

**Molekulargenetische Charakterisierung von Untereinheiten des
Cytochrom b_6f -Komplexes von Cyanobakterien der Gattung
*Anabaena***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Matthias Arnold
aus Regensburg
Regensburg, 2001

Promotionsgesuch eingereicht am: 23.10.2001

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Günter Hauska

Prüfungsausschuß:

Prof. Dr. Wolfgang Oertel (Vorsitzender)

Prof. Dr. Günter Hauska (1. Gutachter)

Prof. Dr. Peter Hegemann (2. Gutachter)

Prof. Dr. Reinhard Wirth (3. Prüfer)

	Seite
I Inhaltsverzeichnis	i-iii
II Abkürzungsverzeichnis	iv-v
III Zusammenfassung	vi
1 Einleitung	2-10
1.1 Photosynthese	1
1.2 Verwandtschaft der Cytochrom <i>b₆f</i> - und <i>bc</i> -Komplexe	2
1.3 Cytochrom <i>b₆f</i> -Komplex	2
1.4 Funktion des <i>b₆f</i> -Komplexes	3
1.5 Untereinheiten des <i>b₆f</i> -Komplexes	4
1.5.1 Cytochrom <i>b₆</i> (PetB)	5
1.5.2 Untereinheit IV (PetD)	6
1.5.3 Rieske FeS-Protein (PetC)	6
1.5.4 Cytochrom <i>f</i> (PetA)	7
1.5.5 Weitere Untereinheiten	8
1.5.6 Zusätzliche Komponenten	8
1.6 Cyanobakterieller Elektronentransport	9
1.7 Heterocystendifferenzierung bei <i>Anabaena</i>	10
1.8 Ziele der Arbeit	12
2 Ergebnisse	13-34
2.1 Die <i>pet</i> -Gene von <i>Anabaena variabilis</i>	13
2.1.1 "Southern Blot" Analysen	13
2.1.2 PCR-Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung der <i>pet</i> -Gene	13
2.2 Die <i>pet</i> -Gene von <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	13
2.3 Sequenzanalyse	14
2.3.1 Kleine Untereinheiten	14
2.3.2 Die Rieske-Isoformen	16
2.3.2.1 Vorkommen von Rieske-Isoformen in Cyanobakterien	18
2.4 Charakterisierung der kleinen Untereinheiten und der Rieske-Isoformen von <i>Anabaena</i> PCC 7120	20
2.4.1 Expressionsstudien	20
2.4.1.1 RT-PCR	21
2.4.1.2 Reporterstudien mit GFP	24
2.4.2 Reinigung des <i>b₆f</i> -Komplexes	25
2.4.3 Erzeugung von Deletionsmutanten	25
2.4.3.1 Konstruktion von Deletionsmutanten der kleinen Untereinheiten	27
2.4.3.1.1 Die <i>petG</i> -Deletion	27
2.4.3.1.2 Die <i>petM</i> -Deletion	27
2.4.3.1.3 Die <i>petN</i> -Deletion	27
2.4.3.2 Konstruktion von Deletionsmutanten der Rieske-Gene	28
2.4.3.2.1 Die <i>petC1</i> -Deletion	28
2.4.3.2.2 Die <i>petC2</i> -Deletion	28
2.4.3.2.3 Die <i>petC3</i> -Deletion	28
2.4.3.2.4 Die <i>petC4</i> -Deletion	29
2.4.4 Analyse des Genotyps der <i>pet</i> -Mutanten mittels PCR und "Southern Blot"	29
2.4.5 Phänotyp der <i>pet</i> -Mutanten	32
2.4.5.1 Wachstumskurven	32
2.4.5.2 Wachstum auf N ₂	32
2.4.5.3 Diaminobenzidin-Färbung	33
2.5 Komplementation der Δ <i>petC4</i> -Mutante	34
2.5.1 Konstruktion des <i>petC4</i> Komplementationsvektors	34
2.5.2 Phänotyp des Stammes Δ <i>petC4</i> (pMA220)	34
3 Diskussion	35-46
3.1 Identifizierung und Charakterisierung der kleinen Untereinheiten in <i>Anabaena</i> sp.	35

3.1.2	Deletion der kleinen Untereinheiten in <i>Anabaena</i> PCC 7120	36
3.1.3	Funktion der kleinen Untereinheiten	36
3.2	Identifizierung und Charakterisierung von mehreren Rieske FeS-Proteinen in <i>Anabaena</i> sp.	37
3.2.1	Auftreten von Rieske-Isoformen in anderen Organismen	38
3.2.2	Expressionsstudien	39
3.2.3	Redoxpotentiale der Rieske-Isoformen	40
3.2.4	Deletion der <i>petC</i> -Gene	42
3.2.5	Mögliche Funktionen der Rieske-Isoformen	44
3.2.6	Regulatorische Funktion des Cytochrom <i>b₆f</i> -Komplexes	46
4	Material und Methoden	47-63
4.1	Material	47
4.1.1	Organismen	47
4.1.1.1	Cyanobakterien	47
4.1.1.2	<i>Escherichia coli</i>	47
4.1.2	Plasmide	48
4.1.3	Chemikalien und Materialien	50
4.2	Molekularbiologische Methoden	51
4.2.1	Standardmethoden	51
4.2.2	Plasmid-Präparationen aus <i>E. coli</i>	51
4.2.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	51
4.2.4	Isolierung genomischer DNA aus <i>Anabaena</i>	51
4.2.5	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Anabaena</i>	52
4.2.6	Herstellung kompetenter Zellen	53
4.2.7	Transformation	53
4.2.8	PCR (Polymerase Chain Reaction)	53
4.2.9	RT-PCR	56
4.2.9.1	cDNA Synthese	56
4.2.9.1	Amplifikation der cDNA mittels PCR	57
4.2.10	Inverse PCR	57
4.2.11	DNA-Sequenzierung und Sequenzauswertung	57
4.2.12	Markierung von DNA-Sonden	57
4.2.13	“Southern Blot“ Analyse	58
4.2.14	Gezielte Mutagenese von <i>Anabaena</i>	58
4.2.14.1	Konjugation von <i>Anabaena</i> und <i>E. coli</i>	58
4.2.14.2	Übertragung von Integrationsvektoren und Selektion auf Doppelte Rekombination	59
4.3	Biochemische Methoden	59
4.3.1	Chlorophyllbestimmung bei <i>Anabaena</i>	59
4.3.2	Heterocysteninduktion bei <i>Anabaena</i>	59
4.3.3	Färbung mit Diaminobenzidin	60
4.3.4	Heterocystenisolierung aus <i>Anabaena</i>	60
4.3.5	Schnellaufschluß von <i>Anabaena</i> -Zellen	60
4.3.6	Anreicherung des <i>b₆f</i> -Komplexes	60
4.3.7	Proteinisolierung aus <i>Anabaena</i>	61
4.3.8	Proteinbestimmung	61
4.3.9	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	61
4.3.9.1	SDS-PAGE	61
4.3.9.2	SDS-Harnstoff-PAGE	61
4.3.8.3	Coomassie-Färbung	61
4.3.10	“Western Blot“ Analyse	62
4.4	Biophysikalische Methoden	62
4.4.1	UV/Vis-Spektroskopie	62
4.4.2	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	62
4.4.3	Differenzspektroskopie zur Konzentrationsbestimmung der Cytochrome <i>b</i> und <i>f</i>	62
4.4.4	Aktivitätsmessung des <i>b₆f</i> -Komplexes	63

5 Literaturverzeichnis	64-75
6 Anhang	76-93
6.1 In Genbanken übermittelte Sequenzen	76
6.2 Sequenzen der Gene von <i>Anabaena variabilis</i> sp. ATCC 29413 und flankierender Bereiche	76
6.2.1 <i>A. variabilis</i> <i>petBD</i> -Operon	76
6.2.2 <i>A. variabilis</i> <i>petC1A</i> -Operon	77
6.2.3 <i>A. variabilis</i> <i>petC2</i>	79
6.2.4 <i>A. variabilis</i> <i>petC3</i>	80
6.2.5 <i>A. variabilis</i> <i>petG</i>	81
6.2.6 <i>A. variabilis</i> <i>petM</i>	82
6.2.7 <i>A. variabilis</i> <i>petN</i>	82
6.3 Sequenzen der Gene von <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 und flankierender Bereiche	82
6.3.1 <i>Anabaena</i> PCC 7120 <i>petBD</i> -Operon	82
6.3.2 <i>Anabaena</i> PCC 7120 <i>petC1A</i> -Operon	84
6.3.3 <i>Anabaena</i> PCC 7120 <i>petC2</i>	86
6.3.4 <i>Anabaena</i> PCC 7120 <i>petC3</i>	88
6.3.5 <i>Anabaena</i> PCC 7120 <i>petC4</i>	89
6.3.6 <i>Anabaena</i> PCC 7120 <i>petG</i>	91
6.3.7 <i>Anabaena</i> PCC 7120 <i>petM</i>	92
6.3.8 <i>Anabaena</i> PCC 7120 <i>petN</i>	93

II Abkürzungsverzeichnis

<i>A. variabilis</i>	<i>Anabaena variabilis</i> FD ATCC 29413
A+A	Medium nach Allen und Arnon
Ab	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
<i>Anabaena</i> PCC 7120	<i>Anabaena</i> sp. Stamm PCC 7120
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
<i>b₆f</i> -Komplex	Cytochrom <i>b₆f</i> -Komplex
Bm	Bleomycin
bom	„basis of mobility“
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CIP	„Calf Intestinal Phosphatase“
Cm	Chloramphenicol
DAB	Diaminobenzidin
Dab ⁺	Fähigkeit zur Oxidation von Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
<i>dev</i>	„development“
DIG	Digoxygenin
DR	Doppelrekombinante
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und weitere
EtBr	Ethidiumbromid
Fd	Ferredoxin
Fix ⁺	Fähigkeit zur N ₂ -Fixierung unter anaeroben Bedingungen
FNR	Ferredoxin-NADP ⁺ -Oxidoreduktase
Fox ⁺	Fähigkeit zur N ₂ -Fixierung unter aeroben Bedingungen
h	Stunde
Hen ⁺	Besitz einer intakten Heterozystenhülle
Hep ⁺	Besitz einer intakten Polysaccharidhülle
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
Het ⁺	Fähigkeit zur Proheterozystenbildung
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
LB	Luria Broth
LHCII	„light harvesting complex“ II
M	Molar
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
Nm	Neomycin
NTA	Nitrilo-tri-Essigsäure
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
Oligon.	Oligonukleotid(e)
oriT	„origin of Transfer“
oriV	Replikationsursprung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pc	Plastocyanin
PCC	Pasteur Culture Collection

PCR	Polymerase Kettenreaktion
pet	“photosynthetic electron transport”
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
psi	pound per square inch (1psi = 6896 Pa)
PQ	Plastoquinon
Q	Quinon
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sec	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sm	Streptomycin
Sp	Spectinomycin
SR	Einfachrekombinante
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tc	Tetracyclin
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TrisCl	Tris-Puffer, pH mit Salzsäure eingestellt
U	Unit
UE	Untereinheit
ÜN	über Nacht
Vol	Volumina
W	Watt
WT	Wildtyp

III Zusammenfassung

Cyanobakterielle Cytochrom b_6f -Komplexe sind gemeinsamer Bestandteil sowohl des photosynthetischen als auch des respiratorischen Elektronentransports und spielen dadurch eine zentrale Rolle bei der Energieumwandlung der Zelle. Der b_6f -Komplex katalysiert den Elektronentransfer von Plastochinol zu Plastocyanin oder Cytochrom c_{553} , wobei es gleichzeitig zu einer elektrogenen Translokation von Protonen über die Thylakoidmembran kommt. Funktionell analoge bc -Komplexe findet man in den Elektronentransportketten der Atmung und Photosynthese in Bakterien, höheren Pflanzen und Algen.

Schon lange gibt es Hinweise auch auf eine regulatorische Rolle des b_6f -Komplexes. Besonders interessant sind Untersuchungen in dieser Hinsicht bei einigen Vertretern filamentbildender Cyanobakterien wie *Anabaena* sp., die auf Mangel an gebundenem Stickstoff mit einem Differenzierungsprozess reagieren. Bei Stickstoffmangel entstehen innerhalb der Filamente die auf die N_2 -Fixierung spezialisierten Heterocysten. Neben der Ausbildung einer zusätzlichen Hülle als Diffusionsbarriere gegen Sauerstoff kommt es auch zu massiven Veränderungen in den Elektronentransportketten. Die Inaktivierung von PS II und eine erhöhte Atmungsaktivität garantieren die Entstehung eines mikroaeroben Klimas in der Heterocyste, das eine Aktivität der sauerstoffsensitiven Nitrogenase ermöglicht. Zusätzlich gewährleistet ein verstärkter zyklischer Elektronentransport um PSI und den b_6f -Komplex die Deckung des erhöhten Energiebedarfes.

In der vorliegenden Arbeit konnten die Sequenzen der Gene für die Untereinheiten des b_6f -Komplexes von *Anabaena variabilis* und *Anabaena* PCC 7120 ermittelt werden. Der Schwerpunkt der Charakterisierung wurde auf diejenigen Untereinheiten gelegt, die wie die kleinen Untereinheiten (PetG, PetM und PetN) entweder nicht unmittelbar an den Redoxprozessen beteiligt sind, oder aber wie das Rieske FeS-Protein (PetC) in mehreren Isoformen auftreten.

Alle vier abgeleiteten PetC-Proteine in *Anabaena* PCC 7120 weisen die charakteristischen Merkmale von Rieske FeS-Proteinen auf. Die gezeigte Transkription spricht für eine Expression aller vier Gene bei *Anabaena* PCC 7120. Zumindest PetC1 ist auch assoziierte Untereinheit des b_6f -Komplexes, wahrscheinlich sind aber auch alle alternativen Proteine wie bei *Synechocystis* PCC 6803 Untereinheiten eines b_6f -Komplexes. Die Funktion von heterologen b_6f -Komplexen mit alternativen Rieske-Untereinheiten ist bisher allerdings ungeklärt.

Deletionsmutanten der kleinen Untereinheiten und der Rieske-Isoformen wurden bei der weiteren Funktionsanalyse insbesondere auf ihre Rolle während des Differenzierungsprozesses untersucht. Während die erfolgreich generierten $\Delta petM$ -, $\Delta petC2$ - und $\Delta petC3$ -Stämme von *Anabaena* sp. PCC 7120 phänotypisch keine Unterschiede zum WT zeigten, ist die Deletion von $petC4$ unter Stickstoffmangelbedingungen letal. Ohne PetC4 ist in *Anabaena* PCC 7120 die Differenzierung einer vegetativen Zelle zur Heterocyste in einem sehr frühen Stadium arretiert und eine N_2 -Fixierung unter aeroben Wachstumsbedingungen nicht möglich.

1 Einleitung

1.1 Photosynthese

Die Photosynthese ist der treibende Prozess des Lebens auf der Erde. Fast alle Lebensformen beruhen direkt oder indirekt auf diesem Prozess der Energiegewinnung. Dabei wandeln höhere Pflanzen und photosynthetische Bakterien die Lichtenergie der Sonne in chemisch gebundene Energie um.

Einzelne Lichtquanten werden von Antennenpigmenten absorbiert und zu den sogenannten Reaktionszentren weitergeleitet. In den Reaktionszentren findet die photoinduzierte Ladungstrennung statt, wobei Elektronen durch die Photosynthesemembran transportiert werden können. Meistens ist der Elektronentransport an einen Protonentransport gekoppelt, durch den über die Membran ein elektrochemisches Potential aufgebaut wird. Diese in der "Lichtreaktion" gespeicherte Energie wird in den folgenden "Dunkelreaktionen" in Reduktions- bzw. Energieäquivalente umgewandelt, die dann u. a. zur Assimilation von Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel zur Verfügung stehen.

Der photosynthetische Elektronentransport in Cyanobakterien und den Chloroplasten höherer Pflanzen und Algen ist in den Thylakoidmembranen lokalisiert und besteht aus integralen und peripheren Proteinen, an die Pigmente und redoxaktive prosthetische Gruppen gebunden sind. Diese Proteine sind in drei integralen Membrankomplexen organisiert: Photosystem I (PSI), Photosystem II (PSII) und dem Cytochrom b_6f -Komplex (b_6f -Komplex), die durch in der Membran bewegliche Komponenten miteinander verknüpft sind. Zusätzlich tritt in Thylakoidmembranen von Chloroplasten noch der mit den beiden Photosystemen assoziierte Antennenkomplex (LHCII) des PSII auf, dessen Funktion bei Cyanobakterien von den Phycobilisomen ausgeführt wird. Die ATP-Synthase, als weiterer Membrankomplex, nutzt die Energie des im Elektronentransport erzeugten elektrochemischen Potentials zur Synthese von ATP.

Im folgenden werden einige Grundlagen der primären Prozesse der Photosynthese skizziert.

Das durch einen Lichtquant angeregte Chlorophyll a -Dimer ("special pair") führt im Reaktionszentrum des PSII eine Ladungstrennung durch. $P680^*$ wird zu $P680^+$ oxidiert und Phaeophytin reduziert. Das stark positive Redoxpotential (~ 1000 mV) des oxidierten primären Elektronendonors $P680^+$ wird auf einen vier Manganatome enthaltenden Komplex des PSII (Bricker 1996) übertragen, in welchem dann einzelnen Wassermolekülen schrittweise Elektronen entzogen werden. Dadurch kommt es zur Freisetzung von Protonen und molekularem Sauerstoff an der lumenalen Seite des PSII.

Der primäre Elektronenakzeptor Phaeophytin reduziert ein gebundenes Plastochinon (Q_A) zum Semichinon. Dieses überträgt das Elektron auf ein weiteres Plastochinon (Q_B), das nahe der stromalen Seite der Thylakoidmembran vom PSII gebunden wird. Nach erneuter Anregung des special pairs, Aufnahme eines weiteren Elektrons und doppelter Protonierung verlässt Q_B als neutrales Plastochinol (QH_2) seine Bindungsstelle und diffundiert in die umgebende Lipidschicht. Ersetzt wird es durch ein Plastochinon aus dem membraninternen Plastochinonpool. Das QH_2 wird vom Cytochrom b_6f -Komplex reoxidiert, welcher Plastocyanin (Pc) oder Cytochrom c_{553} reduziert. Nach dem Modell des modifizierten Q-Zyklus (Mitchell, 1976, Trumpower, 1990) werden dabei

insgesamt vier Protonen pro Elektron in das Thylakoidlumen abgegeben. Die Funktion des b_6f -Komplexes wird später noch im Detail beschrieben.

Im Reaktionszentrum des PSI findet im Licht die primäre Ladungstrennung des angeregten Chlorophyll a -Dimers P700* statt. Dieses wird zu P700⁺ oxidiert, ein monomeres Chlorophyll a (A_0) als primärer Akzeptor reduziert. Die Elektronen zur Rereduktion seines oxidierten Reaktionszentrums P700⁺ erhält PSI von dem vom b_6f -Komplex reduzierten Plastocyanin oder Cytochrom c_6 .

Vom A_0 wird im PSI über ein Naphtochinon (A_1) ein [4Fe4S]-Cluster auf der stromalen Seite reduziert. Das [4Fe4S]-Zentrum reduziert über zwei weitere gebundene [4Fe4S]-Zentren das peripher und beweglich angedockte Ferredoxin (Fd) (in Cyanobakterien auch alternativ Flavodoxin). Vom [2Fe2S]-Cluster des Ferredoxins schließlich werden im nichtzyklischen Elektronentransport die Elektronen von der Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase (FNR) auf NADP⁺ übertragen, wobei noch zwei Protonen aus dem Cytoplasma aufgenommen werden. Alternativ kann das vom PSI abgegebene Elektron im zyklischen Elektronentransport den Cytochrom b_6f -Komplex reduzieren. Dabei sind nur das PSI und der b_6f -Komplex, nicht aber PSII beteiligt. Unbekannt ist, wie der Elektronenkreislauf zwischen dem PSI und dem b_6f -Komplex zustande kommt (Bendall und Manasse, 1995; Heimann und Schreiber, 1999). In höheren Pflanzen (Spinat) soll FNR eine assoziierte Untereinheit des b_6f -Komplexes sein und über Ferredoxin das Bindeglied zwischen PSI und dem b_6f -Komplex beim cyclischen Elektronentransport bilden. In Cyanobakterien ist die FNR jedoch kein Bestandteil des Komplexes (Zhang et al., 2001).

1.2 Verwandtschaft der Cytochrom b_6f - und bc -Komplexe

Funktionsanalog zum Cytochrom b_6f -Komplex aus Chloroplasten und Cyanobakterien sind der mitochondriale Cytochrom bc_1 -Komplex und der bakterielle Cytochrom bc -Komplex. Sie koppeln in vergleichbarer Weise die Redoxenergien von Elektronentransportprozessen an die Translokation von Protonen durch Membranen. Die so als chemiosmotischer Protonengradient gespeicherte Energie der Oxidations- und Reduktionsreaktionen treibt dann z.B. die Synthese von ATP durch die ATP-Synthase.

Strukturelle, funktionelle und phylogenetische Ähnlichkeiten zwischen den Komplexen der Cytochrom bc -Familie sind vielfältig beschrieben worden. Dazu gehören neben Homologien der DNA- bzw. Proteinsequenz (Hauska et al., 1988; Widger und Cramer, 1991) auch die identische Stöchiometrie der redoxaktiven Zentren (Hauska et al., 1983) und deren Orientierung in der Membran. Auch die Mechanismen des Elektronen- und Protonentransfers (Trumpower, 1990) sind vergleichbar.

1.3 Cytochrom b_6f -Komplex

Der b_6f -Komplex stellt wie oben erwähnt als Plastochinol:Plastocyanin Oxidoreduktase die Verbindung zwischen den beiden Reaktionszentren von PSII und PSI her, indem er Elektronen vom Plastochinol auf entweder Plastocyanin oder Cytochrom c_{553} überträgt. Die Oxidation von Plastochinol durch den b_6f -Komplex ist die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion im photosynthetischen Elektronentransport (Witt, 1971; Lee und Whitmarsh, 1989). Aus diesem Grund ist der b_6f -Komplex ein potentieller Regulationspunkt der Elektronentransportketten.

In den letzten Jahren ist das Verständnis der Struktur und Funktion des b_6f -Komplexes sehr weit fortgeschritten. Dazu beigetragen hat auch die enge Verwandtschaft zwischen b_6f - und den funktionsanalogen bc -Komplexen. Während die Struktur der mitochondrialen bc_1 -Komplexe aus Rinderherz (Xia et al., 1997; Iwata et al., 1998) und Huhn (Zhang et al., 1998) mittels Röntgenkristallographie schon bestimmt werden konnten, gibt bisher nur hochaufgelöste Kristallstrukturen einzelner hydrophiler Domänen des b_6f -Komplexes. So ist erst die dreidimensionale Struktur der lumenalen Domäne des Rieske-Proteins aus Spinat (Carrell et al., 1997) sowie die extrinsische Domäne des Cytochrom f der Steckrübe (Martinez et al., 1994), aus *C. reinhardtii* (Chi et al., 2000) und dem Cyanobakterium *Phormidium laminosum* (Carrell et al., 1999) bekannt.

Funktionell scheint der b_6f -Komplex in dimerer Form vorzuliegen (Breyton et al., 1997). Alle bisher in aktiver Form gereinigten Komplexe lagen als Dimer vor. Kristallographische Informationen über die Struktur dieses Dimers beschränken sich bisher auf zweidimensionale Kristalle von *C. reinhardtii* mit einer Auflösung von ca. 8-9 Å (Mosser et al., 1997; Bron et al., 1999).

1.4 Funktion des b_6f -Komplexes

Über die katalytische Aktivität des b_6f -Komplexes wird immer noch kontrovers diskutiert. Am weitesten akzeptiert ist der von Mitchell (1976) vorgeschlagene und von Crofts et al. (1983) und Trumpower (1990) modifizierte Mechanismus des Q-Zyklus (Abb. 1.1). Ursprünglich ist dieser Mechanismus für die Cytochrom bc -Komplexe vorgeschlagen worden und ist mit geringen Unterschieden auch auf den Cytochrome b_6f -Komplex übertragbar.

Die entscheidende Teilreaktion des Elektronen- und Protonentransports im Q-Zyklus ist die Verzweigung des Elektronenflusses bei der Oxidation von Plastochinol. So können im b_6f -Komplex wie auch in bc -Komplexen zwei Elektronentransportwege unterschieden werden. Dies sind zum einen der "high potential" Weg über das Rieske FeS-Protein und Cytochrom f , die beide ein sehr hohes Redoxpotential von etwa +300 mV besitzen, und zum anderen der "low potential" Weg über die beiden Hämgruppen des Cytochroms b_6 mit deutlich geringeren Redoxpotentialen von ca. -150 bzw. -50 mV.

Abbildung 1 zeigt im Detail den Mechanismus des Q-Zyklus im Elektronentransport. Voraussetzung für diesen Mechanismus sind zwei getrennte Bindungsstellen für die Oxidation bzw. Reduktion des Chinol(n)s. An der Q_o -Bindestelle ("o" für "outside" oder "oxidation") wird das relativ inerte Plastochinol vom Rieske FeS-Protein oxidiert, das seinerseits das Elektron an das Cytochrom f und Plastocyanin überträgt. Das entstandene hochreaktive Semihydrochinon reduziert die Hämgruppe des Cytochrom b_6 mit niedrigerem Redoxpotential ("low potential" oder b_{6L}) und zwar schneller als das Rieske FeS-Protein vom Cytochrom f oxidiert wird. Auf diese Weise kommt es zu einer Aufspaltung des Elektronenflusses. Das Elektron vom Cytochrom b_{6L} wird über die Hämgruppe des Cytochrom b_6 mit dem höheren Redoxpotential ("high potential" oder b_{6H}) auf Plastochinon übertragen, das an der Q_i -Bindestelle ein relativ stabiles Semichinon bildet. Zur Vervollständigung des Q-Zyklus wird dieser gesamte Prozess wiederholt und nach Aufnahme eines zweiten Elektrons diffundiert das Plastochinol von der Q_i -Bindestelle ("i" für "inside") in den Plastochinonpool ab, wandert wieder auf die andere Membranseite und wird in gleicher Weise oxidiert. Pro Zyklus werden so für zwei vom PSII auf PSI übertragene Elektronen zusätzlich Protonen durch die Membran transportiert (Abb. 1.1), die zu einer erhöhten ATP-Bildung beitragen. Neben den bei der Reduktion von Q_B auf der Matrix zugewandten

Seite aufgenommen und bei der Oxidation des Plastochinols an der Q_o -Bindestelle in den Thylakoidinnenraum entlassenen zwei Protonen werden weitere Protonen bei der Reduktion von Plastochinon durch Cytochrom b_{6H} auf der Matrixseite aufgenommen und ebenfalls an der gegenüberliegenden Seite der Membran bei der Oxidation wieder freigesetzt.

