzierter Heterozysten, gemessen anhand der Expression des Heterozysten-Gens *hetR*, im Vergleich zum Wildtyp nicht erhöht war. Sichtbar waren weder ausdifferenzierte Heterozysten noch Hormogonien. *N. p. cph2(5-6)* konnte keine beweglichen Strukturen ausbilden, was in einer veränderten Biofilm-Morphologie resultierte und die Phototaxis verhinderte. Die alleinige Quantifizierung von *nifH* ermöglicht jedoch kein abschließendes Urteil, ob der Nitrogenase-Komplex vollständig synthetisiert wurde, und ob die Nitrogenase in den Zellen aktiv ist. Dies könnte man zukünftig über die Messung der Stickstofffixierung bestimmen. Ebenso kann aus der alleinigen Quantifizierung des frühen Heterozysten-Gens *hetR* nicht sicher geschlossen werden, dass es sich bei den Zellen der Mutante um unreife Heterozysten handelt. Es könnte sich genauso um Hormogonien oder eine Mischung beider Zelltypen handeln, denn in beiden Zelltypen wird *nifH* exprimiert (Christman *et al.*, 2011). Um einen genaueren Einblick zu bekommen, müsste die Expression einer Reihe weiterer, für die Differenzierung von Hormogonien und Heterozysten bedeutender, Gene untersucht werden. Eine *Microarray*-Analyse, wie sie von Christman *et al.* (2011) durchgeführt wurde, würde sich für die gleichzeitige Untersuchung vieler Gene eignen. Mit dieser Analyse könnte man ebenfalls eine mögliche c-di-GMP-induzierte Hochregulierung von Genen untersuchen, die in *N. punctiforme* für die EPS-Synthese oder -Abgabe verantwortlich sein könnten. Einen Hinweis auf die Beteiligung von c-di-GMP im Lebenszyklus von *N. punctiforme* lieferte zudem die Tatsache, dass auch c-di-GMP im Wildtyp gemessen werden konnte. Jedoch war dies nur in einer Probe und in sehr geringer Konzentration möglich. Die natürlichen c-di-GMP-Level schwanken im Laufe der bakteriellen Wachstumsphasen (Spangler *et al.*, 2010). Eine gezielte c-di-GMP-Quantifizierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Lebenszyklus des Wildtyps könnte möglicherweise einen Zeitpunkt liefern, zu dem der Botenstoff zuverlässig detektierbar wäre. Auch die c-di-GMP-Level unter dem Einfluss unterschiedlicher Lichtqualitäten sollte in diese Untersuchungen einbezogen werden, denn schon Agostoni *et al.* (2013) konnten sowohl für ein unizelluläres, als auch für ein filamentöses Cyanobakterium eine von der Lichtqualität abhängige intrazelluläre c-di-GMP-Konzentration nachweisen.

4.2 Isolierung und Charakterisierung der Exopolysaccharide und Exoproteine von *Knufia petricola*

Gesteinsbewachsende mikrokoloniale Pilze, zu denen auch *Knufia petricola* zählt, gehören zu den stresstolerantesten Organismen der Erde (Gorbushina, 2003, Zakharova *et al.*, 2013). In die Zellwand eingelagertes Melanin und die Produktion von EPS sind Strategien, um auch extreme Umweltbedingungen tolerieren zu können. Eine bereits durch Gorbushina *et al.* (2008) visualisierte, ausgeprägte EPS-Schicht von *K. petricola* wurde bisher weder extrahiert noch strukturell charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Methode zur quantitativen Isolierung der EPS gefunden, und eine strukturelle Analyse der isolierten Exopolysaccharide durchgeführt werden. Da sowohl Melanin und Carotinoiden als auch den EPS, im Besonderen den Exopolysacchariden, eine bedeutende Rolle bei der Stresstoleranz zugesprochen wird (Fernandez und Koide, 2013, Gao *et al.*, 2015, Tseng *et al.*, 2011), wurde zudem analysiert, ob sich die Menge der EPS oder die Art der Exopolysaccharide bei Verlust des Melanins ändern. Dazu wurden neben dem Wildtyp auch sechs bereits vorhandene Pigmentmutanten in die EPS Analysen einbezogen. Neben der visuellen Darstellung der gesamten EZM durch REM und deren Quantifizierung, wurden die Exopolysaccharide einer strukturellen Analyse mittels Gaschromatografie-Massenspektrometrie unterzogen. Im Rahmen der EPS-Charakterisierung wurden zudem erste Untersuchungen zu möglichen Extraktionsmethoden extrazellulärer Proteine und deren Identifizierung durchgeführt.

4.2.1 Visualisierung, Extraktion und Quantifizierung der EPS

Viele Studien beschreiben die Extraktion und Charakterisierung von Exopolysacchariden aus unterschiedlichen Pilzen. Dabei steht jedoch oftmals die Optimierung von Produktionsraten ausgehend von Suspensionskulturen im Vordergrund (Mahapatra und Banerjee, 2013). Die Nutzung von Suspensionskulturen hat den Vorteil, dass die zu untersuchenden Exopolysaccharide mit relativ geringem Aufwand in großen Mengen produziert werden können. Dies ist vor allem für industrielle Anwendungen unabdingbar. Bei *K. petricola* handelt es sich jedoch um einen gesteinsbewachsenden Pilz, der, als Gemeinschaft mit anderen Organismen, maßgeblich an Verwitterung und Biodeterioration unter Einsatz seiner EPS beteiligt ist (Gorbushina und Broughton, 2009, Noack-Schonmann *et al.*, 2014b, Seiffert *et al.*, 2016). Aufgrund der Bedeutsamkeit des

Ergebnisse und Diskussion

Pilzes innerhalb von Biofilm-Gemeinschaften, und trotz des Nachteils einer deutlich geringeren Ausbeute, sollten die EPS nicht aus Suspensionskulturen, sondern aus Biofilmen extrahiert und analysiert werden. Wie aus Abbildung 4.17 ersichtlich wird, erscheint die Oberfläche des *K. petricola* Biofilms eher trocken. Auch in Suspensionskultur gibt der Pilz sichtbar kaum EPS in das Medium ab, es bleibt weitestgehend klar. Des Weiteren war das Entfernen des Biofilms von dem Filter durch Abkratzen beim Wildtyp und allen Melanin-produzierenden Stämmen schwierig, da sie sehr stark am Untergrund zu haften schienen und sehr trocken waren. Im Gegensatz dazu ließen sich die Biofilme der Melaninmutanten Δpks und $\Delta pks/\Delta pdg$ bzw. $pm9/\Delta pdg$ problemlos entfernen. Dies deutet darauf hin, dass die Melanin-produzierenden Stämme (inkl. Δsdh) die Fähigkeit haben, in die Oberfläche einzudringen, während die Melaninmutanten diese Eigenschaft verloren zu haben scheinen. Es ist bekannt, dass Melanin die Fähigkeit zur Infektion und Penetration der Wirtszelle in phytopathogenen schwarzen Pilzen maßgeblich beeinflusst (Butler *et al.*, 2005). Möglicherweise spielt es auch eine Rolle bei der Substratpenetration gesteinsbewachsender Pilze. Auch die Morphologie der Melanin-produzierenden Biofilme auf den Cellulose Acetat-Filtern unterschied sich von der der Melaninmutanten. Die Biofilmstruktur war weniger flach, diese Stämme wuchsen schneller und stärker in die Höhe, wohingegen die Biofilme der Melaninmutanten sich lediglich an den Rändern wölbten und insgesamt eine „cremige“ Konsistenz aufwiesen. Der Stamm Δsdh , welcher eine wasserlösliche braune Melanin-Vorstufe produziert, stellte dabei eine Zwischenstufe dar. Dieser ließ sich schwerer vom Filter entfernen als die Melaninmutanten, war aber weder so trocken wie Wildtyp und Δpdg noch so „cremig“ wie Δpks , $\Delta pks/\Delta pdg$ und $pm9\Delta pdg$.

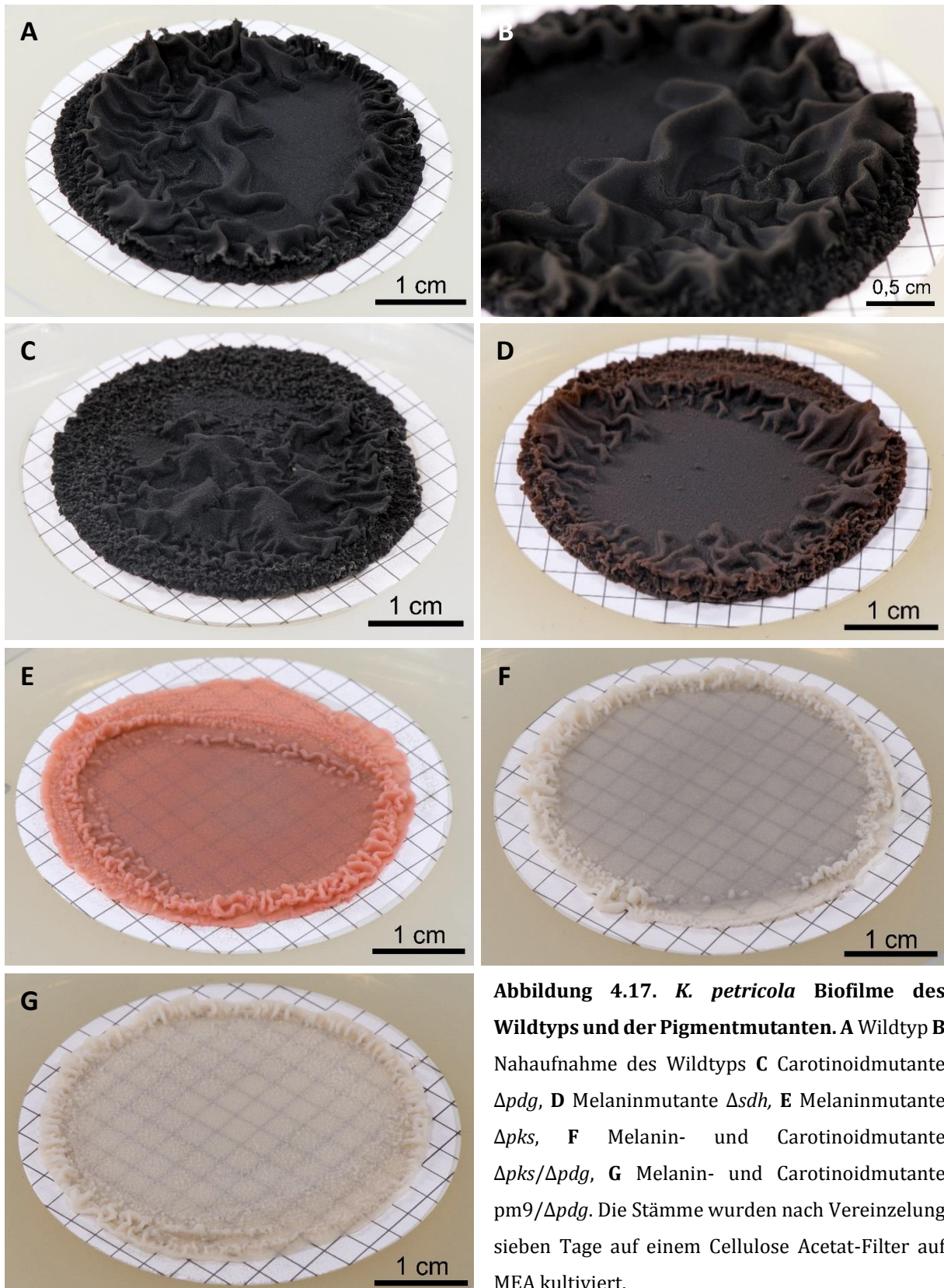


Abbildung 4.17. *K. petricola* Biofilme des Wildtyps und der Pigmentmutanten. A Wildtyp B Nahaufnahme des Wildtyps C Carotinoidmutante Δpdg , D Melaninmutante Δsdh , E Melaninmutante Δpks , F Melanin- und Carotinoidmutante $\Delta pks/\Delta pdg$, G Melanin- und Carotinoidmutante $pm9/\Delta pdg$. Die Stämme wurden nach Vereinzlung sieben Tage auf einem Cellulose Acetat-Filter auf MEA kultiviert.

Nahaufnahmen der Biofilme offenbarten jedoch trotz der eher trocken erscheinenden Oberfläche der Melanin-Stämme eine deutliche Menge extrazellulärer Matrix in den Biofilmen, welche in den Melanin-Mutanten noch stärker ausgeprägt war (Abb. 4.18). Neben einem Einblick in die Struktur des Biofilms mittels Raster-Elektronenmikroskopie (REM) sollten auch zwei unterschiedliche Probenvorbereitungen für die REM, die Kritisch-Punkt-Trocknung und Kryo-REM, verglichen werden. Die bei der Kryo-REM im Mikroskop vorherrschenden Temperatur- und Druckverhältnisse führen dazu, dass das in den Proben enthaltene Wasser gasförmig vorliegt. Starkes Abkühlen verlangsamt zudem den Phasenübergang des Wassers. Das sofortige Schockfrostern der Proben sowie die Weiterverarbeitung unter kalten Bedingungen verhindert, dass sich Eiskristalle bilden und es im Verlauf der Analysen zur Veränderung der Probe oder zu Oberflächenverzerrungen kommen kann. Die Kryo-REM erlaubt es daher, wasserhaltige und sensible Proben in ihrem natürlichen unveränderten Zustand zu betrachten. Auch die Kritisch-Punkt-Trocknung stellt eine Methode zur schonenden Vorbereitung der Proben für REM dar. Um die Oberflächenspannung des Wassers zu vermeiden, welche die Struktur der Probe schädigen würde, wird das Wasser gegen eine Flüssigkeit mit geringerer Oberflächenspannung ausgetauscht (z.B. Ethanol). Diese wird dann durch flüssiges CO₂ ersetzt (bereits flüssig bei 55 bar und Raumtemperatur). Das CO₂ wiederum wird daraufhin jenseits seines „kritischen Punktes“ bei einer Temperatur von ca. 31°C und entsprechendem Druck von 73 bar getrocknet (Romeis, 2015).

Bei allen Stämmen, besonders aber bei Wildtyp (Abb. 4.18A-B), der Δpdg Mutante (Abb. 4.18C-D) und der pm9 Δpks Mutante (Abb. 4.18K-L) war ein deutlicher Unterschied der beiden Methoden sichtbar. Nach der Durchführung der Kritisch-Punkt-Trocknung der Proben erschienen, besonders deutlich sichtbar bei Wildtyp und Δpdg Mutante, spinnwebartige Fäden, die wie ein Netz über die Zellen gelegt schienen. Im Gegensatz dazu war nach Kryo-REM eine deutliche, intakte EPS-Schicht zu erkennen. Zudem wurden EPS-Stränge zwischen den Zellen sichtbar, die scheinbar die Zellen und den Biofilm zusammenhielten. Bei der auf der Spontanmutante pm9 basierenden Mutante pm9/ Δpdg war die EPS nach Kritisch-Punkt-Trocknung nur noch in Spuren zu erkennen (Abb. 4.18K). Mittels Kryo-REM war dagegen eine sehr große Menge extrazellulärer Substanzen erkennbar, die nur lose gebunden waren (Abb. 4.18L). Eine vergleichbare Menge EPS war im Wildtyp und Δpdg Mutante sichtbar. Im Vergleich dazu war eine größere Menge EPS in den Biofilmen der Mutanten Δpks , Δsdh , $\Delta pks/\Delta pdg$ und pm9/ Δpdg vorhanden. Letzterer war zudem der einzige Stamm, bei dem die EPS eine poröse und

lockere Struktur aufwies. Bei allen anderen Stämmen konnte man eine fest an die Zellen gebundene EPS beobachten, welche bei Stämmen mit erhöhter EPS-Menge zusätzlich deutlich ausgeprägte schleimartige Stränge zwischen den Zellen ausbildeten. Die veränderten Eigenschaften der EPS in der Mutante pm9/ Δpdg kann dazu geführt haben, dass diese weniger stabil in der Aufarbeitungsprozedur der Kritisch-Punkt-Trocknung waren und dabei möglicherweise entfernt wurden. Dafür spricht auch, dass dieser Biofilm der einzige war, welcher während des Prozesses die Haftung zum Filter verloren hat. Der Biofilm lag in der Lösung größtenteils separat vom Filter vor. Da der EZM die Anheftung an das Substrat zugesprochen wird, könnte der Verlust derselben zu einer Verminderung der Haftung geführt haben. Die Ergebnisse deuten insgesamt darauf hin, dass sich die Probenvorbereitung mittels Kritisch-Punkt-Trocknung nur bedingt zur gezielten Analyse von EPS eignet. Die EPS wurde bei den anderen Stämmen während der Vorbereitung nicht entfernt. Jedoch zeigte sich, dass sich aufgrund der Vorbehandlung die Struktur der EZM unter Umständen verändern kann und ein verfälschtes Bild der Biofilmarchitektur geliefert wird. Für die Betrachtung in der Regel sehr wasserreicher Biofilme ist stattdessen die Nutzung der Kryo-REM zu bevorzugen, da diese den Blick auf einen unveränderten Zustand des Biofilms ermöglicht.

Nach der angesprochenen Entfernung der EPS-Schicht wurde eine weitere Besonderheit der Mutante pm9/ Δpdg sichtbar (Abb. 4.18K). Die Mutante zeichnet sich durch eine längliche Zellform aus, wobei die einzelnen Zellen filamentartig angeordnet sind und untereinander verbunden zu sein scheinen. Dieser Stamm basiert auf der Mutante pm9, welche eine die Melanin-Synthese betreffende Mutation spontan ausgebildet hat. Die abweichende Zellform deutet auf weitere spontane Mutationen im Genom hin, welche jedoch nicht bekannt sind. Diese könnten auch einen Einfluss auf die Struktur der EPS haben. Zur Klärung des genetischen Hintergrundes dieses Phänotyps könnte die Sequenzierung des Genoms herangezogen werden.

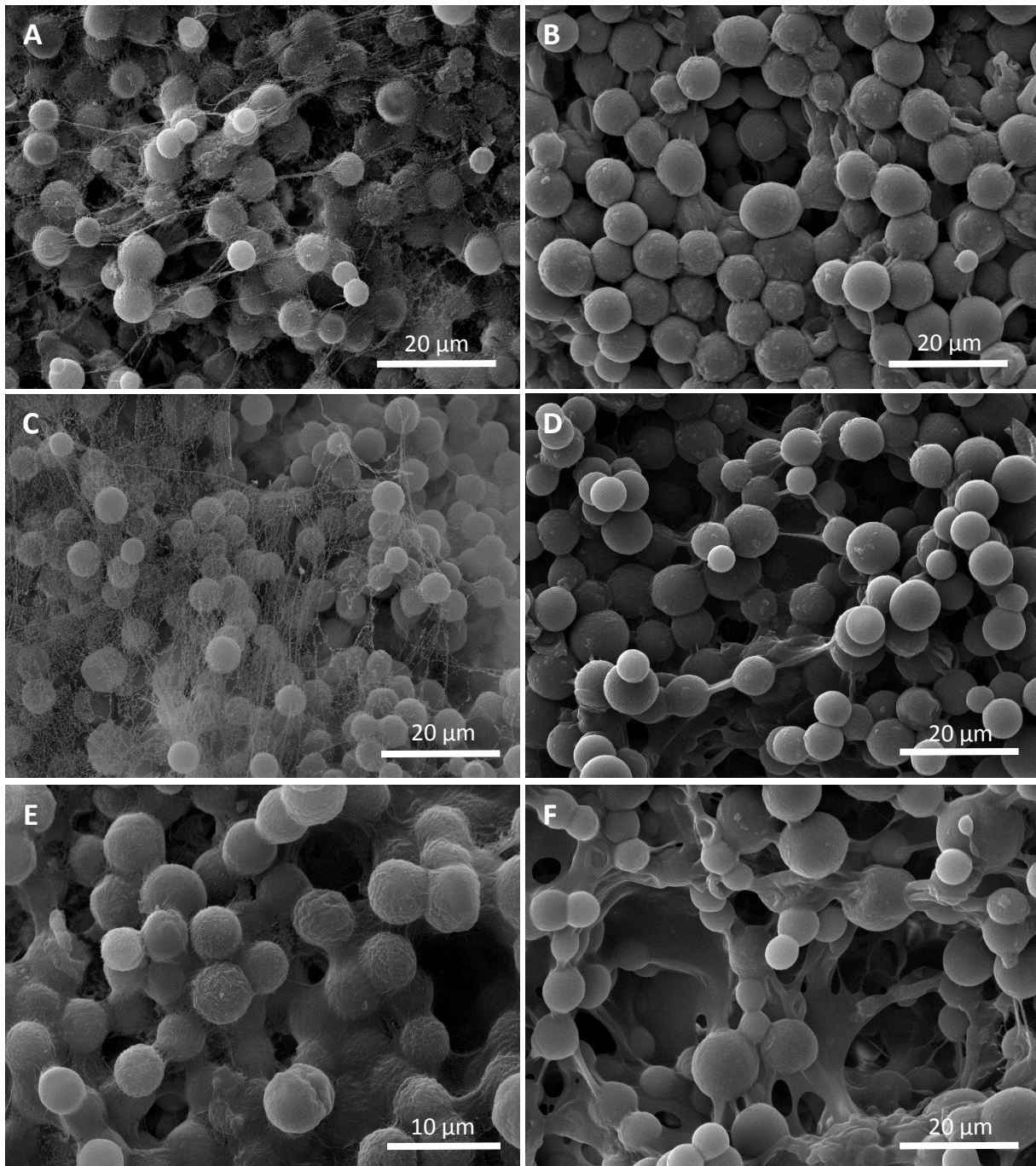


Abbildung 4.18. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen des *K. petricola* Wildtyps und der Pigmentmutanten. A/B Wildtyp, C/D Δpdg , E/F Δsdh , G/H Δpks , I/J $\Delta pks/\Delta pdg$, K/L $pm9/\Delta pdg$. Für sieben Tage auf MEA/Cellulose Acetat-Filter kultivierte Biofilme wurden abgekratzt und mit Kritisch-Punkt-Trocknung vorbereitet (links) oder ohne weitere Vorbehandlung direkt auf dem Filter mit Kryo-REM analysiert (rechts). (Fortsetzung auf nächster Seite)

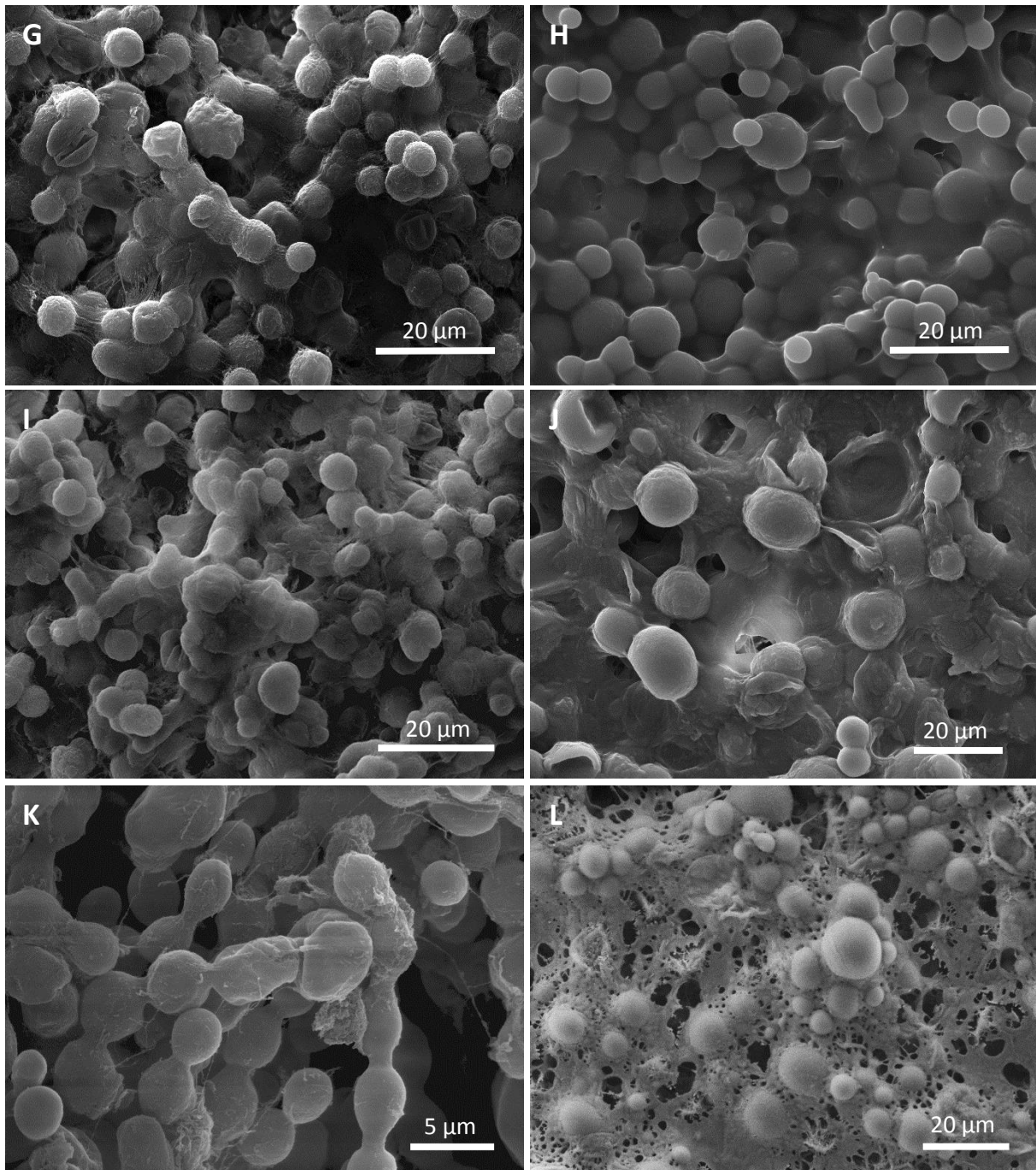


Abbildung 4.18. Fortsetzung

Viele Organismen, deren EZM intensiv untersucht wurde, zeichnen sich dadurch aus, dass die EPS in zwei bis drei mehr oder weniger abgrenzbare Fraktionen unterteilt werden können. EPS, die in das umliegende Medium abgegeben werden und somit frei vorliegen werden dabei häufig als *soluble* oder *released* EPS (SPS oder RPS) bezeichnet. Weiterhin wird gelegentlich auch in *loosely bound* EPS (LPS), für eher locker an die Zellen gebundene, und *tightly bound* EPS (TPS), für fest an die Zellen gebundene EPS, unterschieden. Ein bekannter Vertreter unter den schwarzen Pilzen, dessen EPS in das

Medium abgegeben wird und eine eher „schleimige“ Konsistenz hat, ist *Aureobasidium pullulans*. Dieser ebenfalls melanisierte hefe-ähnliche Pilz produziert das Exopolysaccharid Pullulan in großen Mengen (Prajapati *et al.*, 2013). Im Gegensatz dazu bildet *K. petricola* fest gebundene EPS, was eine aktive Ablösung der Bestandteile von den Zellen erfordert. Eine bedeutende Abgabe von EPS in das Kulturmedium konnte nicht festgestellt werden. Außerdem bietet sich die Unterscheidung unterschiedlich stark gebundener EPS eher bei der Untersuchung von Suspensionskulturen an. Deswegen wurden in dieser Arbeit alle extrazellulären Substanzen von *K. petricola* A95 als TPS betrachtet. In der Literatur werden verschiedene physikalische und chemische Extraktionsmethoden beschrieben, wobei auch hier in freie, locker gebundene und fest gebundene EPS unterschieden wird (Pellicer-Nacher *et al.*, 2013). Physikalische Methoden umfassen Zentrifugation bei hohen Drehzahlen, Ultraschall und Erhitzen; chemische Methoden die Ablösung durch EDTA oder NaOH sowie mittels Kationenaustauscher. Die Menge der EPS insgesamt, aber auch der Bestandteile im Einzelnen, hängt stark von der Extraktionsmethode ab (Liu und Fang, 2002). Bei chemischen Methoden ist diese Menge deutlich höher im Vergleich zu den physikalischen Methoden (Comte *et al.*, 2006), jedoch führt die chemische Ablösung häufig auch zu einer höheren Zahl lysierter Zellen und damit zu Kontaminationen mit intrazellulärem Material. Dieser Umstand kann die Information über die Menge und Charakteristika der extrahierten EPS verzerren und die folgende Quantifizierung der einzelnen Substanzen beeinflussen (Pellicer-Nacher *et al.*, 2013).

K. petricola Zellen zeichnen sich durch eine relativ hohe Zellwand- und Melanin-vermittelte Stabilität aus. Aufgrund dieser Stabilität und weil chemische Extraktionsmethoden größere EPS-, besonders aber größere Exopolysaccharid-Mengen liefern, wurde für die Extraktion der *K. petricola* EPS die basische Extraktion mit NaOH und Formaldehyd gewählt. Liu und Fang (2002) extrahierten mit dieser Methode im Vergleich zu anderen Methoden aus Schlammproben hohe Mengen aller EPS Bestandteile, vor allem Kohlenhydrate und Proteine. Funktionelle Gruppen wie Amine in Proteinen oder Carboxylgruppen in Kohlenhydraten und Proteinen besitzen pK_a Werte, die sich geringfügig unter einem pH-Wert von elf befinden (Pellicer-Nacher *et al.*, 2013). Eine Erhöhung des pH-Werts der Lösung durch NaOH führt somit zur Dissoziation dieser Gruppen in den EPS, sodass sie abgelöst werden. Zudem wird die Löslichkeit in Wasser erhöht, sodass höhere Mengen extrahiert werden können (Liu und Fang, 2002, Wingender *et al.*, 1999). Formaldehyd fixiert dabei die Zellen und verhindert in geringen

Konzentrationen die Zellyse, indem es mit Amino-, Carbonyl-, Hydroxyl- und Sulfhydrylgruppen von Proteinen und Nucleinsäuren der Zelloberfläche reagiert (Pommerville und Alcamo, 2004). Um den Grad der Zellyse zu ermitteln, wird häufig die Bestimmung der Aktivität des intrazellulären Enzyms Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) oder die Menge an DNA in den EPS-Extrakten herangezogen (Frolund *et al.*, 1996, Liu und Fang, 2002). Jedoch sind beide Methoden nur bedingt zur Beurteilung anwendbar. Das Enzym G6PDH unterliegt während der Extraktion und Lagerung der Extrakte leicht der Denaturierung, sodass die Zahl lysierter Zellen unterschätzt werden kann. Zudem wurde gezeigt, dass DNA, neben Proteinen und Kohlenhydraten, ein großer Bestandteil der EPS-Matrix sein kann (Dominiak *et al.*, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde stattdessen nach jeder EPS-Extraktion mikroskopisch überprüft, ob die Zellen noch intakt waren. Zur Quantifizierung der EPS wurde die Trockenmasse der extrahierten EPS bestimmt und auf die Trockenmasse der jeweiligen Zellpellets bezogen. Ein Bezug auf die Zellzahl war insofern schwierig, als das die Auszählung von *K. petricola* Zellen in einer Zählkammer nur sehr ungenau erfolgen kann, da der Pilz Zellklumpen bildet, die auch durch mechanische Vereinzelung nicht vollständig aufgelöst werden können.

Von *K. petricola* A95 Wildtyp, kultiviert als Biofilm auf Vollmedium mit Glucose als Kohlenstoff-Quelle, konnten 102,8 mg (\pm 3,5 mg) EPS extrahiert werden. Da in den meisten Studien EPS aus Flüssigkulturen extrahiert und quantifiziert wurde, kann die EPS-Menge nicht direkt mit der durch andere Pilze produzierten Menge verglichen werden. Mahapatra und Banerjee (2013) und Osinska-Jaroszuk *et al.* (2015) geben jedoch eine Übersicht über EPS-Mengen in mg/L verschiedener anderer Pilze. Dabei wird vor allem deutlich, dass die EPS-Produktionsrate von vielen Faktoren abhängt. Je nach Zusammensetzung des Mediums, Art der Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle und der Kulturbedingungen (pH-Wert, Temperatur, Dauer etc.) kann die Menge stark variieren (Mahapatra und Banerjee, 2013). Demnach stellt die ermittelte EPS-Menge von *K. petricola* einen auf die genutzten Kulturbedingungen bezogenen Wert dar, welcher bei Änderungen ebenjener deutlich abweichen kann.

