Chromosomensegregation in *Hyphomonas neptunium*:

Das Kamel und das Nadelöhr

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Anne Raßbach
aus Altenkirchen (Westerwald)

Marburg (Lahn), Juli 2013

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer: 1180)
als Dissertation angenommen am ___.___.2013

Erstgutachter: Jun.-Prof. Dr. Martin Thanbichler
Zweitgutachter: Prof. Dr. Peter Graumann

Tag der mündlichen Prüfung: ___.___.2013

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2009 bis August 2013 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie unter der Leitung von Jun.-Prof. Dr. Martin Thanbichler durchgeführt.

Meinen Eltern und Großeltern

Unser Geld bedingt den Kapitalismus, den Zins, die Massenarmut, die Revolte und schließlich den Bürgerkrieg, der zur Barbarei zurückführt. ... Wer es vorzieht, seinen eigenen Kopf etwas anzustrengen statt fremde Köpfe einzuschlagen, der studiere das Geldwesen.“

Silvio Gesell, Geld oder Krieg (1912), in: Gesammelte Werke Band 7, S. 170.

Abstract

The generation of progeny is the ultimate goal of every living cell. To achieve this aim, proper replication and segregation of the DNA is essential. Our current knowledge about chromosome segregation in bacteria derives from a few well-studied model organisms which divide by symmetric or asymmetric binary fission. In order to expand our knowledge in this field we established a new model organism, *Hyphomonas neptunium* that reproduces by budding off new offspring from the tip of a reproductive stalk structure (Abbildung 1). Its close relationship to the established model system *Caulobacter crescentus* enabled us to develop a broad spectrum of methods.

This study investigates the mechanism of chromosome segregation in *H. neptunium. In vivo* localization studies of the chromosomal origin region revealed that the centromere-like region defined by the $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-complex is segregated in two discrete steps. One of the two centromere-like regions initially moves to the stalked pole of the mother cell. Once bud formation initiates, the centromere-like region then moves through the stalk and is tethered to the flagellated pole of the bud cell.

To gather further information about chromosome segregation, two systems for the *in vivo* localization of chromosomal regions were established in *H. neptunium*: the FROS- and the $parBS_{Yp}$-System. An analysis of the dynamics of chromosome segregation revealed that the centromere-like region is segregated before the origin of replication, which resides at a distance of ~570 kb near the *dnaA* gen. So *H. neptunium* is the first bacterium to be investigated in which chromosome replication and segregation appear to be uncoupled. A comparative analysis of closely related species indicated that the origin regions of stalked budding bacteria display major organizational differences.

Before the $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-complex moves through the stalk, the stalk is DNA free. This observation suggests that *H. neptunium* possesses a second segregation mechanism since the generic ParA-based segregation system requires chromosomal DNA as interaction partner.

To shed light on the mechanism of chromosome segregation, I characterized the ParA homologs of *H. neptunium* with fluorescent fusions and deletion mutants. The results of localization and mutational analyses indicate that besides the generic chromosomal partitioning protein ParA HNE3561 ($ParA_{HNE}$) HNE0708 may also be involved in the segregation process.

The deletion of HNE0708 caused a pleiotropic phenotype. The mutant cells exhibited DNA accumulations in the stalks and displayed small bubble-like structures at the stalk tips. Furthermore, mothercells showed an elevated number of origin regions, suggesting a defect in the regulation of replication initiation of origin segregation.

HNE3561 ($ParA_{HNE}$) colocalized with $ParB_{HNE}$ in the mother cell. However, it localized earlier to the stalk tip than $ParB_{HNE}$ and was never observed in the stalk. This observation supported our hypothesis that a second segregation mechanism drives the movement of the origin region through the stalk.

Collectively, these results suggest a two-step chromosome segregation process with the centromere-like $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-complex acting as a central anchor point for the segregation machinery.

Zusammenfassung

Die Generierung lebensfähiger Nachkommen ist das Hauptziel jeder Zelle. Um dieses Ziel zu erreichen, ist die korrekte Replikation und Segregation des Erbguts unerlässlich. Unser Wissen über Chromosomen-Segregationsprozesse in Bakterien beziehen wir aus dem Studium weniger Modellorganismen, die sich über symmetrische oder asymmetrische binäre Teilung fortpflanzen. Um unser Wissen auf diesem Gebiet zu erweitern, fanden wir mit *Hyphomonas neptunium,* eine Spezies, die sich über Knospung fortpflanzt und ihren Stiel als reproduktive Struktur verwendet, einen geeigneten Kandidaten (Abbildung 1). Die nahe Verwandtschaft zu dem Modellorganismus *Caulobacter crescentus* ermöglichte es uns zudem, viele Methoden zu adaptieren und so in kurzer Zeit ein umfangreiches Methodenspektrum zu entwickeln.

Die vorliegende Studie vermittelt einen ersten Einblick in die Chromosomensegregation von *H. neptunium*. Eine *in vivo* Lokalisationsstudie der Ursprungsregion ergab, dass die Segregation der zentromer-ähnlichen Region ($ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplex) in zwei separaten Schritten erfolgt. Zunächst segregiert eine der beiden zentromer-ähnlichen Regionen zum Stielpol der Mutterzelle und verweilt dort, bis die Knospe gebildet wurde. Anschließend segregiert sie durch den Stiel und lokalisiert am flagellierten Pol der Knospe. Zum besseren Verständnis der Chromosomensegregation wurden zwei *in vivo*-Lokalisationssystem in *H. neptunium* etabliert: das FROS- und das $parBS_{Yp}$-System. Die Analyse zeigte, dass die zentromer-ähnliche Region ($ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplex) vor dem ~570 kb entfernten Replikationsursprung in der Nähe des *dnaA*-Gens segregiert wird. Damit ist *H. neptunium* wahrscheinlich das erste untersuchte Bakterium, das die Initiation der Replikation von der Segregation trennt. Ein Vergleich mit nah verwandten Vertretern der dimorphen, gestielten Bakterien ergab, dass auch die drei anderen sequenzierten Spezies eine Umstrukturierung der Ursprungsregion aufwiesen, der aber kein gemeinsames Muster zu Grunde liegt.

Bevor die zentromer-ähnliche Region durch den Stiel segregiert, ist er DNA-frei. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass H. neptunium über ein zweites Segregationssystem verfügt, da der ParA-basierende Segregationprozess DNA als Interaktionspartner benötigt.

Um einen detaillierteren Einblick in den Segregationsprozess zu erhalten, wurden die ParA-Homologe von *H. neptunium* mittels Fluoreszenzfusionen und Deletionsmutanten charakterisiert. Diese Untersuchungen zeigten, dass die beiden ParA-Homologe HNE3561 ($ParA_{HNE}$) und HNE0708 wahrscheinlich am Segregationsprozess beteiligt sind. Die Ergebnisse der Lokalisations- und Deletionsstudien weisen darauf hin, dass nicht nur das chromosomale ParA HNE3561 (ParAHNE), sondern auch HNE0708 an der Chromosomensegregation beteiligt ist.

Die Deletion von HNE0708 führte zu einem pleitropen Phänotyp. Die Zellen der Mutation wiesen DNA Akkumulationen um Stiel auf und bildeten keine bläschenähnliche Strukturen an der Stielspitze. Des Weiteren zeigten Mutterzellen eine erhöhte Anzahl an Ursprungsregionen, was auf einen Defekt bei der Regulation der Replikationsinitiation hindeutet.

$ParA_{HNE}$ (HNE3561) kolokalisierte in der Mutterzelle mit $ParB_{HNE}$. Überraschenderweise lokalisierte es vor $ParB_{HNE}$ in Stielspitze, aber niemals im Stiel. Diese Beobachtung stützt

unsere Hypothese, dass ein zweiter Mechanismus für die Segregation der zentromer-ähnlichen Region durch den Stiel verantwortlich ist.
Zusammengefasst ergibt sich ein zweigeteilter Chromosomensegregationsprozess, bei dem die zentromer-ähnliche Region des $ParB_{HNE}$/*parS*$_{HNE}$-Komplexes als zentraler Ankerpunkt für die Segregationsmachinerie fungiert.

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
DAP	2,6-Diaminopimelinsäure
DAPI	4’,6-Diamidino-2-Phenylindol
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Deoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
OD_{600}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBS	ribosomale Bindestelle
UpM	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAP	shrimp alkaline phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
TEMED	N, N, N’,N’-Tetramethylethylen-1,2-diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VLAP	Vaseline-Lanolin-Paraffin-Wachs
x g	x-fache Erdbeschleunigung

Inhaltsverzeichnis

Abstract **1**

Zusammenfassung **2**

Abkürzungsverzeichnis **4**

1 Einleitung **8**

1.1 *Hyphomonas neptunium* als Modelorganismus 8

1.1.1 Methodenspektrum für die genetische Manipulation von *H. neptunium* 9

1.1.2 *H. neptunium* und *C. crescentus*: ein Vergleich 9

1.2 Bakterielle Chromosomenarchitektur 11

1.2.1 Der Replikationsursprung 11

1.2.2 Der Terminus 14

1.3 DNA Segregationssysteme in Bakterien 15

1.3.1 Plasmid-Segregationssysteme 15

1.3.2 Typ I Segregationssysteme 16

1.3.3 Typ II Segregationssysteme 17

1.3.4 Chromosomale Segregationssysteme 17

1.3.5 Chromosomensegregation in *B. subtilis* 18

1.3.6 Das essentielle *parABS*-System von *C. crescentus* 18

1.4 Ziel dieser Arbeit 19

2 Ergebnisse **21**

2.1 Zeitlicher und räumlicher Ablauf der Chromosomensegregation 21

2.1.1 Definition des Replikationsursprungs 21

2.1.2 Definition der Terminusregion 23

2.1.3 Experimentelle Bestimmung des *oriC* in *H. neptunium* 24

2.1.4 Visualisierung der Chromosomensegregation in *H. neptunium* 25

2.2 Welche Proteine sind an der Chromosomensegregation beteiligt? 31

2.2.1 Charakterisierung von HNE0708 34

2.2.2 Untersuchung des MipZ-Homologes HNE1128 41

2.2.3 Das HNE1300-HNE1299 Operon 43

2.2.4 Untersuchung des ParA-Homologes HNE3561 45

3 Diskussion **49**

3.1 Die Anomalie des Replikationsursprungs 49

3.2 Die Etablierung der *in vivo* Lokalisationssysteme 51

3.3 Chromosomensegregation in zwei Schritten 52

3.4 Das ParA-Homolog HNE0708 53
3.5 MipZ in *H. neptunium* 55
3.6 Das HNE1300/HNE1299-Operon 55
3.7 Die Beteiligung HNE3561 an der Chromosomensegregation in *H. neptunium*. 56
3.8 Ausblick 58

4 Material und Methoden 59
4.1 Chemikalien und Reagenzien 59
4.1.1 Puffer und Lösungen 59
4.1.2 Medien 59
4.1.3 Geräteliste 61
4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden 61
4.2.1 Escherichia coli 61
4.2.2 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen 62
4.2.3 Kultivation von *Hyphomonas neptunium* 62
4.2.4 Konjugation von *H. neptunium* 62
4.2.5 In-frame Deletionen in *H. neptunium* 63
4.2.6 Dauerkulturen 63
4.2.7 Bestimmung der Zelldichte 63
4.2.8 Synchronisation 63
4.2.9 Mikroskopie und Bildbearbeitung 64
4.3 Molekularbiologische Methoden 65
4.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 65
4.3.2 Kolonie-PCR 65
4.3.3 Restriktion 66
4.3.4 Gelelektrophorese 66
4.3.5 Ligation 67
4.3.6 Extraktion von Plasmid-DNA 67
4.3.7 Sequenzierung 67
4.4 Biochemische Methoden 68
4.4.1 SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophosese [161, 156] 68
4.4.2 Western Blot 69
4.4.3 Semi–Dry Transfer 69
4.4.4 Immundetektion 69
4.4.5 Coomassie-Färbung 69
4.5 Bioinformatische Methoden 70

5 Anhang 71
5.1 Verwendete Oligonukleotide 71
5.2 Verwendete Plasmide 75
5.3 Plasmid Konstruktion 77

5.4 Verwendete Stämme 82
5.5 *parS*- und *dif*-Stellen 84
5.6 Literaturverzeichnis 85

Lebenslauf 94

Erklärung 95

Danksagung 96

1 Einleitung

Das wichtigste Ziel einer jeden Zelle ist die Reproduktion und die damit verknüpfte Weitergabe des Erbguts. Alle anderen Prozesse wie Anabolismus, Katabolismus, Transkription und Translation arbeiten auf dieses Ziel hin.
Lange Zeit wurde angenommen, dass Bakterien keine innere Organisation besäßen und alle internen Prozesse den Gesetzen der Diffusion unterworfen wären. Erste Zweifel an dieser Theorie kamen auf, als man in der ersten Hälfe des vergangenen Jahrhunderts die Nukleoide von Bakterien mittels Färbung unter dem Lichtmikroskop sichtbar machte und erkannte, dass sie nicht die gesamte Zelle ausfüllten. Weitere Untersuchungen und die rasante Entwicklung der Mikroskopie, vor allem in den vergangenen 20 Jahren, enthüllten, dass die DNA von Bakterien hoch organisiert im Zytoplasma vorliegt und Bakterien über komplexe Mechanismen zur Weitergabe von DNA verfügen.
Unser Wissen über die DNA-Segregationsmechanismen beziehen wir aus den Studien weniger Modellorganismen, wie *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Vibrio cholera* und *Caulobacter crescentus*, die sich alle durch symmetrische oder asymmetrische binäre Teilung vermehren. Um unser Wissen über diese fundamentalen Prozesse zu erweitern, wurde in dieser Arbeit die Chromosomensegregation in dem sich durch Knospung fortpflanzenden Bakterium *Hyphomonas neptunium* untersucht.

1.1 *Hyphomonas neptunium* als Modelorganismus

Hyphomonas neptunium ist ein aerobes, bestieltes, dimorphes α-Proteobakterium, welches aus dem Hafenbecken von Barcelona isoliert wurde. [1] *H. neptunium* ist nicht in der Lage, Zucker als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Interessanterweise besitzt es aber alle für die Glykolyse und den Pentose-Phosphat-Weg nötigen Gene. Dies deutet darauf hin, dass *H. neptunium* unter bislang unbekannten Bedingungen zum Zuckerabbau fähig ist.

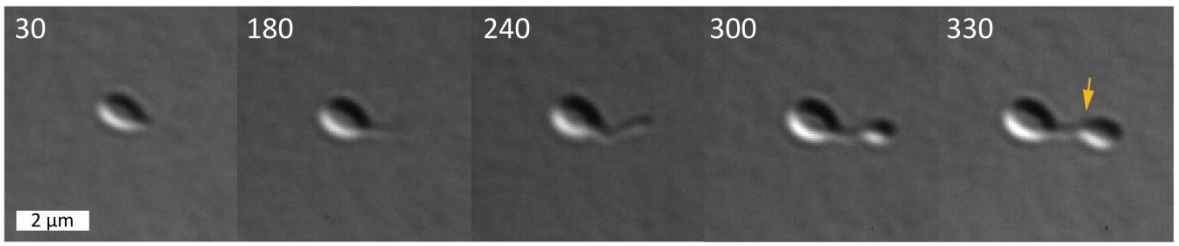


Abbildung 1: Zeitrafferaufnahme einer den Zellzyklus durchlaufenden *H. neptunium*-Zelle. Der gelbe Pfeil zeigt die Teilungsebene, Zeit in Minuten.

Unter Laborbedingungen haben sich Aminosäuren als optimale Kohlenstoffquelle erwiesen. [2], [3] Darüber hinaus kann *H. neptunium* folgende Zwischenprodukte des Zitratzyklus verstoffwechseln: Pyruvat, α-Ketoglutarat, Fumarat und Malat. [4] Weitere Studien weisen darauf hin, dass *H. neptunium* auch aromatische und halogenierte

Verbindungen abbauen kann. Dies würde *H. neptunium* einen Wachstumsvorteil sichern, da sein natürliches Habitat mit selbigen Verbindungen verunreinigt ist. [1] Im Unterschied zu vielen anderen marinen und Süßwasserbakterien verfügt *H. neptunium* nur über einen unvollständigen Chemotaxisapparat. Laborversuche bestätigen, dass *H. neptunium* nicht zur Chemotaxis befähigt ist. [2] Es wird vermutet, dass das Fehlen eines energieaufwendigen Chemotaxisapparates die motilen Schwärmerzellen befähigt, größere Distanzen zu überbrücken und so neue Habitate zu erschließen. [2] Basierend auf morphologischen Übereinstimmungen wurde *H. neptunium* anfänglich als *Hyphomicrobium neptunium* zu den Hyphomicrobiaceae gruppiert. [1] Zurzeit wird *H. neptunium* zu den Rhodobacterales gezählt, was durch Analysen der Physiologie und einer 16S rRNA Studie gestützt wird. [5, 6] Gegen diese Klassifizierung spricht allerdings die Tatsache, dass die meisten Rhodobacterales weder dimorph noch bestielt sind. Demzufolge hätten sich diese Merkmale unabhängig voneinander in einigen Rhodobacterales entwickeln müssen oder sie wären in einem gemeinsamen Vorfahren vorhanden gewesen und dann in den Rhodobacterales größtenteils verloren gegangen. Eine andere Studie diskutiert eine Neugruppierung von *H. neptunium* zu den Caulobacterales. [7] Dieser Vorschlag basiert auf der Untersuchung der 23S rRNA sowie mehrerer hochkonservierter Proteine, wie ribosomalen Proteinen, Hitzeschockprotein 70 (HSP70) und Elongationsfaktors Tu (EF-Tu). [7] Vergleichende Genomanalysen deuten ebenfalls auf eine nahe Verwandtschaft von *H. neptunium* zu *Caulobacter crescentus* hin und unterstützen so den Vorschlag der Neugruppierung. [2]

1.1.1 Methodenspektrum für die genetische Manipulation von *H. neptunium*

Für die genetische Manipulation von *H. neptunium* können wir auf ein vollständig sequenziertes und annotiertes Genom zurückgreifen. [7] Die Entwicklung weiterer genetischer und molekularbiologischer Werkzeuge für die zellbiologische Arbeit mit diesem Organismus erfolgt derzeit in unserem Labor. Zurzeit verfügen wir über ein Konjugationsprotokoll, mit dem Plasmide über einfach homologe Rekombination in das Chromosom von *H. neptunium* integriert werden können (Stefanie Wick, nicht publiziert). Als Antibiotika-Resistenzen stehen Rifampicin und Kanamycin zur Verfügung. Deletionen können mittels einer Gegenselektionsmethode auf der Basis des *sacB*-Gens erstellt werden. [8] Mit Hilfe einer Microarray-Analyse wurden zwei mit Kupfer oder Zink induzierbare Promotoren identifiziert. [9, 10, 11] Weiterhin wurde ein Synchronisationsprotokoll entwickelt, das die Anheftung von bestielten Zellen ausnutzt, um sie von den motilen Schwärmerzellen zu trennen. [10, 8]

1.1.2 *H. neptunium* und *C. crescentus*: ein Vergleich

C. crescentus ist ein in oligotrophen, aquatischen Lebensräumen weit verbreitetes gram-negatives, bestieltes α-Proteobakterium. [12] *C. crescentus* zählt neben *E. coli, B. subtilis* und *V. cholerae* zu den am besten untersuchten Modellsystemen für die bakterielle Zellteilung.

Sowohl *H. neptunium* als auch *C. crescentus* gehören zur nicht-phylogenetischen Gruppe der dimorphen, bestielten Bakterien (DPBs). [13] Die Mitglieder der DPBs teilen sich durch

asymmetrische Teilung (*C. crescentus*) oder Knospung (*H. neptunium*) und bilden so eine sessile Mutterzelle und eine motile Schwärmerzelle. Ein weiteres gemeinsames Merkmal der Stiel.[13] Der Stiel ist eine Ausstülpung des Zellkörpers, die in *C. crescentus* als Anheftungsorgan und zur Aufnahme von Phosphat dient.[14, 15] Das Periplasma des Stiels ist in *C. crescentus* vom Periplasma des Zellkörpers durch Diffusionsbarrieren getrennt. Die Diffusionsbarrieren gewähren *C. crescentus* einen Wachstumsvorteil, da sie die Ausdünnung von löslichen Proteinen im Periplasma verhindern.[16] Das Cytoplasma des Stiels ist im Gegensatz zum Periplasma nicht kompartimentiert und frei von DNA und Ribosomen.[15, 17, 18]
In *H. neptunium* ist der Stiel ein integraler Teil der Zelle. Das Periplasma ist durchgängig und der Stiel wird als reproduktive Struktur verwendet.[1] Dies bedeutet, dass sich während der Chromosomensegregation DNA und Ribosomen im Stiel befinden.

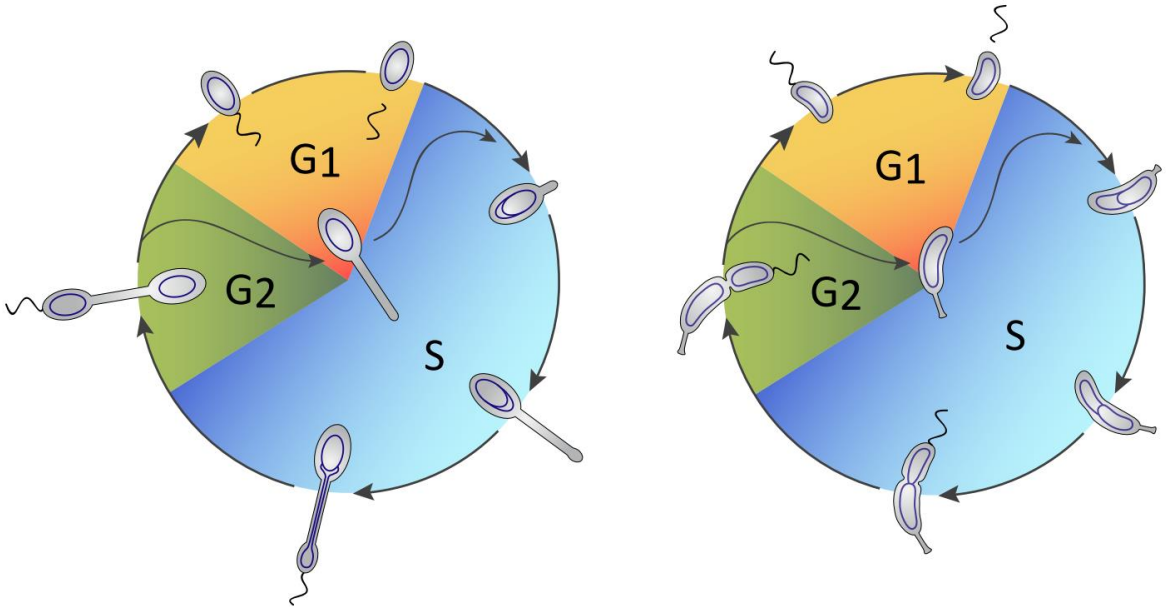


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zellzyklen von *H. neptunium* (links) und *C. crescentus* (rechts). Die G1- (gelb), S- (blau) und G2-(grün) Phasen sind vergleichend gegenüber gestellt.

H. neptunium und *C. crescentus* besitzen 1835 homologe Gene. Es wird angenommen, dass ein Drittel dieser Gene für den Lebenszyklus der DPBs und die Stielbiogenese benötigt werden.[13] Die Zellzyklen von *H. neptunium* und *C. crescentus* weisen ebenfalls viele Gemeinsamkeiten auf (Abbildung 2). Bei der Teilung entstehen zwei physiologisch und morphologisch unterschiedliche Tochterzellen, eine motile Schwärmerzelle und eine sessile Stielzelle. Bevor die Replikation beginnt, verliert die Schwärmerzelle ihr Flagellum. *C. crescentus* bildet anschließend am zuvor flagellierten Pol den Stiel aus und initiiert dann einmalig die Replikation.[19, 20, 21] Während die Replikation voranschreitet, wächst die Stielzelle in die Länge und bildet am nicht bestielten Pol eine Flagelle. Nach der Trennung der beiden Chromosomen teilt sich die Zelle asymmetrisch in eine Schwärmerzelle und eine Stielzelle. Die Stielzelle kann direkt einen neuen Zellzyklus beginnen, wohingegen sich die Schwärmerzelle erst in eine Stielzelle differenzieren muss. *H. neptunium* verliert wie *C. crescentus* seine Flagelle, bevor es die Replikation initiiert. Im Unterschied zu *C. crescentus* wird der Stiel allerdings am gegenüberliegenden Pol gebildet. Der Stiel wächst während der Replikation weiter, wobei eine Knospe an der Spitze gebildet wird. *H. neptunium* verwendet den Stiel als reproduktive Struktur, und transportiert eine Kopie

des Chromosoms durch den Stiel in die Knospe. Die Schwärmerzelle differenziert sich über mehrere Stunden hinweg in eine Stielzelle, wohingegen die Stielzelle sofort einen neuen Zellzyklus einleiten kann.
Weitere Indizien, die darauf hindeuten, dass der Zellzyklus in beiden Organismen ähnlich reguliert wird, sind homologe Zellzyklusregulatoren. Darunter befindet sich beispielsweise auch CtrA, der in *C. crescentus* den Hauptzellzyklusregulator darstellt. [2]

1.2 Bakterielle Chromosomenarchitektur

Die meisten untersuchten Bakterien verfügen über ein einzelnes zirkuläres Chromosom mit einer Länge von 4 Mb bis 8 Mb, wobei das durchschnittliche Chromosom etwa 1000-mal länger ist als die Zelle selbst. *C. crescentus* zum Beispiel verpackt ein 1,3 mm langes (~4 Mb) Chromosom in einer 2 µm kleinen Zelle. [22] Bis zur Mitte des vorherigen Jahrhunderts ging man davon aus, dass die Chromosomen von Bakterien unstrukturiert in der Zelle vorliegen und zufällig an die Tochterzelle übertragen würden. Die Entwicklung neuer zellbiologischer und mikroskopischer Methoden in den vergangenen dreißig Jahren enthüllte ein völlig anderes Bild. Es zeigte sich, dass Bakterien die Replikation und die Segregation der DNA von einem einzelnen Lokus aus beginnen, dem Replikationsursprung (*oriC*). Die Replikation verläuft bidirektional entlang der beiden Chromosomen Arme (Replikore) und endet in der Terminusregion (*ter*). [23, 22] Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Chromosomen von Bakterien eine bestimmte Orientierung in der Zelle ein, die auch an die Tochterzellen vererbt wird. [24]

1.2.1 Der Replikationsursprung

Die Initiation der Replikation wird durch dynamische Proteinkomplexe gestartet, die in einer strikten Hierarchie zu *oriC* rekrutiert werden. In der *oriC*-Region befinden sich konservierte 9 bp lange Sequenzmotive, die sogenannten DnaA-Boxen. DnaA bindet an diese spezifischen DNA-Sequenzen, bildet einen Nukleoproteinkomplex und entwindet die DNA in einer AT-reichen Region. Die DNA-Helikase bindet an die beiden nun freien Einzelstränge und entwindet diese weiter, so dass die zwei Replisomkomplexe auf die DNA geladen werden können. [25], [26] Obwohl sich der Ablauf der Initiation in vielen Organismen ähnelt, gibt es gravierende Unterschiede im Aufbau der Ursprungsregion und bei der Regulation der Initiation.

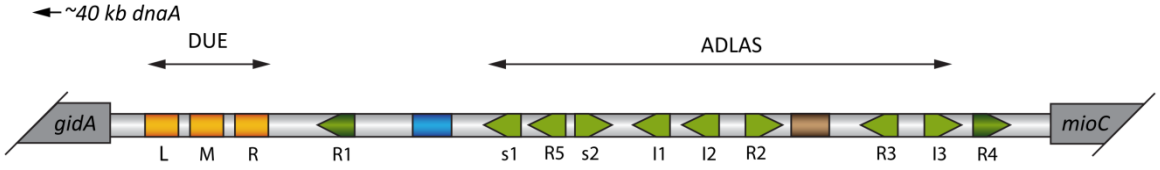


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des Replikationsursprungs von *E. coli*. Die drei AT-reichen Bereiche L, M, R (gelb) bilden das DUE („DNA unwinding element"). Die beiden DnaA-Boxen R1 und R4 (dunkelgrün) begrenzen die ADLAS-Region (ATP-DnaA low-affinity site), in der sich sowohl die restlichen DnaA-Boxen wie auch die zwei s-Stellen und die drei I-Stellen befinden (hellgrün). Die Bindestelle des IHF (braun) befindet sich ebenfalls in der ADLAS Region wohingegen die sich die Fis Bindestelle (blau) außerhalb befindet. (modifiziert nach Ozaki 2009 [25]).

In *E. coli* beträgt die minimale Größe für einen funktionstüchtigen Replikationsursprung 245 bp. [27] Der *oriC* besteht aus zwei funktionellen Bereichen: dem „DNA unwinding element“ (DUE) und der „ATP-DnaA low-affinity site“ (ADLAS)-Region (Abbildung 3). Beide Regionen sind für die Initiation essentiell. [27] DnaA bindet in der ADLAS-Region an mehrere DnaA-Boxen mit unterschiedlicher Affinität. Die ADLAS-Region wird von den DnaA-Boxen R1 und R4 begrenzt. Diese R-Boxen haben eine hohe Bindeaffinität sowohl für DnaA-ATP als auch DnaA-ADP. [28, 29, 30] Die DnaA-Boxen R2, R3, R5, die I-Stellen und die s-Stellen werden als ADLAS bezeichnet, da sie eine höhere Affinität zu DnaA-ATP besitzen (Ozaki 2008. [30, 31, 32, 33] Die DnaA-Boxen R2, R3 und R5 sind 9 bp lang und besitzen das konservierte TTATNCACA Motiv. [34] Die I-Stellen sind 9 bp lange DNA-Sequenzen, die 3 bis 4 Fehlpaarungen zur Konsensus-Sequenz aufweisen. [35] Die s-Stellen verfügen über die 6 bp lange Konsensus-Sequenzen TGATCC, die von I2 und I3 geteilt werden. [31] Zwei weitere Proteine besitzen Bindestellen in der DnaA-Binderegion: das bakterielle Histon-ähnliche Protein IHF (Integration host factor) und Fis. [36] Das IHF-Protein regt die Bindung von DnaA an die R2-Box und die I-Stellen in der ADLAS-Region an und unterstützt so die Initiation. [35, 37, 38, 39, 40] Fis konkurriert mit DnaA um die Bindung an die DnaA-Boxen R5 und I1-I3 in der ADLAS-Region. Eine hohe DnaA-ATP Konzentration negiert diesen Effekt jedoch. [37] Es wird angenommen, dass Fis bei der Regulation mehrfacher Initiationen in einem Zellzyklus schnell wachsender Bakterien beteilig ist. [41, 42] Die zweite funktionelle Region DUE besitzt drei 13 bp lange AT-reiche GATCTNTTNTTTT Sequenzen. [43] Hier wird die DNA entwunden und es entsteht der offene Initiationskomplex. DnaA-ATP bindet direkt an einzelsträngige DNA, wobei der obere T-reiche Strang bevorzugt wird. [30, 44] Nach dem Entwinden lädt DnaC mit Hilfe von DnaA die Helikase DnaB in der Einzelstrangregion auf die DNA. [45] Während die Helikase an der DNA entlang wandert, entwindet sie selbige. [40], [26] Die DNA Primase DnaG und das DNA-Polymerase III-Holoenzym lagern sich an die DNA an und bilden das Replisom. DnaG synthetisiert einen RNA Primer auf dem Folgestrang an den die Polymerase III bindet und DNA in 5‘-3‘ Richtung synthetisiert. [34, 40, 46, 26]).

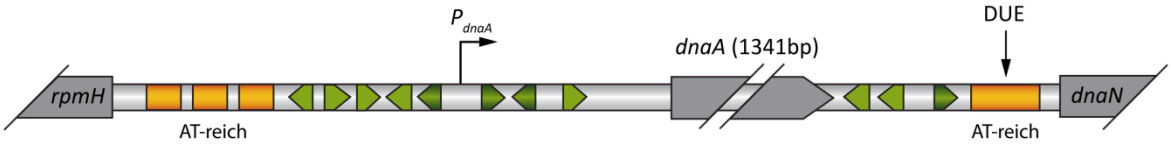


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Replikationsursprungs von *B. subtilis*. Die Ursprungsregion von *B. subtilis* ist durch das *dnaA*-Gen zweigeteilt. Stromaufwärts befinden sich eine AT-reiche Region (gelb), drei DnaA-Boxen mit dem Konsensus-Motiv (dunkelgrün) und fünf DnaA-Boxen mit jeweils einer Fehlpaarung (hellgrün). Stromabwärts befinden sich zwei DnaA-Boxen mit je einer Fehlpaarung (hellgrün) und eine perfekte DnaA-box (dunkelgrün) sowie das AT-reiche DUE (gelb) (modifiziert nach Briggs 2012 [47]).

Bei *B. subtilis* befindet sich der Replikationsursprung, wie bei den meisten soweit untersuchten Bakterien, in direkter Nähe des *dnaA*-Gens. [48], [49] Die elf DnaA-Boxen befinden sich in zwei intergenen Bereichen stromauf- und stromabwärts von *dnaA* (Abbildung 4). Vier der DnaA-Boxen in der Ursprungsregion besitzen das (5’TTATCCACA3‘) Konsensus-Motiv, wobei drei vor und eine hinter dem *dnaA*-Gen liegen. Die anderen sieben Boxen haben jeweils eine Abweichung von der Konsensus-Sequenz. Fünf DnaA-Boxen befinden sich stromaufwärts vom *dnaA* Gen und zwei stromabwärts. [50, 51] Beide DnaA-Box Cluster sind für die Initiation essentiell, wobei das stromaufwärts gelegene auch für die Autoregulation des *dnaA*-Gens benötigt wird. Hier wirkt DnaA als

Transkriptionsfaktor und bindet an den eigenen Promotor. [52] Bei der Initiation bildet die Ursprungsregion eine Schleife, und es wird angenommen, dass diese Schleife an den beiden DnaA-Box-Clustern zusammengehalten wird. [47] Die genaue Funktionsweise dieses „geteilten Ursprungs“ ist unbekannt. *B. subtilis* besitzt sechs weitere DnaA-Box-Cluster, die aber weder in der Nähe des *oriC* liegen, noch für die Initiation essentiell sind. [53, 54] Des Weiteren befinden sich zwischen *rpmH* und *dnaA* drei AT-reiche, 16 bp lange Sequenzen und ein „DNA unwinding element“ (DUE) in der intergenen Region zwischen *dnaA* und *dnaN*. [55] DnaA bindet an die DnaA-Box-Cluster und bildet einen Nukleoproteinkomplex. Nun werden DnaD und DnaB zu *oriC* rekrutiert. DnaD und DnaB sind nur in den Firmicutes konserviert (DnaB aus *B. subtilis* besitzt keine Ähnlichkeit mit Helikase DnaB aus *E. coli*). Die genaue Funktion der beiden Proteine ist noch nicht bekannt. Es wird vermutet, dass DnaD die Bildung des offenen Replikationskomplexes unterstützt oder stabilisiert, da es direkt mit DnaA interagiert. [55] DnaB ist in der Lage, DNA zu biegen und ist wahrscheinlich an der Bildung der *oriC*-Schleife beteiligt. [56] Nachdem der offene Komplex gebildet wurde, wird der DnaI-DnaC Komplex angelagert (Helikase Ladeprotein DnaI und Helikase DnaC). Zuletzt wird DnaG zum *oriC* rekrutiert und synthetisiert dort den ersten RNA-Primer auf dem Folgestrang.

In *C. crescentus* befindet sich der Replikationsursprung (*C. crescentus* origin, *Cori*) in der Nähe des *hemE*-Gens (Abbildung 5). [57] Die Regulation von *hemE* wird durch einen starken und einen schwachen Promotor kontrolliert. Wird der stärkere Promotor ausgeschaltet, kann die Replikation nicht initiiert werden. [58] Der Replikationsursprung ist etwa 1000 bp lang. [59, 60] In *C. crescentus* befinden sich sieben 9 bp lange DnaA-Boxen in der Ursprungsregion. Sie werden in G-Boxen und W-Boxen unterteilt. [61] Die beiden G-Boxen besitzen eine moderate Affinität für DnaA und begrenzen die äußersten Bereiche des DnaA-box Clusters. Die Initiation ist nur möglich, wenn eine der beiden Boxen vorhanden ist.

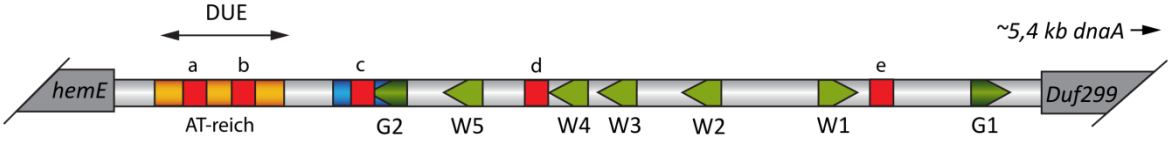


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Replikationsursprungs von *C. crescentus*. Dargestellt sind die AT-reichen Sequenzen (gelb), CtrA-Bindestellen (rot, a-e), eine IHF-Bindestelle (blau), DnaA-Boxen mit hoher Affinität zu DnaA (dunkelgrün) und DnaA-Boxen mit schwacher Affinität (grün) (modifiziert aus Collier 2012 [62]).

Die fünf W-Boxen haben eine geringe Affinität zu DnaA, sind aber für die Initiation essentiell. [61] Eine AT-reiche Region befindet sich stromaufwärts des DnaA-box-Clusters. An dieser Stelle wird die DNA aufgewunden. Des Weiteren befindet sich ein Bindemotiv des IHF-Proteins in der Ursprungsregion. IHF ist in der Lage DNA zu biegen. In *E. coli* unterstützt es die Bildung des Initiationskomplexes, indem es DnaA zu spezifischen DnaA-Boxen rekrutiert. [59], [63] Die Bindestelle von IHF überlappt mit einer wichtigen Bindestelle von CtrA, einem der Hauptregulatoren des Zellzyklus, welcher die Initiation inhibiert. Des Weiteren befinden sich fünf CtrA-Bindestellen mit der Konsensus-Sequenz TTAA(N7)TTAA [64] in der Ursprungsregion. CtrA ist ein essentieller Antwort-Regulator, der durch die Bindung an seine Erkennungssequenzen die Initiation am *Cori* verhindert. [65] Dies lässt vermuten, dass CtrA und das IHF Protein um diese Bindestelle konkurrieren und sich gegenseitig verdrängen.

1.2.2 Der Terminus

Die meisten Bakterien besitzen ein einzelnes zirkuläres Chromosom, welches bidirektional repliziert wird. [59, 66] Die Terminusregion ist, im Gegensatz zum Replikationsursprung, weniger untersucht. Der Terminus befindet sich in den meisten Bakterien in direkter Nähe des „GC-skews". [67] Der „GC-skew" ist ein Wechsel in der Häufigkeit von Cytosin zu Guanin auf dem Leitstrang, der wie folgt berechnet wird: (Cytosin - Guanin) / (Cytosin + Guanin). Diese Formel gibt die relative Häufigkeit von Cytosin gegenüber Guanin an. Wendet man diese Formel auf ein vollständiges Chromosom an, erhält man in der Regel zwei Punkte, bei denen sich der GC-skew abrupt ändert. In den meisten untersuchten Bakterien befindet sich der Replikationsursprung in der Nähe solchen Wechsels und der Terminus in direkter Nähe zum zweiten Wechsel.
Die Terminusregionen von *E. coli*, *B subtilis* und *C. crescentus* besitzen mehrere DNA-Motive, die für die korrekte Segregation und Termination der DNA benötigt werden.
Die Chromosomen von *B. subtilis* und *E. coli* verfügen über so genannte Replikationsfallen (Abbildung 6). Diese Replikationsfallen bestehen aus 23 bp langen polaren DNA Sequenzen (*Ter*-Stellen), die von der Replikationsgabel nur in Richtung Terminus passiert werden können, sowie den Terminationsproteinen RTP in *B. subtilis* und Tus in *E. coli*, die spezifisch an die *Ter*-Stellen binden. [68] Die Terminationsproteine besitzen außer ihrer Funktion keine Sequenz- oder Strukturähnlichkeit und sind nur in nah verwandten Spezies konserviert. Daher wird vermutet, dass diese Systeme unabhängig voneinander entstanden sind. Da Veränderungen an den Replikationsfallen zu keinen ernsten Phänotypen führen, wird angenommen, dass dieses System lediglich die Effizienz der Replikation, in schnell wachsenden Zellen mit mehreren Initiationen pro Zellzyklus, steigert.