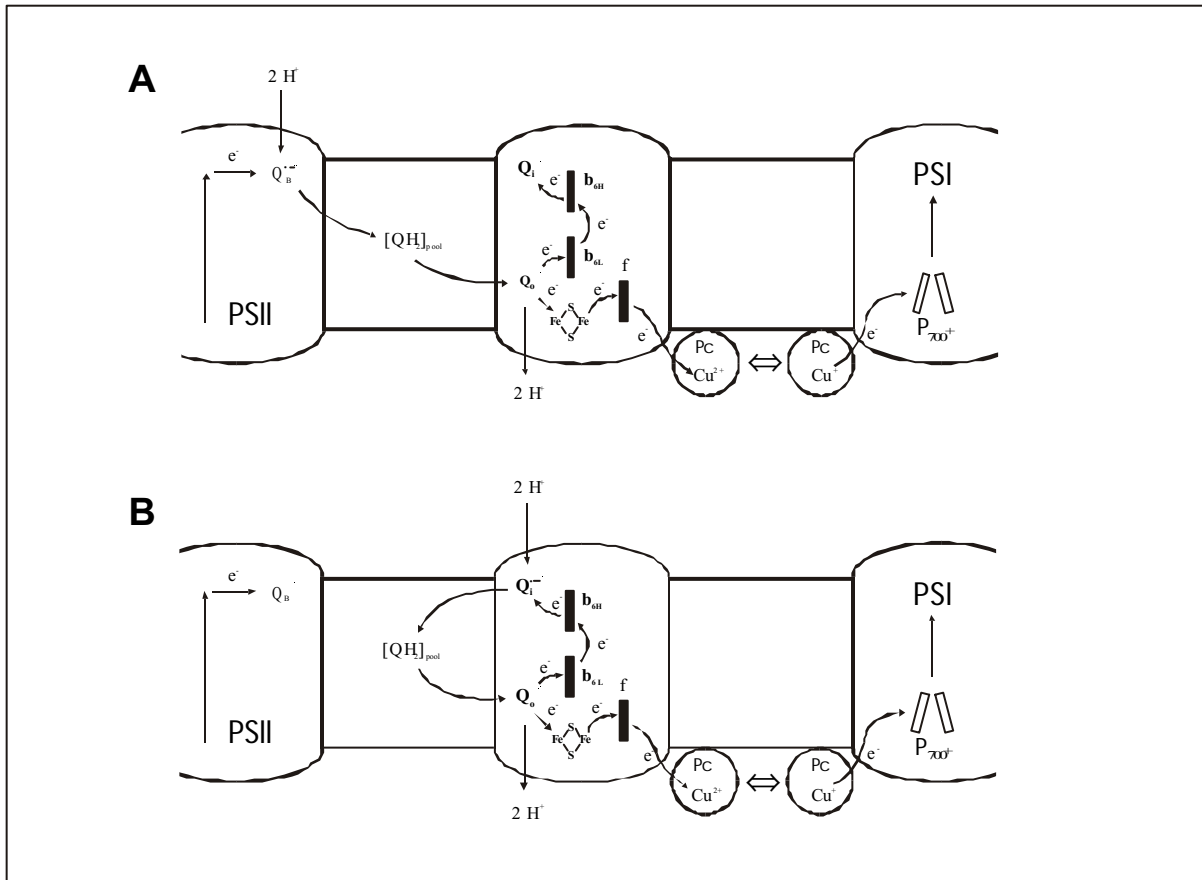


Abbildung 1.1: Q-Zyklus im photosynthetischen Elektronentransport. A und B zeigen zwei aufeinander folgende Reaktionsschritte, die einen vollständigen Q-Zyklus ausmachen. Alternativ zu Plastocyanin kann in Cyanobakterien Cytochrom c_{553} als Elektronenakzeptor fungieren. Weitere Erläuterungen im Text. Nach Hauska und Arnold (2000).

Der Cytochrom b_6f -Komplex besitzt neben seiner zentralen Rolle während der photosynthetischen Energieumsetzung auch eine regulatorische Bedeutung (Hauska et al., 1996; Kallas, 1994). Er wirkt als Sensor des Reduktionsgrades im Plastochinonpool und reguliert dadurch über eine Proteinkinase (LHCII-Kinase) die Quantenverteilung auf Photosystem I und II. (Allen, 1992; Vener et al., 1997; Zito et al., 1999). Eine Regulation könnte aber nicht nur über die rasche Enzymaktivierung erfolgenden, sondern auch durch eine langsamere, über Genexpression gesteuerte Anpassung vonstatten gehen (Allen et al., 1995, Murakami und Fujita, 1993; Wollman, 1999; Keren und Ohad, 1999).

1.5 Untereinheiten des b_6f -Komplexes

Der Kern des Cytochrom b_6f -Komplexes besteht aus vier großen Untereinheiten (MW >16 kDa). Dabei handelt es sich um Cytochrom f (PetA), Cytochrom b_6 (PetB), das Rieske FeS-Protein (PetC) und die Untereinheit IV (PetD). Mit Ausnahme der Untereinheit IV binden alle redoxaktive Cofaktoren.

lokalisiert während das "high-potential" Häm (b_{6H}) mit einem Redoxpotential von -50 mV auf der anderen Membranseite liegt. Auch spektroskopisch sind die beiden Hämgruppen deutlich voneinander zu unterscheiden (Nitschke et al., 1988; Hauska et al., 1989).

Die nicht kovalente Bindung der beiden Hämgruppen wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Kuras et al. (1997) konnten zeigen, dass die Bande des Cytochrom b_6 Proteins aus *C. reinhardtii* nach einer denaturierenden Gelelektrophorese und Hämfärbung immer noch anzusprechen war. Möglicherweise ist zumindestens eine Hämgruppe kovalent an das Protein gebunden. Zusammen mit Untereinheit IV ist PetB an der Bildung der Chinonbindestellen beteiligt (Poggese et al., 1997).

1.5.2 Untereinheit IV (PetD)

PetD mit einer molaren Masse von etwa 17 kDa besteht aus drei transmembranen α -Helices und besitzt als einzige der großen Untereinheiten keine redox-aktiven Gruppen (E-F in Abb. 1.2). Funktionell ist die Untereinheit IV an der Bildung der beiden Chinonbindestellen beteiligt. Bei *C. reinhardtii* konnte die Beteiligung dieses Proteins an der Aktivierung der LHCI-Kinase gezeigt werden (Zito et al., 1999).

Die Untereinheit IV ist stark homolog zum C-terminalen Bereich des Cytochrom b -Proteins aus Cytochrom bc_1 -Komplexen. Da auch zwischen Cytochrom b_6 und dem N-Terminus von Cytochrom b große Homologien bestehen, wird postuliert, dass die beiden Untereinheiten im Laufe der Evolution aus einer Spaltung eines Cytochrom b Proteins hervorgegangen sind (Widger et al., 1984; Hauska et al., 1988).

1.5.3 Rieske FeS-Protein (PetC)

Das Rieske FeS-Protein ist der primäre Oxidant des Plastochinols. Es besitzt eine molare Masse von etwa 20 kDa und besteht aus einer großen lumenalen Domäne, die über eine Transmembranhelix im N-Terminus des Proteins in der Membran verankert ist. Die lumenale Domäne aus Spinat konnte strukturell bis auf $1,8 \text{ \AA}$ aufgelöst werden (Carrell et al., 1997). Diese Kristallstruktur bestätigte die Koordination des $[2Fe_2S]$ -Cluster über zwei streng konservierte Histidin- und zwei Cystein-Reste. Wahrscheinlich ist diese Koordinierung die Ursache für das hohe Redoxpotential von etwa $+300$ mV. Zuerst beschrieben wurde ein solch gebundenes $[2Fe_2S]$ -Cluster als Bestandteil des mitochondrialen bc_1 -Komplexes anhand EPR-spektroskopischer Untersuchungen (Rieske et al., 1964). Diese Entdeckung war letztendlich auch für die Namensgebung dieser Proteinfamilie verantwortlich.

Nach neuesten Erkenntnissen besitzt das Rieske FeS-Protein in bc -Komplexen eine erstaunliche strukturelle Besonderheit. Das Protein trat in Kristallen von bc_1 -Komplexen aus Mitochondrien je nach verwendetem Inhibitor in drei unterschiedlichen Orientierungen auf (Zhang et al., 1998). Abhängig vom an der Q_o -Bindestelle gebundenen Inhibitor konnte die lumenale Domäne des Rieske FeS-Proteins in verschiedenen Konformationen beobachtet werden (Abb. 1.3). Bei Bindung von Stigmatellin befindet sich die flexible Domäne in der "proximalen" Position, die eine Elektronenübertragung von gebundenem Chinol erlaubt. Myxothiazol-Bindung verursacht eine Konformationsänderung der Rieske-Domäne in die "distale" Position, die näher an der Hämgruppe

des Cytochroms *c* liegt (Brugna et al., 2000). In Abwesenheit eines Inhibitors wird entweder eine Mittelstellung (Kim et al., 1998; Iwata et al., 1998; Xia et al., 1997) oder die "distale" Position eingenommen (Zhang et al., 1998). Aus diesen Daten kann eine pendelnde Bewegung der lumenalen Domäne des Rieske FeS-Proteins abgeleitet werden, mit der Elektronen vom Quinol zum Cytochrom transportiert werden. Breyton (2000) konnte eine Domänenbewegung bei Bindung von Stigmatellin auch beim *b₆f*-Komplex aus *C. reinhardtii* zeigen. Es muss also beim *b₆f*-Komplex ein analoger Mechanismus angenommen werden. Allerdings treten im Gegensatz zu dem Mechanismus bei *bc₁*-Komplexen noch zusätzliche Konformationsänderungen im Komplex auf, die nicht nur durch die Bewegung des Rieske FeS-Proteins erklärt werden können.

Sehr wahrscheinlich wird die redoxabhängige Aktivierung der LHCII-Kinase über die Konformationsänderung des Rieske-Membranankers infolge der Domänenbewegung des Rieske FeS-Proteins gesteuert (Zito et al., 1999; Vener et al., 1997; Vener et al., 1998).

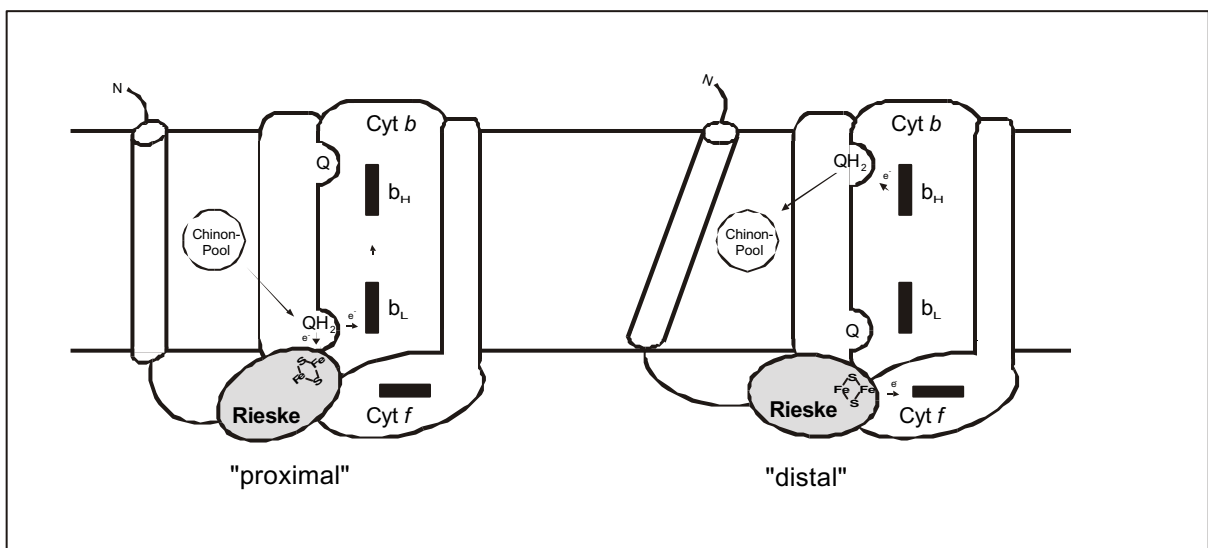


Abbildung 1.3: Modell der Domänenbewegung des Rieske FeS-Proteins. Nähere Erläuterungen im Text.

1.5.4 Cytochrom *f* (PetA)

Cytochrom *f* besitzt eine Hämgruppe des α -Typs und ist mit etwa 31 kDa das größte Protein des Cytochrom *b₆f*-Komplexes. Es besteht aus einer großen lumenalen Domäne und einer Transmembranhelix am C-Terminus. Die Struktur des löslichen Teils wurde durch Röntgenstrukturanalyse bis zu einer Auflösung von 1,9 Å ermittelt (Martinez et al., 1994; Carrell et al., 1999). Das Häm ist kovalent über zwei Cysteine an das Protein gebunden. Interessant ist auch der sechste Ligand des Fe in der Hämgruppe. Im Gegensatz zu der Koordinierung über den Schwefel eines Methionins, wie er bei Cytochrom *c* auch in anderen *bc*-Komplexen üblich ist, dient hier die freie Aminogruppe der N-terminalen Aminosäure des Proteins als Ligand. Auch sonst besitzen Cytochrom *f* und andere Cytochrome des *c*-Typs in ihrer Aminosäuresequenz sehr geringe Ähnlichkeiten (Hauska et al., 1988), was darauf hindeutet, dass phylogenetisch unterschiedliche Ursprünge vorliegen.

Funktionell bildet Cytochrom *f* mit dem Rieske FeS-Protein den "high potential" Elektronentransportweg und überträgt ein Elektron vom Rieske FeS-Protein auf Plastocyanin oder alternativ auf Cytochrom *c₅₅₃*. Im Protein konnte eine Reihe von fünf Wassermolekülen identifiziert

werden. Es wird vermutet, dass über diese Kette aus Wassermolekülen der Protonentransport stattfindet (Ponamarev und Cramer, 1998).

1.5.5 Weitere Untereinheiten

Zusätzlich zu den vier großen Untereinheiten treten im Cytochrom b_6f -Komplex einige kleinere Untereinheiten mit Molekulargewichten von 35 kDa auf, die strukturell alle nur aus jeweils ein wenig mehr als einer Transmembranhelix bestehen. In höheren Pflanzen und Grünalgen sind vier kleine Untereinheiten identifiziert worden (PetG, L, M und N). Die genaue Funktion dieser Untereinheiten im Cytochrom b_6f -Komplex konnte bisher nicht ermittelt werden. Hinweise auf eine mögliche Funktion stammen aus wenigen Deletionsexperimenten. Die Deletion von PetG in *Chlamydomonas reinhardtii* verringerte drastisch die Menge der vier großen Untereinheiten (Haley und Bogard 1989) und verhinderte photoautotrophes Wachstum (Berthold et al., 1995). Ein Ausschalten von PetL im selben Organismus führte zu einem vergleichbaren Phänotyp, allerdings konnte die Mutante noch eingeschränkt photoautotroph wachsen (Takahashi et al., 1996). In Tabak war die Deletion von PetN letal (Hager et al., 1999). Über die Funktion von PetM sind bisher wenige Informationen verfügbar. Selbst die Orientierung in der Thylakoidmembran wird ähnlich wie bei PetN kontrovers diskutiert. Ketchner und Malkin (1996) plädierten für eine lumenale Position des G-Terminus aufgrund dessen eher positiven Charakters, während aus Trypsin-Behandlungen auf eine umgekehrte Orientierung geschlossen wurde (de Vitry et al., 1996).

In *C. reinhardtii* wurde vor kurzem PetO als zusätzliche Untereinheit des Cytochrom b_6f -Komplexes beschrieben (Hamel et al., 2000). Während der "State Transitions" wird PetO reversibel phosphoryliert und hat vermutlich eine regulatorische Funktion.

In Cyanobakterien scheint der b_6f -Komplex in Hinsicht auf die kleineren Untereinheiten eine etwas veränderte Zusammensetzung zu haben. Bisher konnte nur gezeigt werden, dass PetG und PetM Bestandteil des Komplexes sind. Im Gegensatz zu PetL und PetO wurde zwar ein Gen für PetN in cyanobakteriellen Genomen gefunden, inwieweit PetN aber auch mit dem b_6f -Komplex assoziiert ist, bleibt unklar. Mit Ausnahme von einer PetM-Deletionsmutante gibt es in Cyanobakterien keinerlei Hinweise auf die Funktionen der kleinen Untereinheiten. Vermutlich ist PetM in *Synechocystis* PCC 6803 nicht essentiell für die Aktivität des b_6f -Komplexes, spielt aber eine regulatorische Rolle (Schneider et al., 2001a).

1.5.6 Zusätzliche Komponenten

Sowohl in Präparationen des b_6f -Komplexes des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Bald et al., 1992) als auch der Grünalge *C. reinhardtii* (Pierre et al., 1997) und des Spinats (Dietrich und Kühlbrand, 1999) trat pro b_6f -Monomer ein gebundenes Chlorophyll a -Molekül auf. Zusätzlich wurde in stöchiometrischen Mengen ein Carotinoid gefunden, das bei *Mastigocladus laminosus* und *C. reinhardtii* als β -Carotin identifiziert wurde (Zhang et al., 1999). Für das Chlorophyll a -Molekül wurde die Bindung an Cytochrom b_6 nachgewiesen (Poggese et al., 1997), für das β -Carotin eine Bindung an dieses Protein nur vorgeschlagen (Boronowsky et al., 1998).

Die Funktion des Chlorophylls und des Carotenoids ist bisher noch unklar. Für das Chlorophyll a wird eine strukturelle Funktion angenommen, da dieses Molekül keine Rolle beim Energietransfer zu spielen scheint (Peterman et al., 1998). Die Bildung von Singulett-Sauerstoff durch das angeregte Chlorophyll a -Molekül könnte durch einen Energietransfer an das β -Carotin verhindert werden. Das β -Carotin könnte demnach Komponenten des b_6f -Komplexes vor der Schädigung durch aggressive Sauerstoffradikale schützen (Zhang et al., 1999).

1.6 Cyanobakterieller Elektronentransport

Die oben beschriebenen Mechanismen photosynthetischer Reaktionen laufen in allen oxygene Photosynthese betreibenden Organismen vergleichbar ab. Bei Cyanobakterien sind aber bemerkenswerterweise der photosynthetische und der respiratorische Elektronentransport über gemeinsame Komponenten sehr eng miteinander verbunden (Dworsky et al., 1995; Schmetterer, 1994). So ist z.B. der b_6f -Komplex Bestandteil beider Elektronentransportwege. Gene für Untereinheiten eines Cytochrom bc_1 -Komplexes konnten in den bisher sequenzierten cyanobakteriellen Genomen von *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Nostoc punctiforme* und *Anabaena* sp. PCC 7120 nicht identifiziert werden.

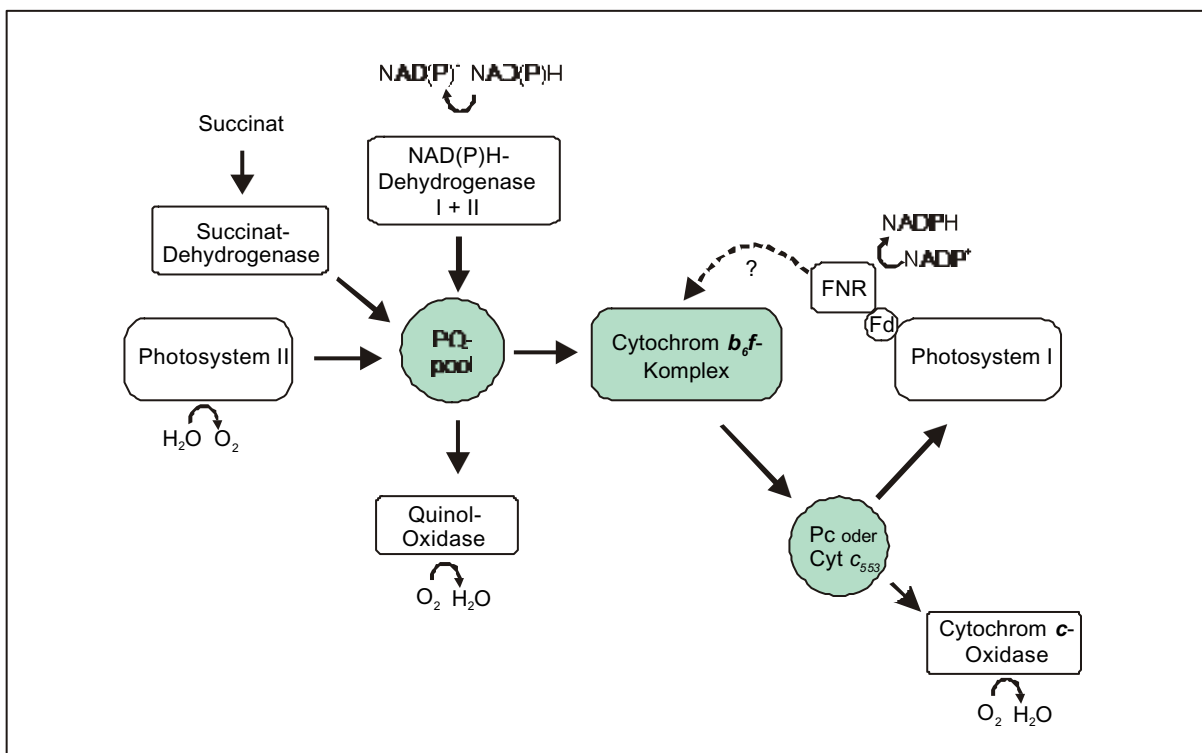


Abbildung 1.4: Schematischer Überblick der cyanobakteriellen Elektronentransportketten. Die Abkürzungen werden im Text erklärt.

Über die genaue Lokalisation der respiratorischen bzw. photosynthetischen Proteinkomplexe wird seit langem kontrovers diskutiert. Wahrscheinlich kommen die Komponenten der Photosynthese nur in den Thylakoidmembranen vor, während der respiratorische Elektronentransport zusätzlich auch in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist (Jeanjean et al., 1998). So wurden in der Cytoplasmamembran von *Synechocystis* sp. PCC 6803 nur typische respiratorische Proteine wie die Succinat-Dehydrogenase,

NAD(P)H-Dehydrogenasen, und eine putative Chinol-Oxidase als überwiegende terminale Oxidase gefunden (Howitt et al., 1993).

Abbildung 1.4 zeigt schematisch die vernetzten Elektronentransportwege in Cyanobakterien. Elektronentransfer in bzw. aus dem Plastochinonpool kann in cyanobakteriellen Membranen über verschiedene Transportwege führen. Die relative Elektronentransportrate eines bestimmten Weges ist abhängig von dessen Kapazität, sowie geregelt durch die Verfügbarkeit an Elektronenakzeptoren bzw. -donatoren. Drei sich überkreuzende Wege können als dominant angesehen werden. Der lineare photosynthetische Elektronentransport vom PSII zum PSI, der respiratorische Elektronentransport vom NADPH oder Succinat über eine Cytochromoxidase auf O_2 und der zyklische Elektronentransport rund um PSI. Elektronen können leicht in von allen drei Wegen genutzten Komponenten wie dem Plastochinonpool, dem *b₆f*-Komplex oder den Elektronencarriern Plastocyanin oder Cytochrom *c₅₅₃* von einem Elektronentransportweg auf einen anderen wechseln.

So wird z.B. der Plastochinonpool nicht nur von PSII sondern auch von der NAD(P)H-Dehydrogenase reduziert. Auch die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase hat einen sehr großen Einfluss auf den Reduktionsgrad des Plastochinonpools (Cooley und Vermaas, 2001). Als Elektronenendakzeptor kann nicht nur PSI sondern auch die terminale Cytochrom *aa₃*-Oxidase dienen, die Elektronen dann auf Sauerstoff überträgt. Alternativ können Elektronen auch unter Umgehung des Cytochrom *b₆f*-Komplexes direkt über eine Chinol-Oxidase an O_2 abgeben.

Neben den beschriebenen Proteinkomplexen sind noch weitere am Elektronentransport beteiligt, deren Anteil aber nur untergeordnet ist.

1.7 Heterocystendifferenzierung bei *Anabaena*

(neueste Übersichten in: Wolk, 2000; Adams und Duggan, 1999)

Filamentöse Cyanobakterien der Gattung *Anabaena* gehören zu der Gruppe von prokaryontischen Organismen, die in der Lage sind, N_2 aus der Atmosphäre zu fixieren. Die Schlüsselrolle bei der Stickstofffixierung kommt dem molybdänhaltigen Enzym Nitrogenase zu. Dabei handelt es sich um ein komplexes Enzymsystem, das offenbar in allen bisher bekannten, stickstofffixierenden Bakterien sehr ähnlich aufgebaut ist. Die Nitrogenase besteht aus zwei Komponenten. Ein als Dinitrogenase bezeichnetes Eisen-Molybdän-Protein, das die eigentliche Nitrogenase darstellt, und einem Eisen-Protein, welches aufgrund seiner Funktion als Elektronencarrier zum FeMo-Protein als Dinitrogenase-Reduktase bezeichnet wird. Als Elektronendonator der Reduktase dient häufig reduziertes Ferredoxin. Der Prozess der Stickstofffixierung ist sehr energieaufwendig, obwohl die Reaktion eigentlich exergonisch ist. Wohl wegen der Reaktionsträgheit des elementaren Stickstoffs müssen für die Reduktion eines N_2 -Moleküls zu NH_3 etwa 16 ATP aufgewendet werden. Die benötigten Reduktionsäquivalente und ATP werden oxidativ oder photosynthetisch erzeugt.

Die Nitrogenase wird durch O_2 schnell inaktiviert, so dass ein effektiver Schutz des Enzyms vor molekularem Sauerstoff notwendig wird. Bei N_2 -fixierenden aeroben Organismen haben sich aus diesem Grund unterschiedliche Mechanismen entwickelt, die eine ausreichend anaerobe Umgebung für die Nitrogenase schaffen. Filamentbildende Gattungen wie *Anabaena* erreichen das durch eine räumliche Trennung zwischen Photosynthese und Stickstofffixierung. Dabei kommt es zu einem bei

Prokaryonten sonst sehr selten zu beobachtenden Differenzierungsprozess. Innerhalb des Filamentes bilden sich unter Stickstoffmangelbedingungen spezialisierte Zellen aus, in denen die Stickstofffixierung stattfindet (Fay, 1968; Peterson und Wolk, 1978). Diese Heterocysten genannten Zellen zeigen im Vergleich zu den vegetativen Zellen viele morphologische und biochemische Besonderheiten, die Grundlagen für die aerobe Fixierung von N_2 bilden.

Zur Schaffung möglichst anaerober Bedingungen für die Nitrogenase weisen Heterocysten eine besondere Zellhülle auf, die der gram-negativen Bakterienzellwand aufgelagert wird. Diese Zellhülle besteht aus einer inneren laminaren Schicht aus Glykolipiden, die an den Verbindungen zwischen Heterocyste und benachbarten vegetativen Zellen besonders ausgeprägt ist (Abb. 1.5). Die Glykolipidschicht setzt die Diffusion von molekularem Sauerstoff auf ein für die Nitrogenase nicht inaktivierendes Maß herab, der Polysaccharid-Sacculus dient dem Schutz der Glykolipidschicht (Murry und Wolk, 1989). Im Gegensatz zu 230 mM in der aeroben Umgebung wird innerhalb der Heterocyste von einem Sauerstoffpartialdruck von 0,6 mM ausgegangen (Elhai und Wolk, 1991). In gleichem Maß wie der Sauerstoff wird zwar auch der Stickstoff mit seinem vergleichbaren Van der Waals-Radius am Eindringen in die Heterocyste gehindert, doch der vierfach höhere Partialdruck von N_2 gewährleistet eine bedarfsdeckende Stickstoffversorgung der Nitrogenase (Walsby, 1985).

Das intrazelluläre Membransystem der Thylakoide ist innerhalb der Heterocyste umgeordnet (Abb. 1.5). Neben den im Vergleich zu den vegetativen Zellen in geringerem Ausmaß vorhandenen Thylakoidmembranen treten bei Heterocysten an den Zellpolen die charakteristischen Honigwabenmembranen ("honeycomb") auf. Eine spezifische Eigenschaft von Heterocysten ist die Fähigkeit, an diesen Membranen lichtunabhängig Diaminobenzidin (DAB) zu oxidieren. Katalysiert wird diese lichtmikroskopisch als brauner Niederschlag sichtbare Reaktion von in diesem Fall nicht näher spezifizierten Hämproteinen, die auch für die erhöhte respiratorische Aktivität an den Zellpolen verantwortlich sein könnten. Aus den photosynthetisch aktiven vegetativen Zellen eingedrungener Sauerstoff wird wahrscheinlich von an den "Honeycomb"-Membranen lokalisierten Enzymen der Atmungskette reduziert (Murry et al., 1981), wobei gleichzeitig noch Energie in Form von ATP gewonnen wird (Brown-Howland et al., 1988).

Die "Proteinausstattung" der Heterocysten unterscheidet sich wesentlich von jener der vegetativen Zellen. Während der Differenzierung werden etwa 100 Proteine exprimiert, die den vegetativen Zellen fehlen (Wolk, 2000). Das Fehlen des Enzyms Rubisco bedingt die Unfähigkeit CO_2 zu fixieren und macht die Heterocysten abhängig von der Kohlenstoffversorgung durch Nachbarzellen (Wolk, 1968, Jüttner und Carr, 1976). Kohlenstoffverbindungen aus den benachbarten vegetativen Zellen werden für die Erzeugung von Reduktionsäquivalenten (NADPH) benötigt, deren erhöhter Bedarf durch eine gesteigerte Aktivität des Pentosephosphat-Weges zur Verfügung gestellt wird. Im Gegenzug exportieren die Heterocysten den fixierten Stickstoff wahrscheinlich in Form von Glutamin in die vegetativen Zellen.