Eine zum Wildtyp vergleichbare EPS-Menge von 106,9 mg (\pm 16 mg) wurde von der Δpdg Mutante produziert. Die Stämme Δpks und $\Delta pks/\Delta pdg$ produzierten dagegen eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Menge EPS von 188,6 mg (\pm 31,5 mg) und 202 mg (\pm 13,21 mg). Aus der Δsdh Mutante wurden 136 mg (\pm 23,2 mg) EPS extrahiert (Abb. 4.19). Die Mutante pm9/ Δpdg lieferte 164,5 mg (\pm 47,8 mg) EPS. Bei diesem Stamm

Ergebnisse und Diskussion

zeigten sich zudem hohe Abweichungen der Extraktionsmenge in den einzelnen Durchgängen. Bereits bei der Probenvorbereitung und Visualisierung mit REM wurde deutlich, dass die EPS dieser Mutante empfindlicher gegenüber der chemischen Aufarbeitung ist. Die starken Schwankungen können sich demnach mit einem unterschiedlich stark ausgeprägten Verlust der EPS während der Extraktion erklären lassen. Außerdem gab die Spontanmutante pm9, die dieser Mutante zugrunde liegt, weniger EPS ab ($78,99 \text{ mg} \pm 12,89 \text{ mg}$) als der Wildtyp. Die unbekanntenen Mutationen dieses Stammes resultieren offenbar, neben der Unterbrechung der Melanin-Synthese, in einer verminderten EPS-Produktionsrate. Die erhöhte EPS-Synthese in den Mutanten Δpks und $\Delta pks/\Delta pdg$ lassen hingegen vermuten, dass die Menge produzierter EPS von der Fähigkeit zur Melanin-Produktion abhängig ist.

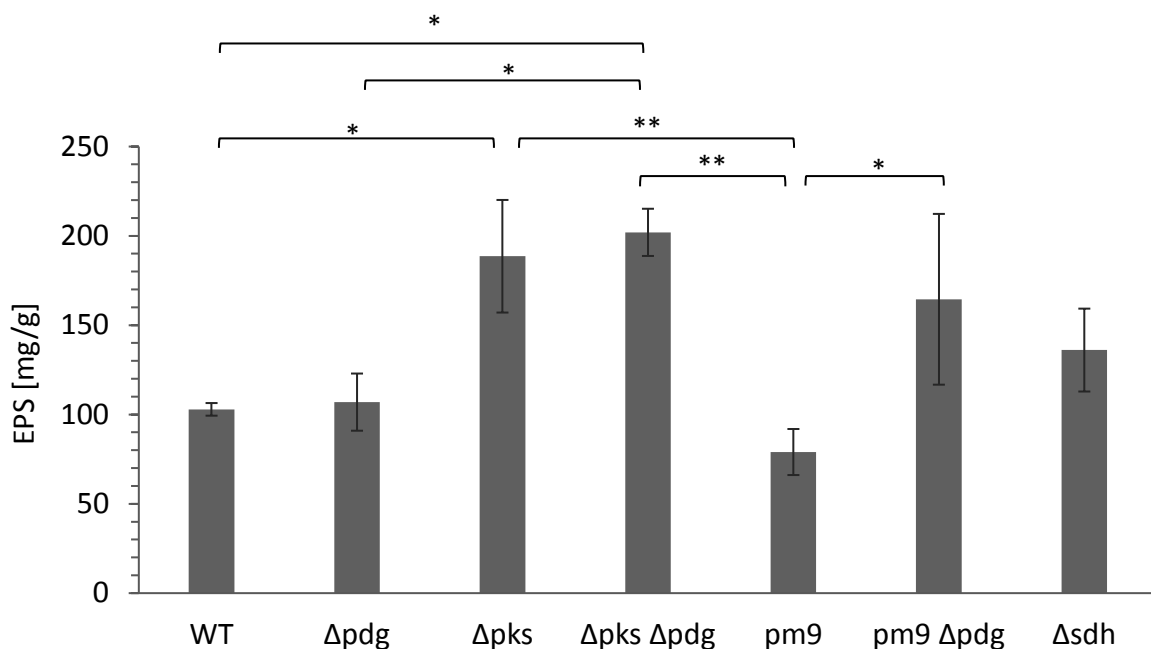


Abbildung 4.19. EPS-Menge produziert von *K. petricola* Wildtyp und Pigmentmutanten. EPS wurden von Biofilmen (auf Filter) nach sieben Tagen Inkubation auf MEA mit NaOH/Formaldehyd extrahiert. Das Trockengewicht aller extrahierten EPS wurde bestimmt und auf das Trockengewicht der zurückgebliebenen Zellpellets bezogen, $n=3$, $**p<0,01$, $*p<0,05$.

Melanin kann den Organismus vor vielfältigen umweltbedingten Stressfaktoren, wie extremen Temperaturen (Robinson, 2001, Rosas und Casadevall, 1997), sehr hohem Salzgehalt der Umgebung (Kejzar *et al.*, 2013), Metalltoxizität (Gadd und Derome, 1988) und osmotischem Stress sowie Austrocknung (Fernandez und Koide, 2013) schützen. Aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften schirmt es den Organismus zudem vor

ionisierter Strahlung ab (Eisenman und Casadevall, 2012). Ähnliche Schutzfunktionen konnten auch für die extrazelluläre Matrix verschiedener Mikroorganismen nachgewiesen werden. Extrazelluläre Proteine und Polysaccharide, aber auch DNA schützen mikrobielle Biofilme durch Wasserspeicherung vor Austrocknung, bilden eine Barriere gegen antimikrobielle oder infektiöse Substanzen sowie toxische Metallionen und akkumulieren Nährstoffe aus der Umwelt (Flemming, 2017). Bei der *K. petricola* Mutante Δpks wurde durch Ausschalten der Polyketid-Synthase der Melanin-Syntheseweg unterbrochen. Bei dieser Mutante, welche noch Carotinoide produziert, und bei den pigmentfreien $pm9\Delta pdg$ und $\Delta pks/\Delta pdg$ Mutanten fehlt die schützende Funktion von Melanin, sodass diese Stämme einer erhöhten Gefahr durch Umweltschädigungen ausgesetzt sind. Dies kann möglicherweise durch vermehrte Produktion von EPS kompensiert werden. Beide Mutanten bilden annähernd doppelt so viele EPS, wie der melanisierte Wildtyp. Die ebenfalls melanisierte Δpdg Mutante, bei der lediglich die Carotinoid-Synthese ausgeschaltet ist, gab ebenso viele EPS ab, wie der Wildtyp. Dass der Phänotyp der Δsdh Mutation zwischen dem des Wildtyps und der Δpks Mutante liegt, spiegelt auch die EPS-Produktionsrate zwischen beiden genannten Stämmen wider. Diese Mutante kann lediglich die braune Melanin-Vorstufe Scytalon herstellen, welche im Gegensatz zu Melanin wasserlöslich ist und in den extrazellulären Raum entweicht. Funktionen, welche durch Melanin erfüllt werden, werden möglicherweise in reduziertem Umfang auch von dieser Vorstufe bereitgestellt. In Kombination mit einer geringfügig erhöhten EPS-Produktion könnte dieser Stamm dann seinen Schutz vor Umwelteinflüssen wiederherstellen. Da die Menge der extrahierten EPS auf das Trockengewicht der Zellen normalisiert wurde, kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass dies die Quantifizierung der EPS verzerrt hat. Das Gewicht der pigmentdefizienten Stämme könnte sich aufgrund der fehlenden Pigmente zu dem Gewicht des Wildtyps unterscheiden, jedoch erscheinen die Zellen der untersuchten Stämme unter dem Mikroskop gleich groß, die Zellen der farblosen Mutanten sogar geringfügig größer im Vergleich zum Wildtyp. Die Extraktion und Charakterisierung der verschiedenen Melanin-Arten ist grundsätzlich möglich, aber aufgrund der teilweise aggressiven Extraktionsmethoden und der eingeschränkten Löslichkeit ist eine quantitative Extraktion schwierig (Raman und Ramasamy, 2017, Selvakumar *et al.*, 2008).

4.2.2 Strukturelle Charakterisierung

4.2.2.1 FTIR

Die Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie wird zur quantitativen Bestimmung bekannter Substanzen sowie zur Identifikation unbekannter Substanzen genutzt, indem ein Interferogramm von der Probe aufgenommen wird, welches dann über Fourier-Transformation in ein Infrarotspektrum umgerechnet wird. Die Methode beruht auf der Stimulation von Schwingungen in der Probe, wobei einzelne Verbindungen in charakteristischen Frequenzen schwingen. Anhand eines „Fingerabdruck“-Bereichs bei $1500 - 600 \text{ cm}^{-1}$ können Substanzen identifiziert werden. Dies funktioniert jedoch nur bei reinen Substanzen. Bei Substanzgemischen kann aufgrund von Schwingungen charakteristischer Gruppen lediglich die Zugehörigkeit zu Stoffklassen bestimmt werden.

Die FTIR-Spektren der Extrakte des *K. petricola* A95 Wildtyps sowie der Pigmentmutanten zeigten die für EPS typischen funktionellen Gruppen (Abb. 4.20). Die Spektren der weißen Mutanten $\text{pm9}/\Delta\text{pdg}$ und $\Delta\text{pks}/\Delta\text{pdg}$ stimmten in ihren *peak*-Maxima nahezu überein, sodass im Folgenden nur das Spektrum von $\Delta\text{pks}/\Delta\text{pdg}$ exemplarisch besprochen wird. Eine ausgedehnte Bande bei $3305 - 3262 \text{ cm}^{-1}$ repräsentiert die Streckungsschwingung der Hydroxylgruppen von Kohlenhydraten, sowie der Aminogruppen von Proteinen (Fang *et al.*, 2014, Liang *et al.*, 2010). Eine schwache Absorptionsbande bei $2936 - 2888 \text{ cm}^{-1}$ kann der asymmetrischen C-H Streckungsschwingung der aliphatischen CH_2 -Gruppe (Liang *et al.*, 2010), die Banden um $1661 - 1552 \text{ cm}^{-1}$ den C=O, C=N und C-N Schwingungen der Amide I und II bei Anwesenheit von Proteinen zugeordnet werden (Fang *et al.*, 2014). Weitere charakteristische Banden von Kohlenhydraten bei $1440 - 1350 \text{ cm}^{-1}$ resultieren aus der Beugungsschwingung der C-H Bindung von CH_2 - und CH_3 -Gruppen (Mota *et al.*, 2013). Im Spektrum der Wildtyp EPS befindet sich das Bandenmaximum bei 1429 cm^{-1} , während es bei allen Pigmentmutanten auf $1375 \text{ cm}^{-1} \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ verschoben ist. Die C=O Streckungsschwingung, welche durch Uronsäuren hervorgerufen wird ($\sim 1730 \text{ cm}^{-1}$, wenn vorhanden), konnte nicht detektiert werden (Mota *et al.*, 2013). Im Spektrum der Wildtyp EPS entsprechen eine starke Bande bei 1021 cm^{-1} und eine schwache Bande bei 1150 cm^{-1} der C-O-C Streckungsschwingung von Kohlenhydraten (Fang *et al.*, 2014). Eine vergleichbare starke Bande mit einem Maximum bei 1029 cm^{-1} findet sich auch im Spektrum der Δpdg Mutante. Auffällig ist jedoch, dass dieses Maximum bei den weiteren Mutanten verschoben ist. In der Δpks Mutante liegt es bei 1075 cm^{-1} , in der $\Delta\text{pks}/\Delta\text{pdg}$

Mutante bei 1080 cm^{-1} und in der Δsdh Mutante bei 1082 cm^{-1} . Bei der spektroskopischen Untersuchung verschiedener pflanzlicher Polysaccharide und Monosaccharide konnten bereits Kacurakova *et al.* (2000) zeigen, dass jedes Polysaccharid, abhängig von seiner jeweiligen Monosaccharid-Zusammensetzung, im Bereich $1200 - 1000\text{ cm}^{-1}$ spezielle Bandenmaxima zeigt, die eine Identifizierung ermöglichen. Cerna *et al.* (2003) bestätigten dies und geben für Galaktose einen Bandenbereich von $1100 - 1030\text{ cm}^{-1}$ mit einem Maximum bei 1068 cm^{-1} an. Mannose zeigt ein Maximum bei 1072 cm^{-1} und 1033 cm^{-1} , Banden für Glucose liegen hauptsächlich im Bereich $1030 - 944\text{ cm}^{-1}$ (Cerna *et al.*, 2003). Da bei den Spektren des Wildtyps und der Δpdg Mutante die Bandenmaxima bei $1025\text{ cm}^{-1} \pm 4\text{ cm}^{-1}$ liegen, ist in diesen Spektren Glucose vermutlich das Monosaccharid mit dem größten Anteil am Exopolysaccharid. Eine Verschiebung des Bandenmaximums bei den Melaninmutanten in den Bereich von Galaktose/Mannose deutet darauf hin, dass der Anteil dieser Monosaccharide in den EPS deutlich erhöht ist. Einen Hinweis auf die Konfiguration der glykosidischen Bindungen innerhalb der Kohlenhydrate geben die Banden zwischen 900 cm^{-1} und 800 cm^{-1} . Banden bei $897 - 871\text{ cm}^{-1}$ lassen auf eine β -glykosidische Bindung schließen, Banden bei $844 - 835\text{ cm}^{-1}$ auf eine α -glykosidische Bindung (Farina *et al.*, 2009). Beide Arten sind in allen Stämmen zu finden. Die Ergebnisse zeigen, dass in den EPS von *K. petricola* A95 neben Kohlenhydraten auch Proteine, jedoch keine Uronsäuren nachweisbar waren. Die Monosaccharid-Einheiten sind sowohl über α - als auch über β -glykosidische Bindungen verknüpft. Zudem geben die IR-Spektren einen ersten Hinweis auf eine Veränderung der Monosaccharid-Zusammensetzung in den Exopolysacchariden der Melaninmutanten.

Ergebnisse und Diskussion

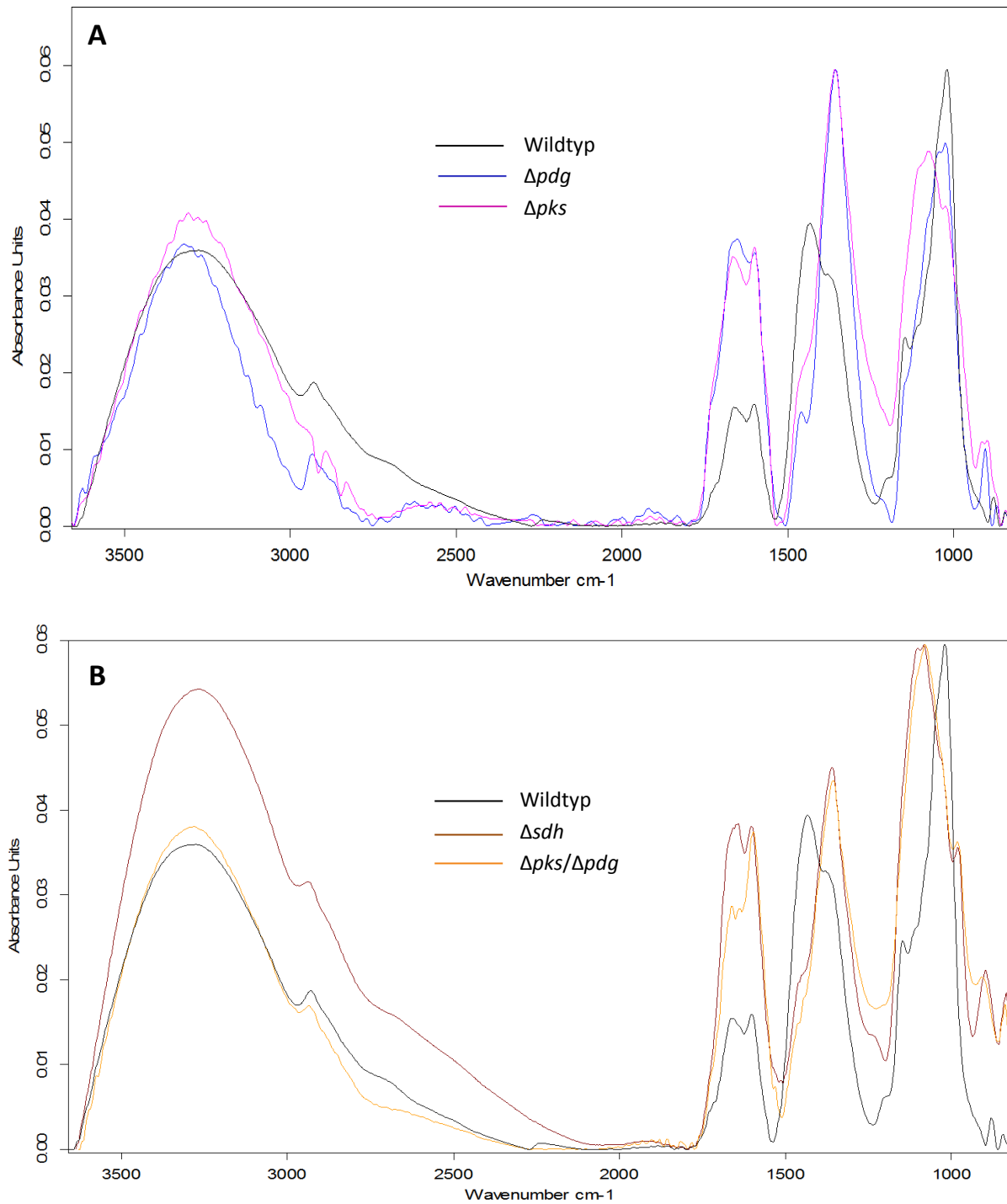


Abbildung 4.20. Fourier-transformierte Infrarotspektren (FTIR) der von *K. petricola* isolierten EPS. Jede Kurve repräsentiert den Mittelwert aus fünf gemessenen Spektren und ist grundlinienkorrigiert. Die CO₂ Bande wurde entfernt. **A** Wildtyp (Schwarz) im Vergleich zu Δpdg (blau) und Δpks (pink). **B** Wildtyp (schwarz) im Vergleich zu Δsdh (braun) und $\Delta pks/\Delta pdg$ (orange).

4.2.2.2 Identifizierung der Monosaccharid-Einheiten

Kohlenhydrate bilden eine sehr heterogene Stoffklasse, die oft stark in ihrer primären Ringstruktur, dem Polymerisierungs- und Verzweigungsgrad sowie in der Art der glykosidischen Bindung variieren. Der erste Schritt in der Strukturanalyse von Polysacchariden ist die Untersuchung, welcher Art die strukturgebenden Monosaccharid-Einheiten sind, und in welcher Menge diese vorkommen. Die Gaschromatographie (GC) hat sich in der Vergangenheit als sehr sensitive und zuverlässige Methode für die Strukturanalyse von Kohlenhydraten erwiesen (Cui, 2005). Kohlenhydrate sind jedoch nicht flüchtig und müssen für die Untersuchung mit GC zunächst zu flüchtigen Substanzen derivatisiert werden. Üblicherweise basieren die genutzten Methoden auf der Substitution der polaren Gruppen in den Kohlenhydraten, sodass deren Flüchtigkeit erhöht wird (Ruiz-Matute *et al.*, 2011). Ob neutrale oder saure Saccharide oder solche mit Aminogruppen - abhängig von der Art der zu analysierenden Monosaccharide existiert eine Vielzahl von Derivatisierungsmethoden (Ruiz-Matute *et al.*, 2011). Die Silylierung ist eine sehr häufig genutzte Methode, da sie sowohl die Derivatisierung von neutralen und Aminosacchariden sowie Uronsäuren zu Trimethylsilylethern ermöglicht. Jedoch werden während der Silylierung von jedem Monosaccharid mitunter mehrere Isomere mit unterschiedlichen Retentionszeiten gebildet (Sasaki und Souza, 2013). Sehr komplexe Chromatogramme und die dadurch bedingte Überlagerung von *peaks*, vor allem bei mehreren Monosacchariden, führt häufig zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse. Zudem wird bei mehreren *peaks* pro Monosaccharid die Quantifizierung erheblich erschwert. Im Gegensatz dazu wird bei der Derivatisierung zu Alditolacetaten, Aldonitrilacetaten oder Dialkyldithioacetalen nur jeweils ein Isomer gebildet, sodass auch nur ein *peak* für jedes Monosaccharid im Chromatogramm erscheint. Jede dieser Derivatisierungsmethoden bringt jedoch unterschiedliche Nachteile mit sich. Allen gemeinsam ist die meist sehr aufwendige Derivatisierungsprozedur. Aldonitrilacetate eignen sich lediglich für die Analyse von Aldosen, die Derivate der Ketosen sind nicht flüchtig und somit für die GC ungeeignet. Alditolacetate können nur aus neutralen Sacchariden generiert werden. Eine Analyse von Uronsäuren oder Aminosacchariden ist nicht möglich. Außerdem können unterschiedliche Monosaccharide zum gleichen Alditol umgesetzt werden – Glucitol resultiert aus Glucose, aber auch aus Fruktose, das zu Glucitol und Mannitol derivatisiert wird. Ein Vorteil ist jedoch, dass diese Methode durch vorgeschaltete Methylierung zusätzlich auch zur Analyse glykosidischer Bindungen verwendet werden kann (Sasaki und Souza, 2013). Ruiz-Matute *et al.* (2011) geben einen

umfassenden Überblick über Vor- und Nachteile der genannten Methoden, und weiterer Derivate. Dabei wird deutlich, dass es keine universell einsetzbare Methode gibt, und dass die gewählte Methode individuell auf die Fragestellung angepasst werden muss. Aufgrund des Vorteils der guten Quantifizierbarkeit, der vergleichsweise einfachen Modifizierbarkeit für die Nutzung zur Bindungsanalyse und weil bereits in der FTIR-Analyse (Abschnitt 4.2.2.1) keine für Uronsäuren typischen Banden nachgewiesen werden konnten, wurde für die Strukturanalyse der Polysaccharide in dieser Arbeit die Derivatisierung zu Alditolacetaten gewählt (Abb. 4.21).

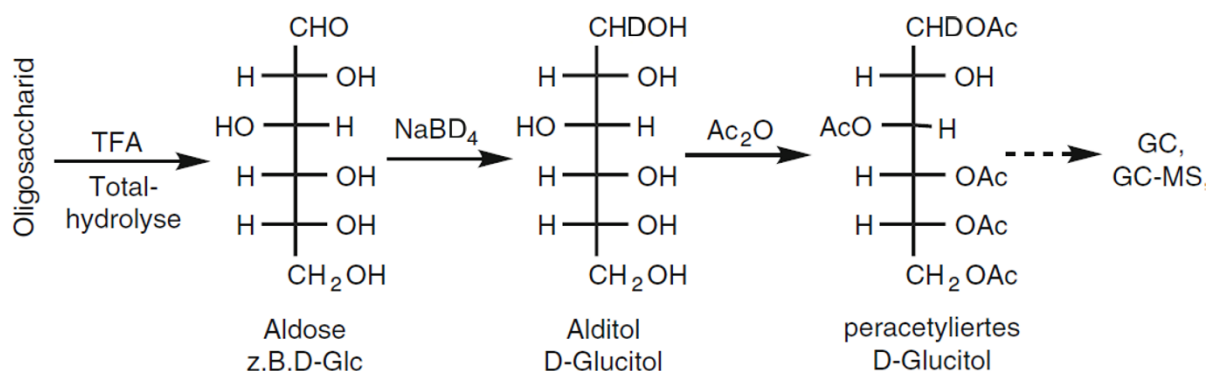


Abbildung 4.21. Derivatisierung von Polysacchariden zu Alditolacetaten. Nach Hydrolyse glykosidischer Bindungen wird das Monosaccharid mit NaBD₄ zum Alditol umgewandelt, dann werden unter Zuhilfenahme von Essigsäureanhydrid freie OH-Gruppen acetyliert. Entstandene Alditolacetate sind leicht flüchtig und können mit GC-MS identifiziert werden [Krois (2017), modifiziert].

Der Gesamtkohlenhydrat-Gehalt der extrahierten und gewogenen EPS (4.2.1) wurde nach Dubois *et al.* (1956) bestimmt, sodass von jeder zu untersuchenden Probe die gleiche Menge an Exopolysacchariden derivatisiert werden konnte. Das Mitführen eines internen Standards ermöglichte zudem die Quantifizierung der Substanzen, da dieser den gleichen Schwankungen durch die vergleichsweise lange und aufwendige Derivatisierung unterliegt, wie die Monosaccharide selbst. Neben dem internen Standard in der Probe ermöglichte das Mitführen eines standardisierten Monosaccharid-Mixes bei jedem Messdurchgang zudem die zuverlässige Quantifizierung der Monosaccharide auch mit MS als Detektor. Im Vorfeld ist die Bestimmung der Retentionszeiten der einzelnen Monosaccharide unabdingbar, da es sich bei den Hexosen D-Glucose, D-Galaktose und D-Mannose um Epimere handelt. Sie unterscheiden sich in ihrer Konfiguration lediglich in einem Chiralitätszentrum, sodass auch deren Alditolacetate Glucitol, Galactitol und Mannitol in der MS dasselbe Massenspektrum liefern (Anhang C2-C4). Anhand dessen

kann demnach lediglich geschlussfolgert werden, dass es sich um eines dieser Epimere handelt. Nur unter zusätzlicher Zuhilfenahme der Retentionszeiten ist es möglich, das genaue Monosaccharid zu bestimmen. In Abbildung 4.22 ist ein Beispielchromatogramm eines *K. petricola* A95 Exopolysaccharids dargestellt, welches auch zur Quantifizierung der Monosaccharide genutzt wurde.

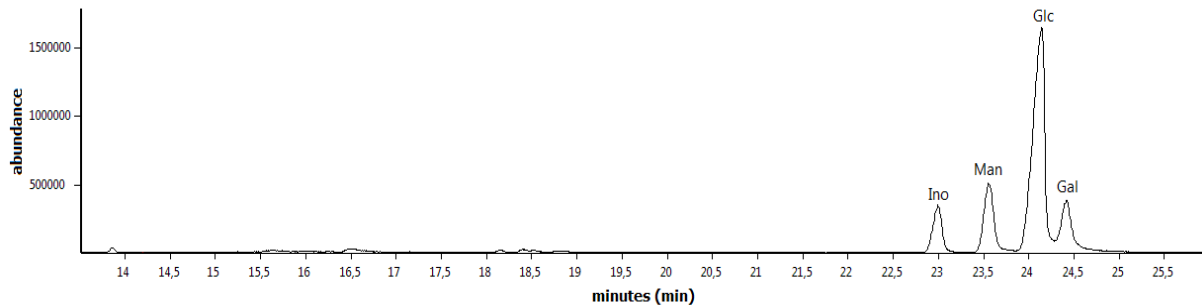


Abbildung 4.22. Ausschnitt eines GC-MS Chromatogramms der untersuchten *K. petricola* WT Exopolysaccharide nach Derivatisierung zu Alditolacetaten. TIC (Massenbereich m/z 40-500); Ino = interner Standard myo-Inositol, Glc = D-Glucose, Man = D-Mannose, Gal = D-Galaktose.

Die Analyse der Monosaccharid-Einheiten ergab, dass das von *K. petricola* produzierte Exopolysaccharid ein Heteropolysaccharid ist (Abb. 4.22 und 4.23). Es setzt sich sowohl im Wildtyp, als auch in den Pigmentmutanten aus den drei Hexosen Mannose, Glucose und Galaktose zusammen, jedoch zeigten sich Unterschiede in den Anteilen des jeweiligen Monosaccharids. Der Hauptbestandteil des Wildtyp-Exopolysaccharids war Glucose (66,7%), gefolgt von Mannose (20,6%) und Galaktose (12,7%). Eine vergleichbare Zusammensetzung von Glucose (61%), Mannose (24,1%) und Galaktose (14,9%) konnte auch in der EPS der Δpdg Mutante gefunden werden. Dies deckt sich mit den jeweiligen FTIR-Spektren der Proben, da dort bereits das Bandenmaximum in einem für Glucose typischen Bereich auftrat (4.2.2.1). Osinska-Jaroszuk *et al.* (2015) geben eine umfassende Übersicht über EPS-Mengen und Exopolysaccharid-Struktur von einer Vielzahl verschiedener Ascomyceten und Basidiomyceten. Wie auch bei *K. petricola*, setzen sich die analysierten Heteropolysaccharide häufig aus den Hexosen Glucose und Galaktose und/oder Mannose zusammen. Seltener wurden in einigen Pilzen zudem Deoxyhexosen, Aminozucker oder Pentosen gefunden (Osinska-Jaroszuk *et al.*, 2015).

Aus Abbildung 4.23 wird eine zum Wildtyp abweichende Monosaccharid-Zusammensetzung in den Melaninmutanten ersichtlich. Wie bereits aus den FTIR-Spektren hervorging (4.2.2.1), konnte in diesen EPS-Proben ein deutlich geringerer Anteil Glucose, aber ein höherer Anteil Galaktose und Mannose nachgewiesen werden. In den Exopolysacchariden der Mutanten Δpks und $pm9\Delta pdg$ war Glucose dennoch das

Ergebnisse und Diskussion

Monosaccharid mit dem höchsten Anteil (42,3% und 42,7%). Die Anteile von Mannose (30,3% und 26,4%) und Galaktose (27,4% und 30,9%) waren aber erhöht. In der Δsdh Mutante war ein vergleichbarer Anteil von Glucose (38,9%) und Mannose (36,8%) enthalten. Galaktose war zu weiteren 24,3% vorhanden.

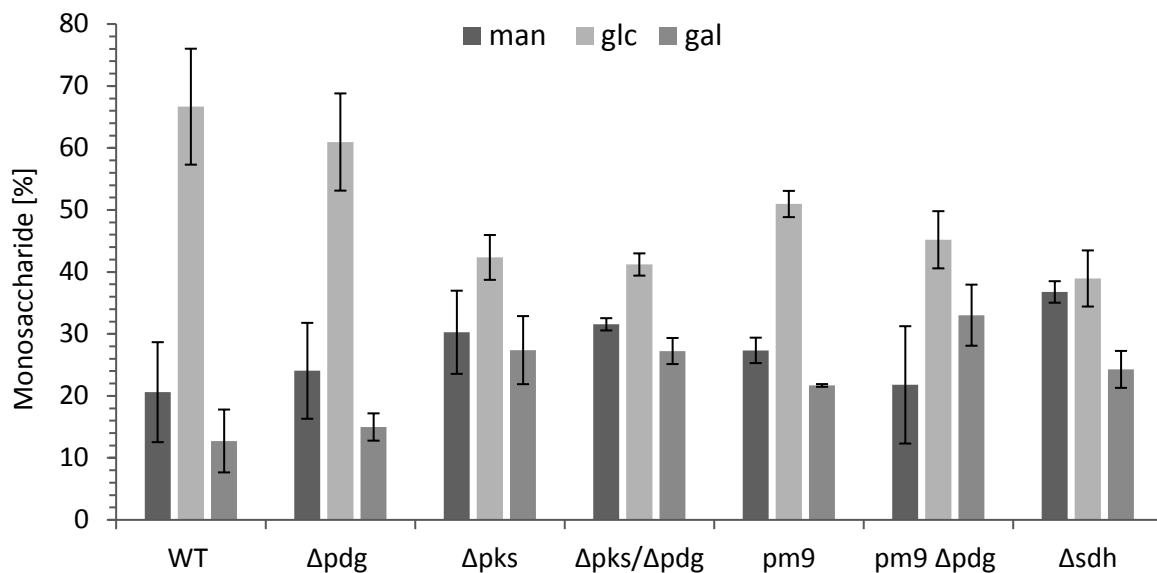


Abbildung 4.23. Monosaccharid-Zusammensetzung der Exopolysaccharide von *K. petricola* Wildtyp und Pigmentmutanten. Quantifizierung über internen Standard myo-Inositol nach Derivatisierung zu Alditolacetaten und Analyse mit GC-MS. Man, Mannose; Glc, Glucose; Gal, Galaktose; n = 3.