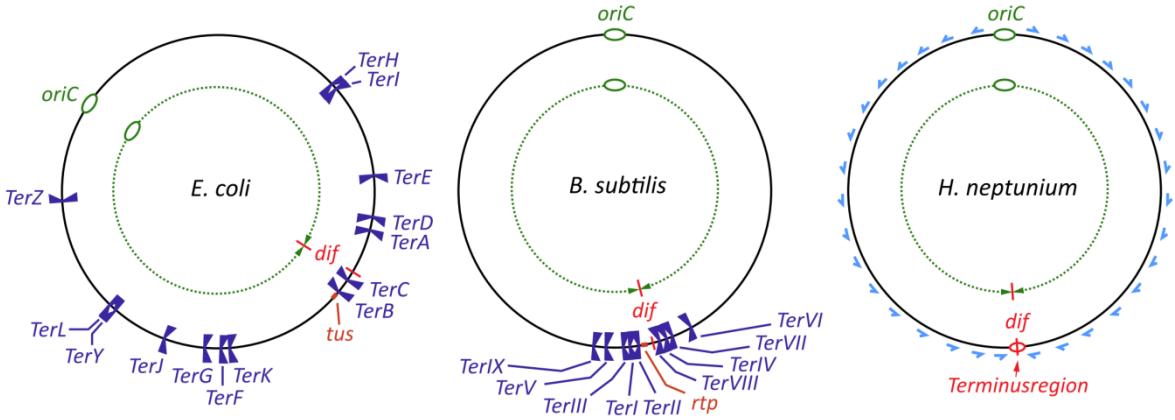


Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung der Replikationsfallen von *E. coli*, *B. subtilis* sowie der Terminusregion und KOPS-Sequenzen von *C. crescentus*. (*E. coli* und *B. subtilis* modifiziert nach Duggin 2008 [68])

Interessanterweise sind die Komponenten der Replikationsfallen RTP und Tus nicht essentiell und ihre Deletion führt zu keinen sichtbaren Phänotypen. [69, 70] Auch haben Sequenzveränderungen im Terminusbereich kaum Einfluss auf das Zellwachstum. [71, 72]

Ein weiteres Merkmal der Terminusregion sind die 28 bp langen konservierten XerC und XerD Bindestellen, die sogenannten *dif*-Stellen. Die Rekombinasen XerC und XerD binden spezifisch an die *dif*-Stellen und sind in der Lage, Chromosomendimere, die in 5 – 10 % aller Zellen durch homologe Rekombination zwischen den Schwesterchromosomen enstehen, zu trennen.
C. crescentus besitzt keine Homologe zu den Terminationsfallen von *E. coli* oder *B. subtilis*. Die *dif*-Stellen befinden sich in der Nähe des GC-skew-Wechsels und es konnte gezeigt werden, dass sowohl das Entfernen der *dif*- Stellen als auch die Deletion von XerCD zu einer erhöhten Zahl von Chromosomendimeren führt.
Ferner weist die Ausrichtung der 8 bp langen „FtsK-orienting polar sequences“ (KOPS) auf die Terminusregion in direkter Nähe der *dif*-Stellen hin (Abbildung 6). Die in Bakterien hoch konservierte DNA-Translokase FtsK wird an den KOPS-Sequenzen auf die DNA geladen. Da FtsK an der Zellteilungsebene immobilisiert ist und die KOPS-Sequenzen in Richtung Terminus orientiert sind wird das Chromosom von der Zellteilungsebene weggepumpt. [73, 74]

1.3 DNA Segregationssysteme in Bakterien

1.3.1 Plasmid-Segregationssysteme

Plasmide sind zirkuläre extra-chromosomale DNA-Elemente, die für ihren Wirt nicht essentiell sind, aber unter bestimmten Umweltbedingungen einen Wachstumsvorteil bieten. Um ihre Weitergabe auch in schnell wachsenden Zellen zu garantieren, haben sich unterschiedliche Strategien entwickelt. [75, 76, 77] Die erste und einfachste Strategie ist eine hohe Kopienzahl, welche die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Übertragung maximiert. Sogenannten „high-copy number“-Plasmide besitzen zwischen zwanzig und mehreren hundert Plasmidkopien pro Zelle. Durch die Konkatenierung von mehreren Kopien sinkt jedoch die Anzahl der Segregationseinheiten. [78, 79] Zu dieser Gruppe gehören auch die Klonierungsvektoren pUC und pBR332. Die zweite und aufwendigere Variante ist die Entwicklung eines eigenen Segregationssystems. Dieser Ansatz wird von den „low-copy number“-Plasmiden verfolgt, die mit weniger als zehn Kopien pro Zelle vorliegen.
Der prinzipielle Aufbau der Plasmid-Segregationssysteme ist sehr ähnlich (Abbildung 7). Sie bestehen aus drei Komponenten, deren Gene in einem Operon oragnisiert sind, nämlich (i) einer zentromer-ähnlichen Sequenz (*parS* oder *parC*), (ii) einem DNA-Bindeprotein (ParB oder ParR), das an die Zentromer-Sequenz bindet und (iii)einer ATPase, die mit dem DNA-Bindeprotein interagiert und die Kraft für die Segregation bereitstellt oder die Direktionalität des Segregationsprozesses vorgibt (Abbildung 7). [80, 81, 82, 83]
Zurzeit werden drei Hauptgruppen von Plasmid-Segregationssystemen anhand ihrer ATPasen unterschieden. [84, 85] Die Typ I Systeme verfügen über Walker P-loop ATPasen und werden auf Grund von Anwesenheit oder Abwesenheit eines N-terminalen HTH-Motives (Helix-turn-Helix) in Typ Ia und Typ Ib unterteilt. [80, 81] Das Typ II Plasmid-Segregationssystem verwendet für die Segregation Aktin-ähnliche Zytoskelettelemente und das Typ III System, Tubulin-ähnliche GTPasen (Abbildung 7). [86], [76]

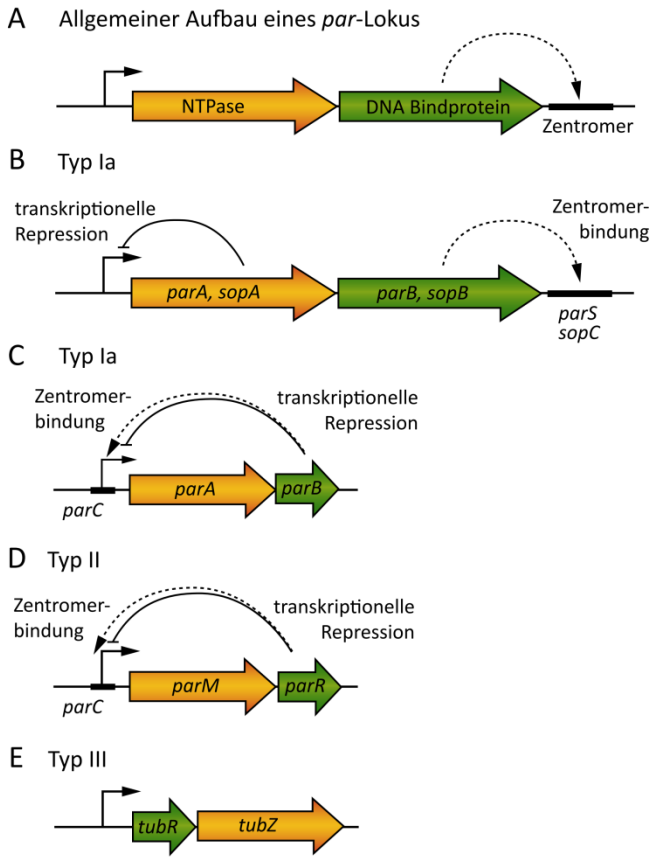


Abbildung 7: Schematischer Aufbau der unterschiedlichen Par-Systeme. (A) Allgemeine Organisation eines *par*-Lokus. (B) Die ATPasen von Typ Ia-Systemen besitzen ein zusätzliches HTH-Motiv, weshalb sie auch als lange ParA-Proteine bezeichnet werden (Plasmide P1 und F). (C) Da den ATPasen des Typ Ib das HTH-Motiv fehlt werden sie auch kurze ParA-Proteine genannt. Zu ihnen gehören die ATPasen, der Plasmide pB171, TP228 sowie aller chromosomalen *parABS*-Systeme. (D) Aufbau eines Typ II *par*-Lokus (z.B. Plasmid R1) und (E) eines Typ III *par*-Lokus (pBtoxis und pXO1) Die Abbildung wurde modifiziert nach Salje 2010 [80] und Gerdes 2010 [81].

1.3.2 Typ I Segregationssysteme

Die beiden größten Herausforderungen für ein Segregationssystem sind (i) die Feststellung von spezifischen Positionen innerhalb einer Zelle und (ii) anschließend die korrekte Segregation des Plasmids zu diesen Positionen.
Die beiden am besten untersuchten Plasmide des Typ I Systems sind P1 und F aus *E. coli*. [80, 81] In beiden Fällen bindet das ParB-ähnliche Protein (SopB bei F) an die Zentromer-Region *parC* (*sopC* bei F) und bildet einen Nukleoprotein-Komplex. ParA-ATP bindet unspezifisch an DNA und ist über das gesamte Nukleoid verteilt. Interagiert ein ParB/*parS*-Komplex mit DNA-gebundenem ParA-ATP, stimuliert ParB die ATPase-Aktivität von ParA, wodurch dieses als ParA-ADP von der DNA dissoziiert. Durch Brown‘sche Molekularbewegung kommt der ParB/*parS*-Komplex mit dem nächsten ParA-ATP in Kontakt und der Vorgang wiederholt sich. Die Plasmidkopien wandern so von der Zellmitte ausgehend, den ParA-ATP Molekülen in Richtung der Zellpole hinterher. [82, 87, 83]
Da die ParA-ADP Moleküle einige Zeit benötigen um wieder die ATP Form zu wechseln findet eine gerichtet Bewegung statt. Diese Hypothese wird auch von der besonderen

Anfälligkeit der Typ I Systemen für Konzentrationsänderungen der einzelnen Komponenten gestützt. [88, 89, 90]
Dieses Model der Segregation wird auch als „diffusion-ratchet"-Modell bezeichnet und im Gegensatz zum „pulling"-Modell setzt es kein ParA-Filament voraus. [81, 90]

1.3.3 Typ II Segregationssysteme

Das *parMRC*-Operon des Plasmids R 1 aus *E. coli* war eines der ersten DNA-Segregationssysteme, das in Bakterien identifiziert wurde. [91] Die Aktin-ähnlichen ATPasen der Typ II-Segregationssysteme segregieren Plasmide, indem sie Filamente ausbilden, deren dynamische Instabilität der von eukaryotischen Mikrotubuli gleicht. ParM bildet eine Aktin-ähnliche doppel-helikale Struktur, die aus zwei Protofilamenten besteht. Die ParM-Protofilamente sind im Gegensatz zu Aktin links drehend. [92, 93] ParM ist nur in seiner ATP-gebunden Form in der Lage stabile Sturkturen auszubilden. Die Untereinheiten eines ParM-Filaments können spontan hydrolisieren, solange jedoch an den Enden des Filaments neue ParM-ATP Moleküle angelagert werden bleibt das Filament stabil. [94, 95] Ist die Hydrolyse der Untereinheiten schneller als die Anlagerung neuer ParM-ATP Untereinheiten kommt es ähnlich wie bei Mikrotubuli zur vollständigen Depolymerisation des Filaments. Bei Typ II-Segregationssystemen interagiert der ParR/*parC*-Komplex des R1 Plasmids an beiden Enden mit dem ParM-Protofilamenten. [96, 94] Das ParM-Filament ist in der Lage das Plasmid innerhalb weniger Sekunden an die Pole der Zelle zu schieben. Anschließend depolymerisiert das ParM-Filament vollständig und die, an den Polen lokalisierten Plasmide können wieder frei diffundieren. Der Segregationsvorgang von Typ II Plasmiden ist, wie der von Typ 1 Plasmiden nicht an den Zellzyklus gekoppelt, da die Plasmide mehrere Segregationsrunden durchlaufen können. [96]

1.3.4 Chromosomale Segregationssysteme

Chromosomale *parABS*-Systeme sind in allen untersuchten bakteriellen Chromosomen konserviert, mit Ausnahme der Familien Enterobacteriaceae (z.B. *E. coli*), Pasteurellaceae (z.B. *Haemophilus influenzae*) und Mycoplasmataceae (z.B *Mycoplasma sp*.). In der Mehrzahl der sequenzierten Chromosomen befinden sich die *parAB*-Homologe in direkter Nähe des Replikationsursprungs. [97] *E. coli* verwendet für die Segregation der Ursprungsregion die 25 bp langen *migS*-Sequenzen, die sich in der Ursprungsregion befinden. [98, 99] Warum die *migS*-Sequenzen für die Segregation der Ursprungsregion essentiell sind und wie andere Bakterien, die weder über *migS* noch ParAB-Homologe verfügen, ihre Chromosomen segregieren, muss in weiteren Studien geklärt werden. Obwohl die Homologe von ParAB hoch konserviert sind, können viele Bakterien ihre Chromosomen auch in ihrer Abwesenheit normal segregieren. [100], [101], [102], [103], [104] Demnach ist es wahrscheinlich, dass mehrere redundante Segregationssysteme für den Transport der DNA in Bakterien zuständig sind.

1.3.5 Chromosomensegregation in *B. subtilis*

Das erste und bis jetzt vielseitigste chromosomale *parABS*-System wurde in *B. subtilis* identifiziert. Die beiden Hauptkomponenten Spo0J (ParB) und Soj (ParA) sind in *B. subtilis* anders, als in anderen Bakterien, nicht ausschließlich an der Chromosomensegregation, sondern auch an der Sporulation und der Initiation der Replikation beteiligt.
Die Deletion von Soj und Spo0J führt zu einem schwachen Segregationsdefekt, der sich in 1 – 2 % DNA-freien Zellen auswirkt (etwa 100-mal mehr als im Wildtyp). [100] Während der Sporulation repremiert Spo0J die Bindung von Soj an die DNA früher sporulationsspezifischer Gene (*spoII*), wodurch die Sporenbildung ermöglicht wird. [105, 106, 107, 108] Des Weiteren führt sowohl die Deletion von Spo0J als auch die von Soj zu einer erhöhten Initiationsrate. In seiner monomeren Form inhibiert Soj die Oligomerisierung des Initationsproteins DnaA und verhindert so die Initiation. [109, 110] Das Soj Dimer hingegen unterstützt die Bildung einer DnaA-Helix-Struktur, die für die Initiation essentiell ist. [110] Spo0J ist in der Lage die ATPase-Aktivität von Soj zu aktivieren und es so in seine monomere Form zu überführen. Der Vorgang, der Soj in seine Dimere-Form überführt, ist allerdings noch unbekannt und es wird angenommen, dass es den Großteil der Zeit in seiner monomeren-Form vorliegt, da es kontinuierlich von Spo0J inhibiert wird.
Ferner bindet Spo0J an acht *parS*-Sequenzen in der Ursprungsregion und sorgt durch die Rekrutierung von „structural maintenance of chromosomes"-Komplexen (SMC) an den *oriC* für die Kondensation der DNA und die korrekte Segregation. Die Deletion von Spo0J führt in vegetativen Zellen zu einer 100-fach erhöhten Anzahl an DNA-freien Zellen. Entfernt man Spo0J und Soj in einem Stamm, dem auch SMC fehlen, wird die Anzahl der DNA-freien und der geschnittenen Zellen drastisch erhöht. [111, 112]). In *B. subtilis* ist die Hauptaufgabe des chromosomalen *parABS*-Systems weniger die Segregation des *oriC,* sondern die Regulation der Initiation und das Rekrutieren von SMC-Komplexen an die DNA.

1.3.6 Das essentielle *parABS*-System von *C. crescentus*

Anders als in den meisten Bakterien ist das *parABS*-System in *C. crescentus* essentiell, da der Replikationsursprung über ParB direkt mit dem FtsZ-Inhibitor MipZ interagiert. [113, 114, 115] Die Korrekte Positionierung des *Cori* durch das parABS-System ist folglich essentiell. Die Modifikation einzelner Komponenten führt zu schwerwiegenden Chromosomen-Segregationsdefekten. [113, 116]
Der Replikationsursprung von *C. crescentus* wird von einem *parABS*-System segregiert, welches den Typ I Plasmid-Segregationssystemen ähnelt und das sich in der Nähe des Segregationsursprungs befindet. Die Walker A ATPase ParA bildet in ihrer ATP-Form Dimere, die unspezifisch mit DNA interagieren und sich über das Chromosom ausbreiten. [117, 118] Diese ParA-Stuktur durchspannt vom neuen Pol ausgehend fast die gesamte Zelle (Abbildung 8). Wie bei den Typ I Plasmid-Segregationssystemen bindet ParB spezifisch an die zentromer-ähnlichen *parS* Sequenzen und bildet einen Nukleoprotein-Komplex. Durch die Synthese neuer DNA wird einer der beiden ParB/*parS*-Komplex vom alten Pol weggeschoben und interagiert mit der ParA-Struktur. [118] ParB besitzt eine starke Affinität für ParA und stimuliert die ATPase-Aktivität von ParA. [117]

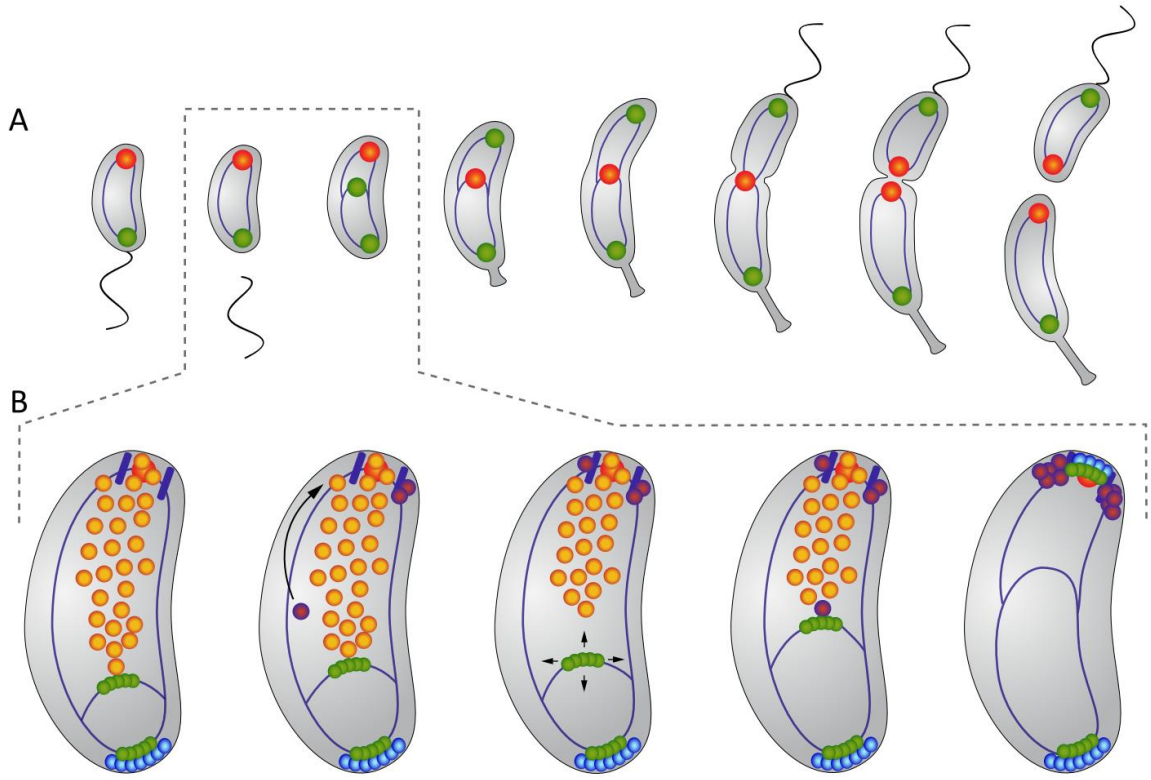


Abbildung 8: Chromosomensegregation in *C. crescentus*. (A) Die Segregation des Replikationsursprungs (grüner Punkt) und der Terminusregion (roter Punkt) während des dimorphen Lebenszyklus von *C. crescentus*. (B) Segregation des ParB/*parS*-Komplexes durch ParA zum gegenüberliegenden Pol (grüner Punkt ParB/*parS*-Komplexe, gelber Punkt ParA-ATP, violetter Punkt ParA-ADP, blauer Punkt PopZ, violetter Strich TipN) (modifiziert nach Schofield 2010).

Die ParA-Dimere zerfallen nach der Hydrolyse von ATP in zwei Monomere, die nicht mehr in der Lage sind mit DNA zu interagieren. [117] Durch diesen Vorgang wird die ParA-Struktur verkürzt und durch Brown'sche Molekularbewegung erreicht der ParB/*parS*-Komplex erneut die ParA-Struktur, woraufhin sich die ATP-Hydrolyse wiederholt. [118] Die Verkürzung der ParA-Struktur transportiert den ParB/*parS*-Komplex zum neuen Pol, wo er von PopZ verankert wird. [117, 94] Um die Polymerisation einer zweiten ParA-Struktur am alten Pol zu verhindern werden, die ParA-ADP Moleküle am neuen Pol von TipN gebunden. [118]

1.4 Ziel dieser Arbeit

Unser bisheriges Wissen über die Chromosomensegregation in Bakterien beruht auf der Analyse weniger Modellorganismen, die sich entweder durch symmetrische oder asymmetrische binäre Teilung vermehren. Wir haben H. neptunium als neuen Modellorganismus ausgewählt, da es sich durch Knospung vermehrt und seinen Stiel als reproduktive Struktur nutzt. Die bis jetzt bekannten Segregationsmechanismen sind auf *H. neptunium* nur teilweise anwendbar, da sein Stiel vor der Segreagtion DNA-frei ist. Mit hoher Wahrscheinlichkeit verfügt *H. neptunium* über einen zweiten Segregationsmechnismus, der das Chromosom durch den Stiel transportiert.

Die Identifikation des Segregationssystems von *H. neptunium* und die Visualisierung der Chromosomensegregation *in vivo* waren die Ziele dieser Arbeit. Zu diesem Zweck wurde zwei *in vivo*-Lokalisationssystem in *H. neptunium* etabliert um die Segregation unterschiedlicher Chromosomen-Loci, *in vivo* zu verfolgen.
Des Weiteren sollen die wahrscheinlich am Segregationsprozess beteiligten ParA-Homologe von *H. neptunium* durch Loklisations- und Deletionsstudien näher untersucht werden.

2 Ergebnisse

2.1 Zeitlicher und räumlicher Ablauf der Chromosomensegregation

Die bis jetzt untersuchten *parABS*-Systeme sind an der Segreagtion der Ursprungsregion beteiligt. [117, 102, 101, 100] In der Ursprungsregion befinden sich die zentromer-ähnlichen *parS*-Sequenzen, an die ParB bindet. Nach dem Replikationsstart bewegen sich einer oder beide ParB/*parS*-Komplexe mit Hilfe von ParA über den Nucleoid zu bestimmten Positionen (Quelle). In allen bis jetzt untersuchten Bakterien sind die zentromer-ähnlichen *parS*-Sequenzen in der Nähe des Replikationsursprungs die erste Region des Chromosoms und die Terminusregion die Letzte, die segregiert werden. [24, 119, 120] *H. neptunium* verfügt über Homologe eines chromosomalen *parABS*-Systems, allerdings ist dieses System nicht geeignet die Segregation der DNA durch den Stiel zu vermitteln, da der Stiel vor Beginn der Segregation DNA-frei ist. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass *H. neptunium* über einen zweiten Segregationsmechnismus verfügt.
Um mehr über den zeitlichen und räumlichen Ablauf der Chromosomensegregation zu erfahren wurden die *parS*-Sequenzen von *H. neptunium* ermittelt und die Dynamik der ParB/*parS*-Komplexe während des Zellzyklus analysiert um einen ersten Einblick in den Ablauf der Segregation zu erhalten. Des Weiteren sollten der Replikationsursprung und die Terminusregion mittels des „Fluorescent repressor operator systems“ (FROS) analysiert werden. [121] Um festzustellen, ob die Segregation ähnlich geordnet verfäuft wie im nah verwandten *C. crescentus*. [24]

2.1.1 Definition des Replikationsursprungs

Über die Position des Replikationsurspung und der Terminusregion ist in *H. neptunium* nichts bekannt. Daher müssen diese für die Chromosomendynamik wichtigen Punkte erst ermittelt werden. In fast allen Bakterien befinden sich der Replikationsursprung und die Terminusregion in der Nähe des GC-skews. [122, 67, 123] Der konservierte GC-skew gibt die Häufigkeit von Guanin zu Cytosin wieder und ist in der Regel auf dem Leitstrang positiv und auf dem Folgestrang negativ. [124] Diese Asymmetrie führt zu zwei Wechselpunkten, an denen sich die Häufigkeit abrupt ändert. Die Wechselpunkte liegen sich auf einem zirkulären Chromosom gegenüber. Um diese kritischen Regionen in der Genomsequenz von *H. neptunium* zu lokalisieren, wurden bioinformatische Analysen durchgeführt. Dazu wurde der GC-skew von *C. cresentus* und *H. neptunium* mit dem „GC-skew server“ berechnet und grafisch dargestellt (Abbildung 9). [125]
C. crescentus weist einen sehr deutlichen GC-skew mit zwei Wechselpunkten in der Nähe von 1 bp und von 1.9 Mb auf. *H. neptunium* weist einen eher diskontinuierlichen GC-skew auf, der auf dem Leitstrang auch größere Regionen mit einer negativen Häufigkeit von Guanin zu Cytosin besitzt (Abbildung 9). In C. crescentus wurde in der Nähe des ersten Wechselpunkts (1 bp) der Replikationsursprung identifiziert und am zweiten Wechsel die Terminus Region. [60, 123]

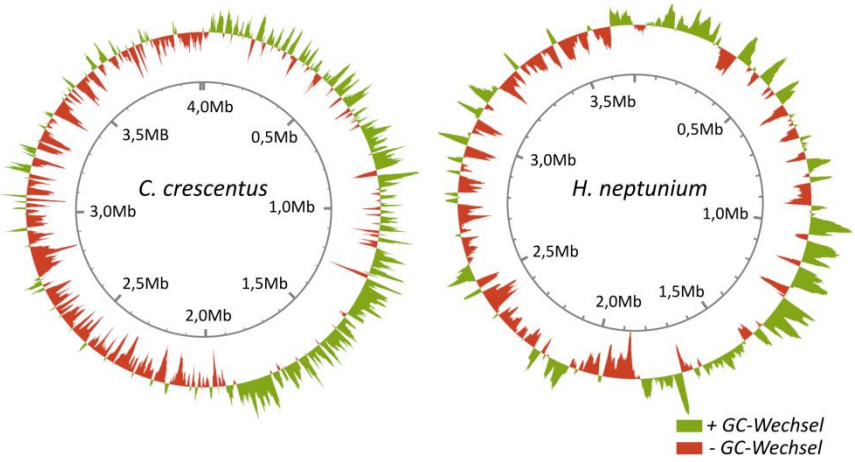


Abbildung 9: Schematische Darstellung des GC-skews von *C. crescentus* und *H. neptunium*. Die GC-skews wurden mit dem „GC-skew server" ermittelt. [125] Die Häufigkeit von Guanin im Vergleich zu Cytosin ist auf dem Leitstrang positiv (grün) und auf dem Folgestrang negativ (orange). Der Replikationsursprung und der Terminus befinden sich jeweils an einem der beiden Wechsel.

Um den Replikationsursprung von *H. neptunium* zu bestimmen, wurde der gut charakterisierte *Cori* von *C. crescentus* zum Vergleich herangezogen. In *C. crescentus* befinden sich in direkter Nähe zum ersten GC-skew-Wechsel (1 bp) Homologe der Gene *dnaA, hemE, gidA, gidB, parA* und *parB*. Darüber hinaus befinden sich fünf Bindestellen für DnaA (DnaA-Boxen) und zwei für ParB (*parS*-Sequenzen) in dieser Region. In vielen anderen Bakterien befinden sich zusätzlich noch die Gene von *dnaN, recF* und *gyrB* am Replikationsursprung, die sich aber im Fall von *C. crescentus* 163 kb von *Cori* entfernt befinden (Abbildung 10). [126]

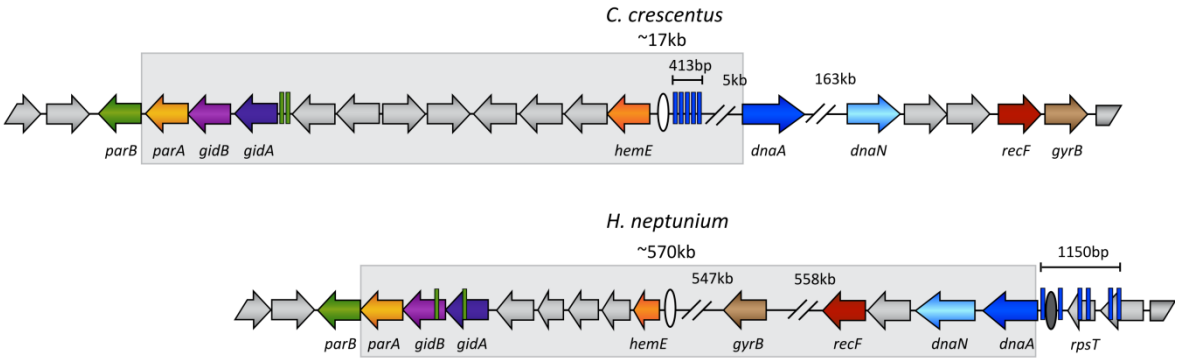


Abbildung 10: Die Replikationsursprünge von *C. crescentus* und *H. neptunium*. Der *oriC* von *C. crescentus* (weiße Ellipse) wurde von Marczynski und Kollegen experimentell ermittelt. [58, 60] Die DnaA-Boxen sind mit blauen, die *parS*-Sequenzen mit grünen Strichen dargestellt.

Die Organisation der Ursprungsregion von *H. neptunium* im Bereich des *gidABparAB*-Operons sowie dessen relative Lage zu *hemE* ist nahezu identisch mit der in *C. crescentus.* Die Anordnung der anderen konservierten Gene und Bindestellen weicht jedoch stark von der in *C. crescentus* ab. Zum einen befinden sich alle restlichen konservierten Gene einschließlich des *dnaA*-Gens ~560 kb stromaufwärts des GC-skews. Zum anderen zeigte die Analyse der DnaA-Boxen, dass sich ein Cluster von sechs DnaA-Bindestellen stromaufwärts von *dnaA* befindet. Das DnaA-Box-Cluster hat eine Länge von 1150 bp. Zwei der DnaA-Boxen befinden sich in der intergenen Region stromaufwärts von *dnaA*,

die anderen vier DnaA-Boxen liegen in den zwei nächstgelegenen Genen. Die intergene Region zwischen *dnaA* und *rpsT* besitzt einen deutlich niedrigeren GC-Gehalt (~52 %) als das Gesamtgenom (~62 %) und ist damit signifikant AT-reicher. Allerdings konnten in diesem Bereich keine AT-reichen Sequenzwiederholungen ermittelt werden, wie sie typischerweise zum Aufschmelzen des Replikationsursprungs durch DnaA benötigt werden. [30, 44, 62] In der Nähe des GC-skew-Wechsels konnten dagegen weder eine Anhäufung von DnaA-Boxen noch eine AT-reiche Region detektiert werden. Insgesamt ist daher davon auszugehen dass die Replikation in *H. neptunium* 570 kb vom GC-skew-Wechsel entfernt in der Nähe von *dnaA* startet. Demnach ist *H. neptunium* das erste Bakterium, für das eine deutliche zeitliche Entkopplung von Replikation und Segregation nachgewiesen wird.

2.1.2 Definition der Terminusregion

Durch die bidirektionale Replikation des Bakterien Chromosoms liegen sich der Replikationsursprung und die Terminusregion gegenüber. Da aus den vorangegangenen Experimenten alles daraufhin deutet, dass der Replikationsursprung sich nicht am ersten GC-skew-Wechsel befindet, soll nun ermittelt werden ob sich der Terminus ebenfalls verschoben hat.
Über die Terminusregion, die in der Regel am zweiten GC-skew-Wechsel lokalisiert, ist wenig bekannt. Die meisten untersuchten Bakterien besitzen in der Terminusregion die 28 bp langen sogenannten *dif*-Stellen. [67] Die Rekombinasen XerC und XerD erkennen die *dif*-Stellen und können dort Chromosomendimere voneinander trennen, die bei homologer Rekombination zwischen den Schwesterchromosomen auftreten können. Um die *dif*-Stellen von *H. neptunium* zu ermitten wurde nach der *dif*-Sequenz (5‘-AAGATCGACTTTGTAATTTATGTAAAGT-3‘, [123]) des nah verwandten *C. crescentus* auf dem Chromosom von *H. neptunium* gesucht. Bei dieser Suche wurden maximal drei Fehlpaarungen erlaubt. Die *dif*-Stellen von *H. neptunium* wurden in der Nähe des zweiten GC-skew-Wechsels identifiziert (Abbildung 11, Tabelle 16). Dies bedeutet, dass sich die Terminusregion in *H. neptunium* wahrscheinlich nicht gegenüber des Replikationsursprungs befindet, sondern in der Nähe des zweiten GC-skew-Wechsels. Ein weiteres Indiz für diese Hypothese ist die Orientierung der 8 bp langen „FtsK-orienting polar sequences“ (KOPS). KOPS-Sequenzen sind konservierte Sequenzen, die auf dem Chromosom überrepräsentiert sind und ihre Ausrichtung weist sowohl auf dem Leit- als auch auf dem Folgestrang in Richtung des *dif*-Locus. [127, 128] Die in Bakterien hochkonservierte DNA-Translokase FtsK benötigt die KOPS-Sequenzen für die gerichtete Translokation der DNA in Richtung *dif*-Stellen in der Terminusregion. [73, 74] *C. crescentus* verfügt über 965 Wiederholungen des GGGCNGGG-KOPS-Motivs auf dem Leitstrang, aber nur 251 dieser Wiederholungen auf dem Folgestrang. [123] Des Weiteren ist ihre Häufigkeit am Replikationsursprung am geringsten und steigt in Richtung der Terminusregion stark an (Abbildung 11). [123]
Für die Suche nach dem KOPS-Motiv in *H. neptunium* wurde die *C. crescentus* KOPS-Sequenz GGGCNGGG verwendet. Diese Analyse ergab 1332 Sequenzwiederholungen auf dem Leitstrang und 570 auf dem Folgestrang von *H. neptunium*. Die Mehrzahl der KOPS-Sequenzen ist, wie in *C. crescentus*, in Richtung des *dif*-Locus orientiert. Während in *C. cresentus* allerdings eine Anhäufung von KOPS-Sequenzen in der Terminusregion

beobachtet wird, sind diese Motive in *H. neptunium* gleichmäßig über das gesamte Chromosom verteilt.

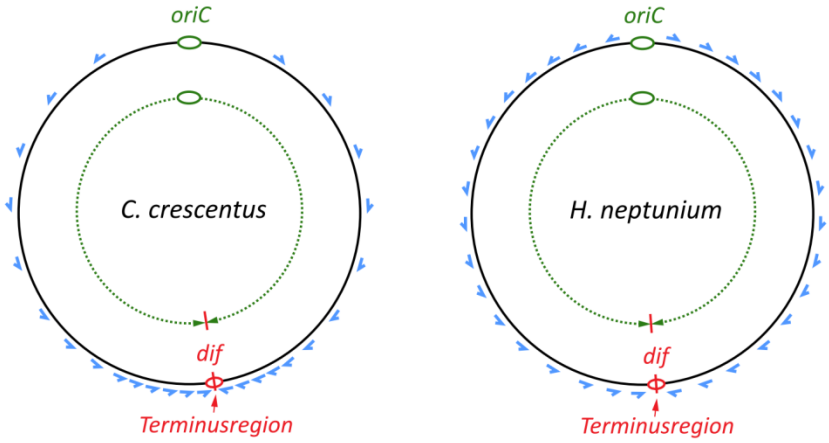


Abbildung 11: Anordnung der KOPS-Sequenzen (FtsK-orienting polar sequences) und der Terminusregion von *C. crescentus* und *H neptunium*. Die Terminusregion befindet sich in direkter Nähe der konservierten *dif*-Stellen (rot) und wurde für *C. crescentus* von Jensen und Kollegen experimentell bestimmt. [123] Die Mehrheit der KOPS-Sequenzen verlaufen bidirektional in Richtung Terminusregion. In *C. crescentus* steigt die Zahl der KOPS-Sequenzen in der Terminusregion stark an, wohingegen die KOPS-Sequenzen von *H. neptunium* gleichmäßig verteilt sind.

Die Anwesenheit der beiden palindromischen *dif*-Stellen (Tabelle 16) in direkter Nähe des zweiten GC-skew-Wechsels und die Orientierung von 1332 KOPS-Sequenzen in Richtung des *dif*-Locus legen den Schluss nahe, dass sich der Terminus in der Nähe des zweiten GC-skew-Wechsels befindet (Abbildung 11). Nachdem sowohl die Ursprungsregion als auch die Terminusregion vorhergesagt wurden, kann mit der Visualisierung der Chromosomensegregation begonnen werden. Die erste zu beantwortende Frage ist, wo die zentromer-ähnliche und die Ursprungsregion in der Zelle lokalisiert sind und in welchen Stadien des Zellzyklus sie segregiert werden.

2.1.3 Experimentelle Bestimmung des *oriC* in *H. neptunium*

Alle bioinformatischen Analysen (2.1.1) weisen darauf hin, dass sich der Replikationsursprung ~570 kb vom GC-skew-Wechsel und dem *parABS*-Operon entfernt befindet. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden zwei Proteine des Replisomes mit einem Fluoreszenzmarker versehen. In *C. crescentus* wurden in früheren Arbeiten HolB (δ-Untereinheit der DNA-Polymerase III, Teil des β-Klammer-Ladekomplexes) und DnaB (DNA-Helikase) mit einem grün fluoreszierenden Protein (GFP) fusioniert und unter Kontrolle ihrer nativen Promotoren exprimiert. Auf diese Weise konnte das Replisom als distinkter Fokus detektiert werden, der sich bei Begin der S-Phase bildete, im Verlauf der Replikation in Richtung Zellmitte wanderte und sich dort auflöste. In beiden Fällen traten keine phänotypischen Veränderungen auf. [129]
In *H. neptunium* war es allerdings nicht möglich, HolB und DnaB, unter ihrem nativen Promotor mit mCherry oder Venus zu fusionieren. Dies lässt vermuten, dass die Fusionsproteine in *H. neptunium* nicht funktionell sind. Aus diesem Grund wurde *holB* und *dnaB* unter dem induzierbaren Promotor P_{2372} C-terminal mit mCherry fusioniert. In beiden Fällen konnte nach sechsstündiger Induktion allerdings nur ein diffuses

zytoplasmatisches Signal, aber keine differenzierbaren Fokusse detektiert werden (Abbildung 12).

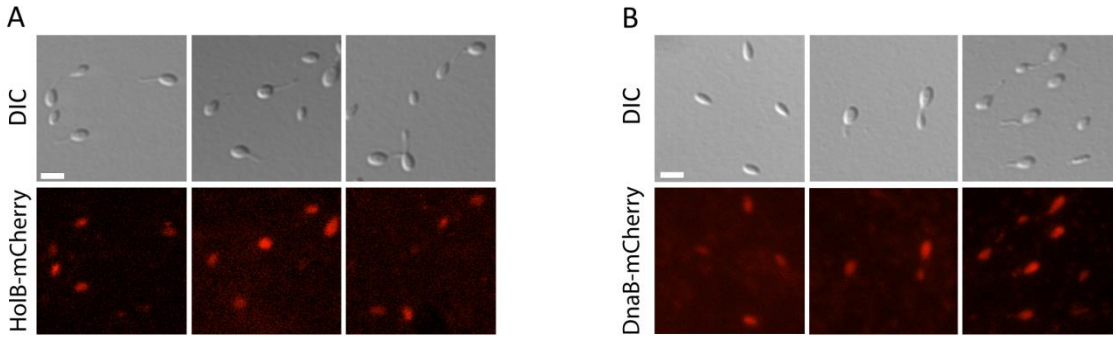


Abbildung 12: Mikroskopische Analyse der Stämme AR 59 und AR62. (A) Hier sind die DIC und Fluoreszenzaufnahmen des Stammes AR 59 (*P_{2372}::P_{2372}-HNE1812-mCherry*) und in (B) die von AR 62 (*P_{2372}::P_{2372}-HNE2164-mCherry*) zu sehen. Die Zellen wurden in MB-Medium angezogen und für 6 h mit 300 µM $ZnSO_4$ induziert, auf ein 1 % Agarosekissen überführt und mikroskopiert. Balken: 2 µm.

Da die direkte Visualisierung des Replisomes nicht möglich war, soll in Zukunft das Einzelstrang-Bindeprotein SSB mit dem Fluoreszenzmarker Venus versehen werden. Der Vorteil von SSB ist, dass es während der Replikation in großer Zahl an die freiwerdenden Einzelstränge bindet aber nicht direkt an der Replikation beteiligt ist. Ferner sind aus früheren Studien in *E. coli* keine negativen Effekte bekannt. [130]
Die ungewöhnliche Anordnung des Replikationsursprungs in *H. neptunium* wirft die Frage auf, welche Region zuerst segregiert wird, die zentromer-ähnliche Region (*parABS*-Operons) oder der Replikationsursprung in der Nähe des *dnaA*-Gens?

2.1.4 Visualisierung der Chromosomensegregation in *H. neptunium*

Aus *C. crescentus* ist bekannt, dass der Replikationsursprung als erstes segregiert wird. [24]
In *C. crescentus* bindet $ParB_{CC}$ an die *$parS_{CC}$*-Stellen und bildet einen Nukleoproteinkomplex aus, der von $ParA_{CC}$ zum gegenüberliegenden Pol transportiert wird (Abbildung 8). [116] Um das Segregationsverhalten von $ParB_{HNE}$ in *H. neptunium* zu analysieren, wurde $ParB_{HNE}$ C-terminal mit dem gelb fluoreszierenden Protein (YFP) markiert und unter Kontrolle des nativen Promotors exprimiert (Abbildung 13).
In Schwärmerzellen lokalisierte das fluoreszenzmarkierte $ParB_{HNE}$ als Fokus an einem der Pole. Die Unterscheidung von Schwärmerzellen und frühen gestielten Zellen ist unter dem Lichtmikroskop schwierig. Als Schwärmerzelle wurde eine Zelle ohne sichtbaren Stiel und mit nur einem $ParB_{HNE}$-YFP-Fokus definiert. Nach kurzer Zeit (Abbildung 13 A 90 min und B 60 min) wurde eine zweites Fluoreszenzsignal sichtbar, das innerhalb von 60 min zum gegenüberliegenden Pol wanderte (Abbildung 13 A 120 min und B 90 min). Während der Segregation der $ParB_{HNE}$-Fokusse in der Mutterzelle begann am Pol gegenüber des ersten ParA*HNE*-Fokus der Stiel zu wachsen.