Eine Aktivität des Sauerstoff produzierenden Photosystems II ist in Heterocysten nicht festzustellen, obwohl einzelne Komponenten dieses Systems nachgewiesen werden konnten (Thiel, 1990). Die wenigen verbleibenden Phycobilisomen dienen dem Energietransfer auf PSI. Ohne funktionelles PSII unterbleibt die mit einer Nitrogenaseaktivität unvereinbare Produktion von molekularem Sauerstoff.

Das intakte Photosystem I betreibt zur Energiegewinnung, d. h. zur ATP-Regeneration, überwiegend den zyklischen Elektronentransport (Tel-Or und Stewart, 1977, Lockau et al., 1978).

Bisher ist die Regulation der Elektronentransportketten in Cyanobakterien weitgehend unbekannt. Insbesondere der Verlust an intaktem PSII, eine erhöhte Respiration und eine gesteigerte zyklische Photophosphorylierung in Heterocysten erfordern im Vergleich zu den Vorgängen in den vegetativen Zellen ein völlig veränderte Regulation des Elektronentransportes.

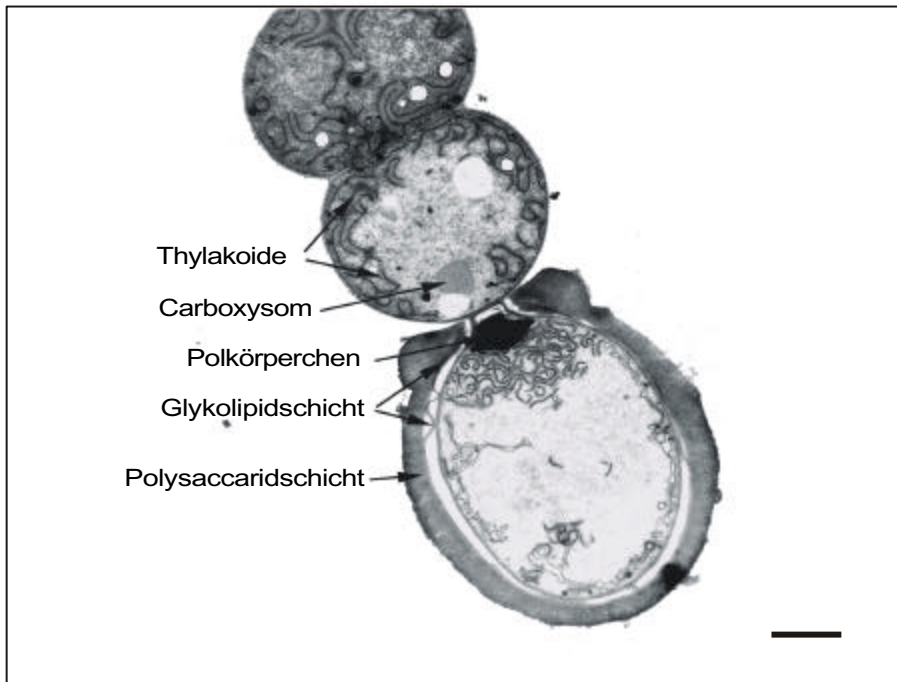


Abbildung 1.5: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Filamentes mit endständiger Heterocyste von *Anabaena* sp. PCC 7120 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von I. Maldener). Der Balken entspricht 1 µm.

1.8 Ziele der Arbeit

Nach der Ermittlung der Gensequenzen für die Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes der Cyanobakterien *Anabaena variabilis* ATCC 29413 und *Anabaena* PCC 7120 sollten die Gene mutiert und die resultierenden Phänotypen charakterisiert werden. Besonderes Augenmerk lag auf einer möglichen regulatorischen Funktion des Komplexes bzw. einzelner Untereinheiten in der Koordination der vernetzten cyanobakteriellen Elektronentransportketten. Desweiteren sollte geprüft werden, ob dem b_6f -Komplex eine Bedeutung für die Redoxkontrolle bei *Anabaena* zukommt. Insbesondere stellte sich die Frage nach der Funktion der kleinen Untereinheiten, die aufgrund fehlender redoxaktiver Zentren nicht unmittelbar an der Elektronenübertragung beteiligt zu sein schienen. Außerdem sollte der Zustand und die Funktion des b_6f -Komplexes in Heterocysten und vegetativen Zellen von *Anabaena* verglichen werden.

Im Verlauf der Arbeit warf zudem die Veröffentlichung des Gesamtgenoms von *Anabaena* PCC 7120 die Frage nach der Funktion der Isoformen des Rieske FeS-Proteins auf. Eine gezielte Deletion dieser alternativen Proteine und Charakterisierung der Mutanten sollten das Verständnis in bezug auf die Funktion dieser Proteine fördern.

2 Ergebnisse

2.1 Die *pet*-Gene von *Anabaena variabilis*

2.1.1 "Southern Blot" Analysen

Um die Gene, die Untereinheiten des *b₆f*-Komplexes in *A. variabilis* (Tab. 2.1) codieren, zu erhalten, wurden mit heterologen Sonden (homolog zu den entsprechenden Genen von *Synechocystis* sp. PCC 6803) "Southern Blot" Analysen mit genomischer DNA von *A. variabilis* durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass bis auf eine Ausnahme alle Gene als einzelne Kopien im Genom vorliegen (Daten nicht gezeigt). Nur mit der Sonde gegen die stark konservierten Bereiche des Gens für das Rieske FeS-Protein hybridisierten mehrere Restriktionsfragmente, was für das Auftreten zusätzlicher Kopien bzw. Isoformen dieses Gens sprach.

2.1.2 PCR-Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung der *pet*-Gene

Die Sequenzen der *b₆f*-Gene von *A. variabilis* (Tab. 2.1) wurden ermittelt, indem anfänglich PCR-Fragmente mit heterologen Oligonukleotiden (homolog zu *Synechocystis* sp. PCC 6803) und genomischer DNA als "template" generiert, in pGEM-T kloniert und schließlich sequenziert wurden. Nach Erhalt zumindest kurzer Fragmente des Genbereiches konnten angrenzende Sequenzen mit homologen Primern durch inverse PCR (s. Material und Methoden 4.2.10) bestimmt werden.

Die ermittelten DNA-Sequenzen dieser *pet*-Gene und ihrer Umgebung (s. Anhang) wurden in der EMBL-Datenbank hinterlegt (Accession-Nr. s. Tab. 6.1 im Anhang).

2.2 Die *pet*-Gene von *Anabaena* sp. PCC 7120

Im kürzlich vollständig sequenzierten Genom von *Anabaena* PCC 7120 (<http://www.kazusa.or.jp>) konnten alle bei *A. variabilis* (s. Tab. 2.1) beschriebenen Gene des *b₆f*-Komplexes identifiziert werden. Eine gezielte Analyse zeigte zusätzlich den ORF für eine vierte Isoform des Rieske FeS-Proteins. Um eine einheitliche Nomenklatur insbesondere der Rieske-Gene zu gewährleisten und bestimmte Bereiche innerhalb dieser Gene und angrenzender Sequenzen besser ansprechen zu können, wurden auch diese Segmente des Gesamtgenoms in der EMBL-Datenbank hinterlegt (Accession-Nr. s. Tab. 6.1 im Anhang).

Aufgrund der großen Homologie der Genome zwischen den beiden *Anabaena* Species wurde intensiv nach einem vierten potentiellen Rieske FeS-Protein in *A. variabilis* gesucht. Trotz der Verwendung verschiedener Kombinationen von Oligonukleotiden in den PCR-Amplifikation mit genomischer DNA von *A. variabilis* als "template" konnte das *petC4*-Gen in diesem Organismus aber nicht gefunden werden. Produkt der PCR-Amplifikation waren immer nur Fragmente, die sich nach Sequenzierung als

identisch zum *petC2*-Gen erwiesen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass in *A. variabilis* ähnlich wie in *Nostoc punctiforme*, *Synechocystis* PCC 6803 und *Synechococcus* PCC 7002 nur drei Isoformen vorkommen (Tab. 2.2).

Anabaena variabilis ORF		Eigenschaften des abgeleiteten Proteins			
Gen	Länge (bp)	Protein	Länge (AS)	Masse (kDa)	pI
<i>petB</i>	648	Cytochrom <i>b₆</i> (PetB)	215	24,226	8,59
<i>petD</i>	483	Untereinheit IV (PetD)	160	17,488	8,48
<i>petC1</i>	540	Rieske FeS-Protein (PetC1)	179	19,198	5,17
<i>petA</i>	1002	Cytochrom <i>f</i> (PetA)	333	35,893	5,02
<i>petC2</i>	537	alt. Rieske FeS-Pr. (PetC2)	178	19,428	5,39
<i>petC3</i>	411	alt. Rieske FeS-Pr. (PetC3)	136	14,245	8,40
<i>petG</i>	114	PetG	37	3,956	9,16
<i>petM</i>	105	PetM	34	3,524	3,96
<i>petN</i>	90	PetN	29	3,212	10,72

Anabaena 7120 ORF		Eigenschaften des abgeleiteten Proteins			
Gen	Länge (bp)	Protein	Länge (AS)	Masse (kDa)	pI
<i>petB</i>	648	Cytochrom <i>b₆</i> (PetB)	215	24,226	8,59
<i>petD</i>	483	Untereinheit IV (PetD)	160	17,497	8,48
<i>petC1</i>	540	Rieske FeS-Protein (PetC1)	179	19,158	5,17
<i>petA</i>	1002	Cytochrom <i>f</i> (PetA)	333	35,866	4,92
<i>petC2</i>	537	alt. Rieske FeS-Pr. (PetC2)	178	19,403	4,89
<i>petC3</i>	411	alt. Rieske FeS-Pr. (PetC3)	136	14,233	8,40
<i>petC4</i>	537	alt. Rieske FeS-Pr. (PetC4)	178	18,944	7,09
<i>petG</i>	114	PetG	37	3,940	9,16
<i>petM</i>	105	PetM	34	3,524	3,96
<i>petN</i>	90	PetN	29	3,212	10,72

Tabelle 2.1: Eigenschaften der ermittelten *pet*-Gene und der daraus abgeleiteten Proteine von *A. variabilis* (oben) und *Anabaena* PCC 7120 (unten). Der isoelektrische Punkt (pI) wurde ohne Berücksichtigung eventuell vorhandener Disulfidbrücken ermittelt.

2.3 Sequenzanalyse

2.3.1 Kleine Untereinheiten

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der kleinen Untereinheiten sowohl von *A. variabilis* als auch von *Anabaena* PCC 7120 zeigen einen großen Identitätsgrad zu bekannten cyanobakteriellen Homologen (Abb. 2.1). Alle diese Proteine (Polypeptide) bestehen aus nicht viel mehr als einem sehr hydrophoben Bereich von etwas mehr als 20 Aminosäuren (Abb. 2.2), der hinreichend zur Bildung einer Transmembranhelix ist, wie sie bei homologen Proteinen beschrieben wurde (Karauchnow et al., 1997). Nur die etwas größeren PetG-Proteine besitzen zusätzlich am C-Terminus einen Bereich, der aufgrund seines hydrophilen Charakters wahrscheinlich nicht innerhalb der Membran lokalisiert ist. Das Fehlen von prosthetischen Gruppen macht eine weitere Charakterisierung der kleinen Untereinheiten z. B. anhand charakteristischer Bindemotive in der Sequenz nur schwer möglich.

A) PetG

A.v. 1 VVEPLLSGIVLGLIVVTL SGLFYAAAYKQYKRPNELGG 37
A. 7120 1 VVEPLLSGIVLGLIVVTL AGLFYAAAYKQYKRPNELGG 37
N.p. 1 VVEPLLSGIVLGLV FVTL AGLFYAAAYKQYKRPNQLGG 37
S. 6803 1 VIEPLLLGIVLGLIPVTL AGLFVAAYLQYKRGNQFNLD 37
S. 7942 1 MIEPLLCGIVLGLIPITL AGLFMAAYLQYRRGNQLGA 37
::***** :***:*** ** **:* *::.

A.v.	100				
A. 7120	97.3	100			
N.p.	89.2	91.9	100		
S. 6803	70.3	73.0	73.0	100	
S.7942	67.6	70.3	70.3	78.4	100

B) PetM

A.v. 1 MSGE..LLNAALLSFGLIFV G WALGALLLKIQ...GAEE 34
A. 7120 1 MSGE..LLNAALLSFGLIFV G WALGALLLKIQ...GAEE 34
N.p. 1 MGGE..ILNAAILSFGLIFV G WLGALLLKIQ...GGEE 34
S. 6803 1 MTAESMLANGAFIMIGL TLLGLAWGFVI IKLQ...GSEE 36
S. 7002 1 MSAESMMFNGFIIAITAVL FGVAWGFLILKI QNKAGKAE 38
* .* : *. :: : :.* . * ::*: * * *

A.v.	100				
A. 7120	100	100			
N.p.	85,3	85,3	100		
S. 6803	38,2	38,2	32,4	100	
S. 7002	26,5	26,5	26,5	50	100

C) PetN

A.v. 1 MAILTLGWVSLLVVFTW S IAMVVWGRNGL 29
A. 7120 1 MAILTLGWVSLLVVFTW S IAMVVWGRNGL 29
N.p. 1 MEILTLGWVSLLVVFTW S IAMVVWGRNGL 29
S. 6803 1 MDILTLGWVSVLVLFTW S ISMVVWGRNGF 29
* *****:***:*****:*****:

A.v.	100			
A. 7120	100	100		
N.p.	96,6	96,6	100	
S. 6803	82,8	82,8	82,8	100

Abbildung 2.1:

Homologien aller bisher bekannten kleinen Untereinheiten aus Cyanobakterien.

Oben abgebildet sind jeweils die Vergleiche der Aminosäuresequenzen, darunter tabellarisch der Identitätsgrad in % gezeigt für A) PetG, B) PetM und C) PetN. * kennzeichnen identische AS, stark konservierte Aminosäurereste sind mit :, weniger konservierte mit . markiert. A.v. = *Anabaena variabilis* sp. ATCC 29413; A. 7120 = *Anabaena* sp. PCC 7120; N.p. = *Nostoc punctiforme* sp. ATCC 29133; S. 6803 = *Synechocystis* sp. PCC 6803; S. 7942 = *Synechococcus* sp. PCC 7942; S. 7002 = *Synechococcus* sp. PCC 7002. Vergleiche der Aminosäuresequenzen und Berechnung des Identitätsgrads wurden mit dem Programm ClustalX (Version 1.64b) durchgeführt.

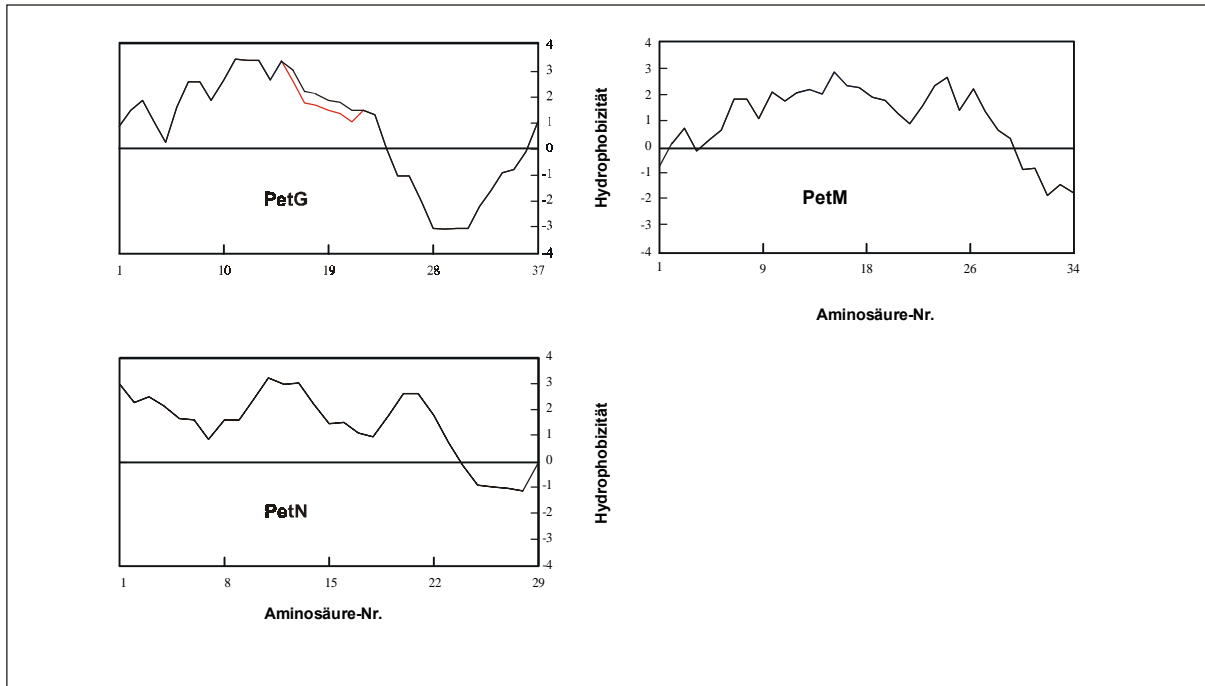


Abbildung 2.2: Hydropathieprofile von PetG (A), PetM (B) und PetN (C) aus *Anabaena* PCC 7120 und *A. variabilis*. Die Hydropathieprofile von PetG, PetM und PetN wurden mit Hilfe des Programms DNAMAN nach Goldman et al. (1986) und Kyte und Doolittle (1982) mit einer Fenstergröße von 6 Aminosäuren erstellt. Die Proteinsequenzen der kleinen Untereinheiten beider Organismen sind identisch mit Ausnahme eines AS-Austausches bei PetG. Der daraus resultierende Unterschied der Hydrophobizität bei *A. variabilis* ist rot dargestellt.

2.3.2 Die Rieske-Isoformen

Bei der Analyse der abgeleiteten Proteinsequenzen der drei potentiellen Rieske FeS-Proteine von *A. variabilis* bzw. der vier von *Anabaena* PCC 7120 zeigt PetC1 jeweils die größte Homologie zu anderen bekannten Cytochrom b_6f -Komplex Rieske Sequenzen (Tab. 2.2). Auch entspricht die Lokalisation dieses Gens in einem Operon mit dem für Cytochrom f codierenden Gen *petA* der bei anderen Cyanobakterien charakteristischen Anordnung im Genom. Tabelle 2.2 macht deutlich, dass PetC1 jeweils auch große Homologien zu seinen Isoformen besitzt. Die Identitäten zwischen PetC1 und seinen Homologen (PetC2 und PetC3 bei *A. variabilis* bzw. PetC2, PetC3 und PetC4 bei *Anabaena* PCC 7120) liegt jeweils zwischen 30 und 40 %. Mit Ausnahme von PetC3 (136 AS) bestehen auch alle Proteine aus einer vergleichbaren Anzahl von Aminosäuren (178 oder 179 AS).

PetC3 weist in beiden Organismen im N- und C-terminalen Bereich des Proteins sowie im Protein selber Deletionen auf (Abb. 2.3). Während PetC1, PetC2 und PetC4 alle ein Molekulargewicht von etwa 19 kDa besitzen (Tab. 2.1), haben beide PetC3-Proteine aufgrund der Deletionen nur ein berechnetes Molekulargewicht von etwa 14 kDa, was untypisch für bisher bekannte Rieske FeS-Proteine aus b_6f -Komplexen ist.

Die Aminosäuresequenzen der putativen Rieske FeS-Proteine von *A. variabilis* und *Anabaena* PCC 7120 wurden auf charakteristische Eigenschaften von Rieske FeS-Proteinen untersucht. Alle potentiellen PetC-Proteine weisen die typischen Sequenzmotive für die Bindung des [2Fe2S]-Clusters (Motiv I und Motiv II in Abb. 2.4) auf. An die lumenale Domäne ist das [2Fe2S]-Clusters über je zwei Cystein- bzw. Histidinreste gebunden, wobei das eine Fe-Atom von den Schwefelatomen zweier

A

		RR-Motiv		Transmembranhelix		
PetC1	1	MAQFSESVDV	PDMGRRQFMN	LLTFGTVTGV	ALGALYPVWN	YFIPPATG.G 49
PetC2	1	M.DDTLNQLN	PSMSRRQLLN	FFTGAIVAAT	ASAAIYPATK	FFMPPAESTD 49
PetC3	1	M.....	..KRRDFIN	WVGLGWIASS	LPVAIAACSS	QPVTSTEG.Q 37
		*	*****	. . ::	*: . .	:... :
PetC1	50	AGGGTTAKDE	LGNDVSVSKF	LESHNVGDRT	LVQGLKGDPT	YIVVESKEAI 100
PetC2	50	AEGGVLAQDK	IGHPIPASQI	LVQAS.GTRA	LIAGLAGEPT	YLTVREDGTL 99
PetC3	38	AIGTVAELDK	TG.....QL	LNENSPIGPV	LVVGTSKDAN	LIAVN..... 76
		* * .	*: *	:: *	. *:	* :.. :.*
PetC1	101	TDYGINAVCT	HLGCVVPWNA	AENKFKCPCH	GSQYDATGKV	VRGPAPKSLA 151
PetC2	100	DPMGI VNNCT	HLGCTFPWNP	VDQQFQCPCH	GSRYDAQGSV	ERGPANRPLK 150
PetC3	77PTCS	HKGCTIAWQA	QAKKFVCPCH	GAEYGVGDKV	QKDPATKPLK 120
			*: * **...*:	::* *****	*:.* *.*	:.** :.*
PetC1	152	LSHAKTENDK	IVLTPWTETD	FRTGEEPWWS		179
PetC2	151	LVHVQVKDDY	IWISSWQETD	PRTGKPPWWV		178
PetC3	121	TYAAKIEGDS	VVVKQS....			136
		. : : :	: : :			

B

		RR-Motiv		Transmembranhelix		
PetC1	1	MAQFSESVDV	PDMGRRQFMN	LLTFGTVTGV	ALGALYPVWN	YFIPPAAG.G 49
PetC2	1	M.DDTLNQAN	PSMSRRQLLN	FFTGAIVATT	ASAAIYPATK	FFMPPAESTD 49
PetC4	1	M.DNSIPIES	PSLSRRQLLN	FITGATVAVT	AGAALYPAGK	FLIAPAECTG 49
PetC3	1	M.....	..KRRDFIN	WVGLGWIASS	LPVAIAACSS	QPTTSTEG.Q 37
		*	*****	. . ::	*: . .	:... :
PetC1	50	AGGGTTAKDE	LGNDVSVSKF	LESHNVGDRT	LVQGLKGDPT	YIVVESKEAI 100
PetC2	50	AEGGILAQDK	IGHPIPASQI	LAQAS.GTRA	LIAGLAGEPT	YLTVREDGTL 99
PetC4	50	AGGAILAKDI	LGKQIPASQI	LAEP.PQTRA	LVAGLAGEPT	YLIVKEDHTL 99
PetC3	38	AIGTVAELDK	TG.....QL	LNENSPIGPV	LVVGTSKDAN	LIAVN..... 76
		* * *	*: *	:: *	. *:	* :.. :.*
PetC1	101	TDYGINAVCT	HLGCVVPWNA	AENKFKCPCH	GSQYDATGKV	VRGPAPKSLA 151
PetC2	100	DPMGI VNNCT	HLGCTFPWNP	VDQQFQCPCH	GSRYDAQGSV	ERGPANRPLK 150
PetC4	100	DRIGLVDNCT	HLGCTFPWNP	LDQQFQCPCH	GSRYAPDGSV	VRGPAPLPLK 150
PetC3	77PTCS	HKGCTVAWQA	QAKKFVCPCH	GAEYGVGDKV	QKDPATKPLK 120
			*: * **...*:	::* *****	*:.* *.*	:.** :.*
PetC1	152	LSHAKTENDK	IVLTSWTETD	FRTGEEPWWS		179
PetC2	151	LVQVQVKDDY	IWISPWQETD	PRTGKPPWWV		178
PetC4	151	IVQVAVIDNS	ILISPWTETD	PRTGKPPWWV		178
PetC3	121	TYAAKIEGDS	VVVKQS....			136
		. : : :	: : :			

Abbildung 2.3: Sequenzvergleich der potentiellen Rieske Proteine aus A) *A. variabilis* und B) *Anabaena PCC 7120*. Im N-terminalen Bereich ist die potentielle Transmembranhelix hervorgehoben. * kennzeichnen identische AS, stark konservierte Aminosäurereste sind mit ;, weniger konservierte mit . markiert. Vergleiche der Aminosäuresequenzen wurden mit dem Programm ClustalX (Version 1.64b) durchgeführt.

Cysteinreste, das andere aber von den ϵ -Stickstoffatomen der Imidazolringe zweier Histidinreste gebunden wird. Die in den Motiven jeweils C-terminal gelegenen Cysteinreste bilden eine Disulfidbrücke aus, was durch strukturelle Analysen bei Rieske FeS-Proteinen gezeigt werden konnte (Iwata et al., 1996; Carrell et al., 1997). Auch der Abstand von 12 AS zwischen diesen Motiven ist

mehrere Isoformen dieses Enzyms noch in drei weiteren Cyanobakterien vor. Im ebenfalls filamentösen heterocystenbildenden Cyanobakterium *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (<http://spider.jgi-psf.org>) sowie in den einzelligen *Synechocystis* sp. PCC 6803 (<http://www.kazusa.or.jp>) und *Synechococcus* PCC 7002 (Schneider, 2000) treten jeweils drei potentielle *petC*-Gene im Genom auf. Von *Synechococcus* sind die Sequenzdaten allerdings noch nicht verfügbar.

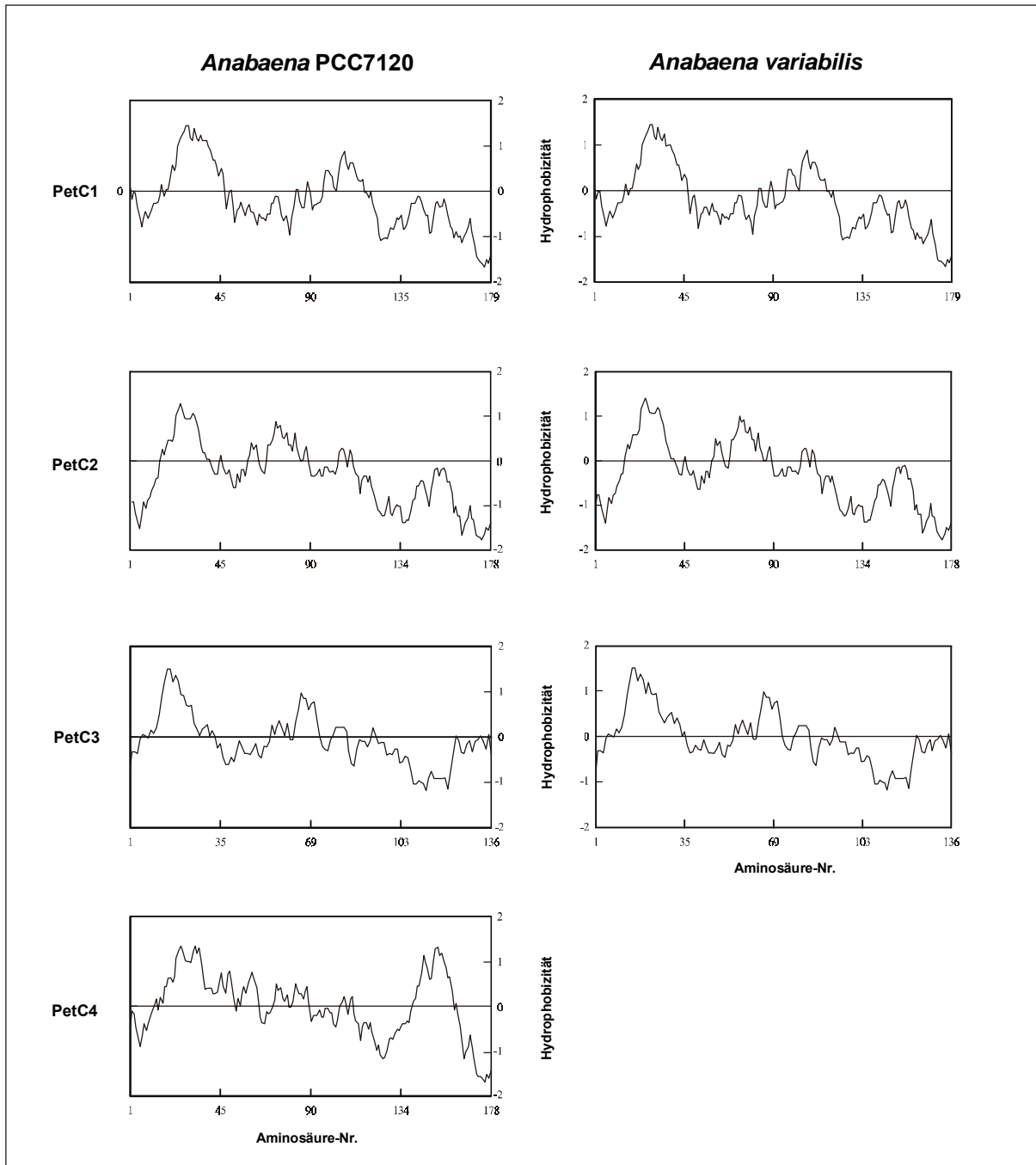


Abbildung 2.5: Hydropathieprofile von PetC1-4 aus *Anabaena* PCC 7120 (links) bzw. *A. variabilis* (rechts). Die Hydropathieprofile wurden mit Hilfe des Programms DNAMAN mit einer Fenstergröße von 20 Aminosäuren erstellt.

sollte geklärt werden, ob die entsprechenden Enzyme überhaupt exprimiert werden. Antikörper gegen die Rieske FeS-Proteine von *Anabaena* sp. sind bisher nicht verfügbar und "Western Blot" Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen die drei Rieske FeS-Proteine von *Synechocystis* PCC 6803 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dirk Schneider/Bochum) zeigten keinerlei Wechselwirkung mit den *Anabaena*-Proteinen. Aufgrund des fehlenden immunologischen Nachweises für eine Expression wurde die Transkription der vier Rieske-Isogene mittels RT-PCR untersucht. Da in Cyanobakterien die Expression eines Proteins vorrangig transkriptionell gesteuert wird, lässt die Untersuchung der Transkription auch Rückschlüsse auf die Verfügbarkeit eines Proteins zu. Insbesondere von Interesse war bei den PetC-Proteinen eine differentielle Expression während des Differenzierungsprozesses einer vegetativen Zelle zur Heterocyste.