Die veränderte Monosaccharid-Zusammensetzung in den Melaninmutanten lässt vermuten, dass die Produktion von Melanin einen erheblichen Einfluss auf die Zusammensetzung der Exopolysaccharide hat. Obgleich viele Pilze Melanin über den DHN-Syntheseweg produzieren, sind viele der Studien zu Melanin mit DOPA-Melanin durchgeführt worden, da dieses auch kommerziell erhältlich ist (Eisenman und Casadevall, 2012). Dabei bleibt jedoch fraglich, inwieweit die gewonnenen Erkenntnisse auch auf DHN-Melanin angewendet werden können, da sich beide Moleküle strukturell unterscheiden (Eisenman und Casadevall, 2012). Melanine sind Bestandteil der Zellwand und bilden dort Komplexe mit Proteinen und Kohlenhydraten (Butler und Day, 1998). DOPA-Melanin ist zudem besonders mit mannosehaltigen Polysacchariden der Zellwand verbunden (Zhong *et al.*, 2008). Da Melanine als unlösliche, fest in die Zellwand integrierte Makromoleküle charakterisiert werden (Eisenman und Casadevall, 2012), verbleiben möglicherweise auch die strukturellen Bestandteile, an die das Melanin gebunden ist, fest

in der Zellwand verankert. Bei den Melaninmutanten Δpks , Δsdh und $pm9\Delta pdg$ ist kein Melanin mehr in der Zellwand verankert. Kohlenhydrate und Proteine, die im Wildtyp und der Carotinoid-Mutante Δpdg noch an Melanin gebunden und dadurch unlöslich sind, könnten daher möglicherweise bei den Melaninmutanten die Zellwand in höherem Maße verlassen und in den extrazellulären Raum gelangen. Dies könnte zudem einen ersten Hinweis darauf geben, dass es sich bei den untersuchten Exopolysacchariden um mehr als ein Polymer handelt. Neben einem im Wildtyp und in der Δpdg Mutante hauptsächlich sekretierten Polymer aus Glucose-Einheiten, würde demnach in den Melaninmutanten in verstärktem Maße ein Polymer aus Mannose- und Galaktose-Einheiten abgegeben werden. Weitere Bestätigung erhält diese Annahme durch die Ergebnisse der Analyse der glykosidischen Bindungen (4.2.2.3).

4.2.2.3 Identifizierung der Bindungstypen

Zur Analyse der Bindungstypen innerhalb der Exopolysaccharide wurde die Methylierungsanalyse genutzt. Diese beruht auf der Derivatisierung zu Alditolacetaten, jedoch werden alle freien Hydroxylgruppen im noch intakten Polysaccharid zunächst methyliert. Erst dann werden die Monosaccharide freigesetzt und zu permethylierten Alditolacetaten (PMAA) umgesetzt (Abb. 4.24).

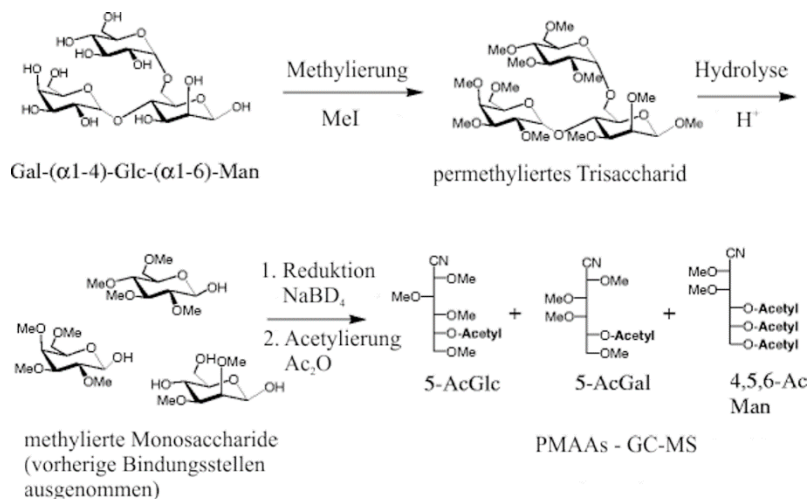


Abbildung 4.24. Derivatisierung von Polysacchariden zu permethylierten Alditolacetaten. Alle freien OH-Gruppen im Polysaccharid werden zunächst methyliert, erst dann werden die glykosidischen Bindungen durch saure Hydrolyse gespalten. Das Monosaccharid wird mit NaBD₄ zum Alditol umgewandelt, dann werden freie OH-Gruppen acetyliert. Diese befinden sich nur dort, wo vorher eine Bindung bestand. Anhand der Position von Me- und Ac-Gruppen kann dann auf die Bindungstypen geschlossen werden [Price (2007), modifiziert].

Ergebnisse und Diskussion

Der Bindungstyp (z.B. 1→4-Bindung oder 1→6-Bindung) und die Ringform (Pyranose oder Furanose) können aus dem Massenspektrum entnommen werden. Auch bei dieser Methode besteht jedoch das Problem, dass die Epimere D-Glucose, D-Galaktose und D-Mannose zu demselben Massenspektrum in der GC-MS führen. Auch hier wird für die exakte Bestimmung des Monosaccharids zusätzlich der Vergleich mit bekannten Retentionszeiten eines Standards eines jeden Monosaccharids benötigt. Da es keine kommerziell zu erwerbenden Standards in dieser Form gibt, bleibt hier nur der Vergleich mit Literaturwerten (Sasaki und Souza, 2013). Diese können sich aber abhängig vom verwendeten System und der Chromatographie-Säule deutlich unterscheiden. Um die detektierten Bindungstypen zuverlässig den genauen Monosacchariden zuordnen zu können, wurden eigene Standards generiert, aus denen eine Bibliothek mit Retentionszeit und zugehörigem Massenspektrum erstellt werden konnte. Eine Übersicht der Bindungstypen und deren Retentionszeiten ist Tabelle 4.3 zu entnehmen. Ein Beispielchromatogramm einer *K. petricola* Probe, das für die Analyse der Bindungstypen herangezogen wurde, ist in Abbildung 4.25 dargestellt. Die Massenspektren der relevanten Bindungstypen können Anhang C entnommen werden. Aufgrund der Vielzahl möglicher Bindungstypen und der Ähnlichkeit der drei untersuchten Hexosen lagen die *peaks* nahe beieinander, sodass es leicht zu Überlagerungen hätte kommen können. Die letztendlich in den *K. petricola* Exopolysacchariden vorkommenden PMAAs wurden jedoch gut aufgetrennt. Lediglich die PMAAs 3,4,6-Me₃-Man [(1→2)-Man_p] und 2,4,6-Me₃-Glc [(1→3)-Glc_p] wurden beide in den Proben detektiert und liefen so nahe beieinander, dass es teilweise zu Überlagerungen kam (Abb. 4.25).

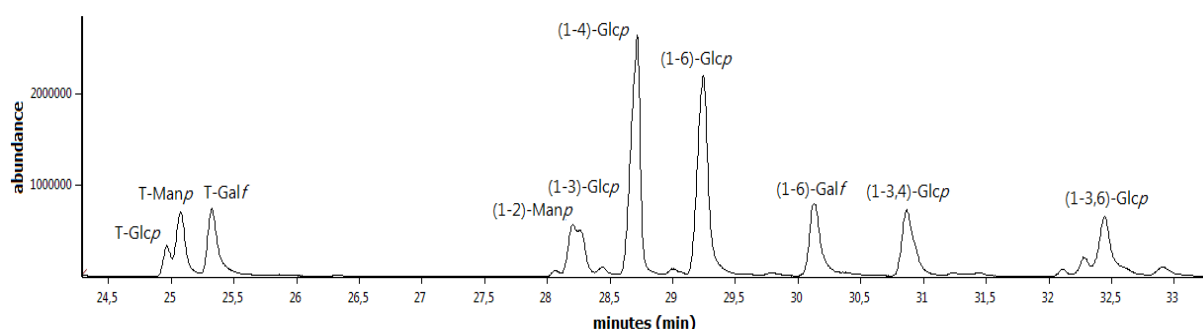


Abbildung 4.25. Ausschnitt eines GC-MS Chromatogramms der untersuchten *K. petricola* Exopolysaccharide nach Derivatisierung zu permethylierten Alditolacetaten. TIC (Massenbereich m/z 40 -500).

Tabelle 4.3. Retentionszeiten permethylierter Alditolacetate (PMAA) nach 3h (Glucose, Mannose) bzw. 4h (Galaktose) Methylierungsdauer

t_R	PMAA	t_R	PMAA
22,12	2,3,5,6-Me ₄ -Man	30,39	2,3,5-Me ₃ -Glc
25,07	2,3,4,6-Me ₄ -Glc	30,40	2,3,4-Me ₃ -Gal
25,13	2,3,4,6-Me ₄ -Man	30,87	2,6-Me ₂ -Glc
25,38	2,3,5,6-Me ₄ -Gal	30,93	4,6-Me ₂ -Man
25,86	2,3,4,6-Me ₄ -Gal	30,93	2,6-Me ₂ -Gal
28,07	3,4,6-Me ₃ -Glc	31,24	4,6-Me ₂ -Glc
28,22	3,4,6-Me ₃ -Man	31,58	3,6-Me ₂ -Gal
28,28	2,4,6-Me ₃ -Glc	32,10	2,3-Me ₂ -Man
28,32	2,5,6-Me ₃ -Gal	32,32	2,3-Me ₂ -Glc
28,47	2,3,6-Me ₃ -Man	32,60	2,4-Me ₂ -Glc
28,60	2,3,6-Me ₃ -Gal	32,62	6-Me-Man
28,69	2,4,6-Me ₃ -Man	32,80	2,3-Me ₂ -Gal
28,70	2,3,6-Me ₃ -Glc	33,05	6-Me-Gal
28,77	3,5,6-Me ₃ -Gal	33,55	2,4-Me ₂ -Gal
29,07	2,4,6-Me ₃ -Gal	34,15	2-Me-Man
29,23	2,3,4-Me ₃ -Glc	34,42	2-Me-Glc
29,28	2,3,4-Me ₃ -Man	34,78	2-Me-Gal
29,40	3,4,6-Me ₃ -Man	35,08	4-Me-Man
30,19	2,3,5-Me ₃ -Gal	35,73	3-Me-Gal

t_R Retentionszeit in Minuten

Tabelle 4.4 zeigt die Bindungstypen in den Exopolysacchariden des Wildtyps und der Pigmentmutanten. Die drei endständigen Einheiten, 2,3,4,6-Me₄-Glc_p (T-Glc_p; 7.8%), 2,3,5,6-Me₄-Gal_f (T-Gal_f; 4.1%) und 2,3,4,6-Me₄-Man_p (T-Man_p; 1.6%), sowie die Derivate 2,4-Me₂-Glc_p [(1→3,6)-Glucopyranose; 4.4%] und 2,6-Me₂-Glc_p [(1→3,4)-Glucopyranose; 4.7%] deuten darauf hin, dass es sich bei dem Exopolysaccharid des *K. petricola* Wildtyps um ein verzweigtes Polymer oder aber mehrere unterschiedliche Polymere handelt. Besonders auffällig ist das Verhältnis der Derivate der Bindungstypen (1→4)-Glucopyranose und (1→6)-Glucopyranose, 2,3,6-Me₃-Glc_p (50,7%) und 2,3,4-Me₃-Glc_p (22,1%). Die vergleichsweise große Menge dieser Derivate lässt vermuten, dass diese die Hauptkette des Exopolysaccharids bilden, wobei auf zwei (1→4)-Glucopyranose-Einheiten eine (1→6)-Glucopyranose-Einheit folgt. Dasselbe Verhältnis der genannten

Ergebnisse und Diskussion

Bindungstypen von 2:1 findet man auch in dem extrazellulären α -Glucan Pullulan, welches vom namensgebenden und ebenfalls melanisierten Pilz *Aureobasidium pullulans* gebildet wird (Bender *et al.*, 1959) (Abb. 1.2). Bei Pullulan handelt es sich um ein lineares Homopolysaccharid, dessen Glucose-Moleküle über α -(1 \rightarrow 6)- und α -(1 \rightarrow 4)-Bindungen verknüpft sind (Cheng *et al.*, 2011). Die Pullulan-Polymere unterschiedlicher Stämme enthalten gelegentlich zusätzlich kleine Mengen α -(1 \rightarrow 3)-, oder auch β -(1 \rightarrow 3)- und β -(1 \rightarrow 6)-Verbindungen (Bouveng *et al.*, 1962, Fujii, 1984, Sowa, 1963).

Auch in den *K. petricola* WT Exopolysacchariden wurden Spuren des Derivats 2,4,6-Me₃-Glc_p gefunden, welches den Bindungstyp (1 \rightarrow 3)-Glucopyranose widerspiegelt. Neben den genannten Derivaten konnten jedoch noch weitere detektiert werden. Das Vorhandensein der Derivate 3,4,6-Me₃-Man_p (2%) und 2,3,5-Me₃-Gal_f (2,6%) lässt darauf schließen, dass *K. petricola* A95 noch mindestens ein weiteres Polymer produziert, das sich aus (1 \rightarrow 2)-Mannopyranose und (1 \rightarrow 6)-Galaktofuranose zusammensetzt. Die geringe Menge der Mannose- und Galaktose-assoziierten sowie die hohe Menge der Glucose-assoziierten Bindungstypen lässt vermuten, dass die untersuchten Exopolysaccharide aus mindestens zwei unterschiedlichen Polymeren bestehen, hauptsächlich aus einem Glucan und in geringerem Anteil aus einem Galaktomannan. Diese Hypothese wird durch extern durchgeführte Analysen der Exopolysaccharide mittels analytischer Gelpermeationschromatographie (GPC; *size – exclusion chromatography*, SEC) gestützt. Demnach zeigen die extrahierten Polysaccharide ein sehr heterogenes Profil (Breitenbach *et al.*, 2018). Allerdings sollte zukünftig auch eine präparative GPC durchgeführt werden. Dabei werden die Polymere separat eluiert, und die in dieser Arbeit durchgeführte Strukturanalyse kann für jedes einzelne Polymer wiederholt werden. Nur so kann sicher beurteilt werden, welche der gefundenen Monosaccharide und Bindungen zu welchem Polymer gehören. Für die präparative GPC werden jedoch große Mengen der Exopolysaccharide benötigt. Die Kultivierung als Biofilm spiegelt die natürliche Lebensform des Pilzes am besten wider, allerdings eignet sich die Anzucht auf den Filtern weniger, um ausreichend große Mengen der EPS isolieren zu können.

Bereits in den FTIR-Analysen (4.2.2.1) konnten Anhaltspunkte sowohl für α - als auch β -Konfigurationen der glykosidischen Bindungen gefunden werden. Bestätigt wurde dies zusätzlich durch ebenfalls extern durchgeführte NMR-Analysen (Breitenbach *et al.*, 2018). Demnach haben die genannten glykosidischen Bindungen (1 \rightarrow 4)-Glc_p, (1 \rightarrow 6)-Glc_p und (1 \rightarrow 2)-Man_p eine α -Konfiguration, die (1 \rightarrow 6)-Gal_f liegt in β -Konfiguration vor. *K. petricola*, welcher innerhalb der Ascomyceten zur Klasse der

Eurotiomyceten (Ordnung *Chaetothyriales*) gehört, produziert demnach hauptsächlich ein α -Glucan ($\sim 80\%$), welches dem Pullulan von *A. pullulans* sehr ähnlich ist. *A. pullulans* wird wiederum zur Klasse der Dothideomyceten gezählt. Das zweite von *K. petricola* abgegebene Polymer Galaktomannan ($\sim 20\%$) ist dagegen dem von *Exophiala jeanselmei* (ebenso *Chaetothyriales*) produzierten Exopolysaccharid strukturell ähnlich (Sasaki *et al.*, 2011). *K. petricola* A95, als gesteinsbewachsender Pilz und enger Verwandter von *Exophiala* sp., vereint demnach die Exopolysaccharid-Eigenschaften von Vertretern innerhalb seiner eigenen Klasse und Vertretern anderer Klassen der sehr heterogenen Gruppe der schwarzen Hefen (Gueidan *et al.*, 2011, Ruibal *et al.*, 2008).

Tabelle 4.4. Anteil glykosidischer Bindungen an Exopolysacchariden des *K. petricola* Wildtyps und der Pigmentmutanten. Man, Mannose; Glc, Glucose; Gal, Galaktose; *p*, Pyranoseform; *f*, Furanoseform; Sp, Spuren.

Permethyliertes Alditolacetat	<i>Knufia petricola</i> A95 (Mol%)						glykosidische Bindung
	WT	Δpdg	Δpks	$\Delta pks/\Delta pdg$	pm9 Δpdg	Δsdh	
2,3,4,6-Me₄-Glc_p	7,8	5,9	9,0	11,4	9,6	8,5	Glc _p -(1→
2,3,4,6-Me₄-Man_p	1,6	Sp	7,1	5,1	6,2	3,7	Man _p -(1→
2,3,5,6-Me₄-Gal_f	4,1	2,5	9,9	10,0	12,6	4,5	Gal _f -(1→
3,4,6-Me₃-Man_p	2,0	1,6	7,9	8,8	9,0	1,7	2→)-Man _p -(1→
2,4,6-Me₃-Glc_p	Sp	Sp	7,3	6,5	9,8	1,7	3→)-Glc _p -(1→
2,3,6-Me₃-Glc_p	50,7	51,0	20,4	25,1	23,3	45,8	4→)-Glc _p -(1→
2,3,4-Me₃-Glc_p	22,1	30,5	14,5	10,1	10,0	19,0	6→)-Glc _p -(1→
2,3,5-Me₃-Gal_f	2,6	1,7	13,0	9,1	10,8	4,8	6→)-Gal _f -(1→
2,6-Me₂-Glc_p	4,7	4,3	2,7	8,7	4,6	8,0	3,4→)-Glc _p -(1→
2,4-Me₂-Glc_p	4,4	2,5	8,2	5,2	4,1	2,3	3,6→)-Glc _p -(1→

Alle genannten glykosidischen Bindungen aus den Wildtyp-Exopolysacchariden konnten auch in denen der Pigmentmutanten nachgewiesen werden (Tabelle 4.4), sodass qualitative Unterschiede ausgeschlossen werden können. Zum Teil wiesen diese jedoch deutliche quantitative Abweichungen auf. Wie bereits bei den Ergebnissen der FTIR- und Monosaccharid-Analysen (4.2.2.1 und 4.2.2.2), unterschied sich auch in der Methylierungsanalyse die Δpdg Mutante nicht wesentlich vom Wildtyp. (1→4)-Glc_p und (1→6)-Glc_p als die hauptsächlichsten Bindungen hatten mit 51% und 30,5% ebenfalls ein annäherndes Verhältnis von 2:1. Von den terminalen Verbindungen T-Glc_p (5,9%), T-Gal_f (2,5%) sowie von (1→2)-Man_p (1,6%), (1→6)-Gal_f (1,7%), (1→3,4)-Glc_p (4,3%) und

Ergebnisse und Diskussion

(1→3,6)-Glc_p (2,5%) wurden zum Wildtyp vergleichbare Mengen detektiert. Spuren von T-Man_p und (1→3)-Glc_p konnten ebenfalls gefunden werden. Deutliche quantitative Unterschiede konnten jedoch, wie schon bei der FTIR- und Monosaccharid-Analyse bei den Melanin-Mutanten Δpks , $\Delta pks/\Delta pdg$ und $pm9\Delta pdg$, festgestellt werden. Das 2:1 Verhältnis der Bindungen (1→4)-Glc_p und (1→6)-Glc_p blieb in der Δpks Mutante mit 20,4% und 14,5%, in der $\Delta pks/\Delta pdg$ Mutante mit 25,1% und 10,1% und in der $pm9\Delta pdg$ Mutante mit 23,3% und 10% weitestgehend dasselbe, im Vergleich zu Wildtyp und der Δpdg Mutante, jedoch nahm die Menge beider Bindungen an der Gesamtmenge aller Bindungen deutlich ab. Dies spricht, wie bereits bei der Analyse des Wildtyps vermutet, auch dafür, dass diese glykosidischen Bindungen Teil eines separaten Polymers sind. Die Bindungen (1→3,4)-Glc_p in den Mutanten Δpks (2,7%), $\Delta pks/\Delta pdg$ (8,7%) und $pm9\Delta pdg$ (4,6%) sowie die Bindung (1→3,6)-Glc_p in der $pm9\Delta pdg$ Mutante (4,1%) und der $\Delta pks/\Delta pdg$ Mutante (5,2%) zeigten keine deutlichen Unterschiede zum Wildtyp. Mit 8,2% war die Bindung (1→3,6)-Glc_p in der Δpks Mutante in etwas höherer Menge vorhanden. Deutlich erhöht in den drei Melaninmutanten waren dagegen die terminalen Verbindungen T-Glc_p (9% und 9,6%, 11,4%), T-Man_p (7,1% und 6,2%, 5,1%) und T-Galf (9,9% und 12,6%, 10%) sowie (1→2)-Man_p (7,9% und 9%, 8,8%), (1→3)-Glc_p (7,3% und 9,8%, 6,5%) und (1→6)-Galf (13% und 10,8%, 9,1%).

Ausgehend von der Annahme, dass der Wildtyp mindestens zwei Polymere, ein α -Glucan und ein α/β -Galaktomannan bildet, zeigen die Ergebnisse der Methylierungsanalyse, dass ein alleiniges Ausschalten der Carotinoid-Produktion keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Exopolysaccharide zu haben scheint. Bei fehlender Melanin-Synthese wird jedoch die Produktion oder die Sekretion des potentiellen Galaktomannans erhöht. Eine Möglichkeit stellt die aktive Erhöhung der Produktion durch den Pilz dar, weil die durch Melanin gegebene Schutzwirkung gegen äußere Einflüsse fehlt. Ähnliche Schutzfunktionen konnten auch für die extrazelluläre Matrix verschiedener Mikroorganismen nachgewiesen werden. Extrazelluläre Proteine und Polysaccharide, aber auch DNA, schützen mikrobielle Biofilme durch Wasserspeicherung vor Austrocknung, bilden eine Barriere gegen antimikrobielle oder infektiöse Substanzen sowie toxische Metallionen und akkumulieren Nährstoffe aus der Umwelt (Flemming, 2017). Die vermehrte Abgabe von EPS und im Besonderen von Exopolysacchariden kann demnach möglicherweise ein Melanin-Defizit in den Mutanten ausgleichen.

Glycokonjugate, Zellwand-assoziierte Polysaccharide und Exopolysaccharide mit Galaktofuranose-Einheiten wurden in vielen Mikroorganismen gefunden. Darunter stellen humanpathogene Pilze einen erheblichen Anteil dar (Heesemann *et al.*, 2011, Pedersen und Turco, 2003, Peltier *et al.*, 2008, Sasaki *et al.*, 2002). Da Galf-Einheiten zudem ausschließlich von Mikroorganismen gebildet werden und bisher nicht in Säugetieren gefunden werden konnten, haben sie in letzteren eine immunogene Aktivität und bilden einen wichtigen Ansatzpunkt bei der Diagnose von Infektionen (Heesemann *et al.*, 2011). Schmalhorst *et al.* (2008) konnten zeigen, dass die Fähigkeit, Galaktofuranose-Einheiten synthetisieren zu können, in *A. fumigatus* wichtig für die Virulenz des Pilzes ist. Innerhalb der Gruppe der schwarzen Hefen ist das Galaktomannan des humanpathogenen Vertreters *E. jeanselmei* und dessen immunogene Aktivität untersucht worden (Sasaki *et al.*, 2011). Ein strukturell sehr ähnliches Polymer wird auch von *K. petricola* gebildet, der selbst aber kein pathogener Pilz ist. Es stellt sich daher die Frage, welche Funktion das im Vergleich zum Hauptpolymer in geringen Mengen in der Wildtyp EPS vorkommende Galaktomannan im Lebenszyklus und bei der Materialbesiedlung des gesteinsbewachsenden Pilzes spielt. Die Zellwand und der sich unmittelbar darum befindende extrazelluläre Raum sind eng miteinander verbunden. Außerdem lassen sich besonders in Pilzen die strukturegebenden Zellwand-Polysaccharide und die extrazellulären Polysaccharide nicht immer strikt voneinander trennen. Häufig werden diese aufgrund geringfügiger struktureller Änderungen und damit verbundener höherer Löslichkeit in den extrazellulären Raum abgegeben (Breitenbach *et al.*, 2016). Neben der Bedeutung für die Pathogenität vieler Pilze wurde auch eine essentielle Funktion Galf-beinhaltenender Polysaccharide für das ungestörte Wachstum, die Integrität der Zellwand und die Adhäsion von Hyphen in *A. nidulans*, *A. niger* und *A. fumigatus* nachgewiesen (Damveld *et al.*, 2008, El-Ganiny *et al.*, 2010, Lamarre *et al.*, 2009, Paul *et al.*, 2011). Auch Melanin spielt unter anderem eine tragende Rolle bei der Zellintegrität (Cordero und Casadevall, 2017). Das Ausschalten der Melanin-Synthese in *K. petricola* führt vermutlich auch zu einer Neuordnung der gesamten Zellwand. Da diese strukturegebende Komponente in den Melaninmutanten fehlt, erhöhen diese möglicherweise die Synthese des ebenfalls strukturegebenden Galaktomannans, um die Stabilität der Zellwand zu erhalten. In *Cryptococcus neoformans* konnte gezeigt werden, dass Melanin vor allem an Zellwand-Polysaccharide mit Mannose-Einheiten gebunden ist (Zhong *et al.*, 2008). Da Melanin überwiegend wasserunlöslich ist und demnach bei den meisten Pilzen nicht in den extrazellulären Raum entweicht, würden in

diesem Fall auch die gebundenen Polysaccharide die Zelle nicht verlassen. Wenn auch in *K. petricola* Melanin vornehmlich an Galaktomannan in der Zellwand gebunden ist, würde das Fehlen von Melanin in den Mutanten möglicherweise dazu führen, dass das Polymer aufgrund höherer Löslichkeit vermehrt als Teil der EPS nach außen gelangt. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte jedoch zukünftig die Struktur und Anordnung der Zellwand-Komponenten des Wildtyps und der Pigmentmutanten untersucht werden.

4.2.3 Visualisierung und Charakterisierung der EPS durch Lektine

Neben der Extraktion und anschließenden chemischen Analyse der Matrix-Bestandteile von Biofilmen kann eine Charakterisierung auch über bildgebende Verfahren erfolgen. Eine Reihe mikroskopischer Techniken haben sich dafür in der Vergangenheit bewährt (Neu und Lawrence, 2016). Unter diesen eignet sich die Konvokale *Laser-Scanning-Mikroskopie* in Verbindung mit der Fluoreszenz-Lektin-Bindungsanalyse (FLBA) besonders gut für die Untersuchung von gemischten (umweltrelevanten) Biofilmen (Neu und Lawrence, 2016). Lektine sind Kohlenhydrat-bindende Proteine, die in nahezu allen Organismen, in Bakterien, Pflanzen und Tieren, zu finden sind (Goldstein und Hayes, 1978). Sie binden dabei an spezifische Kohlenhydrate, sodass die Bindung der Lektine einen Hinweis auf die Zusammensetzung der komplexen Kohlenhydrate geben kann (Neu und Kuhlicke, 2017). Allerdings ist zur Bindungsspezifität vieler Lektine bisher wenig bekannt. Häufig zeigen die Lektine auch eine bevorzugte Bindung an ein Monosaccharid und werden gleichzeitig von einem anderen inhibiert, wodurch es zu Fehlinterpretationen kommen kann. Demnach kann die FLBA eine strukturelle Charakterisierung der EZM durch chemische Methoden unterstützen, aber nicht als alleinstehende Methode zur Strukturaufklärung herangezogen werden.

Zunächst sollte festgestellt werden, welche der Lektine aus der vorhandenen Bibliothek an Glycokonjugate der *K. petricola* Biofilme binden. Dafür wurde ein Fluoreszenz-Lektin-*Bar-Coding* (FLBC) (Neu und Kuhlicke, 2017) mit Biofilmen des *K. petricola* Wildtyps und der Pigmentmutante $\Delta pks/\Delta pdg$ durchgeführt. So konnte sichergestellt werden, dass ein Stamm mit allen Pigmenten und ein Stamm ganz ohne Pigmente in das *Screening* einbezogen werden konnte. Eine Übersicht, welche Lektine getestet worden sind, kann Anhang C entnommen werden. In Tabelle 4.5 sind alle Lektine aufgelistet, die im Wildtyp und/oder in der Mutante $\Delta pks/\Delta pdg$ gebunden haben. Die Stärke der Bindung wurde anhand der Spannung im Photomultiplier klassifiziert.

Es fiel jedoch auf, dass alle Bindungen im Screening vergleichsweise schwach ausfielen. So wird üblicherweise in ein starkes Signal bei 400-600, ein mittleres Signal bei 600-800 und ein schwaches Signal bei 800-1000 unterteilt (Neu und Kuhlicke, 2017). Jedoch lag die Spannung bei allen im *Screening* durchgeführten Messungen zwischen 800 und 1000. Da dennoch visuelle Unterschiede in der Stärke der Bindungen erkennbar waren, wurde die Klassifizierung dementsprechend innerhalb dieser Spanne angepasst und vorgenommen. Es wurden 12 Lektine gefunden, die im Wildtyp, und 26 Lektine, die in der Pigmentmutante binden. Davon haben 16 Lektine ausschließlich an Glycokonjugate der Pigmentmutante gebunden. Darüber hinaus banden die zwei Lektine NPA und PMA nur im Wildtyp. Da Lektine an spezifische Glycokonjugate in der EPS und an der Zellwand binden, gibt die selektive Bindung einzelner Lektine nur in Biofilmen des Wildtyps oder der Pigmentmutante einen Hinweis darauf, dass die Zusammensetzung der EPS in Verbindung mit der Zellwand durch Ausschalten der Pigmentsynthese grundlegend verändert wurde. Lektine, die im Screening potentiell interessante Bindungsmuster gezeigt haben (AAL, AIA, GNA, RCA), nur im Wildtyp gebunden haben (PMA) oder eine besonders gute EPS-Färbung zeigten (ASA, HHA, PSA), wurden für eine genauere Analyse mittels FLBA ausgewählt. Mit dieser wurde neben dem Wildtyp und der Doppelmutante auch die Melanin-Mutante Δpks untersucht. Tabelle 4.6 listet die ausgewählten Lektine auf und gibt eine Übersicht über deren Bindungsspezifität und das jeweilige Bindungsmuster in den *K. petricola* Biofilmen.

Tabelle 4.5. Übersicht des Lektin-Screenings von *K. petricola* WT und $\Delta pks/\Delta pdg$

Lektin	Wildtyp	$\Delta pks/\Delta pdg$
AAL	++	+++
AIA		++
AMA		++
ASA		++
BAN	+	++
BPA		~
Calsepa		+
CSA	+	+
DBA		+
DSA		+
ECA		+
GNA	+	+
GS-I		+
HHA	++	~
HMA		~
MNA-G		++
MPA	+	~
NPA	+	
PMA	++	
PSA	++	+
PTA		+
RCA	++	++
SNA		++
STA		++
UDA	++	+
UEA-I		+++
WFA		+
WGA	++	+++

Signalstärke (*Voltage*): ~ über 1000
 + 1000-950
 ++ 950-900
 +++ 900-800

Ergebnisse und Diskussion

Die drei Lektine AAL, AIA und RCA haben gleichmäßig verteilte Strukturen der EZM angefärbt, die nicht eindeutig der Zellwand oder EPS zugeordnet werden konnten (Abb. 4.26). Während AAL und RCA in jedem der drei untersuchten Stämme gebunden haben, gab AIA nur in den beiden Melanin-Mutanten ein Signal. AAL bindet zudem spezifisch an α -Fucose-Einheiten, eine Deoxyhexose, die in den Polysaccharid-Analysen nicht gefunden wurde. Hierbei kann es sich aber um den Kohlenhydrat-Anteil eines Glykokonjugats (Glycoprotein, Glycolipid) handeln, welcher bei der Extraktion der Exopolysaccharid-Polymere nicht erfasst worden wäre. Die Lektine ASA, HHA und PSA eigneten sich sehr gut, um EPS in den Biofilmen anzufärben (Abb. 4.26). Unter diesen drei Lektinen hat ASA jedoch nur in den Melanin-Mutanten, nicht aber im Wildtyp gebunden. Ein Rückschluss auf die Struktur kann in diesem Fall nicht getroffen werden, da die Bindungsspezifität von ASA nicht bekannt ist. Zudem war bei den meisten Lektinen keine eindeutige Abgrenzung zwischen der Bindung der EPS und der Zellwand möglich. Besonders im Wildtyp ist die EPS sehr eng an die Zellen gebunden, sodass EPS und Zellwand häufig schwer unterscheidbar waren. Mit dem Lektin GNA wurden jedoch immer wieder Doppelringe sichtbar, wobei der innere Ring vermutlich die Zellwand und der äußere Ring die EPS-Hülle zeigte (Abb. 4.26 und 4.27). PMA war das einzige Lektin, welches ausschließlich in den Biofilmen des Wildtyps gebunden hat (Abb. 4.26). Der Verlust des Melanins in den Mutanten führte sehr wahrscheinlich auch zu einem grundlegenden Umbau der Zellwandstruktur. Die alleinige Bindung im Wildtyp zeigt, dass durch das Ausschalten der Melanin-Synthese nicht nur Strukturen dazu gekommen sind, beispielsweise eine größere Menge EPS, sondern dass dadurch auch Strukturen, möglicherweise durch einen Umbau der Zellwand, verloren gegangen sind. Um welche Substanzen es sich dabei handelt, kann jedoch nicht genauer bestimmt werden, da auch hier die Bindungsspezifität nicht bekannt ist. Im gesamten Lektin-Screening fiel zudem auf, dass die Lektin-Lösungen, welche auf die Biofilme gegeben wurden, nicht vollständig durch den Biofilm diffundieren konnten. So entstanden Abschnitte, in denen man die Bindung des Lektins in Form des spezifischen Musters detektieren konnte, und andere Abschnitte, in denen keinerlei Bindung zu sehen war. Eine Funktion der EZM vieler Organismen ist die Wirkung als Diffusionsbarriere zum Schutz vor antimikrobiellen Substanzen (Lewis, 2001). Demnach könnte auch die Diffusion der Lektine durch die untersuchten *K. petricola* Biofilme durch eine solche Barriere-Funktion beeinträchtigt worden sein.