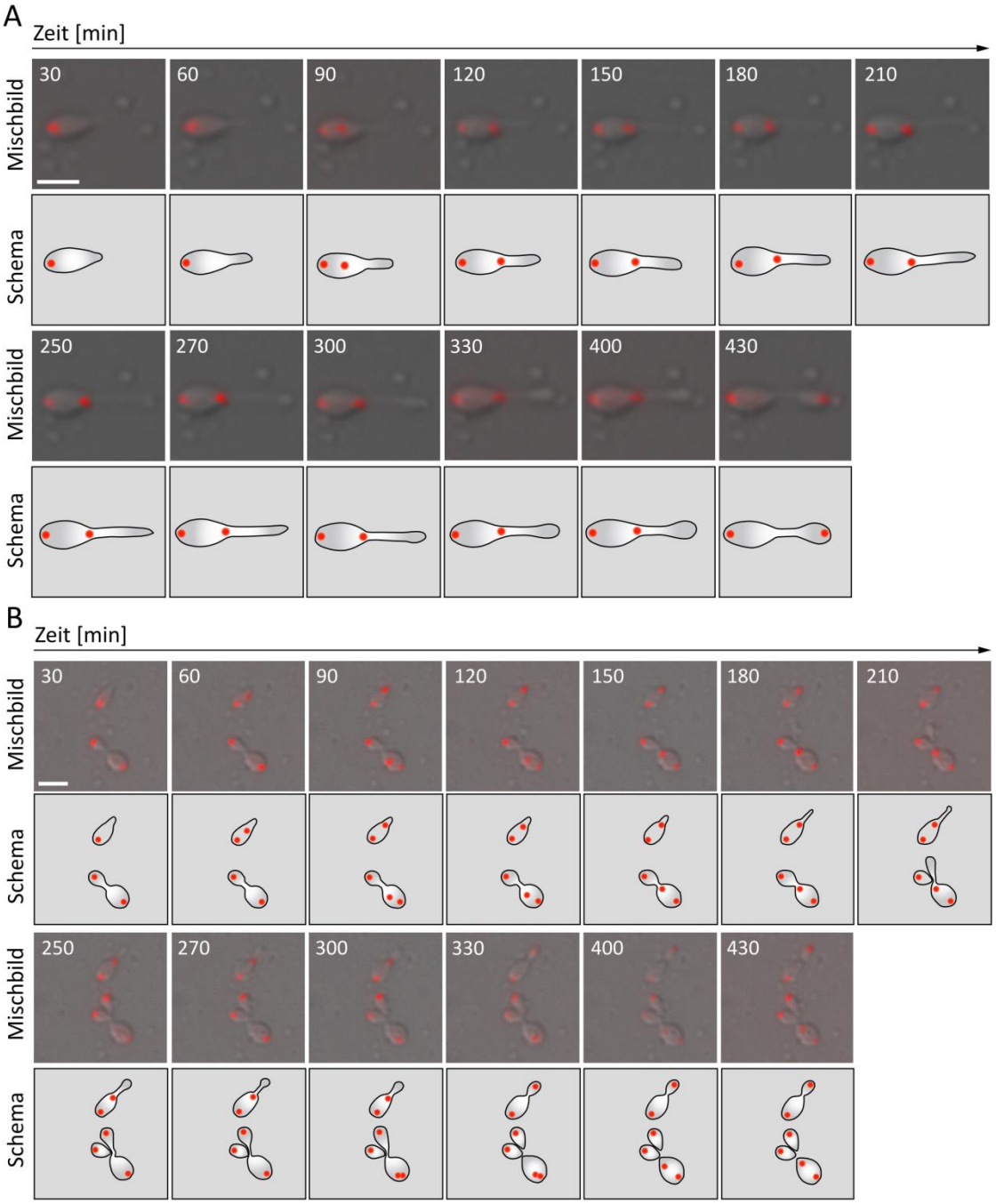


Abbildung 13: Zeitliche Abfolge der Segregation von $ParB_{HNE}$-YFP. (A) Bewegung von $ParB_{HNE}$-YFP in einer repräsentativen Schwärmerzelle. Zellen des Stammes AR 48 (*HNE3560::HNE3560-yfp*) wurden in MB-Medium bis zu einer OD_{600} von ~0,2 angezogen und mit einem Druck von 4 psi für 6 s in eine Durchflusskammer (B04A) eingespült. Der Druck wurde während dem Experiment auf 0,25 psi verringert, um ein Wegspülen der Schwärmerzellen zu verhindern. Balken: 1 µm. (B) Segregation von $ParB_{HNE}$-YFP in einer repräsentativen Schwärmerzelle und einer repräsentativen knospenden Zelle. Die Zellen stammen aus dem gleichen Experiment wie Abbildung A. Balken: 2 µm.

Der $ParB_{HNE}$-Fokus am bestielten Pol verweilte dort für einige Zeit, während der Stiel weiter wuchs (Abbildung 13 A 120 min-400 min und B 90 min-300 min). Erst nach Entwicklung der Knospe bewegt sich der $ParB_{HNE}$-Fokus durch den Stiel in die Knospe und wurde am Pol gegenüber des Stiels immobilisiert (Abbildung 13 A 430 min und B 330 min). Der Segregationsprozess von $ParB_{HNE}$-YFP kann in einer Schwärmerzelle bis zu

sechs Stunden dauern, demgegenüber benötigt eine Stielzelle maximal vier Stunden für die Segregation.
H. neptunium zeigte in vorangegangenen Experimenten Resistenzen gegen die meisten gängigen Antibiotika (Stefanie Wick nicht publiziert, Strobel 2010). Daher stehen für *H. neptunium* im Moment nur Kanamycin und Rifampicin als Selektionsmarker für die Klonierungen zu Verfügung. Die $ParB_{HNE}$-YFP Fusion wurde mittels doppelt homologer Rekombination in das Genom eingebracht (Stamm KH22, Heinrich 2011). Dieses Vorgehen sparte eine Resistenzkasse für die weiteren Untersuchungen und der zweite Rekombinationsschritt entfernte das integrierte Plasmid wieder vollständig aus dem Chromosom von *H. neptunium*. Dieser Stamm zeigte leicht verlängerte Stiele im Vergleich zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt). KH22 wurde als Hintergrundstamm für die Integration des „Fluorescent repressor operator systems“ (FROS) verwendet. Da die Rifampicin- und Kanamycin-Resistenzkassetten für die Integration des *lacO*-arrays und des *lacI-mCherry* benötigt wurden, konnte der morphologisch unbeeinträchtige Stamm AR 48 (*HNE3560::HNE3560-yfp*) nicht verwendet werden.

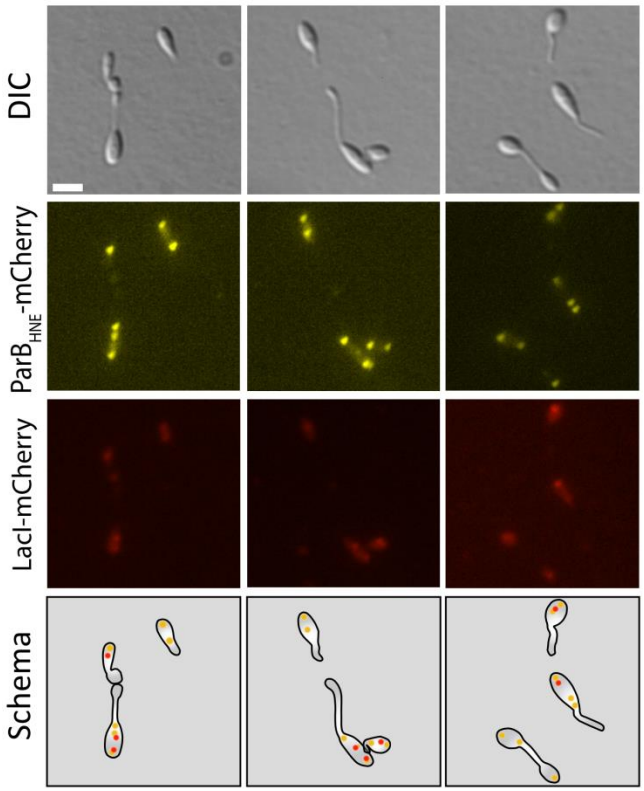


Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von $ParB_{HNE}$-YFP und des FROS-Systems in *H. neptunium.* Die Zellen des Stammes KH24 ($P_{HNE2372}$*::lacI-mCherry; lacO*-array integriert an Position 55°, *HNE3560-yfp*) wurden in MB-Medium mit 200 µM IPTG für 2 Tage angezogen, mit MB-Medium + 200µM IPTG auf eine OD_{600}~0,1 verdünnt, für 6 h mit 300 µM $ZnSO_4$ induziert und auf ein 1% Agarosekissen überführt. Balken: 2 µm.

Das FROS-System besteht aus zwei Komponenten, zum einen dem LacI-Repressor, des *lac*-Operons aus *E. coli* und zum anderen einer Aneinanderreihung von etwa 250 Wiederholungen der *lacO*-Bindestellen. Der LacI-Repressor wurde an mCherry fusioniert und unter Kontrolle des zink-induzierbaren Promotors $P_{HNE2372}$ exprimiert. Die Synthese des LacI-Repressors verstärkte den morphologischen Effekt, der verlängerten Stiele von KH22 (*HNE3560::HNE3560-yfp*), leicht. Durch die Zugabe von geringen Konzentrationen

an IPTG wurde versucht, den Phänotyp zu verringern, da dies nicht gelang ist davon auszugehen, dass die Synthese der LacI-mCherry Fusion das Wachstum von *H. neptunium* beeinflusst (Abbildung 14). Durch die C-terminale Fusion eines etwa 2000 bp langen DNA-Fragments aus dem *H. neptunium* Chromosom an den *lacO*-array kann das Plasmid mit den *lacO*-Bindestellen an jede beliebige Position im Chromosom integriert werden.
Um die Frage zu beantworten, welche Ursprungsregion zuerst segregiert wird, wurde das *lacO*-Plasmid etwa 10 kb (KH24, Position 55°) und 30 kb (KH25, Position 54°) stromabwärts des *dnaA*-Gens integriert. [131]
Durch die zusätzliche Integration der *lacO*-Bindestellen wurde der zuvor beobachtete Phänotyp, der verlängerten Stiele verstärkt und es kam zur Anhäufung von mehr als zwei $ParB_{HNE}$-YFP-Fokussen in Mutterzellen (Abbildung 14).
So wiesen Zellen, die mehrere Teilungen absolviert hatten stark verlängerte Stiele auf und die Zellkörper der Mutterzellen zeigten außerdem einen vergrößerten Durchmesser. Die Morphologie der Schwärmerzellen war jedoch unverändert und ließ daher eine Analyse der Chromosomensegregation zu.

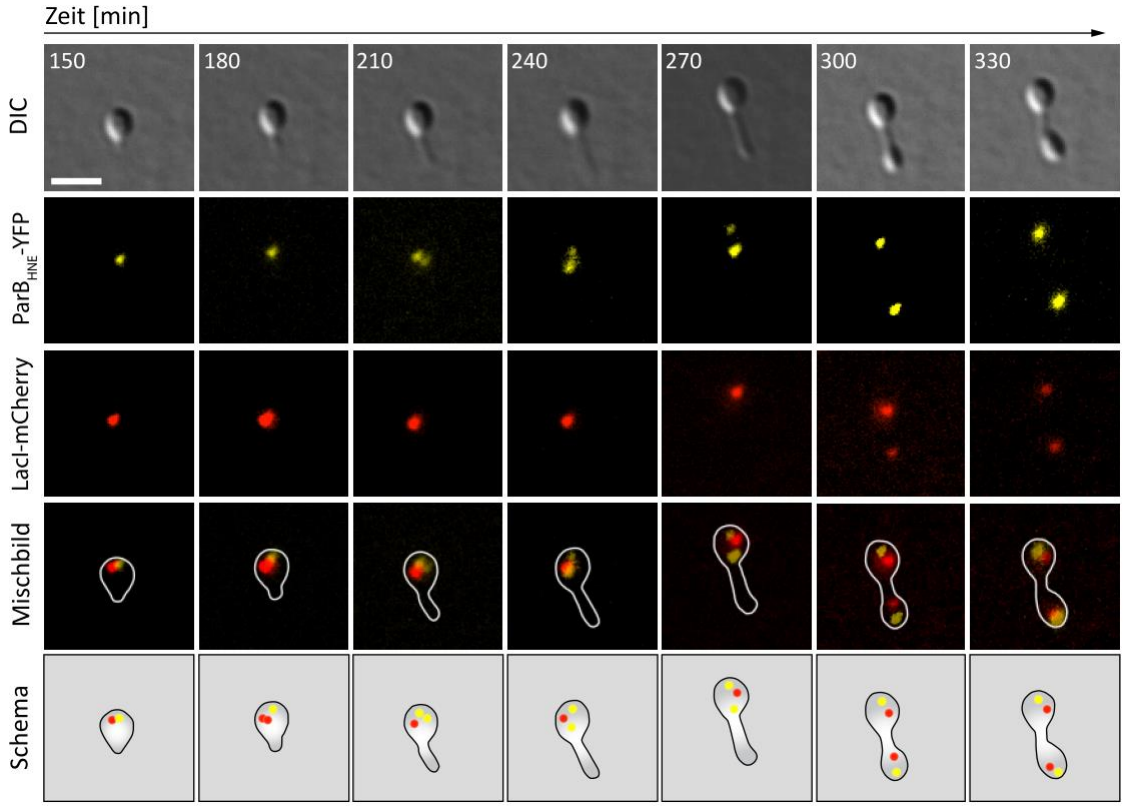


Abbildung 15: Integration des FROS-Systems und $ParB_{HNE}$-YFP in *H. neptunium*. Die Abbildung zeigt die zeitliche Abfolge der Segregation von $ParB_{HNE}$-YFP und des FROS-Systems in einer Zelle des Stammes KH24 ($P_{HNE2372}$*::lacI-mCherry; lacO*-array integriert an Position 55°, *HNE3560-yfp*). Die Zellen wurden mit MB-Medium bis zur einer OD_{600} von ~0,3 angezogen, für 6 h mit 300 µM $ZnSO_4$ induziert und auf ein 1% Agarosekissen überführt. Für die mikroskopische Langzeitanalyse wurde das Agarosekissen mit VLAP versiegelt, um die Austrocknung zu verhindern. Balken: 2 µm.

In Schwärmerzellen lokalisierte $ParB_{HNE}$-YFP am flagellierten Pol. Nach einer Stunde wurde ein weiteres $ParB_{HNE}$-YFP-Signal sichtbar und bewegte sich innerhalb einer weiteren Stunde zu diesem Pol (Abbildung 15, 210 - 270 min). Sowohl die $ParB_{HNE}$-YFP-Fokusse als auch das FROS-Signal verharrten in dieser Position bis die Knospe deutlich zu

sehen war (Abbildung 15, 270 min und Abbildung 16, 30 min – 60 min). Nun segregierte der $ParB_{HNE}$-YFP-Fokus vom gestielten Pol zum flagellierten Pol der Knospe (Abbildung 15, 300 min und Abbildung 16, 90 min). Anschließend wanderte das FROS-Signal innerhalb einer Stunde in die Knospe und nahm dort die gleiche Position wie in der Mutterzelle ein (Abbildung 15, 300 – 330 min und Abbildung 16, 90 – 120 min).

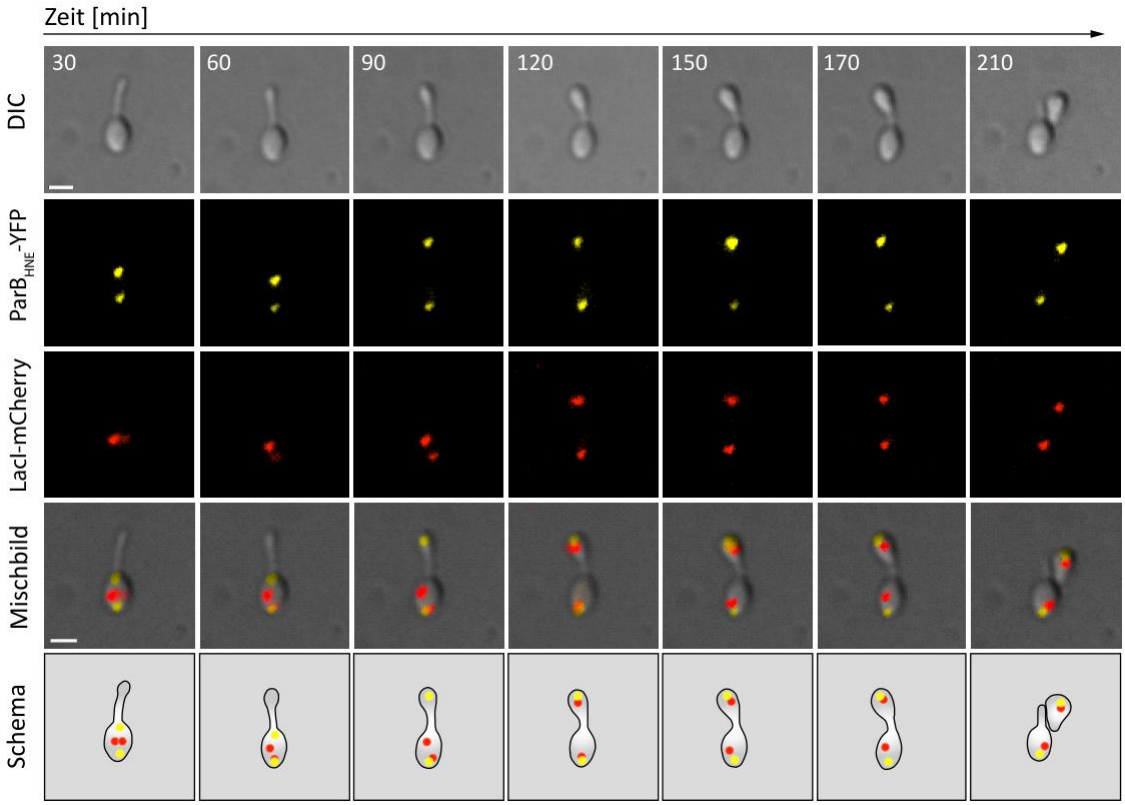


Abbildung 16: Mikroskopische Aufnahme von $ParB_{HNE}$-YFP und des FROS-Systems im Stamm KH25 ($P_{HNE2372\text{-}RBS3}$*::lacI-mCherry; lacO*-array integriert an Position 54°, *HNE3560-yfp*). Die Zellen wurden mit MB-Medium bis zur einer OD_{600} von ~0,3 angezogen, für 6 h mit 300 µM $ZnSO_4$ induziert und auf ein 1% Agarosekissen überführt. Für die mikroskopische Langzeitanalyse wurde das Agarosekissen mit VLAP versiegelt, um die Austrocknung zu verhindern. Balken: 1 µm.

Mit diesen Experimenten konnte ein erster Hinweis erbracht werden, dass die zentromer-ähnliche *parS*-Region in der Nähe des GC-skews vor dem Replikationsursprung (*dnaA*-Gen) segregiert wird. Im Folgenden wird zwischen der zentromer-ähnliche Region und dem Replikationsursprung unterschieden.

Auf Grund der morphologischen Veränderungen, die die Integration des FROS-Systems in *H. neptunium* verursachte (Abbildung 14) und um auszuschließen, dass die beobachteten Dynamiken ein Artefakt waren, wurde nach einem alternativen System zur *in vivo*-Lokalisation der Chromosomensegregation gesucht. Die Wahl fiel dabei auf das Plasmid-Segregationssystem des Virulenzplasmids pMT1 aus *Yersinia pestis,* welches zum Typs Ia gehört und dem Segregationssystem des gut charakterisierten P1-Plasmids aus *E. coli* sehr ähnlich ist. [132]
Das $ParB_{Yp}$-Protein dieses Systems war in früheren Arbeiten so modifiziert worden, dass es zwar noch in der Lage war, an seine und die *parS*-Stellen des mini-P1 Plasmids zu binden, aber einen dominant negativen Effekt auf die Weitergabe des mini-P1 Plasmids hatte. [133] Da eine GFP-$ParB_{Yp}$ Fusion nicht in der Lage ist, DNA zu segregieren, aber an die

entsprechenden *parS*$_{Yp}$-Stellen binden kann, ist dieses System dazu geeignet, die Position chromosomaler DNA zu visualisieren. [133, 134]
Um eine Kreuzreaktion mit den parS-Stellen von *H. neptunium* zu vermeiden wurde zunächst überprüft, ob die *parS*-Stellen von pMT1 eine Übereinstimmung mit den *parS*-Stellen aus *H. neptunium* aufweisen. Die Analyse ergab, dass die *parS*-Stellen keine Ähnlichkeit besitzen und somit nicht mit dem endogenen *parABS*-System von *H. neptunium* interferieren.
Wie zuvor bei dem FROS-System wurde das DNA-Bindeprotein ParB aus *Yersinia pestis* N-terminal mit dem rot-fluoreszierenden Protein mCherry fusioniert und unter dem zink-induzierbaren Promotor P_{2372} in *H. neptunium* produziert. Die Expression wurde mittels Western Blot-Analyse überprüft. Diese zeigte, dass der Promotor bereits ohne Zugabe von Induktor eine relativ starke basale Expression des Gens erlaubte (Abbildung 17 B). Weder diese basale Expression noch die spätere Induktion des mCherry-ParB$_{Yp}$-Proteins beeinflusste das Wachstum oder die Morphologie der Zellen (Abbildung 17 A und Abbildung 18 A, C). Des Weiteren konnte kein distinktes mCherry-Signal detektiert werden, was darauf hindeutet, dass ParB$_{Yp}$ nicht an die *parS*-Stellen von *H. neptunium* bindet.

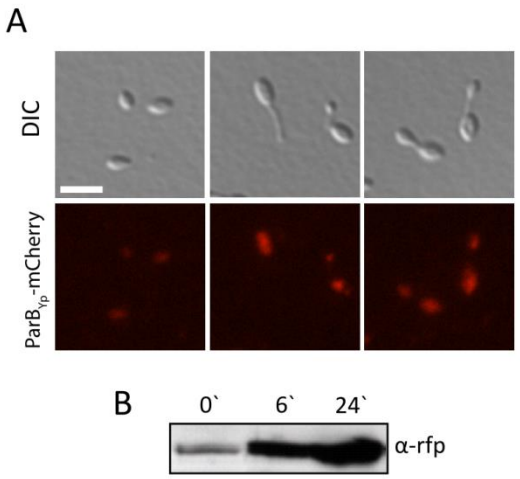


Abbildung 17: Produktion von ParB aus *Yersinia pestis* (ParB$_{Yp}$) in *H. neptunium*. (A) Mikroskopische Analyse der Lokalisation von mCherry-ParBYp. Eine exponentiell wachsende Kultur des Stammes AR58 (*P$_{2372}$::P$_{2372}$-mCherry-parB$_{Yp}$*) wurden in MB-Medium für 6 h mit 300 µM $ZnSO_4$ inkubiert, um die Synthese von mCherry-ParB$_{Yp}$ zu induzieren und anschließend mittels DIC- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. (B) Immunoblot-Analyse des unter A beschriebenen Stammes. Eine Probe der Kultur wurde vor der Induktion der Expression von *mCherry-parB$_{Yp}$*, sowie 6 h und 24 h danach entnommen und mittels anti-RFP Antiserum analysiert. Balken: 2 µm.

Das nächste Ziel war es in den Stamm AR 58 (*P$_{2372}$::P$_{2372}$-mCherry-parB$_{Yp}$*) die *parS*$_{Yp}$-Stellen (94 bp, [132]) aus *Y. pestis* zu integrieren (Abbildung 18 B). Die *parS*$_{Yp}$-Stellen wurden etwa 40 kb von der zentromer-ähnlichen Region (Position 355°, Abbildung 18 B) durch einfach homologe Rekombination in das Chromosom von *H. neptunium* integriert und die Lokalisation mittels Zeitrafferaufnahmen analysiert (Abbildung 18 A).
Das mCherry-ParB$_{Yp}$ lokalisiert, wie das ParB$_{HNE}$-YFP Protein, am flagellierten Pol. Nach der Replikation und während die Stielsynthese voranschritt, bewegte sich einer der mCherry-ParB$_{Yp}$-Komplexe zum entgegengesetzten Pol (Abbildung 18 A). Dort verharrte er, bis die Knospe gut sichtbar war und segregierte anschließend in der Tochterzelle zum flagellierten Pol (Abbildung 18 B).

Das *parBS*$_{Yp}$-System von *Y. pestis* hatte weder auf das Wachstum noch auf die Morphologie von *H. neptunium* Zellen einen Einfluss (Abbildung 18). Aus diesem Grund wird dieses System für alle weiteren Lokalisationsstudien verwendet werden.

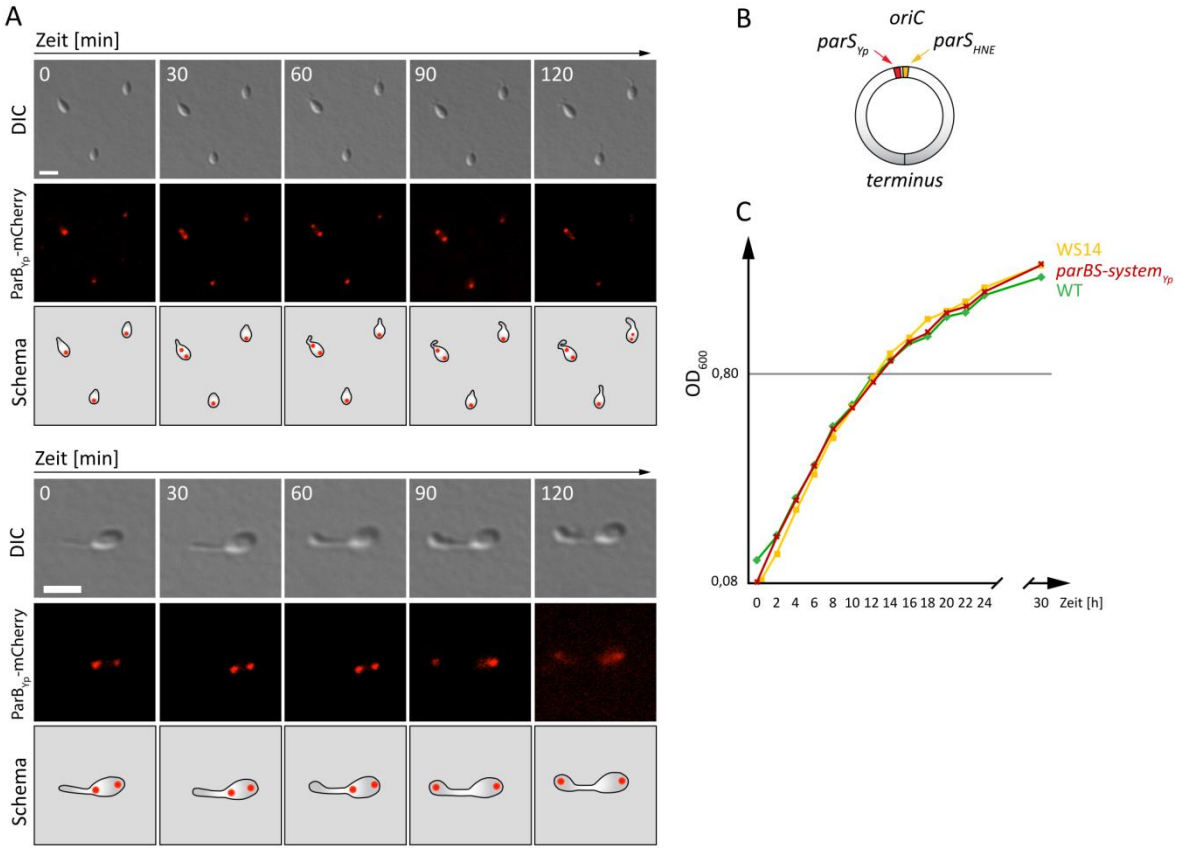


Abbildung 18: Integration des Plasmid-Segregationssystems aus *Y. pestis* in *H. neptunium.* (A) Lokalisation des mCherry-ParB$_{Yp}$-Signals im Stamm AR61 (*P$_{2372}$::P$_{2372}$-mCherry-parB$_{Yp}$ HNE_3531::HNE_3531-parS$_{Yp}$)* Zu sehen ist eine repräsentative Schwärmerzelle (oberer Teil) und eine knospende Zelle (unterer Teil). Die Zellen wurden in MB-Medium gezogen und 6 h mit 300 µM $ZnSO_4$ induziert. (B) Schematische Darstellung der chromosomalen Position der *parS$_{HNE}$*-Stellen (gelb) und die Integrationsstelle der *parS$_{Yp}$*-Stellen aus *Y. pestis* (rot). (C) Wachstumskurve des Stammes AR61 (*P$_{2372}$::P$_{2372}$-mCherry-parB$_{Yp}$) HNE_3531::HNE_3531-parS$_{Yp}$)* aus drei unabhängigen Wachstumsreihen im Vergleich zum Wildtyp-Stamm (WT) und dem WS14 Kontrollstamm, der keinen Biofilm bilden kann. Balken: 1 µm.

2.2 Welche Proteine sind an der Chromosomensegregation beteiligt?

Viele Bakterien verwenden Homologe des *parABS*-Systems, um ihre Ursprungsregion zu segregieren. Durch die Identifikation der zentromer-ähnlichen Region ist bekannt, dass *H. neptunium* mindestens ein ParA-Homolog besitzt (HNE3561). ParA-Homologe benötigen um korrekt zu funktionieren DNA als Interaktionspartner. [117, 82] Da sich im Stiel von *H. neptunium* zum Zeitpunkt der Segregation des ParB/*parS*-Komplexes keine DNA befindet, lässt dies auf einen zweiten Segregationsmechanismus schließen, der den Transport durch den Stiel ausführt. Um festzustellen, ob *H. neptunium* weitere ParA-Homologe besitzt, wurde eine BLAST-Analyse mit der ParA-Aminosäuresequenz von *C. crescentus* gegen das Proteom von *H. neptunium* durchgeführt. Die Untersuchung

ergab, dass *H. neptunium* über insgesamt sechs ParA-Homologe verfügt. Die sechs Homologe wurden von Daniela Kiekebusch in einen phylogenetischen Baum eingerechnet (Abbildung 19, D. Kiekebusch, nicht publiziert). Die phylogenetische Analyse zeigt, dass alle ParA-Homologe in die Superfamilie von Mrp/MinD P-loop-ATPasen gehören. Die Mitglieder dieser Superfamilie erfüllen eine Vielzahl von Aufgaben. So sind sie zum Beispiel an der Positionierung des Chromosoms (ParA/Soj), der Regulation des FtsZ-Rings (MinD), der Stickstofffixierung (NifH), der Arsenregulation (ArsA) und der Flagellenregulierung (FlgG) beteiligt. [135]

H. neptunium besitzt mit HNE0468 ein Mitglied aus der MotR Familie. Aus *Pseudomonas aeroginosa* ist bekannt, dass Homologe dieser Unterfamilie an der Flagellen-Biosynthese beteiligt sind. [136] Da HNE0943 nicht über das konservierte KGGxGKxT Walker A Motiv verfügt, dass für die Bindung von ATP und die Dimerbildung benötigt wird, ist es unwahrscheinlich, dass es an der Chromosomensegregation beteiligt ist und wird daher in den folgenden Untersuchungen nicht weiter berücksichtigt.

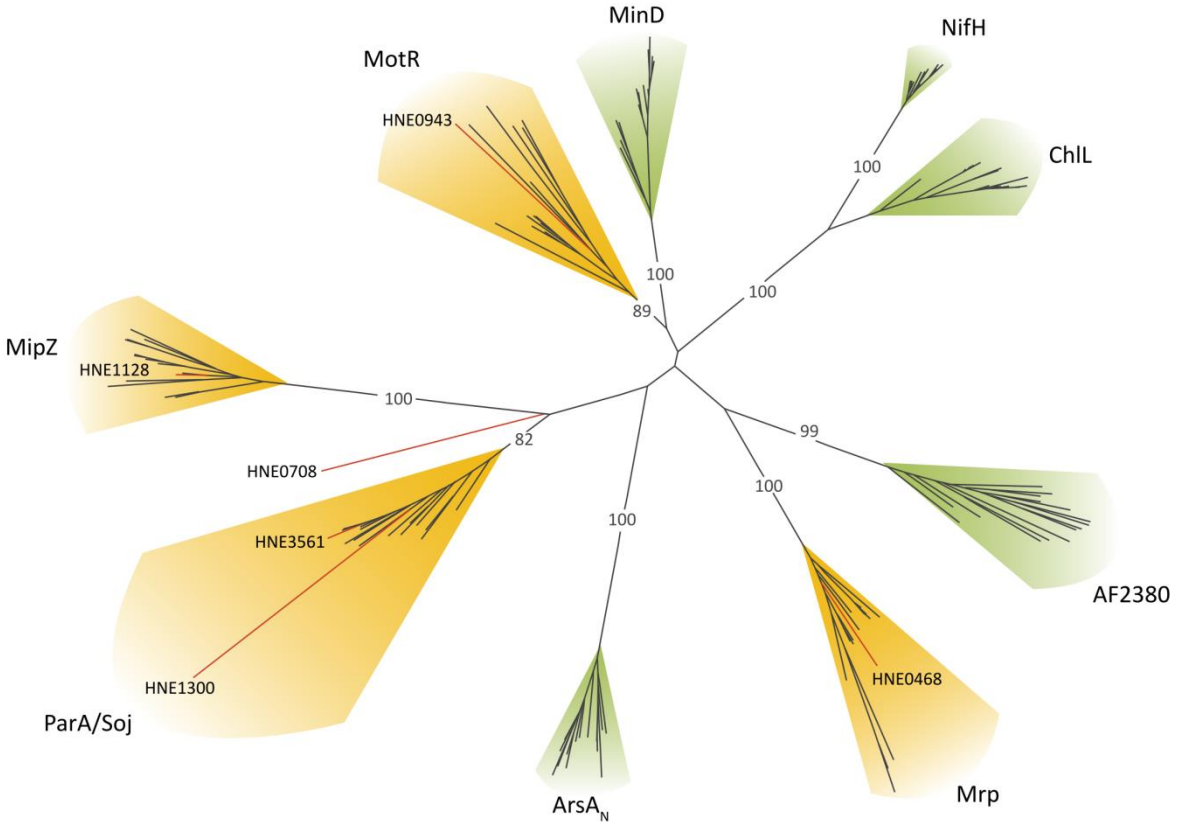


Abbildung 19: Phylogenetische Eingruppierung der ParA-Homologe von *H. neptunium*. Es sind alle neun Unterfamilien der Mrp/Soj Superfamilie dargestellt. Unterfamilien, in denen mindestens ein ParA-Homolog identifiziert wurde sich gelb unterlegt. Zusätzlich wurden die ParA-Homologe von *H. neptunium* mit roten Linien hervorgehoben. Unterfamilien, welche kein Homolog aufwiesen sind grün unterlegt Proteinsequenzen von 15 Vertretern jeder Unterfamilie wurden für die Erstellung eines Alignments mittels MAFFT v6 [137] herangezogen. Die phylogenetische Analyse erfolgte mittels der Maximum Likelihood (ML)-Methode unter Zuhilfenahme des RaxML-Programms [138] und einer anschließenden Darstellung des Baums mit Hilfe von iTOL. [139] Die Zahlen stellen Bootstrap-Werte zur statistischen Unterstützung der Knoten dar. Eine Analyse mittels der Neighbor Joining (NJ)-Methode unterstützt den hier dargestellten Baum (modifiziert nach Kiekebusch 2011 [140]).

HNE0468 wurde in die Mrp/MBP35 Unterfamilie eingruppiert. Die Mitglieder dieser Familie sind in vielen Organismen am Aufbau von FeS-Clustern beteiligt [141, 142] daher wird auch HNE0468 hier keiner weiteren Analyse unterzogen.
In dieser Arbeit werden die drei Homologe der ParA/Soj und MipZ Unterfamilie sowie HNE0708, das zwischen diesen beiden Familien eingruppiert wurde, näher charakterisiert. Bei ihnen besteht eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass sie an der Chromosomensegregation beteiligt sind.
HNE3561 ($ParA_{HNE}$) lokalisiert zusammen mit *gidA, gidB* und *parB* im *parABS*-Operon in der Nähe des GC-skews (Abbildung 10). In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass $ParB_{HNE}$ an die wahrscheinlich an die zentromer-ähnliche Region bindet und als erstes segregiert wird (Abbildung 13). Wie Eingangs schon erwähnt, ist aus vielen anderen Bakterien bekannt, dass ParB und ParA miteinander interagieren. [81, 80, 117, 143] Aus diesem Grund ist eine Beteiligung von $ParA_{HNE}$ am Segregationsprozess wahrscheinlich. Der chromosomale Zusammenhang und die funktionellen Domänen von $ParA_{HNE}$ und $ParA_{Cc}$ (ParA aus *C. crescentus*) sind stark konserviert, was ein weiterer Hinweis auf eine ähnliche Funktion ist (Abbildung 20).

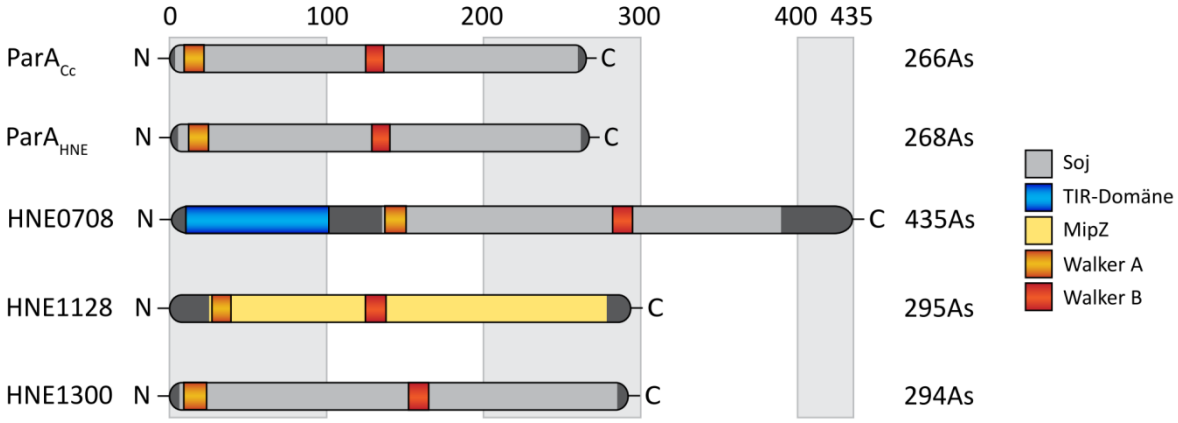


Abbildung 20: Vergleich der funktionellen Domänen von ParA aus *C. cresentus* mit den ParA/Soj, dem MipZ und dem HNE0708 Homolog aus *H. neptunium*. Zu sehen sind ParA aus *C. crescentus* (AAB51267.1), HNE3561 (YP_762232.1), HNE0708 (YP_759436.1), HNE1128 (YP_759848.1) und HNE1300 (YP_760018.1). Die Position der Soj/ParA-Domänen ist in hellgrau, die Walker A-Region in orange, die Walker B-Region in rot, die MipZ-Domäne in gelb und die TIR-Domäne in blau dargestellt.

HNE0708 und *HNE1128* (*mipZ*) sind sogenannte „orphan" ParA-Homologe, da sie von einem einzelnen offenen Leserahmen kodiert werden. *HNE0708* hat im Gegensatz zu den anderen ParA-Homologen einen langen N-terminalen Bereich mit einer TIR-Domäne. TIR-Domänen sind in anderen Bakterien für Protein-Protein Interaktion verantwortlich. [144] *HNE1300* wird zusammen mit dem *H. neptunium*-spezifischen Gen *HNE1299* kodiert. Die Anordnung in einem mutmaßlichen Operon legt den Schluss nahe, dass die beiden Proteine am gleichen Prozess beteiligt sind. Aus diesem Grund wird HNE1299 ebenfalls charakterisiert.

2.2.1 Charakterisierung von HNE0708

HNE0708 besitzt als einziges ParA-Homolog in *H. neptunium* einen verlängerten N-terminalen Bereich mit einer TIR-Domäne, die wahrscheinlich für eine Protein-Protein Interaktion verantwortlich ist. Für die initiale Charakterisierung von HNE0708 wurde es C-terminal mit Venus fusioniert und unter dem zink-induzierbaren Promotor P_{2372} in *H. neptunium* exprimiert. Die HNE0708-Venus Fusion wies ein diffuses zytoplasmatisches Signal auf und bildete im Stiel ein abwechselndes Muster aus stärkeren und schwächeren Lokalisationen (Abbildung 21 B). Das Fusionsprotein hatte keinen Einfluss auf die Wachstumsrate, zeigte aber in Stielzellen und knospenden Zellen einen morphologischen Defekt, der sich in verlängerten und zum Teil dünnen Stielen äußerte (Abbildung 21 B). Um die abnorme Morphologie der Stiele näher zu untersuchen wurden vom Stamm AR 37 (*P_{2372}::P_{2372}-HNE0708-venus*) Cryo-EM Aufnahmen von Yi-Wei Chang am „California Institute of Technology“ angefertigt. Abbildung 21 C zeigt, dass der dünne Stiel eine Verdickung aufwies, die mit dem Lichtmikroskop nicht sichtbar war. In dieser Verdickung akkumulierte sich DNA (Abbildung 21 C).
Da wir zurzeit noch nicht über replizierende Plasmide verfügen, wurde eine Überexpression von HNE0708 erstellt, indem HNE0708 unter die Kontrolle des P_{2372} Promotors gestellt wurde. Zusammen mit dem Wildtyp-Expressionslevels von HNE0708 wird HNE0708 wahrscheinlich überproduziert. Bereits sechs Stunden nach der Induktion von HNE0708 konnten verlängerte Stiele beobachtet werden, die zum Teil sehr dünn waren (Abbildung 21 D). Nach 24 h war die morphologische Veränderung durch die Überproduktion von HNE0708 nicht mehr von denen des Stammes AR 37 (*P_{2372}::P_{2372}-HNE0708-venus*) zu unterscheiden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse legen nahe, dass HNE0708 eine Funktion bei der Erhaltung der Stielstabilität oder Stielbiogenese besitzt.