2.4.1.1 RT-PCR

Die RT-PCR ist ein mögliches Verfahren, um die Expression von Genen auf mRNA-Ebene zu bestimmen. Von jeder der zu vergleichenden Proben wurde exakt die gleiche Menge Gesamt-RNA in

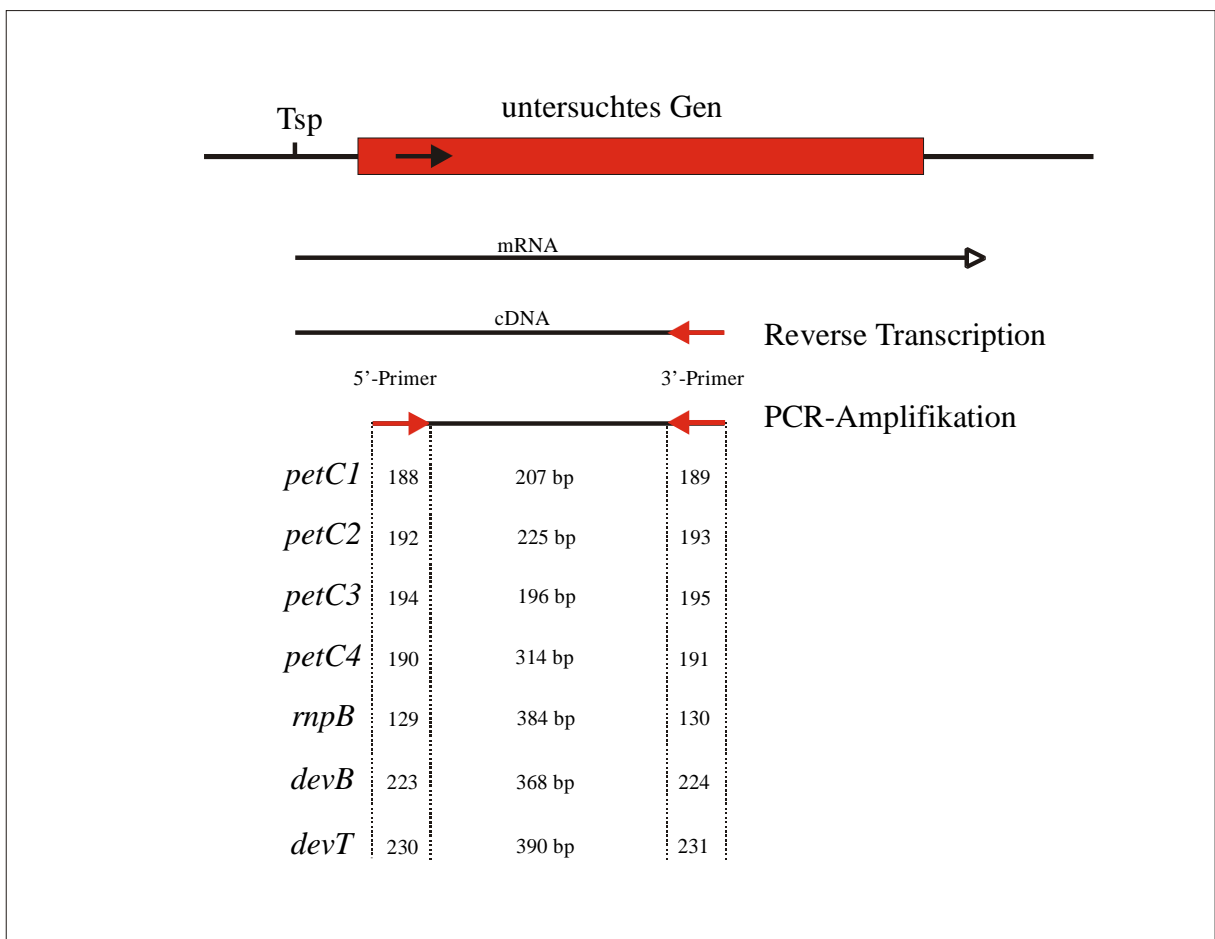


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der RT-PCR. Für jedes untersuchte Gen sind neben den verwendeten Oligonukleotiden auch die Fragmentgrößen der PCR-Produkte angegeben. Tsp = Transkriptionsstartpunkt.

cDNA umgeschrieben (RT-Reaktion). Ein Teil dieser cDNA wurde anschließend als Template in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Die PCR erfolgte mit Primern, die homolog zu einer Sequenz des transkribierten Bereichs sind (Abb. 2.6).

Die Bandenstärke des PCR-Produkts auf einem Agarosegel ist direkt proportional zu dem Anteil der entsprechenden mRNA an der Gesamt-RNA, falls die Zyklenzahl der PCR-Reaktion nicht im Sättigungsbereich liegt. Die Zyklenzahl wurde für jedes Gen empirisch ermittelt. Als Kontrolle, dass in allen Ansätzen gleiche Mengen RNA eingesetzt wurden, wurde das in *Anabaena* PCC 7120 konstitutiv exprimierte Gen für eine Untereinheit der RNase P (*rnpB*) amplifiziert (Vioque, 1997). Die eingesetzte RNA wurde anfänglich mittels einer PCR-Reaktion mit den später auch bei der RT-PCR verwendeten Primern auf eine Kontamination mit DNA getestet. Als zusätzliche Kontrolle diente jeweils ein Ansatz, der ohne die Zugabe der Reversen Transkriptase durchgeführt wurde, und der bei der Analyse der PCR-Amplifikation keine Signale ergab (Daten nicht gezeigt).

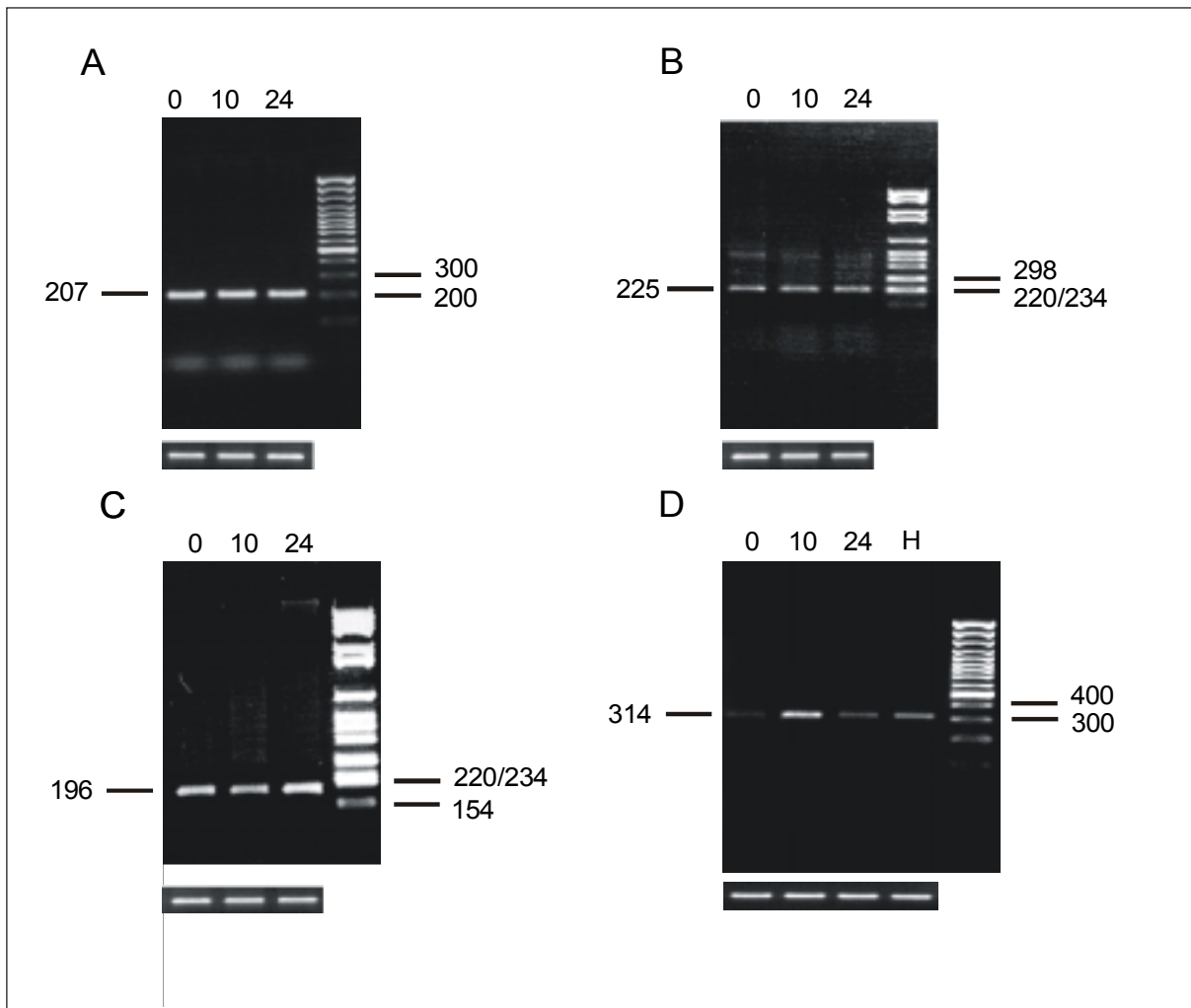


Abbildung 2.7: Analyse der Transkription der vier Rieske-Gene von *Anabaena* PCC 7120 mittels RT-PCR. Amplifikation der cDNA von A) *petC1*, B) *petC2*, C) *petC3* und D) *petC4*, erhalten durch reverse Transkription aus Zellen, denen 0, 10 bzw. 24 h Stickstoff entzogen wurde, sowie bei D) zusätzlich noch mit RNA aus Heterocysten (H). Unten ist jeweils die Kontrollreaktion mit dem *rnpB*-Gen gezeigt.

Während *petC1*, *petC2*, und *petC3* zu allen untersuchten Zeitpunkten in sichtbar gleicher Menge transkribiert wurden, war für *petC4* eine differentielle Transkription deutlich zu erkennen (Abb. 2.7). Zehn Stunden nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff stieg die Menge an *pet4*-mRNA und dementsprechend die Intensität der in der RT-PCR-Reaktion erhaltenen Bande, um nach (24 h) wieder auf das ursprüngliche Niveau zu fallen. Die Transkription von *petC4* scheint auf einem bestimmten Level konstitutiv zu sein wie auch die der anderen drei *petC*-Gene, um nach Induktion der Heterocystendifferenzierung durch Stickstoffmangel aber kurzfristig erhöht zu werden.

Ein solcher zeitlicher Verlauf der Transkription ist für einige heterocystenspezifische Gene beschrieben worden. Fiedler et al. (2001) zeigten für das heterocystenspezifische Gen *devB* in "Northern Blot" Analysen eine erhöhte Transkription 2-3 h nach Entzug an gebundenem Stickstoff. Diese Induktion ist nachweislich auf die Heterocysten beschränkt (Maldener et al., 1994). Eine Induktion der Transkription von *devB* ist in einer RT-PCR Analyse auch deutlich zu sehen (Abb. 2.8).

Die Transkription von *petC4* läuft auch vergleichbar mit der des potentiellen Transkriptionsfaktors *devT* (Abb. 2.8). Unklar ist bislang aber, ob die bei *devT* beobachtete Steigerung der Transkription ähnlich wie bei *devB* nur in den Heterocysten vonstatten geht, oder parallel auch in den vegetativen Zellen auftritt. Phänotypisch spricht allerdings vieles für *devT* als heterocystenspezifisches Gen. Die *devT*-Mutante $\alpha 2$ (Ernst et al., 1992) ist in einem Stadium der Reifung der Heterocyste arretiert, der vom WT etwa 12 h nach Induktion des Differenzierungsprozesses erreicht wird (Iris Maldener, unveröffentlicht). Es kommt nicht zur Ausbildung reifer Heterocysten und die Mutante ist nicht fähig zur Fixierung von N_2 .

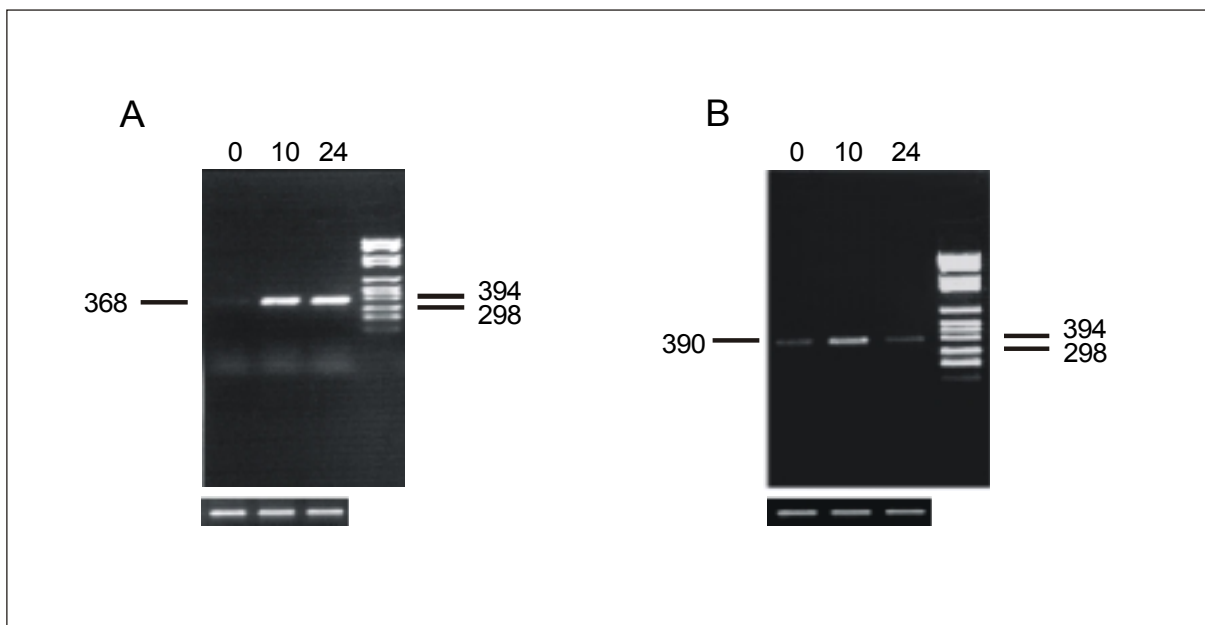


Abbildung 2.8: Analyse der Transkription heterocystenspezifischer Gene von *Anabaena* PCC 7120 mittels RT-PCR. Amplifikation der cDNA von A) *devB* und B) *devT*, erhalten durch reverse Transkription aus Zellen, denen 0, 10 bzw. 24 h Stickstoff entzogen wurde. Unten ist jeweils die Kontrollreaktion mit dem *mpB*-Gen gezeigt.

Die Frage nach einer heterocystenspezifischen Transkriptionssteigerung ist schwer mit der RT-PCR Methode zu untersuchen, da noch unreife Proheterocysten von den vegetativen Zellen eines

Filamentes nicht getrennt werden können. Reife Heterocysten können nach Lysozymbehandlung von vegetativen Zellen intakt abgetrennt werden, um aus ihnen die spezifische RNA zu isolieren. Abbildung 2.7 D zeigt eine RT-PCR Analyse des *petC4*-Gens mit Heterocysten RNA, die aus einer Kultur 24 h nach Entzug an gebundenem Stickstoff gewonnen wurde. Das Heterocystensignal ist geringfügig stärker als der aus Gesamt-RNA ermittelte 24 h-Wert, lässt aber wohl keine Aussagen über eine erhöhte Transkription von *petC4* in Heterocysten zu (s. Diskussion). Auch die Anwesenheit von *petC1*-, *petC2*- und *petC3*-mRNA in heterocystenspezifischer RNA wurde untersucht (Daten nicht gezeigt). Die Schwäche des erhaltenen Signals erlaubt aber auch bei keinem dieser drei Gene Rückschlüsse auf eine spezifische Transkription in Heterocysten.

2.4.1.2 Reporterstudien mit GFP

In den RT-PCR Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Transkription aller vier Gene für Rieske FeS-Proteine stattfindet, die entsprechenden Proteine also mit großer Wahrscheinlichkeit alle exprimiert werden. Insbesondere die Steigerung der *petC4*-Transkription während des Differenzierungsprozesses ließ eine heterocystenspezifische Rolle von PetC4 und die Lokalisation dieses Proteins in den Heterocysten vermuten.

Bei der Analyse der Expression eines Proteins und dessen Lokalisation innerhalb eines Filamentes haben sich in *Anabaena* sp. Reporterstudien mit dem GFP-Protein („green fluorescent protein“) als effektiv erwiesen. So konnte z.B. die differentielle Expression von PatS innerhalb des Filamentes beobachtet werden (Yoon und Golden, 1998).

Für die Reporterstudien wurden jeweils etwa 1000 bp mit dem potentiellen Promotorbereich des zu untersuchenden Rieske-Gens (Tab. 2.3) nach PCR-Amplifikation mittels AT-Klonierung in der richtigen Orientierung vor das *gfp*-Gen in den Vektor pGlow-TOPO von Invitrogen® kloniert. Das *gfp*-Gen auf diesem Vektor wurde durch mehrere Mutationszyklen („GFP cycle 3 mutant“) optimiert (Cramer et al., 1996). Cycle 3-GFP zeigt gegenüber dem WT-GFP aus *Aquorea victoria* eine 40fach gesteigerte Fluoreszenz, besitzt aber dieselben Absorptions- (395 bzw. 478 nm) bzw. Emissionsmaxima (507 nm). Das eingesetzte Fragment wurde sequenziert, um die korrekte Amplifikation und die richtige Orientierung 3' vom *gfp*-Gens sicherzustellen.

Die Fusion des *gfp*-Gens unter Kontrolle des jeweiligen Rieske-Promotors wurde nach *PmeI*- und *KpnI*-Verdau in die *SmaI*- und *KpnI*-Schnittstellen des „Shuttlevektors“ pRL488 gebracht und dieser konjugativ in den WT von *Anabaena* PCC 7120 überführt.

Promotorregion von	amplifiziert mit Oligon.	Größe in bp	in pGlow-TOPO	in pRL488
<i>petC1</i>	208+181	1171	pMA193	pMA205
<i>petC2</i>	210+209	1036	pMA196	pMA207
<i>petC3</i>	214+213	1041	pMA200	pMA217
<i>petC4</i>	212+211	1038	pMA198	pMA208

Tabelle 2.3: Übersicht der für die GFP-Reporterstudien generierten Plasmide

Nach dem konjugativen Transfer der "Shuttlevektoren" in *Anabaena* PCC 7120 wurde eine Vielzahl von Kulturen mit der durch den Vektor vermittelten *Nm*-Resistenz erhalten. Das Vorhandensein des "Shuttlevektors" mit der transkriptionalen GFP-Fusion wurde in den Exkonjuganten mittels PCR-Analyse bestätigt. Auffällig war das im Vergleich zur Kontrolle (WT mit "Shuttlevektor" ohne *gfp*-Gen) schlechtere Wachstum der Exkonjuganten. Es konnte in keinem Fall die Expression eines der Rieske FeS-Proteine durch Messung der charakteristischen GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Auch "Western Blot" Analysen mit einem GFP-Antikörper (Invitrogen) verliefen negativ (s. Diskussion).

2.4.2 Reinigung des *b₆f*-Komplexes

Die Reinigung des *b₆f*-Komplexes aus *Anabaena* PCC 7120 sollte weitere Anhaltspunkte für die Expression mehrerer Rieske-Isoformen sowie deren Einbau in einen funktionellen Komplex liefern. Der Gesamtkomplex wurde nach der von Krinner et al. (1982) beschriebenen Methode zum einen aus allen Zellen einer Kultur, zum anderen spezifisch aus Heterocysten gereinigt. Der isolierte *b₆f*-Komplex war in beiden Fällen aktiv (nicht gezeigt), was für einen intakt gereinigten Komplex sprach. Zur besseren Auftrennung der Banden der (drei längeren) Rieske FeS-Proteine und des sehr hydrophoben Cytochrom *b₆*-Proteins, die in SDS-Gelen trotz unterschiedlicher molekularer Massen schwer zu unterscheiden sind, wurde eine SDS-PAGE mit 6 M Harnstoff im Trenngel verwendet (nicht gezeigt). Anschließend erfolgte der Transfer der Proteinbanden auf eine Immobilon-P-PVDF-Membran (Millipore) und die potentielle Bande des/der Rieske FeS-Proteine wurde N-terminal ansequenziert (R. Deutzmann).

Durch Ermittlung der ersten fünf bis acht N-terminalen Aminosäuren sollte festgestellt werden, ob die untersuchte Rieske-Bande einem Gemisch aus mehreren Rieske FeS-Proteinen entspricht, was aufgrund der Sequenzunterschiede in diesem Bereich der Proteine durchaus möglich sein sollte. Eine Ansequenzierung der typischen Rieske-Bande erfasst allerdings nur die drei etwa gleich großen Rieske-Isoformen PetC1, PetC2 und PetC4. Das wesentlich kleinere PetC3 läuft bei der Auftrennung sicherlich mit einer anderen Geschwindigkeit, eine entsprechende Bande bei etwa 14 kDa konnte aber nicht angesprochen werden.

Bei dem aus allen Zellen einer Kultur, die mit N₂ als einziger Stickstoffquelle gewachsen war, gereinigten *b₆f*-Komplex konnte durch die Ermittlung der ersten acht Aminosäuren nur PetC1 als integraler Bestandteil identifiziert werden. Allerdings spricht dieses Ergebnis nicht unbedingt gegen das Auftreten auch der anderen Isoformen als Bestandteil des Komplexes. Wahrscheinlich ist die Gesamtmenge der alternativen Rieske FeS-Proteine wesentlich geringer, wodurch *b₆f*-Komplexe mit einer solchen Untereinheit als Rieske-Komponente daher auch seltener sind. Bei der Sequenzierung sind die Signale der N-terminalen Aminosäuren dann von den Signalen des PetC1 überlagert worden. Die Proteinsequenzierung der Rieske-Bande aus Heterocystenisolaten war nicht erfolgreich (s. Diskussion).

2.4.3 Erzeugung von Deletionsmutanten

Um zusätzliche Anhaltspunkte auf die Funktion der untersuchten Untereinheiten zu gewinnen, sollten Deletionsmutanten erzeugt und anschließend phänotypisch charakterisiert werden.

Bei der Konstruktion der Vektoren für die Deletion der Gene sowohl der kleinen Untereinheiten als auch der Rieske FeS-Proteine wurde immer die im folgenden beschriebene Strategie verwendet: Der 5'-Bereich mit dem N-Terminus sowie der C-Terminus mit dem 3-Bereich des jeweiligen Genes wurden über PCR an genomischer DNA von *Anabaena* PCC 7120 (Ausnahme *petG*) amplifiziert. Dabei wurden die verwendeten Oligonukleotide so konzipiert, dass die für die weiteren Klonierungsschritte erforderlichen Restriktionsschnittstellen in die generierten PCR-Fragmente eingefügt wurden. Diese Fragmente wurden dann (teilweise über Klonierung in pGEM-T als Zwischenschritt) in der richtigen Orientierung in den Vektor pRL277 eingesetzt. Schließlich entstand durch das Einsetzen der C.K3-Kassette aus pRL448 eine Sequenz, in der anstelle eines Teilbereiches des ursprünglichen Gens das die Kanamicinresistenz vermittelnde *npt*-Gen liegt.

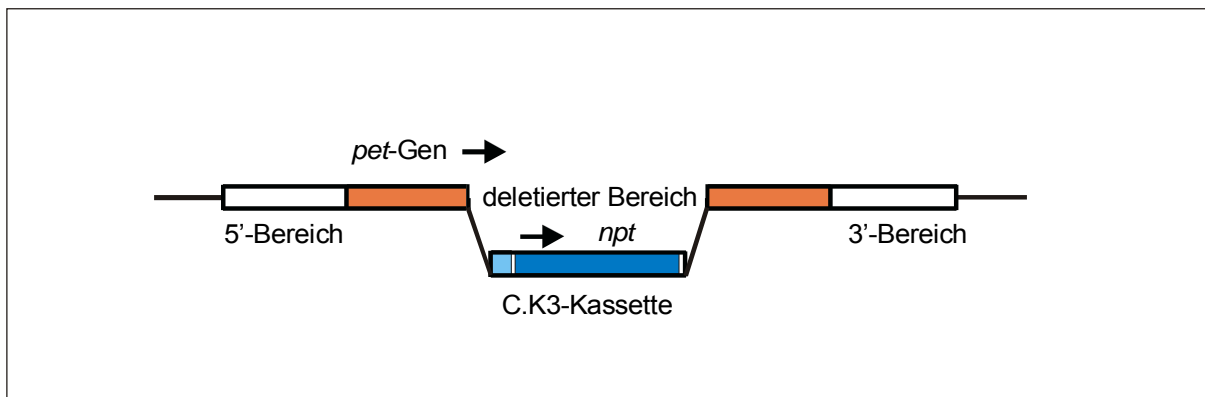


Abbildung 2.9: Schema zur Konstruktion einer Δpet -Mutante. Ein Teilbereich des jeweiligen Gens wurde deletiert und durch die C.K3-Kassette ersetzt. Das *npt*-Gen für die Neomycin-Phosphotransferase vermittelt die *Nm*-Resistenz.

Die so gewonnenen "Cargoplasme" wurden in den *E. coli*-Stamm HB101 [pRL528] transformiert und über Konjugation (s. Material und Methoden 4.2.14.1) in den Wildtyp von *Anabaena* PCC 7120 gebracht. Das aus dem Vektor pRL277 hervorgegangene "Cargoplasmid" besitzt keinen in *Anabaena* funktionellen Replikationsursprung. Die Übertragung der Plasmid-DNA mit dem Resistenzmarker ist also nur über eine Rekombination homologer DNA-Bereiche ins *Anabaena*-Genom möglich. Zur vollständigen Inaktivierung eines Gens ist meist eine doppelte Rekombination (DR) der homologen DNA-Bereiche auf beiden Seiten der inserierten Resistenzkassette notwendig, da bei einer einfachen Rekombination ("single recombination" oder SR) u.U. eine Kopie des WT-Gens im Genom erhalten bleibt. Der Vorgang der doppelten Rekombination ist in *Anabaena* PCC 7120 allerdings sehr selten und wird nicht selektiert, da schon bei einer einfachen Rekombination die Resistenz-vermittelnde Kassette ins Chromosom übertragen wird. Dies macht die zusätzliche Verwendung von konditional letalen Markergenen nötig, die eine positive Selektion auf doppelte Rekombination erlauben. Das "Cargoplasmid" trägt das für gram-negative Bakterien konditional letale Gen *sacB* (Cai und Wolk, 1990), das für das sekretorische Enzym Levansucrase codiert (Steinmetz et al., 1985). Die Expression des aus *Bacillus subtilis* stammenden *sacB*-Gens führt zum Absterben der *Anabaena*-Zellen, wenn diese in Anwesenheit von 5 % Saccharose gezogen werden. Somit wird die Selektion auf doppelte Rekombination ermöglicht, da nur solche *Anabaena*-Zellen auf Saccharose wachsen können, die nach doppelter Rekombination den *sacB*-tragenden Vektorteil verloren haben. Aufgrund mehrerer

Kopien (etwa fünf bis acht) des zirkulären Bakterienchromosoms innerhalb einer *Anabaena*-Zelle gewährleistet auch eine DR nicht automatisch den erwünschten Genotyp. Bis zur vollständigen Segregation des veränderten Genbereiches bedarf es mehrerer Reproduktionszyklen und u.U. einer gesteigerten Antibiotikakonzentration.