Tabelle 4.6. Übersicht ausgewählter Lektine mit Bindung in *K. petricola* WT und/oder Melaninmutanten. Fuc Fucose, Man Mannose, Glc Glucose, GlcNAc N-Acetylglucosamin

Lektin	Organismus	WT	Δpks	$\Delta pks/$ Δpdg	Bindungs- spezifität	Spezielle Eigenschaften
AAL	<i>Aleuria aurantia</i> (Gemeiner Orangebecherling)	X	X	X	α -Fuc	Strukturen der EZM; sichtbar als „Fetzen“; gleichmäßig verteilt
AIA	<i>Artocarpus integrifolia</i> (Jackfrucht)		X	X	unbekannt	wie AAL, jedoch werden andere Strukturen gefärbt
ASA	<i>Allium sativum</i> (Knoblauch)		X	X	unbekannt	keine eindeutige Abgrenzung von EPS und Zellwand (mehr EPS in Doppelmutante)
GNA	<i>Galanthus nivalis</i> (Schneeglöckchen)	X	X	X	α -Man	Zellwand/ EPS; Doppelringe – besonders im WT sichtbar (innerer Ring = Zellwand; äußerer Ring = EPS)
HHA	<i>Hippeastrum hybrid</i> (Amaryllis)	X	X	X	α -Man	gute EPS-Färbung
PMA	<i>Polygonatum multiflorum</i> (Vielblütige Weißwurz)	X			unbekannt	gute Zellwand-Färbung im WT, gelegentlich auch kleine Mengen EPS gefärbt
PSA	<i>Pisum sativum</i> (Gartenerbse)	X	X	X	α -Man, α -Glc, α -GlcNAc	EPS in allen Stämmen, Diffusion durch Biofilm oft unvollständig
RCA	<i>Ricinus communis</i> (Wunderbaum)	X	X	X	unbekannt	ungewöhnliche Struktur in EZM, reproduzierbar

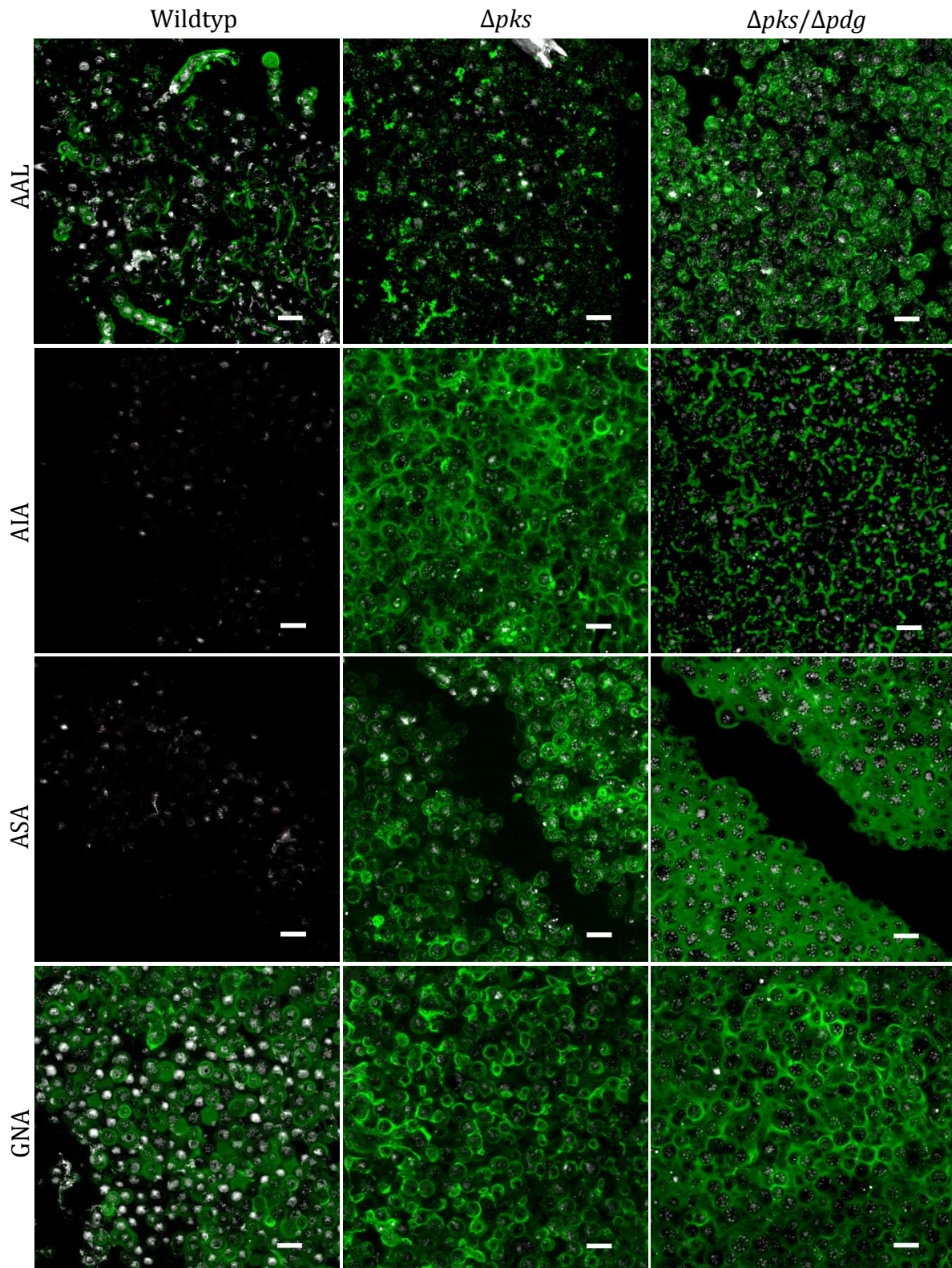


Abbildung 4.26. Bindung ausgewählter Lektine in *K. petricola* Wildtyp und Pigmentmutanten. Die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Lektine AAL, AIA, ASA, GNA, HHA, PMA, PSA und RCA wurden zu sieben Tage alten Biofilmen des Wildtyps und der Pigmentmutanten Δpks und $\Delta pks/\Delta pdg$ gegeben und die Bindung wurde mit konvokaler Laser-Scanning-Mikroskopie dokumentiert. Maßstabsbalken = 10 μm . (Fortsetzung auf nächster Seite)

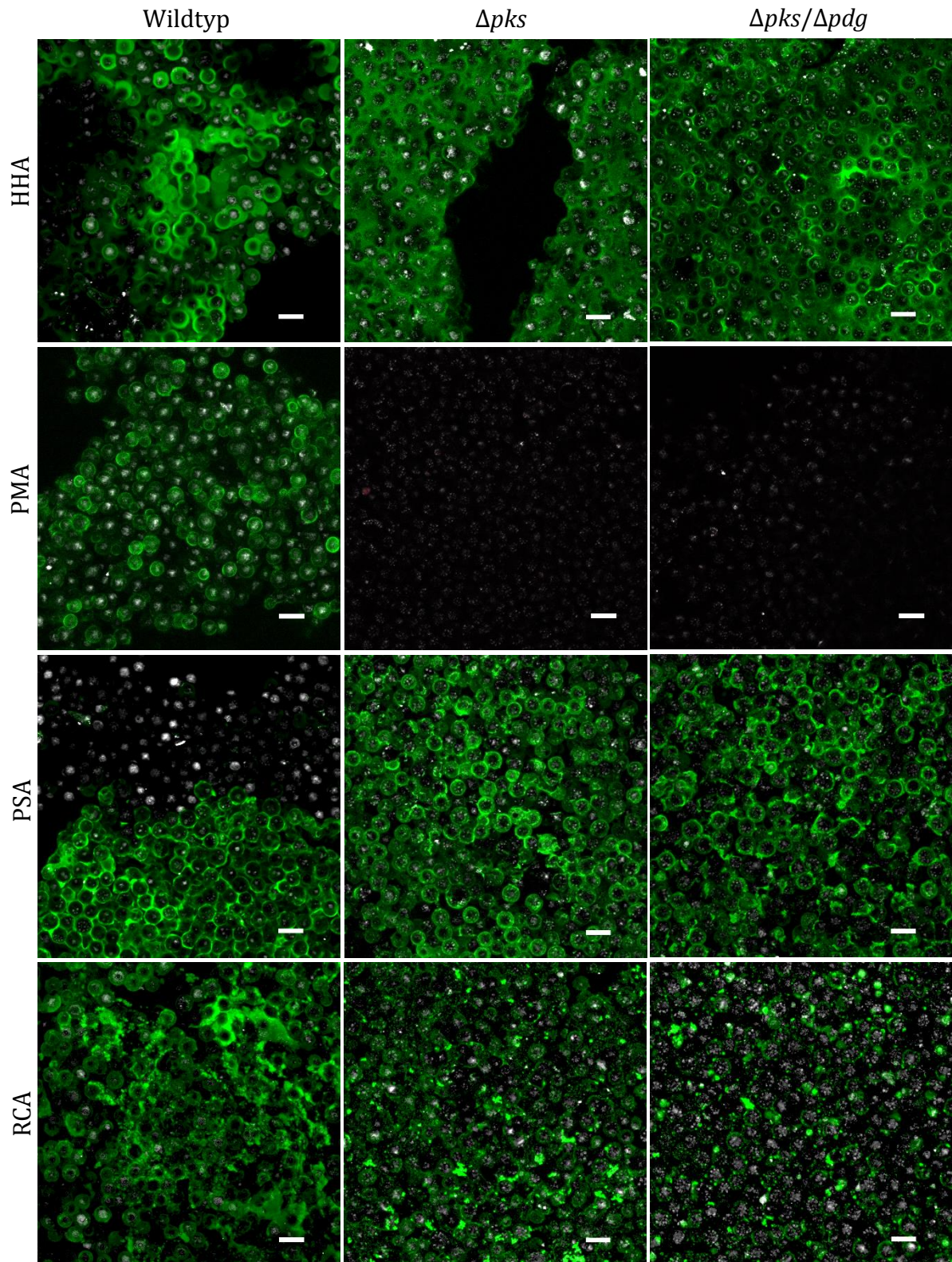


Abbildung 4.26. Fortsetzung

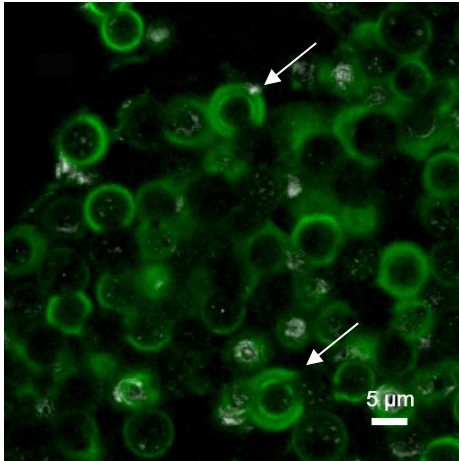


Abbildung 4.27. Bindung des Lektins GNA in *K. petricola* Wildtyp. Bei einigen Zellen des Biofilms wurden durch die Bindung des Lektins GNA Doppelringe sichtbar (gekennzeichnet durch Pfeile). Der innere Ring zeigt möglicherweise die Zellwand des Pilzes, der äußere Ring die EPS-Hülle.

4.2.4 Isolierung und Visualisierung extrazellulärer Proteine

Um extrazelluläre Proteine aus *K. petricola* Biofilmen zu extrahieren, wurden zwei verschiedene Methoden verglichen. Bei den EPS des schwarzen Pilzes handelt es sich, wie bereits in 4.2.1 „Visualisierung, Extraktion und Quantifizierung der EPS“ beschrieben, um fest an die Zellen gebundene EPS. *K. petricola* gibt sichtbar keine Substanzen in das umliegende Medium ab. Zudem ist die Analyse der EPS-Zusammensetzung in Biofilmen besonders unter dem Aspekt der Materialverwitterung vorzuziehen, sodass eine Methode gefunden werden sollte, die die Extraktion von extrazellulären Proteinen aus Biofilmen ermöglicht. Mit chemischen EPS-Extraktionsmethoden können häufig deutlich größere Mengen EPS abgelöst werden, jedoch bergen diese auch die Gefahr der vermehrten Zellyse (Liu und Fang, 2002, Zorel *et al.*, 2015). Obgleich oftmals nur geringe Ausbeuten mit physikalischen Extraktionsmethoden erzielt werden, konnten Zorel *et al.* (2015) feststellen, dass die Menge und Zusammensetzung der extrahierten Proteine anaerober Klärschlämme bei chemischen und physikalischen Extraktionsmethoden gleich blieb.

In dieser Arbeit wurden für die Extraktion extrazellulärer Proteine die milde chemische Extraktion mit NaOH und Formaldehyd und die physikalische Extraktion ausschließlich durch Zentrifugation verglichen. Die Zentrifugationsmethode hat dabei den Vorteil, dass die Anzahl lysierter Zellen und damit die Kontamination mit intrazellulärem Material möglichst gering gehalten wird. Die Menge extrahierten extrazellulären Materials ist aber häufig ebenso gering (Zorel *et al.*, 2015). Aufgrund der hohen Zellwand- und Melanin-vermittelten Stabilität von *K. petricola* Zellen ist der Grad der Lyse auch bei chemischer Extraktion gering (vgl. 4.2.1). Jedoch besteht bei dieser Methode der Nachteil, dass Proteine bei der Extraktion ausgefällt werden könnten. So gleicht die Löslichkeit von Proteinen einer V-artigen Kurve, wobei die Löslichkeit bei

einem pH-Wert am isoelektrischen Punkt des Proteins am geringsten ist. Die gewählte chemische Extraktionsmethode erfordert die Erhöhung des pH-Wertes, um die Dissoziation der EPS zu ermöglichen (Wingender *et al.*, 1999). Extrazelluläre Proteine, deren isoelektrischer Punkt nahe des pH-Werts liegt, gehen so während der Extraktion verloren. Eine chemische Extraktionsmethode mit NaOH und Formaldehyd wurde in dieser Arbeit auch für die Extraktion extrazellulärer Polysaccharide verwendet (vgl. 4.2.1). Entsprechend war davon auszugehen, dass neben den Proteinen auch ein beträchtlicher Anteil der Polysaccharide extrahiert wird, die in größerer Menge die folgenden Analysen stören können. Die chemischen Extrakte hatten aufgrund der Polysaccharide eine hohe Viskosität, welche die weitere Aufarbeitung erschwerte.

Die Analyse der konzentrierten Proteinextrakte mit SDS-PAGE und anschließender Färbung mit kolloidalem Coomassie lieferte zwölf Proteinbanden (Abb. 4.28). Zwei sehr ausgeprägte Banden bei ca. 65 und 33 kDa waren in allen Extrakten deutlich erkennbar. Darüber hinaus konnten vor allem in den durch Zentrifugation erhaltenen Extrakten elf weitere schwache oder sehr schwache Banden identifiziert werden. Da die Banden in den Zentrifugationsextrakten aber insgesamt stärker waren, kann anhand der SDS-PAGE nicht endgültig darauf geschlossen werden, dass diese Proteine in den NaOH/FA-Extrakten nicht vorhanden waren. Die Menge chemisch extrahierter Proteine war im Vergleich zur physikalischen Extraktion insgesamt geringer, sodass die ohnehin schon niedrig konzentrierten Proteine auf dem Gel, aufgrund fehlender Sensitivität, nicht sichtbar gemacht werden konnten. Die Ergebnisse zeigen aber, dass bei der Extraktion extrazellulärer Proteine aus *K. petricola* Biofilmen die Herangehensweise mit vergleichsweise aggressiven Methoden nicht zwingend nötig ist. Vielmehr konnte mit der am geringsten invasiven Extraktionsmethode eine für folgende Analysen ausreichende Menge von Proteinen extrahiert und gleichzeitig die Gefahr des pH-Wert-abhängigen Verlusts einzelner Proteine vermindert werden. Auch das Bandenprofil beider Methoden war vergleichbar.

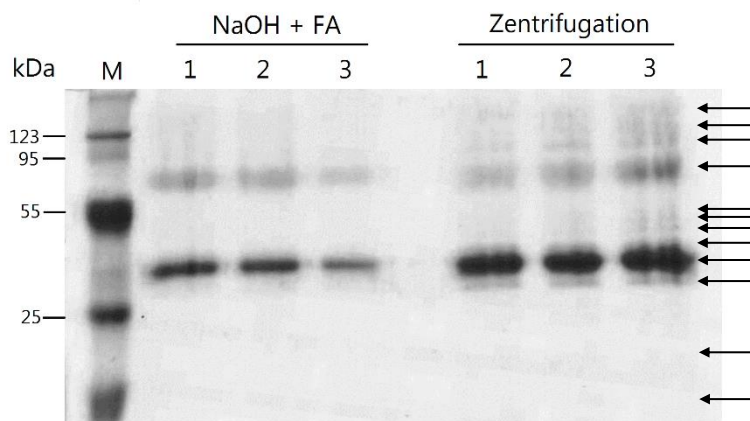


Abbildung 4.28. SDS-PAGE extrazellulärer Proteine aus *K. petricola* Biofilmen. Proteine wurden aus Biofilm-Suspensionen chemisch (NaOH+FA) oder physikalisch (Zentrifugation) extrahiert, mit Ammoniumsulfat gefällt und konzentriert. Drei Replikate wurden bei jeder der Extraktionsmethoden mitgeführt. Pfeile zeigen die auf dem Gel gesehenen Banden. Einige Banden waren so schwach, dass sie auf dem eingescannten Bild nicht mehr sichtbar sind. M Marker.

4.2.5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die extrazellulären Substanzen des mikrokolonialen Pilzes *K. petricola* erstmals isoliert und die extrazellulären Polysaccharide strukturell charakterisiert. Der Vergleich des Wildtyps mit verschiedenen Pigmentmutanten zeigte, dass das Fehlen des Schutzpigmentes Melanin in den Zellen zu vermehrter EPS-Abgabe oder Synthese in den Biofilmen führte. Außerdem führte dies auch zu einer Änderung der Struktur der extrazellulären Polysaccharide. Während der Wildtyp zu ~80% ein α -Glucan und zu ~20% ein α/β -Galaktomannan abgab, war der Anteil des potentiellen Galaktomannans in der EZM der Pigmentmutanten deutlich erhöht. Dagegen hatte das Ausschalten der Carotinoid-Synthese keinen Einfluss auf die Beschaffenheit der extrazellulären Polysaccharide. Neben der strukturellen Analyse konnte eine Veränderung in der EPS-Menge und ihrer Struktur durch mikroskopische Untersuchungen visualisiert werden. Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse deuten darauf hin, dass zwei Polymere Bestandteil der EZM sind, jedoch sollte dies in zukünftigen Analysen durch präparative GPC weiter untersucht werden. Dabei werden die einzelnen Polymere aufgetrennt und separat eluiert. Danach können die in dieser Arbeit durchgeführten Strukturanalysen nochmals durchgeführt werden, sodass die Bindungstypen auch sicher den einzelnen Polymeren zugeordnet werden können.

Die während der Arbeit parallel mit den extrahierten EPS des Wildtyps durchgeführten Rasterkraftmikroskopie-Experimente (AFM) ergaben, dass mit der EPS-Lösung die Korrosion von Oberflächen hervorgerufen werden kann (Breitenbach *et al.*, 2018). Da neben extrazellulären Polysacchariden vor allem Enzyme bei der Interaktion mit dem Substrat beteiligt sind, sollte zukünftig ebenso das Exoproteom des Pilzes charakterisiert werden, um weitere Hinweise über die Beteiligung der EPS des Pilzes an Verwitterungsprozessen am Substrat zu erhalten. Die Extraktion und Auftrennung extrazellulärer Proteine des *K. petricola* Wildtyps konnten in dieser Arbeit bereits erfolgreich durchgeführt werden.

Bei Melanin, Carotinoiden und auch der EZM eines Biofilms handelt es sich um Substanzen, für die schon häufig eine bedeutende Rolle bei der Toleranz gegenüber Trockenstress, UV-Strahlung und oxidativem Stress in anderen Organismen nachgewiesen wurde. Da von *K. petricola* Stämme vorliegen, die entweder alle Schutzpigmente und stattdessen geringere Mengen EPS produzieren, oder aber Defizite in der Ausbildung von Schutzpigmenten haben, aber stattdessen vermehrt EPS abgeben, könnte dahingehend die Anfälligkeit gegenüber diesen Stressarten in den Stämmen untersucht werden. Zum Beispiel ist möglicherweise die Toleranz der Melaninmutante Δpks gegenüber einzelnen Stresstypen durch die größere Menge EPS erhöht, oder aber durch das Fehlen des Melanins verringert. Außerdem gibt es Hinweise, dass Organismen die Zusammensetzung ihrer Carotinoide zur Abwehr schädlicher Einflüsse auch kurzfristig ändern können (Ehling-Schulz *et al.*, 1997, Sakaki *et al.*, 2002). Auch Gorbushina *et al.* (2008) konnten bereits eine Akkumulation der Carotinoid-Vorstufe Phytoen in *K. petricola* Zellen bei Trockenstress beobachten. Die Rolle der Carotinoide sollte bei entsprechenden Experimenten berücksichtigt werden, da häufig ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren bei der Reaktion auf äußere Einflüsse vorliegt. Gleiches gilt natürlich auch für die anderen Mutanten. So lassen sich möglicherweise Hinweise auf die Bedeutung von Melanin, Carotinoiden und EZM in Bezug auf die Toleranz gegenüber verschiedenen Stresstypen des sehr widerstandsfähigen schwarzen Pilzes *K. petricola* finden.

5 LITERATUR

- Adav, S. S., Ravindran, A. und Sze, S. K. (2015). Quantitative proteomic study of *Aspergillus Fumigatus* secretome revealed deamidation of secretory enzymes. *J Proteomics* 119, 154-168.
- Agostoni, M., Koestler, B. J., Waters, C. M., Williams, B. L. und Montgomery, B. L. (2013). Occurrence of cyclic di-GMP-modulating output domains in cyanobacteria: an illuminating perspective. *MBio* 4(4), 1-10.
- Agostoni, M. und Montgomery, B. L. (2014). Survival strategies in the aquatic and terrestrial world: the impact of second messengers on cyanobacterial processes. *Life (Basel)* 4, 745-769.
- Agostoni, M., Waters, C. M. und Montgomery, B. L. (2016). Regulation of Biofilm Formation and Cellular Buoyancy Through Modulating Intracellular Cyclic di-GMP Levels in Engineered Cyanobacteria. *Biotechnol Bioeng* 113, 311-319.
- Albersheim, P. (1979). Citation Classic - Method for the Analysis of Sugars in Plant Cell-Wall Polysaccharides by Gas-Liquid-Chromatography. *Curr Cont/Phys Chem Earth Sci*, 10-10.
- Alfaro, M., Oguiza, J. A., Ramirez, L. und Pisabarro, A. G. (2014). Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi. *J Proteomics* 102, 28-43.
- Avalos, J. und Limon, M. C. (2015). Biological roles of fungal carotenoids. *Curr Genet* 61, 309-324.
- Bangen, K., Hong, N., Louie, A., Mei, G. und Trewartha, J. (2004). The Effects of Incubation with Ampicillin and Tetracycline on the Expression of the bla and tetA genes of pBR322. *J Exp Microbiol Immunol* 5, 23-28.
- Barends, T. R., Hartmann, E., Griese, J. J., Beitlich, T., Kirienko, N. V., Ryjenkov, D. A., Reinstein, J., Shoeman, R. L., Gomelsky, M. und Schlichting, I. (2009). Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature* 459, 1015-1018.
- Barreto-Bergter, E. und Figueiredo, R. T. (2014). Fungal glycans and the innate immune recognition. *Front Cell Infect Microbiol* 4, 1-17.
- Bender, H., Lehmann, J. und Wallenfels, K. (1959). Pullulan, a Extracellular Glucan from *Pullularia-Pullulans*. *Biochimica Et Biophysica Acta* 36, 309-316.
- Bergman, B., Ran, L. und Adams, D. G. (2008). Cyanobacterial-plant Symbioses: Signaling and Development. In *The Cyanobacteria. Molecular Biology, Genomics and Evolution*, Herrero, A. und Flores, E. (Hrsg.), Caister Academic Press, Norfolk, 447-473.
- Bouveng, H. O., Mckay, J., Lindberg, B. und Kiessling, H. (1962). Polysaccharides Elaborated by *Pullularia Pullulans* .1. Neutral Glucan Synthesised from Sucrose Solutions. *Acta Chemica Scandinavica* 16, 615-620.
- Bowman, S. M. und Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* 28, 799-808.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Breitenbach, R., Silbernagl, D., Toepel, J., Sturm, H., Broughton, W. J., Sasaki, G. L. und Gorbushina, A. A. (2018). Corrosive extracellular polysaccharides of the rock-inhabiting model fungus *Knufia petricola*. *Extremophiles* 22(2), 165-175.

Literatur

- Breitenbach, R., Toepel, J., Dementyeva, P., Knabe, N. und Gorbushina, A. A. (2016). Snapshots of fungal extracellular matrices. In *The Perfect Slime - Microbial Extracellular Polymeric Substances (EPS)*, Flemming, H. C., Neu, T. R. und Wingender, J. (Hrsg.), IWA Publishing, London, 269-300.
- Breitenbach, R., Dementyeva, P., Gorbushina, A. A. und Knabe, N. (unveröffentlicht). Characterization of pigment mutants of the rock-inhabiting fungus *Knufia petricola*.
- Büdel, B., Karsten, u. und Garcia-Pichel, F. (1997). Ultraviolet-absorbing scytonemin and mycosporine-like amino acid derivatives in exposed, rock-inhabiting cyanobacterial lichens. *Oecologia* 122, 165-172.
- Buikema, W. J. und Haselkorn, R. (1991). Characterization of a Gene Controlling Heterocyst Differentiation in the Cyanobacterium *Anabaena*-7120. *Genes & Development* 5, 321-330.
- Butler, M. J. und Day, A. W. (1998). Fungal melanins: a review. *Can J Microbiol* 44, 1115-1136.
- Butler, M. J., Gardiner, R. B. und Day, A. W. (2005). Degradation of melanin or inhibition of its synthesis: are these a significant approach as a biological control of phytopathogenic fungi? *Biol Control* 32, 326-336.
- Campbell, E. L., Hagen, K. D., Chen, R., Risser, D. D., Ferreira, D. P. und Meeks, J. C. (2015). Genetic analysis reveals the identity of the photoreceptor for phototaxis in hormogonium filaments of *Nostoc punctiforme*. *J Bacteriol* 197, 782-791.
- Cao, Z., Livoti, E., Losi, A. und Gartner, W. (2010). A blue light-inducible phosphodiesterase activity in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Photochem Photobiol* 86, 606-611.
- Carbohydrate Research Center (2016). The CCRC Spectral Database for PMAA's (Georgia, USA: University of Georgia).
<https://www.ccrcc.uga.edu/specdb/ms/pmaa/pframe.html>. Letzter Zugriff: 19.02.2018
- Cardemil, L. und Wolk, C. P. (1979). Polysaccharides from Heterocyst and Spore Envelopes of a Blue-Green-Alga - Structure of the Basic Repeating Unit. *J Biol Chem* 254, 736-741.
- Cerna, M., Barros, A. S., Nunes, A., Rocha, S. M., Delgadillo, I., Copikova, J. und Coimbra, M. A. (2003). Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives. *Carbohydr Pol* 51, 383-389.
- Cheng, K. C., Demirci, A. und Catchmark, J. M. (2011). Pullulan: biosynthesis, production, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 92, 29-44.
- Chowdhary, A., Perfect, J. und de Hoog, G. S. (2015). Black Molds and Melanized Yeasts Pathogenic to Humans. *Cold Spring Harbor Perspect Med* 5, 1-21.
- Christman, H. D., Campbell, E. L. und Meeks, J. C. (2011). Global transcription profiles of the nitrogen stress response resulting in heterocyst or hormogonium development in *Nostoc punctiforme*. *J Bacteriol* 193, 6874-6886.
- Ciucanu, I. (2006). Per-O-methylation reaction for structural analysis of carbohydrates by mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 576, 147-155.
- Ciucanu, I. und Caprita, R. (2007). Per-O-methylation of neutral carbohydrates directly from aqueous samples for gas chromatography and mass spectrometry analysis. *Anal Chim Acta* 585, 81-85.

- Cohen, M. F. und Meeks, J. C. (1997). A hormogonium regulating locus, *hrmUA*, of the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* strain ATCC 29133 and its response to an extract of a symbiotic plant partner *Anthoceros punctatus*. *Mol Plant Microbe Interact* 10, 280-289.
- Cohen, M. F., Meeks, J. C., Cai, Y. A. und Wolk, C. P. (1998). Transposon mutagenesis of heterocyst-forming filamentous cyanobacteria. *Photosynth Mol Biol Energy Capture* 297, 3-17.
- Cohen, M. F., Wallis, J. G., Campbell, E. L. und Meeks, J. C. (1994). Transposon mutagenesis of *Nostoc* sp. strain ATCC 29133, a filamentous cyanobacterium with multiple cellular differentiation alternatives. *Microbiol* 140 (Pt 12), 3233-3240.
- Comte, S., Guibaud, G. und Baudu, M. (2006). Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and complexation properties of Pb and Cd with EPS Part II. Consequences of EPS extraction methods on Pb²⁺ and Cd²⁺ complexation. *Enzym Microbial Technol* 38, 246-252.
- Cordero, R. J. B. und Casadevall, A. (2017). Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biol Rev* 31, 99-112.
- Cui, S. W. (2005). Food carbohydrates : chemistry, physical properties, and applications. Structural analysis of polysaccharides. Taylor & Francis Group, CRC Press.
- Cypionka, H. (2017). Picolay. www.picolay.icbm.de, version 06.12.2017. Letzter Zugriff: 19.02.2018
- Damerval, T., Guglielmi, G., Houmard, J. und De Marsac, N. T. (1991). Hormogonium Differentiation in the Cyanobacterium *Calothrix*: A Photoregulated Developmental Process. *Plant Cell* 3, 191-201.
- Damveld, R. A., Franken, A., Arentshorst, M., Punt, P. J., Klis, F. M., van den Hondel, C. A. M. J. J. und Ram, A. F. J. (2008). A novel screening method for cell wall mutants in *Aspergillus niger* identifies UDP-galactopyranose mutase as an important protein in fungal cell wall biosynthesis. *Genetics* 178, 873-881.
- Danese, P. N., Pratt, L. A. und Kolter, R. (2000). Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* 182, 3593-3596.
- de Beer, D., Stoodley, P. und Lewandowski, Z. (1994). Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnol Bioeng* 44, 636-641.
- De Philippis, R., Colica, G. und Micheletti, E. (2011). Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process. *Appl Microbiol Biotechnol* 92, 697-708.
- DeRuyter, Y. S. und Fromme, P. (2008). Molecular Structure of the Photosynthetic Apparatus. In *The Cyanobacteria Molecular Biology, Genomics and Evolution*, Herrero, A. und Flores, E. (Hrsg.), Caister Academic Press, Norfolk, 217-270.
- Diakumaku, E., Gorbushina, A. A., Krumbein, W. E., Panina, L. und Soukharjevski, S. (1995). Black fungi in marbles and limestones - an aesthetical, chemical and physical problem for the conservation of monuments. *Sci Total Environ* 167, 295-304.
- Di Pippo, F., Ellwood, N. T. W., Gismondi, A., Bruno, L., Rossi, F., Magni, P. und De Philippis, R. (2013). Characterization of exopolysaccharides produced by seven biofilm-forming cyanobacterial strains for biotechnological applications. *J Appl Phycol* 25, 1697-1708.
- Doering, T. L. (2009). How Sweet it is! Cell Wall Biogenesis and Polysaccharide Capsule Formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Microbiol* 63, 223-247.