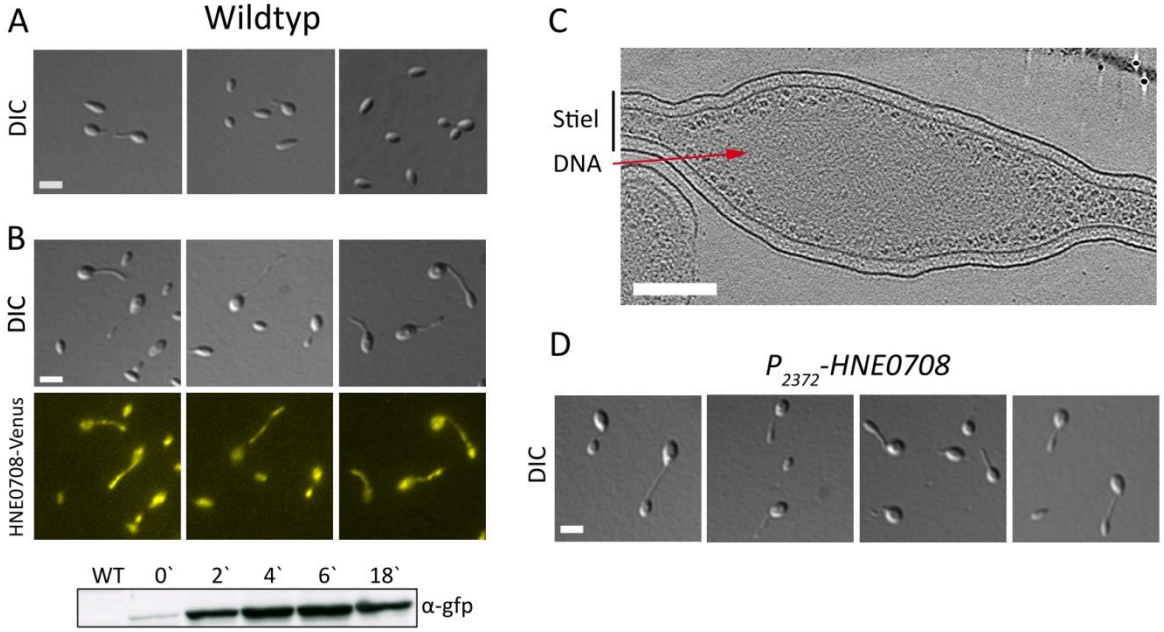


Abbildung 21: Mikroskopische Aufnahme des Wildtyp und die Lokalisation von HNE0708-Venus. (A) DIC Aufnahmen des Wildtyp-Kontrollstammes ATCC15444. Die Zellen wurden über Nacht in MB-Medium inkubiert, anschließend verdünnt und bis zu einer OD_{600} ~0,3 propagiert, auf ein 1 % Agarosekissen überführt und mikroskopiert. Balken: 2 µm. (B) Mikroskopische Aufnahme des Stammes AR 37 (*P_{2372}::P_{2372}-HNE0708-venus*). Oben sind die DIC-Aufnahmen und unten die Fluoreszenzaufnahmen von *HNE0708-venus* dargestellt. Die Zellen wurden in MB-Medium angezogen und für 6 h mit 300 µM $ZnSO_4$ induziert, auf ein

1 % Agarosekissen überführt und mikroskopiert. Balken: 2 µm. Immunoblot-Analyse des unter B beschriebenen Experiments. Eine Probe der Kultur wurde vor der Induktion der Expression von HNE0708-Venus, sowie 2 h, 4 h, 6 h und 18 h danach entnommen und mittels anti-GFP Antiserum analysiert (C) Cryo EM Aufnahme des Stammes AR 37 (*P_{2372}::P_{2372}-HNE0708-venus*) Der Ausschnitt zeigt den Stiel einer repräsentativen Zelle. Der rote Pfeil deutet auf eine DNA-Akkumulation im Stiel. Balken: 200 nm. (D) Expression von HNE0708 unter dem induzierbaren Promoter P_{2372}. Zu sehen sind Zellen einer logarithmisch wachsenden Kultur (OD_{600}~0,3) des Stammes AR 44 (*P_{2372}::P_{2372}-HNE0708*) nach 6 h Induktion mit 300 µM $ZnSO_4$. Die Zellen wurden in MB-Medium kultiviert. Balken: 1 µm.

Zur weiteren Charakterisierung von HNE0708 wurde eine Deletionsmutante mit Hilfe es Derivats der pNPTS138 Plasmid hergestellt. Die Schwärmerzellen der Deletionsmutante waren signifikant länger als die der Wildtyp-Kontrollgruppe ($p<0,01$). Bei einigen Stielzellen konnte man stark verlängerte Stiele beobachten, die an ihren Enden Bläschen bildeten (Abbildung 22 A). Diese Verdickung wurde auch bei knospenden Zellen beobachtet, wobei es bei diesen Zellen den Anschein hatte, dass die Teilungsebene nicht mehr korrekt positioniert werden konnte (Abbildung 26). Eine statistische Auswertung war weder für die Stielzellen noch die knospenden Zellen der Deletion möglich, da beide Gruppen anders als der Wildtyp keine Normalverteilung aufweisen. Die Normalverteilung ist eine Voraussetzung für einen robusten t-test. Die Wachstumsgeschwindigkeit wurde durch die Deletion von HNE0708 nicht beeinflusst (Abbildung 22 B).
Von der HNE0708-Venus-Fusion ist bekannt, dass die DNA-Segregation durch den Stiel beeinträchtigt ist und sich DNA im Stiel anstaut (Abbildung 21 C). Da die Deletion von HNE0708 einen ähnlichen morphologischen Effekt hat (Abbildung 22 A), wurde mittels einer DAPI-Färbung untersucht, ob auch hier DNA-Akkumulationen im Stiel zu finden sind. In 22 % der Stiele von knospenden Zellen konnten DNA-Akkumulationen visualisiert werden (Abbildung 23 A). In Wildtyp-Zellen staute sich keine DNA in den Stielen an. Diese Beobachtung wurde durch eine Cryo-EM Aufnahme des Stammes AR 48 (*ΔHNE0708*) bestätigt (Abbildung 23 B).

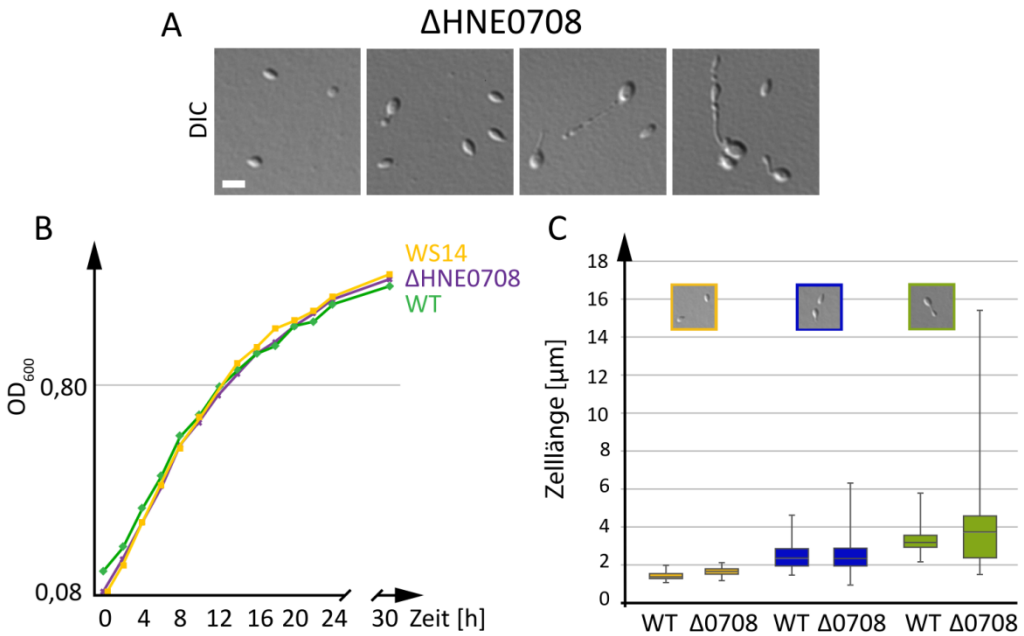


Abbildung 22: Analyse der Deletionsmutante von HNE0708. (A) DIC Aufnahmen des Stammes AR 46 (ΔHNE0708). Die Zellen wurden in MB-Medium bis zu einer OD_{600}~0,3 inkubiert, auf ein 1% Agarosekissen überführt und mikroskopisch analysiert. Balken: 2 µm. (B) Wachstumskurve des Stammes AR 46 (ΔHNE0708) aus drei unabhängigen Wachstumsreihen im Vergleich zum Wildtyp-Stamm (WT) und WS14

(bildet keinen Biofilm). (C) Boxblot der unterschiedlichen Zelllängen von Wildtyp und AR 46 (ΔHNE0708). Wildtyp: Schwärmerzellen n=173, Stielzellen n=154, knospende Zellen n=51. AR 46 (ΔHNE0708): Schwärmerzellen n=106, Stielzellen n=166, knospende Zellen n=108.

Des Weiteren zeigten die Cryo-EM-Aufnahmen, dass sich auch Ribosomen in diesen Ausstülpungen befinden, was einen Hinweis auf Transkriptionsprozesse im Stiel gibt.
Die erneute Beobachtung sehr dünner Stiele durch die Deletion von HNE0708 und die zusätzliche Bildung von Bläschen an den Stielspitzen unterstützten die Hypothese, HNE0708 eine wichtige Rolle für die Stielstabilität und Stielbiogenese spielt.

Die DNA-Ansammlungen in den Stielen deuten darauf hin, dass das Entfernen von HNE0708 einen negativen Effekt auf die Chromosomensegregation hat. Um das DNA-Segregationsverhalten dieses Stammes zu visualisieren wurde, eine $ParB_{HNE}$-YFP-Fusion (Stamm AR 53: *ΔHNE0708, HNE3560::HNE3560-yfp*) im nativen Gen-Lokus von $parB_{HNE}$ integriert. In Schwärmerzellen verlangsamte sich die Segregation der $ParB_{HNE}$-YFP-Fokusse im Mutterzellkörper. Im Wildtyp benötigt der ParB/*parS*-Komplex maximal eine Stunde, um zwei Fokusse an beiden Polen auszubilden, während es in der HNE0708 Deletion bis zu zwei Stunden dauerte (Abbildung 13 und Abbildung 24, 30 – 120 min). Am gestielten Pol angelangt, verharrte der $ParB_{HNE}$-YFP-Fokus, bis die Knospe etwa auf ein Drittel der Mutterzelle angewachsen war und segregierte dann in weniger als 30 min in die Knospe (Abbildung 24, 240 – 270 min). Dort positionierte sich der $ParB_{HNE}$-YFP-Fokus am flagellierten Pol (Abbildung 24, 270 min).

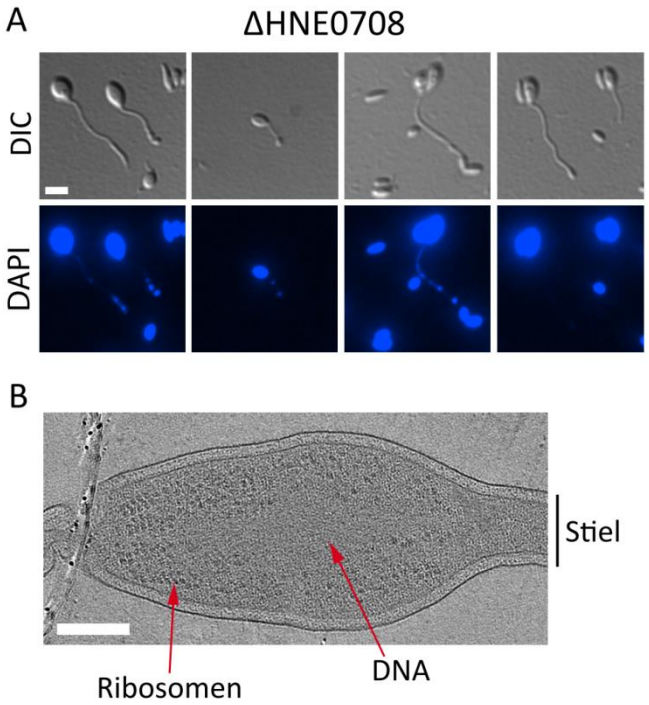


Abbildung 23: DAPI Färbung und Cryo-EM Aufnahme der HNE0708 Deletion. (A) Die obere Reihe zeigt die DIC-, die untere die Fluoreszenzaufnahmen des AR 46 (*ΔHNE0708*) Stammes. Die Zellen wurden in MB-Medium angezogen bis zu einer OD_{600} von ~0,3 angezogen, für 30 min mit DAPI gefärbt, auf ein 1% Agarosekissen überführt und mikroskopiert. Balken: 2 µm. (B) Cryo EM Aufnahme des Stammes AR 46 (*ΔHNE0708*). Der Ausschnitt zeigt den Stiel einer repräsentativen Zelle. Die roten Pfeile deuten auf eine Ansammlung von Ribosomen sowie eine DNA-Akkumulation im Stiel. Balken: 200 nm.

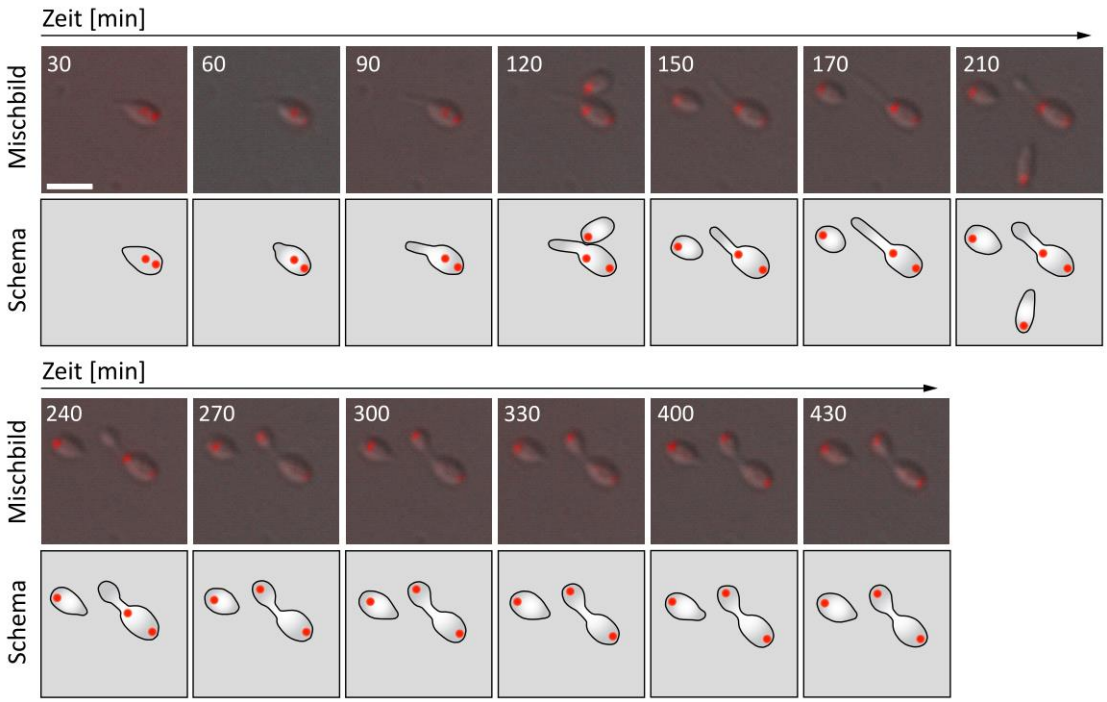


Abbildung 24: Lokalisation von $ParB_{HNE}$-YFP im HNE0708 Deletionshintergrund. Im oberen Bereich wird die Überlagerung von DIC- und Fluoreszenz-Signal gezeigt, im unteren eine schematische Darstellung der Lokalisation von $ParB_{HNE}$-YFP in einer repräsentativen Schwärmerzelle des Stammes AR 53 (*ΔHNE0708, HNE3560::HNE3560-yfp*). Das Schema dient der Verdeutlichung, der Lokalisation. Die Zellen wurden in MB-Medium angezogen und mit einem Druck von 4 psi für 6 s in die Durchflusskammer (B04A) eingespült. Der Druck wurde während dem Experiment auf 0,25 psi reduziert um ein wegspülen der Schwärmerzellen zu verhindern. Balken: 2 µm.

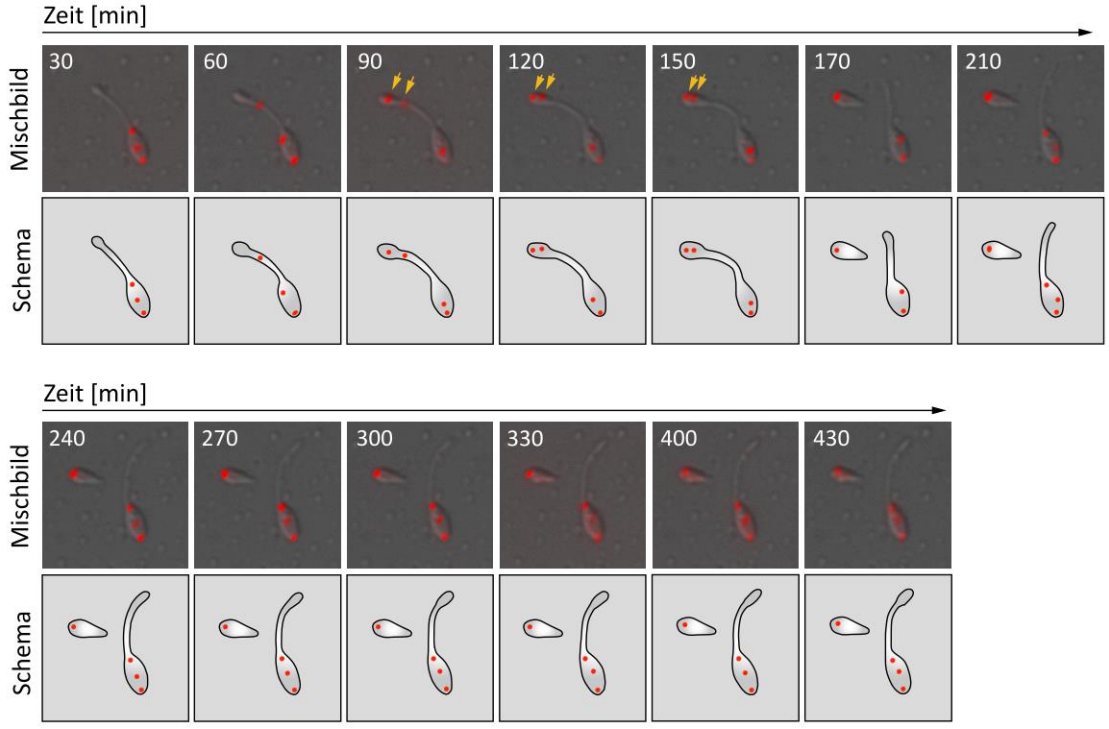


Abbildung 25: Lokalisation von $ParB_{HNE}$-YFP in der HNE0708 Deletionsmutante. Die obere Reihe zeigt eine Überlagerung von DIC und Fluoreszenzbildern einer repräsentativen Stielzelle des Stammes AR 53 (*ΔHNE0708, HNE3560::HNE3560-yfp*) und die untere Reihe eine schematische Darstellung. Die gelben Pfeile deuten auf die Segregation von zwei $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplexen hin. Die Zellen wurden in MB-Medium

angezogen und mit einem Druck von 4 psi für 6 s in die Durchflusskammer (B04A) eingespült. Der Druck wurde während dem Experiment auf 0,25 psi verringert um ein wegspülen der Schwärmerzellen zu verhindern. Balken: 2 µm.

In gestielten Zellen konnten bis zu vier Fokusse in den Mutterzellen beobachtet werden. Abbildung 25 zeigt eine repräsentative Stielzelle mit drei $ParB_{HNE}$-Fokussen in der Mutterzelle. Der Fokus am gestielten Pol wird innerhalb von 30 min durch den Stiel segregiert wobei ihm ein zweiter Fokus folgt (Abbildung 25, 60 – 90 min, gelbe Pfeile). Die Signale beider $ParB_{HNE}$-Fokusse überlappen nach 60 min am flagellierten Pol (Abbildung 25, 170 min) und eine Unterscheidung zwischen den zwei segregierten Chromosomen ist nicht mehr möglich (Abbildung 25, 170 – 430 min). Nach Abspaltung der Tochterzelle besitzt die Mutterzelle zunächst zwei $ParB_{HNE}$-Fokusse, von denen einer Richtung Stiel segregiert. Nach weiteren 30 min ist wieder ein dritter Fokus in der Zellmitte zu erkennen (Abbildung 25, 210 min). Dies deutet auf eine regelmäßige Hyperinitiation hin.
Knospende Zellen verfügen in vielen Fällen über mehrere $ParB_{HNE}$-Signale in den Mutterzellen (Abbildung 26). In einer repräsentativen knospenden Zelle ist zunächst ein $ParB_{HNE}$-YFP-Signal am ungestielten Pol der Mutterzelle und einer am flagellierten Pol der Tochterzelle zu sehen. Diese Lokalisation zeigt sich kurz von der Teilung eine Zelle (Abbildung 13 und Abbildung 26, 30 min). Diese Zelle verlängert ihren Stiel weiterhin und startet eine neue Replikationsrunde, bevor die Tochterzelle abgeschnürt wurde (Abbildung 26, 60 – 90 min). Die Tochterzelle ihrerseits beginnt ebenfalls einen Zellzyklus und segregiert einen $ParB_{HNE}$-YFP-Fokus in den Stiel, der daraufhin anschwillt und mehrere Bläschen bildet (Abbildung 26, 120 min-210 min). Der $ParB_{HNE}$-Fokus der Tochterzelle wandert weiter in den Stiel, erreicht aber nie das Ende der Ausstülpungen und wandert schließlich ein Stück zurück in Richtung der Tochterzelle (Abbildung 26, 400 min).
Diese Beobachtung in Zellen, die schon mehrere Zellteilungen durchlaufen haben, deutet darauf hin, dass HNE0708 auch an der korrekten Knospenentwicklung oder der Abschnürung beteiligt ist.

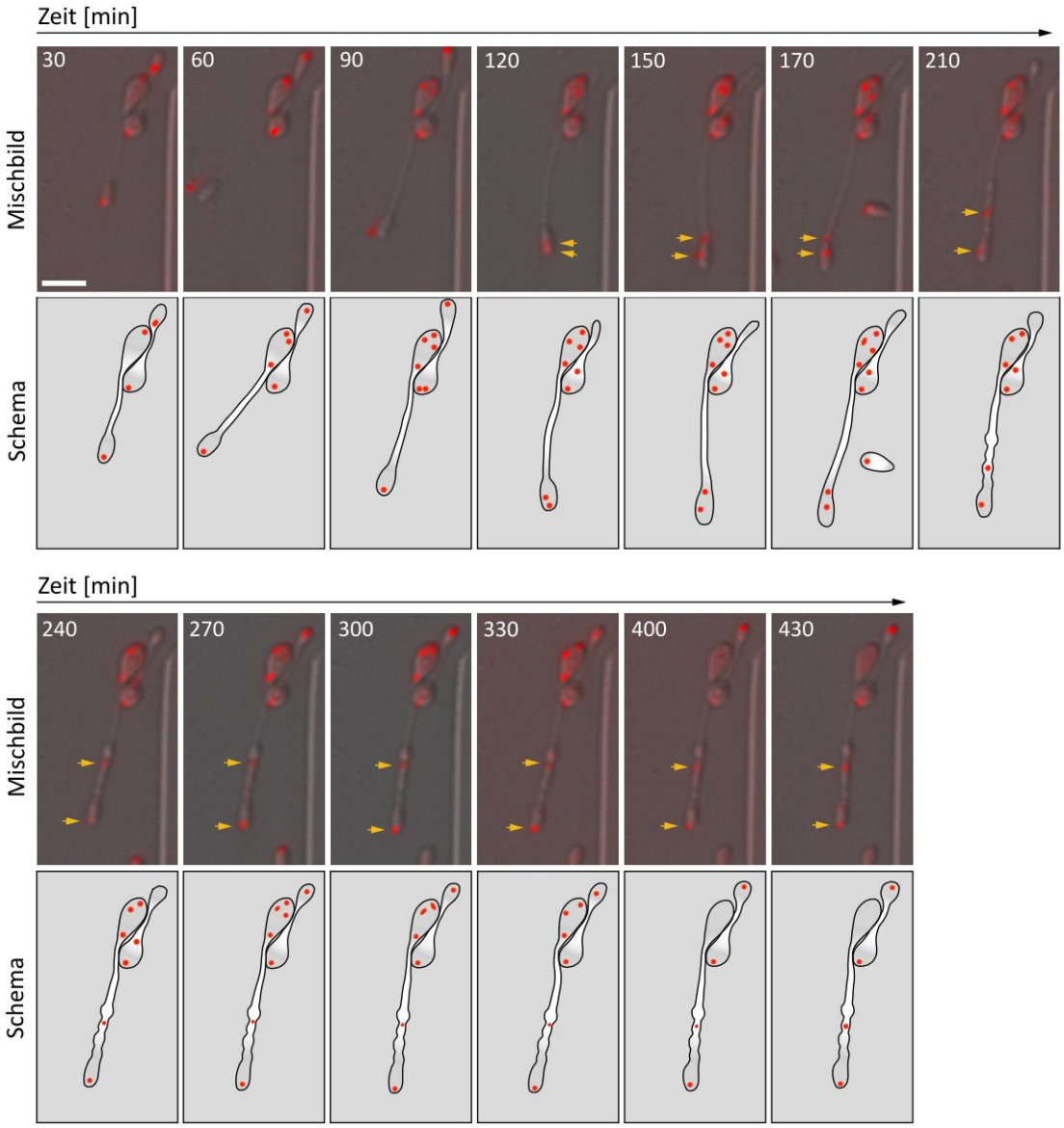
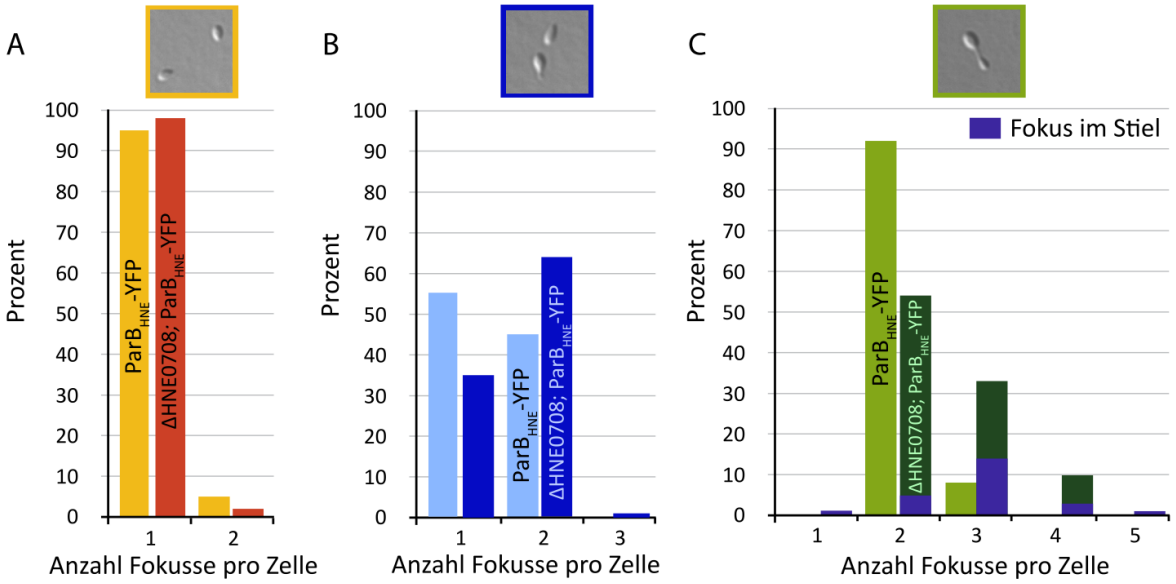


Abbildung 26: Zeitlicher und räumlicher Ablauf der $ParB_{HNE}$-YFP-Lokalisation im Stamm AR 53 (*ΔHNE0708, HNE3560::HNE3560-yfp*). Die Abbildung zeigt eine repräsentative knospende Zelle. Die gelben Pfeile markieren eine $ParB_{HNE}$-YFP Segregation der Tochterzelle in den Stiel der Mutterzelle. Die Zellen des Stammes AR 53 wurden in MB-Medium angezogen und mit einem Druck von 4 psi für 6 s in die Durchflusskammer (B04A) eingespült. Der Druck wurde während dem Experiment auf 0,25 psi verringert um ein wegspülen der Schwärmerzellen zu verhindern. Balken: 2 µm.



D

	Anzahl Zellen	
	AR 48	AR 53
Schwärmerzellen	175	46
Stielzellen	178	80
knospende Zellen	50	87

Abbildung 27: Anzahl der ParB$_{HNE}$-Fokusse in Schwärmer- Stiel- und knospenden Zellen. Es wurde die Anzahl der ParB$_{HNE}$-YFP-Signale in den Stämmen AR 48 hier Kontrollstamm (*HNE3560::HNE3560-yfp*) und AR 53 (*ΔHNE0708, HNE3560::HNE3560-yfp*) in (A) Schwärmerzellen, (B) Stielzellen und (C) knospenden Zellen verglichen. Des Weiteren wurden in (C) auch ParB$_{HNE}$-YFP-Signale im Stiel dargestellt. Die Zellen wurden in MB-Medium angezogen und mit einem Druck von 4 psi für 6 s in die Durchflusskammer (B04A) eingespült. Der Druck wurde während dem Experiment auf 0,25 psi verringert um ein wegspülen der Schwärmerzellen zu verhindern. Es handelt sich bei diesen Zellen um Zellen aus dem gleichen Experiment wie in *Abbildung 24*, *Abbildung 25* und *Abbildung 26* Anzahl der ausgezählten Zellen des Stammes AR48 (*HNE3560::HNE3560-yfp*) und AR53 (*ΔHNE0708, HNE3560::HNE3560-yfp*).

Abbildung 27 zeigt die quantitative Analyse der ParB$_{HNE}$-YFP-Fokusse in der HNE0708 Deletionsmutante im Vergleich zum Kontrollstamm (AR 48 *HNE3560::HNE3560-yfp*). In Schwärmer- und Stielzellen konnte kein Unterschied zwischen der Deletion von HNE0708 und dem Kontrollstamm beobachtet werden (Abbildung 27 A, B).
Unterschiede zwischen Kontrollstamm und Deletionsmutante wurden allerdings in knospenden Zellen deutlich. Drüber hinaus besitzen die knospenden Zellen der Deletionsmutante bis zu fünf sichbare Fokusse (Abbildung 27 C). In 28 % aller knospenden Zellen befand sich mindestens ein ParB$_{HNE}$-YFP-Fokus im Stiel. Diese Lokalisation konnte im Wildtyp nicht beobachtet werden. Die Lokalisation von ParB$_{HNE}$-YFP im Stiel unterstützt die These, dass HNE0708 eine wichtige Rolle bei der Chromosomensegregation oder der Initiation spielt. Ob HNE0708 direkt oder indirekt an der Segregation und der Initiation beteiligt ist müssen weiter Experimente zeigen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Deletion von HNE0708 mehrere Effekte hervorruft. Erstens kommt es zu einer Hyperinitiation der Replikation, zweitens akkumuliert DNA während der Segregation im Stiel, drittens wird die zentromer-ähnliche Region während eines Zellzyklus mehrfach durch den Stiel transportiert und viertens starten die Tochterzellen ihre Replikation und Segregation, obwohl sie noch über den Stiel mit der Mutterzelle verbunden sind.

2.2.2 Untersuchung des MipZ-Homologes HNE1128

Wie zuvor erwähnt, ist HNE1128 ($MipZ_{HNE}$) das MipZ-Homolog von *H. neptunium*. In dem nahe verwandten *C. crescentus* ist $MipZ_{Cc}$ ein essentielles Protein, das für die korrekte Positionierung des Z-Rings verantwortlich ist. [114] Die Modifikation des Proteinlevels von $MipZ_{Cc}$ hat verheerende Auswirkungen auf das Wachstum und die Morphologie der Zellen. Wird $MipZ_{Cc}$ zum Beispiel ausgedünnt, verschiebt sich die Teilungsebene in Richtung des flagellierten Pols und es entstehen Minizellen, während eine Überexpression zum sofortigen Stopp der Zellteilung und zur Ausbildung von filamentösen Zellen führt. [114]

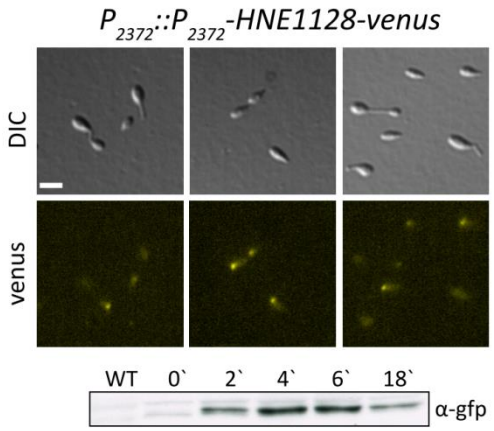


Abbildung 28: Lokalisation von HNE1128-Venus. Die obere Reihe zeigt die DIC Aufnahmen während die untere das Venus-Signal zeigt. Die Zellen des Stammes AR 36 (*P_{2372}::P_{2372}-HNE1128-venus*) wurden in MB-Medium bis zu einer OD_{600}~0,3 angezogen, für 6 h mit 300 µM $ZnSO_4$ induziert, auf 1 % Agarosekissen überführt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Das Proteinlevel von HNE1128-Venus wurde mittels Western Blot überprüft. Balken: 1 µm.

Für eine nähere Charakterisierung wurde das Fusionsprotein $MipZ_{HNE}$ -Venus unter dem zink-induzierbaren Promotor P_{2372} in *H. neptunium* exprimiert (Abbildung 28). Das Signal blieb nach sechs stündiger Induktion sehr schwach und $MipZ_{HNE}$-Venus-Lokalisationen konnten nur in 40% alle Zellen detektiert werde. In Schwärmerzellen lokalisiert das Signal an einem Pol. In gestielten Zellen war nur ein diffuses zytoplasmatisches Signal zu erkennen, wohingegen in knospenden Zellen wieder ein Signal am Pol gegenüber des Stiels beobachtet werden konnte. Dieses Lokalisationsmuster legt eine zumindest zeitweise Kolokalisation mit $ParB_{HNE}$ an den Polen nahe. Eine Überprüfung dieser Hypothese war auf Grund der Schwäche des $MipZ_{HNE}$-Venus-Signals nicht möglich.
Um einen detaillierteren Einblick in die Funktion von $MipZ_{HNE}$ zu erhalten, wurde eine Deletionsmutante angefertigt. Die Längenmessung der knospenden Zellen ergab einen signifikanten Unterschied ($p<0,01$) der Mittelwerte von Wildtyp und Deletionsmutante (Abbildung 29 C). Für die Schwärmer- und Stielzellenpopulationen konnten keine Signifikantstest berechnet werden, da die gemessenen Zellen der Deletion keine Normalverteilung aufwiesen, die für diese Berechnungen Voraussetzung war. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass sie einen signifikanten Unterschied zeigen würden, da sich die mittleren 50% (gelbe und blaue Boxen) der Wildtyp und der $MipZ_{HNE}$ Schwärmer- und Stielzellen fast vollständig überlappen. Weiterhin gab es weder in den oberen noch den unteren 25% starke Ausreißer (Abbildung 29 C).

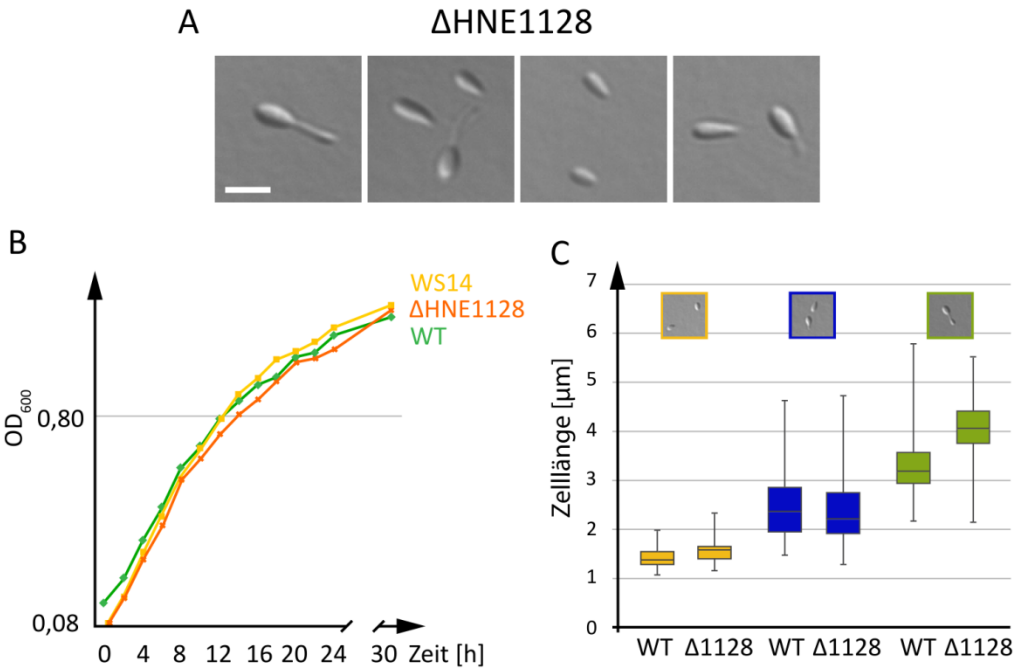


Abbildung 29: Deletion von $MipZ_{HNE}$. (A) Mikroskopische Untersuchung des Stammes AR 31 (*ΔHNE1128*). Die Zellen wurden in MB-Medium bis zum Erreichen der stationären Phase inkubiert, auf eine OD_{600}~0,1 verdünnt und bei einer OD_{600}~0,3 mikroskopiert. Balken:2 µm. (B) Wachstumskurve aus drei unabhängigen Experimenten. Die Zellen wurden in MB-Medium angezogen, auf eine optische Dichte von 0,1 verdünnt und alle 2 h wurde photometrisch die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. (C) Boxblot der unterschiedlichen Zelllängen von Wildtyp und AR 31 (*ΔHNE1128*). Wildtyp: Schwärmerzellen n=173, Stielzellen n=154, knospende Zellen n=51. AR31 (*ΔHNE1128*): Schwärmerzellen n=43, Stielzellen n=111, knospende Zellen n=31.

Da der Wildtyp von *H. neptunium* einen starken Biofilm bildet, der die genaue Ermittlung der optischen Dichte nicht ermöglicht, wurde als zusätzlicher Kontrollstamm, der biofilmloses WS14 (*ΔhfsB)* verwendet (Abbildung 29 B). Die Biofilmbildung wurde durch die Inkubation der Zellen, in Schikanekolben weiter verzögert. Dieses Vorgehen verhinderte, dass der Wildtyp in den ersten 30 Stunden einen Biofilm bildete, der die Messungen beeinflusst hätte. Die Deletionsmutante zeigte keinen Wachstumsunterschied im Vergleich zum Wildtyps oder zum Kontrollstammes WS14 (Abbildung 29 B).
Der verlängerte Stiel der knospenden $MipZ_{HNE}$ Deletionszellen könnte auch eine verzögerte Zellteilung hindeuten. Allerdings spielt $MipZ_{HNE}$ keine so entscheidende Rolle für den Zellzyklus, wie in *C. crescentus*. Sollte $MipZ_{HNE}$ an der Regulation von FtsZ beteiligt sein, so existiert in *H. neptunium* mindestens ein weiteres redundantes System.

2.2.3 Das HNE1300-HNE1299 Operon

HNE1300 ist ein ParA/Soj-Homolog mit einer Länge von 294 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 32 kDa. Der Annotation von Badger und Kollegen nach wird es zusammen mit HNE1299 in einem Operon kodiert. [7] Bisher konnten keine Homologe zu HNE1299 in anderen Spezies identifiziert werden. Ferner konnten keine konservierten Domänen in HNE1299 ermittelt werden. Es war auch nicht möglich, konservierte Domänen zu ermitteln. Für die Charakterisierung wurden beide Proteine C-terminal mit dem gelb-fluoreszierenden Protein Venus fusioniert und unter dem zink-induzierbaren Promotor P_{2372} in *H. neptunium* produziert (Abbildung 30). HNE1300 zeigte ein schwaches, diffuses zytoplasmatisches Signal, welches in manchen Zellen auch schwach im Stiel lokalisierte. Das Fluoreszenzsignal von HNE1299 war ebenfalls schwach, zytoplasmatisch und diffus, wobei die geringe Leuchtkraft auf die schwache Expression des Fusionsproteins zurückgeführt werden konnte (Abbildung 30). Um weitere Informationen über HNE1300 und HNE1299 zu erhalten, wurden die entsprechenden Gene entfernt und die Stämme anschließend auf morphologische Veränderungen hin untersucht.

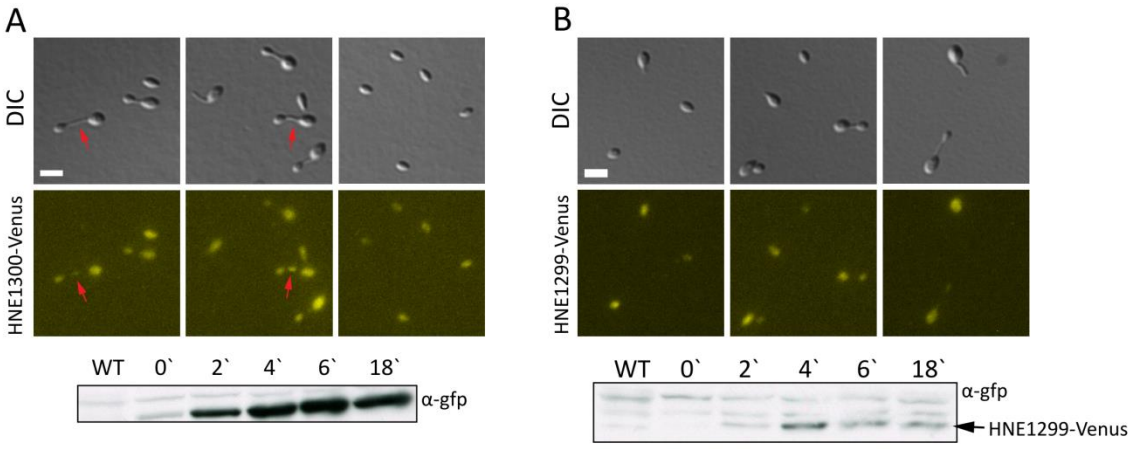


Abbildung 30: Lokalisation des ParA-Homologes HNE1300 und des *H. neptunium*-spezifischen Proteins HNE1299. (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Stammes AR 40 (P_{2372}::P_{2372}-*HNE1300-venus*). Die roten Pfeile deuten auf Lokalisationen im Stiel. Analyse des Proteinlevels mittels Western Blot. (B) Mikroskopische Aufnahme des Stammes AR 35 (P_{2372}::P_{2372}-*HNE1299-venus*) und Überprüfung des Proteinlevels von HNE1299-Venus mittels Western Blot. Die Zellen der Stämme AR 40 und AR 35 wurden mit MB-Medium angezogen, für 6 h mit 300 µM $ZnSO_4$ induziert, auf 1 % Agarosekissen überführt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Balken: 1 µm.