2.4.3.1 Konstruktion von Deletionsmutanten der kleinen Untereinheiten

2.4.3.1.1 Die *petG*-Deletion

Der 5'-Bereich und der N-Terminus von *petG* von *A. variabilis* wurden mit den Oligonukleotiden 97+98 mittels PCR amplifiziert (657 bp) und in pGEM-T-Vektor kloniert (pMA98). In die *PstI*-Schnittstelle dieses Vektors wurde das gleich geschnittene mit den Oligon. 147+148 generierte PCR-Fragment (627 bp) mit dem C-Terminus und dem 3'-Bereich ligiert. Das 1295 bp große *SphI*-/*SpeI*-Fragment aus diesem Vektor pMA116 wurde in die *SphI*-/*SpeI*-Schnittstellen von pRL271 eingesetzt (pMA117), in dessen *XbaI*-Schnittstelle dann die *XbaI* geschnittene C.K3-Kassette integriert wurde (pMA118).

Aufgrund der sehr großen Homologien sowohl des *petG*-Gens (Abb. 2.1) als auch angrenzender Bereiche konnte der Vektor pMA118 mit der *A. variabilis*-Sequenz auch zur Mutagenese von *Anabaena* PCC 7120 eingesetzt werden.

2.4.3.1.2 Die *petM*-Deletion

Das 1119 bp PCR-Fragment (Oligon. 168+169) mit dem C-Terminus und dem 3'-Bereich von *petM* wurde nach *SpeI*-Verdau in die *SpeI*-Schnittstelle von pRL277 ligiert. In die *PstI*- und *NheI*-Schnittstellen dieses Vektors (pMA130) wurde das mit dem gleichen Enzymen geschnittene 1011 bp große PCR-Fragment (Oligon. 166+167) mit dem 5'-Bereich und N-Terminus von *petM* kloniert (pMA131). Im letzten Schritt erfolgte das Einfügen der *XbaI* geschnittenen C.K3-Kassette in die *NheI*-Schnittstelle (pMA132).

2.4.3.1.3 Die *petN*-Deletion

Das 923 bp PCR-Fragment (Oligon. 170+171) mit dem 5'-Bereich und dem N-Terminus von *petN* wurde mit *SpeI* verdaut und in die *SpeI*-Schnittstelle von pRL277 ligiert. In die *PstI*- und *NheI*-Schnittstellen dieses Vektors (pMA133) wurde das mit dem gleichen Enzymen geschnittene 741 bp große PCR-Fragment (Oligon. 172+173) mit dem 3'-Bereich und C-Terminus von *petN* kloniert (pMA134). Abschließend wurde die *XbaI* geschnittene C.K3-Kassette in die *NheI*-Schnittstelle eingefügt (pMA135).

2.4.3.2 Konstruktion von Deletionsmutanten der Rieske-Gene

2.4.3.2.1 Die *petC1*-Deletion

Das 2098 bp große PCR-Fragment (Oligon. 200 + 201) mit dem 5'-Bereich und N-Terminus von *petC1* wurde in pGEM-T kloniert (pMA178). In die *SpeI*- und *NheI*-Schnittstellen dieses Vektors wurde das 2152 bp PCR-Fragment (Oligon. 202 + 203) mit dem 3'-Bereich und dem C-Terminus nach Restriktion mit denselben Enzymen eingesetzt (pMA180). Nach *XhoI*/*SpeI*-Verdau von pMA180 wurde das 4240 bp große Fragment in die *XhoI*/*SpeI*-Schnittstellen von pRL277 ligiert. In die *NheI*-Schnittstelle dieses Vektors (pMA181) wurde die *XbaI* geschnittene C.K3-Kassette inseriert (pMA182).

Problematisch ist bei diesem Konstrukt, dass durch die Insertion der C.K3-Kassette in *petC1* möglicherweise auch die polycistronische Transkription von *petA* als nachfolgendes Gen im *petC1A*-Operon beeinträchtigt wird. Die Disruption von *petC1* könnte somit einen polaren Effekt auf die Expression von Cytochrom *f* (PetA) ausüben. Um einen solchen Einfluss auf das cotranskribierte Gen auszuschließen, wurde in die bisher nicht vollständig segregierte Mutante $\Delta petC1$ (Abb. 2.10/2) ein "Shuttlevektor" mit dem *petA*-Gen unter der Kontrolle des Promotors des *petC1A*-Operons gebracht. Unter der Voraussetzung, dass PetC1 ein nichtessentielles Protein ist, sollte die Herstellung einer vollständig segregierten $\Delta petC1$ -Mutante auf diese Weise möglich sein.

Für die Konstruktion des Shuttlevektors zur Komplementation von *petA* wurde der 1064 bp große Promotorbereich des *petC1A*-Operons mit den Oligon. 264 + 265 mittels PCR amplifiziert und in pGEM-T kloniert (pMA221). Das *petA*-Gen, generiert mit den Oligon. 266 + 272 wurde als 1383 bp großes PCR-Fragment nach *SpeI*/*NdeI*-Verdau in den gleich geschnittenen Vektor pMA221 eingefügt. Aus dem so gewonnenen Vektor pMA222 wurde das 2431 bp große *BamHI*-Fragment ausgeschnitten und in die *BamHI*-Schnittstelle des "Shuttle-Vektors" pRL1049 ligiert (pMA223).

Nach Transformation in den *E. coli*-Stamm HB101 [pRL528] erfolgte die Konjugation in die nicht vollständig segregierte $\Delta petC1$ -Mutante.

2.4.3.2.2 Die *petC2*-Deletion

Der 5'-Bereich und N-Terminus von *petC2* wurde als 2732 bp großes PCR-Fragment (Oligon. 196+197) in pGEM-T kloniert. In die *PstI*- und *NheI*-Schnittstellen dieses Vektors pMA173 wurde das 2341 bp PCR-Fragment (Oligon. 198+199) mit dem 3'-Bereich und dem C-Terminus nach Restriktion mit denselben Enzymen eingesetzt (pMA175). Nach *PstI*/*XbaI*-Verdau von pMA175 wurde das 5056 bp große Fragment in die *PstI*/*XbaI*-Schnittstellen von pRL277 ligiert. In die *NheI*-Schnittstelle dieses Vektors (pMA176) erfolgte das Einfügen der *XbaI* geschnittenen C.K3-Kassette (pMA177).

2.4.3.2.3 Die *petC3*-Deletion

Das 2187 bp große PCR-Fragment (Oligon. 204+205) mit dem 5'-Bereich und N-Terminus von *petC3* wurde in pGEM-T kloniert. In die *PstI*/*NheI*-Schnittstellen des so entstandenen Vektors pMA183 wurde das 1190 bp PCR-Fragment (Oligon. 206+207) mit dem C-Terminus und dem 3'-Bereich nach Restriktion mit denselben Enzymen eingesetzt (pMA185). Nach *PstI*/*XhoI*-Verdau von pMA185 wurde

das 6251 bp große Fragment in den *Pst*I und *Xho*I geschnittenen Vektor pRL277 eingesetzt. In die *Nhe*I-Schnittstelle dieses Vektors (pMA186) wurde die C.K3-Kassette/*Xba*I ligiert (pMA187).

2.4.3.2.4 Die *petC4*-Deletion

In den pGEM-T Vektor wurde das 2388 bp große PCR-Fragment (Oligon. 152+153) mit dem 5'-Bereich und N-Terminus von *petC4* ligiert (pMA123). In die *Spe*I- und *Nhe*I-Schnittstellen von pMA123 wurde das 2167 bp PCR-Fragment (Oligon. 154+155) mit dem C-Terminus und dem 3'-Bereich nach Restriktion mit denselben Enzymen eingefügt (pMA124). Nach *Pst*I-/*Spe*I-Verdau von pMA124 wurde das 4545 bp große Fragment in die *Pst*I- und *Spe*I-Schnittstellen von pRL277 kloniert. In die *Nhe*I-Schnittstelle dieses Vektors (pMA125) wurde die *Xba*I geschnittene C.K3-Kassette eingesetzt (pMA126).

2.4.4 Analyse des Genotyps der *pet*-Mutanten mittels PCR und "Southern Blot"

Zur schnellen Überprüfung der Exkonjuganten auf eine Doppelrekombination (DR) bzw. die vollständige Segregation der mutierten Gene wurden mittels PCR die Größen der entsprechenden DNA-Sequenzen bestimmt. Dazu wurde Gesamt-DNA verwendet, sowie je zwei Oligonukleotide, die homolog sind zu einem Bereich 5' bzw. 3' der Integrationsstelle der Resistenzkassette. Nach erfolgter Doppelrekombination sollte nur noch ein Fragment amplifiziert werden, dessen Länge der Summe aus WT-Sequenz abzüglich des deletierten Bereiches plus der inserierten Kassette entspricht.

A

Mutante/ Stamm		Genotyp	amplifiziert mit Oligonukleotiden	erwartete Fragmente (bp)	
				SR	DR
Δ <i>petG</i>	118	<i>petG</i> ::C.K3	179, 180	334 (WT), 1411	1411
Δ <i>petM</i>	132	<i>petM</i> ::C.K3	156, 157	213 (WT), 1278	1278
Δ <i>petN</i>	135	<i>petN</i> ::C.K3	158, 159	226 (WT), 1255	1255
Δ <i>petC1</i>	182	<i>petC1</i> ::C.K3	184, 134	800 (WT), 1512	1512
Δ <i>petC2</i>	177	<i>petC2</i> ::C.K3	192, 242	1014 (WT), 1711	1711
Δ <i>petC3</i>	187	<i>petC3</i> ::C.K3	194, 234	826 (WT), 1598	1598
Δ <i>petC4</i>	126	<i>petC4</i> ::C.K3	190, 144	472 (WT), 1264	1264

B

Mutante/ Stamm		Genotyp	Sonde generiert mit Oligonukleotiden	Restriktions- enzym	erwartete Fragmente (bp)	
					SR	DR
Δ <i>petG</i>	118	<i>petG</i> ::C.K3	125, 180	<i>Pvu</i> I	1173 (WT), 2251	2251
Δ <i>petM</i>	132	<i>petM</i> ::C.K3	168, 169	<i>Spe</i> I	3697(WT), 4762	4762
Δ <i>petN</i>	135	<i>petN</i> ::C.K3	187, 173	<i>Eco</i> RI	2352 (WT), 3381	3381
Δ <i>petC1</i>	182	<i>petC1</i> ::C.K3	84, 127	<i>Ssp</i> I	1560 (WT), 1856	1856
Δ <i>petC2</i>	177	<i>petC2</i> ::C.K3	210, 193	<i>Nde</i> I	3503 (WT), 4200	4200
Δ <i>petC3</i>	187	<i>petC3</i> ::C.K3	206, 234	<i>Spe</i> I+ <i>Xba</i> I	1176(WT), 1948	1948
Δ <i>petC4</i>	126	<i>petC4</i> ::C.K3	212, 146	<i>Hind</i> III	3610 (WT), 4294	4294

Tabelle 2.4: Charakterisierung der Δ *pet*-Stämme. (A) PCR-Test: Verwendete Oligonukleotide und erwartete Fragmentgrößen; (B) "Southern Blot" Analyse: Benutzte Sonden, Restriktionsenzyme und erwartete Fragmentgrößen.

Falls die Deletion eines Gens letal ist, werden bestenfalls Stämme mit einem einzelnen Rekombinationsereignis (SR) oder unvollständiger Segregation erhalten, d.h. es tritt zusätzlich zum veränderten Gen noch das WT-Fragment auf (Tab. 2.4).

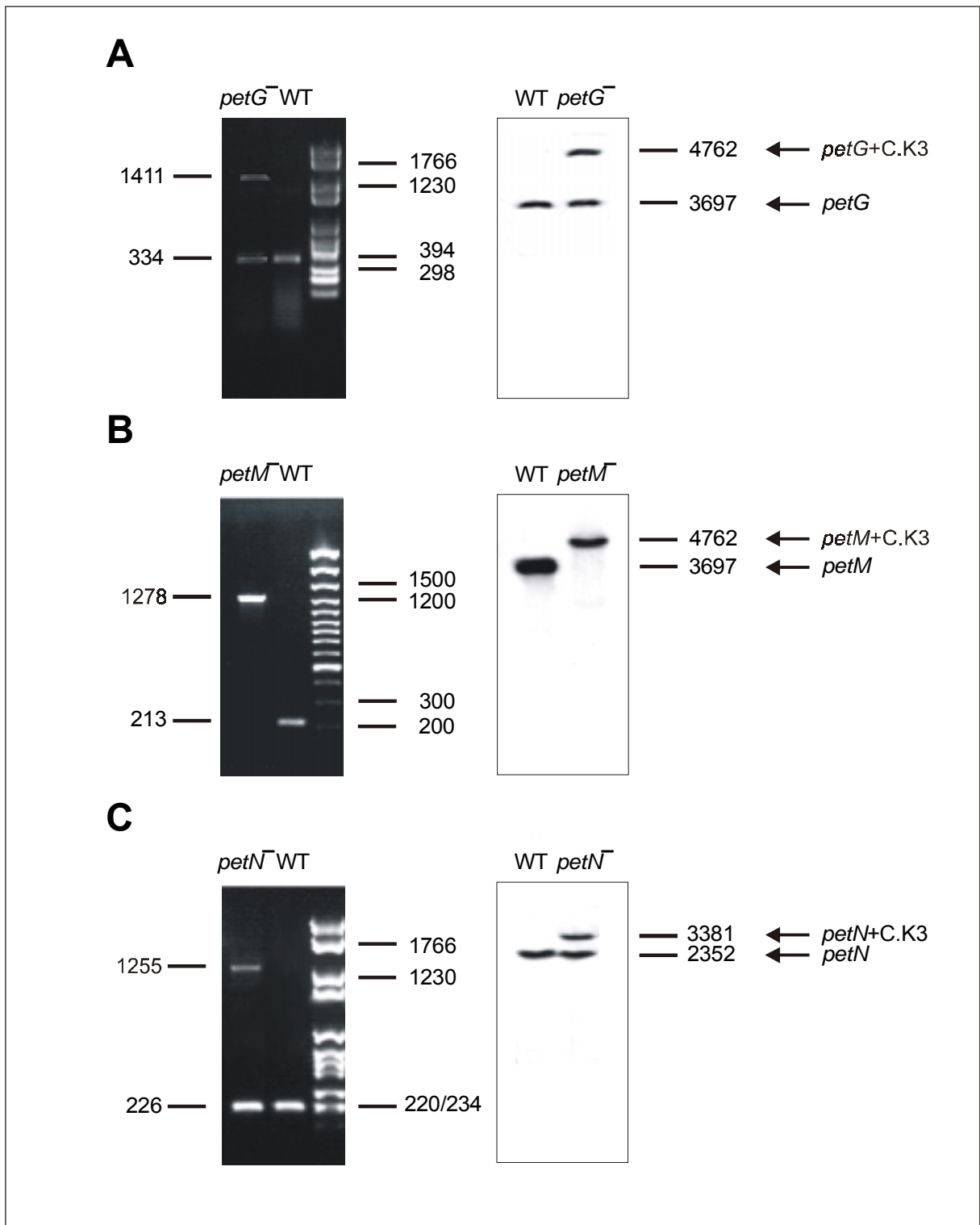


Abbildung 2.10/1: PCR- und "Southern Blot" Analyse der *Anabaena* PCC 7120-Deletionsmutanten. A) $\Delta petG$, B) $\Delta petM$ und C) $\Delta petN$.

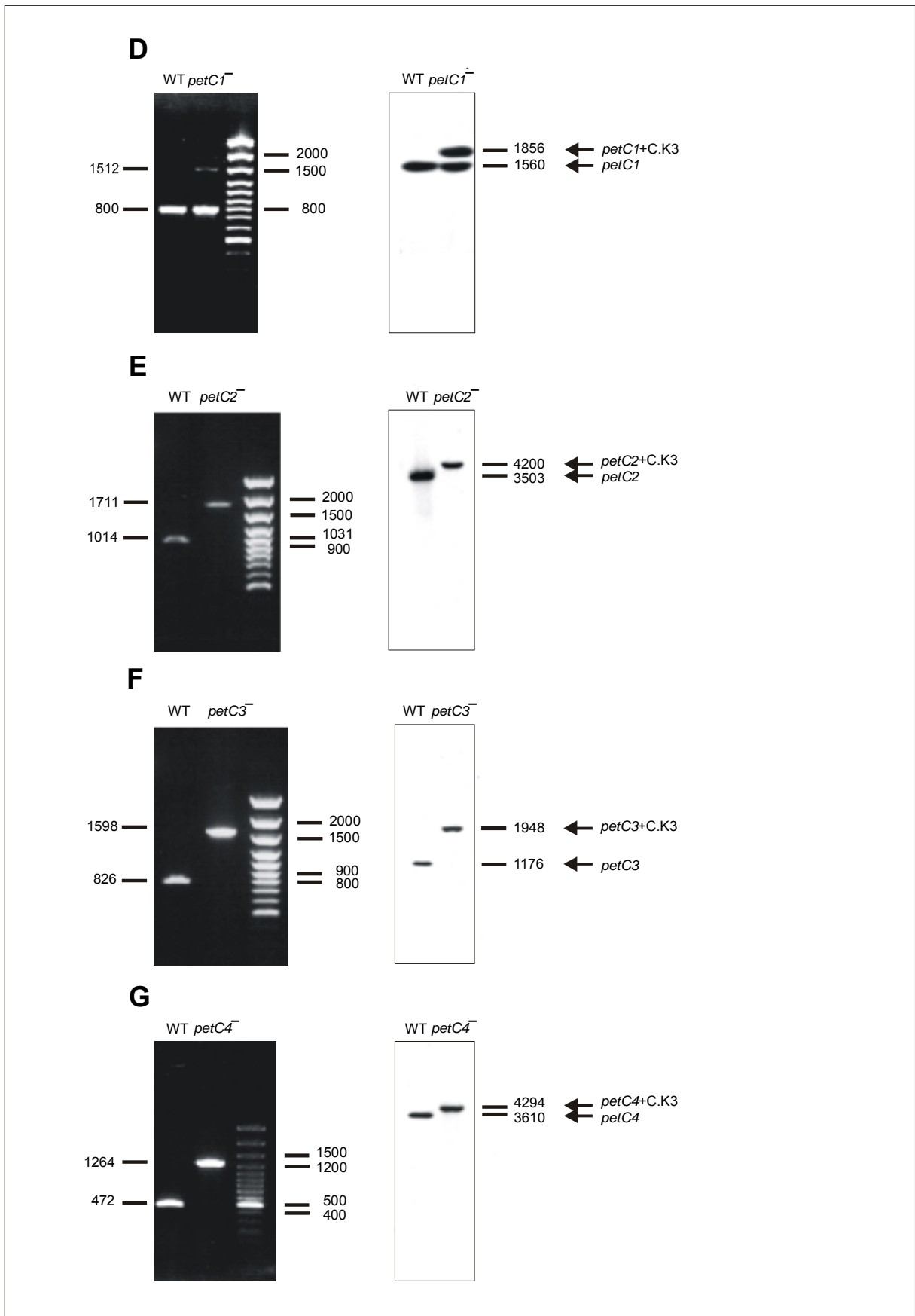


Abbildung 2.10/2: PCR- und "Southern Blot" Analyse der *Anabaena* PCC 7120-Deletionsmutanten. D) $\Delta petC1$, E) $\Delta petC2$, F) $\Delta petC3$ und G) $\Delta petC4$.

Phänotypisch sollten nur die Mutanten charakterisiert werden, bei denen zum einen die Integration des deletierten Genes durch eine doppelte Rekombination stattgefunden hatte und zweitens dieser Genotyp bis zur vollständigen Segregation selektiert werden konnte. Dadurch wurde gewährleistet, dass unter keinen Umständen mehr eine Kopie des WT-Gens vorlag. Die PCR- und "Southern Blot" Analyse in Abbildung 2.10/1+2 zeigt eine Doppelrekombination und vollständige Segregation für die Stämme $\Delta petM$, $\Delta petC2$, $\Delta petC3$ und $\Delta petC4$. Entsprechende Stämme konnten für *petG* und *petN* wahrscheinlich deswegen nicht erreicht werden, da das Fehlen der entsprechenden Proteine für *Anabaena* letal ist. Im Fall des $\Delta petC1$ -Stammes führt dagegen wie oben beschrieben die Deletion von *petC1* sehr wahrscheinlich zu einem polaren Effekt auf die Transkription des im Operon nachfolgenden essentiellen *petA*-Gens. Die erfolgreiche Komplementation von *petA* durch eine Konjugation des "Shuttlevektors" pMA223 (s. 2.4.3.2.1) in die unvollständig segregierte Mutante $\Delta petC1$ sollte zu einer vollständigen Deletion des *petC1*-Genes führen, was im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitmangel aber nicht mehr erreicht werden konnte.

2.4.5 Phänotyp der *pet*-Mutanten

2.4.5.1 Wachstumskurven

In einem ersten Schritt wurde das Wachstum der Deletionsmutanten $\Delta petM$, $\Delta petC2$, $\Delta petC3$ und $\Delta petC4$ unter Standardbedingungen in Nitrat-haltigem Medium untersucht. Es traten keine signifikanten Unterschiede in den Wachstumskurven sowohl untereinander als auch im Vergleich zu einer WT-Kultur auf (Daten nicht gezeigt). Die Gene *petM*, *petC2*, *petC3* und *petC4* sind für das Wachstum von *Anabaena* PCC 7120 in Nitrat-haltigem Medium offensichtlich nicht essentiell.

2.4.5.2 Wachstum auf N₂

Mit einer Ausnahme waren alle Mutanten in der Lage, in Medium ohne gebundenen Stickstoff in vergleichbarer Weise wie der WT zu wachsen. Die Gene *petM*, *petC2* und *petC3* sind also auch für ein Wachstum von *Anabaena* PCC 7120 in Medium mit N₂ als einziger Stickstoffquelle nicht notwendig. Der Entzug an gebundenem Stickstoff führte allerdings in Kulturen des $\Delta petC4$ Stammes innerhalb von 24-48 h zu einem Ausbleichen der Zellen und einem raschen Absterben der Kultur. Lichtmikroskopisch sind in Filamenten des WT 48 h nach einem "Stickstoff step down" deutlich reife Heterocysten zu erkennen. Filamente des $\Delta petC4$ -Stammes weisen diese ausdifferenzierten Zellen jedoch nicht auf (Abb. 2.11).

Fluoreszenzaufnahmen zeigen zusätzlich einen weitgehenden Abbau der Phycobilisomen in allen Zellen der $\Delta petC4$ -Mutante bei Stickstoffhunger. Nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff für 48 h kommt es zu einem fast vollständigen Verlust der charakteristischen Phycobilisomenfluoreszenz (in vivo bei 660 nm). Der Abbau der Phycobilisomen in der $\Delta petC4$ -Mutante vollzieht sich in nahezu allen Zellen eines Filamentes, während im WT Phycobilisomen nur in denjenigen Zellen abgebaut werden, die zur Heterocyste differenzieren. Trotz des Abbaus der Phycobilisomen in allen Zellen lassen sich aber auch in den Filamenten der $\Delta petC4$ -Mutante Fluoreszenzunterschiede zwischen benachbarten

Zellen feststellen. In einigen Zellen ist der Verlust der Fluoreszenz weiter fortgeschritten, was darauf hindeutet, dass diese Zelle als Heterocyste determiniert ist. Zu den frühen biochemischen Vorgängen einer designierten Heterocyste gehört eben dieser Proteinabbau, der insbesondere die Phycobilisomen betrifft und über die Fluoreszenzänderung sehr gut beobachtet werden kann. Es scheint also auch in der $\Delta petC4$ -Mutante zu der charakteristischen Musterbildung innerhalb des Filamentes zu kommen, ohne dass allerdings eine morphologisch erkennbare Differenzierung erfolgt. Eine Fixierung von N_2 ist unmöglich, wodurch der Stickstoffmangel in den vegetativen Zellen weiter durch katabolische Prozesse wie den Abbau der Phycobilisomen gedeckt wird. Das *petC4*-Gen ist offensichtlich essentiell für die Heterocystendifferenzierung in *Anabaena* PCC 7120 (s. Diskussion). Im Lichtmikroskop ist außerdem deutlich zu erkennen, dass die Zellen der Mutante wesentlich kleiner sind, was wahrscheinlich auch auf einen verstärkten Proteinabbau zurückzuführen ist.

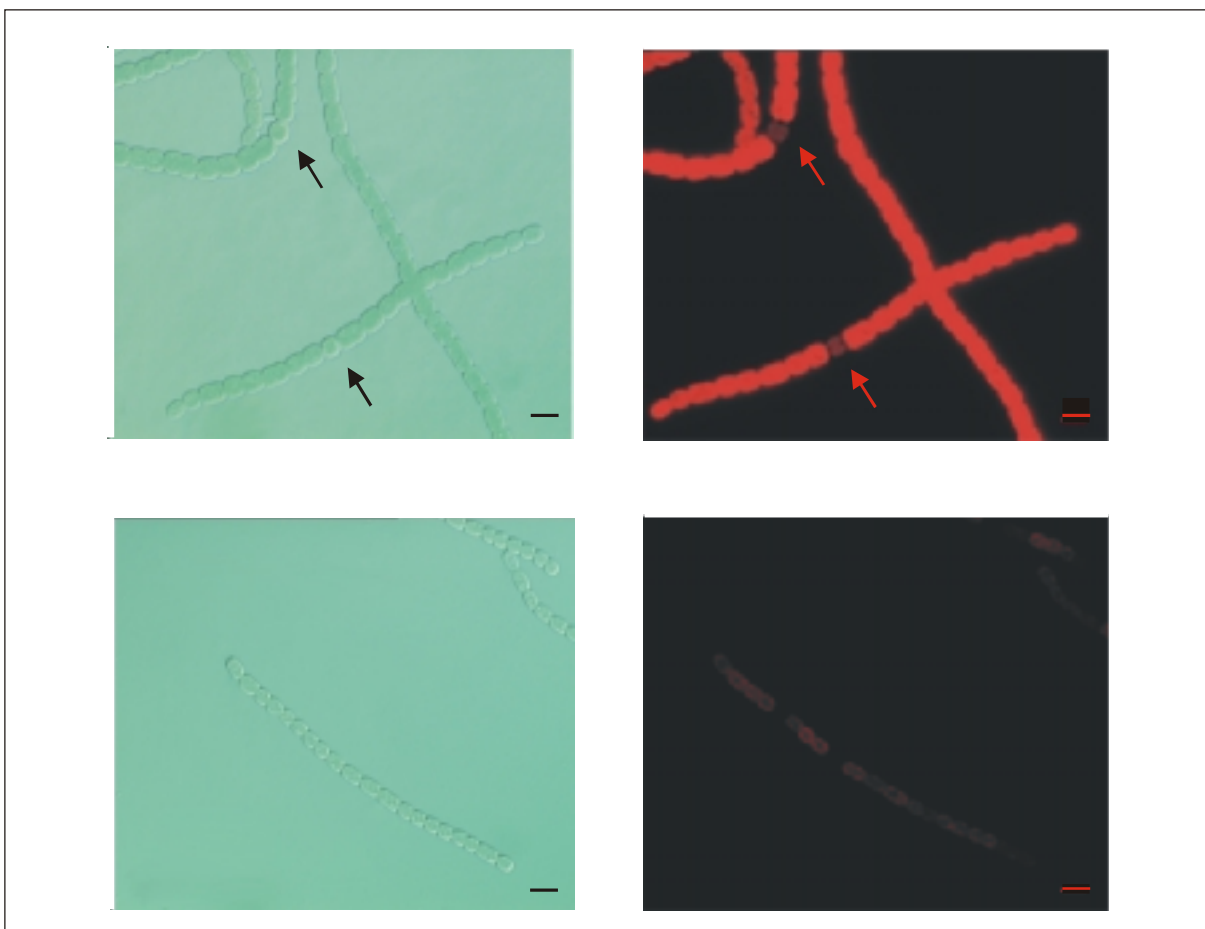


Abbildung 2.11: Filamente des Wildtyps von *Anabaena* 7120 (oben) und der $\Delta petC4$ -Mutante (unten). Lichtmikroskopische Aufnahmen (links) und Aufnahmen der Phycobilisomenfluoreszenz (rechts). Reife Heterocysten sind durch Pfeile gekennzeichnet. Der Balken entspricht 5 μ m.