Literatur

- Dominiak, D. M., Nielsen, J. L. und Nielsen, P. H. (2011). Extracellular DNA is abundant and important for microcolony strength in mixed microbial biofilms. *Environ Microbiol* 13, 710-721.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8, 881-890.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. und Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem* 28, 350-356.
- Dunn, J. H. und Wolk, C. P. (1970). Composition of the cellular envelopes of *Anabaena cylindrica*. *J Bacteriol* 103, 153-158.
- Ehling-Schulz, M., Bilger, W. und Scherer, S. (1997). UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J Bacteriol* 179, 1940-1945.
- Eisenman, H. C. und Casadevall, A. (2012). Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl Microbiol Biotechnol* 93, 931-940.
- El-Ganiny, A. M., Sheoran, I., Sanders, D. A. R. und Kaminskyj, S. G. W. (2010). *Aspergillus nidulans* UDP-glucose-4-epimerase UgeA has multiple roles in wall architecture, hyphal morphogenesis, and asexual development. *Fungal Genet Biol* 47, 629-635.
- Ernst, A., Black, T., Cai, Y., Panoff, J. M., Tiwari, D. N. und Wolk, C. P. (1992). Synthesis of nitrogenase in mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 affected in heterocyst development or metabolism. *J Bacteriol* 174, 6025-6032.
- Fang, F., Lu, W. T., Shan, Q. und Cao, J. S. (2014). Characteristics of extracellular polymeric substances of phototrophic biofilms at different aquatic habitats. *Carbohydr Polym* 106, 1-6.
- Farina, J. I., Vinarta, S. C., Cattaneo, M. und Figueroa, L. I. C. (2009). Structural stability of *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126 beta-glucan with fermentation time: a chemical, infrared spectroscopic and enzymatic approach. *J Appl Microbiol* 106, 221-232.
- Fernandez, C. W. und Koide, R. T. (2013). The function of melanin in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* under water stress. *Fungal Ecol* 6, 479-486.
- Ferreira, A. R., Alves, V. D. und Coelho, I. M. (2016). Polysaccharide-Based Membranes in Food Packaging Applications. *Membranes (Basel)* 6(22), 1-17.
- Figurski, D. H. und Helinski, D. R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 1648-1652.
- Flemming, H. C. (2017). The perfect slime - and the "dark matter" of biofilms. In *The perfect slime*, Flemming, H. C., Neu, T. R. und Wingender, J., (Hrsg.), IWA Publishing, London, 1-13.
- Flemming, H. C., Neu, T. R. und Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: The "House of Biofilm cells". *J Bacteriol* 189, 7945-7947.
- Flemming, H. C. und Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623-633.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A. und Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 14, 563-575.
- Flores, E. und Herrero, A. (2010). Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nat Rev Microbiol* 8, 39-50.
- Frolund, B., Palmgren, R., Keiding, K. und Nielsen, P. H. (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Wat Res* 30, 1749-1758.

- Fujii, N., Shinohara, S., Ueno, H., Imada, K. (1984). Polysaccharides produced by *Aureobasidium* sp. (black yeast). *Kenkyu Hokoku—Miyazaki Daigaku Nogakubu* 31, 253-262.
- Gadd, G. M. (2007). Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol Res* 111, 3-49.
- Gadd, G. M. und Derome, L. (1988). Biosorption of Copper by Fungal Melanin. *Appl Microbiol Biotechnol* 29, 610-617.
- Gao, L., Pan, X. L., Zhang, D. Y., Mu, S. Y., Lee, D. J. und Halik, U. (2015). Extracellular polymeric substances buffer against the biocidal effect of H₂O₂ on the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Wat Res* 69, 51-58.
- Garcia-Pichel, F. und Castenholz, R. W. (1993) Occurrence of UV-absorbing mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Appl Environ Microbiol* 59, 163-169.
- Garozzo, D., Impallomeni, G., Spina, E. und Sturiale, L. (1998). The structure of the exocellular polysaccharide from the cyanobacterium *Cyanospira capsulata*. *Carbohydr Res* 307, 113-124.
- Goldstein, I. J. und Hayes, C. E. (1978). The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 35, 127-340.
- Gorbushina, A. (2003). Microcolonial fungi: survival potential of terrestrial vegetative structures. *Astrobiol* 3, 543-554.
- Gorbushina, A. A. (2007). Life on the rocks. *Environ Microbiol* 9, 1613-1631.
- Gorbushina, A. A., Beck, A. und Schulte, A. (2005). Microcolonial rock inhabiting fungi and lichen photobionts: evidence for mutualistic interactions. *Micol Res* 109(11), 1288-1296.
- Gorbushina, A. A. und Broughton, W. J. (2009). Microbiology of the Atmosphere-Rock Interface: How Biological Interactions and Physical Stresses Modulate a Sophisticated Microbial Ecosystem. *Annu Rev Microbiol* 63, 431-450.
- Gorbushina, A. A., Kotlova, E. R. und Sherstneva, O. A. (2008). Cellular responses of microcolonial rock fungi to long-term desiccation and subsequent rehydration. *Stud Mycol* 61, 91-97.
- Gorbushina, A. A. und Krumbein, W. E. (2000) Subaerial biofilms and their effects on soil and rock. In *Microbial Sediment*, Riding, R. E. und Awramik, S. M. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 161-170.
- Gorbushina, A. A., Krumbein, W. E., Hamman, C. H., Panina, L., Soukharjevski, S. und Wollenzien, U. (1993). Role of black fungi in color change and biodeterioration of antique marbles. *Geomicrobiol J* 11(3-4), 205-221.
- Gorbushina, A. A. und Palinska, K. A. (1999). Biodeteriorative processes on glass: experimental proof of the role of fungi and cyanobacteria. *Aerobiol* 15, 183-191.
- Gorbushina, A. A., Whitehead, K., Dornieden, T., Niese, A., Schulte, A. und Hedges, J. I. (2003). Black fungal colonies as units of survival: hyphal mycosporines synthesized by rock-dwelling microcolonial fungi. *Can J Bot* 81, 131-138.
- Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O'Donnell, A. G. und Bailey, M. J. (2000). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied Environ Microbiol* 66, 5488-5491.

Literatur

- Gueidan, C., Ruibal, C., De Hoog, G. S. und Schneider, H. (2011). Rock-inhabiting fungi originated during periods of dry climate in the late Devonian and middle Triassic. *Fungal Biol* 115, 987-996.
- Haba, E., Pinazo, A., Jauregui, O., Espuny, M. J., Infante, M. R. und Manresa, A. (2003). Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnol Bioeng* 81, 316-322.
- Hanahan, D. (1983). Studies on Transformation of Escherichia-Coli with Plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- He, J., Han, G. Y. und Chen, D. W. (2013). Insights into enzyme secretion by filamentous fungi: Comparative proteome analysis of *Trichoderma reesei* grown on different carbon sources. *J Proteomics* 89, 191-201.
- Heesemann, L., Kotz, A., Echtenacher, B., Broniszewska, M., Routier, F., Hoffmann, P. und Ebel, F. (2011). Studies on galactofuranose-containing glycostructures of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol* 301, 523-530.
- Helm, R. F., Huang, Z., Edwards, D., Leeson, H., Peery, W. und Potts, M. (2000). Structural characterization of the released polysaccharide of desiccation-tolerant *Nostoc commune* DRH-1. *J Bacteriol* 182, 974-982.
- Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 7, 263-273.
- Hill, H. Z. (1992). The function of melanin or six blind people examine an elephant. *Bioessays* 14, 49-56.
- Hirose, Y., Narikawa, R., Katayama, M. und Ikeuchi, M. (2010). Cyanobacteriochrome CcaS regulates phycoerythrin accumulation in *Nostoc punctiforme*, a group II chromatic adapter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 8854-8859.
- Hoffman, M. und Decho, A. W. (1999). Extracellular Enzymes Within Microbial Biofilms and the Role of the Extracellular Polymer Matrix. In *Microbial Extracellular Polymeric Substances*, Wingender, J., Neu, T. R. und Flemming, H. C. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 217-230.
- Houmard, J. und de Marsac, N. T. (1988). Cyanobacterial genetic tools: current status. *Methods Enzymol* 167, 808-847.
- Iigusa, H., Yoshida, Y. und Hasunuma, K. (2005). Oxygen and hydrogen peroxide enhance light-induced carotenoid synthesis in *Neurospora crassa*. *Febs Letters* 579, 4012-4016.
- Jeong, J. C., Lee, I. Y., Kim, S. W. und Park, Y. H. (1999). Stimulation of beta-carotene synthesis by hydrogen peroxide in *Blakeslea trispora*. *Biotechnol Letters* 21, 683-686.
- Kacurakova, M., Capek, P., Sasinkova, V., Wellner, N. und Ebringerova, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr Pol* 43, 195-203.
- Kejzar, A., Gobec, S., Plemenitas, A. und Lenassi, M. (2013). Melanin is crucial for growth of the black yeast *Hortaea werneckii* in its natural hypersaline environment. *Fungal Biol* 117, 368-379.
- Khayatan, B., Bains, D. K., Cheng, M. H., Cho, Y. W., Huynh, J., Kim, R., Omoruyi, O. H., Pantoja, A. P., Park, J. S., Peng, J. K., Splitt, S. D., Tian, M. Y. und Risser, D. D. (2017). A Putative O-Linked beta-N-Acetylglucosamine Transferase Is Essential for Hormogonium Development and Motility in the Filamentous Cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *J Bacteriol* 199.

- Knabe, N., Voigt, O., Gerrits, R., Schüssler, J., von Blanckenburg, F. und Gorbushina, A. A. (unveröffentlicht) Genetics for Geomycology: Targeting Genes in the Rock-inhabiting, Model Microcolonial Fungus *Knufia petricola* A95
- Knowles, E. J. und Castenholz, R. W. (2008). Effect of exogenous extracellular polysaccharides on the desiccation and freezing tolerance of rock-inhabiting phototrophic microorganisms. *Fems Microbiol Ecol* 66, 261-270.
- Krois, D. (2017). Organisch-Chemische Methoden in Biochemie, Biologischer Chemie, Molekularbiologie und Medizinischer Chemie. Springer Spektrum, Berlin.
- Kulakovskaya, T. V., Shashkov, A. S., Kulakovskaya, E. V. und Golubev, W. I. (2005). Ustilagic acid secretion by *Pseudozyma fusiformata* strains. *Fems Yeast Res* 5, 919-923.
- Kumar, K., Mella-Herrera, R. A. und Golden, J. W. (2010). Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000315.
- Kuncheva, M., Panchev, I., Pavlova, K., Russinova-Videva, S., Georgieva, K. und Dimitrova, S. (2013). Functional Characteristics of an Exopolysaccharide from Antarctic Yeast Strain *Cryptococcus Laurentii* Al(62). *Biotechnol Biotechnolo Equip* 27, 4098-4102.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lamarre, C., Beau, R., Balloy, V., Fontaine, T., Hoi, J. W. S., Guadagnini, S., Berkova, N., Chignard, M., Beauvais, A. und Latge, J. P. (2009). Galactofuranose attenuates cellular adhesion of *Aspergillus fumigatus*. *Cellular Microbiol* 11, 1612-1623.
- Lamprinou, V., Mammali, M., Katsifas, E. und Karagouni, K. D. (2013) Phenotypic and Molecular Biological Characterization of Cyanobacteria from Marble Surfaces of Treated and Untreated Sites of Propylaea (Acropolis, Athens). *Geomicrobiol* 30(4), 371-378.
- Landoulsi, J., El Kirat, K., Richard, C., Feron, D. und Pulvin, S. (2008). Enzymatic approach in microbial-influenced corrosion: a review based on stainless steels in natural waters. *Environ Sci Technol* 42, 2233-2242.
- Latge, J. P. (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* 66, 279-290.
- Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 999-1007.
- Li, T. T., Li, C. T., Butler, K., Hays, S. G., Guarnieri, M. T., Oyler, G. A. und Betenbaugh, M. J. (2017). Mimicking lichens: incorporation of yeast strains together with sucrose-secreting cyanobacteria improves survival, growth, ROS removal, and lipid production in a stable mutualistic co-culture production platform. *Biotechnol Biofuels* 10(55), 1-11.
- Liang, Z., Li, W., Yang, S. und Du, P. (2010). Extraction and structural characteristics of extracellular polymeric substances (EPS), pellets in autotrophic nitrifying biofilm and activated sludge. *Chemosphere* 81, 626-632.
- Liang, Z. X. (2015). The expanding roles of c-di-GMP in the biosynthesis of exopolysaccharides and secondary metabolites. *Nat Prod Rep* 32, 663-683.
- Liu, H. und Fang, H. H. (2002). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *J Biotechnol* 95, 249-256.
- Liu, Y. S. und Wu, J. Y. (2006). Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Microbiol Biotechnol* 73, 663-668.

Literatur

- Ma, L. M., Conover, M., Lu, H. P., Parsek, M. R., Bayles, K. und Wozniak, D. J. (2009). Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *Plos Pathogens* 5(3), e1000354.
- Mahapatra, S. und Banerjee, D. (2013). Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications. *Microbiol Insights* 6, 1-16.
- Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J. und Flemming, H. C. (1999). The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Int J Biol Macromol* 26, 3-16.
- Meeks, J. C. (1998). Symbiosis between nitrogen-fixing cyanobacteria and plants. *Bioscience* 48, 266-276.
- Meeks, J. C., Campbell, E. L., Summers, M. L. und Wong, F. C. (2002). Cellular differentiation in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Arch Microbiol* 178, 395-403.
- Mollenhauer, D., Mollenhauer, R. und Kluge, M. (1996) Studies on initiation and development of the partner association in *Geosiphon pyriforme* (Kütz.) v. Wettstein, a unique encocytobiotic system of a fungus (Glomales) and the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* (Kütz.). *Hariat Protoplasma* 193, 3-9.
- Montgomery, B. L. (2007). Sensing the light: photoreceptive systems and signal transduction in cyanobacteria. *Mol Microbiol* 64, 16-27.
- Montoya, H. (2009). Algal and cyanobacterial saline biofilms of the Grande Coastal Lagoon, Lima, Peru. *Nat Resour Environ Issues* 15, 127-134.
- Mota, R., Guimaraes, R., Buttell, Z., Rossi, F., Colica, G., Silva, C. J., Santos, C., Gales, L., Zille, A., De Philippis, R., Pereira, S. B. und Tamagnini, P. (2013). Production and characterization of extracellular carbohydrate polymer from *Cyanothece* sp. CCY 0110. *Carbohydr Pol* 92, 1408-1415.
- Muro-Pastor, A. M. und Hess, W. R. (2012). Heterocyst differentiation: from single mutants to global approaches. *Trends in Microbiol* 20, 548-557.
- Nai, C., Wong, H. Y., Pannenbecker, A., Broughton, W. J., Benoit, I., de Vries, R. P., Gueidan, C. und Gorbushina, A. A. (2013). Nutritional physiology of a rock-inhabiting, model microcolonial fungus from an ancestral lineage of the *Chaetothyriales* (Ascomycetes). *Fungal Genet Biol* 56, 54-66.
- Nakhamchik, A., Wilde, C. und Rowe-Magnus, D. A. (2008). Cyclic-di-GMP regulates extracellular polysaccharide production, biofilm formation, and rugose colony development by *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol* 74, 4199-4209.
- Neu, T. R. und Kuhlicke, U. (2017). Fluorescence Lectin Bar-Coding of Glycoconjugates in the Extracellular Matrix of Biofilm and Bioaggregate Forming Microorganisms. *Microorganisms* 5(1), 1-13.
- Neu, T. R. und Lawrence, J. R. (2016). The extracellular matrix - an intractable part of biofilm systems. In *The Perfect Slime - Microbial Extracellular Polymeric Substances*, Flemming, H. C., Neu, T. R. und Wingender, J. (Hrsg.), IWA Publishing, London, 25-60.
- Neu, T. R. und Marshall, K. C. (1990). Bacterial polymers: physicochemical aspects of their interactions at interfaces. *J Biomater Appl* 5, 107-133.
- Neunuebel, M. R. und Golden, J. W. (2008). The *Anabaena* sp. strain PCC 7120 gene all2874 encodes a diguanylate cyclase and is required for normal heterocyst development under high-light growth conditions. *J Bacteriol* 190, 6829-6836.
- Nicolalsen, K., Hahn, A. und Schleiff, E. (2009). The cell wall in heterocyst formation by *Anabaena* sp PCC 7120. *J Basic Microbiol* 49, 5-24.

- Nilsson, M., Rasmussen, U. und Bergman, B. (2006). Cyanobacterial chemotaxis to extracts of host and nonhost plants. *Fems Microbiol Ecol* 55, 382-390.
- Noack-Schonmann, S., Bus, T., Banasiak, R., Knabe, N., Broughton, W. J., Den Dulk-Ras, H., Hooykaas, P. J. J. und Gorbushina, A. A. (2014a). Genetic transformation of *Knufia petricola* A95-a model organism for biofilm-material interactions. *Amb Express* 4(80), 1-6.
- Noack-Schonmann, S., Spagin, O., Grunder, K. P., Breithaupt, M., Gunter, A., Muschik, B. und Gorbushina, A. A. (2014b). Sub-aerial biofilms as blockers of solar radiation: spectral properties as tools to characterise material-relevant microbial growth. *Int Biodeterior Biodegrad* 86, 286-293.
- Oliveira, P., Martins, N. M., Santos, M., Couto, N. A., Wright, P. C. und Tamagnini, P. (2015). The *Anabaena* sp. PCC 7120 Exoproteome: Taking a Peek outside the Box. *Life (Basel)* 5, 130-163.
- Oren, A. (1997). Mycosporine-like amino acids as osmotic solutes in a community of halophilic cyanobacteria. *Geomicrobiol J* 14, 231-240.
- Osinska-Jaroszuk, M., Jarosz-Wilkolazka, A., Jaroszuk-Scisel, J., Szalapata, K., Nowak, A., Jaszek, M., Ozimek, E. und Majewska, M. (2015). Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. *World J Microbiol Biotechnol* 31, 1823-1844.
- Paul, B. C., El-Ganiny, A. M., Abbas, M., Kaminskyj, S. G. und Dahms, T. E. (2011). Quantifying the importance of galactofuranose in *Aspergillus nidulans* hyphal wall surface organization by atomic force microscopy. *Eukaryotic Cell* 10, 646-653.
- Pedersen, L. L. und Turco, S. J. (2003). Galactofuranose metabolism: a potential target for antimicrobial chemotherapy. *Cell Mol Life Sci* 60, 259-266.
- Pellicer-Nacher, C., Domingo-Felez, C., Mutlu, A. G. und Smets, B. F. (2013). Critical assessment of extracellular polymeric substances extraction methods from mixed culture biomass. *Wat Res* 47, 5564-5574.
- Peltier, P., Euzen, R., Daniellou, R., Nugier-Chauvin, C. und Ferrieres, V. (2008). Recent knowledge and innovations related to hexofuranosides: structure, synthesis and applications. *Carbohydr Res* 343, 1897-1923.
- Pereira, S., Zille, A., Micheletti, E., Moradas-Ferreira, P., De Philippis, R. und Tamagnini, P. (2009). Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *Fems Microbiol Rev* 33, 917-941.
- Perez-Mendoza, D., Aragon, I. M., Prada-Ramirez, H. A., Romero-Jimenez, L., Ramos, C., Gallegos, M. T. und Sanjuan, J. (2014). Responses to Elevated c-di-GMP Levels in Mutualistic and Pathogenic Plant-Interacting Bacteria. *Plos One* 9(3), e91645.
- Perez-Mendoza, D., Rodriguez-Carvajal, M. A., Romero-Jimenez, L., Farias Gde, A., Lloret, J., Gallegos, M. T. und Sanjuan, J. (2015). Novel mixed-linkage beta-glucan activated by c-di-GMP in *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E757-765.
- Perez-Mendoza, D. und Sanjuan, J. (2016). Exploiting the commons: cyclic diguanylate regulation of bacterial exopolysaccharide production. *Curr Opin Microbiol* 30, 36-43.
- Persat, A., Nadell, C. D., Kim, M. K., Ingremeau, F., Siryaporn, A., Drescher, K., Wingreen, N. S., Bassler, B. L., Gitai, Z. und Stone, H. A. (2015). The Mechanical World of Bacteria. *Cell* 161, 988-997.

Literatur

- Pinto, F., Pacheco, C. C., Ferreira, D., Moradas-Ferreira, P. und Tamagnini, P. (2012). Selection of suitable reference genes for RT-qPCR analyses in cyanobacteria. *Plos One* 7, e34983.
- Pokharel, R., Gerrits, R., Schuessler, J. A., Floor, G. H., Gorbushina, A. A. und von Blanckenburg, F. (2017). Mg Isotope Fractionation during Uptake by a Rock-Inhabiting, Model Microcolonial Fungus *Knufia petricola* at Acidic and Neutral pH. *Environ Sci Technol* 51, 9691-9699.
- Pommerville, J. C. und Alcamo, I. E. (2004). Alcamo's fundamentals of microbiology, 7th edn, Mass.: Jones and Bartlett Publishers, Sudbury.
- Porra, R. J. (2002). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynth Res* 73, 149-156.
- Potts, M. (1999). Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *European J Phycol* 34(4), 319-328.
- Prajapati, V. D., Jani, G. K. und Khanda, S. M. (2013). Pullulan: An exopolysaccharide and its various applications. *Carbohydr Pol* 95, 540-549.
- Price, N. P. J. (2007). Permethylated Linkage Analysis Techniques for Residual Carbohydrates. *Appl Biochem Biotechnol* 148(1-3), 271-276.
- Raman, N. M. und Ramasamy, S. (2017). Genetic validation and spectroscopic detailing of DHN-melanin extracted from an environmental fungus. *Biochem Biophys Rep* 12, 98-107.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. und Stanier, R. Y. (1979). Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *J Genet Microbiol* 111, 1-61.
- Risser, D. D., Chew, W. G. und Meeks, J. C. (2014). Genetic characterization of the hmp locus, a chemotaxis-like gene cluster that regulates hormogonium development and motility in *Nostoc punctiforme*. *Mol Microbiol* 92, 222-233.
- Risser, D. D. und Meeks, J. C. (2013). Comparative transcriptomics with a motility-deficient mutant leads to identification of a novel polysaccharide secretion system in *Nostoc punctiforme*. *Mol Microbiol* 87, 884-893.
- Robinson, C. H. (2001). Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytologist* 151, 341-353.
- Romeis, B. (2015). Mikroskopische Technik, 19. Auflage, Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
- Romling, U., Galperin, M. Y. und Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* 77, 1-52.
- Rosas, A. L. und Casadevall, A. (1997). Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *Fems Microbiol Letters* 153, 265-272.
- Rossi, F. und De Philippis, R. (2015). Role of cyanobacterial exopolysaccharides in phototrophic biofilms and in complex microbial mats. *Life (Basel)* 5, 1218-1238.
- Ruibal, C., Platas, G. und Bills, G. F. (2008). High diversity and morphological convergence among melanised fungi from rock formations in the Central Mountain System of Spain. *Persoonia* 21, 93-110.
- Ruiz-Matute, A. I., Hernandez-Hernandez, O., Rodriguez-Sanchez, S., Sanz, M. L. und Martinez-Castro, I. (2011). Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879, 1226-1240.

- Sakaki, H., Nochide, H., Komemushi, S. und Miki, W. (2002). Effect of active oxygen species on the productivity of torularhodin by *Rhodotorula glutinis* no. 21. *J Biosci Bioeng* 93, 338-340.
- Sakamoto, T., Yoshida, T., Arima, H., Hatanaka, Y., Takani, Y. und Yoshiyuki, T. (2009). Accumulation of trehalose in response to desiccation and salt stress in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Phycol Res* 57, 66-73.
- Santos, D. K., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A. und Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *Int J Mol Sci* 17(3), 1-31.
- Sasaki, G. L., Czelusniak, P. A., Vicente, V. A., Zanata, S. M., Souza, L. M., Gorin, P. A. J. und Iacomini, M. (2011). Some biomolecules and a partially O-acetylated exogalactomannan containing beta-Galf units from pathogenic *Exophiala jeanselmei*, having a pronounced immunogenic response. *Int J Biol Macromol* 48, 177-182.
- Sasaki, G. L., Ferreira, J. C., Glienke-Blanco, C., Torri, G., De Toni, F., Gorin, P. A. J. und Iacomini, M. (2002). Pustulan and branched beta-galactofuranan from the phytopathogenic fungus *Guignardia citricarpa*, excreted from media containing glucose and sucrose. *Carbohydr Pol* 48, 385-389.
- Sasaki, G. L., Iacomini, M. und Gorin, P. A. J. (2005). Methylation-GC-MS analysis of arabinofuranose- and galactofuranose-containing structures: rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias* 77, 223-234.
- Sasaki, G. L. und Souza, L. M. (2013). Mass Spectrometry Strategies for Structural Analysis of Carbohydrates and Glycoconjugates. In Tandem Mass Spectrometry - Molecular Characterization. Coelho, D. A. V. (Hrsg.), InTech, 81-115.
- Savakis, P., De Causmaecker, S., Angerer, V., Ruppert, U., Anders, K., Essen, L. O. und Wilde, A. (2012). Light-induced alteration of c-di-GMP level controls motility of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol* 85, 239-251.
- Schaeper, S., Krol, E., Skotnicka, D., Kaever, V., Hilker, R., Sogaard-Andersen, L. und Becker, A. (2016). Cyclic Di-GMP Regulates Multiple Cellular Functions in the Symbiotic Alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 198, 521-535.
- Schmalhorst, P. S., Krappmann, S., Vervecken, W., Rohde, M., Muller, M., Braus, G. H., Contreras, R., Braun, A., Bakker, H. und Routier, F. H. (2008). Contribution of galactofuranose to the virulence of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 7, 1268-1277.
- Schmid, J., Sieber, V. und Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front Microbiol* 6, 496.
- Schmid, J., Meyer, V. und Sieber, V. (2016). Scleroglucan: biosynthesis, production and application of a versatile hydrocolloid. *Appl Microbiol Biotechnol* 91(4), 937-947.
- Schüßler, A. (2012). The *Geosiphon-Nostoc* Endosymbiosis and Its Role as a Model for Arbuscular Mycorrhiza Research. In Fungal Associations. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research). Hock, B. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 77-91.
- Schüßler, A., Meyer, T., Gehrig, H. und Kluge, M. (1997). Variations of lectin binding sites in extracellular glycoconjugates during the life cycle of *Nostoc punctiforme*, a potentially endosymbiotic cyanobacterium. *Europ J Phycol* 32, 233-239.

Literatur

- Seckbach, J. (2007). *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*. Springer, Dordrecht.
- Seiffert, F. (2014). Charakterisierung von Gesteinsbewuchs und -verwitterung durch einen Modellbiofilm. Dissertation im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie (Berlin, Freie Universität Berlin).
- Seiffert, F., Bandow, N., Bouehez, J., von Blanckenburg, F. und Gorbushina, A. A. (2014). Microbial colonization of bare rocks: laboratory biofilm enhances mineral weathering. *Geochem of Earth's Surface Ges-10* 10, 123-129.
- Seiffert, F., Bandow, N., Kalbe, U., Milke, R. und Gorbushina, A. A. (2016). Laboratory Tools to Quantify Biogenic Dissolution of Rocks and Minerals: A Model Rock Biofilm Growing in Percolation Columns. *Front Earth Sci* 4(31), 1-10.
- Selbmann, L., de Hoog, G. S., Mazzaglia, A., Friedmann, E. I. und Onofri, S. (2005). Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic desert. *Stud Mycol*, 1-32.
- Selbmann, L., Zucconi, L., Isola, D. und Onofri, S. (2014). Rock black fungi: excellence in the extremes, from the Antarctic to space. *Curr Genet*, 335-345.
- Selvakumar, P., Rajasekar, S., Periasamy, K. und Raaman, N. (2008). Isolation and characterization of melanin pigment from *Pleurotus cystidiosus* (telomorph of *Antromycopsis macrocarpa*). *World J Microbiol Biotechnol* 24, 2125-2131.
- Sheppard, D. C. und Howell, P. L. (2016). Biofilm Exopolysaccharides of Pathogenic Fungi: Lessons from Bacteria. *J Biol Chem* 291(24), 12529-12537.
- Shimao, M. (2001). Biodegradation of plastics. *Curr Opin Biotechnol* 12, 242-247.
- Silvester, W. B. (1976). Endophyte adaptation in *Gunnera-Nostoc* symbiosis. In *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*. Nutman, P. S. (Hrsg.), Cambridge University Press, Cambridge, 521-538.
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimitz, M. und Romling, U. (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* 53, 1123-1134.
- Singh, R., Shivaprakash, M. R. und Chakrabarti, A. (2011). Biofilm formation by zygomycetes: quantification, structure and matrix composition. *Microbiol-Sgm* 157, 2611-2618.
- Singh, R. S. und Saini, G. K. (2012). Biosynthesis of Pullulan and Its Applications in Food and Pharmaceutical Industry. In *Microorganisms in sustainable agriculture and biotechnology*, Satyanarayana. Johri, T. B. N. und Prakash, A. (Hrsg.), Springer, Dordrecht, New York, 509-553.
- Sowa, W., Blackwood, A.C., Adams, G.A. (1963). Neutral extracellular glucan of *Pullularia pullulans* (de Bary) Berkhout. *Can J Chem* 41, 2314-2319.
- Spangler, C., Bohm, A., Jenal, U., Seifert, R. und Kaefer, V. (2010). A liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry method for quantitation of cyclic di-guanosine monophosphate. *J Microbiol Methods* 81, 226-231.
- Staley, J. T., Palmer, F. und Adams, J. B. (1982). Microcolonial Fungi: Common Inhabitants on Desert Rocks? *Science* 215, 1093-1095.
- Sterflinger, K., De Baere, R., de Hoog, G. S., De Wachter, R., Krumbein, W. E. und Haase, G. (1997). *Coniosporium perforans* and *C. apollinis*, two new rock-inhabiting fungi isolated from marble in the Sanctuary of Delos (Cyclades, Greece). *Antonie Van Leeuwenhoek* 72, 349-363.
- Sterflinger, K. und Krumbein, W. E. (1997). Dematiaceous fungi as a major agent for biopitting on Mediterranean marbles and limestones. *Geomicrobiol* 14(3), 219-230.

- Sterflinger, K. und Pinar, G. (2013). Microbial deterioration of cultural heritage and works of art--tilting at windmills? *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 9637-9646.
- Stewart, P. S. und Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 6, 199-210.
- Sutherland, I. W. (1990). Exopolysaccharide structure. In Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Sutherland, I. W. (Hrsg.), Cambridge University Press, Cambridge, 20-37.
- Tarutina, M., Ryjenkov, D. A. und Gomelsky, M. (2006). An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J Biol Chem* 281, 34751-34758.
- Tourney, J. und Ngwenya, B. T. (2014). The role of bacterial extracellular polymeric substances in geomicrobiology. *Chem Geol* 386, 115-132.
- Tous, C., Vega-Palas, M. A. und Vioque, A. (2001). Conditional expression of RNase P in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC6803 allows detection of precursor RNAs - Insight in the in vivo maturation pathway of transfer and other stable RNAs. *J Biol Chem* 276, 29059-29066.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Tseng, M. N., Chung, P. C. und Tzean, S. S. (2011). Enhancing the stress tolerance and virulence of an entomopathogen by metabolic engineering of dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis genes. *Appl Environ Microbiol* 77, 4508-4519.
- Tsumuraya, Y., Misaki, A., Takaya, S. und Torii, M. (1978). New Fungal Alpha-D-Glucan, Elsinan, Elaborated by *Elsinoe-Leucospila*. *Carbohydr Res* 66, 53-65.
- Ueno, Y., Hirashima, N., Inoh, Y., Furuno, T. und Nakanishi, M. (2007). Characterization of biosurfactant-containing liposomes and their efficiency for gene transfection. *Biol Pharmal Bulletin* 30, 169-172.
- van Tilburg, A. U. und Thomas, M. D. (1993). Production of Extracellular Proteins by the Biocontrol Fungus *Gliocladium virens*. *Appl Environ Microbiol* 59, 236-242.
- Vieira, A. A. H., Ortolano, P. I. C., Giroldo, D., Oliveira, M. J. D., Bittar, T. B., Lombardi, A. T. und Sartori, A. L. (2008). Role of hydrophobic extracellular polysaccharide of *Aulacoseira granulata* (Bacillariophyceae) on aggregate formation in a turbulent and hypereutrophic reservoir. *Limnology and Oceanography* 53, 1887-1899.
- Vilain, S., Pretorius, J. M., Theron, J. und Brozel, V. S. (2009). DNA as an Adhesin: *Bacillus cereus* Requires Extracellular DNA To Form Biofilms. *Appl Environ Microbiol* 75, 2861-2868.
- Vilhauer, L., Jarvis, J., Ray, W. K. und Helm, R. F. (2014). The exo-proteome and exo-metabolome of *Nostoc punctiforme* (Cyanobacteria) in the presence and absence of nitrate. *Arch Microbiol* 196, 357-367.
- Villa, F., Stewart, P. S., Klapper, I., Jacob, J. M. und Cappitelli, F. (2016). Subaerial Biofilms on Outdoor Stone Monuments: Changing the Perspective Toward an Ecological Framework. *Biosci* 66, 285-294.
- Volk, R. B., Venzke, K. und Blaschek, W. (2007). Structural investigation of a polysaccharide released by the cyanobacterium *Nostoc insulare*. *J Appl Phycol* 19, 255-262.