Die Schwärmerzellen der Deletion von HNE1300 zeigten einen signifikanten Unterschied ($p<0,01$) des Mittelwert im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 31 C). Beim Vergleich der Stielzellen konnte dagegen kein signifikanter Unterschied ($p>0,172$) der Mittelwerte bestimmt werden. Die knospenden Zellen konnten statistisch nicht analysiert werden, da die Zellen der HNE1300 Deletion keine Normalverteilung aufwiesen. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Deletionsmutante wurde durch die größeren Schwärmerzellen nicht beeinflusst (Abbildung 31 B). Auch die Schwärmerzellen der HNE1299 Deletion wiesen signifikant verlängerte Zellkörper auf ($p>0,01$; Abbildung 32 B). Die knospenden und die Stielzellen konnten nicht verglichen werden, da sie nicht der Normalverteilung unterlagen. Auf welche Weise die Deletionen von HNE1300 und HNE1299 die verlängerten Schwärmerzellen hervorrufen, ist unbekannt. Weder die

Deletion noch die Fluoreszenzfusion deuten auf eine Beteiligung der beiden Proteine an der Chromosomensegregation hin, weswegen sie keiner weiteren Untersuchung unterzogen werden.

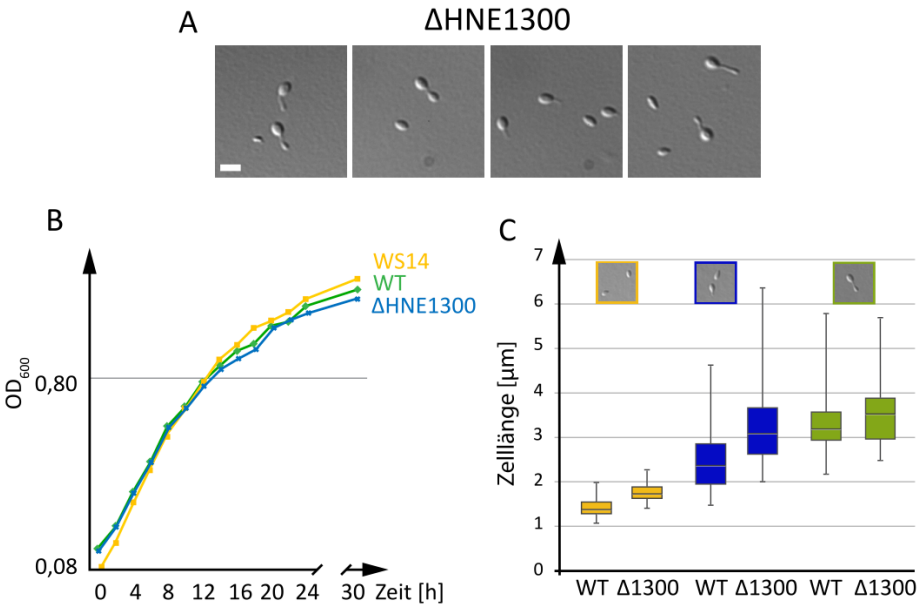


Abbildung 31: Analyse der Deletion des ParA-Homologes HNE1300. (A) Die Zellen des Stammes AR 24 (*ΔHNE1300*) wurden inMB-Medium bis zu einer optischen Dichte von ~0,25 inkubiert, auf ein 1% Agarosekissen überführt und mikroskopisch analysiert. Balken: 1 µm. (B) Wachstumskurve der Stämme ATCC15444 (Wildtyp), WS 14 (*ΔhfsB*) und AR 24 (*ΔHNE1300*) aus drei unabhängigen Experimenten. Die Zellen wurden in MB-Medium angezogen, auf eine optische Dichte von 0,1 verdünnt und alle 2 h wurde photometrisch die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. (C) Boxblot der unterschiedlichen Zelllängen von Wildtyp und AR 24 (*ΔHNE1300*). Wildtyp: Schwärmerzellen n=173, Stielzellen n=154, knospende Zellen n=51. AR 24 (*ΔHNE1300*): Schwärmerzellen n=54, Stielzellen n=41, knospende Zellen n=32.

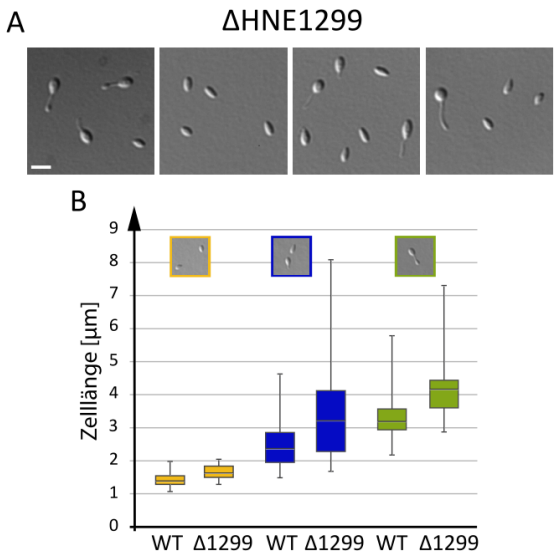


Abbildung 32: Deletion des *H. neptunium*-spezifischen Proteins HNE1299. (A) Die Zellen des Stammes AR 27 (*ΔHNE1299*) wurden mit MB-Medium bis zu einer optischen Dichte von ~0,25 inkubiert, auf ein 1 % Agarosekissen überführt und mikroskopisch analysiert. Balken: 1 µm. (B) Boxblot der unterschiedlichen Zelllängen von Wildtyp und AR 27 (*ΔHNE1299*). Wildtyp: Schwärmerzellen n=173, Stielzellen n=154, knospende Zellen n=51. AR 27 (*ΔHNE1299*): Schwärmerzellen n=40, Stielzellen n=62, knospende Zellen n=35.

2.2.4 Untersuchung des ParA-Homologes HNE3561

Das ParA/Soj-Homolog HNE3561 ($ParA_{HNE}$) ist ein 268 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von ~30 kDa, das zusammen mit *gidA, gidB* und *parB* im *parABS*-Operon kodiert ist. Zur näheren Charakterisierung wurde $ParA_{HNE}$ C-terminal mit Venus fusioniert und unter dem zink-induzierbaren Promotor P_{2372} in *H. neptunium* produziert. Das Fluoreszenzsignal lokalisiert in Schwärmerzellen an einem oder an beiden Polen als Fokus (Abbildung 33 und Abbildung 34 A). Diese Lokalisationsmuster gleicht dem von $ParB_{HNE}$ (Abbildung 13).

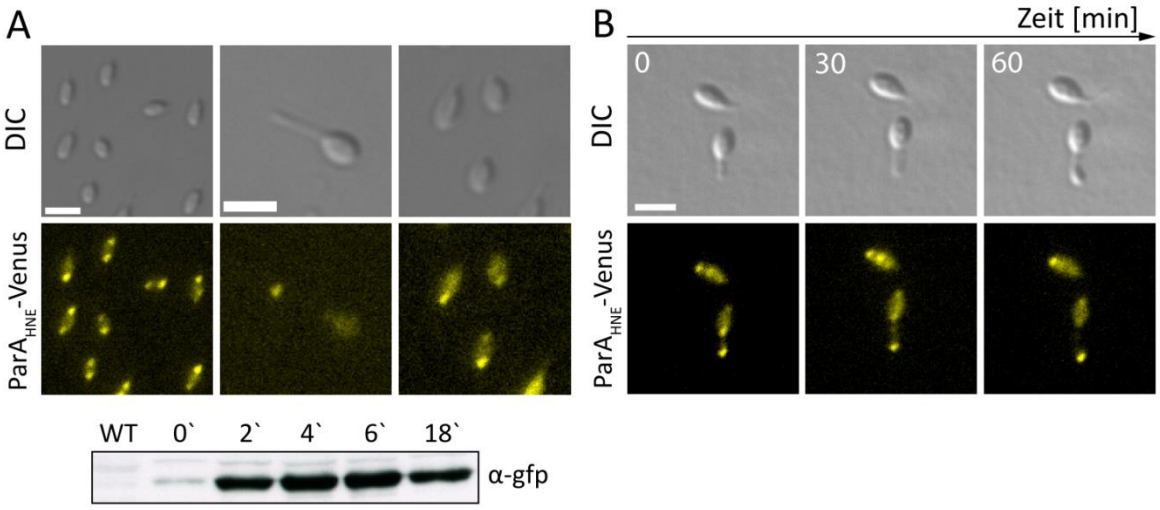
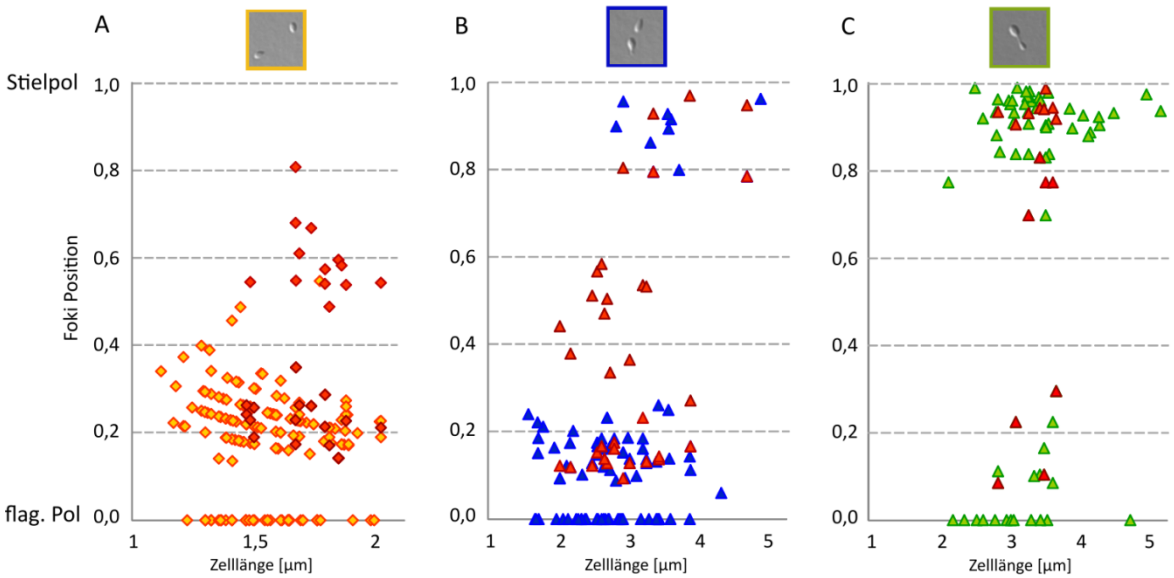


Abbildung 33: Lokalisation der $ParA_{HNE}$-Venus Fusion. (A) Die Zellen des Stammes AR33 (P_{2372}::P_{2372}-*HNE3561-venus*) wurden in MB-Medium angezogen, für 6 h mit 300 µM $ZnSO_4$ induziert, auf 1 % Agarosekissen überführt und mikroskopiert. Das Proteinlevel der HNE3561-Venus Fusion wurde mittels Western Blot überprüft. (1) Balken: 1 µm. (2) Balken: 2 µm. (B) Zeitliche Abfolge der Lokalisation von $ParA_{HNE}$-Venus an der Stielspitze und in der Knospe. Balken: 2 µm.

In 27,5% der Stielzellen konnte ein diffuses zytoplasmatisches Signal detektiert werden. Über die Hälfte der Stielzellen besaß einen Fokus, der entweder am ungestielten Pol oder in der Stielspitze zu sehen war (Abbildung 34 B D). Die restlichen 20% der Stielzellen zeigten zwei Fokusse, die in der Mutterzelle an beiden Polen lokalisierten. In seltenen Fällen (2,5°%) war einer der Fokusse in der Stielspitze und der Zweite am gestielten Pol der Mutterzelle zu sehen (Abbildung 33 B und Abbildung 34 B). Innerhalb von 30 min verschwand die Lokalisation in der Mutterzelle und es verblieb ein einzelner Fokus in der Knospe. Nach weiteren 30 min hatte sich die Knospe gebildet und es war ein schwacher $ParA_{HNE}$-Fokus am ungestielten Pol der Mutterzelle und ein Fokus in der Knospe zu sehen.
In knospenden Zellen besaßen 20 % ein diffuses zytoplasmatisches $ParA_{HNE}$-Venus Signal. (Abbildung 34 C, D). Zwei Drittel der knospenden Zellen (66,7 %) zeigten einen $ParA_{HNE}$ Fokus in der Knospe am flagellierten Pol. Zellen, deren Knospe fast die Größe der Mutterzelle erreicht hatte, besaßen einen Fokus in der Knospe und einen in der Mutterzelle jeweils gegenüber des Stiels (Abbildung 33 B und Abbildung 34 C).



D

	Anzahl der Foci [%]		
	0	1	2
Schwärmerzellen	22,6	68,8	8,8
Stielzellen	27,5	52,5	20
knospende Zellen	20	66,7	13,3

E

	Anzahl Zellen			
	0	1	2	gesamt
Schwärmerzellen	36	109	14	159
Stielzellen	22	42	16	80
knospende Zellen	12	40	8	60

Abbildung 34: Grafische Darstellung der Lokalisation von $ParA_{HNE}$-Venus. (A) $ParA_{HNE}$-Venus Lokalisation in Schwärmerzellen. Die gelben Rauten markieren Schwärmerzellen mit einem Fokus, die roten Rauten Zellen mit zwei Fokussen. Die gelben Rauten auf der Nulllinie markieren Zellen mit diffusem Signal (B) Position des $ParA_{HNE}$-Venus Fusionsproteins in Stielzellen. Blaue Dreiecke markieren Zellen mit einem, rote Zellen mit zwei Fokussen. Die blauen Dreiecke auf der Nulllinie markieren Zellen mit diffusem Signal. (C) $ParA_{HNE}$-Venus-Signale in knospenden Zellen. Die grünen Dreiecke zeigen knospende Zellen mit einem $ParA_{HNE}$-Venus Fokus, die roten Zellen mit zwei Fokussen. Dreiecke auf der Nulllinie markieren Zellen ohne Fokus. (D) Prozentuale Verteilung der $ParA_{HNE}$-Venus-Fokusse in den drei Zelltypen. (E) Anzahl der Zellen aus den Graphen A, B und C. Bei diesen Zellen handelt es ich um die Zellen des gleichen Experiments, wie in Abbildung 33.

Das Lokalisationsmuster von $ParA_{HNE}$-Venus in Schwärmerzellen ähnelt stark dem von $ParB_{HNE}$ (Abbildung 33 und Abbildung 34 A). Um diese Beobachtung zu überprüfen, wurde eine Kolokalisationsstudie mit einer $ParA_{HNE}$-mCherry- und einer $ParB_{HNE}$-YFP-Fusion durchgeführt. Die Fluoreszenzmikroskopie des Stamm AR38 (*HNE3560::HNE3560-yfp* P_{2372}*::*P_{2372}*-HNE3561-mCherry*) zeigte, dass die $ParA_{HNE}$-mCherry-Fusion deutlich vor dem $ParB_{HNE}$-YFP-Signal im Stiel lokalisierte (Abbildung 35). Vergleicht man die Beobachtungen der Abbildung 33 und Abbildung 35 so ist es wahrscheinlich, dass $ParA_{HNE}$ in der Mutterzellen mit $ParB_{HNE}$ kolokalisiert aber vor $ParB_{HNE}$ im Stiel ansammelt.
Legt man den durch ParA in *C. crescentus* vermittelten Segregationsmechanismus des Replikationsursprungs zu Grunde, sollte eine solche Lokalisation wegen des Fehlens von DNA im Stiel nicht möglich sein. Für eine genauere zeitliche Analyse eignete sich der Stamm AR 38 nicht, da das $ParA_{HNE}$-mCherry-Fluoreszenzsignal sehr schwach war. Es wurde versucht die Fluoreszenzmarker gegeneinander auszutauschen, allerdings konnte der Stamm noch nicht fertiggestellt werden.

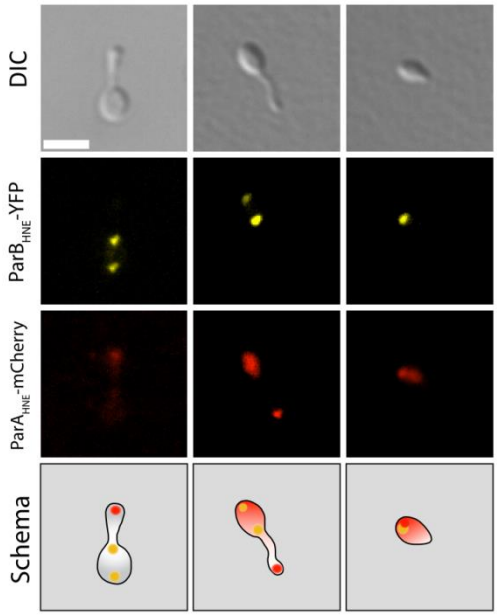


Abbildung 35: Kolokalisation von ParB$_{HNE}$-Yfp und ParA$_{HNE}$-mCherry. Die Abbildung zeigt jeweils eine repräsentative knospende Stiel- und Schwärmerzelle des Stamm AR38 (*HNE3560::HNE3560-yfp* P_{2372}*::*P_{2372}*-HNE3561-mCherry*) Die Zellen wurden in MB-Medium angezogen und für 6 h mit 300 µM $ZnSO_4$ induziert, auf ein 1 % Agarosekissen überführt und mikroskopiert. Balken: 2 µm.

Zur weiteren Charakterisierung wurde eine Deletionsmutante von ParA$_{HNE}$ hergestellt (Abbildung 36). Anders als ParB$_{HNE}$ ist ParA$_{HNE}$ nicht essentiell. Das Entfernen von ParA$_{HNE}$ hatte keinen Effekt auf die Wachstumsgeschwindigkeit (Abbildung 36 B). Die Zellen wiesen aber einen morphologischen Phänotyp auf, der die Stiele von knospenden Zellen stark verlängerte (Abbildung 36 C). Eine statistische Analyse der knospenden Zellen war nicht möglich, da diese Gruppe keiner Normalverteilung unterlag. Vergliech man aber die mittleren 50 % der knospenden Zellen (grüne Boxen, Abbildung 36 C) so sah man, dass sie deutlich über den mittleren 50 % der Wildtyp-Zellen lagen. Nach Durchlaufen mehrerer Zellteilungen traten auch Zellen mit zwei Stielen auf (gelbe Pfeile, Abbildung 36 A). Die Stielzellen der ParA$_{HNE}$ Deletion wiesen ebenfalls keine Normalverteilung auf aber in diesem Fall überlappen die mittleren 50 % der Zellen (blaue Boxen, Abbildung 36 C) fast vollständig mit den Zellen des Wildtyps. Des Weiteren waren die Stielzellen morphologisch unauffällig. Die Schwärmerzellen wiesen keine morphologische Veränderung auf und der statistische Vergleich der Mittelwerte ergab keine signifikante Abweichung (p-Wert>0,774).

Um zu überprüfen, ob die Deletion von ParA$_{HNE}$ einen Effekt auf die Chromosomensegregation verursacht, wurde wie bei der HNE0708 Deletion versucht eine ParB$_{HNE}$-YFP-Fusion am nativen Lokus zu integrieren. Bei keinem der Konjugationsversuche konnte eine erfolgreiche Insertion erzielt werden. Darüber hinaus schlugen sowohl der Versuch einer Komplementation als auch die Insertion einer induzierbaren Variante von ParB$_{HNE}$-YFP fehl. Es ist bis jetzt nicht gelungen, ein Plasmid in den Deletionsstamm von ParA$_{HNE}$ einzubringen.

Die verlängerten Stiele, der ParA$_{HNE}$-Deletionsmutante deuten auf eine Verzögerung der Zellteilung hin. Ferner ist es auffällig, dass die Deletion von ParA$_{HNE}$ bis jetzt der einzige Stamm ist, der keine Plasmide mehr aufnehmen kann.

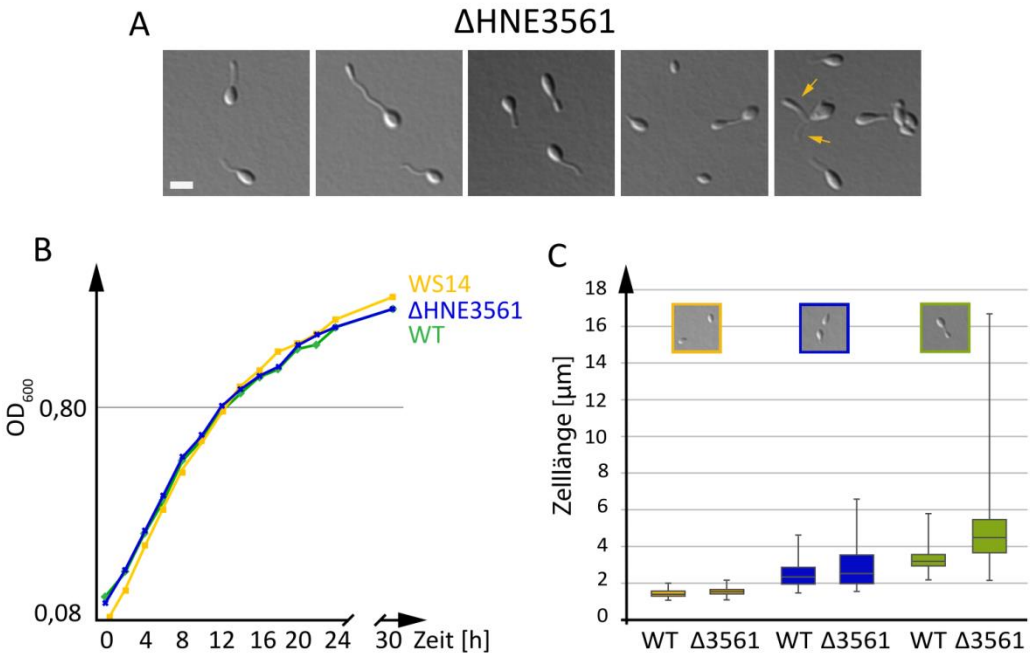


Abbildung 36: Analyse der Deletion des ParA-Homologes HNE3561. (A) Mikroskopische Aufnahme des Stammes AR 45 (*ΔHNE3561*). Die Zellen wurden mit MB-Medium bis zu einer optischen Dichte von ~0,25 angezogen, auf ein 1 % Agarosekissen überführt und mikroskopisch analysiert. Balken: 1 µm. (B) Wachstumskurve der Stämme ATCC15444 (Wildtyp), WS 14 (*ΔhfsB*) und AR 45 (ΔHNE3561) aus drei unabhängigen Experimenten. (C) Längenvergleich der Schwärmer- Stiel- und knospenden Zellen des Wildtyps und der Deletion von HNE3561.

3 Diskussion

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war es, ein System zur *in vivo*-Visualisierung von chromosomalen Positionen in *H. neptunium* zu etablieren und erste Untersuchungen zur Chromosomendynamik vorzunehmen. Zu diesem Zweck wurden zunächst die Ursprungsregion sowie die Terminusregion von *H. neptunium* bestimmt, um anschließend das FROS- und das *parBS*$_{Yp}$-System in *H. neptunium* zu testen. Zusätzlich sollte das chromosomale Segregationssystem von *H. neptunium* identifiziert und näher charakterisiert werden. Da *H. neptunium* nah mit *C. crescentus* verwandt ist, wurde *H. neptunium* auf die Anwesenheit eines *parABS*-Systems analysiert, das in *C. crescentus* maßgeblich an der Segregation der Ursprungsregion beteiligt ist. Ferner konnten sechs ParA-Homologe ermittelt werden, von denen vier auf Grund einer hohen Sequenzähnlichkeit zu ParA$_{Cc}$ näher untersucht wurden.

3.1 Die Anomalie des Replikationsursprungs

Bevor die Chromosomensegregation von *H. neptunium in vivo* untersucht werden konnte, musste zunächst der Replikationsursprung und der Terminus bestimmt werden. Mittels dieser Fixpunkte sollten die ersten Positionen ausgewählt werden, anhand derer die Struktur des Chromosoms und die Dynamik des Segregationsprozesses näher untersucht werden sollte.

Der erste Schritt bei der Bestimmung des Replikationsursprungs war die Ermittlung des GC-skews. Die Existenz verschiedener GC-skews auf den beiden Armen des Chromosoms (Replikore) wurde von Lobry 1996 zum ersten Mal für *E. coli, B. subtilis* und *Haemophilus influenzae* beschrieben. In darauffolgenden Analysen wurden GC-skews in fast allen Bakterienchromosomen nachgewies.[124, 145, 146] Weitere Untersuchungen zeigten, dass sich der Replikationsursprung und die Terminusregion in der Nähe der beiden Übergänge des GC-skews befinden.[126] Der Grund für das Entstehen des GC-skews ist noch nicht vollständig verstanden. Zurzeit wird angenommen, dass er in der ungleichen Replikation von Folge- und Leitstrang zu finden ist. In einzelsträngiger DNA ist die Wahrscheinlichkeit für eine Desaminierung 140 mal höher als in doppelsträngiger DNA.[147] Die Desaminierung von Cytosin führt zur Bildung von Uracil. Wird das Uracil nicht wieder durch ein Cytosin ersetzt, kommt es bei der Replikation zu einer Fehlpaarung mit Adenin und somit zu einer Transition von Cytosin zu Thymin. Da der Leitstrang länger als Einzelstrang vorliegt (Template für die Okazaki Fragmente) als der Folgestrang, ist die Wahrscheinlichkeit einer Anhäufung dieser Mutation hier höher.[148, 149]

Um zu ermitteln, an welchem der beiden Wechselpunkte der Replikationsursprung liegt, wurde nach Genen gesucht, die am Replikationsursprung konserviert sind, darunter auch *dnaA* (Abbildung 10). Das *dnaA*-Gen ist für die Definition des Replikationsursprungs von entscheidender Bedeutung, da seine Position in fast allen Bakterien mit Ausnahme von *H. influenzae* in direkter Nähe des Replikationsursprungs konserviert ist.[47], [126], [122] In *H. influenzae* überlappt der Replikationsursprung mit *gidA* in der Nähe des GC-skew-

Wechsels, das *dnaA*-Gen befindet sich hingegen 450 kb stromaufwärts von dieser Position.
Bei der Definition des Replikationsursprungs von *H. neptunium* fällt die ungewöhnliche Positionierung des *dnaA*-Gens, 570 kb stromaufwärts vom GC-skew-Wechsel auf (Abbildung 37). Da die Position des Replikationsursprungs durch die Bestimmung des GC-skews und der Position von *dnaA* nicht ausreichend definiert werden konnte, wurden die im Ursprungsbereich konservierten Gene *parA, parB, gidB, gidA, dnaN, recF, gyrB*, *hemE* und der *dif*-Locus in der Terminusregion zur näheren Bestimmung herangezogen (Abbildung 11). Die Position von *parA, parB, gidB, gidA* und *hemE* waren wie im *C. crecentus* in der Nähe des GC-skews-Wechsels konserviert. Die Gene von *dnaA, dnaN* und *recF* wiesen dagegen im Vergleich zu *C. crescentus* eine entgegengesetzte Orientierung auf und befanden sich ~570 kb vom GC-skew-Wechsel entfernt. Dies könnte auf eine Inversion dieser Region des Chromosoms hindeuten. Der *dif*-Lokus befindet sich in der Nähe des GC-skew-Wechsels, gegenüber dem *parABS*-Operon.

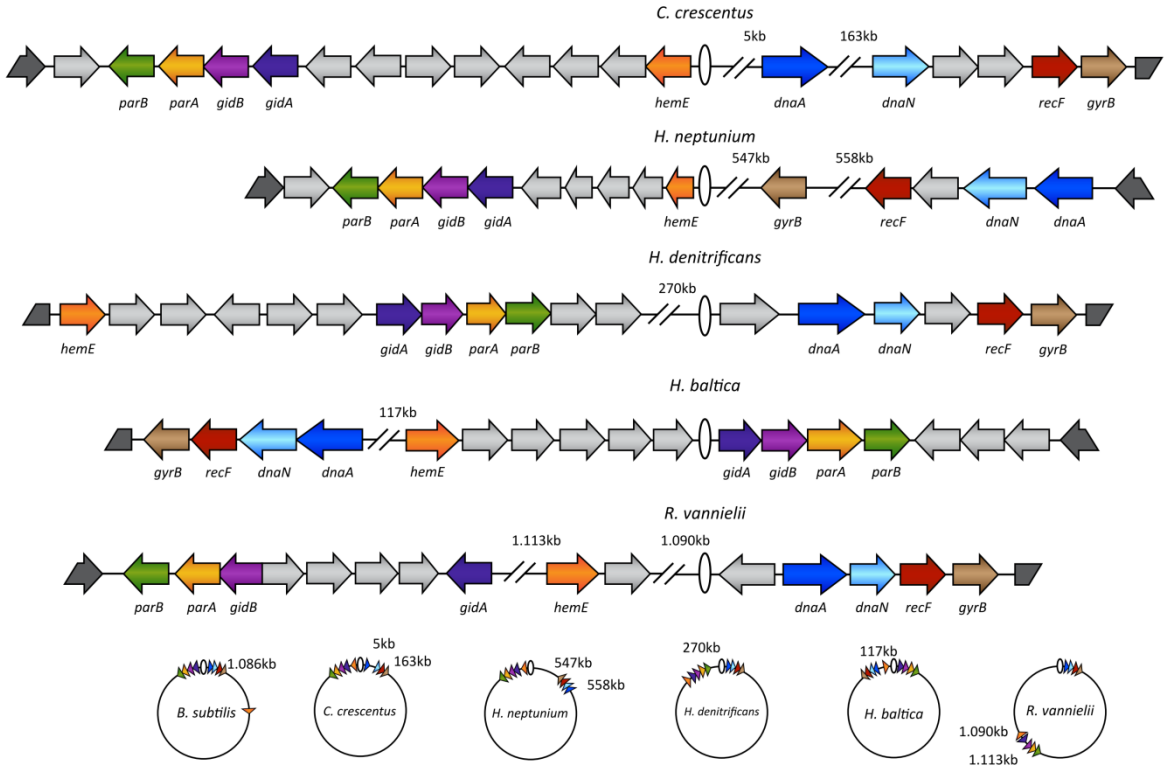


Abbildung 37: Vergleich der Ursprungsregionen der vier sequenzierten DPBs und von *C. crescentus*. (nähere Beschreibung siehe Text)

Um die Position der Ursprungsregion weiter einzugrenzen, wurden die konservierten *parS*-Sequenzen und die DnaA-Bindestellen ermittelt. Die *parS*-Sequenzen befinden sich wie in *C. crescentus* in direkter Nähe des *parABS*-Operons. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass diese zentromer-ähnliche Region als erste segregiert wird. Die einzige Ansammlung von DnaA-Bindestellen befindet sich stromaufwärts des *dnaA*-Gens. Des Weiteren ist der intergene Bereich zwischen *dnaA* und *rpsT* um 10 % AT-reicher als das restliche Chromosom von *H. neptunium*, was die Entwindung der DNA in diesem Bereich erleichtern würde. Experimentell konnte die Position des Replikationsursprungs bis jetzt

nicht nachgewiesen werden. Es deutet aber alles darauf hin, dass *H. neptunium* die Initiation der Replikation von der Segregation entkoppelt hat.
Um zu überprüfen, ob die anormale Anordnung des *dnaA*-Gens eine Anpassung an die Verwendung des Stiels als reproduktive Struktur ist, wurden alle Genome von Bakterien mit einem ähnlichen Zellzyklus untersucht. Zurzeit sind die Genome von *Hischia baltica, Hyphomicrobium denitrificans* und *Rhodomicrobium vannielii* verfügbar (Abbildung 37). Überraschenderweise zeigte jedes dieser Bakterien eine Abweichung von der konservierten Genanordnung, wie sie in den meisten anderen Bakterien zu finden ist. [126]
In *H. denitrificans* und *R. vannielii* befindet sich das *dnaA, dnaN, recF* und das *gyrB*-Gen in der Nähe des GC-skew-Wechsels, wohingegen das *parABS*-Operon in *H. denitrificans* 270 kb und in *R. vannielii* etwa 1.113 kb davon entfernt sind. *H. baltica* ist das einzige Bakterium dieser Auswahl, bei dem das *parABS*-Operon die ersten Gene des Leitstrangs kodiert und das *dnaA*-Gen auf der gegenüberliegenden Seite des GC-skew-Wechsels liegt.
In allen vier Genomen konnte ein deutlicher Unterschied in der Anordnung der Replikationsursprünge beobachtet werden. In allen vier Fällen wurde die Ursprungsregion neu angeordnet. Allerdings konnte kein einheitliches Muster beobachtet werden, das auf eine spezielle Funktion dieser Neuanordnung schließen ließe. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass die Neuanordnungen unabhängig voneinander stattgefunden haben. Die Sequenzierung weiterer Genome von Mitgliedern der nicht phylogenetischen Gruppe der DPBs könnte weitere Einblicke in diese ungewöhnliche Veränderung gewähren. Darüber hinaus sollte die Position des Replikationsursprungs von *H. neptunium* experimentell bestätigt werden, um die aufgestellte Hypothese von getrenntem Replikationsstart und Segregationsstart weiter zu festigen.

3.2 Die Etablierung der *in vivo* Lokalisationssysteme

Für die Analyse des Segregationsverhaltens wurden in *H. neptunium* zwei Systeme zur Visualisierung chromosomaler Loci etabliert. Zuerst wurde versucht, das FROS-System zu verwenden, welches bereits in vielen Organismen wie *C. crescentus* und *B. subtilis* erfolgreich zum Einsatz gekommen ist. [24], [119], [121] Es konnten damit erfolgreich die Position und Dynamik von zwei Loci im Bereich der möglichen *oriC*-Region untersucht werden. Allerdings ist das System in *H. neptunium* nur eingeschränkt funktionsfähig, da Zellen nach dem Durchlaufen mehrerer Zellzyklen verlängerte Stielen und Segregationsdefekte zeigten. Aus der Literatur ist bis jetzt nur die Behinderung der Replikation durch die die Häufung von LacI-Molekülen auf den integrierten lacO-Arrays bekannt. [150] Dieser negative Effekt kann in der Regel durch die Zugabe von IPTG oder die Reduktion der Zahl an *lacO*-Bindestellen reduziert oder völlig beseitigt werden. Im Fall von *H. neptunium* führt aber die Synthese von LacI-mCherry in Abwesenheit des lacO-Arrays bereits zu einer Beeinträchtigung des Wachstums. Diese Beobachtung lässt eine Bindung von LacI auf dem *H. neptunium* Chromosom vermuten. Jedoch konnte nach Zugabe von IPTG, welche diese Bindung deutlich schwächen sollte, keine Verringerung des Phänotyps erreicht werden. Der Grund für den leicht toxischen Effekt von LacI-mCherry bleibt daher unklar.
Trotz gewisser Einschränkungen konnte die Chromosomensegregation in Schwärmerzellen über den ersten Teilungszyklus verfolgt werden, da zu dieser Zeit keine

morphologischen Veränderungen auftraten. Die Verwendung des *parBS*$_{Yp}$-Systems erzeugte weder morphologische Veränderungen noch beeinträchtigte es das Wachstum der Zellen. Aus diesem Grund wird für alle zukünftigen Experimente auf dieses System zurückgegriffen werden.

3.3 Chromosomensegregation in zwei Schritten

Sowohl *H. neptunium* als auch das nah verwandte Bakterium *C. crescentus* besitzen das konservierte *parABS*-System. In *C. crescentus* ist das *parABS*-System für die Chromosomensegregation essentiell. Das ParB$_{Cc}$-Protein bindet an die zentromer-ähnlichen *parS*$_{Cc}$-Sequenzen in der Ursprungsregion und vermittelt die anfängliche Segregation der *Cori*-Region. Der Versuch, ParB$_{HNE}$ in *H. neptunium* zu inaktivieren, schlug fehlt. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass ParB$_{HNE}$ eine ähnlich wichtige Rolle wie das *C. crescentus*-Homolog spielen könnte.
Um die Hypothese zu überprüfen, dass die zentromer-ähnliche Region (*parS*$_{HNE}$-Motive) zuerst segregiert wird, wurde ParB$_{HNE}$ mit dem gelb-fluoreszierenden Protein YFP fusioniert und dessen Lokalisation über den Zellzyklus hinweg verfolgt (Abbildung 13). Eine Korrelation der erhaltenen Muster mit denen anderer Loci, die mit Hilfe des FROS- und *parS*$_{YP}$-Systems visualisiert worden waren, führt zu folgendem Modell: Der ParB$_{HNE}$/*parS*$_{HNE}$-Komplex lokalisiert in Schwärmerzellen zu Beginn des Zellzyklus am begeißelten Pol. Das FROS-System, das ~30 kb stromaufwärts des *dnaA*-Gens inseriert wurde (Position 54°), lokalisiert leicht versetzt in Richtung Zellmitte (Abbildung 16). Nach der Replikation wandert der ParB$_{HNE}$/*parS*$_{HNE}$-Komplex in etwa einer Stunde zum gegenüberliegenden Pol der Mutterzellen. Dort verweilt er, bis die Knospe gut sichtbar ist. Dieses Verweilen kann bis zu vier Stunden dauern. Es ist anzunehmen, dass während dieser Zeit das Chromosom vollständig repliziert wird. Nach der Segregation durch den Stiel lokalisiert der ParB$_{HNE}$/*parS*$_{HNE}$-Komplex am unbestielten Pol der Knospe. Der mit dem FROS-System markierte Lokus bei 55° folgt innerhalb von 30 min und nimmt die gleiche Position wie in der Mutterzelle ein. Das Lokalisationsmuster des *parBS*$_{Yp}$-Systems, das einen Lokus bei 355° visualisiert, zeigt dagegen auf Grund des geringen Abstands zu den *parS*$_{HNE}$-Motiven die gleiche Lokalisation wie der ParB$_{HNE}$/*parS*$_{HNE}$-Komplex (Abbildung 18).
Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass der ParB$_{HNE}$/*parS*$_{HNE}$-Komplex vor dem vermutlichen Replikationsursprung segregiert wird. Dies würde bedeuten, dass *H. neptunium* das erste bekannte Bakterium ist, bei dem der Replikationsursprung und die zentromer-ähnliche Region räumlich deutlich voneinander getrennt sind. Ob diese Trennung in direktem Zusammenhang mit der Verwendung des Stiels als reproduktive Struktur steht, werden weitere Experimente zeigen.

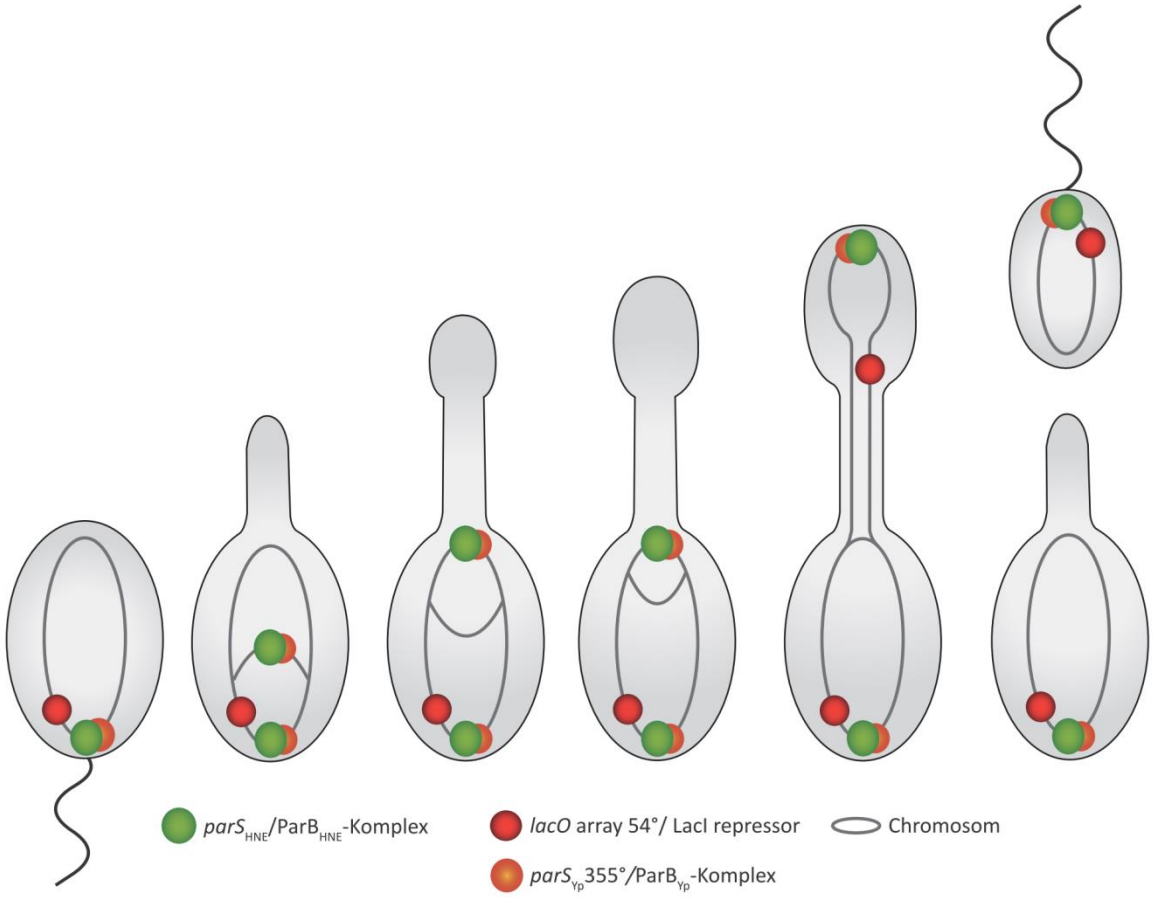


Abbildung 38: Modell für die Segregation chromosomaler DNA in *H. neptunium*. In diesem Model werden die mit Hilfe der $ParB_{HNE}$-YFP-Fusion und der beiden *in vivo*-Lokalisationssysteme gemachten Beobachtungen zusammengefasst (*Abbildung 13*, *Abbildung 15*, *Abbildung 16* und *Abbildung 18*). Einer der beiden $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplexe wandert nach der Replikation der *oriC*-Rgion zum gegenüberliegenden Pol und verweilt dort, bis die Knospe gut sichtbar ist. Anschließend wird der $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplex in weniger als 30 min durch den Stiel zum begeißelten Pol der Knospe transportiert. Die *lacO*-Array des FROS-Systems, die in der Nähe des dnaA-Gens (Position 54° und 55°) integriert sind, folgen dem $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplex innerhalb von 30 min und lokalisiert in der Knospe an einer vergleichbaren Position, wie zuvor in der Mutterzelle. Das Signal des $parS_{Yp}ParB_{Yp}$-Komplexes, das einen Lokus bei 355° markiert, zeigt das gleiche Lokalisationsmuster wie der $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplex.