2.4.5.3 Diaminobenzidin-Färbung

Der beim Wildtyp nach Inkubation mit Diaminobenzidin zu beobachtende braune Niederschlag in den Polregionen („Honeycomb“-Regionen) der Heterocysten war in keiner Zelle des Filamentes der

$\Delta petC4$ -Mutante zu beobachten Die Unfähigkeit der Mutante zur Oxidation von DAB ließ auf eine unvollständige Differenzierung des Protoplasten schließen (s. Diskussion).

2.5 Komplementation der $\Delta petC4$ -Mutante

Um zu bestätigen, dass der bei der *petC4*-Mutante beobachtete Phänotyp durch Inaktivierung des *petC4*-Gens und nicht durch einen polaren Effekt zustande kam, wurde das intakte *petC4*-Gen und dessen den putativen Promotor beinhaltende 5'-Bereich auf einem "Shuttlevektor" in die $\Delta petC4$ -Mutante gebracht. Dieser "Shuttlevektor" ist in der Lage nach Konjugation in *Anabaena* PCC 7120 autonom zu replizieren. Die Selektion erfolgt durch den Vektor codierte Streptomycin- bzw. Spektinomycinresistenz. Durch seine geringe Kopienzahl in der Zelle (etwa 10) wird gewährleistet, dass das Protein in ähnlicher Quantität exprimiert wird wie im WT. Demzufolge sollte der so erhaltene *Anabaena*-Stamm wieder den Phänotyp des WT aufweisen.

2.5.1 Konstruktion des *petC4* Komplementationsvektors

Das mit den Oligon. 243 und 244 generierte PCR-Fragment mit dem potentiellen Promotorbereich und dem *petC4*-Gen wurde nach *Bam*HI-Verdau in die *Bam*HI-Schnittstelle des "Shuttlevektors" pRL1049 ligiert (pMA220).

2.5.2 Phänotyp des Stammes $\Delta petC4$ (pMA220)

Nach dem konjugativen Transfer von pMA220 in die $\Delta petC4$ -Mutante war der resultierende Stamm phänotypisch nicht mehr vom WT zu unterscheiden. Insbesondere werden wieder reife Heterocysten gebildet und ein Wachstum mit N_2 als einziger Stickstoffquelle ist möglich. Dieses ist der Beweis, dass der Phänotyp der *petC4*-Deletionsmutante auch wirklich auf das Fehlen von PetC4 zurückzuführen ist. Das Vorhandensein des *petC4*-tragenden "Shuttlevektors" pMA220 in den Zellen der $\Delta petC4$ -Mutante wurde durch eine PCR-Analyse nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

3 Diskussion

Der Cytochrom b_6f -Komplex ist in Cyanobakterien gemeinsamer Bestandteil des photosynthetischen und respiratorischen Elektronentransportes (Peschek, 1987) und stellt den zentralen Knotenpunkt innerhalb der vernetzten Elektronentransportketten dar (Abb. 1.4). Eine Charakterisierung einzelner Untereinheiten des b_6f -Komplexes in Deletionsexperimenten gestaltete sich in der Vergangenheit schwierig, da ein Ausschalten von essentiellen Untereinheiten zum Verlust der Aktivität des Komplexes führt. Ohne b_6f -Komplex ist ein Wachstum auch trotz einer alternativen Oxidase (Abb. 1.4) nicht möglich (Schneider, 2000). Da in Cyanobakterien kein alternativer Cytochrom bc -Komplex vorhanden ist, der ein heterotrophes Wachstum ermöglichen könnte, ist die Herstellung von Mutantstämmen ohne funktionsfähigen b_6f -Komplex unmöglich.

Geninaktivierungen anderer Komponenten der Elektronentransportketten in Cyanobakterien sind im Gegensatz dazu mehrfach beschrieben worden. So wurde in *Anabaena variabilis* (Toelge et al., 1991) und in *Synechocystis* PCC 6803 (Shen et al., 1993) das PS I erfolgreich ausgeschaltet. Auch konnten *Synechocystis*-Stämme ohne PS II (Nilsson et al., 1990) oder ohne terminale Oxidase (Pils et al., 1997) gewonnen werden.

Die Schwierigkeiten bei der Charakterisierung cyanobakterieller Untereinheiten des b_6f -Komplexes durch Deletionsexperimente führten dazu, dass vorrangig höhere Pflanzen wie *Chlamydomonas reinhardtii*, in denen ein mitochondrialer bc -Komplex heterotrophes Wachstum erlaubt, für entsprechende Versuche verwendet wurden.

In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Charakterisierung derjenigen Untereinheiten des cyanobakteriellen b_6f -Komplexes gelegt, die wie die kleinen Untereinheiten nicht unmittelbar an Redoxprozessen beteiligt sind, oder aber in mehreren Isoformen vorliegen, also nicht zwangsläufig als essentiell für den Organismus angesehen werden mussten.

3.1 Identifizierung und Charakterisierung der kleinen Untereinheiten in *Anabaena* sp.

In den Genomen von *A. variabilis* und *Anabaena* PCC 7120 wurden jeweils Gene für die Untereinheiten *petG*, *petM* und *petN* identifiziert. Ein Gen für die aus höheren Pflanzen und Algen bekannte Untereinheit PetL (s. Einleitung) konnte weder in *Anabaena* sp. noch in anderen vollständig sequenzierten Genomen von Cyanobakterien gefunden werden. Diese Untereinheit scheint phylogenetisch jüngeren Ursprungs zu sein und nur in plastidären b_6f -Komplexen vorzukommen.

Auffällig bei der Analyse der Sequenzen ist die sehr große Identität der aus *petG*, *petM* und *petN* abgeleiteten Proteine mit den cyanobakteriellen Homologen. Obwohl die Proteine aus nicht viel mehr als einer Transmembranhelix bestehen, deutet die stark konservierte Aminosäuresequenz innerhalb der Cyanobakterien funktionell auf eine wichtige Rolle jedes dieser Proteine innerhalb des b_6f -Komplexes hin.

3.1.2 Deletion der kleinen Untereinheiten in *Anabaena* PCC 7120

Von den Genen der kleinen Untereinheiten konnte in *Anabaena* PCC 7120 nur *petM* ausgeschaltet werden. Im Fall der beiden anderen Gene waren die Versuche, vollständig segregierte Deletionsmutanten zu erhalten, nicht erfolgreich. PetG und PetN scheinen im Gegensatz zu PetM essentielle Untereinheiten des *b₆f*-Komplexes zu sein. Gestützt wird diese Vermutung durch vergleichbare Erkenntnisse aus Deletionsmutanten anderer Organismen. Die Deletion des *petG*-Gens (Berthold et al., 1995) in *Chlamydomonas reinhardtii* ließ die Mutante nicht mehr photoautotroph wachsen und die Menge an *b₆f*-Komplex war drastisch geringer. Ein Ausschalten der erst kürzlich als neue Untereinheit des Cytochrom *b₆f*-Komplex beschriebenen PetN-Proteins in Tabak ist ebenfalls letal. (Hager et al., 1999).

Die Disruption von PetM in *Anabaena* PCC 7120 scheint im Gegensatz zur Inaktivierung von PetG oder PetN keinen direkten Einfluss auf den Organismus zu haben. Phänotypisch verhält sich die Δ *petM*-Mutante unter allen untersuchten Bedingungen in bezug auf photoautotrophes Wachstum, Bildung von Heterocysten und N₂-Fixierung exakt wie der WT. Auch im Cyanobakterium *Synechocystis* PCC 6803 ist *petM* ausgeschaltet worden (Schneider et al., 2001a). Die *Synechocystis*-Mutante ist ebenfalls lebensfähig und zeigt keine signifikanten Unterschiede zum WT. Vermutlich spielt PetM in *Synechocystis* PCC 6803 eine regulatorische Rolle, ist aber nicht essentiell für die Aktivität des *b₆f*-Komplexes (Schneider et al., 2001a).

Über eine Funktion der kleinen Untereinheiten im *b₆f*-Komplex lassen sich anhand der Ergebnisse der Deletionsexperimente kaum Hinweise oder Erkenntnisse gewinnen.

3.1.3 Funktion der kleinen Untereinheiten

Die genaue Funktion einer kleinen Untereinheit im *b₆f*-Komplex ist bislang in keinem Organismus aufgeklärt worden. Erkenntnisse in dieser Richtung stammen wie oben erwähnt insbesondere von den Δ *petG*- und Δ *petL*-Mutanten (Berthold et al., 1995, Takahashi et al., 1996) der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, für die ein photoautotrophes Wachstum eingeschränkt oder unmöglich ist, sowie die Gesamtmenge an *b₆f*-Komplex stark erniedrigt ist. Letal wirkt sich die Deletion von PetN in Tabak aus (Hager et al., 1999).

Da PetG, PetM und PetN aufgrund fehlender redoxaktiver Gruppen nicht unmittelbar an katalytischen Prozessen beteiligt sind, muss für sie eine andere (im Fall von PetG und PetN essentielle) Funktion postuliert werden. Die Rolle von PetG und PetN im *b₆f*-Komplex könnte der von Untereinheit 6 im mitochondrialen *bc1*-Komplex entsprechen, für die bei Hefe gezeigt wurde, dass sie der Stabilisierung einer voll aktiven, dimeren Struktur dient (Schmitt und Trumpower, 1990). Eine Beteiligung von kleinen Proteinuntereinheiten an der Stabilisierung und Oligomerisierung ist auch für die Membranproteinkomplexe der Reaktionszentren von Photosystem I (Xu et al., 1995) und Photosystem II (Kunstner et al., 1995; Takahashi et al., 1994) durch Deletionsstudien belegt.

Alternativ könnten die kleinen Untereinheiten auch mit anderen Proteinen interagieren, und über diesen Kontakt eine Signalkaskade beeinflussen. Auf diese Weise könnten vom *b₆f*-Komplex als

Sensor aufgenommene Signale über eine Transduktionskette Vorgänge innerhalb der Zelle regulieren.

3.2 Identifizierung und Charakterisierung von mehreren Rieske FeS-Proteinen in *Anabaena* sp.

In *A. variabilis* bzw. *Anabaena* PCC 7120 wurde mit einer Ausnahme für jede Untereinheit des *b₆f*-Komplexes jeweils nur ein Gen identifiziert. Interessanterweise wurden aber in beiden Organismen mehrere Gene für die Rieske-Untereinheit gefunden. Grundlage für die Klassifizierung als Rieske FeS-Protein war vorrangig das Auftreten der beiden charakteristischen Bindemotive des [2Fe2S]-Clusters. Solche [2Fe2S]-Cluster kommen als prosthetische Gruppe allerdings in einer Vielzahl von Enzymen vor. Die Bindung des Clusters erfolgt über die Koordination der Fe-Atome an den Schwefel von Cysteinresten. Eine Ausnahme innerhalb dieser generellen Koordination des [2Fe2S]-Clusters bilden die Rieske FeS-Zentren, bei denen eines der Fe-Atom über die ϵ -Stickstoffatome der Imidazolringe zweier Histidinreste gebunden wird. Proteine mit einem solchen Rieske [2Fe2S]-Cluster werden in zwei Gruppen unterteilt (Schmidt und Shaw, 2001). Neben dem zuerst entdeckten Protein mitochondrialer *bc₁*-Komplexe (Rieske et al., 1964) gehören auch solche aus *bc*-Komplexen bakterieller Atmungsketten (Trumpower and Gennis, 1994), aus *b₆f*-Komplexen des photosynthetischen Elektronentransportes von Pflanzen und photosynthetischen Bakterien (Riedel et al., 1991) und solche aus Archaeen (Schäfer et al., 1996) zu der Gruppe der Rieske FeS-Proteine. Die zweite Gruppe wird von bakteriellen Hydroxylasen und Oxygenasen (Mason und Cammack, 1992; Butler und Mason, 1997) gebildet, sowie nach neuesten Erkenntnissen auch von eukaryotischen Oxygenasen (Schlenzka et al., 1996; Rathinasabapathi et al., 1997). Diese Enzymgruppe wird auch als Proteine des "Rieske-Typs" bezeichnet.

Für eine Einordnung aller sieben PetC-Sequenzen der beiden *Anabaena* Species in die Gruppe der Rieske FeS-Proteine spricht das Auftreten zweier hoch konservierter Cysteinreste (s. Abb. 2.4), die zur Ausbildung der für diese Gruppe charakteristischen Disulfidbrücke zwischen den Bindemotiven des [2Fe2S]-Clusters benötigt werden (Kauppi et al., 1998). Diese Disulfidbrücke tritt nur bei Rieske FeS-Proteinen auf, nicht aber bei Proteinen die zwar [2Fe2S]-Cluster als prosthetische Gruppen besitzen, funktionell aber andere enzymatische Reaktionen katalysieren. Weiterhin ist der C-terminal der Cluster-Bindestellen gelegene sogenannte Pro-loop ein weiteres nur in Rieske FeS-Proteinen hinreichend konserviertes Merkmal (Iwata et al., 1996).

Die Analyse der aus den *petC*-Genen abgeleiteten Proteinsequenzen liefert noch weitere Hinweise darauf, dass es sich auch bei PetC2 und PetC4 funktionell um Rieske FeS-Proteine handeln könnte. So weisen PetC2 bei *A. variabilis* bzw. PetC2 und PetC4 bei *Anabaena* PCC 7120 neben den homologen Bindemotiven der prosthetischen Gruppe eine 30-40 prozentige Identität (vgl. Tab. 2.2) in der Gesamtsequenz zum jeweiligen PetC1-Protein auf. Auch die Länge des offenen Leserahmens (178-179 AS) und die Größe des daraus abgeleiteten Proteins (~ 19 kDa) sind vergleichbar. PetC1 ist durch Ansequenzierung als Rieske-Untereinheit des angereicherten *b₆f*-Komplexes bei *Anabaena* PCC 7120 identifiziert worden (s. 2.4.2). Die gemessene Aktivität des angereicherten Komplexes spricht für PetC1 als funktionelles Rieske FeS-Protein in *Anabaena* sp. Zudem sind alle bisher in Cyanobakterien beschriebenen Gene für die funktionelle Rieske-Untereinheit des Cytochrom *b₆f*-Komplexes wie *petC1* in einem Operon mit dem Cytochrom *f* codierenden *petA*-Gen organisiert.

Abweichend in bezug auf die Größe verhält sich das PetC3-Protein verglichen mit dem jeweiligen PetC1-Protein. Aufgrund mehrerer Deletionen codiert *petC3* ein etwa 14 kDa großes Protein mit einer Länge von nur 136 Aminosäuren (Abb. 2.3). Dennoch besitzt auch PetC3 wie alle anderen PetC-Proteine einen sehr hydrophoben Bereich von etwa 20 Aminosäuren am N-Terminus des Proteins, der ausreichend zur Bildung einer α -helicalen Transmembranspanne ist. Dieser Membrananker ist für Rieske FeS-Proteine in den Kristallen mitochondrialer *bc₁*-Komplexe gezeigt worden und wird gleichsam auch für die funktionsanalogen Proteine in *b₆f*-Komplexen angenommen (Karauchnow et al., 1997).

Die aus den Sequenzvergleichen der Rieske-Isoformen ermittelten Eigenschaften deuten stark darauf hin, dass es sich bei allen durch die *petC*-Gene codierten Proteine um Rieske FeS-Proteine handeln könnte. Inwieweit diese Proteine auch tatsächlich exprimiert werden und ob sie im Fall einer Expression auch Bestandteil des *b₆f*-Komplexes von *Anabaena* sp. sind konnte anhand von Sequenzanalysen allerdings nicht beantwortet werden.

3.2.1 Auftreten von Rieske-Isoformen in anderen Organismen

Das Vorkommen mehrerer Gene für Isoformen des Rieske FeS-Proteins im Genom ist zwar nicht ausschließlich auf Cyanobakterien beschränkt, scheint bei diesen aber ein verbreitetes Merkmal zu sein. In allen vollständig sequenzierten cyanobakteriellen Genomen treten mindestens drei Gene für Rieske FeS-Proteine auf. Nach Schütz et al. (2000) sind nur noch in phylogenetisch ursprünglichen Organismen wie z.B. in *Aquifex aeolicus*, in *Deinococcus radiodurans* und in der Gruppe der Archaeen bei *Aeropyrum pernix* mehrere Rieske-Gene gefunden worden. Interessanterweise sind aber in höheren Pflanzen und Algen solche Isoformen bisher nicht bekannt. Bei den in Tabak identifizierten zwei Genen für ein Rieske FeS-Protein scheint es sich aufgrund der gleichstarken Expression und des extrem hohen Identitätsgrads von über 98 % wohl eher um die Allele desselben Gens zu handeln (Madueno et al., 1992).

Das Auftreten von mehreren *petC*-Genen in allen Cyanobakterien scheint auf eine funktionelle Rolle der einzelnen PetC-Proteine hinzudeuten. Wahrscheinlich besitzen Cyanobakterien durch mehrere Isoformen dieses Proteins Vorteile z. B. bei der Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen, da jede dieser Isoformen unterschiedliche reguliert werden könnte (Tandeau de Marsac und Houmard, 1993). Vergleichbares ist in *Synechocystis* PCC 6803 für das Gen der PS II-Untereinheit *PsbA* gezeigt worden, wo sich das Expressionsmuster der homologen Gene *psbA1*, *psbA2* und *psbA3* bei verschiedenen Lichtbedingungen verändert (Mohamed et al., 1993; Salih und Jansson, 1997).

Da Cyanobakterien als Vorläufer der Chloroplasten gelten, zumindestens aber auf einen gemeinsamen Ursprung zurückgehen, sind Rieske-Isoformen in höheren Organismen wahrscheinlich im Verlauf der Evolution verschwunden. Die Funktionen der alternativen Rieske FeS-Proteine wurde in Chloroplasten dann möglicherweise von anderen Komponenten übernommen oder nicht mehr gebraucht.

3.2.2 Expressionsstudien

Mittels RT-PCR-Analysen konnte gezeigt werden, dass alle vier Gene für Rieske FeS-Proteine in *Anabaena* PCC 7120 zumindest transkribiert werden. Während die Transkripte von *petC1*, *petC2* und *petC3* konstitutiv vorhanden sind, ist ein transienter Anstieg der *petC4*-mRNA zu beobachten (s. unten). Da die Regulation der Expression in Cyanobakterien hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene abläuft (Curtis und Martin, 1994), kann auch das Vorhandensein aller vier PetC-Proteine angenommen werden. Reporterstudien mit dem "Green Fluorescent Protein" (GFP) sollten die Expression aller vier Proteine in *Anabaena* PCC 7120 verifizieren. Dazu wurde der jeweilige putative Promotorbereich vor das *gfp*-Gen kloniert und mittels eines "Shuttlevektors" in den WT von *Anabaena* PCC 7120 gebracht. Trotz der Verwendung einer GFP-Variante mit der solche Expressionsstudien schon erfolgreich in diesem Organismus durchgeführt werden konnten (Yoon und Golden, 1998), war dieser Ansatz bis zum jetzigen Zeitpunkt allerdings nicht erfolgreich. Ursächlich könnte das darauf zurückzuführen sein, dass die Expression des von Yoon und Golden (1998) untersuchten Proteins (PatS) verglichen mit den Untereinheiten des *b₆f*-Komplexes sicherlich nur auf einem sehr geringen Niveau stattfindet. Dementsprechend wird auch das PatS-GFP-Fusionsprotein nur in sehr geringer Menge gebildet. Im Gegensatz dazu war möglicherweise die durch die Rieske-Promotoren gesteuerte Expression des GFP aber so hoch, dass eine für die Zelle letale Konzentration an GFP erreicht wurde. Solche Phänomene sind gerade für die Gattung *Anabaena* schon beschrieben worden.

Neben der gezeigten Transkription aller Rieske-Gene in *Anabaena* PCC 7120 sprechen auch Untersuchungen der drei Rieske-Isoformen im verwandten Cyanobakterium *Synechocystis* PCC 6803 für eine mögliche Expression aller vier Rieske FeS-Proteine von *Anabaena* PCC 7120. So konnte in *Synechocystis* PCC 6803 nicht nur die Expression aller drei Proteine unter physiologischen Bedingungen durch "Western Blot" Analysen mit spezifischen Antikörpern gezeigt werden (Schneider, 2000), sondern zumindestens zwei Isoformen (PetC1 und PetC3) sind auch assoziierte Untereinheiten eines *b₆f*-Komplexes (Schneider et al., 2001b). Wahrscheinlich werden in *Synechocystis* PCC 6803 alle drei Rieske-Isoformen konstitutiv exprimiert, sind aber in unterschiedlichen Mengen Untereinheiten des *b₆f*-Komplexes. Es gibt offensichtlich in diesem Cyanobakterium heterogene *b₆f*-Komplexe, die sich nur in ihrer Rieske-Untereinheit voneinander unterscheiden. So konnte von Schneider (2000) mittels "Western Blot" Analyse gezeigt werden, dass die Menge an isoliertem *b₆f*-Komplex mit PetC1 als Rieske-Komponente in isolierten Membranen wesentlich größer ist als die Menge an *b₆f*-Komplex mit einer der alternativen Untereinheiten. Eine vergleichbare Situation könnte auch in *Anabaena* PCC 7120 vorliegen. Bei der Ansequenzierung der Rieske-Bande des aus allen Zellen des Filamentes isolierten *b₆f*-Komplexes konnte nur PetC1 identifiziert werden. PetC2, PetC3 und PetC4 konnten auf diese Weise nicht als integrale Bestandteile des Komplexes angesprochen werden. Sie sind womöglich aber dennoch in geringerer Menge als PetC1 als Komponenten eines alternativen *b₆f*-Komplexes vorhanden, das Signal des dominanten PetC1 machte aber eine Identifizierung unmöglich. Bei dem aus Heterocysten isolierten *b₆f*-Komplex war eine Ansequenzierung der putativen Rieske FeS-Proteine erfolglos. Vielleicht sind die Proteine N-terminal maskiert und eine Sequenzierung daher nicht möglich. Der erfolglose Sequenzierungsversuch kann

aber auch auf ein verändertes Verhältnis der Rieske-Untereinheiten in den b_6f -Komplexen aus Heterocysten hindeuten. Möglicherweise übernehmen eines oder beide der alternativen Proteine PetC2 und PetC4 die dominante Rolle von PetC1, diese Annahme konnte aber mittels Ansequenzierung nicht verifiziert werden. Antikörper gegen synthetische Peptide nicht homologer Bereiche der PetC-Isoformen könnten in Zukunft zur Identifizierung der jeweiligen Isoform in verschiedenen Zelltypen der Filamente beitragen.

3.2.3 Redoxpotentiale der Rieske-Isoformen

Interessante Hinweise auf eine mögliche Funktion liefern die Redoxpotentiale der abgeleiteten Rieske FeS-Proteine. Wie von Schütz et al. (1994) vorgeschlagen und experimentell von Denke et al. (1998) bestätigt, kann anhand zweier charakteristischer Aminosäuren am C-terminalen Ende des zweiten [2Fe2S]-Cluster-Bindemotivs das Redoxpotential des Proteins vorhergesagt werden (s. Abb. 2.4). Experimentell ermittelte Redoxpotentiale unterstützen diese Theorie. Im folgenden sind die Mittelpunktspotentiale der Rieske FeS-Proteine einiger ausgewählter Organismen in Zusammenhang mit der Sequenz des zweiten Bindemotivs und der beiden ausschlaggebenden Aminosäuren aufgeführt.

Bindemotiv II	Organismus	Em [mV]	Literatur	
CPCHGSxY	Spinat Chloroplast	+300	Zhang et al., 1996	
	Rinderherz Mitochondrien	+312	Link et al., 1992	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+285	Denke et al., 1998	
	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	+310	Trumpower, 1981	
	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	PetC1	+320	Schneider, 2000
		PetC2	+300	
	<i>Anabaena variabilis</i>	PetC1	n. bekannt	diese Arbeit
		PetC2	n. bekannt	
	<i>Anabaena</i> PCC 7120	PetC1	n. bekannt	diese Arbeit
		PetC2	n. bekannt	
PetC4		n. bekannt		
CPCHGSxF	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	+229	Henninger et al., 1999	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y185F	+217	Denke et al., 1998	
CPCHGzxY	<i>Chlorobium limicola</i>	+160	Trumpower, 1981	
	<i>Thermus thermophilus</i>	+150	Kuila und Fee, 1986	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S183A	+155	Denke et al., 1998	
	<i>Anabaena variabilis</i> PetC3	n. bekannt	diese Arbeit	
	<i>Anabaena</i> PCC 7120 PetC3	n. bekannt	diese Arbeit	
CPCHGyxF	<i>Heliobacillus mobilis</i>	+150	Kramer et al., 1997	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S183A, Y185F	+105	Denke et al., 1998	
	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 PetC3	+135	Schneider, 2000	

Tabelle 3.1: Sequenz der C-terminalen Bindedomäne des [2Fe2S]-Clusters und der Redoxpotentiale (Em) einiger ausgesuchter Rieske FeS-Proteine. Aminosäurereste mit Hydroxylgruppen an den Positionen 6 und 8 der Bindedomäne sind fett gedruckt. x, y und z bezeichnen variable Aminosäurereste.

Die Hydroxylgruppen der Serin- und Tyrosinreste stabilisieren über Wasserstoffbrückenbindungen die reduzierte Form des [2Fe2S]-Clusters und sind somit verantwortlich für das extrem hohe Redoxpotential des Proteins von etwa +300 mV. Bei Organismen mit einem Austausch Y→F an

Position 8 ist das Redoxpotential etwa 60-80 mV geringer. Deutlich wird dieser Effekt besonders in der Y185F-Mutante von *S. cerevisiae* (Denke et al., 1998). Noch drastischer wirkt sich die Substitution des Serinrestes an Position 6 aus. Das Redoxpotential sinkt bei der *S. cerevisiae*-Mutante S183A von ursprünglich +285 auf +155 mV. Vergleichbare Werte (Tab.3.1) finden sich auch bei Organismen wie z.B. *C. limicola*, die ebenfalls an dieser Position keinen Serinrest besitzen (Schütz et al., 1994). Das Fehlen beider Hydroxylgruppen an den Positionen 6 und 8 vermindert das Redoxpotential noch weiter, was auch durch den Wert der Doppelmutante S183A und Y185F von *S. cerevisiae* deutlich wird.

Obwohl die Redoxpotentiale der *Anabaena* Rieske FeS-Proteine bis jetzt noch nicht ermittelt wurden, lassen sie sich aufgrund der Einordnung in obige Tabelle sicherlich bis zu einem gewissen Grad vorhersagen. Da die Redoxpotentiale von Ubichinol und Plastochinol mit etwa +100 mV sehr ähnlich sind (Rich und Bendall, 1980), scheint es zulässig zu sein, Werte von Organismen mit *bc*-Komplexen und solche aus Organismen mit *b₆f*-Komplexen gleichermaßen in die Betrachtungen einzubeziehen. Demnach lassen die beiden Aminosäuren an den Positionen 6 und 8 des C-terminalen Bindemotivs für die längeren Rieske-Isoformen (PetC1, PetC2 und PetC4) sowohl von *A. variabilis* als auch von *Anabaena* PCC 7120 ein Redoxpotential von ~ +300 mV vermuten. Dieser Wert entspricht den bekannten Redoxpotentialen von *b₆f*- und *bc₁*-Rieske FeS-Proteinen aus Ubi- bzw. Plastochinol oxidierenden Organismen (Henninger et al., 1999).