Literatur

- Volkman, M., Whitehead, K., Rütters, H., Rullkötter, J. und Gorbushina, A. A. (2003). *Rapid Commun Mass Specrom* 17, 897-902.
- Wang, Z. F., He, Y. und Huang, L. J. (2007). An alternative method for the rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS analysis of carbohydrates. *Carbohydr Res* 342, 2149-2151.
- Watanabe, M., Sasaki, K., Nakashimada, Y., Kakizono, T., Noparatnaraporn, N. und Nishio, N. (1998). Growth and flocculation of a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* 50, 682-691.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. und Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295, 1487-1487.
- Whitton, B. A. und Potts, M. (2012). Introduction to the cyanobacteria. In: Whitton, B. A. (ed.) *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*. Springer Verlag.
- Wilde, A., Fiedler, B. und Borner, T. (2002). The cyanobacterial phytochrome Cph2 inhibits phototaxis towards blue light. *Mol Microbiol* 44, 981-988.
- Wingender, J., Neu, T. R. und Flemming, H.-C. (1999). *Microbial extracellular polymeric substances : characterization, structure, and function*. Springer, Berlin, New York.
- Wolf, E. und Schüßler, A. (2005). Phycobiliprotein fluorescence of *Nostoc punctiforme* changes during the life cycle and chromatic adaptation: characterization by spectral confocal laser scanning microscopy and spectral unmixing. *Plant Cell Environ* 28, 480-491.
- Wollenzien, U., de Hoog, G. S., Krumbein, W. und Uijthof, J. M. (1997). *Sarcinomyces petricola*, a new microcolonial fungus from marble in the Mediterranean basin. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71, 281-288.
- Wosten, H. A. B. und Scholtmeijer, K. (2015). Applications of hydrophobins: current state and perspectives. *Appl Microbiol and Biotechnol* 99, 1587-1597.
- Wu, Y. C., Ding, Y. Z., Cohen, Y. und Cao, B. (2015). Elevated level of the second messenger c-di-GMP in *Comamonas testosteroni* enhances biofilm formation and biofilm-based biodegradation of 3-chloroaniline. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 1967-1976.
- Xu, X., Elhai, J. und Wolk, C. P. (2008). Transcriptional and Developmental Responses by *Anabaena* to Depreivation of Fixed Nitrogen. In *The Cyanobacteria. Molecular Biology, Genomics and Evolution*. Herrero, A. und Flores, E. (Hrsg.), Caister Academic Press, Norfolk, 383-422.
- Young, A. J. und Lowe, G. M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys* 385, 20-27.
- Zakharova, K., Tesei, D., Marzban, G., Dijksterhuis, J., Wyatt, T. und Sterflinger, K. (2013). Microcolonial fungi on rocks: a life in constant drought? *Mycopathol* 175, 537-547.
- Zarnowski, R., Westler, W. M., Lacmbouh, G. A., Marita, J. M., Bothe, J. R., Bernhardt, J., Lounes-Hadj Saharaoui, A., Fontaine, J., Sanchez, H., Hatfield, R. D., Ntambi, J. M., Nett, J. E., Mitchell, A. P. und Andes, D. R. (2014). Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio* 5, e01333-01314.
- Zhong, J. Y., Frases, S., Wang, H., Casadevall, A. und Stark, R. E. (2008). Following fungal melanin biosynthesis with solid-state NMR: Biopolyrner molecular structures and possible connections to cell-wall polysaccharides. *Biochem* 47, 4701-4710.
- Zorel, J. A., Aquino, S. F., Sanson, A. L., Castro-Borges, W. und Silva, S. Q. (2015). Evaluation of EPS extraction protocols from anaerobic sludge for gel-based proteomic studies. *Wat Sci Technol* 72, 535-542.

Zupancic, J., Novak Babic, M., Zalar, P. und Gunde-Cimerman, N. (2016). The Black Yeast *Exophiala dermatitidis* and Other Selected Opportunistic Human Fungal Pathogens Spread from Dishwashers to Kitchens. *Plos One* 11, e0148166.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1. Extrazelluläre polymere Substanzen im Biofilm.....	4
Abbildung 1.2. Struktur von Pullulan.....	10
Abbildung 1.3. Modellbiofilm mit <i>N. punctiforme</i> und <i>K. petricola</i>	13
Abbildung 1.4. Schematische Darstellung eines Phycobilisoms.....	18
Abbildung 1.5. Lebenszyklus von <i>N. punctiforme</i>	19
Abbildung 1.6. Struktur von c-di-GMP.....	22
Abbildung 1.7. Cph2-Phytochrom aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	23
Abbildung 3.1. Formel zur Berechnung der $\Delta\Delta C_t$ -Werte in der qRT-PCR.....	47
Abbildung 3.2. BSA-Eichgerade zur Proteinquantifizierung nach Bradford (1976).....	50
Abbildung 3.3. Phototaxis.....	54
Abbildung 3.4. Eichgerade zur Quantifizierung von c-di-GMP.....	56
Abbildung 3.5. Glucose-Eichgerade zur Quantifizierung von Kohlenhydraten nach Dubois <i>et al.</i> (1956).....	58
Abbildung 3.6. Formel zur Berechnung der Konzentration von Monosacchariden aus GC- MS Chromatogrammen.....	60
Abbildung 4.1. In <i>N. punctiforme</i> transferierter C-terminaler Teil des Cph2-Phytochroms aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	68
Abbildung 4.2. PCR zur Überprüfung der erfolgreichen Konjugation von <i>N.</i> <i>punctiforme</i>	69
Abbildung 4.3. Western Blot zur Detektion der DGC in <i>N. punctiforme</i>	70
Abbildung 4.4. Nachweis und Quantifizierung von c-di-GMP mittels HPLC/DAD/MS.....	72
Abbildung 4.5. Wachstumskurve von <i>N. punctiforme</i> Wildtyp und <i>N. p. cph2(5-6)</i>	74
Abbildung 4.6. Morphologie von <i>N. p. cph2(5-6)</i> Suspensionskulturen.....	74

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4.7. Phototaktische Bewegung zu Lichtquellen unterschiedlicher Qualitäten..	77
Abbildung 4.8. Lichtmikroskopische Aufnahmen von <i>N. punctiforme</i> Wildtyp und <i>N. p. cph2(5-6)</i> nach Hormogonien Induktion.....	77
Abbildung 4.9. Licht- und Fluoreszenzmikroskopie in diazotrophen Medium.....	81
Abbildung 4.10. Stabilität möglicher Referenzgene für die RT-qPCR.....	84
Abbildung 4.11. Expression des Nitrogenase-Gens <i>nifH</i>	85
Abbildung 4.12. Expression des Heterozysten-Gens <i>hetR</i>	86
Abbildung 4.13. Morphologie der Biofilme von <i>N. punctiforme</i> Wildtyp und <i>N. p. cph2(5-6)</i>	89
Abbildung 4.14. RPS-Menge produziert von <i>N. punctiforme</i> Wildtyp und <i>N. p. cph2(5-6)</i>	90
Abbildung 4.15. Ausschnitt eines, zur strukturellen Charakterisierung der <i>N. punctiforme</i> Exopolysaccharide herangezogenen GC-MS Chromatogramms.....	91
Abbildung 4.16. Zusammensetzung der Exopolysaccharide produziert von <i>N. punctiforme</i> Wildtyp und <i>N. p. cph2(5-6)</i>	92
Abbildung 4.17. <i>K. petricola</i> Biofilme des Wildtyps und der Pigmentmutanten.....	99
Abbildung 4.18. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Biofilmen des <i>K. petricola</i> Wildtyps und der Pigmentmutanten.....	102
Abbildung 4.19. EPS-Menge produziert von <i>K. petricola</i> Wildtyp und Pigmentmutanten.....	106
Abbildung 4.20. Fourier-transformierte Infrarotspektren (FTIR) der von <i>K. petricola</i> isolierten EPS.....	110
Abbildung 4.21. Derivatisierung von Polysacchariden zu Alditolacetaten.....	112
Abbildung 4.22. Ausschnitt eines GC-MS Chromatogramms der untersuchten <i>K. petricola</i> WT Exopolysaccharide nach Derivatisierung zu Alditolacetaten.....	113

Abbildung 4.23. Monosaccharid-Zusammensetzung der Exopolysaccharide von <i>K. petricola</i> Wildtyp und Pigmentmutanten.....	114
Abbildung 4.24. Derivatisierung von Polysacchariden zu permethylierten Alditolacetaten	115
Abbildung 4.25. Ausschnitt eines GC-MS Chromatogramms der untersuchten <i>K. petricola</i> Exopolysaccharide nach Derivatisierung zu permethylierten Alditolacetaten.....	116
Abbildung 4.26. Bindung ausgewählter Lektine in <i>K. petricola</i> Wildtyp und Pigmentmutanten.....	126
Abbildung 4.27. Bindung des Lektins GNA in <i>K. petricola</i> Wildtyp.....	128
Abbildung 4.28. SDS-PAGE extrazellulärer Proteine aus <i>K. petricola</i> Biofilmen.....	130

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1. Verwendete Plasmide.....	37
Tabelle 2.2. Verwendete Primer.....	37
Tabelle 3.1. PCR Cyclyer-Protokoll.....	41
Tabelle 3.2. qRT-PCR Cyclyer-Programm.....	47
Tabelle 3.3. Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.....	49
Tabelle 3.4. Geräteparameter HPLC c-di-GMP.....	55
Tabelle 3.5. Elutionsgradient HPLC c-di-GMP.....	55
Tabelle 3.6. Geräteparameter GC-MS.....	61
Tabelle 3.7. Temperaturprogramm zur Auftrennung von Alditolacetaten.....	61
Tabelle 3.8. Temperaturprogramm zur Auftrennung von permethylierten Alditolacetaten.....	64
Tabelle 4.1. Laufristanzen der Wildtyp-Hormogonien zur Lichtquelle.....	76
Tabelle 4.2. Anteil glykosidischer Bindungen an Exopolysacchariden von <i>N. punctiforme</i> Wildtyp und <i>N. p. cph2(5-6)</i>	94
Tabelle 4.3. Retentionszeiten permethylierter Alditolacetate (PMAA) nach 3h (Glucose, Mannose) bzw. 4h (Galaktose) Methylierungsdauer.....	117
Tabelle 4.4. Anteil glykosidischer Bindungen an Exopolysacchariden des <i>K. petricola</i> Wildtyps und der Pigmentmutanten.....	119
Tabelle 4.5. Übersicht des Lektin-Screenings von <i>K. petricola</i> WT und $\Delta pks/\Delta pdg$	123
Tabelle 4.6. Übersicht ausgewählter Lektine mit Bindung in <i>K. petricola</i> WT und/oder Melaninmutanten.....	125

ANHANGSVERZEICHNIS

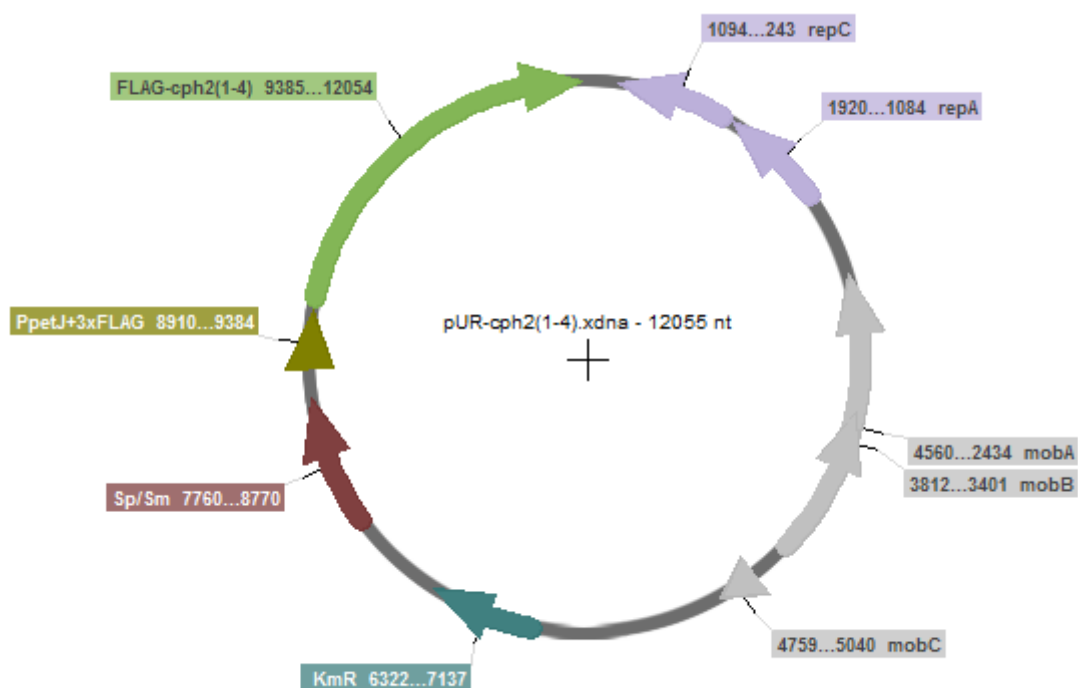
A	Plasmidkarten	XVII
A1	pUR-cph2(1-4).....	XVII
A2	pUR-cph2(5-6).....	XVII
B	Infoblätter Farbfolien	XVIII
B1	Farbfolie #27.....	XVIII
B2	Farbfolie #89.....	XIX
B3	Farbfolie #120.....	XX
B4	Farbfolie #209.....	XXI
C	Massenspektren	XXII
C1	Mannose.....	XXII
C2	Glucose.....	XXII
C3	Galaktose.....	XXIII
C4	Fucose.....	XXIII
C5	Arabinose.....	XXIV
C6	Xylose.....	XXIV
C7	Rhamnose.....	XXV
C8	Ribose.....	XXV
C9	myo-Inositol.....	XXVI
C10	2,3,4,6-Me ₄ -Manp.....	XXVI
C11	2,3,4,6-Me ₄ -Glc _p	XXVII
C12	2,3,4,6-Me ₄ -Gal _p	XXVII
C13	2,3,5,6-Me ₄ -Gal _f	XXVIII
C14	2,3,4-Me ₃ -Gal _p	XXVIII
C15	2,3,4-Me ₃ -Glc _p	XXIX
C16	3,4,6-Me ₃ -Man _p	XXIX
C17	2,4,6-M ₃ -Glc _p	XXX
C18	2,3,5-Me ₃ -Gal _f	XXX
C19	2,3,6-Me ₃ -Glc _p	XXXI
C20	2,6-Me ₂ -Glc _p	XXXI
C21	2,6-Me ₂ -Gal _p	XXXII
C22	2,4-Me ₂ -Glc _p	XXXII
C23	2,3-Me ₂ -Glc _p	XXXIII

Anhangsverzeichnis

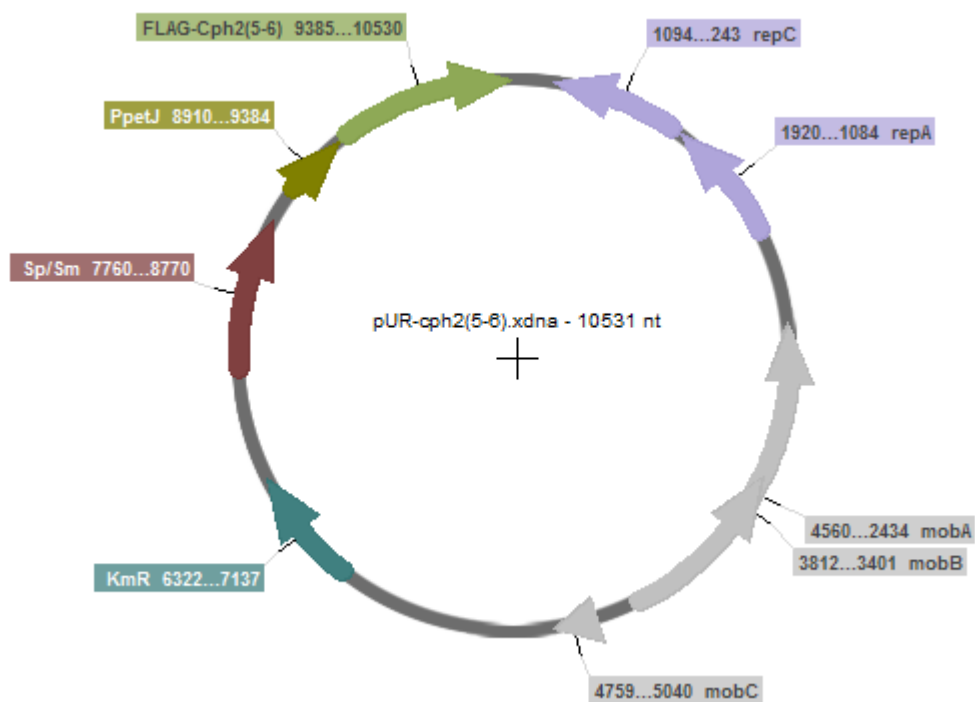
C24	2,3,4-Me ₃ 6-Deoxy-Hexp.....	XXXIII
C25	3,4-Me ₂ 6-Deoxy-Hexp.....	XXXIV
C26	2,3,5-Me ₃ -Penf.....	XXXIV
C27	2,3-Me ₂ -Penp.....	XXXV
D	Lektine.....	XXXVI
D1	Übersicht getesteter Lektine im Screening.....	XXXVI

ANHANG

A Plasmidkarten



A1: pUR-cph2(1-4)

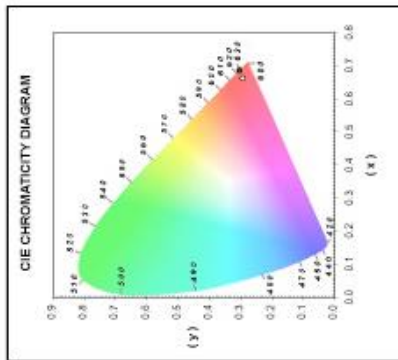
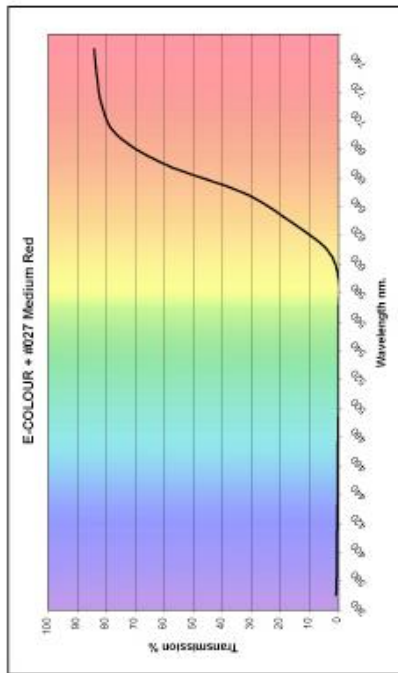


A2: pUR-cph2(5-6)

B Infoblätter Farbfolien

resco COLOR FILTER TECHNICAL DATA SHEET

SWATCHBOOK: E-COLOUR +
 COLOR FILTER: #027 Medium Red
 DESCRIPTION: Color Effects Lighting Filter.
 TRANSMISSION = 3% or -5.1 stop loss
 MIRE D SHIFT = Not Applicable.
 CC EQUIVALENT = Not Applicable.



COLORIMETRIC DATA
 OBSERVER: CIE 1964 10°
 SOURCE: * 'A' (tungsten)
 ° 'D65' (daylight)

HUNTER LAB SOURCE A	
L*	28.310
A*	52.041
B*	45.031

HUNTER LAB SOURCE D65	
L*	20.014
A*	51.814
B*	50.379

CIE 1964 SOURCE A	
Y	5.574
(X)	0.688
(Y)	0.304

CIE 1964 SOURCE D65	
Y	2.993
(X)	0.683
(Y)	0.294

nm.	360	380	400	420	440	460	480	500	520	540	560	580	600	620	640	660	680	700	720	740
Trans %	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	17	33	60	76	81	83	84

MATERIAL SPECIFICATIONS:

General Description: Dye-Coated Polyester Film
 Substrate: PET (Polyethylene Terephthalate)
 Thickness: 3.0 mil (.003" or 75 micron)
 Manufactured in: U.K.

AVAILABLE SIZES:

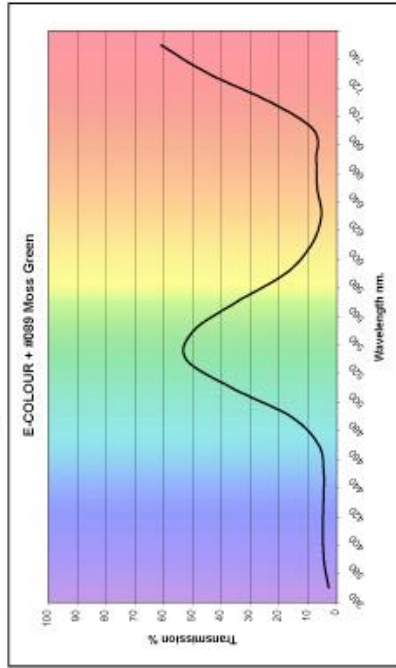
- ✓ 20 in. x 24 in. sheets (50cm x 60cm)
- ✓ 21 in. x 24 in. sheets (53 x 60cm)
- ✓ 24 in. x 25 ft. rolls (60cm x 7.62m)
- ✓ 48 in. x 25 ft. rolls (121cm x 7.62m)
- 60 in. x 20 ft. rolls (152.4cm x 6.10m)
- 13.5 in. Diameter Glass (34.3cm) - Cut to order



COLOR FILTER TECHNICAL DATA SHEET

B2: Farbfolie #89

SWATCHBOOK: E-COLOUR +
 COLOR FILTER: #089 Moss Green
 DESCRIPTION: Color Effects Lighting Filter.
 TRANSMISSION = 31% or -1.7 stop loss
 MIREL SHIFT = Not Applicable.
 CC EQUIVALENT = Not Applicable.

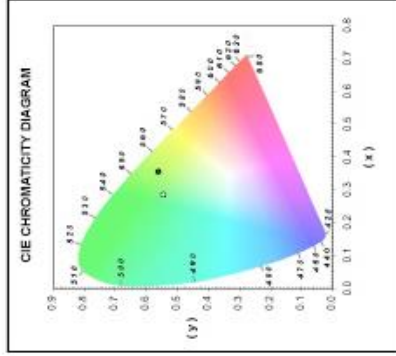


HUNTER LAB SOURCE A	
L*	58.102
A*	-43.105
B*	33.003

HUNTER LAB SOURCE D65	
L*	61.858
A*	-60.036
B*	45.824

CIE 1964 SOURCE A	
Y	25.068
(X)	0.357
(Y)	0.561

CIE 1964 SOURCE D65	
Y	30.002
(X)	0.298
(Y)	0.545



COLORIMETRIC DATA
 OBSERVER: CIE 1964 10°
 SOURCE: • 'A' (tungsten)
 ° 'D65' (daylight)

nm	360	380	400	420	440	460	480	500	520	540	560	580	600	620	640	660	680	700	720	740
Trans %	3	5	5	5	5	4	6	16	36	50	35	18	9	5	7	8	8	23	44	61

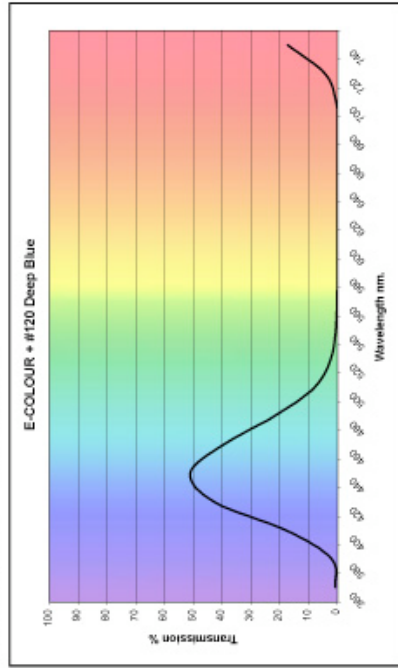
MATERIAL SPECIFICATIONS:
 General Description: Dye-Coated Polyester Film
 Substrate: PET (Polyethylene Terephthalate)
 Thickness: 3.0 mil (.003" or 75 micron)
 Manufactured in: U.K.

AVAILABLE SIZES:
 20 in. x 24 in. sheets (50cm x 60cm)
 21 in. x 24 in. sheets (53 x 60cm)
 24 in. x 25 ft. rolls (60cm x 7.62m)
 48 in. x 25 ft. rolls (121cm x 7.62m)
 60 in. x 20 ft. rolls (152.4cm x 6.10m)
 13.5 in. Diameter Glass (34.3cm) - Cut to order

Copyright 2001, Rosco Laboratories Inc.
 All Rights Reserved

rosco COLOR FILTER TECHNICAL DATA SHEET

SWATCHBOOK: E-COLOUR +
 COLOR FILTER: #120 Deep Blue
 DESCRIPTION: Color Effects Lighting Filter.
 TRANSMISSION = 1% or -6.7 stop loss
 MIRE SHIFT = Not Applicable.
 CC EQUIVALENT = Not Applicable.



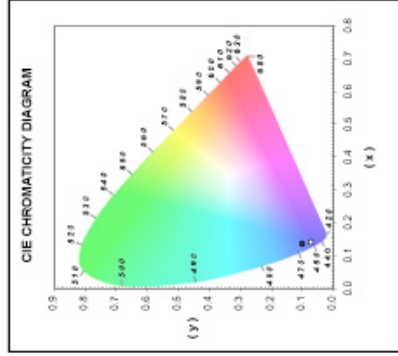
COLORIMETRIC DATA
 OBSERVER: CIE 1964 10°
 SOURCE: • 'A' (tungsten)
 • 'D65' (daylight)

HUNTER LAB SOURCE A	
L*	14.002
A*	9.311
B*	-91.213

HUNTER LAB SOURCE D65	
L*	23.96
A*	46.323
B*	-76.154

CIE 1984 SOURCE A	
Y	1.730
(X)	0.137
(Y)	0.101

CIE 1984 SOURCE D65	
Y	3.966
(X)	0.143
(Y)	0.073



nm.	360	380	400	420	440	460	480	500	520	540	560	580	600	620	640	660	680	700	720	740	
Trans. %	1	2	18	43	51	40	22	8	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	17

MATERIAL SPECIFICATIONS:
 General Description: Dye-Coated Polyester Film
 Substrate: PET (Polyethylene Terephthalate)
 Thickness: 3.0 mil (.003" or 75 micron)
 Manufactured in: U.K.

AVAILABLE SIZES:
 20 in. x 24 in. sheets (50cm x 60cm)
 21 in. x 24 in. sheets (53 x 60cm)
 24 in. x 25 ft. rolls (60cm x 7.62m)
 48 in. x 25 ft. rolls (121cm x 7.62m)
 60 in. x 20 ft. rolls (152.4cm x 6.10m)
 13.5 in. Diameter Glass (34.3cm) - Cut to order

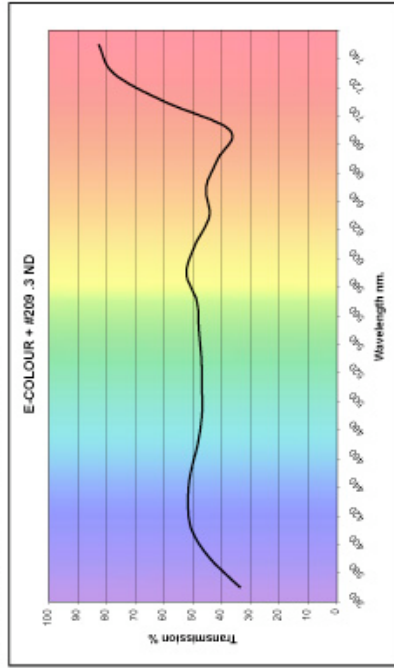
Copyright 2001, Rosco Laboratories Inc. All Rights Reserved.



COLOR FILTER TECHNICAL DATA SHEET

B4: Farbfolie #209

SWATCHBOOK: E-COLOUR +
COLOR FILTER: #209 .3 ND
DESCRIPTION: Neutral Density Window Filter. One Stop Light Reduction.
TRANSMISSION = 51% or -1.0 stop loss
MIRE D SHIFT = Not Applicable.
CC EQUIVALENT = Not Applicable.



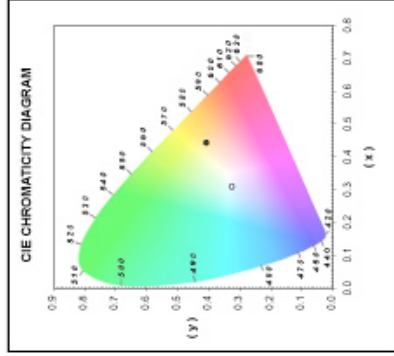
COLORIMETRIC DATA
OBSERVER: CIE 1964 10°
SOURCE: 'A' (tungsten)
 'D65' (daylight)

HUNTER LAB SOURCE A	
L*	74.987
A*	-1.039
B*	-0.801

HUNTER LAB SOURCE D65	
L*	74.975
A*	0.665
B*	-1.175

CIE 1964 SOURCE A	
Y	48.228
(X)	0.415
(Y)	0.405

CIE 1964 SOURCE D65	
Y	48.228
(X)	0.311
(Y)	0.328



mm	360	380	400	420	440	460	480	500	520	540	560	580	600	620	640	660	680	700	720	740
Trans %	53	44	50	52	51	48	47	47	47	48	49	52	49	44	45	41	37	60	78	83

MATERIAL SPECIFICATIONS:

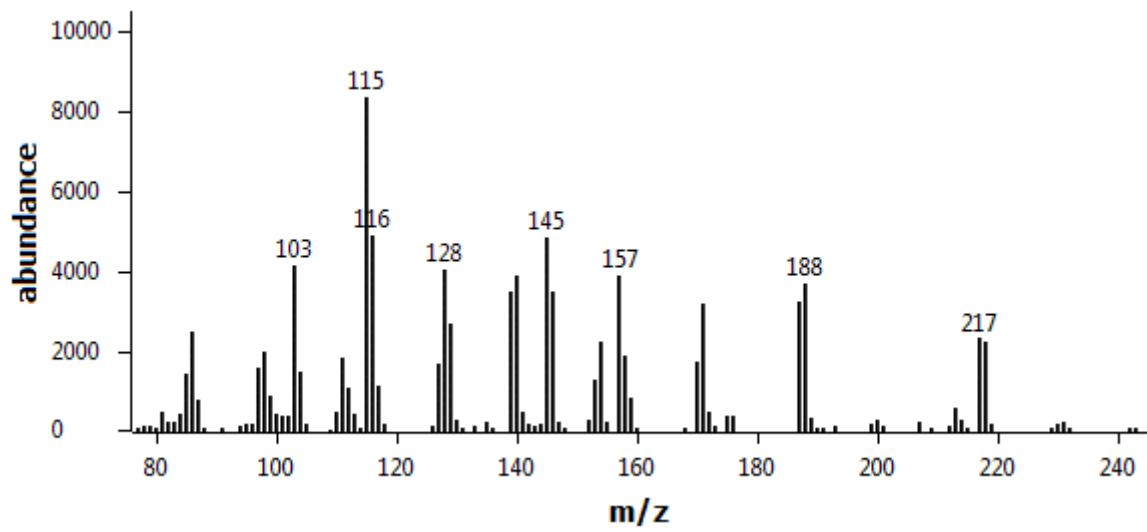
General Description: Dye-Coated Polyester Film
Substrate: PET (Polyethylene Terephthalate)
Thickness: 3.0 mil (.003" or 75 micron)
Manufactured in: U.K.