3.4 Das ParA-Homolog HNE0708

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es Proteine zu identifizieren, die an der Segregation des Chromosoms beteiligt sind. Aus vielen anderen Bakterien ist bekannt, dass Homologe der Soj/ParA-Familie an der Segregation der Ursprungsregion beteiligt sind. [151, 117, 152, 153] Mittels einer BLAST-Analyse wurden in *H. neptunium* sechs Homologe der Soj/ParA-Unterfamilie identifiziert. Auf Grund ihrer hohen Sequenzähnlichkeit zum ParA-Homolog aus *C. crescentus* und der damit hohen Wahrscheinlichkeit einer Beteiligung am Segregationsprozess wurden die vier ParA-Homologe HNE0708, HNE1128 (MipZ), HNE1300 und HNE3561 ($ParA_{HNE}$) näher charakterisiert.

Phylogenetisch wird HNE0708 in die Superfamilie der Mrp/MinD P-loop-ATPasen eingruppiert (Abbildung 19). Es steht evolutionär zwischen der Soj/ParA- und der MipZ-Unterfamilie und kann keiner der beiden Gruppen direkt zugeordnet werden. Um zu überprüfen, ob es sich bei HNE0708 um ein Mitglied einer bis jetzt unbekannten Unterfamilie der Mrp/MinD-Superfamilie handelt, wurde eine BLAST-Analyse durchgeführt. Diese ergab, dass es unter allen bisher sequenzierten Genomen nur in *H. baltica*, einem weiteren Vertreter der Hyphomonadaceae, ein Homolog zu HNE0708 gibt (Abbildung 39).

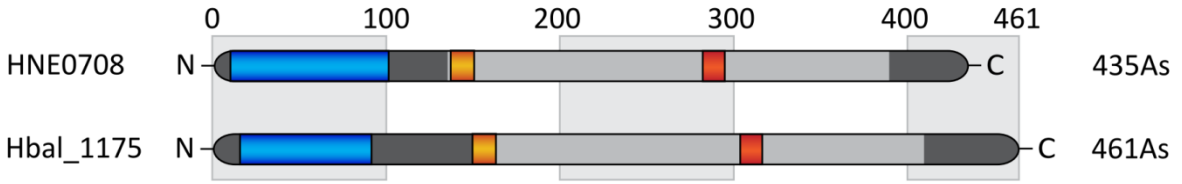


Abbildung 39: Domänenstruktur von HNE0708 und Hbal1175. Eine BLAST-Analyse zeigt, dass nur in *H. baltica* ein Homolog von HNE0708 existiert. Die Position der Soj/ParA-Domänen ist in hellgrau, die Walker A-Region in orange, die Walker B-Region in rot und die TIR-Domäne in blau dargestellt.

Der Hauptunterschied zu Vertretern der Soj/ParA- und MipZ-Unterfamilien ist der verlängerte N-Terminus, der sich durch eine konservierte TIR-Domäne auszeichnet. Die TIR-Domänen sind in anderen Bakterien für die Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich.[144] Ob Homologe von HNE0708 ein generelles Merkmal der Hyphomonadaceae sind, kann zu Zeit leider nicht weiter untersucht werden, da keine weiteren sequenzierten Genome dieser Familie zur Verfügung stehen.
Die Deletion von HNE0708 sowie dessen Fusion mit dem gelb-fluoreszierenden Protein Venus führten zu verlängerten Stielen, in denen sich DNA akkumulierte (Abbildung 21 und Abbildung 23). Aus zahlreichen Studien ist bekannt, dass ParA-Homologe Dimere bilden, um unterschiedliche Funktionen wahrnehmen zu können.[110, 115, 154] Bei der Fluoreszenzfusion von HNE0708 ist davon auszugehen, dass die Fusionsproteine mit den Wildtypproteinen interagierten und so einen dominant negativen Effekt hervorriefen, der der Deletion stark ähnelte (Abbildung 21).
Die Auswirkungen der Deletion von HNE0708 auf den Zellzyklus von *H. neptunium* sind enorm. Es kommt zur Hyperinitiation der Replikation (Abbildung 25), die zentromer-ähnliche Region wird zum Teil mehrfach durch den Stiel segregiert (Abbildung 25) und es kommt zu DNA-Akkumulationen im Stiel (Abbildung 21 und Abbildung 23). Darüber hinaus starten die Tochterzellen ihre Replikation, obwohl sie noch nicht von der Mutterzelle getrennt sind (Abbildung 26).
Ein direkter Einfluss auf die Initiationsrate wurde für das ParA-Homolog Soj aus *B. subtilis* beschrieben.[109] In seiner monomeren Form inhibiert Soj die Bindung des Replikationsinitationsproteins DnaA an die Ursprungsregion. Liegt Soj dagegen als Dimer vor, stimuliert es die Bindung von DnaA an den Replikationsursprung.[110] Für HNE0708 ist ein direkter Einfluss auf die Initiation der Replikation unwahrscheinlich, da die Replikation in Schwärmerzellen des Deletionsstammes normal verläuft (Abbildung 24).
Es ist wahrscheinlich, dass HNE0708 eine Rolle bei der Stielbiogenese und bei der Determinierung der Zellteilungsebene spielt (Abbildung 26). Zu bestimmen wie HNE0708 diese Prozesse beeinflusst wird das Ziel weiterer Studien sein.

3.5 MipZ in *H. neptunium*

Das $MipZ_{Cc}$-Homolog aus *C. crescentus* ist zurzeit das einzige näher charakterisierte Protein der MipZ-Unterfamilie (Abbildung 19). In *C. crescentus* ist $MipZ_{Cc}$ ein essentieller Inhibitor des Zellteilungsproteins $FtsZ_{Cc}$.[114] Die Veränderung des Proteinlevels von $MipZ_{Cc}$ hat gravierende Auswirkungen auf die Morphologie der Zellen. So führt eine Überexpression zu filamentösen Zellen, wohingegen sich eine Ausdünnung in Minizellen auswirkt. [114] Zu Beginn des Zellzyklus lokalisiert $ParB_{Cc}$ am alten Pol und stimuliert dort die Bildung von $MipZ_{Cc}$-Dimeren, die auf Grund unspezifischer DNA-Bindung vom Pol ausgehend einen Gradienten in Richtung Zellmitte bilden. Nach der Replikation der Ursprungsregion segregiert einer der $ParB_{Cc}$/$parS_{Cc}$-Komplexe durch die Interaktion mit $ParA_{Cc}$ zum neuen Pol. Durch die dynamische Interaktion von MipZ mit den $ParB_{Cc}$/$parS_{Cc}$-Komplexen bildet sich ein beidseitiger Proteingradient, der ein Konzentrationsminimum in der Zellmitte aufweist, wo $FtsZ_{Cc}$ zum $FtsZ_{Cc}$-Ring polymerisieren kann. 114, 115
In *H. neptunium* ist $MipZ_{HNE}$ nicht essentiell und die Deletion führt nur in knospenden Zellen zu verlängerten Stielen, was auf eine Verzögerung der Zellteilung hinweist. Allerdings konnten keine weiteren morphologischen Defekte, wie verringerte Wachstumsgeschwindigkeit oder DNA-lose Minizellen, festgestellt werden. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass es in *H. neptunium* andere, redundante Systeme zur Positionierung von $FtsZ_{HNE}$ geben muss. Die Möglichkeit, dass $MipZ_{HNE}$ wie $MipZ_{Cc}$ einen Gradienten für die Positionierung von FtsZ aufbaut, ist unwahrscheinlich, da die Zellteilung von *H. neptunium* am bestielten Pol der Knospe (Abbildung 13) und nicht in der Zellmitte über dem Nukleoid stattfindet. Würde $MipZ_{HNE}$ einen Gradienten bilden, läge die Zellteilungsebene etwa in der Mitte des Stiels. $MipZ_{HNE}$ lokalisiert während des Zellzyklus zusammen mit $ParB_{HNE}$ an den unbestielten Polen von Mutterzelle und Knospe, aber nicht am bestielten Pol der Mutterzelle. Was gegen eine direkte Interaktion von $MipZ_{HNE}$ mit $ParB_{HNE}$ spricht. Diese Hypothese muss aber erst durch Interaktionsstudien bewiesen werden.
Welche Funktion $MipZ_{HNE}$ während des Zellzyklus von *H. neptunium* spielt, ist weiter unklar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es keine vergleichbar wichtige Rolle wie sein Homolog in *C. crescentus* spielt.

3.6 Das HNE1300/HNE1299-Operon

Die Anordnung von HNE1300 und des *H. neptunium*-spezifische Protein HNE1299 gleicht der Anordnung von anderen ParA-Homologen mit ihrem Adapter-Protein ParB. Welche Funktion diese beiden Proteine in *H. neptunium* erfüllen könnten, soll im folgende diskutert werden. HNE1300 und HNE1299 zeigten bei den Untersuchungen, die während dieser Arbeit angefertigt wurden, keine Phänotypen, die auf eine Beteiligung an der Chromosomensegregation schließen ließen. Phylogenetisch gehört HNE1300 wie $ParA_{HNE}$ (HNE3561) zur Soj/ParA Unterfamilie (Abbildung 19). Allerdings zeigte sowohl die fluoreszenzmarkierte Version von HNE1300 als auch die von HNE1299 ein ausschließlich diffuses zytoplasmatisches Signal, das keinen Rückschluss auf die Funktion der beiden Proteine zuließ (Abbildung 30). Die Deletionsstämme wiesen zwar größere Schwärmerzellen auf, dieser Unterschied zum Wildtyp wurde aber erst durch eine

statistische Auswertung sichtbar, da der durchschnittliche Längenunterschied zwischen den Schwärmerzellen des Wildtyps und der Deletionen nur ~0,3 µm (HNE1300) und ~0,2 µm (HNE1299) betrug (Abbildung 31 und Abbildung 32). Diese Veränderung hatte aber keine Auswirkung auf die Wachstumsgeschwindigkeit des HNE1300-Deletionsstammes (Abbildung 31). Da beide Proteine ohne Phänotyp ausgeschaltet werden können, ist anzunehmen, dass keines der beiden Proteine eine entscheidende Rolle bei der Chromosomensegregation von *H. neptunium* spielt. HNE1300 und HNE1299 könnten aber an der Positionierung anderer zellulärer Komponenten als DNA beteiligt sein. Ferner kann nicht ausgeschlossen werden, dass HNE1300 zusammen mit HNE3561 als redundanter Mechanismus an der Chromosomensegregation beteiligt ist.

3.7 Die Beteiligung HNE3561 an der Chromosomensegregation in *H. neptunium*.

Die Chromosomensegregation läuft in *H. neptunium* in zwei separaten Schritten ab (Abbildung 13). Zu Beginn des Zellzyklus lokalisiert ein Fokus von $ParA_{HNE}$-Venus am gleichen Pol wie $ParB_{HNE}$ und die restliche Zelle weist ein diffuses zytoplasmatisches Signal auf (Abbildung 13 und Abbildung 33). Nach dem Beginn der Replikation wandert einer der $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplexe, wahrscheinlich mit Hilfe von $ParA_{HNE}$, durch die Mutterzelle zum Stielpol und verweilt dort, bis die Knospe deutlich sichtbar ist (Abbildung 13)
In 10 % der Stielzellen befindet sich ein $ParA_{HNE}$-Fokus in der Stielspitze. Dies könnte bedeuten, dass dort zu diesem Zeitpunkt in der Stielspitze ein Protein lokalisiert, das die frei diffundierenden $ParA_{HNE}$-Moleküle bindet. Ein ähnlicher Mechanismus ist aus *C. crescentus* bekannt, wo $TipN_{Cc}$ als Senke für die $ParA_{Cc}$-ADP Monomere dient, um die Entstehung einer neuen $ParA_{Cc}$-Stuktur hinter dem wandernden $ParB_{Cc}$/$parS_{Cc}$-Komplex zu verhindern. In der zweiten Phase seiner Segregation wandert der $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplex in die Knospe, wo er am begeißelten Pol immobilisiert wird (Abbildung 13). Es ist anzunehmen, dass der eigentliche Segregationsvorgang innerhalb weniger Minuten abläuft, da nur in sehr seltenen Fällen ein $ParB_{HNE}$-Fokus im Stiel detektiert werden konnte. Darüber hinaus zeigten vorrangegangene Experimente in Mangelphosphat-Medium, dass sich $ParB_{HNE}$-YFP-Signale innerhalb von sieben Minuten durch einen ~6 µm langen Stiel bewegen. [131] Diese schnelle und gerichtete Bewegung legt den Schluss nahe, dass es einen zweiten Mechanismus für die Segregation durch den Stiel gibt.
Nach der Segregation von $ParB_{HNE}$ befindet sich ein Fokus am begeißelten Pol der Knospe und einer am unbestielten Pol der Mutterzelle. $ParA_{HNE}$ ist in 58 % der knospenden Zellen ausschließlich in der Knospe lokalisiert. Kurz nach der Teilung lokalisiert es wieder zusammen mit $ParB_{HNE}$ am unbestielten Pol der Mutterzellen.
Der auffälligste Unterschied zwischen den bisher bekannten *parABS*-Systemen und dem von *H. neptunium* ist die Tatsache, dass nur $ParB_{HNE}$ essentiell ist. In allen bis jetzt untersuchten *parABS*-Systemen sind entweder alle Komponenten essentiell (*C. crescentus*) oder alle entbehrlich (*B. subtilis*, *V. cholera*). [113, 117, 100, 152] In *C. crescentus* führt die Deletion von $ParB_{Cc}$, die Überexpression von $ParA_{Cc}$ oder $ParB_{Cc}$, die Insertion zusätzlicher $parS_{Cc}$-Sequenzen oder eine Mutation der $ParA_{Cc}$-ATPase-Aktivität zu

schwerwiegenden Segregationsdefekten. [117] Im Gegensatz dazu führt die Deletion von Soj (ParA) oder Spo0J (ParB) in *B. subtilis* nur zu einem schwachen Chromosomensegregationsdefekt, der sich in 1 – 2 % DNA-freien Zellen auswirkt (Ireton 1994). Der Hauptgrund für diesen gravierenden Unterschied liegt an der direkten Interaktion des $FtsZ_{Cc}$-Inhibitors $MipZ_{Cc}$ mit dem *Cori*. [114] Der $FtsZ_{Cc}$-Ring kann sich nur dann in der Mitte der Zelle bilden, wenn beide *Coris* an den Zellpolen lokalisieren. Dies ist nur in Anwesenheit von $ParA_{Cc}$, $ParB_{Cc}$ und der $parS_{Cc}$-Stellen möglich. [117], [116]

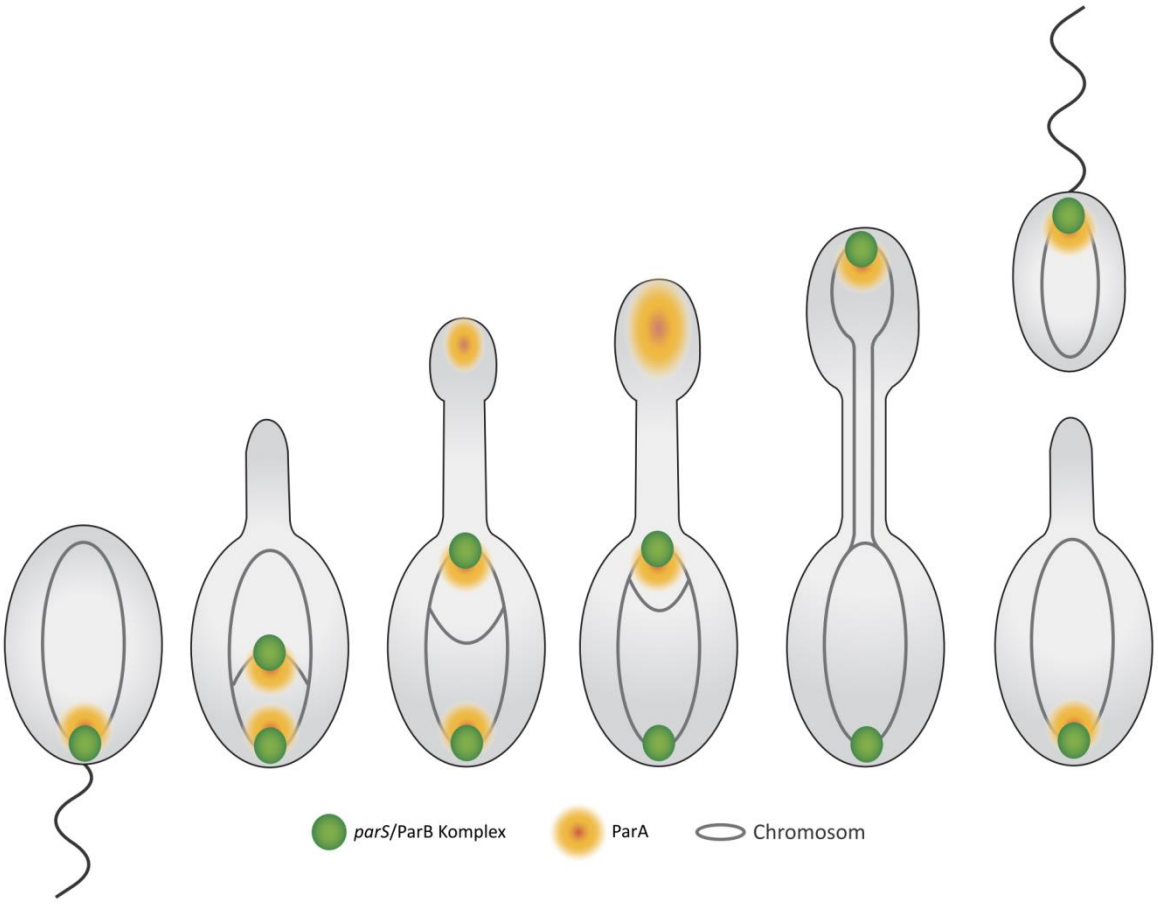


Abbildung 40: Modell für die Segregation des $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplexes und $ParA_{HNE}$ während des Zellzyklus von *H. neptunium*. Der $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplex (grüner Punkt) ist zu Beginn des Zellzyklus mit $ParA_{HNE}$ (gelber Punkt Punkt) am begeißelten Pol kolokalisiert. Nach der Replikation der zentromerähnlichen Region wird einer der beiden $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplexe durch die neu synthetisierte DNA in Richtung Zellmitte verschoben und segregiert innerhalb einer Stunde zum gegenüberliegenden Pol. Am gestielten Pol kolokalisiert $ParA_{HNE}$ ebenfalls mit dem $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplex. Anschließend wird $ParA_{HNE}$ teilweise in der Spitze des Stiels sichtbar, bevor das Signal des $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplexes dort zu sehen ist. Zu diesem Zeitpunkt ist am Pol der Mutterzelle gegenüber des Stiels kein $ParA_{HNE}$-Fokus mehr zu detektieren und die Intensität des $ParA_{HNE}$-Fokus am gestielten Pol nimmt ab. Sobald die Knospe gut zu sehen ist, bewegt sich der $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplex innerhalb weniger Minuten durch den Stiel und ist zusammen mit $ParA_{HNE}$ am gegeißelten Pol der Knospe lokalisiert. Nach der Teilung kolokaliserten $ParA_{HNE}$ und der $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplex wieder zusammen am unbestielten Pol der Stielzelle.

Die Entbehrlichkeit von $ParA_{HNE}$ für die Chromosomensegregation in *H. neptunium* könnte mit der Geschwindigkeit zusammenhängen, mit der die $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplexe in der Mutterzelle voneinander getrennt werden (Abbildung 13). In der Mutterzelle von *H. neptunium* segregieren die $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplexe innerhalb einer Stunde durch die ~1,5 µm lange Zelle (Abbildung 13). In *C. crescentus* erfolgt die Segregation der

Ursprungsregion innerhalb von maximal 15 min mit einer Geschwindigkeit von ~0,27 µm/min. [24] Die Segregation in der Mutterzelle läuft in *H. neptunium* also deutlich langsamer ab als in *C. crescentus*. Zwei weitere Punkte sprechen für die Redundanz von $ParA_{HNE}$ in der Mutterzelle: (i) Der $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplex wird nicht sofort nach Ankunft am bestielten Pol weiter durch den Stiel transportiert, was das Zeitlimit für die zufällige Diffusion weiter verlängert (Abbildung 13) und (ii) der $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplex dient wahrscheinlich als Ankerpunkt für den zweiten Segregationsmechanismus, so dass in Abwesenheit von $ParA_{HNE}$ die Segregation durch den Stiel einfach solange verzögert werden könnte, bis der $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplex den bestielten Pol erreicht hat (Abbildung 13). Um einen tieferen Einblick in das Verhalten des $ParB_{HNE}$/$parS_{HNE}$-Komplexes in Abwesenheit von $ParA_{HNE}$ zu erlangen, sollte versucht werden, eine induzierbare $ParB_{HNE}$-YFP-Fusion im $ParA_{HNE}$-Deletionsstamm zu produzieren.

3.8 Ausblick

Mit dieser Arbeit ist es erstmals gelungen einen Einblick in die Chromosomensegregation eines Bakteriums zu erhalten, das seinen Stiel als reproduktive Struktur benutzt und sich durch Knospung teilt. Es wurde gezeigt, dass anders als in allen bekannten Bakterien eine räumliche Trennung zwischen dem Replikationsursprung und der zentromer-ähnlichen Region, die zuerst segregiert wird, besteht. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Segregation der zentromer-ähnlichen Region in zwei zeitlich getrennten Schritten abläuft.
Die Analyse der vier ausgewählten ParA-Homologe ergab, dass $MipZ_{HNE}$ anders als sein Homolog in *C. crescentus* keine entscheidende Rolle in *H. neptunium* spielt. [114, 115]
Es wird spannend sein zu klären, ob die Hyphomonadaceae mit den Homologen von HNE0708 eine weitere bis jetzt unbekannte Unterfamilie der Mrp/MinD-Superfamilie besitzen und worin die genaue Funktion dieser Proteine besteht.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden analysenrein von den Firmen Amersham (UK), Applichem (Deutschland), Becton Dickinson (USA), Bioline (Deutschland), Carl–Roth (Deutschland), Difco (Spanien), GE Healthcare (Deutschland), Invitrogen (Deutschland), Merck (Deutschland), PerkinElmer (USA), peqlab (USA) oder Sigma (USA) erworben.
Alle Restriktionsenzyme, sowie T4 DNA-Ligase, alkalische Phosphatase und Protein- DNA-Marker wurden von New England Biolabs (NEB, USA) oder Fermentas (Kanada) bezogen.
Alle PCR-Reaktionen wurden entweder mit BioMix™ Red (Bioline® Bio–25005, Bioline, Deutschland) oder mit KOD Hot Start DNA Polymerase (Novagen® 71086-4, Merck, Deutschland) durchgeführt.
Restriktionsenzyme, Enzyme zur Klonierung (T4 DNA-Ligase, Phosphatase) sowie DNA- und Proteinmarker stammten von Fermentas (Kanada) und New England Biolabs (NEB; USA).

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Kits

Kit	Verwendungszweck
GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma, USA)	Extraktion von DNA aus einem Agarosegel
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma, USA)	Plasmidpräparation
GenElute™ PCR Clean–Up Kit (Sigma, USA)	DNA–Aufreinigung

4.1.1 Puffer und Lösungen

Alle Standardpuffer wurden nach Ausubel (1987) und Sambrook (1989) hergestellt. [155], [156] Puffer und Lösungen wurden mit Reinstwasser angesetzt, autoklaviert oder gegebenenfalls sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm).

4.1.2 Medien

Im Folgenden werden alle Medien aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Alle Medien wurden mit Reinstwasser angesetzt und autoklaviert. Hitzeempfindliche Bestandteile wie Antibiotika wurden erst nach Abkühlen auf 45°C zugegeben.

LB-Medium [157](Roth Art. – Nr. X968.2)

Trypton	1,0 %	(w/v)
Hefeextrakt	0,5 %	(w/v)
NaCl	1,0 %	(w/v)

Super-Broth Medium (SB-Medium)

Trypton	3,5 %	(w/v)
Hefeextrakt	2,0 %	(w/v)
NaCl	0,5 %	(w/v)

Marine Broth (MB-Medium, Difco ™ 2216)

Pepton	0,5 %	(w/v)
Hefeextrakt	0,01 %	(w/v)
Fe(III)citrat	0,4	mM
NaCl	0,3	M
$MgCl_2$	62,0	mM
$MgSO_4$	27,0	mM
$CaCl_2$	16,0	mM
KCl	1,0	mM
Na_2CO_3	1,9	mM
KBr	0,7	mM
$SrCl_2$	0,2	M
H_3BO_3	0,4	M
Na-silicat	22,0	mM
NaF	57,0	mM
$(NH_4)NO_3$	20,0	mM
Na_2HPO_4	35,0	mM

Das MB-Medium wurde vor dem Autoklavieren in der Mikrowelle aufgekocht, um Aggregatbildung zu verhindern. Vor Gebrauch wurde es sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm), um Präzipitate zu entfernen.

Tabelle 2: Medienzusätze

	E. coli		***H. neptunium***	
Antibiotika	Flüssigmedium	Festmedium	Flüssigmedium	Festmedium
Ampicillin [50 mg/ml]	200 µg/ml	200 µg/ml	-	-
Kanamycin [50 mg/ml]	50 µg/ml	30 µg/ml	200 µg/ml	100 µg/ml
Rifampicin [10 mg/ml]	50 µg/ml	25 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml
Medienzusatz				
DAP [60 mM]	300 µM	300 µM		
$CuSO_4$ [1 M]	-	-	300 µM	500 µM
$ZnCl_2$ [20 mM]	-	-	300 µM	500 µM

4.1.3 Geräteliste

Tabelle 3: Geräteliste

Gerät	Firma
2UV Transilluminator	UVP
ÄKTApurifier™ 10	GE Healthcare
Axio Imager.M1 (aufrechtes Fluoreszenzmikroskop)	Zeiss
Axio Observer.Z1 (inverses Fluoreszenzmikroskop)	Zeiss
Axiostar plus (Lichtmikroskop)	Zeiss
Digitaler Heizblock	VWR
Micro-Zentrifuge	Roth
Nanodrop®ND-1000 Spektrometer	Peqlab
P93 (Drucker für Gelfotos)	Mitsubishi
PerfectBlueTM „Semi-Dry“-Electroblotter-Sedec	Peqlab
RC 5B plus Zentrifuge	Sorvall
Thermomixer compact	Eppendorf
TProfessional Thermocycler	Biometra
Ultrospec 10 Photometer	Amersham Biosciences
UV-Tisch	Herolab
Zentrifuge 5424	Eppendorf

4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

4.2.1 Escherichia coli

Die verwendeten *E. coli* Stämme wurden unter aeroben Bedingungen über Nacht in LB- oder SB-Medium bei 37°C schüttelnd (210 UpM) propagiert. Die Kultivierung auf Festmedium erfolgte auf LB-Agar Platten bei 37°C.

Kompetenten *E. coli* Zellen wurden in Anlehnung an das Protokoll von Sambrook (1989) hergestellt. [156] Es wurden 10 ml LB-Medium mit *E. coli* TOP10 aus einer Dauerkultur inokuliert und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 250 ml mit 2,5 ml der Vorkultur inokuliert und bei 37°C schüttelnd (210 UpM) bis zu einer OD_{600} von 0,6 kultiviert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden in vorgekühlte GS-3 Zentrifugenbecher übertragen und 20 min auf Eis gelagert. Die Kultur wurde mit einem Sorvall GS-3 Rotor (Thermo Fisher, USA) bei 4°C und 3000 x g für 10 min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 30 ml eiskaltem 0,1 M $CaCl_2$ resuspendiert. Die Suspension wurde in sterile 50 ml Falconröhrchen überführt und

30 min auf Eis inkubiert. Die behandelten Zellen wurden mit einer Sorvall Haereus Multifuge 1 (Thermo Fisher, USA) bei 4°C und 3000 x g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 8 ml eiskaltem 0,1 M $CaCl_2$ mit 15% Glycerin resuspendiert. Die Suspension wurde zu je 80 µl in Eppendorf–Gefäßen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80°C.

4.2.2 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

E.coli TOP 10

Ein 80 µl Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* TOP10-Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Es wurden 10 µl Ligationsgemisch (Punkt 4.3.5) zu den Zellen pipettiert und die Zellen 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42°C. Die Zellen wurden für 2 min auf Eis gestellt und nach Zugabe von 600 µl LB-Medium 1 – 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Pro Transformationsansatz wurden 50 µl und 100 µl auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

E.coli WM3064 (*dap*$^-$)

Das Protokoll für die Transformation von WM3064 Zellen entsprach im Wesentlichen dem Protokoll für *E. coli* TOP10. Anstatt 10 µl Ligationsgemisch wurden hier 4 µl Plasmid DNA zugegeben und sowohl LB-Medium als auch Agarplatten enthielten zusätzlich 300 µM DAP.

4.2.3 Kultivation von *Hyphomonas neptunium*

Alle *H. neptunium*-Kulturen wurden aerob in MB-Medium bei 28°C ein bis zwei Tage schüttelnd (210 UpM) inkubiert. Die Kultivierung auf MB-Festmedium erfolgte für drei bis fünf Tage unter aeroben Bedingungen bei 28°C.

4.2.4 Konjugation von *H. neptunium*

Die Konjugation von *H. neptunium* erfolgte mit *E. coli* WM3064. Die zu konjugierenden Plasmide wurden in *E. coli* WM3064 transferiert. Eine *H. neptunium*-Kultur wurde bei 28°C bis zur stationären Phase (1-2 Tage), der WM3064 Stamm mit integriertem Plasmid in LB-Medium mit 300 µM DAP bei 37°C über Nacht schüttelnd inkubiert. Es wurden 2 ml der *H. neptunium* Kultur und 2 ml der WM3064 Kultur bei 9.000 UpM für 2 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden jeweils in 1 ml MB-Medium mit 300 µM DAP resuspendiert. Die Zellen wurden erneut bei 9.000 UpM für 2 min abzentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 100 µl MB-Medium mit 300 µM DAP resuspendiert, gemischt und mittig auf eine MB-Agarplatte mit 300 µM DAP getropft. Die Platte wurde über Nacht bei 28°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit einer Pipettenspitze von der Platte entfernt und in 1 ml MB-Medium resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde zweimal in je 1 ml MB-Medium

gewaschen (7.000 UpM, 2 min, RT). Abschließend wurden die Zellen in 1 ml MB-Medium aufgenommen und in den Verdünnungen 1:10 und 1:100 zu je 200 µl auf MB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und für 5 Tage bei 28°C inkubiert.

4.2.5 In-frame Deletionen in *H. neptunium*

Zur Herstellung von in-frame Deletionen wurde das Suizidplasmid pNPTS138 verwendet. Es enthält neben einem Kanamycin-Resistenzgen das Gen *sacB* aus *B. subtilis*. Zur Deletion eines Gens wurden etwa 800–900 bp stromauf- und stromabwärts des zu deletierenden Gens mittels PCR amplifiziert. Bei diesen Fragmenten war zu beachten, dass die ersten und die letzten zwölf Kodons des Gens erhalten blieben. Das erstellte Plasmid wurde mittels Konjugation homolog in das Genom von *H. neptunium* integriert. Positive Klone wurden in MB-Medium ohne Selektionsmarker über Nacht bei 28°C schüttelnd inkubiert. Es wurden 200 µl dieser Kultur 1:200 verdünnt, auf MB-Agarplatten mit 3% Sucrose ausplattiert und 5-6 Tage bei 28°C inkubiert. Im Anschluss wurden 32 Kolonien parallel auf MB + 3 % Sucrose und MB+Kanamycin-Platten ausgestrichen. Klone, die das Plasmid nicht mehr trugen, wuchsen nicht auf MB-Sucrose aber auf MB-Kanamycin-Platten. Als abschließende Kontrolle wurden positive Klone mittels Kolonie PCR auf das Vorliegen der korrekten Deletion überprüft.

4.2.6 Dauerkulturen

Für die Anfertigung einer Dauerkultur (Kryo-stock) wurde 900 µl Flüssigkultur mit 100 µl DMSO versetzt und bei -80°C gelagert.

4.2.7 Bestimmung der Zelldichte

Die optische Dichte (OD) von flüssigen Zellkulturen wurde photometrisch bei 600 nm mit dem Ultrospec 10 Photometer bestimmt. Für eine exakte Bestimmung der OD wurden alle Flüssigkulturen auf eine OD unter 0,5 verdünnt.

4.2.8 Synchronisation

Zur Synchronisation von *H. neptunium* wurde ein Protokoll nach Moore & Hirsch und Wali [158, 21] verwendet, das von W. Strobel angepasst und weiter entwickelt worden war. [8, 10] ENREF 8 Die Methode basiert auf der Isolierung der Schwärmerzellen durch Filtration.

H. neptunium wurde in 10 ml MB angeimpft und bei 28°C bis zur stationären Phase inkubiert. Ausgehende von dieser Vorkultur wurde eine 60 ml MB Hauptkultur so inokuliert, dass die Kultur am nächsten Morgen zum Startzeitpunkt der Synchronisation eine OD_{600} von 0,6 hatte. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Die verwendeten Geräte, Zentrifugen und Lösungen wurden auf 4°C vorgekühlt. Zum Ernten der Zellen wurden diese in vorgekühlte SS34-Röhrchen überführt und 15 min bei 3000x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml 1xPBS

resuspendiert und mithilfe einer speziellen Filterapparatur durch eine Filtermembran mit einer Porengröße von 1,2 µm (Millipore) filtriert. Das Filtrat wurde in einem vorgekühlten Kolben aufgefangen. Nach spülen der Apparatur mit 1xPBS wurden die Zellen durch eine zweite Filtermembran mit einer Porengröße von 0,8 µm (Millipore) filtriert. Anschließend wurde das Filtrat bei 3000x g und 4°C für 15 min in vorgekühlten SS34-Röhrchen zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml vorgewärmtem MB-Medium resuspendiert und die OD_{600} durch Zugabe von MB-Medium so eingestellt, dass sie bei 0,3 - 0,4 lag (Zeitpunkt = t_0). Die Kultur wurde in einen sterilen Kolben überführt und bei 28°C inkubiert. Nun wurden über einen Zeitraum von 3 - 4 Stunden alle 30 min Proben genommen und mikroskopisch analysiert.

10x PBS

NaCl	1,4	M
KCl	27	mM
Na_2HPO_4	100	mM
KH_2PO_4 (pH 7,4)	18	mM

Filtrationsapparatur
1x Federklammer aus Aluminium
1x Trichter und Unterteil mit Glasfrittenstützsiebplatte
1x Silikonstopfen
1x 250 ml Standard-Saugflasche
1,2 µm + 0,8 µm Nitrocellulose-Membranen, Ø 47 mm

4.2.9 Mikroskopie und Bildbearbeitung

Für mikroskopische Aufnahmen wurden von einer exponentiell wachsenden *H. neptunium*-Flüssigkultur 2 µl auf ein 1% Agarosekissen pipettiert und mit einem Deckgläschen vollständig abgedeckt. Mikroskopische Langzeitexperimente wurden auf MB-Agarosekissen (1% Agarose) durchgeführt. Um die Zellen vor Austrocknung zu schützen, wurden die Proben mit VLAP versiegelt.
Des Weiteren wurden Microfluidic-Platten (B04A) der Firma CellASIC verwendet, um eine optimale Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten. Nach einspülen der Zellen mit 4 psi für eine Dauer von 6 s wurde die Fließgeschwindigkeit für die Restdauer des Experiments auf 0,25 psi eingestellt.
DIC-Aufnahmen wurden mit einem 100 fach Plan–Apochromat Oil-DIC Objektiv (numerische Apertur 1,40), an einem Zeiss Axio Observer.Z1 Mikroskop (Zeiss, Deutschland) mit einer pco.edge M M-AIR-PCO Kamera (PCO AG, Deutschland) gemacht. Die DAPI-Aufnahmen wurden mit einer X–Cite®120PC Metall–Halogenid–Lampe (EXFO, Kanada) und einem ET–DAPI Filter (Chroma, USA) erstellt. Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem Chroma ET Filter-Set (49000 Series) erstellt. In allen Fällen wurde das Immersionsöl Immersol®518F (Zeiss, Deutschland) verwendet. Die weitere Bildbearbeitung erfolgte mit Metamorph 7.5 (Universal Imaging, USA) und Adobe® Illustrator® (USA).

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde nach den Protokollen von Mullis (1990) und Saiki (1986) modifiziert (Tab. 4 und 5). [159, 160] Das Reaktionsgemisch wurde mit der KOD Hot Start DNA-Polymerase von Merck (Deutschland) nach Herstellerangaben angefertigt. Als Matrize diente gereinigte chromosomale *H. neptunium*-DNA (60 - 80 ng/µl). Das PCR Produkt wurde mittels Gelelektrophorese analysiert und mit dem GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma, USA) aufgereinigt.

Tabelle 4: PCR-Ansatz für KOD Polymerase (50 µl)

10x KOD Polymerase Puffer	5 µl
dNTPs (je 2 mM)	5 µl
$MgSO_4$ (25 mM)	2 µl
DMSO	2,5 µl
Primer forward (100 µM)	0,25 µl
Primer reverse (100 µM)	0,25 µl
KOD Polymerase (1 U/µl)	1 µl
chromosomale DNA (25 ng/µl)	2 µl
H_2O	32 µl

Tabelle 5: PCR Programm für die KOD Polymerase

Schritt			
1. Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
2. Denaturierung	95°C	30 sec	
3. Primeranlagerung	58°C - 65°C	30 sec	30 x
4. Polymerisation	72°C	30 sec pro 1 kb	Schritt 2- 4
5. Finale Polymerisation	72°C	4 min	
6. Lagerung	4°C		

4.3.2 Kolonie-PCR

Für eine Kolonie-PCR wurde BioMix Red™ von Bioline (Deutschland) verwendet. Die *E. coli*-Kolonien wurden entweder mit einem sterilen Zahnstocher oder einer Pipettenspitze von den Platten gepickt und in einen 10-20 µL PCR Ansatz überführt (siehe Tab. 4 und 5).

Tabelle 6: Kolonie-PCR 20 µl Ansatz mit BioMix Red™

BioMixRed	10 µl
DMSO	1 µl
Primer vorwärts	0,1 µl
Primer rückwärts	0,1 µl
H_2O	8,8 µl

Tabelle 7: Kolonie-PCR Programm

Schritt			
1. Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
2. Denaturierung	95°C	30 sec	
3. Primer Anlagerung	65°C	30 sec	29x
4. Polymerisation	72°C	30 sec pro 1 kb	Schritt 2- 4
5. Finale Polymerisation	72°C	4 min	
6. Lagerung	4°C		

4.3.3 Restriktion

Alle Restriktionen wurden mit Enzymen und Puffern von New England Biolabs (NEB, USA) oder Fermentas (Kanada) durchgeführt. Restriktionen mit Standardenzymen wurden über Nacht bei 37°C, Reaktionen mit FastDigest Enzymen bei 37°C für 5 – 15 min inkubiert (Tab. 8 und 9).

Tabelle 8: Restriktionsansatz für Standardenzyme

Reagenz	Restriktion von Vektor-DNA	Restriktion von Insert DNA
10x Puffer	5 µl	5 µl
100x BSA (NEB) optional	1 µl	1 µl
Restriktionsenzym 1 (10 - 20 U/µl)	0,5 µl – 1 µl	0,5 µl – 1 µl
Restriktionsenzym 2 (10 - 20 U/µl)	0,5 µl – 1 µl	0,5 µl – 1 µl
DNA	10 µl	40 µl
SAP oder FastAP (Fermentas)	1 µl	-
deionisiertes Wasser	ad 50 µl	ad 50 µl

Tabelle 9: Restriktionsansatz für FastDigest Enzyme

Reagenz	Restriktion von Vector-DNA	Restriktion von Insert-DNA
10x FastGreen	4 µl	4 µl
Restriktionsenzym 1 (1 U/µl)	2 µl	2 µl
Restriktionsenzym 2 (1 U/µl)	2 µl	2 µl
DNA	10 µl	20 µl
SAP oder FastAP (Fermentas)	2 µl	-
deionisiertes Wasser	ad 50 µl	ad 50 µl

4.3.4 Gelelektrophorese

Die zu analysierende DNA wurde mit DNA-Probenpuffer versetzt und auf ein 1% Agarosegel mit 50 µg/l Ethidiumbromid in 0,5x Tris-Acetat-EDTA-Puffer bei 160 V aufgetrennt. Als Größenmarker wurde der GeneRuler™ 1 kb Ladder (Fermentas)

verwendet. Proben, die mit Biomix™ oder 10x FastGreen Puffer hergestellt worden, waren benötigen keine Zugabe von DNA-Probenpuffer.

Tris-Acetat-EDTA Puffer

Tris	242 g
Eisessig	57,1 ml
EDTA	18 g
ad 1 l	

DNA-Probenpuffer

Glycerin	50%
Bromphenolblau	0,2%
Xylencyanol FF	0,2%
EDTA (aus einer 0,5 M Stammlösung, pH 8,0)	0,2 M

4.3.5 Ligation

Ligationen wurden mit der T4 DNA-Ligase von (Fermentas, Kanada) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Ligationsansatz

5x Rapid Ligation Puffer	4 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
Plasmid-DNA	50 – 100 ng
Insert	min. 2-facher molarer Überschuss über das Plasmidfragment
ad 20 µl mit Reinstwasser	

4.3.6 Extraktion von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde aus *E. coli*-Flüssigkulturen mit dem GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma, USA) nach Herstellerangaben isoliert.

4.3.7 Sequenzierung

Die fertiggestellten Vektoren wurden von der Firma MWG Eurofins (Deutschland) sequenziert. Hierfür wurden 15 µL Plasmid DNA (50 – 100 µg/µl) und Primer mit einer Konzentration von 2 pmol/µl verwendet. Die Ergebnisse wurden mit Vector NTI von Invitrogen (Deutschland) ausgewertet.

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophosese [161, 156]

Es wurden Gelapparaturen und Gelkammern von peqlab (USA) verwendet. Als Proteingrößenmarker diente der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas®, der vor Gebrauch 1:3 mit SDS-Probenpuffer verdünnt worden war. Die Elektrophorese wurde bei 30 mA pro Gel durchgeführt.