Im Gegensatz dazu liegt das Redoxpotential beider PetC3-Proteine von *Anabaena* sp. gemäß obiger Vorhersage durch den S6A-Austausch mit 150 bis 160 mV wahrscheinlich um etwa 150 mV niedriger. Das niedrige Redoxpotential hat aber Konsequenzen auf die mögliche Funktion des PetC3 Proteins. Während PetC1 und PetC2 ein für Rieske Proteine typisches Redoxpotential aufweisen und somit als Plastochinol-Oxidase wirken können, ist eine Oxidation von Plastochinol durch PetC3 unwahrscheinlich. Aufgrund des Mittelpunktspotentials des Quinonsystems erscheint eine Oxidation von Plastochinol durch PetC3 zwar möglich, betrachtet werden müssen aber die Redoxpotentiale der beiden Halbreaktionen vom Plastochinol zum Semiplastochinon bzw. vom Semiplastochinon zum Plastochinon (Rich, 1984; Hauska et al., 1996).

Bisher ist kein *b₆f*-Komplex mit einem Rieske FeS-Protein solch geringen Redoxpotentials bekannt. Allerdings sind Rieske FeS-Proteine einiger bakterieller *bc*-Komplexe mit Redoxpotentialen zwischen +100 und +200 mV beschrieben worden, die Menachinol anstelle von Ubi- oder Plastochinol als Elektronendonator benutzen (Liebl et al., 1992). Interessanterweise benutzen Organismen, in denen entweder eine oder beide Hydroxylgruppen an den Aminosäureresten der Positionen 6 und 8 des zweiten Bindemotivs fehlen, immer Menachinol (-70 mV) als Elektronendonator für ihre *bc*-Komplexe (Henninger et al., 1999).

Für einen *b₆f*-Komplex mit einer PetC3-Untereinheit muss anhand dieser Daten ein Elektronentransportweg postuliert werden, in dem ein Menachinol oxidiert wird. Es gibt Anhaltspunkte für das Auftreten von freiem Menachinol in *A. variabilis* ATCC 29413, da in Thylakoidmembranen 3.5 Phyllochinone/P₇₀₀, in gereinigten PS I-Komplexen jedoch nur 2,0 Phyllochinone/P₇₀₀ auftreten (Lockau et al., 1987). Auch in *Anacystis nidulans* enthalten Membranen stöchiometrisch mehr 5'-Monohydroxyphyllochinon/P₇₀₀ als der gereinigte PS I-Komplex (Ziegler et al., 1989). Auch in *Synechocystis* PCC 6803 soll Menachinol (Naphtochinon) in geringen Umfang in

Thylakoidmembranen vorhanden sein (Johnson et al., 2000). Unklar ist allerdings, ob dieses Menachinol in freier Form oder gebunden an PS I vorliegt (Schneider et al., 2001b).

Ungebundenes Menachinon in cyanobakteriellen Membranen stellt einen potentiellen Elektronendonator für ein "low-potential" Rieske FeS-Protein wie PetC3 dar. Daraus ergäbe sich eine spezielle Funktion eines PetC3-haltigen *b₆f*-Komplexes. Spekuliert werden kann wegen der Nähe zu Komponenten von PS I über eine Rolle im zyklischen Elektronentransport, wie er z.B. verstärkt in Heterocysten stattfindet.

3.2.4 Deletion der *petC*-Gene

Die Deletion der vier *petC*-Gene von *Anabaena* PCC 7120 sollte die Frage beantworten, inwieweit diese Gene für den Organismus essentiell sind. Während eine vollständig segregierte Mutante von *petC1* nicht gewonnen werden konnte, war eine Deletion der alternativen Gene *petC2*, *petC3* und *petC4* erfolgreich. Eine Deletion von *petC1* konnte bisher wahrscheinlich deshalb nicht erreicht werden, da durch die Insertion der C.K3-Kassette (Elhai und Wolk, 1988a) auch die Transkription des mit *petC1* in einem Operon liegenden *petA*-Gens beeinträchtigt oder unterbunden wurde. Das Fehlen des von *petA* codierten essentiellen Cytochrom *f* verhinderte dann das Wachstum einer vollständig segregierten Δ *petC1*-Mutante. Die Erzeugung dieses Stammes sollte aber durch die angestrebte Komplementation von PetA durch die Integration eines *petA*-tragenden "Shuttlevektors" möglich sein, falls die Deletion von *petC1* für den Organismus nicht letal ist. Eine vergleichbare Strategie hat in *Synechocystis* PCC 6803 eine Deletion von *petC1* ermöglicht (Schneider, 2000).

Die Stämme der Deletionsmutanten der anderen drei Rieske-Gene zeigten in ihrem Wachstum unter Standardbedingungen in NO₃⁻-haltigem Medium keinerlei Unterschiede zu einer WT-Kultur. Bei Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium hatte die Deletion von *petC2* und *petC3* keinen Effekt auf das Wachstum. Die Δ *petC4*-Mutante war allerdings im Vergleich zu den Δ *petC2*- und Δ *petC3*-Mutanten und der WT-Kultur nicht mehr in der Lage mit N₂ als einziger Stickstoffquelle zu wachsen. Dieser Phänotyp konnte durch Komplementation mit einer Kopie des WT-Gens vollständig aufgehoben werden. Die Fluoreszenz der Phycobilisomen in der Δ *petC4*-Mutante 48 h nach "Stickstoff step down" zeigt, wie innerhalb des gesamten Filamentes aufgrund der Stickstoffmangelbedingungen Phycobilisomen abgebaut werden. Im WT sind solche Abnahmen der Phycobilisomenfluoreszenz zu diesem Zeitpunkt nur in den Heterocysten auszumachen. Zwar tritt der Abbau der Phycobilisomen am Anfang des Differenzierungsprozesses in allen Zellen des Wildtyps auf, wird aber später durch Neusynthese in den vegetativen Zellen wieder kompensiert (Fay, 1992).

PetC4 ist offensichtlich für ein Überleben unter Wachstumsbedingungen essentiell, in denen das Cyanobakterium als einzige Stickstoffquelle N₂ aus der Luft nutzt. Ohne dieses Protein kann *Anabaena* PCC 7120 scheinbar den vollständigen Differenzierungsprozess nicht durchführen, der letztendlich zur Ausbildung reifer Heterocysten mit der Fähigkeit zur Stickstofffixierung führt. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen von Filamenten der Δ *petC4*-Mutante zeigen 48 h nach Induktion des Differenzierungsprozesses keine ausgereiften Heterocysten. In den Aufnahmen der Phycobilisomenfluoreszenz derselben Filamente können aber Zellen angesprochen werden, die aufgrund ihres geringeren Phycobilisomengehaltes als Vorläufer einer Heterocyste determiniert zu

sein scheinen. Die Reifung dieser Zelle zur Heterocyste ist jedoch zu einem frühen Zeitpunkt arretiert. In welcher Form PetC4 eine solch gravierende Rolle im Prozess der Heterocystendifferenzierung spielt, ist bisher völlig unklar.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die differentielle Expression von PetC4. Die in dieser Arbeit gezeigte Steigerung der Transkription etwa 10 h nach Beginn des Differenzierungsprozesses deutet stark auf eine heterocystenspezifische Funktion von PetC4 hin. Obwohl ein Auftreten von PetC4 ausschließlich in Heterocysten nicht ohne Zweifel gezeigt werden konnte, deutet der Vergleich mit bekannten differentiellen Genen auf eine heterocystenspezifische Expression hin. Bei nahezu allen bisher untersuchten durch Stickstoffmangel induzierten Genen, die für die Heterocystendifferenzierung essentiell sind, fand eine in den Heterocysten lokalisierte Expression statt (z.B. bei *devA*: Maldener et al. 1994; *hetR*: Black et al., 1993; *hetC*: Xu und Wolk, 2001). Auch das *devB*-Gen (Fiedler et al. 2001; Maldener et al., 1994), das eine spezifische Rolle im Differenzierungsprozess spielt, zeigte wie *petC4* bei einer RT-PCR Analyse eine induzierte Transkription. Die Mutation von *devB* führt wie im Fall der $\Delta petC4$ -Mutante zu einer Arretierung in der Differenzierung von Heterocysten und somit zur Unfähigkeit, N_2 aus der Atmosphäre zu fixieren. Die $\Delta petC4$ -Mutante ist allerdings deutlich früher arretiert und wohl eher vergleichbar mit der von Xu und Wolk (2001) beschriebenen $\Delta hetC$ -Mutante.

Bei der Charakterisierung des Differenzierungsprozesses sind insbesondere solche Mutanten von Interesse, die unter aeroben Bedingungen N_2 nicht fixieren können (Fox^-), da sie eventuell in einem Zwischenstadium der Heterocystendifferenzierung arretiert sind. Eine Vielzahl solcher Fox^- -Mutanten sind phänotypisch charakterisiert worden (Ernst et al., 1992).

Phänotyp	Eigenschaften der Mutanten
Fox^-	unfähig zur N_2 -Fixierung unter aeroben Bedingungen
Fix^-	unfähig zur N_2 -Fixierung auch unter anaeroben Bedingungen
Het^-	zeigen keine morphologischen Veränderungen
Hen^-	bilden keine heterozystenspezifische Hülle
Dab^-	können Diaminobenzidin nicht oxidieren
Hgl^-	besitzen keine heterozystenspezifischen Glykolipide
Hep^-	besitzen keine heterozystenspezifischen Polysaccharide

Tabelle 3.2: Definition der von Ernst et al. (1992) eingeführten Abkürzungen zur Charakterisierung von *Anabaena*-Mutanten

Durch diese Charakterisierung wurden die Fox^- -Mutanten in Gruppen zusammengefasst, die sich aufgrund ihrer Eigenschaften in den zeitlichen Ablauf der Differenzierung einordnen lassen. Am Anfang stehen solche Mutanten, die keine erkennbare Differenzierung zeigen (Het^-). Die folgende Gruppe, zu der die *devB*-Mutante (Fiedler et al., 1998a und b) zählt, besitzt zwar schon Heterozysten (Het^+), die spezifische Hülle ist jedoch nicht oder unvollständig ausgebildet (Hen^-). Auch die charakteristische Oxidation von Diaminobenzidin kann diese Gruppe nicht durchführen (Dab^-). Damit unterscheidet sie sich von der Gruppe mit Mutanten, die zwar ebenfalls keine vollständige Ausbildung der Schutzhülle zeigen, deren Fähigkeit, die Diaminobenzidin-Oxidation zu katalysieren jedoch auf eine schon weitergehende Reifung des Protoplasten hindeutet. Annähernd am Ende der zeitlichen Einteilung stehen schließlich Mutanten, die zwar morphologisch intakte Heterozysten ausbilden, unter

aeroben Bedingungen aber keinen Stickstoff fixieren können, da ihnen essentielle respiratorische Enzyme oder eines der *nif*-Genprodukte fehlen (Fix⁻).

Zusammenfassend lässt sich die Δ *petC4*-Mutante anhand dieser Kriterien phänotypisch folgendermaßen charakterisieren. Es treten keine morphologischen Veränderungen in den Zellen des Filamentes auf (Het⁻), die heterocystenspezifische Hülle wird nicht gebildet (Hen⁻), Diaminobenzidin kann nicht oxidiert werden (Dab⁻) und die Mutante ist unfähig zur Fixierung von N₂ unter aeroben Bedingungen (Fox⁻).

3.2.5 Mögliche Funktionen der Rieske-Isoformen

Funktionell kann über die Rieske-Isoformen keine endgültige Aussage getroffen werden. Aufgrund der oben diskutierten Hinweise scheinen alle vier Rieske FeS-Proteine in *Anabaena* PCC 7120 exprimiert zu werden. Zumindest PetC1 ist auch eine assoziierte Untereinheit des Komplexes. Für die drei alternativen Rieske FeS-Proteine PetC2, PetC3 und PetC4 kann auch aufgrund der vergleichbaren Situation im Cyanobakterium *Synechocystis* PCC 6803 eine Rolle als Untereinheit des *b₆f*-Komplexes angenommen werden. Es scheint in *Anabaena* PCC 7120 wie in *Synechocystis* PCC 6803 heterogene *b₆f*-Komplexe zu geben. Warum besitzt *Anabaena* PCC 7120 aber unterschiedlich zusammengesetzte *b₆f*-Komplexe? Es wäre möglich, dass die verschiedenen *b₆f*-Komplexe unterschiedliche Funktionen im respiratorischen oder dem photosynthetischen Elektronentransport übernehmen. Cyanobakterien mit ihren stark vernetzten Elektronentransportketten könnten durch heterogene *b₆f*-Komplexe den Elektronenfluss an diesem zentralem Knotenpunkt des Elektronentransportes koordinieren. Die in Bezug auf ihre Rieske FeS-Untereinheit differierenden *b₆f*-Komplexe könnten z.B. jeweils nur in den Elektronentransport der Atmungskette, den linearen oder zyklischen photosynthetischen Elektronentransport involviert sein. So könnte z.B. PetC1 aufgrund seiner offenbar dominierenden Rolle und seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Rieske FeS-Proteinen aus Spinatchloroplasten nur am photosynthetischen Elektronentransport beteiligt sein. Dieser Theorie widersprechen elektronenmikroskopische Aufnahmen mit einem Immunogold markierten PetC1-Protein im Cyanobakterium *Synechocystis* PCC 6803 (Schneider, 2000). Dort war PetC1 sowohl in der Cytoplasmamembran als auch in den Thylakoidmembranen lokalisiert. In den Cytoplasmamembranen von *Synechocystis* PCC 6803 sind aber nachweislich keine Komponenten des photosynthetischen Elektronentransportes vorhanden (Cooley und Vermaas, 2001). PetC1 scheint also keine ausschließliche Funktion im photosynthetischen Elektronentransport zu haben.

Unter der Voraussetzung, dass in Cyanobakterien verschiedene Elektronentransportprozesse ohne räumliche Trennung innerhalb der gleichen Membran vonstatten gehen, muss von einem Pool unterschiedlicher *b₆f*-Komplexe gesprochen werden. Die Zusammensetzung dieses Pools könnte unter verschiedenen physiologischen Bedingungen variieren und über die Verfügbarkeit der einzelnen Rieske Untereinheiten geregelt werden. In diesem Zusammenhang ist die differentielle Expression des PetC4-Proteins ein interessanter Gesichtspunkt. Ein *b₆f*-Komplex mit PetC4 als Rieske-Untereinheit ist essentiell unter Stickstoffmangelbedingungen, d. h. wenn die Zelle auf eine Fixierung von N₂ aus der Atmosphäre angewiesen ist. In Zellen, die zur Heterocyste differenzieren, kommt es zu einem veränderten Elektronentransport. Anstelle des linearen Elektronentransportes von PS II zu PS I

gewinnt die zyklische Photophosphorylierung an Bedeutung, die für den gesteigerten Bedarf an ATP sorgt. Ein linearer photosynthetischer Elektronentransport kann aufgrund der Inaktivierung von PS II nicht stattfinden. In Heterocysten tritt außerdem eine verstärkte Atmung auf, die für die Herstellung und Aufrechterhaltung des für die Nitrogenaseaktivität notwendigen mikroaeroben Klimas sorgt und zusätzlich ATP liefert. Die Hochregulation des den PetC4 beinhaltenden Komplexes könnte einen dieser veränderten Elektronentransportwege über eine größere Verfügbarkeit der PetC4-Untereinheit steuern, während andere Elektronentransportwege im Gegenzug an Bedeutung verlieren müssten. Das Ausschalten von PetC4 könnte zu einem Verlust eines für die Stickstofffixierung essentiellen Elektronentransportes führen, was letztendlich die Unfähigkeit zur Fixierung von N₂ zur Folge hat. Vorstellbar sind der Verlust einer erhöhten Respiration, wodurch der Sauerstoffpartialdruck innerhalb der Heterocyste nicht auf den für die Nitrogenase erforderlichen Wert gesenkt werden kann und dieses Enzym durch O₂ irreversibel inaktiviert wird. Wie dieser Verlust zu einer Unfähigkeit zur Differenzierung führen kann, wie er in der $\Delta petC4$ -Mutante beobachtet wurde, ist nicht leicht erklärbar. Möglicherweise kann ein erhöhter Energiebedarf bei der Neusynthese heterocystenspezifischer Proteine nicht gedeckt werden. Dieser gesteigerte Energiebedarf der werdenden Heterocyste könnte im WT durch die Umstellung von linearer zu zyklischer Photophosphorylierung gedeckt werden. Eine auch denkbare regulatorische Funktion eines PetC4-*b₆f*-Komplexes wird weiter unten diskutiert.

Bleibt letztendlich die Frage, warum gerade die Deletion von *petC4* eine so drastische Auswirkungen auf die Heterocystendifferenzierung von *Anabaena* PCC 7120 besitzt. In allen anderen bisher bekannten cyanobakteriellen Genomen finden sich nur drei Gene für Rieske FeS-Proteine. Selbst in den eng verwandten filamentbildenden Cyanobakterien wie *A. variabilis* und *N. punctiforme*, die wie *Anabaena* PCC 7120 zu den stickstofffixierenden, heterocystenbildenden Arten gehören, kommt ein *petC4* Gen nicht vor. *Anabaena* PCC 7120 beschreitet also sicherlich bei der Koordination des Differenzierungsprozesses und der Stickstofffixierung einen anderen Weg. PetC4 übt wahrscheinlich in *Anabaena* PCC 7120 eine Funktion aus, die in den verwandten Organismen von dem sehr ähnlichen PetC2-Protein durchgeführt wird. Bemerkenswert ist in dieser Hinsicht die große Identität (70,2 %) zwischen PetC2 und PetC4 (s. Tab. 2.2), die auch wesentlich größer als die Identität zwischen diesen beiden Proteinen und PetC1 ist (35-37 %). Der hohe Identitätsgrad lässt vermuten, dass *petC4* aus einer Genduplikation von *petC2* hervorgegangen ist. Dabei muss dieses Gen unter die Kontrolle eines heterocystenspezifischen Promotors gelangt sein, da *petC4* unter Stickstoffmangelbedingungen offensichtlich in einer anderen Weise als *petC2* reguliert wird (s. Abb. 2.7). Unter diesen Wachstumsbedingungen verschafft eine differentielle Expression dieses Proteins *Anabaena* PCC 7120 möglicherweise einen Vorteil gegenüber Cyanobakterien mit nur drei Rieske FeS-Proteinen. Im Widerspruch dazu steht die Beobachtung, dass, obwohl PetC2 konstitutiv exprimiert zu sein scheint, dieses Protein den Verlust von PetC4 in *Anabaena* PCC 7120 bei Stickstoffmangel nicht kompensieren kann. Dieses deutet auf eine andere Funktion von PetC2 verglichen mit PetC4 hin, was *Anabaena* PCC 7120 einen Vorteil bei der Anpassung z.B. an unterschiedliche Lichtverhältnisse oder Umweltbedingungen bieten könnte (Tandeau de Marsac und Houmard, 1993).

Sicherlich interessant für eine weitergehende Funktionsanalyse wäre die phänotypische Charakterisierung von $\Delta petC2$ -Mutanten in *A. variabilis* und *N. punctiforme* im Hinblick auf deren Fähigkeit zur Fixierung von N_2 .

3.2.6 Regulatorische Funktion des Cytochrom b_6f -Komplexes

Der Redoxzustand des b_6f -Komplexes und des Plastochinonpools wird schon seit längerem als regulatorischer Faktor diskutiert. Der Mechanismus dieser Redoxkontrolle und die Signalkaskade ist aber weitgehend unbekannt. Bei einigen Prozessen wie der Regulation der Expression bestimmter Gene in Chloroplasten scheint der PQ-Pool selbst der Signalgeber zu sein (Pfannenschmidt et al., 1999), in anderen Fällen ist der Cytochrom b_6f -Komplex direkt in die Signaltransduktion involviert. Am besten aufgeklärt ist die Verteilung des LHCII-Antennenkomplexes auf die beiden Photosysteme durch die von dem Redoxzustand des b_6f -Komplexes kontrollierte Aktivität der LHCII-Kinase (Allen, 1992; Vener et al., 1997). In Cyanobakterien wurde eine Beteiligung des b_6f -Komplexes an der Redoxkontrolle der Expression des *psbA*-Gens gezeigt (Alfonso et al., 2000).

Eine regulatorische Funktion könnte der b_6f -Komplex auch mittels seiner unterschiedlichen Rieske-Untereinheiten ausüben. Die in der $\Delta petC4$ -Mutante beobachtete unvollständige Reifung der Heterocysten ist womöglich auf das Fehlen einer regulatorischen Komponente innerhalb der zur vollständigen Differenzierung führenden Signalkaskade zurückzuführen. Möglicherweise dient der $PetC4$ - b_6f -Komplex als Sensor für den Sauerstoffgehalt in der Heterocyste. Ein Fehlen dieses Signalgebers suggeriert der Zelle, den erforderlichen niedrigen Sauerstoffpartialdruck bereits erreicht zu haben, woraufhin es nicht mehr zu einem Ausreifen der Proheterocysten kommt. Als Folge wird die Nitrogenase durch den immer noch vorhandenen Sauerstoff in der Zelle fortlaufend inaktiviert. Das Fehlen eines spezifischen Signals vom $PetC4$ - b_6f -Komplex könnte die unvollständige Differenzierung der Heterocyste sowohl über die Steuerung enzymatischer Vorgänge als auch über Regulation der Expression spezifischer Gene hervorrufen.

Das Phänomen einer unvollständigen Heterocystenreifung ist auch in solchen WT-Kulturen zu beobachten, denen unter anaeroben Bedingungen gebundener Stickstoff aus dem Medium entzogen wird. Unter diesen Kulturbedingungen unterbleibt die vollständig Ausbildung der Heterocystenhülle, die Zelle ist aber durch die ungehinderte Aktivität der Nitrogenase in Abwesenheit von Sauerstoff zur N_2 -Fixierung befähigt (Fay, 1992).

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Organismen

4.1.1.1 Cyanobakterien

Die Kulturen von *Anabaena* sp. Stamm PCC 7120, *Anabaena variabilis* FD Stamm ATCC 29413 und deren Derivate (Tab. 4.1) wurden auf mit 1,5 % Agar verfestigten Platten eines Mediums nach Allen und Arnon (1955) oder in 50 ml Flüssigkulturen in vierfach verdünntem Medium gezogen (A+A/4). Die Wachstumstemperatur betrug 30°C, die Lichtintensität ca. 2000 Lux und die Schüttelrate der Flüssigkulturen 194 rpm. Dem Medium wurde bei Bedarf KNO₃ oder NH₄NO₃ (+10 mM HEPES, pH 8,0) zu einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben, um in Kulturen die Bildung von Heterocysten zu verhindern. Mutanten von *Anabaena* PCC 7120 wurden in Nitrat-haltigen Medien mit 50 µg/ml Neomycin und/oder je 2,5 µg/ml Spektinomycin und Streptomycin gezogen. Den Medien für Stämme mit "Shuttlevektoren" wurde 25 µg/ml Neomycin zugesetzt.

Für präparative Zwecke erfolgte die Anzucht in 750 ml Medium in Flaschen, die in einem 30°C-Wasserbad mit 2 % CO₂ angereicherter Luft begast wurden (Lockau et al., 1988). Nach zwei Tagen wurde die Belichtung der dann dichteren Kulturen von 2000 auf 3000 Lux gesteigert. Nachfolgend werden die verwendeten *Anabaena*-Kulturen beschrieben.

Stamm	Genotyp	Resistenzen	Literatur
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	Wildtyp		Pasteur Culture Collection
SR118	<i>petG</i> ::C.K3	<i>Nm</i>	diese Arbeit
DR126	<i>petC4</i> ::C.K3	<i>Nm</i>	diese Arbeit
DR126 (pMA220)	<i>petC4</i> ::C.K3; <i>petC4</i>	<i>Nm, Sm, Sp</i>	diese Arbeit
DR132	<i>petM</i> ::C.K3	<i>Nm</i>	diese Arbeit
SR135	<i>petN</i> ::C.K3	<i>Nm</i>	diese Arbeit
DR177	<i>petC2</i> ::C.K3	<i>Nm</i>	diese Arbeit
SR182	<i>petC1</i> ::C.K3	<i>Nm</i>	diese Arbeit
DR187	<i>petC3</i> ::C.K3	<i>Nm</i>	diese Arbeit
<i>A. variabilis</i> sp. ATCC 29413	Wildtyp		American Type Culture Collection

Tabelle 4.1: Übersicht der verwendeten *Anabaena*-Stämme

4.1.1.2 *Escherichia coli*

Die in Tabelle 4.2 aufgeführten *E. coli*-Stämme wurden bei 37°C in flüssigem oder auf mit 1,5 % Agar verfestigtem LB-Medium nach Sambrook et al. (1989) gezogen. Zum Medium wurden bei Bedarf die sterilfiltrierten Antibiotika in den folgenden Konzentrationen zugegeben (µg/ml).

Ampicillin	50 bzw. 100
Chloramphenicol	25
Kanamycin	25 bzw. 50
Spektinomycin	100
Streptomycin	25

Stammkulturen wurden in 15 % Glycerin bei -70°C eingefroren.