AVAILABLE SIZES:

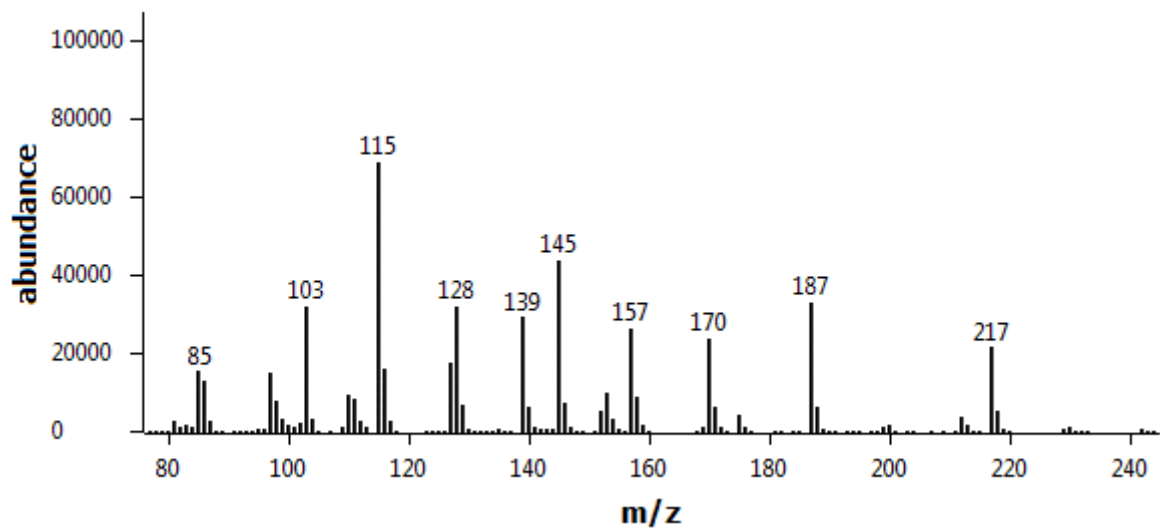
- √ 20 in. x 24 in. sheets (50cm x 60cm)
- √ 21 in. x 24 in. sheets (53 x 60cm)
- √ 24 in. x 25 ft. rolls (60cm x 7.62m)
- √ 48 in. x 25 ft. rolls (121cm x 7.62m)
- 60 in. x 20 ft. rolls (152.4cm x 6.10m)
- 13.5 in. Diameter Glass (34.3cm) - Cut to order

Copyright 2001, Rosco Laboratories Inc. All Rights Reserved.

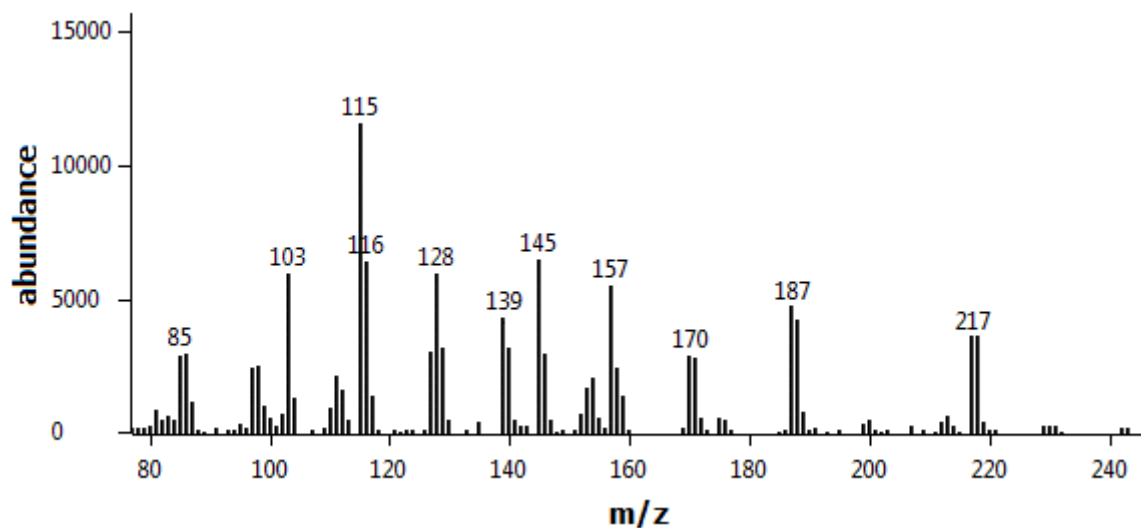
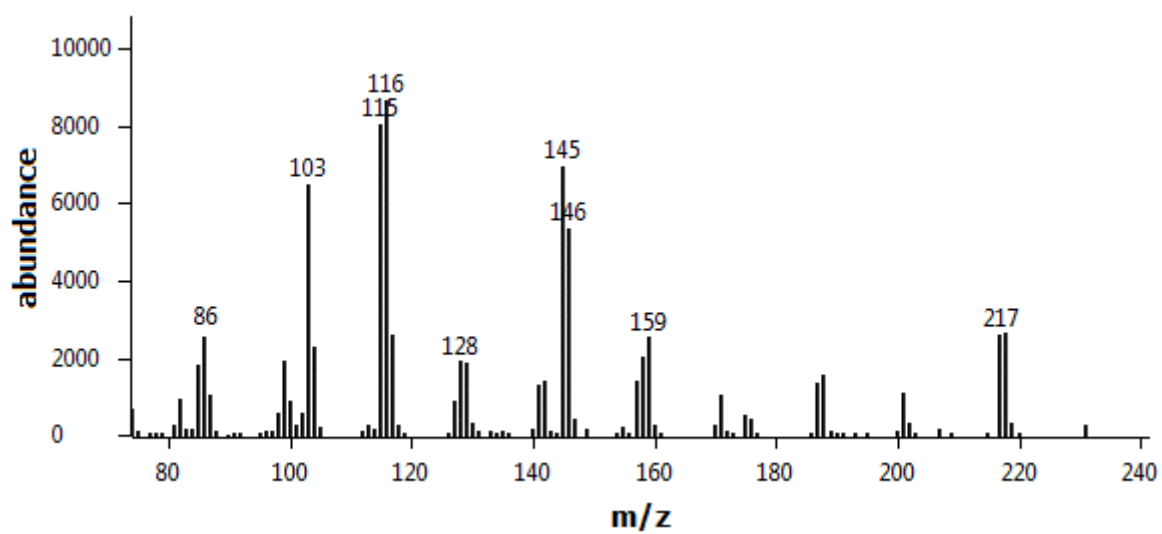
C Massenspektren



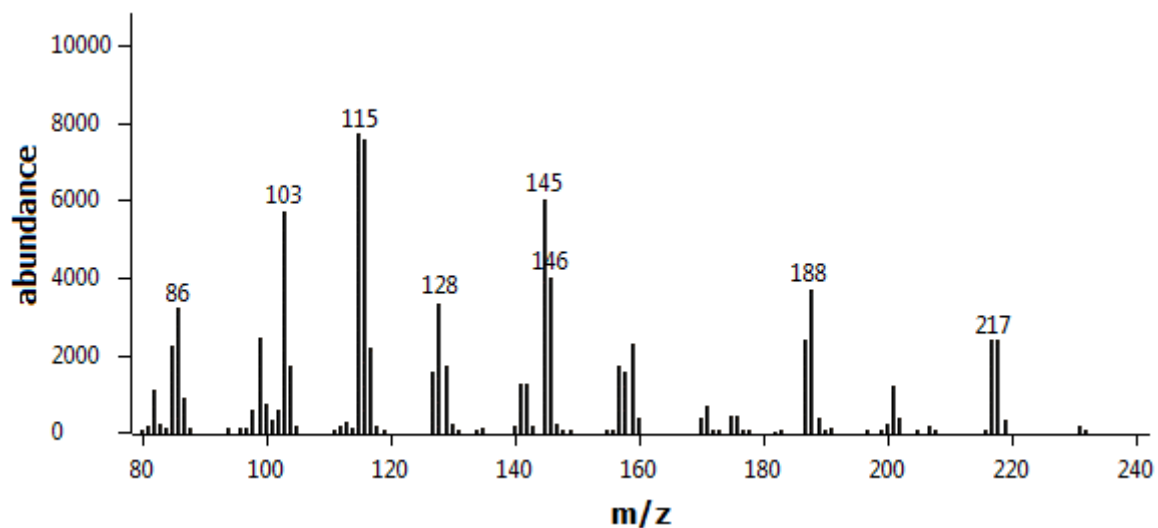
C1: Mannose (Mannitol)



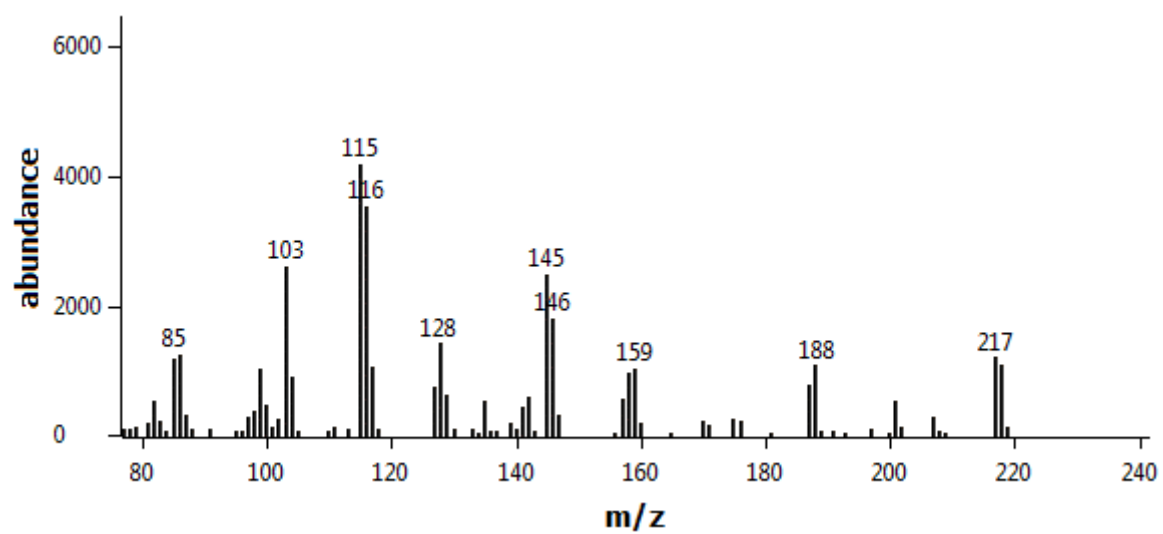
C2: Glucose (Glucitol)

**C3: Galaktose (Galactitol)****C4: Fucose (Fucitol)**

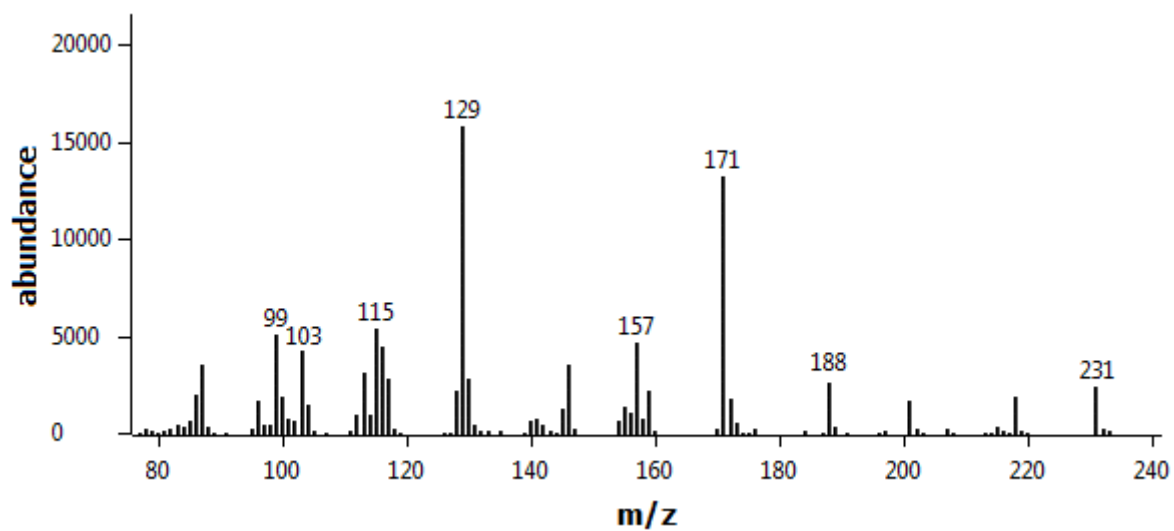
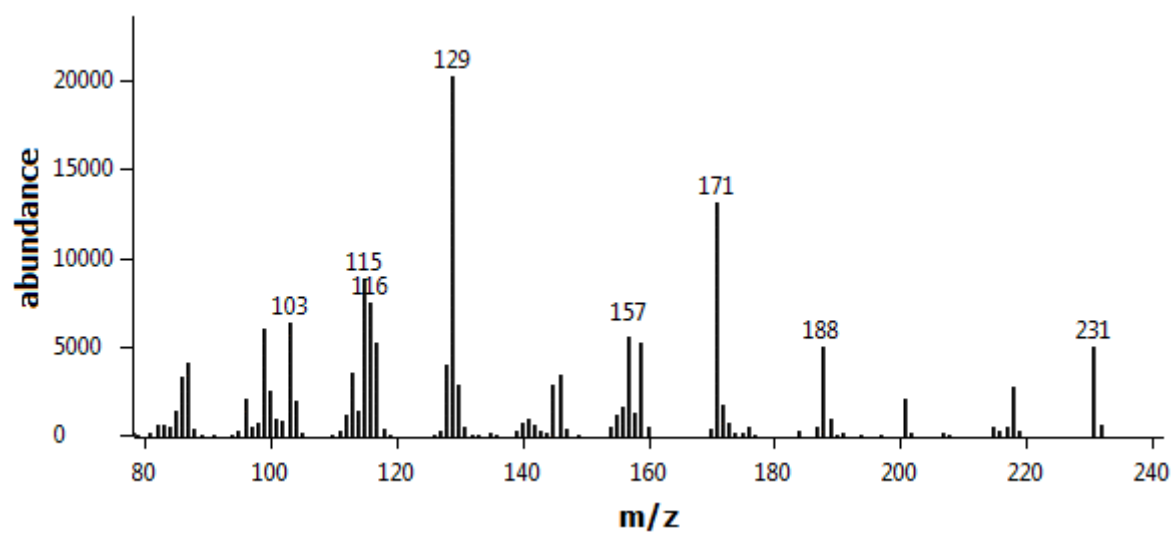
Anhang



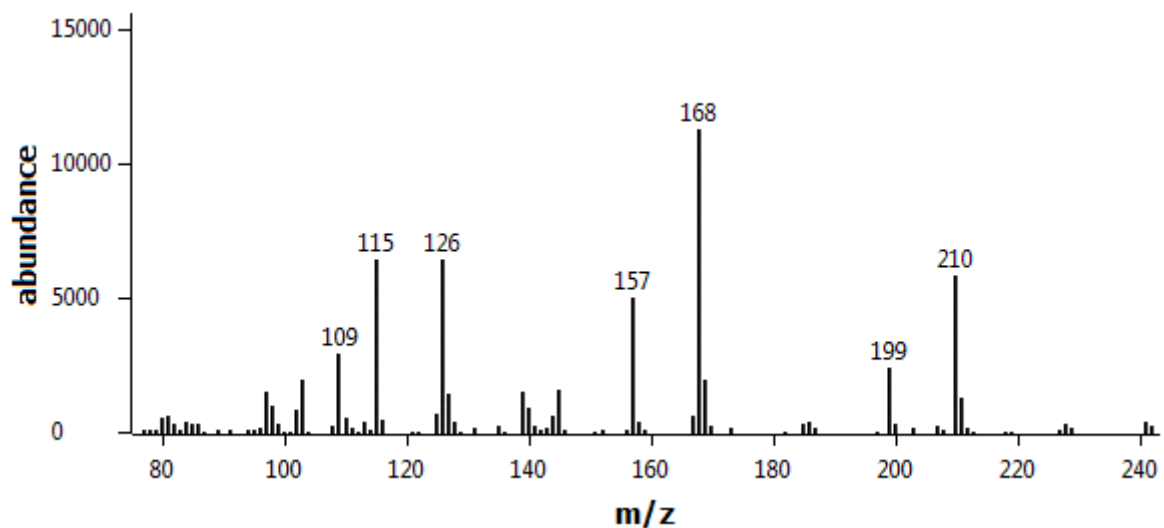
C5: Arabinose (Arabinitol)



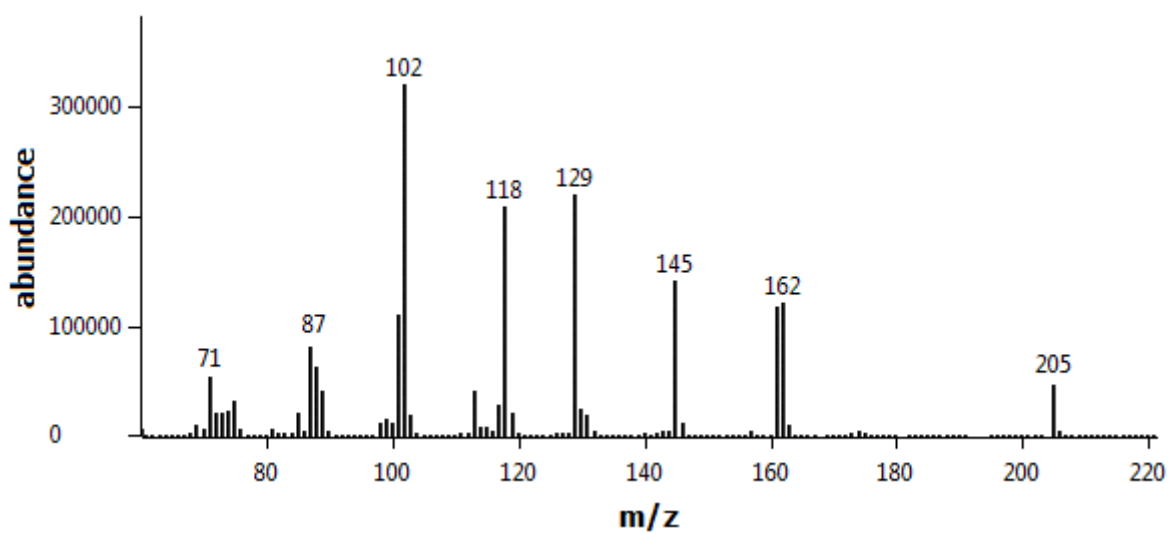
C6: Xylose (Xylitol)

**C7: Rhamnose (Rhamnitol)****C8: Ribose (Ribitol)**

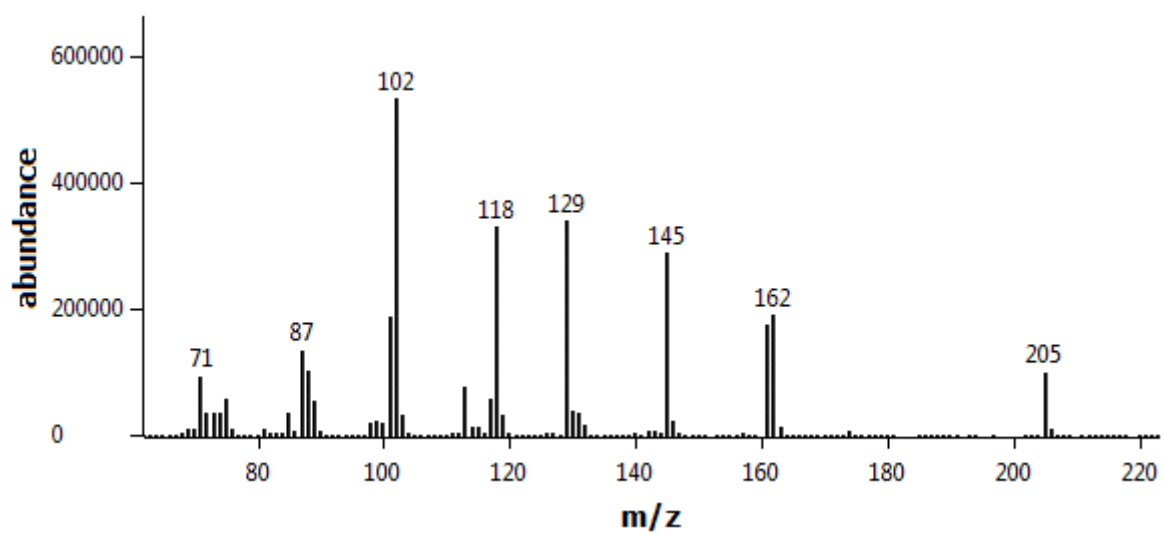
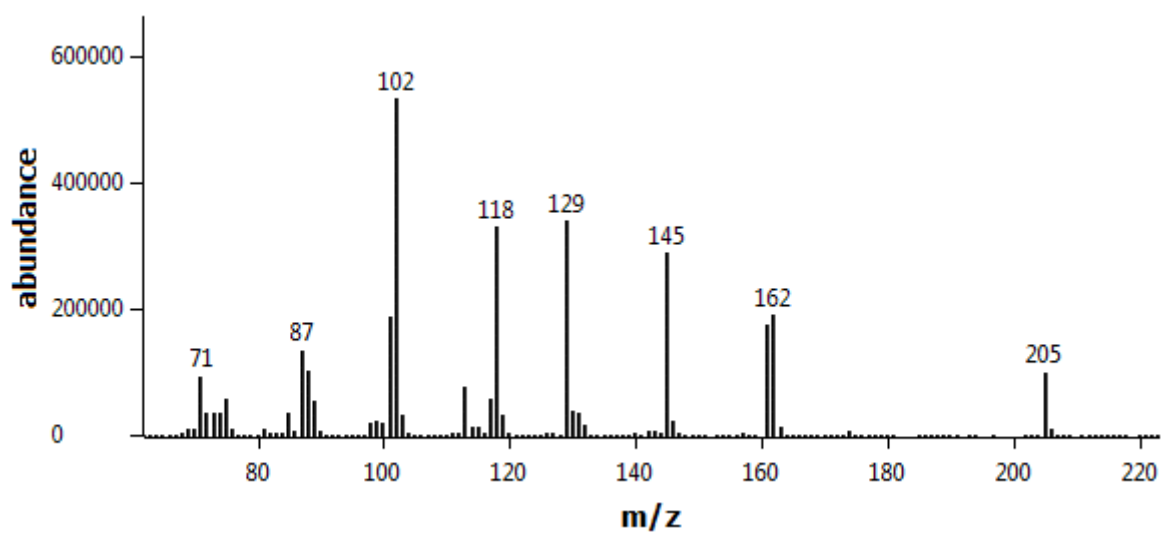
Anhang



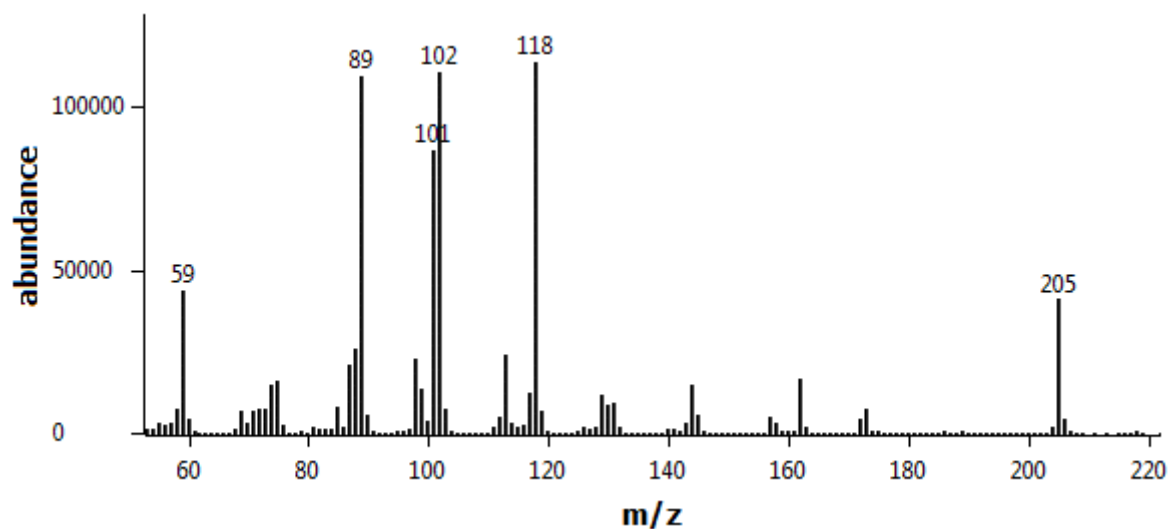
C9: myo-Inositol



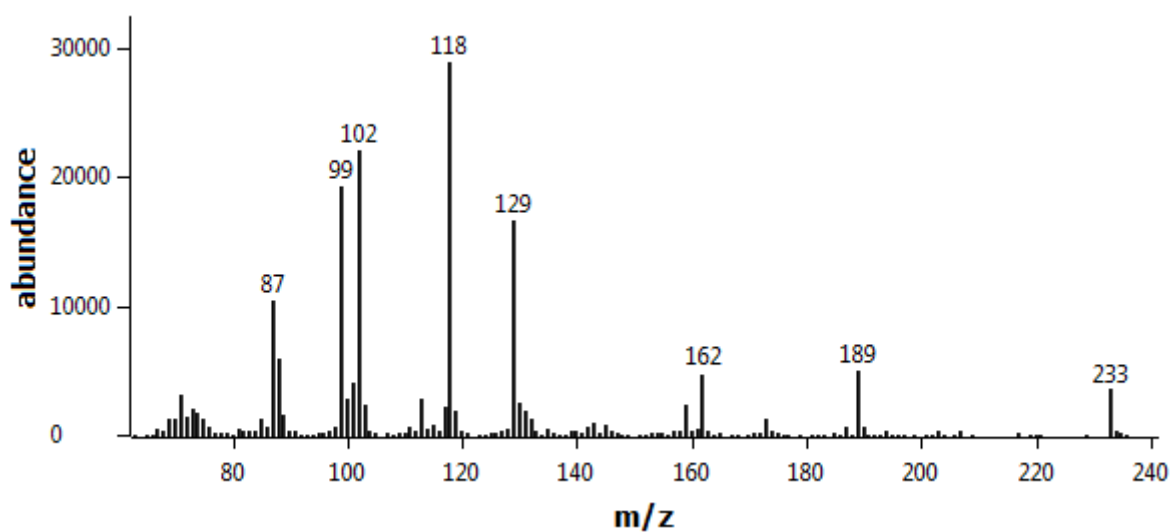
C10: 2,3,4,6-Me₄-Manp

**C11: 2,3,4,6-Me₄-Glc_p****C12: 2,3,4,6-Me₄-Gal_p**

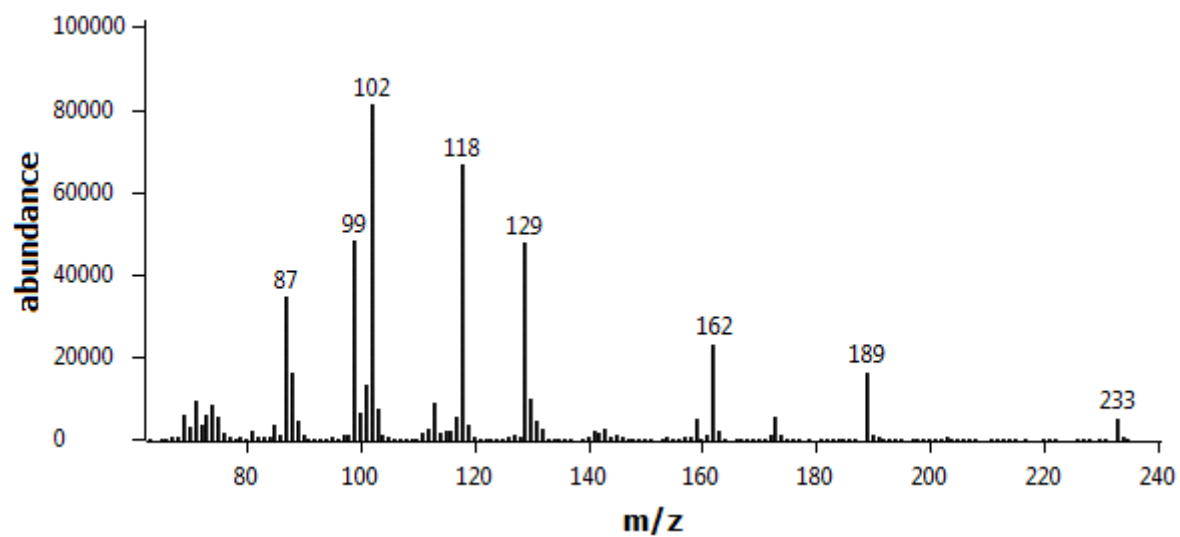
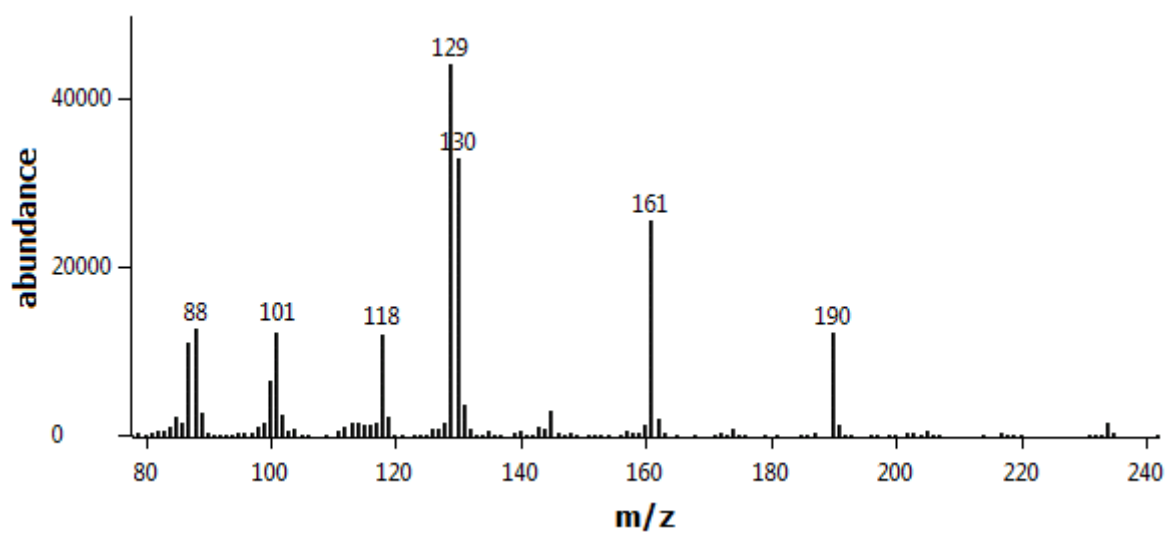
Anhang