Tabelle 10: SDS-PAGE-Gele

	11% Trenngel (10 – 200 kDa)	Sammelgel
4x Trenngelpuffer	2,5 ml	-
4x Sammelgelpuffer	-	625 µl
30% Acrylamid	3,7 ml	417 µl
10% Ammoniumpersulfat	80 µl	25 µl
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	6 µl	1,9 µl
Reinstwasser	3,71 ml	1,43 ml

4x Trenngelpuffer

Tris Base	90,86 g
10% SDS	20 ml
	pH mit 1 M HCl auf 8,8 eingestellen
Reinstwasser	ad 500 ml

4x Sammelgelpuffer

Tris Base	6,06 g
10% SDS	4 ml
	pH mit 1 M HCl auf 6,8 eingestellen
Reinstwasser	ad 100 ml

10x SDS Elektrophorese-Puffer

Tris Base	30,3 g
10% SDS	100 ml
Glycin	144 g
	pH mit 1 M HCl auf 6,8 eingestellen
Reinstwasser	ad 1 l

4.4.2 Western Blot

Alle Western Blots wurden nach dem Standardprotokoll von Towbin durchgeführt. [162]

4.4.3 Semi–Dry Transfer

Der Transfer von Proteinen auf eine PVDF–Membran (Millipore) erfolgte mit einem PerfectBlue™ „Semi–Dry“ Electroblotter (peqlab, USA) bei 2 mA/cm^2 Membran für 1,5 h. Hierzu wurden sechs Whatman-Papiere und eine PVDF–Membran auf Gelgröße zugeschnitten. Die Whatman-Papiere wurden 5–10 min in Western–Transfer–Puffer (WTB) mit 10% Methanol inkubiert. Die Membran wurde 30 sec in Methanol aktiviert, 2 min in Reinstwasser gewaschen und 5 min mit WTB äquilibriert. Für den Blot wurden drei Whatman-Papiere auf der Anodenplatte gestapelt. Die Membran wurde auf die Whatman-Papiere gelegt und mit dem Gel bedeckt. Das Gel wurde nach dem Transfer zur Kontrolle wie in 4.4.5 beschrieben mit Coomassie–Lösung gefärbt.

10x Western–Transfer–Puffer	
Tris	0,25 M
Glycin	1,92 M

4.4.4 Immundetektion

Unspezifische Bindestellen wurden mit 5% Milchpulver in TBST über Nacht bei 4°C schüttelnd geblockt. Zur Detektion wurde die Membran 1,5 h bei Raumtemperatur in 15 ml 5% Milchpulver–TBST mit primärem Antikörper (1:10.000) schüttelnd inkubiert. Die Membran wurde dreimal 10 min mit 25 ml TBST gewaschen und 1,5 h in 15 ml 5% Milchpulver–TBST mit sekundärem Antikörper (1:20.000) schüttelnd inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal für 10 min mit 25 ml TBST gewaschen und zur Entwicklung mit Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer, USA) behandelt. Die Chemilumineszenz wurde auf BioMax Light Film (Kodak, Deutschland) detektiert.

10x TBST	
Tris	100 mM
NaCl	1,5 M
Tween 20	1% (w/w)
pH auf 7,5 einstellen	

4.4.5 Coomassie-Färbung

SDS-PAGE Gele wurden in einer Coomassie Brilliant Blue R 250-Färbelösung auf einer Schwenkapparatur (stuart gyro rocker SL3) mindestens 30 min schüttelnd inkubiert.
Zur Entfärbung wurde das Gel solange in Entfärbelösung inkubiert, bis die Hintergrundfärbung entfernt war.

Coomassie Brillant Blue R 250 Färbelösung	
Methanol	40%
10% Eisessig	10%
Brilliant Blue R 250	0,1% (w/v)

Entfärbelösung mit Ethanol	
Ethanol	20%
10% Eisessig	10%

4.5 Bioinformatische Methoden

Alle Nukleotid- und Proteinsequenzen wurden über die Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) oder die Comprehensive Microbial Resource (CMR)-Datenbank des J. Craig-Venter-Instituts (JCVI) (http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/CmrHomePage.cgi) ermittelt. Die Genomanalysen wurden mit Vector NTI und Snapgene durchgeführt. Der GC-skew wurde mit dem GC-skew server (http://stothard.afns.ualberta.ca/cgview_server/index.html; [163]) und dem GenSkew Programm (http://genskew.csb.univie.ac.at/) ermittelt.
Alle statistischen Analysen wurden mit SPSS (Version 15.0) der Firma IBM berechnet.

5 Anhang

5.1 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 11: Oligonukleotide

Restriktionsschnittstellen wurden unterstrichen.

Name	Beschreibung	Sequenz (5'-3')
Allgemeine Oligonukleotide für Kolonie-PCRs und Sequenzierungen		
M13for		GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA
M13rev		GAGCGGATAACAATTTCACACAGG
eGYC-up		CTTGCCGTAGGTGGCATCGCCCTCG
eGYC-down		GCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAG
mCherry-up		CTCGCCCTCGCCCTCGATCTCGAAC
mCherry-down		GCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAG
RevUni		GGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG
IntSpec-1		ATGCCGTTTGTGATGGCTTCCATGTCG
pCop1486_out_for		CGAAGTCCGCCGTGGCCGAG
Oligonukleotide zur Amplifikation von DNA aus *H. neptunium*		
OAR 161	HNE_3561 for	CGTCCATATGACTAGACCCAGAATATTTGC
OAR 162	HNE_3561 rev	AGGTACCTGCCGCCCTCGCCCT
OAR 163	HNE_1299 for	AGGTCATATGATCGCCGACGGC
OAR 164	HNE_1299 rev	GGTACCGGTGCGGAAGGAGCG
OAR 165	HNE_1299 for	CATCGATCATGTTGATCATATCGGG
OAR 166	HNE_1299 rev	CAAGACCGAGCGCGAGCTGATCT
OAR 167	HNE_3561 for	CTTTCTGGCCGCCAATGATGTTTC
OAR 168	HNE_3561 rev	CAGATTCAGGCAGCTGAAGCAGG
OAR 169	HNE_2372-uni for	CAGCAAAACCGAGCCATATCTGAC
OAR 170	HNE_3561 for	CGGTACCATGACTAGACCCAGAATATTT
OAR 171	HNE_3561 rev	GAATTCTCATGCCGCCCTCGCCC
OAR 172	HNE_0708 for	CCACCATATGTCGCACGTATACATAAGC
OAR 173	HNE_0708 rev	GGTACCATGCCGCGTCATCGCGT
OAR 174	HNE_0708 for	CGGTACCATGTCGCACGTATACATAAG
OAR 175	HNE_0708 rev	CGAATTCTCAATGCCGCGTCATCGCG
OAR 176	HNE_1300 for	CAAACATATGTCTGCCCGCGTCATA
OAR 177	HNE_1300 rev	GGTACCTGCAACCTTCTCCCGGACT
OAR 178	HNE_1300 for	GGTACCATGATGTCTGCCCGCGTCA
OAR 179	HNE_1300 rev	CGAACCGGTTCATGCAACCTTCTCC
OAR 180	HNE_1299 for	GGTACCATGATCGCCGACGGCG
OAR 181	HNE_1299 rev	CGAATTCTCAGGTGCGGAAGGAGC
OAR 182	HNE_0708 for	CGTTTGACCTTGAAGCCCCTCTCC
OAR 183	HNE_0708 rev	CTATGCCAGCCTTGCGAACGTCC
OAR 184	pXCHYN-2 seq rev	CGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTG

Fortsetzung Tabelle 11: Oligonukleotide

Name	Beschreibung	Sequenz (5'-3')
OAR 185	HNE_0708 for	CGAATGGTCGCGCACAAATGTGGAGAAC
OAR 186	HNE_0708 rev	CGCATCAGGATAATCCTGCGGGATGTGC
OAR 187	HNE_0708 for	CGTCTGAACGGCTTCTTCAAACAGG
OAR 188	HNE_1128 for	GCGGCATATGCCCGCTGACGGCGTCGCTCAT
OAR 189	HNE_1128 rev	AGGTACCGAAGTCGATGCTGGCGCCGGCAAGC
OAR 194	HNE_3561 for	CTGGAATGAGGAATTGACTGCGGCT
OAR 195	HNE_3561 rev	CAGCAAGAGCTGTTCCGAGATTGAT
OAR 196	HNE_1300 for	CAGGATTGGCAGGCACAAACATTCC
OAR 197	HNE_1300 rev	CTGGAACAGGTGTTCATCGCCATTG
OAR 198	HNE_1299 for	CAGTAACCCCATCGAGCTGGGTCCA
OAR 199	HNE_1299 rev	GAGCAGTTTCTTGACGATCATGCCG
OAR 200	HNE_0708 for	CCATAATTTCACTGCAAGAAGGTGG
OAR 201	HNE_0708 rev	CAGGGTAGAATACCGTAACGGAAGC
OAR 202	HNE_1128 for	GCCTGACCTGCGCCTGAAACACGTT
OAR 203	HNE_1128 rev	CTTTTCATTGCCGATGACAATGACG
OAR 204	HNE_3561 upstream region for	CACTAGTTGAGTATTCCCTCGGATCTCGACTA
OAR 205	HNE_3561 upstream region rev	CTTAAGCTTTTGATTCACCACGGCAAATATTCTG
OAR 206	HNE_3561 downstream region for	CTTAAGCTTGAAGTGTTGCAGCGTGAAAGGGCGA
OAR 207	HNE_3561 downstream region rev	TGGATCCCCATCGACTTGGTTTCAATCGGCCG
OAR 208	HNE_1300 upstream region for	TACTAGTCACAGCGACCATCTCCCCTTCCAGC
OAR 209	HNE_1300 upstream region rev	CTTAAGCTTTTTGGAATTGGCGATCGATATGACG
OAR 210	HNE_1300 downstream region for	CTTAAGCTTCAGCTCCTCGCCGAAGTCCGGGAGA
OAR 211	HNE_1300 downstream region rev	TGGATCCTCCGCAGCCTCTCCCAGAG
OAR 212	HNE_1299 upstream region for	CACTAGTGGTGATTGACCTCGACACCCAGGCC
OAR 213	HNE_1299 upstream region rev	CTTAAGCTTGGCATCTGCGCCGGGGACGCCG
OAR 214	HNE_1299 downstream region for	CTTAAGCTTAGCTCCTATTTCGGCCGCCGCTCCT
OAR 215	HNE_1299 downstream region rev	TGAATTCATGTTGATCATATCGGGGTATTTGC
OAR 216	HNE_0708 upstream region for	CACTAGTCGGAGATCTGGTCAGCCAGCTTCTG
OAR 217	HNE_0708 upstream region rev	CTTAAGCTTGTCTTTGCCCGAATGGCTTATGTAT
OAR 218	HNE_0708 downstream region for	TATAAGCTTATCCGTGGACTGAATGACGCGATGA
OAR 219	HNE_0708 downstream region rev	TGGATCCTCGCCGTGCATGAGGGCCTGAAGGA
OAR 220	HNE_1128 upstream region for	CACTAGTCGGTGCGCGTGACCTTTTCCTGAGC
OAR 221	HNE_1128 upstream region rev	CTTAAGCTTAACGCGGCTGAGATGAGCGACGC
OAR 222	HNE_1128 downstream region for	CTTAAGCTTCTCCCCGAGCTTGCCGGCGCCAG
OAR 223	HNE_1128 downstream region rev	TGGATCCGTTCATGAGGTTCATGATGAGGGGA
OAR 224	pNPTS138 seq for	TGCTCACATGTAATGTGAGTTAGCT
OAR 225	pNPTS138 seq rev	GATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG
OAR 226	terminus 6.leading 52kb for	TGAATTCATGCCTTCCGCAACGCCTTTTGGCA
OAR 227	terminus 6.leading 52kb rev	TGGATCCTCATTCAACGTAATCTATGAGCTTC
OAR 228	terminus 5.lagging 50kb for	TGAATTCGTTCACACTGTAAATGAGTGCACT
OAR 229	terminus 5.lagging 50kb rev	TGGATCCTCAGTTGTTGCGGGTTGCCGTGCCT
OAR 230	origin 1.leading 30kb for	TGAATTCAGAATACACGTAGAGCGAAATCTAG
OAR 231	origin 1.leading 30kb rev	TGGATCCTTAGTCACGAATATTTCCAACATCC
OAR 232	origin 2.leading 41kb for	TGGATCCATGACGTCTTCTGACCTCACCCCCC

Fortsetzung Tabelle 11: Oligonukleotide

Name	Beschreibung	Sequenz (5'-3')
OAR 233	origin 2.leading 41kb rev	TATATGCTAGCTCAGACGCCGTCAAACAGAGCCGTT
OAR 234	origin 3.lagging 31kb for	TGAATTCGAAGCAACCTGAAGAAGCGCTCCGC
OAR 235	origin 3.lagging 31kb rev	TGGATCCTCACCCCATCGGATAGAGAATTTCC
OAR 236	origin 4.lagging 39kb for	TGGATCCATGACCTATATTCTCATCCACAATC
OAR 237	origin 4.lagging 39kb rev	TATATGCTAGCGGGCGCGTGGAATGGCAGC
OAR 238	HNE_3561-seq rev	CAATGATCTGATACTTGCCCGCCTC
OAR 239	HNE_1300-seq rev	GGTGGAGACTTCAAAGTCCGGCACG
OAR 240	HNE_1128-seq rev	GTCTTCAAACTTCAGCGCGCCCTTG
OAR 241	HNE_0708-seq rev	CTACAAGACCAAATTCCGCCCGATG
OAR 242	terminus 6.leading 52kb intern rev	CAATATCTGCGCCTGATTCATCGGC
OAR 243	terminus 5.lagging 50kb intern rev	CGAAGTCCGAACGCTTCAGAGTTGT
OAR 244	origin 1.leading 30kb intern rev	CATCCTGTTTGGCAGACAGGGACAA
OAR 245	origin 2.leading 41kb intern rev	CTTGTTGACCGGTACGCTTTCTGGA
OAR 246	origin 3.lagging 31kb intern rev	ATCGGTCACCACCTGCTCATAATGG
OAR 247	origin 4.lagging 39kb intern rev	GAAATTCCTCAAAGGCCCGGTTCCC
OAR 248	HNE_3561 deletion control up	CTCTCCTACAAAGAGATCTGTTTCG
OAR 249	HNE_3561 deletion control down	CATCGAGCTGTTCCAGATCACGATA
OAR 250	HNE_0708 deletion control down	CATTGAGCACGCCATCGATTCCAAC
OAR 251	HNE_0708 deletion control up	GCAGAAATTGACATGGGCATGGTCG
OAR 252	HNE_1128 deletion control up	GATACATTTCTGCAACAGTGGGCAG
OAR 253	HNE_1128 deletion control down	CGATCTGGAATTCCAAAGCCTTGCG
OAR 254	HNE_1300 deletion control up	GTCGCTGTTCAACATTAGCATCGCC
OAR 255	HNE_1300 deletion control down	GAGTGTGGGGGAATTTTGAGGCGGT
OAR 256	HNE_1299 deletion control up	CAAATCTGGCAAGAGCCGGACCTCC
OAR 257	HNE_1299 deletion control down	CGCATGTATTCCGTACCCAGCTTTT
OAR 258	origin 1. insertion primer	GAGGAAACCAGCGAAAGCTGATTTC
OAR 259	origin 2. insertion primer	CTTCCTCCGGATGAATTTTCTGGTG
OAR 260	origin 3. insertion primer	GATCAACAGCTCTTAAACGCGTTCA
OAR 261	origin 4. insertion primer	AGCAAGCTGACAATGGCCGAGAGGA
OAR 262	origin 5. insertion primer	ACAGTTTCGGGCAGGATCGGGACGA
OAR 263	origin 6. insertion primer	ACCGGATGGCAAGATGGATAAAAAC
OAR 264	HNE_1812 for	TATACATATGCATGCCTGGCTGATCGAAGGTCCGT
OAR 265	HNE_1812 rev	AGGTACCCTTGGCTGGGGCGGCGTCATACATC
OAR 266	HNE_2164 for	TATACATATGTTTTCTAGCTTTGCCGAGGCGCTC
OAR 267	HNE_2164 rev	AGGTACCCTCCAGAATATCTTCCGTCATCCGC
OAR 268	P_{1846} for	CTTAAGCTTCGGAGCGCTATCTGGGTCTCGACAC
OAR 269	P_{1846} rev	TATACATATGGAAGAGTTCCTGTGAATGATCGGTC
OAR 270	pMCS-uni for	GTTTGTCGCATTATACGCAAGGCGA
OAR 271	HNE1812 insertion primer chrom	CTCTGAAGAAGGGCGATCAGGTCGG
OAR 272	HNE2164 insertion primer chrom	CATATATTCCAAAACGGCGGCTCCT
OAR 273	pLAU43-uni rev	TCCACCCCAACCAAGGTCCGCATTG
OAR 274	origin 1.leading 30kb intern, for	TGACTATTTTACAGGCGAGTCTCTC
OAR 275	origin 2.leading 41kb intern, for	GAGTATTACAGCACGGTCGTCACGA
OAR 276	origin 3.lagging 31kb intern, for	GATACGGTGCTTTCCAATTACCGGC
OAR 277	origin 4.lagging 39kb intern, for	CTTTCTCAGCCCTGATCGGCGATAA

Fortsetzung Tabelle 11: Oligonukleotide

Name	Beschreibung	Sequenz (5'-3')
OAR 278	terminus 5.lagging 50kb intern, for	CAAAGTCACCGGCGACCTGACCTTC
OAR 279	terminus 6.leading 52kb intern, for	ATAGTGTCGAGGTCGTGACATCGCA
OAR 280	origin 3.lagging 31kb intern, for	GATGAAAACCAAGGACCGGGATTCG
OAR 281	origin 4.lagging 39kb intern, for	GTGATGATCAACAAGCGCGACGAGG
OAR 282	terminus 5.lagging 50kb intern, for	GTCATTATCACTTTGCTCGGCCTGC
OAR 283	terminus 6.leading 52kb intern, for	GAATTGACCGGACGTATCATACTGC
OAR 284	origin 1.leading 30kb intern, for	CAACCAGCCCAATATCGCCCTGATC
OAR 285	origin 2.leading 41kb intern, for	ATGATCCTGGGACTGGAGGCCGAAG
OAR 286	HNE_0708 rev	AGGTACCTCAATGCCGCGTCATCGCGTCATTC
OAR 287	HNE_0708 upstream region rev overlap	*ATTCAGTCCACGGAT*GTCTTTGCCCGAATGGCTTATGTAT
OAR 288	HNE_0708 downstream region for overlap	*CATTCGGGCAAAGAC*ATCCGTGGACTGAATGACGCGATGA
OAR 289	HNE_3561 downstream region rev	TGGATCCCGGATTATTATTCCGCAGTCCGGCG
OAR 290	HNE_1812 for	TATACATATGAGCCCCGCGCTGCCTCTGTTCGGGC
OAR 291	HNE_2164 for	TATACATATGGTGAAGGATTATGCGCGGATCATCC
OAR 292	HNE_3561 deletion control up	GAGATTGTCGCGCAAATCGAAATCG
OAR 293	HNE_0708 deletion control up	GTGTCGATCAGGCGGAGGAGTTCGT
OAR 294	origin 2.leading 41kb for	TGGGTACCTTCAATCCCCTCGCCAGCG
OAR 295	origin 2.leading 41kb rev	TGAGCTCTCAGACGCCGTCAAACAGAGCCGTT
OAR 296	origin 4.lagging 39kb for	TAGGTACCCTTTCCATATCGTTTTCGGCAAGAC
OAR 297	origin 4.lagging 39kb rev	TGAGCTCCTAGCGGGCGCGTGGAATGGCAGCC
OAR 298	terminus 5.lagging 50kb for	TAGGTACCCTTCCAGATTTCGACGGTGCTTTAT
OAR 299	terminus 5.lagging 50kb rev	TGAGCTCTCAGTTGTTGCGGGTTGCCGTGCCT
OAR 300	terminus 6.leading 52kb for	TAGGTACCCTCTGATCAATCTCGCGATTGATGG
OAR 301	terminus 6.leading 52kb rev	TGAGCTCTCATTCAACGTAATCTATGAGCTTC
OAR 302	HNE_3560 for	TATACATATGAGTGATCCGGCAGAGGACAATCGCG
OAR 303	HNE_3560 rev	TAGGTACCTTCCGCAGTCCGGCGCTTAGCGGTC
OAR 304	HNE_3560-HA rev	TGAATTCTTA*AGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTA*TTCCGCAGTCCGGCGCTTAG
OAR 305	55° HNE_0550 for	TAGGTACCGTTCCTTCACGGCGATCTGGAACTG
OAR 306	55° HNE_0550 rev	TGAGCTCGTGGTTTTGCTTCAGAATTGGTCAT
OAR 307	110° HNE_1191 for	TAGGTACCATGATCTTTCTGACGGGCGGCGCCT
OAR 308	110° HNE_1191 rev	TGAGCTCTCACTTGGCCGGGGGTAGAGTGGCA
OAR 309	270° HNE_2618 for	TAGGTACCATGGTAAAATTGGTAAATTTCACAG
OAR 310	270° HNE_2618 rev	TGAGCTCTCAGCGGGTCGAACAGAAGCGG
OAR 311	P_{1486} (550bp) for	TATAGCTAGCCGCTCCATGATGAATACGTTTCGC
OAR 312	P_{1486} (550bp) overlap 15bp rev	TGCCGGATCACTCATGAAGAGTTCCTGTGAATGATCGGTC
OAR 313	HNE_3560 overlap 15bp for	TCACAGGAACTCTTCATGAGTGATCCGGCAGAGGACAAT
OAR 314	HNE_3560 rev	TAACATGTTTACTTGTACAGCTCGTCC
OAR 315	parB (pMT1) for	CAAAGAAGCGACTTGTTGTTTATGA
OAR 316	HNE_3560 intern rev	GTCCATCGACTTGGTTTCAATCGGC
OAR 317	rep intern rev	GGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGT
OAR 318	HNE_3561 upstream region for	TACTAGTCAGAATATTTGCCGTGGTGAATCAA

Fortsetzung Tabelle 11: Oligonukleotide

Name	Beschreibung	Sequenz (5'-3')
OAR 319	HNE_3561 upstream region overlap rev	AGCGGTCAAGCGGCGCGGACGCCCGCGATTGTCCTCTGCC
OAR 320	HNE_3561 downstream region overlap for	AATCGCGGGCGTCCGCGCCGCTTGACCGCTAAGCGCCGGA
OAR 321	HNE_3561 downstream region rev	TATAGCTAGCGCTAGCTCAAGAAAGAGCCCGCCCTTCTCTT
OAR 322	HNE_3561 deletion control up	CTTGATTACGCTGCACCTTGGCTCC
OAR 323	HNE_3561 deletion control down	CGTACTTGCGTTCAGCGAAGATGAA

5.2 Verwendete Plasmide

Tabelle 12: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung/Konstruktion	Referenz / Quelle
	pMCS-4-*parS(*pMT1)	Monica Schwartz, unveröffentlicht
	pVan::yfp-parB(pMT1)	Monica Schwartz, unveröffentlicht
pCHYC-2	Integrationsplasmid für C-terminale mCherry-Fusionen, Kan^R	Thanbichler [164]
pEC42	Integrationsplasmid für N-terminale mCherry-Fusionen unter $P_{HNE1486}$, Kan^R	Czerti [10]
pEC44	Integrationsplasmid für C-terminale mCherry-Fusionen unter $P_{HNE1486}$, Kan^R	Czerti [10]
pKH9	Integrationsplasmid $P_{HNE2372\text{-}RBS3}$-*lacI-mCherry*	Heinrich [131]
pMCS-2	*mcs* Kan^R, Integrationsplasmid	Thanbichler [164]
pMCS-3	*mcs* Rif^R, Integrationsplasmid	Thanbichler [164]
pNPTS138	Suizidvektor für doppelt-homologe Rekombination, enthält das *sacB*-Gen aus *B. subtilis*, Kan^R	M.R.K. Alley, unveröffentlicht
pSE17	Integrationsplasmid für C-terminale GFP-Fusionen unter $P_{HNE2372\text{-}RBS3}$, Kan^R	Eisheuer [11]
pSE18	Integrationsplasmid für N-terminale GFP-Fusionen unter $P_{HNE2372\text{-}RBS3}$, Kan^R	Eisheuer [11]
pSE31	Integrationsplasmid für C-terminale Venus-Fusionen unter $P_{HNE2372\text{-}RBS3}$, Kan^R	Eisheuer [11]
pSE32	Integrationsplasmid für N-terminale Venus-Fusionen unter $P_{HNE2372\text{-}RBS3}$, Kan^R	Eisheuer [11]
pSE49	Integrationsplasmid für N-terminale Venus-Fusionen unter $P_{HNE2372\text{-}RBS4}$, Kan^R	Eisheuer [11]
pSE50	Integrationsplasmid für C-terminale Venus-Fusionen unter $P_{HNE2372\text{-}RBS4}$, Kan^R	Eisheuer [11]
pSTRC-2	Integrationsplasmid für C-terminale StrepII-Fusion, Kan^R	Thanbichler [164]
pSW5	pXVENC-2 + *HNE1128,* Kan^R	Stefanie Wick, unveröffentlicht
pSW55	pYFP-2 + *HNE3560*, Kan^R	Stefanie Wick, unveröffentlicht

Fortsetzung Tabelle 12: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung/Konstruktion	Referenz / Quelle
pAR8	Integrationsplasmid *HNE1299-mCherry* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-RBS3}}$	diese Arbeit
pAR11	Integrationsplasmid *HNE3561-mCherry* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-RBS3}}$	diese Arbeit
pAR12	Integrationsplasmid mCherry-HNE3561 unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-RBS3}}$	diese Arbeit
pAR13	Integrationsplasmid *HNE0708-mCherry* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-RBS3}}$	diese Arbeit
pAR14	Integrationsplasmid *mCherry-HNE0708* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-RBS3}}$	diese Arbeit
pAR15	Integrationsplasmid *HNE1300-mCherry* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-RBS3}}$	diese Arbeit
pAR16	Integrationsplasmid *mCherry-HNE1300* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-RBS3}}$	diese Arbeit
pAR17	Integrationsplasmid *mCherry-HNE1299* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-RBS3}}$	diese Arbeit
pAR18	Integrationsplasmid *HNE1128-mCherry* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-RBS3}}$	diese Arbeit
pAR20	Deletionsplasmid für *HNE3561* basierend auf pNPTS138	diese Arbeit
pAR21	Deletionsplasmid für *HNE1300* basierend auf pNPTS138	diese Arbeit
pAR22	Deletionsplasmid für *HNE1299* basierend auf pNPTS138	diese Arbeit
pAR23	Deletionsplasmid für *HNE0708* basierend auf pNPTS138	diese Arbeit
pAR24	Deletionsplasmid für *HNE1128* basierend auf pNPTS138	diese Arbeit
pAR25	Integrationsplasmid *HNE3561-venus* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-RBS4}}$	diese Arbeit
pAR26	Integrationsplasmid *HNE1300-venus* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-RBS4}}$	diese Arbeit
pAR27	Integrationsplasmid *HNE1299-venus* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-RBS4}}$	diese Arbeit
pAR28	Integrationsplasmid *HNE1128-venus* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-RBS4}}$	diese Arbeit
pAR29	Integrationsplasmid *HNE0708-venus* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-RBS4}}$	diese Arbeit
pAR30	Integrationsplasmid *HNE1765-lacO*-array (Position 160°)	diese Arbeit
pAR31	Integrationsplasmid *HNE1846-lacO*-array (Position 200°)	diese Arbeit
pAR32	Integrationsplasmid *HNE0039-lacO*-array (Position 4°)	diese Arbeit
pAR33	Integrationsplasmid *HNE0048-lacO*-array (Position 5°)	diese Arbeit
pAR34	Integrationsplasmid *HNE3539-lacO*-array (Position 356°)	diese Arbeit
pAR35	Integrationsplasmid *HNE3531-lacO-array* (Position 355°)	diese Arbeit
pAR36	Integrationsplasmid *HNE1812-mCherry*	diese Arbeit
pAR37	Integrationsplasmid *HNE2164-mCherry*	diese Arbeit
pAR38	Austausch von Promotor $P_{HNE2372\text{-}RBS4}$ mit $P_{HNE1486}$	diese Arbeit
pAR39	Integrationsplasmid $P_{HNE2372\text{-}RBS4}$-*venus-HNE0708*	diese Arbeit
pAR40	Integrationsplasmid $P_{HNE2372\text{-}RBS4}$-*HNE0708*	diese Arbeit
pAR41	Deletionsplasmid für *HNE3561* basierend auf pNPTS138	diese Arbeit
pAR42	Deletionsplasmid für *HNE0708* basierend auf pNPTS138	diese Arbeit
pAR43	Integrationsplasmid *HNE3560-mCherry*	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 12: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung/Konstruktion	Referenz / Quelle
pAR44	Integrationsplasmid *HNE3560-mCherry*	diese Arbeit
pAR45	Integrationsplasmid für *HNE3560-StrepII* Fusion	diese Arbeit
pAR46	Insertion der *parS*-sites von *Yersinia pestis* in pMCS-3	diese Arbeit
pAR47	Integrationsplasmid *HNE1765-parS$_{Yp}$*-sites (Position 160°)	diese Arbeit
pAR48	Integrationsplasmid *HNE1846-parS$_{Yp}$*-sites (Position 200°)	diese Arbeit
pAR49	Integrationsplasmid *HNE0048-parS$_{Yp}$*-sites (Position 5°)	diese Arbeit
pAR50	Integrationsplasmid *HNE3531-parS$_{Yp}$*-sites (Position 355°)	diese Arbeit
pAR51	Integrationsplasmid *parB$_{Yp}$* (pMT1) unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-}RBS4}$	diese Arbeit
pAR52	Integrationsplasmid *HNE3560-mCherry* unter der Kontrolle von $P_{HNE1486}$	diese Arbeit
pAR53	Integrationsplasmid *HNE1812-mCherry* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-}RBS4}$	diese Arbeit
pAR54	Integrationsplasmid *HNE2164-mCherry* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-}RBS4}$	diese Arbeit
pAR55	Integrationsplasmid für *HNE3560-HA*	diese Arbeit
pAR56	Integrationsplasmid *HNE0550-parS$_{Yp}$*-sites (Position 55°)	diese Arbeit
pAR57	Integrationsplasmid *HNE1191-parS$_{Yp}$*-sites (Position 110°)	diese Arbeit
pAR58	Integrationsplasmid *HNE2618-parS$_{Yp}$*-sites (Position 270°)	diese Arbeit
pAR59	Integrationsplasmid $P_{HNE1486}$-*HNE3560-yfp* in pAR51	diese Arbeit
pAR60	Deletionsplasmid für *HNE3560* basierend auf pNPTS138	diese Arbeit

5.3 Plasmid Konstruktion

Tabelle 13: Plasmid Konstruktion

Plasmid	Konstruktion	Referenz
pAR8	Integrationsplasmid *HNE1299-mCherry* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-}RBS3}$ a) Amplifikation von *HNE1299* mittels nested PCR (OAR 165, OAR 166, OAR 163 und OAR 164) b) Verdau von pSE17 und des PCR-Produkts mit KpnI und NdeI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR11	Integrationsplasmid *HNE3561-mCherry* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-}RBS3}$ a) Amplifikation von *HNE3561* mittels nested PCR (OAR 167, OAR 168, OAR 161 und OAR 162) b) Verdau von pSE17 und des PCR-Produkts mit KpnI und NdeI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR12	Integrationsplasmid mCherry-HNE3561 unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-}RBS3}$ a) Amplifikation von *HNE3561* mittels nested PCR (OAR 167, OAR 168, OAR 170 und OAR 171) b) Verdau von pSE18 und des PCR-Produkts mit KpnI und EcoRI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 13: Plasmid Konstruktion

Plasmid	Beschreibung/Konstruktion	Referenz
pAR13	Integrationsplasmid *HNE0708-mCherry* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-}RBS3}$ a) Amplifikation von *HNE0708* mittels PCR (OAR 172 und OAR 173) b) Verdau von pSE17 und des PCR-Produkts mit KpnI und NdeI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR14	Integrationsplasmid *mCherry-HNE0708* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-}RBS3}$ a) Amplifikation von *HNE0708* mittels PCR (OAR 174 und OAR 175) b) Verdau von pSE18 und des PCR-Produkts mit KpnI und SacI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR15	Integrationsplasmid *HNE1300-mCherry* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-}RBS3}$ a) Amplifikation von *HNE1300* mittels PCR (OAR 176 und OAR 177) b) Verdau von pSE17 und des PCR-Produkts mit KpnI und NdeI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR16	Integrationsplasmid *mCherry-HNE1300* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-}RBS3}$ a) Amplifikation von *HNE1300* mittels PCR (OAR 178 und OAR 179) b) Verdau von pSE18 und des PCR-Produkts mit KpnI und AgeI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR17	Integrationsplasmid *mCherry-HNE1299* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-}RBS3}$ a) Amplifikation von *HNE1299* mittels nested PCR (OAR 165, OAR 166, OAR 181 und OAR 181) b) Verdau von pSE18 und des PCR-Produkts mit KpnI und EcoRI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR18	Integrationsplasmid *HNE1128-mCherry* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-}RBS3}$ a) Amplifikation von *HNE1128* mittels PCR (OAR 188 und OAR 189) b) Verdau von pSE17 und des PCR-Produkts mit KpnI und NdeI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR20	Deletionsplasmid für *HNE3561* basierend auf pNPTS138 a) Amplifikation der *HNE3561* upstream-Region (OAR 204, OAR 205) und der *HNE3561* downstream-Region (OAR 206, OAR 207) b) Verdau der PCR-Produkte mit SpeI und HindIII (*HNE3561* upstream-Region) und HindIII und EcoRI (*HNE3561* downstream-Region). Verdau von pNPTS138 mit SpeI und EcoRI. c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR21	Deletionsplasmid für *HNE1300* basierend auf pNPTS138 a) Amplifikation der *HNE1300* upstream-Region (OAR 208, OAR 209) und der *HNE1300* downstream-Region (OAR 210, OAR 211) b) Verdau der PCR-Produkte mit SpeI und HindIII (*HNE1300* upstream-Region) und HindIII und BamHI (*HNE1300* downstream-Region). Verdau von pNPTS138 mit SpeI und BamHI. c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 13: Plasmid Konstruktion

Plasmid	Beschreibung/Konstruktion	Referenz
pAR22	Deletionsplasmid für *HNE1299* basierend auf pNPTS138 a) Amplifikation der *HNE1299* upstream-Region (OAR 212, OAR 213) und der *HNE1299* downstream-Region (OAR 214, OAR 215) b) Verdau der PCR-Produkte mit SpeI und HindIII (*HNE1299* upstream-Region) und HindIII und EcoRI (*HNE1299* downstream-Region). Verdau von pNPTS138 mit SpeI und EcoRI. c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR23	Deletionsplasmid für *HNE0708* basierend auf pNPTS138 a) Amplifikation der *HNE0708* upstream-Region (OAR 216, OAR 287) und der *HNE0708* downstream-Region (OAR 288, OAR 219) b) overlap PCR der up- und downstream Fragmente c) Verdau von pNPTS138 und des overlap PCR-Produkts SpeI und BamHI d) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR24	Deletionsplasmid für *HNE1128* basierend auf pNPTS138 a) Amplifikation der *HNE1128* upstream-Region (OAR 220, OAR 221) und der *HNE1128* downstream-Region (OAR 222, OAR 223) b) Verdau der PCR-Produkte mit SpeI und BamHI (*HNE1128* upstream-Region) und BamHI und HindIII (*HNE1128* downstream-Region). Verdau von pNPTS138 mit SpeI und HindIII. c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR25	Integrationsplasmid *HNE3561-venus* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-RBS4}}$ a) Amplifikation von *HNE3561* mittels PCR (OAR 161 und OAR 162) b) Verdau von pSE31 und des PCR-Produkts mit KpnI und NdeI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR26	Integrationsplasmid *HNE1300-venus* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-RBS4}}$ a) Amplifikation von *HNE1300* mittels PCR (OAR 176 und OAR 177) b) Verdau von pSE31 und des PCR-Produkts mit KpnI und NdeI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR27	Integrationsplasmid *HNE1299-venus* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-RBS4}}$ a) Amplifikation von *HNE1300* mittels PCR (OAR 163 und OAR 164) b) Verdau von pSE31 und des PCR-Produkts mit KpnI und NdeI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR28	Integrationsplasmid *HNE1128-venus* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-RBS4}}$ a) Amplifikation von *HNE1128* mittels PCR (OAR 188 und OAR 189) b) Verdau von pSE31 und des PCR-Produkts mit KpnI und NdeI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR29	Integrationsplasmid *HNE0708-venus* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-RBS4}}$ a) Amplifikation von *HNE0708* mittels PCR (OAR 172 und OAR 173) b) Verdau von pSE31 und des PCR-Produkts mit KpnI und NdeI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR30	Integrationsplasmid *HNE1765-lacO*-array (Position 160°) a) Amplifikation von *HNE1765/1766* mittels PCR (OAR 226 und OAR 227) b) Verdau von pLAU43 und des PCR-Produkts mit EcoRI und BamHI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR31	Integrationsplasmid *HNE1846-lacO*-array (Position 200°) a) Amplifikation von *HNE1846/1847* mittels PCR (OAR 228 und OAR 229) b) Verdau von pLAU43 und des PCR-Produkts mit EcoRI und BamHI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 13: Plasmid Konstruktion

Plasmid	Beschreibung/Konstruktion	Referenz
pAR32	Integrationsplasmid *HNE0039-lacO*-array (Position 4°) a) Amplifikation von *HNE0039* mittels PCR (OAR 230 und OAR 231) b) Verdau von pLAU43 und des PCR-Produkts mit EcoRI und BamHI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR33	Integrationsplasmid *HNE0048-lacO*-array (Position 5°) a) Amplifikation von *HNE0048* mittels PCR (OAR 232 und OAR 233) b) Verdau von pLAU43 und des PCR-Produkts mit BamHI und NheI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR34	Integrationsplasmid *HNE3539-lacO*-array (Position 356°) a) Amplifikation von *HNE3539/3540* mittels PCR (OAR 234 und OAR 235) b) Verdau von pLAU43 und des PCR-Produkts mit EcoRI und BamHI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR35	Integrationsplasmid *HNE3531-lacO-array* (Position 355°) a) Amplifikation von *HNE3531* mittels PCR (OAR 236 und OAR 237) b) Verdau von pLAU43 und des PCR-Produkts mit BamHI und NheI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR36	Integrationsplasmid *HNE1812-mCherry* a) Amplifikation von *HNE1812* mittels PCR (OAR 264 und OAR 265) b) Verdau von pCHYC-2 und des PCR-Produkts mit KpnI und NdeI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR37	Integrationsplasmid *HNE2164-mCherry* a) Amplifikation von *HNE2164* mittels PCR (OAR 266 und OAR 267) b) Verdau von pCHYC-2 und des PCR-Produkts mit KpnI und NdeI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR38	Austausch von Promotor $P_{HNE2372\text{-}RBS4}$ mit $P_{HNE1486}$ a) Verdau von pKH9 und pEC44 mit NdeI und AvrII b) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR39	Integrationsplasmid $P_{HNE2372\text{-}RBS4}$-*venus-HNE0708* a) Amplifikation von *HNE0708* mittels PCR (OAR 174 und OAR 175) b) Verdau von pSE32und des PCR-Produkts mit KpnI und EcoRI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR40	Integrationsplasmid $P_{HNE2372\text{-}RBS4}$-*HNE0708* a) Amplifikation von *HNE0708* mittels PCR (OAR 172 und OAR 286) b) Verdau von pSE31und des PCR-Produkts mit KpnI und NdeI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR41	Deletionsplasmid für *HNE3561* basierend auf pNPTS138 a) Amplifikation der *HNE3561* upstream-Region (OAR 204, OAR 205) und der *HNE3561* downstream-Region (OAR 206, OAR 289) b) Verdau der PCR-Produkte mit SpeI und BamHI (*HNE3561* upstream-Region) und BamHI und HindIII (*HNE3561* downstream-Region). Verdau von pNPTS138 mit SpeI und BamHI. c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR42	Deletionsplasmid für *HNE0708* basierend auf pNPTS138 a) Amplifikation der *HNE0708* upstream-Region (OAR 216, OAR 287) und der *HNE0708* downstream-Region (OAR 288, OAR 219) b) overlap PCR der up- und downstream Fragmente (OAR 216, OAR 219) c) Verdau von pNPTS138 und des overlap PCR-Produkts SpeI und BamHI d) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR43	Integrationsplasmid *HNE3560-mCherry* a) Verdau von pAR11 und pKH2 mit BsrGI und AgeI b) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 13: Plasmid Konstruktion

Plasmid	Beschreibung/Konstruktion	Referenz
pAR44	Integrationsplasmid *HNE3560-mCherry* a) Verdau von pAR43 und pKH5 mit MunI und NheI b) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR45	Integrationsplasmid für *HNE3560-StrepII* Fusion a) Verdau von pAR43 und pSTRC-2 mit MfeI und SacI b) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR46	Insertion der *parS*-sites von *Yersinia pestis* in pMCS-3 a) Verdau von #72 und pMCS-3 mit HincII und NheI b) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR47	Integrationsplasmid *HNE1765-parS$_{Yp}$*-sites (Position 160°) a) Amplifikation von *HNE1765/1766* mittels PCR (OAR 300 und OAR 301) b) Verdau von pAR46 und des PCR-Produkts mit KpnI und SacI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR48	Integrationsplasmid *HNE1846-parS$_{Yp}$*-sites (Position 200°) a) Amplifikation von *HNE1846/1847* mittels PCR (OAR 298 und OAR 299) b) Verdau von pAR46 und des PCR-Produkts mit KpnI und SacI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR49	Integrationsplasmid *HNE0048-parS$_{Yp}$*-sites (Position 5°) a) Amplifikation von *HNE0048* mittels PCR (OAR 294 und OAR 295) b) Verdau von pAR46 und des PCR-Produkts mit KpnI und SacI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR50	Integrationsplasmid *HNE3531-parS$_{Yp}$*-sites (Position 355°) a) Amplifikation von *HNE3531* mittels PCR (OAR 296 und OAR 297) b) Verdau von pAR46 und des PCR-Produkts mit KpnI und SacI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR51	Integrationsplasmid *parB$_{Yp}$* (pMT1) unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-}RBS4}$ a) Verdau von #75 und pSE49 mit KpnI und NheI b) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR52	Integrationsplasmid *HNE3560-mCherry* unter der Kontrolle von $P_{HNE1486}$ a) Amplifikation von *HNE3560* mittels PCR (OAR 302 und OAR 303) b) Verdau von pEC42 und des PCR-Produkts mit NdeI und KpnI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR53	Integrationsplasmid *HNE1812-mCherry* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-}RBS4}$ a) Verdau von pSE50 und pAR36 mit NdeI und BsrGI b) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR54	Integrationsplasmid *HNE2164-mCherry* unter der Kontrolle von $P_{HNE2372\text{-}RBS4}$ a) Verdau von pSE50 und pAR37 mit NdeI und BsrGI b) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR55	Integrationsplasmid für *HNE3560-HA* a) Amplifikation von *HNE3560* mittels PCR (OAR 302 und OAR 304) b) Verdau von pMCS-2 und *HNE_3650* mit NdeI und EcoRI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR56	Integrationsplasmid *HNE0550-parS$_{Yp}$*-sites (Position 55°) a) Amplifikation von *HNE0550* mittels PCR (OAR 305 und OAR 306) b) Verdau von pAR46 und des PCR-Produkts mit KpnI und SacI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 13: Plasmid Konstruktion