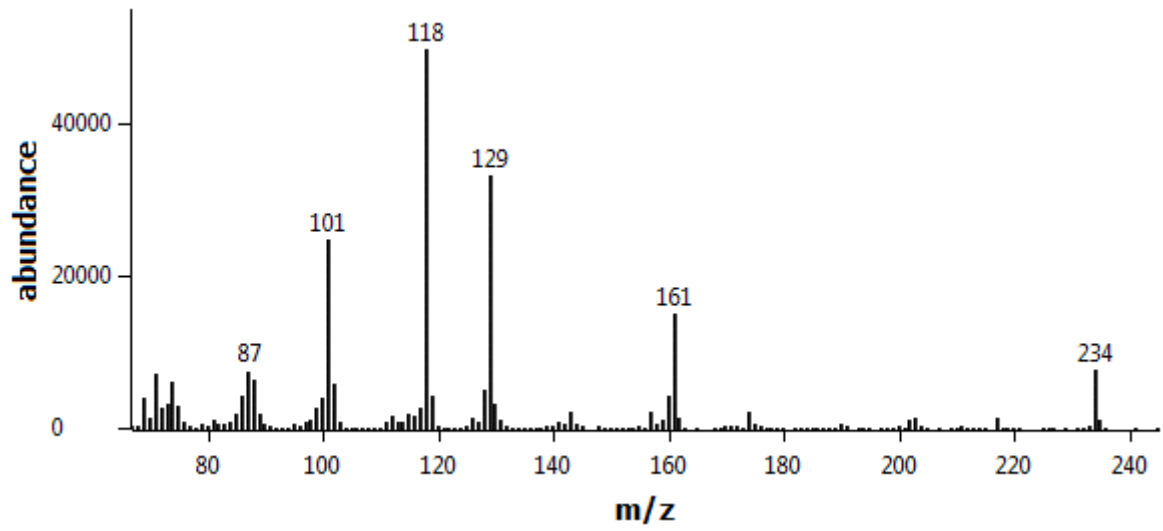
C13: 2,3,5,6-Me₄-Galp



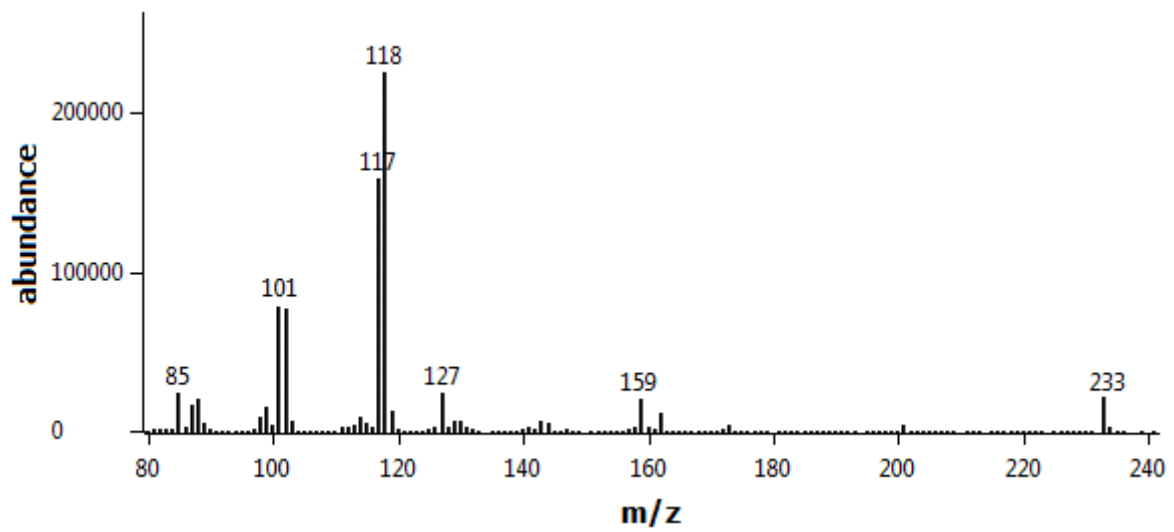
C14: 2,3,4-Me₃-Galp

**C15: 2,3,4-Me₃-Glcp****C16: 3,4,6-Me₃-Manp**

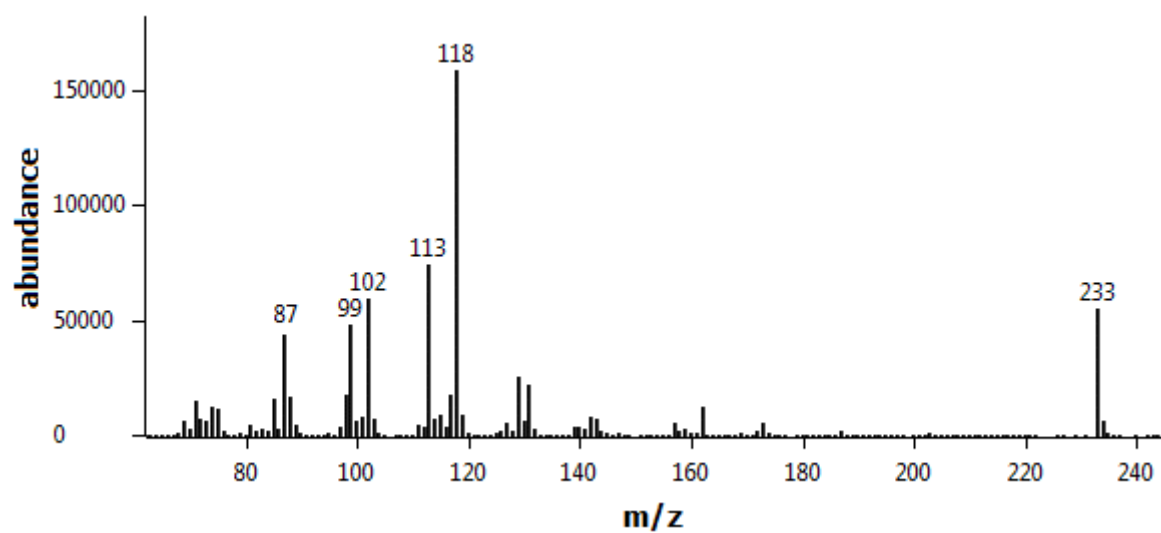
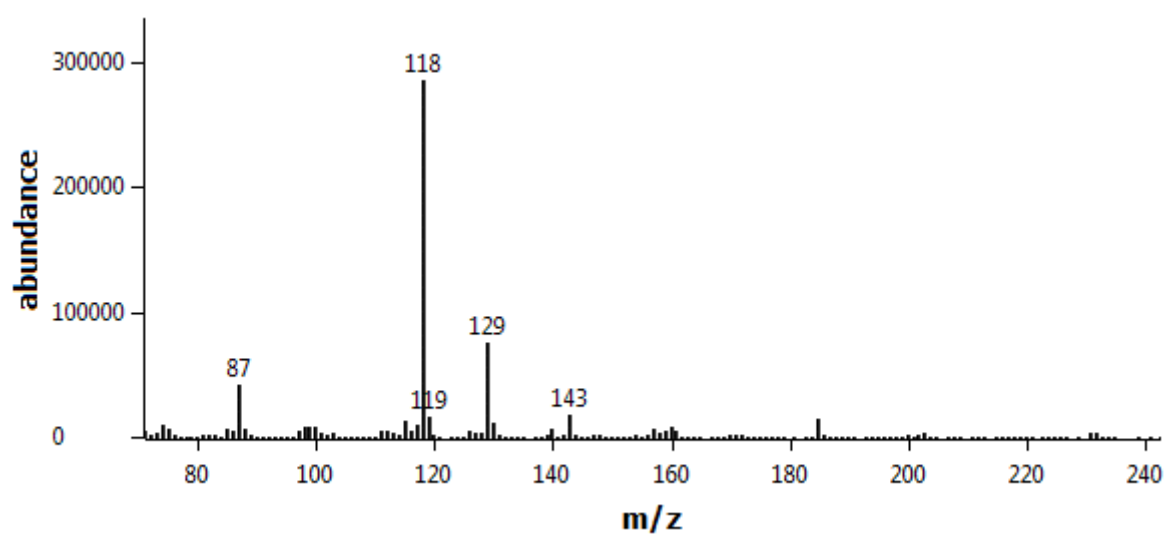
Anhang



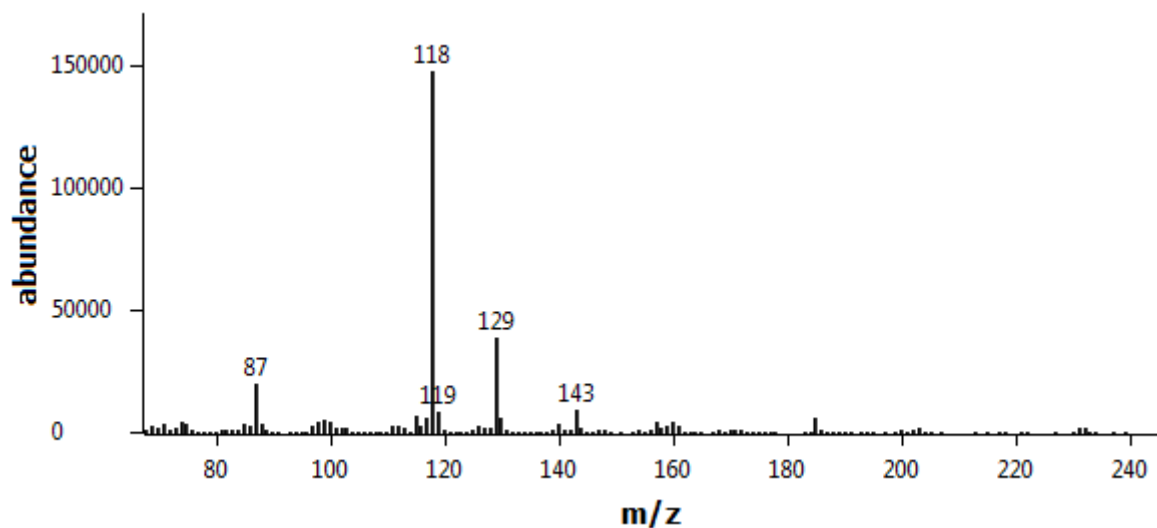
C17: 2,4,6-M₃-Glcp



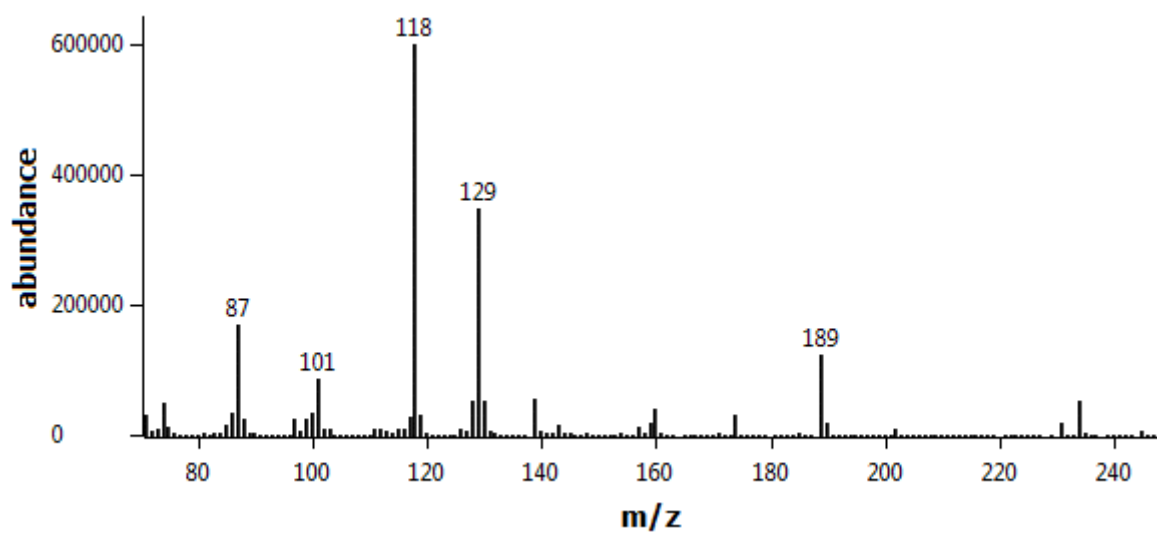
C18: 2,3,5-Me₃-Galf

**C19: 2,3,6-Me₃-Glcp****C20: 2,6-Me₂-Glcp**

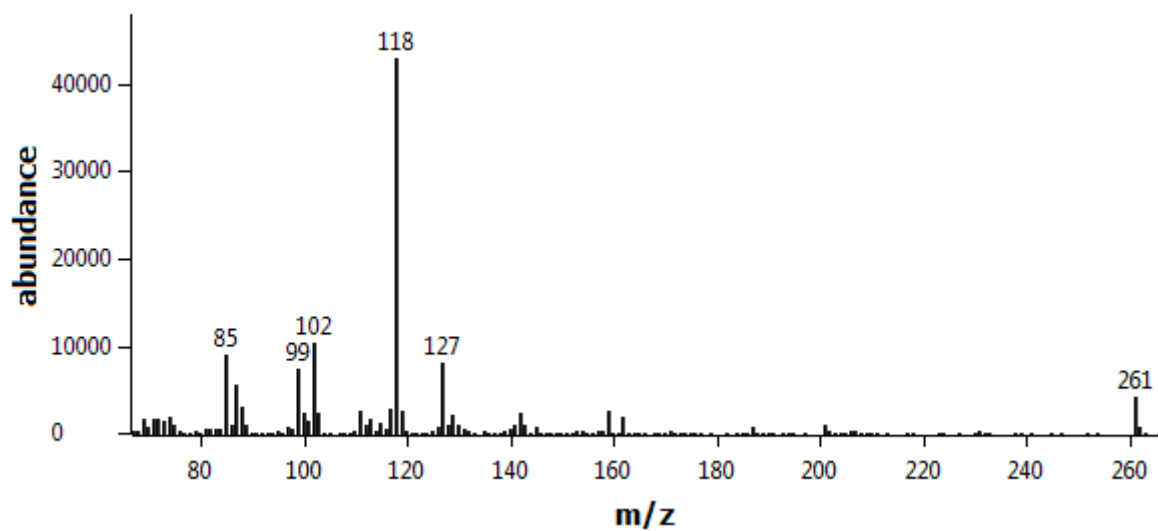
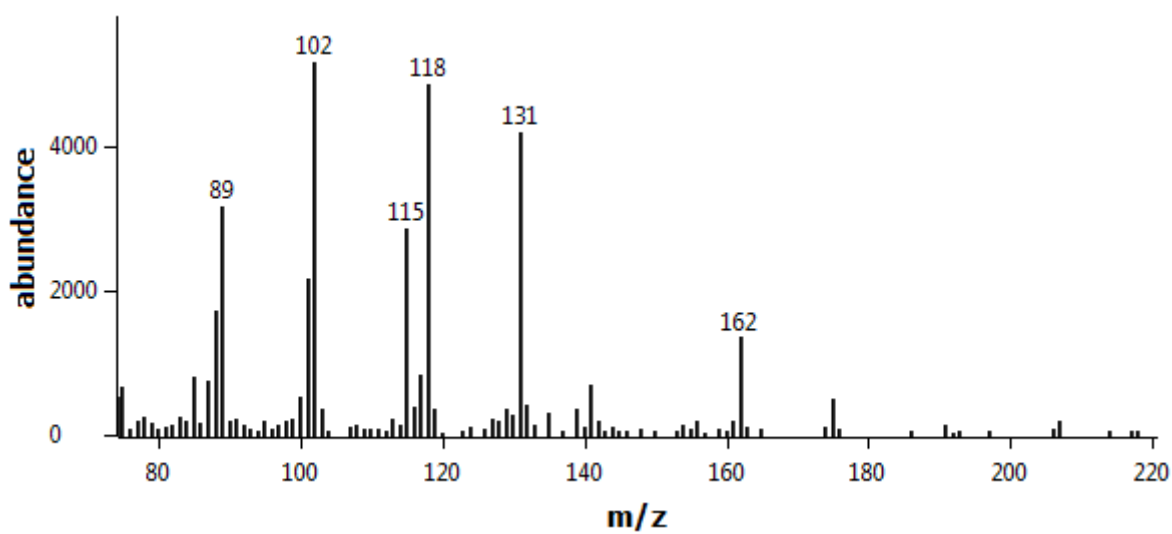
Anhang



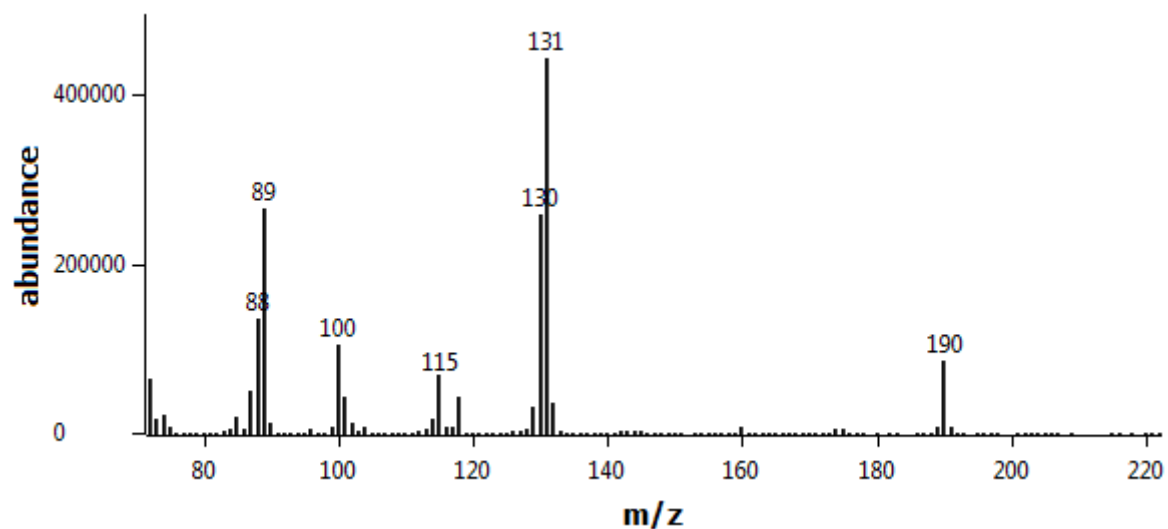
C21: 2,6-Me₂-Galp



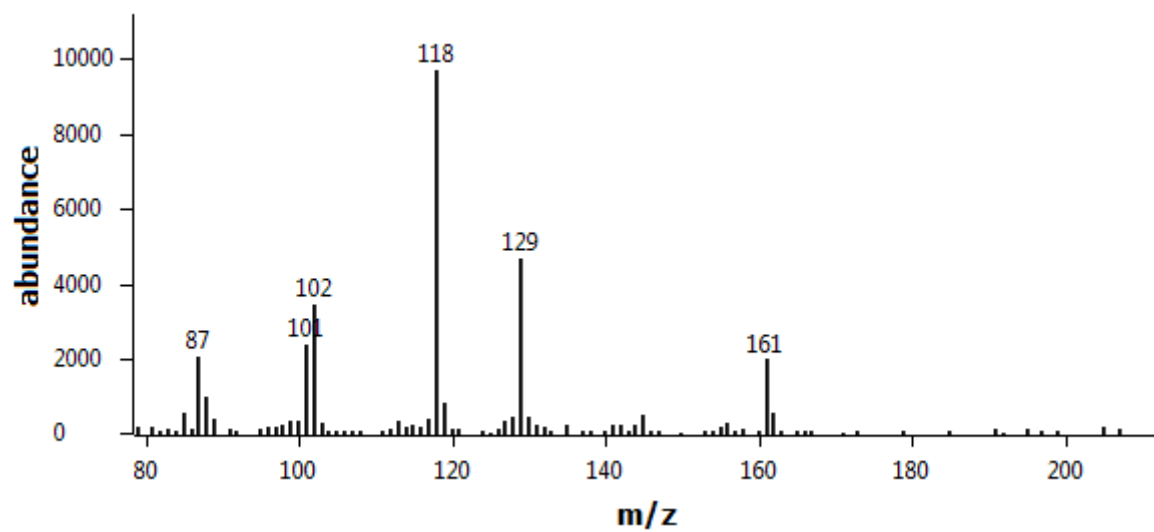
C22: 2,4-Me₂-Glcp

**C23: 2,3-Me₂-Glcp****C24: 2,3,4-Me₃-6-Deoxy-Hexp**

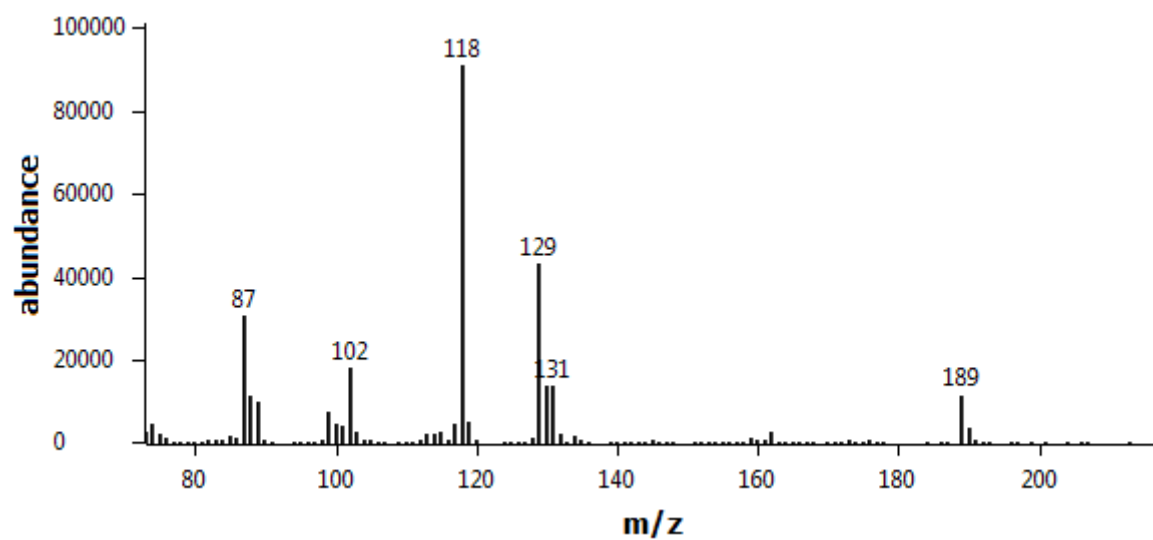
Anhang



C25: 3,4-Me₂-Deoxy-Hexp



C26: 2,3,5-Me₃-Penf



C27: 2,3-Me₂-Penp

D Lektine**D1: Übersicht getesteter Lektine im Screening (modifiziert von Neu und Kuhlicke, 2017)**

Nr.	Lateinische Bezeichnung	Umgangssprachliche Bezeichnung	Code	Fluo-Label	Hersteller
1	<i>Anguilla anguilla</i>	Europäischer Aal	AAA	FTIC	EY Labs
2	<i>Aleuria aurantia</i>	Gemeiner Orangebecherling	AAL	FTIC, Alexa488	Vector Labs ¹
3	<i>Agaricus bisporus</i>	Zucht-Champignon	ABA	FTIC	EY Labs
4	<i>Amaranthus caudatus</i>	Garten-Fuchsschwanz	ACA	FTIC	EY Labs
5	<i>Artocarpus integrifolia</i>	Jackfrucht	AIA	FTIC	EY Labs
6	<i>Arum maculatum</i>	Gefleckter Aaronstab	AMA	FTIC	EY Labs
7	<i>Allium sativum</i>	Knoblauch	ASA	FTIC	EY Labs
8	<i>Musa paradisiaca</i>	Banane	BAN	FTIC	Vector Labs
9	<i>Bryonia dioica</i>	Zaunrübe	BDA	FTIC	EY Labs
10	<i>Bauhinia purpurea</i>	Bauhinie	BPA	FTIC	EY Labs
11	<i>Colchicum autumnale</i>	Herbstzeitlose	CA	FTIC	EY Labs
12	<i>Caragana aborescens</i>	Erbsenstrauch	CAA	FTIC	EY Labs
13	<i>Calystega sepium</i>	Echte Zaunwinde	Calsepa	FTIC	EY Labs
14	<i>Cancer antennarius</i>	Felsenkrabbe	CCA	Alexa488	EY Labs ¹
15	<i>Codium fragile</i>	Grüner Leuchter	Co	Alexa488	Sigma ¹
16	<i>Canavalia ensiformis</i>	Jackbohne	ConA	FTIC	Sigma
17	<i>Cicer arietinum</i>	Kichererbse	CPA	FTIC	EY Labs
18	<i>Cytisus sessilifolius</i>	Kahler Geißklee	CSA	FTIC	EY Labs
19	<i>Dolichos biflorus</i>	Pferdebohne	DBA	FTIC	Sigma
20	<i>Dioclea grandiflora</i>		DGL	FTIC	EY Labs
21	<i>Datura stramonium</i>	Gemeiner Stechapfel	DSA	FTIC	EY Labs
22	<i>Erythrina christagalli</i>	Korallenstrauch	ECA	FTIC	EY Labs
23	<i>Euonymus europaeus</i>	Spindelstrauch	EEA	FTIC	EY Labs
24	<i>Glechoma hederacea</i>	Gundermann	GHA	FTIC	EY Labs
25	<i>Galanthus nivalis</i>	Schneeglöckchen	GNA	FTIC	EY Labs
26	<i>Griffonia simplicifolia</i>	Schwarzbohne	GS-I	FTIC	Sigma
27	<i>Helix aspersa</i>	Gefleckte Weinbergschnecke	HAA	FTIC	EY Labs
28	<i>Hippeastrum hybrid</i>	Ritterstern	HHA	FTIC	EY Labs

Nr.	Lateinische Bezeichnung	Umgangssprachliche Bezeichnung	Code	Fluo-Label	Hersteller
29	<i>Homarus americanus</i>	Amerikanischer Hummer	HMA	FTIC	EY Labs
30	<i>Helix pomatia</i>	Weinbergschnecke	HPA	FTIC	Sigma
31	<i>Iberis amara</i>	Bittere Schleifenblume	IAA	Alexa488	EY Labs ¹
32	<i>Iris hybrid</i>	Iris	IRA	FTIC	EY Labs
33	<i>Laburnum alpinum</i>	Alpen-Goldregen	LAA	FTIC	EY Labs
34	<i>Laburnum anagyroides</i>	Gemeiner Goldregen	LAL	FTIC	EY Labs
35	<i>Phaseolus lunatus</i>	Limabohne	LBA	FTIC	EY Labs
36	<i>Lens culinaris</i>	Linse	LcH	FTIC	EY Labs
37	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Tomate	LEA	FTIC	Sigma
38	<i>Limax flavus</i>	Bierschneigel	LFA	FTIC	EY Labs
39	<i>Lotus tetragonolobus</i>	Rote Spargelerbse	Lotus	FTIC	
40	<i>Limulus polyphemus</i>	Pfeilschwanzkrebs	LPA	FTIC	EY Labs
41	<i>Maackia amurensis</i>	Asiatisches Gelbholz	MAA	FTIC	EY Labs
42	<i>Mangifera indica</i>	Mango	MIA	Alexa488	EY Labs ¹
43	<i>Morniga G</i>	Moringa	MNA-G	FTIC	EY Labs
44	<i>Marasmius oreades</i>	Nelken-Schwindling	MOA	FTIC	EY Labs
45	<i>Maclura pomifera</i>	Milchorangenbaum	MPA	FTIC	EY Labs
46	<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	Gelbe Narzisse	NPA	FTIC	EY Labs
47	<i>Persea americana</i>	Avocado	PAA	Alexa488	EY Labs ¹
48	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		PA-I	Alexa488	Sigma ¹
49	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Gartenbohne	PHA-E	FTIC	EY Labs
50	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Gartenbohne	PHA-L	FTIC	EY Labs
51	<i>Polygonatum multiflorum</i>	Vielblütige Weißwurz	PMA	FTIC	EY Labs
52	<i>Arachis hypogaea</i>	Erdnuss	PNA	FTIC	EY Labs
53	<i>Ptilota plumosa</i>	Rote Meeralg	PPA	Alexa488	Sigma ¹
54	<i>Pisum sativum</i>	Gartenerbse	PSA	FTIC	Sigma
55	<i>Polyporus squamosus</i>	Schuppiger Stielporling	PSL	FTIC	EY Labs

Nr.	Lateinische Bezeichnung	Umgangssprachliche Bezeichnung	Code	Fluo-Label	Hersteller
56	<i>Psophocarpus tetragonobolus</i>	Flügelbohne	PTA	FTIC	EY Labs
57	<i>Phytolacca americana</i>	Amerikanische Kermesbeere	PWA	FTIC	EY Labs
58	<i>Ricinus communis</i>	Wunderbaum	RCA	Fluorescein	Vector Labs
59	<i>Robinia pseudoaccacia</i>	Gewöhnliche Robinie	RPA	FTIC	EY Labs
60	<i>Trifolium repens</i>	Weißklee	RTA	Alexa488	EY Labs ¹
61	<i>Glycine max</i>	Sojabohne	SBA	FTIC	EY Labs
62	<i>Salvia hormonium</i>	Salbei	SHA	Alexa488	EY Labs
63	<i>Sophora japonica</i>	Japanischer Schnurbaum	SJA	FTIC	EY Labs
64	<i>Sambucus nigra</i>	Schwarzer Holunder	SNA	FTIC	EY Labs
65	<i>Salvia sclarea</i>	Muskattellersalbei	SSA	FTIC	EY Labs
66	<i>Sarothamnus scoparius</i>	Besenginsterkraut	SSC	Alexa488	EY Labs
67	<i>Solanum tuberosum</i>	Kartoffel	STA	FTIC	EY Labs
68	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	Chinesische Schlangengurke	TKA	FTIC	EY Labs
69	<i>Tulipa sp.</i>	Tulpe	TL	FTIC	EY Labs
70	<i>Urtica dioica</i>	Brennnessel	UDA	FTIC	EY Labs
71	<i>Ulex europaeus</i>	Stechginster	UEA-I	FTIC	Sigma
72	<i>Vicia faba</i>	Ackerbohne	VFA	FTIC	EY Labs
73	<i>Vicia graminea</i>	Wicke	VGA	FTIC	EY Labs
74	<i>Vigna radiata</i>	Mungobohne	VRA	FTIC	EY Labs
75	<i>Vicia villosa</i>	Zottige Wicke	VVA	FTIC	EY Labs
76	<i>Wisteria floribunda</i>	Japanischer Blauregen	WFA	FTIC	EY Labs
77	<i>Triticum vulgare</i>	Weizen	WGA	FTIC	Sigma

¹ Lektine können nur unmarkiert erworben werden, und wurden nachträglich durch T. Neu und U. Kuhlicke markiert

PUBLIKATIONEN

Poster und Vorträge auf wissenschaftlichen Tagungen

International Symposium on c-di-GMP Signaling in Bacteria. 22.-25. März 2015, Berlin.

Poster: Romy Breitenbach, Anna A. Gorbushina, Jörg Toepel "Role of c-di-GMP in biofilm formation of the filamentous cyanobacterium *Nostoc punctiforme*"

International Symposium on Phototrophic Prokaryotes. 02.-06. August 2015, Tübingen.

Poster: Romy Breitenbach, Jasmina Vandrich, Jörg Toepel, Anna Gorbushina "Role of c-di-GMP in EPS production and biofilm formation of *Nostoc punctiforme*"

Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie. 13.-16. März 2016, Jena.

Poster: Romy Breitenbach, Jasmina Vandrich, Anna A. Gorbushina, Jörg Toepel „C-di-GMP in cell differentiation and biofilm formation of *Nostoc punctiforme*"

DECHEMA Fachgruppentagung "Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz". 04. Oktober 2017, Berlin

Vortrag: Romy Breitenbach, Dorothee Silbernagl, Jörg Toepel, Heinz Sturm, William J. Broughton, Guilherme L. Sasaki, Anna A. Gorbushina „Corrosive extracellular polysaccharides of the rock-inhabiting model fungus *Knufia petricola*"

Workshop FTIR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics. 19.-20. Oktober 2017, Robert-Koch-Institut Berlin.

Poster: Maria Dittrich, Heinz Sturm, Vladimir Zaitsev, Carlos Paulo, Romy Breitenbach, Jörg Toepel, Nicole Knabe, Anna A. Gorbushina "Microscopy-based Raman spectroscopy of fungal melanins in a genetically amenable Ascomycete"

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften und -büchern

Breitenbach, R., Toepel, J., Dementyeva, P., Knabe, N., Gorbushina, A.A. (2016)

Snapshots of fungal extracellular matrices. In: The Perfect Slime. Microbial Extracellular Polymeric Substances. Flemming, H.C., Neu, T.R., Wingender, J. (Eds.), IWA Publishing, London, UK.

Publikationen

Breitenbach, R., Silbernagl, D., Toepel, J., Sturm, H., Broughton, W.J., Sasaki, G.L., Gorbushina, A.A. (2018) Corrosive extracellular polysaccharides of the rock-inhabiting model fungus *Knufia petricola*. *Extremophiles* 22(2), 165-175.

In Vorbereitung:

Breitenbach, R., Dementyeva, P., Gorbushina, A. A., Knabe, N. Characterization of pigment mutants of the rock-inhabiting fungus *Knufia petricola*.