Plasmid	Beschreibung/Konstruktion	Referenz
pAR57	Integrationsplasmid *HNE1191-parS$_{Yp}$*-sites (Position 110°) a) Amplifikation von *HNE1191* mittels PCR (OAR 307 und OAR 308) b) Verdau von pAR46 und des PCR-Produkts mit KpnI und SacI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR58	Integrationsplasmid *HNE2618-parS$_{Yp}$*-sites (Position 270°) a) Amplifikation von *HNE2618* mittels PCR (OAR 309 und OAR 310) b) Verdau von pAR46 und des PCR-Produkts mit KpnI und SacI c) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR59	Integrationsplasmid *P$_{HNE1486}$-HNE3560-yfp* in pAR51 a) Amplifikation des *P$_{HNE1486}$*-550bp Fragments (OAR 311 und OAR 312) und *HNE3560-yfp* (OAR 313, OAR 314) mittels PCR b) overlap PCR des *P$_{HNE1486}$*-550bp Fragments und *HNE3560-yfp* (OAR 313, OAR 314) c) Verdau von pAR51 und des overlap PCR-Produkts mit NheI, PciI d) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit
pAR60	Deletionsplasmid für *HNE3560* basierend auf pNPTS138 a) Amplifikation der *HNE3560* upstream-Region (OAR 318, OAR 319) und der *HNE3560* downstream-Region (OAR 320, OAR 321) b) overlap PCR der up- und downstream Fragmente (OAR 318, OAR 321) c) Verdau des overlap PCR-Fragments und pNPTS138 mit SpeI und NheI d) Ligation der aufgereinigten Fragmente	diese Arbeit

5.4 Verwendete Stämme

Tabelle 14: verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz / Quelle
Escherichia coli		
TOP 10	*F⁻mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ⁻*	Invitrogen, USA
WM3064	*thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZΔM15 RP4-1360 Δ(araBAD)567 ΔdapA1341::[erm pir(wt)]*	W. Metcalf, University of Illinois, Urbana
Hyphomonas neptunium		
ATCC15444	Wildtyp	American Type Culture Collection
WS14	ATCC15444 *ΔhfsB*	Strobel [8]
KH24	P$_{HNE2372-RBS3}$::*lacI-mCherry*; *lacO-array* integriert an *Position 55°, HNE3560-yfp*	Heinrich [131]
KH25	P$_{HNE2372-RBS3}$::*lacI-mCherry*; *lacO-array* integriert an *Position 54°, HNE3560-yfp*	Heinrich [131]
AR 18	ATCC15444 *P$_{2372}$::P$_{2372}$-HNE3561-mCherry*	diese Arbeit
AR 20	ATCC15444 *P$_{2372}$::P$_{2372}$-HNE1128-mCherry*	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 14: verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz / Quelle
AR 22	ATCC15444 *P_{2372}::P_{2372}-mCherry-HNE0708*	diese Arbeit
AR 23	ATCC15444 *P_{2372}::P_{2372}-HNE0708-mCherry*	diese Arbeit
AR 24	ATCC15444 *ΔHNE1300*	diese Arbeit
AR 25	ATC15444 *P_{2372}::P_{2372}-mCherry-HNE1299*	diese Arbeit
AR 27	ATCC15444 *ΔHNE1299*	diese Arbeit
AR 28	ATCC15444 *P_{2372}::P_{2372}-mCherry-HNE1300*	diese Arbeit
AR 29	ATCC15444 *P_{2372}::P_{2372}-mCherry-HNE3561*	diese Arbeit
AR 31	ATCC15444 *ΔHNE1128*	diese Arbeit
AR 32	ATCC15444 *P_{2372}::P_{2372}-HNE1299-mCherry*	diese Arbeit
AR 33	ATCC15444 *P_{2372}::P_{2372}-HNE3561-venus*	diese Arbeit
AR 34	ATCC15444 *P_{2372}::P_{2372}-HNE1300-mCherry*	diese Arbeit
AR 35	ATCC15444 *P_{2372}::P_{2372}-HNE1299-venus*	diese Arbeit
AR 36	ATCC15444 *P_{2372}::P_{2372}-HNE1128-venus*	diese Arbeit
AR 37	ATCC15444 *P_{2372}::P_{2372}-HNE0708-venus*	diese Arbeit
AR 38	ATCC15444 *HNE3560::HNE3560-yfp* *P_{2372}::P_{2372}-HNE3561-mCherry*	diese Arbeit
AR 39	ATCC15444 HNE3560::HNE3560-yfp *P_{2372}::P_{2372}-HNE1128-mCherry*	diese Arbeit
AR 40	ATCC15444 *P_{2372}::P_{2372}-HNE1300-venus*	diese Arbeit
AR 41	ATCC15444 *HNE_3539::HNE_3539-lacOarray*	diese Arbeit
AR 42	ATCC15444 *P_{1486}::P_{1486}-lacI-mCherry*	diese Arbeit
AR 43	ATCC15444 *P_{2372}::P_{2372}-venus-HNE0708*	diese Arbeit
AR 44	ATCC15444 *P_{2372}::P_{2372}-HNE0708*	diese Arbeit
AR 45	ATCC15444 *ΔHNE3561*	diese Arbeit
AR 46	ATCC15444 *ΔHNE0708*	diese Arbeit
AR 47	ATCC15444 *HNE3560::HNE3560-yfp*, *P_{1486}::P_{1486}-lacI-mCherry*	diese Arbeit
AR 48	ATCC15444 *HNE3560::HNE3560-yfp*	diese Arbeit
AR 49	ATCC15444 *HNE3531::HNE3531-lacO*-array (355°)	diese Arbeit
AR 50	ATCC15444 *HNE1846::HNE1846-lacO*-array (200°)	diese Arbeit
AR 51	ATCC15444 *HNE1765::HNE1765-lacO*-array (160°)	diese Arbeit
AR 53	ATCC15444 *ΔHNE0708 HNE3560::HNE3560-yfp*	diese Arbeit
AR 54	ATCC15444 *HNE0048::HNE0048-$parS_{Yp}$*-sites (5°)	diese Arbeit
AR 55	ATCC15444 *HNE3531::HNE3531-$parS_{Yp}$*-sites (355°)	diese Arbeit
AR 56	ATCC15444 *HNE1846::HNE1846-$parS_{Yp}$*-sites (200°)	diese Arbeit
AR 57	ATCC15444 *HNE1765::HNE1765-$parS_{Yp}$*-sites (160°)	diese Arbeit
AR 58	ATCC15444 *P_{2372}::P_{2372}-mCherry-$parB_{Yp}$*	diese Arbeit
AR 59	ATCC15444 *P_{2372}::P_{2372}-HNE1812-mCherry*	diese Arbeit
AR 60	ATCC15444 *HNE3560::HNE3560-Strep*	diese Arbeit
AR 61	ATCC15444 *P_{2372}::P_{2372}-mCherry-$parB_{Yp}$* *HNE3531::HNE3531-$parS_{Yp}$*-sites (355°)	diese Arbeit
AR 62	ATCC15444 P_{2372}:: P_{2372}-HNE2164-mCherry	diese Arbeit
AR 63	ATCC15444 *P_{2372}::P_{2372}-lacI-mCherry* *HNE3560::HNE3560-yfp* *HNE1765::HNE1765-lacO*-array (160°)	diese Arbeit

5.5 *parS*- und *dif*-Stellen

Tabelle 15: *parS*-Stellen

Stamm	Sequenz	Position	Referenz / Quelle
Konsensussequenz	NGTTNCANNTGNAACN		Livny [97]
B. subtilis	TGTTTCACGTGTAACA	47.642	Livny [97]
	TGTTACACGTGTAACA	185.163	
	TGTTACACGTGAAACA	3.911.431	
	TGTTTCACGTGTAACA	4.147.434	
	TGTTTCACGTGAAACG	4.152.783	
	TGTTTCACGTGGAACA	4.205.736	
C. crescentus	CGTTTCACGTGAAACA	4.008.906	Toro [116]
	TGTTCCACGTGAAACA	4.008.964	
H. neptunium	TGTTTCACGTGAAACA	3.697.593	diese Arbeit
	TGTTTCACGTGAAACA	3.698.116	
H. denitrificans	CGTTGCACCCGAAACG	1.094.679	diese Arbeit
	GGTTTCACCAGGAACT	2.913.085	
H. baltica	TGTTTCACGTGAAACA	1957	diese Arbeit
	TGTTTCACGTGAAACT	2299	
	TGTTTCACGTGAAACA	3.454.155	
	TGTTTCACGTGAAACA	3.455.557	
R. vannielii	GGTTGCATCTGCAACC	2.441.882	diese Arbeit
	TGTTTCATGTGAAACA	2.896.754	
	TGTTTCATGTGAAACA	2.902.780	
	CGTTTCATGTGAAACA	2.910.717	

Tabelle 16: *dif*-Stellen

Stamm	Sequenz	Position	intergene Region	Referenz
Konsensussequenz	ANTTCGCATAATNTATATTATGTNAAAT			Carnoy [165]
E. coli	GGTGCGCATAATGTATATTATGTTAAAT	1.678.399	ja	Kuempel [70]
B. subtilis	ACTTCCTAGAATATATATTATGTAAACT	1.942.543	ja	Sciochetti [166]
C. crescentus	AAGATCGACTTTGTAATTTATGTAAAGT	1.946.366	ja	Jensen [123]
H. neptunium	AAGTCGCATAATCTATATTATGGGCAAT	1.856.931	ja	diese Arbeit
H. denitrificans	ATTTCGCATAACATAGATTATGGAAAAT	1.730.429	ja	diese Arbeit
H. baltica	AAAACGCATAATCTACATTATGTGCAAT	1.733.475	ja	diese Arbeit
R. vannielii	ATTCGCCTGATCCTATATTATGGTGGGT	604.596	ja	diese Arbeit

5.6 Literaturverzeichnis

1. Leifson, E. *Hyphomicrobium neptunium* sp. n. *Antonie Van Leeuwenhoek* **30**, 249-256 (1964).
2. Badger, J.H. *et al.* Comparative genomic evidence for a close relationship between the dimorphic prosthecate bacteria *Hyphomonas neptunium* and *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **188**, 6841-6850 (2006).
3. Weiner, R.M. & Blackman, M.A. Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis and bud formation by nalidixic acid in *Hyphomicrobium neptunium*. *J Bacteriol* **116**, 1398-1404 (1973).
4. Devine, R.A. & Weiner, R.M. *Hyphomonas* species metabolise amino acids using Krebs cycle enzymes. *Microbios* **62**, 137-153 (1990).
5. Havenner, J.A., McCardell, B.A. & Weiner, R.M. Development of Defined, Minimal, and Complete Media for the Growth of *Hyphomicrobium neptunium*. *Appl Environ Microbiol* **38**, 18-23 (1979).
6. Garrity G. M., B.D.J., Krieg,N. R., Staley J. R. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. Volume Two: The Proteobacteria. (New York: Springer -Verlag, 2005).
7. Badger, J.H., Eisen, J.A. & Ward, N.L. Genomic analysis of *Hyphomonas neptunium* contradicts 16S rRNA gene-based phylogenetic analysis: implications for the taxonomy of the orders 'Rhodobacterales' and Caulobacterales. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1021-1026 (2005).
8. Strobel, W. Etablierung von genetischen Methoden zur Analyse der Zellteilung in *Hyphomonas neptunium*. *Bachelor Thesis Philipps-Universität Marburg* (2010).
9. Jung, A. Establishment of genetic tools for the analysis of developmental processes in *Hyphomonas neptunium. Master Thesis Philipps-Universität Marburg* (2010).
10. Cserti, E. The analysis of budding in *Hyphomonas neptunium*. *Master Thesis Philipps-Universität Marburg* (2011).
11. Eisheuer, S. Analyse der Zellteillung in *Hyphomonas neptunium Master Thesis Philipps-Universität Marburg* (2011).
12. Henrici, A.T. & Johnson, D.E. Studies of Freshwater Bacteria: II. Stalked Bacteria, a new order of *Schizomycetes*. *J Bacteriol* **30**, 61-93 (1935).
13. S., P.J. *The Prokaryotes*, Vol. Volume 5. (Springer Science+Business, Media, LLC, 2006).
14. Ong, C.J., Wong, M.L. & Smit, J. Attachment of the adhesive holdfast organelle to the cellular stalk of Caulobacter crescentus. *J Bacteriol* **172**, 1448-1456 (1990).
15. Wagner, J.K., Setayeshgar, S., Sharon, L.A., Reilly, J.P. & Brun, Y.V. A nutrient uptake role for bacterial cell envelope extensions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11772-11777 (2006).
16. Schlimpert, S. *et al.* General protein diffusion barriers create compartments within bacterial cells. *Cell* **151**, 1270-1282 (2012).
17. Ireland, M.M., Karty, J.A., Quardokus, E.M., Reilly, J.P. & Brun, Y.V. Proteomic analysis of the *Caulobacter crescentus* stalk indicates competence for nutrient uptake. *Mol Microbiol* **45**, 1029-1041 (2002).

18. Poindexter J.L.S., a.C.-B.G. Fine structure of stalked bacteria belonging to family Caulobacteraceae. *J. Cell Biol.* **23** (1964).
19. Iba, H., Fukuda, A. & Okada, Y. Chromosome replication in *Caulobacter crescentus* growing in a nutrient broth. *J Bacteriol* **129**, 1192-1197 (1977).
20. Marczynski, G.T. Chromosome methylation and measurement of faithful, once and only once per cell cycle chromosome replication in *Caulobacter crescentus. J Bacteriol* **181**, 1984-1993 (1999).
21. Wali, T.M., Hudson, G. R., Danald, D. A. & Weiner, R. M. Timing of swarmer cell cycle morphogenesis and macromolecular synthesis by *Hyphomicrobium neptunium* in synchronous culture. *J Bacteriol* 406-412 (1980).
22. Toro, E. & Shapiro, L. Bacterial chromosome organization and segregation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000349 (2010).
23. Reyes-Lamothe, R., Nicolas, E. & Sherratt, D.J. Chromosome replication and segregation in bacteria. *Annu Rev Genet* **46**, 121-143 (2012).
24. Viollier, P.H. *et al.* Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9257-9262 (2004).
25. Ozaki, S. & Katayama, T. DnaA structure, function, and dynamics in the initiation at the chromosomal origin. *Plasmid* **62**, 71-82 (2009).
26. Katayama, T., Ozaki, S., Keyamura, K. & Fujimitsu, K. Regulation of the replication cycle: conserved and diverse regulatory systems for DnaA and oriC. *Nat Rev Microbiol* **8**, 163-170 (2010).
27. Bramhill, D. & Kornberg, A. Duplex opening by dnaA protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell* **52**, 743-755 (1988).
28. Schaper, S. & Messer, W. Interaction of the initiator protein DnaA of *Escherichia coli* with its DNA target. *J Biol Chem* **270**, 17622-17626 (1995).
29. Ozaki, S., Fujimitsu, K., Kurumizaka, H. & Katayama, T. The DnaA homolog of the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima* forms an open complex with a minimal 149-bp origin region in an ATP-dependent manner. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **11**, 425-438 (2006).
30. Ozaki, S. *et al.* A common mechanism for the ATP-DnaA-dependent formation of open complexes at the replication origin. *J Biol Chem* **283**, 8351-8362 (2008).
31. Kawakami, H., Keyamura, K. & Katayama, T. Formation of an ATP-DnaA-specific initiation complex requires DnaA Arginine 285, a conserved motif in the AAA+ protein family. *J Biol Chem* **280**, 27420-27430 (2005).
32. Keyamura, K. *et al.* The interaction of DiaA and DnaA regulates the replication cycle in *E. coli* by directly promoting ATP DnaA-specific initiation complexes. *Genes Dev* **21**, 2083-2099 (2007).
33. McGarry, K.C., Ryan, V.T., Grimwade, J.E. & Leonard, A.C. Two discriminatory binding sites in the *Escherichia coli* replication origin are required for DNA strand opening by initiator DnaA-ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2811-2816 (2004).
34. Messer, W. & Zakrzewska-Czerwinska, J. *Streptomyces* and *Escherichia coli*, model organisms for the analysis of the initiation of bacterial chromosome replication. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* **50**, 393-398 (2002).
35. Ryan, V.T., Grimwade, J.E., Nievera, C.J. & Leonard, A.C. IHF and HU stimulate assembly of pre-replication complexes at *Escherichia coli oriC* by two different mechanisms. *Mol Microbiol* **46**, 113-124 (2002).

36. Leonard, A.C. & Grimwade, J.E. Building a bacterial orisome: emergence of new regulatory features for replication origin unwinding. *Mol Microbiol* **55**, 978-985 (2005).
37. Ryan, V.T., Grimwade, J.E., Camara, J.E., Crooke, E. & Leonard, A.C. *Escherichia coli* prereplication complex assembly is regulated by dynamic interplay among Fis, IHF and DnaA. *Mol Microbiol* **51**, 1347-1359 (2004).
38. Swinger, K.K. & Rice, P.A. IHF and HU: flexible architects of bent DNA. *Current opinion in structural biology* **14**, 28-35 (2004).
39. Roth, A., Urmoneit, B. & Messer, W. Functions of histone-like proteins in the initiation of DNA replication at oriC of *Escherichia coli*. *Biochimie* **76**, 917-923 (1994).
40. Hwang, D.S. & Kornberg, A. Opening of the replication origin of *Escherichia coli* by DnaA protein with protein HU or IHF. *J Biol Chem* **267**, 23083-23086 (1992).
41. Boye, E., Lyngstadaas, A., Løbner-Olesen, A., Skarstad, K. & Wold, S. Regulation of DNA replication in *Escherichia coli*, in *DNA Replication and the Cell Cycle*, Vol. 43 (Springer Berlin Heidelberg, 1993).
42. Cassler, M.R., Grimwade, J.E. & Leonard, A.C. Cell cycle-specific changes in nucleoprotein complexes at a chromosomal replication origin. *EMBO J* **14**, 5833-5841 (1995).
43. Bramhill, D. & Kornberg, A. A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell* **54**, 915-918 (1988).
44. Speck, C. & Messer, W. Mechanism of origin unwinding: sequential binding of DnaA to double- and single-stranded DNA. *EMBO J* **20**, 1469-1476 (2001).
45. Weigel, C. & Seitz, H. Strand-specific loading of DnaB helicase by DnaA to a substrate mimicking unwound *oriC*. *Mol Microbiol* **46**, 1149-1156 (2002).
46. O'Donnell, M. Replisome architecture and dynamics in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **281**, 10653-10656 (2006).
47. Briggs, G.S., Smits, W.K. & Soultanas, P. Chromosomal replication initiation machinery of low-G+C-content Firmicutes. *J Bacteriol* **194**, 5162-5170 (2012).
48. Moriya, S., Atlung, T., Hansen, F.G., Yoshikawa, H. & Ogasawara, N. Cloning of an autonomously replicating sequence (ars) from the *Bacillus subtilis* chromosome. *Mol Microbiol* **6**, 309-315 (1992).
49. Yoshikawa, H. & Ogasawara, N. Structure and function of DnaA and the DnaA-box in eubacteria: evolutionary relationships of bacterial replication origins. *Mol Microbiol* **5**, 2589-2597 (1991).
50. Moriya, S., Ogasawara, N. & Yoshikawa, H. Structure and function of the region of the replication origin of the *Bacillus subtilis* chromosome. III. Nucleotide sequence of some 10,000 base pairs in the origin region. *Nucleic Acids Res* **13**, 2251-2265 (1985).
51. Ogasawara, N., Moriya, S., von Meyenburg, K., Hansen, F.G. & Yoshikawa, H. Conservation of genes and their organization in the chromosomal replication origin region of Bacillus subtilis and Escherichia coli. *EMBO J* **4**, 3345-3350 (1985).
52. Ogura, Y., Imai, Y., Ogasawara, N. & Moriya, S. Autoregulation of the dnaA-dnaN operon and effects of DnaA protein levels on replication initiation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**, 3833-3841 (2001).
53. Okumura, H. *et al.* Regulation of chromosomal replication initiation by *oriC*-proximal DnaA-box clusters in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* **40**, 220-234 (2012).

54. Smits, W.K., Merrikh, H., Bonilla, C.Y. & Grossman, A.D. Primosomal proteins DnaD and DnaB are recruited to chromosomal regions bound by DnaA in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **193**, 640-648 (2011).
55. Collier, C., Machon, C., Briggs, G.S., Smits, W.K. & Soultanas, P. Untwisting of the DNA helix stimulates the endonuclease activity of *Bacillus subtilis* Nth at AP sites. *Nucleic Acids Res* **40**, 739-750 (2012).
56. Zhang, W. *et al.* The *Bacillus subtilis* DnaD and DnaB proteins exhibit different DNA remodelling activities. *J Mol Biol* **351**, 66-75 (2005).
57. Shaheen, S.M., Ouimet, M.C. & Marczynski, G.T. Comparative analysis of *Caulobacter* chromosome replication origins. *Microbiology* **155**, 1215-1225 (2009).
58. Marczynski, G.T. & Shapiro, L. The control of asymmetric gene expression during *Caulobacter* cell differentiation. *Archives of microbiology* **163**, 313-321 (1995).
59. Brassinga, A.K. & Marczynski, G.T. Replication intermediate analysis confirms that chromosomal replication origin initiates from an unusual intergenic region in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res* **29**, 4441-4451 (2001).
60. Marczynski, G.T. & Shapiro, L. Cell-cycle control of a cloned chromosomal origin of replication from Caulobacter crescentus. *J Mol Biol* **226**, 959-977 (1992).
61. Taylor, J.A., Ouimet, M.C., Wargachuk, R. & Marczynski, G.T. The *Caulobacter crescentus* chromosome replication origin evolved two classes of weak DnaA binding sites. *Mol Microbiol* **82**, 312-326 (2011).
62. Collier, J. Regulation of chromosomal replication in *Caulobacter crescentus*. *Plasmid* **67**, 76-87 (2012).
63. Mott, M.L. & Berger, J.M. DNA replication initiation: mechanisms and regulation in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **5**, 343-354 (2007).
64. Siam, R. & Marczynski, G.T. Cell cycle regulator phosphorylation stimulates two distinct modes of binding at a chromosome replication origin. *EMBO J* **19**, 1138-1147 (2000).
65. Laub, M.T., Chen, S.L., Shapiro, L. & McAdams, H.H. Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacte*r cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4632-4637 (2002).
66. Dingwall, A. & Shapiro, L. Rate, origin, and bidirectionality of *Caulobacter* chromosome replication as determined by pulsed-field gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 119-123 (1989).
67. Hendrickson, H. & Lawrence, J.G. Mutational bias suggests that replication termination occurs near the dif site, not at Ter sites. *Mol Microbiol* **64**, 42-56 (2007).
68. Duggin, I.G., Wake, R.G., Bell, S.D. & Hill, T.M. The replication fork trap and termination of chromosome replication. *Mol Microbiol* **70**, 1323-1333 (2008).
69. Iismaa, S.E. & Watson, J.M. A gene upstream of the Rhizobium trifolii nifA gene encodes a ferredoxin-like protein. *Nucleic Acids Res* **15**, 3180 (1987).
70. Roecklein, B., Pelletier, A. & Kuempel, P. The *tus* gene of *Escherichia coli*: autoregulation, analysis of flanking sequences and identification of a complementary system in *Salmonella typhimurium*. *Research in microbiology* **142**, 169-175 (1991).
71. Cui, T. *et al. Escherichia coli* with a linear genome. *EMBO reports* **8**, 181-187 (2007).

72. Wu, L.J., Franks, A.H. & Wake, R.G. Replication through the terminus region of the *Bacillus subtilis* chromosome is not essential for the formation of a division septum that partitions the DNA. *J Bacteriol* **177**, 5711-5715 (1995).
73. Crozat, E. & Grainge, I. FtsK DNA translocase: the fast motor that knows where it's going. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **11**, 2232-2243 (2010).
74. Stouf, M., Meile, J.C. & Cornet, F. FtsK actively segregates sister chromosomes in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 11157-11162 (2013).
75. Gordon, G.S. & Wright, A. DNA segregation in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**, 681-708 (2000).
76. Ebersbach, G. & Gerdes, K. Plasmid segregation mechanisms. *Annu Rev Genet* **39**, 453-479 (2005).
77. Ghosh, S.K., Hajra, S., Paek, A. & Jayaram, M. Mechanisms for chromosome and plasmid segregation. *Annu Rev Biochem* **75**, 211-241 (2006).
78. Eliasson, A., Bernander, R., Dasgupta, S. & Nordstrom, K. Direct visualization of plasmid DNA in bacterial cells. *Mol Microbiol* **6**, 165-170 (1992).
79. Yao, S., Helinski, D.R. & Toukdarian, A. Localization of the naturally occurring plasmid ColE1 at the cell pole. *J Bacteriol* **189**, 1946-1953 (2007).
80. Salje, J. Plasmid segregation: how to survive as an extra piece of DNA. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **45**, 296-317 (2010).
81. Gerdes, K., Howard, M. & Szardenings, F. Pushing and pulling in prokaryotic DNA segregation. *Cell* **141**, 927-942 (2010).
82. Vecchiarelli, A.G., Mizuuchi, K. & Funnell, B.E. Surfing biological surfaces: exploiting the nucleoid for partition and transport in bacteria. *Mol Microbiol* **86**, 513-523 (2012).
83. Hwang, L.C. *et al.* ParA-mediated plasmid partition driven by protein pattern self-organization. *EMBO J* **32**, 1238-1249 (2013).
84. Gerdes, K., Moller-Jensen, J. & Bugge Jensen, R. Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol Microbiol* **37**, 455-466 (2000).
85. Larsen, R.A. *et al.* Treadmilling of a prokaryotic tubulin-like protein, TubZ, required for plasmid stability in *Bacillus thuringiensis*. *Genes Dev* **21**, 1340-1352 (2007).
86. Schumacher, M.A. Structural biology of plasmid segregation proteins. *Current opinion in structural biology* **17**, 103-109 (2007).
87. Vecchiarelli, A.G., Hwang, L.C. & Mizuuchi, K. Cell-free study of F plasmid partition provides evidence for cargo transport by a diffusion-ratchet mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E1390-1397 (2013).
88. Abeles, A.L., Friedman, S.A. & Austin, S.J. Partition of unit-copy miniplasmids to daughter cells. III. The DNA sequence and functional organization of the P1 partition region. *J Mol Biol* **185**, 261-272 (1985).
89. Davey, M.J. & Funnell, B.E. The P1 plasmid partition protein ParA. A role for ATP in site-specific DNA binding. *J Biol Chem* **269**, 29908-29913 (1994).
90. Davey, M.J. & Funnell, B.E. Modulation of the P1 plasmid partition protein ParA by ATP, ADP, and P1 ParB. *J Biol Chem* **272**, 15286-15292 (1997).
91. Gerdes, K., Larsen, J.E. & Molin, S. Stable inheritance of plasmid R1 requires two different loci. *J Bacteriol* **161**, 292-298 (1985).
92. Orlova, A. *et al.* The structure of bacterial ParM filaments. *Nature structural & molecular biology* **14**, 921-926 (2007).

93. Popp, D. *et al.* Molecular structure of the ParM polymer and the mechanism leading to its nucleotide-driven dynamic instability. *EMBO J* **27**, 570-579 (2008).
94. Gayathri P, F.T., Namba K, Löwe J. Structure of the ParM filament at 8.5Å resolution. *J Struct Biol.* **13**, 1047-8477 (2013).
95. Galkin, V.E., Orlova, A., Rivera, C., Mullins, R.D. & Egelman, E.H. Structural polymorphism of the ParM filament and dynamic instability. *Structure* **17**, 1253-1264 (2009).
96. Campbell, C.S. & Mullins, R.D. In vivo visualization of type II plasmid segregation: bacterial actin filaments pushing plasmids. *The Journal of cell biology* **179**, 1059-1066 (2007).
97. Livny, J., Yamaichi, Y. & Waldor, M.K. Distribution of centromere-like parS sites in bacteria: insights from comparative genomics. *J Bacteriol* **189**, 8693-8703 (2007).
98. Yamaichi, Y. & Niki, H. *migS*, a cis-acting site that affects bipolar positioning of *oriC* on the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO J* **23**, 221-233 (2004).
99. Fekete, R.A. & Chattoraj, D.K. A cis-acting sequence involved in chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **55**, 175-183 (2005).
100. Ireton, K., Gunther, N.W.t. & Grossman, A.D. *spo0J* is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**, 5320-5329 (1994).
101. Lewis, R.A., Bignell, C.R., Zeng, W., Jones, A.C. & Thomas, C.M. Chromosome loss from *par* mutants of *Pseudomonas putida* depends on growth medium and phase of growth. *Microbiology* **148**, 537-548 (2002).
102. Fogel, M.A. & Waldor, M.K. A dynamic, mitotic-like mechanism for bacterial chromosome segregation. *Genes Dev* **20**, 3269-3282 (2006).
103. Jakimowicz, D. *et al.* Characterization of the mycobacterial chromosome segregation protein ParB and identification of its target in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **153**, 4050-4060 (2007).
104. Yamaichi, Y., Fogel, M.A. & Waldor, M.K. par genes and the pathology of chromosome loss in Vibrio cholerae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 630-635 (2007).
105. Cervin, M.A. *et al.* A negative regulator linking chromosome segregation to developmental transcription in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **29**, 85-95 (1998).
106. Marston, A.L. & Errington, J. Dynamic movement of the ParA-like Soj protein of *B. subtilis* and its dual role in nucleoid organization and developmental regulation. *Mol Cell* **4**, 673-682 (1999).
107. Quisel, J.D., Lin, D.C. & Grossman, A.D. Control of development by altered localization of a transcription factor in *B. subtilis*. *Mol Cell* **4**, 665-672 (1999).
108. Quisel, J.D. & Grossman, A.D. Control of sporulation gene expression in *Bacillus subtilis* by the chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB). *J Bacteriol* **182**, 3446-3451 (2000).
109. Scholefield, G., Whiting, R., Errington, J. & Murray, H. Spo0J regulates the oligomeric state of Soj to trigger its switch from an activator to an inhibitor of DNA replication initiation. *Mol Microbiol* **79**, 1089-1100 (2011).
110. Scholefield, G., Errington, J. & Murray, H. Soj/ParA stalls DNA replication by inhibiting helix formation of the initiator protein DnaA. *EMBO J* **31**, 1542-1555 (2012).
111. Sullivan, N.L., Marquis, K.A. & Rudner, D.Z. Recruitment of SMC by ParB-parS organizes the origin region and promotes efficient chromosome segregation. *Cell* **137**, 697-707 (2009).

112. Gruber, S. & Errington, J. Recruitment of condensin to replication origin regions by ParB/SpoOJ promotes chromosome segregation in B. subtilis. *Cell* **137**, 685-696 (2009).
113. Mohl, D.A., Easter, J., Jr. & Gober, J.W. The chromosome partitioning protein, ParB, is required for cytokinesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **42**, 741-755 (2001).
114. Thanbichler, M. & Shapiro, L. MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter. Cell* **126**, 147-162 (2006).
115. Kiekebusch, D., Michie, K.A., Essen, L.O., Lowe, J. & Thanbichler, M. Localized dimerization and nucleoid binding drive gradient formation by the bacterial cell division inhibitor MipZ. *Mol Cell* **46**, 245-259 (2012).
116. Toro, E., Hong, S.H., McAdams, H.H. & Shapiro, L. Caulobacter requires a dedicated mechanism to initiate chromosome segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15435-15440 (2008).
117. Ptacin, J.L. *et al.* A spindle-like apparatus guides bacterial chromosome segregation. *Nat Cell Biol* **12**, 791-798 (2010).
118. Schofield, W.B., Lim, H.C. & Jacobs-Wagner, C. Cell cycle coordination and regulation of bacterial chromosome segregation dynamics by polarly localized proteins. *EMBO J* **29**, 3068-3081 (2010).
119. Teleman, A.A., Graumann, P.L., Lin, D.C., Grossman, A.D. & Losick, R. Chromosome arrangement within a bacterium. *Curr Biol* **8**, 1102-1109 (1998).
120. Niki, H., Yamaichi, Y. & Hiraga, S. Dynamic organization of chromosomal DNA in Escherichia coli. *Genes Dev* **14**, 212-223 (2000).
121. Robinett, C.C. *et al.* In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition. *The Journal of cell biology* **135**, 1685-1700 (1996).
122. Gao, F. & Zhang, C.T. Ori-Finder: a web-based system for finding oriCs in unannotated bacterial genomes. *BMC Bioinformatics* **9**, 79 (2008).
123. Jensen, R.B. Analysis of the terminus region of the Caulobacter crescentus chromosome and identification of the dif site. *J Bacteriol* **188**, 6016-6019 (2006).
124. Lobry, J.R. Asymmetric substitution patterns in the two DNA strands of bacteria. *Molecular biology and evolution* **13**, 660-665 (1996).
125. Grant, J.R. & Stothard, P. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res* **36**, W181-184 (2008).
126. Mierzejewska, J. & Jagura-Burdzy, G. Prokaryotic ParA-ParB-parS system links bacterial chromosome segregation with the cell cycle. *Plasmid* **67**, 1-14 (2012).
127. Bigot, S. *et al.* KOPS: DNA motifs that control E. coli chromosome segregation by orienting the FtsK translocase. *EMBO J* **24**, 3770-3780 (2005).
128. Levy, O. *et al.* Identification of oligonucleotide sequences that direct the movement of the Escherichia coli FtsK translocase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17618-17623 (2005).
129. Jensen, R.B., Wang, S.C. & Shapiro, L. A moving DNA replication factory in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J* **20**, 4952-4963 (2001).
130. Reyes-Lamothe, R., Possoz, C., Danilova, O. & Sherratt, D.J. Independent positioning and action of Escherichia coli replisomes in live cells. *Cell* **133**, 90-102 (2008).
131. Heinrich, K. Analyse der Chromosomensegregation in *Hyphomonas neptunium*. *Bachelor Thesis Philipps-Universität Marburg* (2011).

132. Youngren, B., Radnedge, L., Hu, P., Garcia, E. & Austin, S. A plasmid partition system of the P1-P7par family from the pMT1 virulence plasmid of *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **182**, 3924-3928 (2000).
133. Li, Y. & Austin, S. The P1 plasmid in action: time-lapse photomicroscopy reveals some unexpected aspects of plasmid partition. *Plasmid* **48**, 174-178 (2002).
134. Nielsen, H.J., Li, Y., Youngren, B., Hansen, F.G. & Austin, S. Progressive segregation of the Escherichia coli chromosome. *Mol Microbiol* **61**, 383-393 (2006).
135. Lutkenhaus, J. The ParA/MinD family puts things in their place. *Trends Microbiol* **20**, 411-418 (2012).
136. Campos-Garcia, J., L, G.O. & Soberon-Chavez, G. The Pseudomonas aeruginosa hscA gene encodes Hsc66, a DnaK homologue. *Microbiology* **146 (Pt 6)**, 1429-1435 (2000).
137. Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. & Miyata, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* **30**, 3059-3066 (2002).
138. Stamatakis, A., Hoover, P. & Rougemont, J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Systematic biology* **57**, 758-771 (2008).
139. Letunic, I. & Bork, P. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* **23**, 127-128 (2007).
140. Kiekebusch, D. Die P-loop-ATPase MipZ - Mechanismus der Bildung eines Proteingradienten in einer prokaryotischen Zelle. *Dissertation Philipps-Universität Marburg* (2011).
141. Sharma, A.K., Pallesen, L.J., Spang, R.J. & Walden, W.E. Cytosolic iron-sulfur cluster assembly (CIA) system: factors, mechanism, and relevance to cellular iron regulation. *J Biol Chem* **285**, 26745-26751 (2010).
142. Stehling, O. *et al.* Human Nbp35 is essential for both cytosolic iron-sulfur protein assembly and iron homeostasis. *Molecular and cellular biology* **28**, 5517-5528 (2008).
143. Lasocki, K., Bartosik, A.A., Mierzejewska, J., Thomas, C.M. & Jagura-Burdzy, G. Deletion of the *parA* (*soj*) homologue in *Pseudomonas aeruginosa* causes ParB instability and affects growth rate, chromosome segregation, and motility. *J Bacteriol* **189**, 5762-5772 (2007).
144. Spear, A.M., Loman, N.J., Atkins, H.S. & Pallen, M.J. Microbial TIR domains: not necessarily agents of subversion? *Trends Microbiol* **17**, 393-398 (2009).
145. Necsulea, A. & Lobry, J.R. A new method for assessing the effect of replication on DNA base composition asymmetry. *Molecular biology and evolution* **24**, 2169-2179 (2007).
146. Arakawa, K., Suzuki, H. & Tomita, M. Quantitative analysis of replication-related mutation and selection pressures in bacterial chromosomes and plasmids using generalised GC skew index. *BMC genomics* **10**, 640 (2009).
147. Beletskii, A. & Bhagwat, A.S. Transcription-induced mutations: increase in C to T mutations in the nontranscribed strand during transcription in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13919-13924 (1996).
148. Lobry, J.R. & Sueoka, N. Asymmetric directional mutation pressures in bacteria. *Genome biology* **3**, RESEARCH0058 (2002).
149. Grigoriev, A. Analyzing genomes with cumulative skew diagrams. *Nucleic Acids Res* **26**, 2286-2290 (1998).

150. Bernard, R., Marquis, K.A. & Rudner, D.Z. Nucleoid occlusion prevents cell division during replication fork arrest in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **78**, 866-882 (2010).
151. Lin, D.C. & Grossman, A.D. Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site. *Cell* **92**, 675-685 (1998).
152. Kadoya, R., Baek, J.H., Sarker, A. & Chattoraj, D.K. Participation of chromosome segregation protein ParAI of *Vibrio cholerae* in chromosome replication. *J Bacteriol* **193**, 1504-1514 (2011).
153. Saint-Dic, D., Frushour, B.P., Kehrl, J.H. & Kahng, L.S. A parA homolog selectively influences positioning of the large chromosome origin in Vibrio cholerae. *J Bacteriol* **188**, 5626-5631 (2006).
154. Murray, H. & Errington, J. Dynamic control of the DNA replication initiation protein DnaA by Soj/ParA. *Cell* **135**, 74-84 (2008).
155. Ausubel, F.M. *Current protocols in molecular biology*. (Wiley-Interscience New York, pp. v. , 1988).
156. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. *Molecular cloning : a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press,. Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).
157. J, M. *Experiments in Molecular Genetics*. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
1972).
158. Moore, R.L. & Hirsch, P. First generation synchrony of isolated Hyphomicrobium swarmer populations. *J Bacteriol* **116**, 418-423 (1973).
159. KB., M. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* **48(8):579-82.** (1990).
160. Saiki RK, B.T., Horn GT, Mullis KB, Erlich HA Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* **324(6093):163-166** (1986).
161. Laemmli, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227: 680-685** (1970).
162. Towbin H, S.T., Gordon J Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76: 4350-4354** (1979).
163. Grant JR, S.P. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res* **36:W181-W184** (2008).
164. Thanbichler, M., Iniesta, A.A. & Shapiro, L. A comprehensive set of plasmids for vanillate- and xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus. Nucleic Acids Res* **35**, e137 (2007).
165. Carnoy, C. & Roten, C.A. The dif/Xer recombination systems in proteobacteria. *PLoS One* **4**, e6531 (2009).
166. Sciochetti, S.A., Piggot, P.J. & Blakely, G.W. Identification and characterization of the dif Site from Bacillus subtilis. *J Bacteriol* **183**, 1058-1068 (2001).

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Anne Raßbach
Geburtsdatum	05. September 1984
Geburtsort	Altenkirchen (Westerwald)
Familienstand	ledig

Wissenschaftlicher Werdegang

Seit 10/2009 Doktorarbeit	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Jun. Prof. Martin Thanbichler am Max-Planck Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg
10/2007.- 09/2009 Studium	Masterstudiengang “Molecular and Cellular Biology” an der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie Schwerpunkt Mikrobiologie, Biochemie und Genetik
10/2004 - 05/2007 Grundstudium	Bachelorstudiengangs “Biology” an der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie

Schulischer Werdegang

08/1997 - 04/2004 Schule	Realschule und Gymnasium, Kooperative Gesamtschule Altenkirchen

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Chromosomensegregation in *Hyphomonas neptunium*: Das Kamel und das Nadelöhr“

Selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den ___.___.2013 _____

Anne Raßbach

Danksagung

Ich möchte allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Allen voran danke ich Jun.-Prof. Dr. Martin Thanbichler für die Bereitstellung des tollen Themas, seine vielen Ideen für mein Projekt und seine Geduld, wenn es mit Hyphomonas wieder mal nicht richtig vorwärts ging.

Prof. Peter Graumann danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Alexandra Jung, Daniela Kiekebusch, Andrea Koerdt, Katrin Schenk und Torsten Goßmann möchte ich dafür danken, dass sie sich zum Teil mehrfach meine Arbeit korrektur gelesen haben und mir unzählige tolle Anregungen zur Verbesserung dieser Arbeit gegeben haben.

Meinen Kollaborationspartnern Yi-Wei Chang und Grant Jensen (California Institute of Technology, USA) möchte ich für die Erstellung der Kryoelektronentomogramme danken.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Meiner Labornachbarin Sabrina Eisheuer danke ich für die netten Schwätzchen und ihre kompetente Hilfe beim Ausfindigmachen von Denkfehlern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bachelorarbeit von Kristina Heinrich betreut. Bei ihr möchte ich mich für ihre Ausdauer und Geduld bei der Pionierarbeit mit Hyphomonas bedanken.

Bei Katrin und Andrea möchte ich mich für die netten Mittagessen und die vielen tollen Spieleabende mit euch zwei verrücken Weibern bedanken. Marburg wäre nur halb so schon ohne euch.

Meinen Freunden Torsten, Kirsten, Louise, Arne, Marcus, Irene, Benni, Thomas, Sonja, Katrin, Lukas, Harry und Andrea danke ich für die kapitalen Abenteuer, die wir mit leichtem Gepäck und Paddel heil überstanden haben.

Zu guter Letzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern und meinen beiden Schwestern für ihre Unterstützung und meinem Freund Manuel danke ich für seine Leidensfähigkeit und alles andere.