Stamm	Genotyp	Literatur
BL21	F^{-} , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>), <i>gal</i>	Studier und Moffatt, 1986
DH 5 α	F^{-} , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻m_R⁻</i>), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>rel</i>	Bolivar und Backmann, 1979
DH 10B	<i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), $\phi 80d$, <i>lacZΔM15</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara,leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rspL</i> , <i>nupG</i> { <i>p3:Km</i> , <i>amber amp</i> , <i>amber tet</i> }	Grant et. al., 1990
HB101	<i>proA2</i> , <i>leu</i> , <i>hsdS20</i> (<i>r_B m_B</i>), <i>lacY1</i> , <i>recA1,3</i> <i>ara-14</i> , <i>galk2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl</i> , <i>supE44</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i>	Sambrook et. al., 1989
J53(RP4)	R+, <i>met</i> , <i>pro</i> (RP4: <i>Ap,Tc,Km, Tra+,IncP</i>)	Wolk et al., 1984
JM109	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>D(lac-proAB)/F'</i> [<i>traD36</i> , <i>proAB+</i> , <i>lacIq</i> , <i>lacZDM15</i>]	Yanisch-Peron et al., 1985

Tabelle 4.2: Übersicht der verwendeten *E. coli*-Stämme

4.1.2 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Resistenzen	Literatur
pGEM-T	AT-Klonierungsvektor. 3003 bp	<i>Ap</i>	Promega [®] (Herstellerangaben)
pGlow-TOPO	AT-Klonierungsvektor mit <i>gfp</i> -Gen aus <i>Aquorea victoria</i> . 5333 bp	<i>Ap</i>	Invitrogen [®] (Herstellerangaben)
pMA98	PCR-Produkt <i>A. variabilis</i> mit Oligon. 97+98 (5'-Region+N-Terminus <i>petG</i>) in pGEM-T (Insert 657 bp). 3662 bp	<i>Ap</i>	diese Arbeit
pMA116	<i>Pst</i> I-Frag. (627 bp) aus PCR-Produkt <i>A. variabilis</i> mit Oligon. 147+148 in <i>Pst</i> I-Schnittstelle von pMA98. 4261 bp	<i>Ap</i>	diese Arbeit
pMA117	<i>Spe</i> I+ <i>Sph</i> I-Frag. (1295 bp) aus pMA116 in <i>Spe</i> I+ <i>Sph</i> I-Schnittstellen von pRL271. 7363 bp	<i>Cm, Em</i>	diese Arbeit
pMA118	C.K3-Cassette/ <i>Xba</i> I (1081 bp) aus pRL448 in <i>Xba</i> I-Schnittstelle von pMA117. 8444 bp	<i>Cm, Em, Km</i>	diese Arbeit
pMA123	PCR-Produkt <i>A. 7120</i> mit Oligon. 152+153 (5'-Region+N-Terminus <i>petC4</i>) in pGEM-T (Insert 2388 bp). 5393 bp	<i>Ap</i>	diese Arbeit
pMA124	<i>Nhe</i> I+ <i>Spe</i> I-Frag. (2167 bp) aus PCR-Produkt <i>A. 7120</i> mit Oligon. 154+155 (C-Terminus+3'-Region <i>petC4</i>) in <i>Nhe</i> I+ <i>Spe</i> I-Schnittstellen von pMA123. 7550 bp	<i>Ap</i>	diese Arbeit
pMA125	<i>Pst</i> I+ <i>Spe</i> I-Frag. (4545 bp) aus pMA124 in <i>Pst</i> I+ <i>Spe</i> I-Schnittstellen von pRL277. 11058 bp	<i>Sm, Sp</i>	diese Arbeit
pMA126	C.K3-Cassette/ <i>Xba</i> I (1081 bp) aus pRL448 in <i>Nhe</i> I-Schnittstelle von pMA125. 12139 bp	<i>Km, Sm, Sp</i>	diese Arbeit

pMA130	<i>SpeI</i> -Frag. (1119 bp) aus PCR-Produkt A. 7120 mit Oligon. 168+169 (C-Terminus+3'-Region <i>petM</i>) in <i>SpeI</i> -Schnittstelle von pRL277. 7917 bp	<i>Sm, Sp</i>	diese Arbeit
pMA131	<i>PstI+NheI</i> -Frag. (1011 bp) aus PCR-Produkt A. 7120 mit Oligon. 166+167 (5'-Region+N-Terminus <i>petM</i>) in <i>PstI+NheI</i> -Schnittstellen von pMA130. 8637 bp	<i>Sm, Sp</i>	diese Arbeit
pMA132	C.K3-Cassette/ <i>XbaI</i> (1081 bp) aus pRL448 in <i>NheI</i> -Schnittstelle von pMA131. 9718 bp	<i>Km, Sm, Sp</i>	diese Arbeit
pMA133	<i>SpeI</i> -Frag. (923 bp) aus PCR-Produkt A. 7120 mit Oligon. 170+171 (5'-Region+N-Terminus <i>petN</i>) in <i>SpeI</i> -Schnittstelle von pRL277. 7721 bp	<i>Sm, Sp</i>	diese Arbeit
pMA134	<i>NheI+PstI</i> -Frag. (741 bp) aus PCR-Produkt A. 7120 mit Oligon. 172+173 (C-Terminus+3'-Region <i>petN</i>) in <i>NheI+PstI</i> -Schnittstellen von pMA133. 8163 bp	<i>Sm, Sp</i>	diese Arbeit
pMA135	C.K3-Cassette/ <i>XbaI</i> (1081 bp) aus pRL448 in <i>NheI</i> -Schnittstelle von pMA134. 9244 bp	<i>Km, Sm, Sp</i>	diese Arbeit
pMA173	PCR-Produkt A. 7120 mit Oligon. 196+197 (3'-Region+N-Terminus <i>petC2</i>) in pGEM-T (Insert 2732 bp). 5737 bp	<i>Ap</i>	diese Arbeit
pMA175	<i>NheI+PstI</i> -Frag. (2341 bp) aus PCR-Produkt A. 7120 mit Oligon. 198+199 (C-Terminus+3'-Region <i>petC2</i>) in <i>NheI+PstI</i> -Schnittstellen von pMA173. 8084 bp	<i>Ap</i>	diese Arbeit
pMA176	<i>PstI+XbaI</i> -Frag. (5056 bp) aus pMA175 in <i>PstI+XbaI</i> -Schnittstellen von pRL277. 11561 bp	<i>Sm, Sp</i>	diese Arbeit
pMA177	C.K3-Cassette/ <i>XbaI</i> (1081 bp) aus pRL448 in <i>NheI</i> -Schnittstelle von pMA176. 12642 bp	<i>Km, Sm, Sp</i>	diese Arbeit
pMA178	PCR-Produkt A. 7120 mit Oligon. 200+201 (5'-Region+N-Terminus <i>petC1</i>) in pGEM-T (Insert 2098 bp). 5103 bp	<i>Ap</i>	diese Arbeit
pMA180	<i>NheI+SpeI</i> -Frag. (2152 bp) aus PCR-Produkt A. 7120 mit Oligon. 202+203 (C-Terminus+3'-Region <i>petC1</i>) in <i>NheI+SpeI</i> -Schnittstellen von pMA178. 7243 bp	<i>Ap</i>	diese Arbeit
pMA181	<i>SpeI+XhoI</i> -Frag. (4240 bp) aus pMA180 in <i>SpeI+XhoI</i> -Schnittstellen von pRL277. 10784 bp	<i>Sm, Sp</i>	diese Arbeit
pMA182	C.K3-Cassette/ <i>XbaI</i> (1081 bp) aus pRL448 in <i>NheI</i> -Schnittstelle von pMA181. 11865 bp	<i>Km, Sm, Sp</i>	diese Arbeit
pMA183	PCR-Produkt A. 7120 mit Oligon. 204+205 (5'-Region+N-Terminus <i>petC3</i>) in pGEM-T (Insert 2187 bp). 5192 bp	<i>Ap</i>	diese Arbeit
pMA185	<i>NheI+PstI</i> -Frag. (1990 bp) aus PCR-Produkt A. 7120 mit Oligon. 206+207 (C-Terminus+3'-Region <i>petC3</i>) in <i>NheI+PstI</i> -Schnittstellen von pMA183. 7152 bp	<i>Ap</i>	diese Arbeit
pMA186	<i>PstI+XhoI</i> -Frag. (4167 bp) aus pMA185 in <i>PstI+XhoI</i> -Schnittstellen von pRL277. 10418 bp	<i>Sm, Sp</i>	diese Arbeit
pMA187	C.K3-Cassette/ <i>XbaI</i> (1081 bp) aus pRL448 in <i>NheI</i> -Schnittstelle von pMA186. 11499 bp	<i>Km, Sm, Sp</i>	diese Arbeit
pMA193	PCR-Produkt A. 7120 mit Oligon 208+181 (Promotorbereich <i>petC1</i>) in pGlow-TOPO (Insert 1171 bp). 6504 bp	<i>Ap</i>	diese Arbeit

pMA196	PCR-Produkt A. 7120 mit Oligon 210+209 (Promotorbereich <i>petC2</i>) in pGlow-TOPO (Insert 1036 bp). 6369 bp	<i>Ap</i>	diese Arbeit
pMA198	PCR-Produkt A. 7120 mit Oligon 212+211 (Promotorbereich <i>petC4</i>) in pGlow-TOPO (Insert 1038 bp). 6371 bp	<i>Ap</i>	diese Arbeit
pMA200	PCR-Produkt A. 7120 mit Oligon 214+213 (Promotorbereich <i>petC3</i>) in pGlow-TOPO (Insert 1041 bp). 6374 bp	<i>Ap</i>	diese Arbeit
pMA205	<i>KpnI</i> + <i>PmeI</i> -Frag. (2003 bp) aus pMA193 in <i>SmaI</i> + <i>KpnI</i> -Schnittstellen von pRL488. ca. 14,1 kb	<i>Km</i>	diese Arbeit
pMA207	<i>KpnI</i> + <i>PmeI</i> -Frag. (1868 bp) aus pMA196 in <i>SmaI</i> + <i>KpnI</i> -Schnittstellen von pRL488. ca. 14 kb	<i>Km</i>	diese Arbeit
pMA208	<i>KpnI</i> + <i>PmeI</i> -Frag. (1870 bp) aus pMA198 in <i>SmaI</i> + <i>KpnI</i> -Schnittstellen von pRL488. ca. 14 kb	<i>Km</i>	diese Arbeit
pMA217	<i>KpnI</i> + <i>PmeI</i> -Frag. (1873 bp) aus pMA200 in <i>SmaI</i> + <i>KpnI</i> -Schnittstellen von pRL488. ca. 14 kb	<i>Km</i>	diese Arbeit
pMA220	<i>Bam</i> HI-Frag (1595 bp) aus PCR-Produkt A. 7120 mit Oligon. 243+244 (5'-Region+ <i>petC4</i>) in <i>Bam</i> HI-Schnittstelle von pRL1049. 9097 bp	<i>Sm, Sp</i>	diese Arbeit
pMA221	PCR-Produkt A. 7120 mit Oligon. 264+265 (Promotorregion <i>petC1A</i> -Operon) in pGEM-T (Insert 1064 bp). 4069 bp	<i>Ap</i>	diese Arbeit
pMA222	<i>SpeI</i> + <i>NdeI</i> -Frag. (1383 bp) aus PCR-Produkt A. 7120 mit Oligon. 266+272 (<i>petA</i>) in <i>SpeI</i> + <i>NdeI</i> -Schnittstellen von pMA221. 5413 bp	<i>Ap</i>	diese Arbeit
pMA223	<i>Bam</i> HI-Frag. (2431 bp) aus pMA222 in <i>Bam</i> HI-Schnittstelle von pRL1049. 10027 bp	<i>Sm, Sp</i>	diese Arbeit
pRL271	Integrationsvektorvektor mit <i>sacB</i> -Gen. Positive Selektion auf Doppelrekombination	<i>Cm, Em</i>	Black et al., 1993
pRL277	Integrationsvektorvektor mit <i>sacB</i> -Gen. Positive Selektion auf Doppelrekombination	<i>Sm, Sp</i>	Black et al., 1993
pRL448	C.K3-Kassette tragender Vektor	<i>Ap, Km</i>	Elhai und Wolk, 1988a
pRL488	in <i>Anabaena</i> 7120 autonom replizierendes Plasmid ("Shuttlevektor")	<i>Km</i>	Elhai 1993
pRL528	Helfer-Plasmid für die Konjugation in <i>Anabaena</i> sp.	<i>Cm</i>	Elhai und Wolk, 1988b
pRL1049	in <i>Anabaena</i> 7120 autonom replizierendes Plasmid ("Shuttlevektor")	<i>Sm, Sp</i>	Black und Wolk, 1994

Tabelle 4.3: Aufstellung der verwendeten Plasmide. A. 7120 = *Anabaena* sp. PCC 7120.

4.1.3 Chemikalien und Materialien

Lösungsmittel und Feinchemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Appligene, Biomol, Biorad, Biozym, Difco, Fluka, Merck, NEB Biolabs, PEQLAB, Riedel-de Haen, Roche (Boehringer Mannheim), Roth, Serva, Sigma (Aldrich) und USB (Pharmacia).

Reaktionsgefäße, Plastikwaren, Geräte und andere Labormaterialien stammten von den Firmen Becton Dickinson, Braun, Du Pont, Eppendorf, Fuji, Gilson, Kodak, Millipore, Sarstedt und Whatman.

Filter und Membranen wurden von den Firmen Biodyne (Nylonmembran), Millipore (HATF 08250-, Falten- und Sterilfilter), Schleicher & Schüll (Cellulosenitrat-Membran) und Whatman verwendet. Enzyme für molekularbiologische Arbeiten stammten von den Firmen NEB Biolabs, Fermentas, Pharmacia und Roche (Boehringer Mannheim) und wurden gemäß den Herstellerangaben verwendet.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Standardmethoden

Gentechnische Routinemethoden, wie Nukleinsäure-Fällung, Phenol/Chloroform-Extraktion, Ligation, Restriktionsverdau, Klenow-Behandlung, Behandlung mit Alkalischer Phosphatase (CIP), Nukleinsäure-Auftrennung in Agarose- bzw. Polyacrylamidgelen, etc. wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

4.2.2 Plasmid-Präparationen aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden Kits der Firma QIAGEN (QIAprep[®] Spin Miniprep Kit) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

4.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach dem Ausschneiden der entsprechenden Bande unter langwelligem UV-Licht aus dem Gel wurden zur Isolierung der DNA aus der Agarose alternativ der NucleoSpin[®] Extract Kit (Machery und Nagel), bzw. der QIAquick[™] Gel Extraction Kit (QIAGEN) nach den Richtlinien der Hersteller angewendet.

4.2.4 Isolierung genomischer DNA aus *Anabaena*

Lösungen:

T ₁₀ E ₁ :	10 mM TrisCl, 1 mM EDTA, pH 7,5
SDS:	10 %
Chloroform:	Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)
Phenol:	Phenol mit 100 mM TrisCl pH 7,5 äquilibriert
Phenol/Chloroform:	Phenol/Chloroform (1:1)
Natriumacetat:	3 M, pH 4,8

Genomische DNA aus *Anabaena* wurde nach der Methode von Cai und Wolk (1990) gereinigt. Zellen einer 50 ml *Anabaena*-Kultur mit einer OD_{660nm} von 0,5 bis 0,8 wurden durch 5 min Zentrifugation bei 5000 rpm im GSA-Rotor (Sorvall Superspeed RC2-B, DuPont) geerntet, einmal in TE gewaschen und mit demselben Puffer auf 400 µl Endvolumen gebracht. Nach Zugabe von 150 µl sterilen Glaskugeln (Durchmesser 200 bis 300 µm, Sigma), SDS (Endkonzentration 0,5 %) und 1 Vol Phenol/Chloroform wurde 4 mal 1 min auf einem Vortex gemischt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4°C wurde der Überstand einmal mit 1 Vol Phenol/Chloroform und zweimal mit Chloroform extrahiert und die

Nukleinsäuren mit 2,5 Vol Ethanol und 10 % Natriumacetat gefällt. Das mit 70 % Ethanol gewaschene und getrocknete Pellet wurde in 50 µl TE aufgenommen.

Reinheit und Konzentration der DNA-Lösungen wurde durch Messung der Absorptionsspektren zwischen 220 und 320 nm überprüft. Ein Verhältnis von $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ über 2 zeigt ein hohes Maß an Nukleinsäuren im Vergleich zu aromatischen Aminosäuren an. Folgender Richtwert wurde für die Konzentrationsbestimmung verwendet (Sambrook et al., 1989):

$OD_{260\text{ nm}} = 1$ entspricht 50 ng doppelsträngiger DNA/µl

4.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Anabaena* (nach Muro-Pastor et al., 1999)

Um RNase-frei arbeiten zu können, wurden Wasser und alle Stammlösungen ohne TrisCl mit 0,1 % DEPC behandelt. Nach einer Inkubation ÜN bei 37°C wurde das DEPC in den jetzt RNase-freien Lösungen durch Autoklavieren zerstört. Plastikgefäße wurden in DEPC versetztem Wasser ÜN inkubiert und ebenfalls autoklaviert. Materialien aus Glas wurden 4-5 h bei 250°C gebacken.

Lösungen:

T ₅₀ E ₁₀₀	Tris-HCl 50 mM, EDTA 100 mM, pH 8.0
STET	8% Sucrose, 5% Triton X-100, 50 mM EDTA pH 8.0, Tris pH 8.0
VRC	200 mM (Rnase Inhibitor, Biolabs)
Na-Acetat	3 M pH 5.2
MgSO ₄	50 mM
DNase	10 U/µl (Boehringer)
Chloroform	Chloroform:Isoamylalkohol (24:1)
Phenol	Phenol mit 100 mM TrisCl pH 7,5 äquilibriert
Phenol/Chloroform	Phenol:Chloroform (1:1)
Tris-HCl	100 mM pH 8.0

100 bis 200 ml Zellen einer *Anabaena*-Kultur wurden zu bestimmten Zeitpunkten nach Induktion der Heterocystendifferenzierung (s. 4.3.2) steril entnommen, durch Zentrifugation geerntet und danach in 600 µl (pro 100 ml Kultur) TE resuspendiert. Nach Zugabe von 130 µl Chloroform wurde 5 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Der klare Überstand und das Chloroform wurden vom Pellet abgetrennt. Das Zellpellet wurde in 400 µl STET aufgenommen und jeweils ca. 100 µl Glasskügelchen (Durchmesser 200 bis 300 µm, Sigma), 24 µl VCR (200 mM, RNase-Inhibitor), sowie 200 µl Phenol/Chloroform zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz dreimal je 3 min gevortext und 3 min auf Eis gekühlt. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C. Der klare Überstand wurde abgenommen und durch Zugabe von 0.1 Vol Na-Acetat und 2 Vol EtOH (abs.) bei -80°C gefällt (mindestens eine halbe Stunde). Nach der Fällung erfolgte eine Zentrifugation 15 min bei 4°C. Das feuchte Pellet wurde dann in 260 µl VRC (10 mM) aufgenommen, zweimal mit Phenol/Chloroform und zweimal mit Chloroform extrahiert und anschließend mit 0.1 Vol Na-Acetat und 2 Vol EtOH (abs.) bei -80°C (mindestens 30 min) gefällt. Das nach einer Zentrifugation von 15 min bei 4°C erhaltene Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 30 µl H₂O aufgenommen. Abschließend erfolgte eine DNase-Behandlung durch Zugabe von 10 µl Tris, 10 µl MgSO₄ und 4 µl DNase (10 U/µl) und Inkubation bei 30°C für 1 h.

Reinheit und Konzentration der RNA-Lösungen wurde wie bei isolierter Gesamt-DNA bestimmt. Richtwert für die Konzentration nach Sambrook et al. (1989) ist:

$OD_{260\text{ nm}} = 1$ entspricht 40 ng RNA/ μl

4.2.6 Herstellung kompetenter Zellen

Bei allen für die Transformation verwendeten Stämmen von *E. coli* (Tab. 4.2) wurde die Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl_2 -Methode von Cohen et al. (1972) durchgeführt. Dabei wurden 50 ml LB-Medium mit 500 μl einer ÜN-Kultur des entsprechenden Stammes angeimpft und bei 37°C bis zu einer $OD_{660\text{ nm}}$ von 0,5 gezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 5 min im SS34-Rotor (Sorvall Superspeed RC2-B, DuPont) geerntet, in 50 ml eiskaltem 0,1 M CaCl_2 resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter 5 minütiger Zentrifugation bei 2500 rpm wurde das nun weiche Zellsediment in 5 ml eiskaltem 0,1 M CaCl_2 aufgenommen. Die Zellen wurden mit 87 % Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 15 % versetzt, Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Transformation bei -70°C gelagert.

4.2.7 Transformation

Die kompetenten Zellen (4.2.6) wurden auf Eis aufgetaut und mit 5 μl des Ligationsansatzes versetzt. Nach einer Inkubation auf Eis für 30 min, einem Hitzeschock bei 42°C für 2 Minuten und der anschließenden Zugabe von 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika wurde 1 h bei 37°C geschüttelt. Transformanten wurden durch Ausplattieren auf antibiotikahaltigen Medien selektioniert.

4.2.8 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Die PCR-Reaktionen wurden mit dem MasterTaq[®] Kit von Eppendorf bzw. mit der Taq-Polymerase der Firma PEQLAB nach den Angaben der Hersteller durchgeführt.

In einen Standardreaktionsansatz (100 μl) wurden etwa 100-200 ng "template"-DNA und je 100 pmol der entsprechenden Oligonukleotide eingesetzt. Zur Amplifikation wurden 30 Zyklen in einem DNA Thermal Cycler der Firma Perkin Elmer Cetus (USA) mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Aufschmelzen: 60 sec bei 94°C
"Annealing": 90 sec bei Schmelztemperatur (T_m) des Oligonukleotids
Amplifikation: 120 sec bei 72°C

Anschließend an den letzten Zyklus erfolgte noch eine 7-15 minütige Auffüllreaktion bei 72°C.

Die im folgenden aufgeführten Oligonukleotide wurden bei den Firmen Metabion oder MWG-Biotech synthetisiert.

Oligo-nukleotid	Sequenz 5'→3'	Position*	5' eingefügte Schnittstellen	Verwendung
84	AATGCTTGTACAAGAGC G	A. 7120 <i>petC1A</i> - Op. 2689-2706	---	5'-Primer (Amplifikation der 3'-Region von <i>petC1</i>)
97	GGTCTGCGCGTATCTAA ACT	A.v. <i>petG</i> 1-20	---	3'-Primer (Amplifikation der 3'-Region von <i>petC1</i>)
98	CTAGCTGCAGTCTAGAA CGATGCCTGAAAGTAGG	A.v. <i>petG</i> 644-624	<i>PstI</i> - <i>XbaI</i>	3'-Primer (Amplifikation der 5'-Region von <i>petG</i>)
125	CAGAGGCTTTCACCAAC T	A. 7120 <i>petG</i> 762-779	---	5'-Primer (Amplifikation der <i>petG</i> -Region)
127	TGACAGCTTGTCTTCA G	A. 7120 <i>petC1A</i> - Op. (3490)-3473	---	3'-Primer (Amplifikation der 3'-Region von <i>petC1</i>)
129	GGGAGGAAAGTCCGG GCTCC	A.v.	---	3'-Primer (Amplifikation der 3'-Region von <i>petC1</i>)
130	TAAGCCGGGTTCTGTTC TCTG	A.v.	---	3'-Primer (Amplifikation von <i>rnpB</i>)
134	CGGAGCTCTTAAGACCA CCAGGGTTCTTACC	A. 7120 <i>petC1A</i> - Op. 2570-2547	<i>SacI</i>	3'-Primer (Amplifikation der <i>petC1</i> -Region)
144	GCTGTTATCAATCACTG C	A. 7120 <i>petC4</i> 2905-2888	---	3'-Primer (Amplifikation der <i>petC4</i> -Region)
146	GGTTTCTTCCAGTACG GGGA	A. 7120 <i>petC4</i> 2955-2935	---	3'-Primer (Amplifikation der <i>petC4</i> -Region)
147	GCACTGCAGTGTACCC TCTCTGGGCTGTTCTAC GC	A.v. <i>petG</i> 657-683	<i>PstI</i>	5'-Primer (Amplifikation der 3'-Region von <i>petG</i>)
148	CACCTGCAGACTAGTGC TAGCTTGGTGGTCGGAA TTGAAAAATCAAGC	A.v. <i>petG</i> 1271-1239	<i>PstI</i> - <i>SpeI</i>	3'-Primer (Amplifikation der 3'-Region von <i>petG</i>)
152	CTGCAGTTCACGAATCG TTGCACCTGC	A. 7120 <i>petC4</i> 104-124	<i>PstI</i>	5'-Primer (Amplifikation der 5'-Region von <i>petC4</i>)
153	GCTAGCTTGCCGTCTTG ATAGGGATGG	A. 7120 <i>petC4</i> 2479-2459	<i>NheI</i>	3'-Primer (Amplifikation der 5'-Region von <i>petC4</i>)
154	GCTAGCCCTGGAATCCC TTGGATCAGC	A. 7120 <i>petC4</i> 2774-2795	<i>NheI</i>	5'-Primer (Amplifikation der 3'-Region von <i>petC4</i>)
155	CACTAGTTTCGCATAGA GTGGAACACCC	A. 7120 <i>petC4</i> 4935-4915	<i>SpeI</i>	3'-Primer (Amplifikation der 3'-Region von <i>petC4</i>)
156	TAGCACTTCTGACTCCT GTGC	A. 7120 <i>petM</i> 961-981	---	5'-Primer (Amplifikation der <i>petM</i> -Region)
157	GCTTCTCATCTGTTGAA AGCAGGC	A. 7120 <i>petM</i> 1173-1150	---	3'-Primer (Amplifikation der <i>petM</i> -Region)
158	CCAATCCCAATACCCA GTCC	A. 7120 <i>petN</i> 930-950	---	5'-Primer (Amplifikation der <i>petN</i> -Region)
159	GATAGTAACAGCACTAA GGCG	A. 7120 <i>petN</i> 1155-1135	---	3'-Primer (Amplifikation der <i>petN</i> -Region)
166	CACTGCAGTCCAGTTG TCCTTGTTCCGC	A. 7120 <i>petM</i> 48-68	<i>PstI</i>	5'-Primer (Amplifikation der 5'-Region von <i>petM</i>)
167	GCTAGCCTGCATTCAGT AGTTCGCCGC	A. 7120 <i>petM</i> 1056-1036	<i>NheI</i>	3'-Primer (Amplifikation der 5'-Region von <i>petM</i>)
168	CAACTAGTGCTAGCCTT CGTAGGTTGGGCTTTGG GTGC	A. 7120 <i>petM</i> 1079-1102	<i>SpeI</i> - <i>NheI</i>	5'-Primer (Amplifikation der 3'-Region von <i>petM</i>)
169	CAACTAGTGCCAAAAC TCGGTGAATGCG	A. 7120 <i>petM</i> 2185-2165	<i>SpeI</i>	3'-Primer (Amplifikation der 3'-Region von <i>petM</i>)
170	CACTAGTGCAAACCTT AGGTGCTGATGTCG	A. 7120 <i>petN</i> 118-141	<i>SpeI</i>	5'-Primer (Amplifikation der 5'-Region von <i>petN</i>)
171	CACTGCAGAGCAAAGCA GTCATAGCCTGG	A. 7120 <i>petN</i> 1028-1005	<i>SpeI</i> - <i>NheI</i>	3'-Primer (Amplifikation der 5'-Region von <i>petN</i>)
172	GCTAGCGGTAGTTTGG GGACGTAACGG	A. 7120 <i>petN</i> 1065-1085	<i>NheI</i>	5'-Primer (Amplifikation der 3'-Region von <i>petN</i>)

173	CACTGCAGAGCAAAGCA GTCATAGCCTGG	A. 7120 <i>petN</i> 1795-1775	<i>PstI</i>	3'-Primer (Amplifikation der 3'-Region von <i>petN</i>)
179	TTTTTCTCTCCAGGGT CGCC	A. 7120 <i>petG</i> 975-995	---	5'-Primer (Amplifikation der <i>petG</i> -Region)
180	TGCCTTGGATTGGGGAT TGGG	A. 7120 <i>petG</i> 1308-1288	---	3'-Primer (Amplifikation der <i>petG</i> -Region)
181	AATCTACGCGCTCTTCG TG	A. 7120 <i>petC1A</i> - Op. 2030-2012	---	3'-Primer (Amplifikation der <i>petC1</i> -Promotor- Region)
184	TTGGCGTAATTCCTGTC C	A. 7120 <i>petC1A</i> - Op. 1779-1796	---	5'-Primer (Amplifikation der <i>petC1</i> -Region)
187	GCTAGCCTATAGGGGAA TCGTGGAAAGTCC	A. 7120 <i>petN</i> 1087-1110	<i>NheI</i>	5'-Primer (Amplifikation der 3'-Region von <i>petN</i>)
190	GGACAATAGTATTCCAA TCGAAAG	A. 7120 <i>petC4</i> 2434-2457	---	5'-Primer (Amplifikation der <i>petC4</i> -Region)
192	GATACGTTGAATCAGGC C	A. 7120 <i>petC2</i> 2703-2720	---	5'-Primer (Amplifikation der <i>petC2</i> -Region)
193	CCGTGTTCTGATGCTT G	A. 7120 <i>petC2</i> 2927-2910	---	3'-Primer (Amplifikation der <i>petC2</i> -Region)
194	CGTCGGGATTCATCAA TTG	A. 7120 <i>petC3</i> 2164-2183	---	5'-Primer (Amplifikation der <i>petC3</i> -Region)
196	AAAGCGACTTCTAGACG TTCCG	A. 7120 <i>petC2</i> 14-34	---	5'-Primer (Amplifikation der 5'-Region von <i>petC2</i>)
197	CTGCTAGCGGATCCATG GAAGGATTGGCCTGATT CAACG	A. 7120 <i>petC2</i> 2732-2707	<i>NheI</i> - <i>Bam</i> HI	3'-Primer (Amplifikation der 5'-Region von <i>petC2</i>)
198	CTGCTAGCGGATCCTCT GAAGTTAGTTCAAGTCC AG	A. 7120 <i>petC2</i> 3132-3156	<i>NheI</i> - <i>Bam</i> HI	5'-Primer (Amplifikation der 3'-Region von <i>petC2</i>)
199	CGCTGCAGCGGTAAAG GAAATGGTGGTGACG	A. 7120 <i>petC2</i> 5459-5437	<i>PstI</i>	3'-Primer (Amplifikation der 3'-Region von <i>petC2</i>)
200	CACTCGAGGATTCTCCC GATGAGTTGCCTGG	A. 7120 <i>petC1A</i> - Op. 9-31	<i>XhoI</i>	5'-Primer (Amplifikation der 5'-Region von <i>petC1</i>)
201	CTGCTAGCGGATCCAAC TGACGTCGCCCATATC GGGAACG	A. 7120 <i>petC1A</i> - Op. 2084-2058	<i>NheI</i> - <i>Bam</i> HI	3'-Primer (Amplifikation der 5'-Region von <i>petC1</i>)
202	CTGCTAGCGGATCCTCT GGCTTTGAGTCACGCTA AAACCG	A. 7120 <i>petC1A</i> - Op. 2471-2497	<i>NheI</i> - <i>Bam</i> HI	5'-Primer (Amplifikation der 3'-Region von <i>petC1</i>)
203	CAACTAGTTATCCACAT TTGCACAAAGCGGCTGA ACGC	A. 7120 <i>petC1A</i> - Op. 4612-4582	<i>SpeI</i>	3'-Primer (Amplifikation der 3'-Region von <i>petC1</i>)
204	CACTCGAGTGCATCTTT GCCGACTTTGCCACC	A. 7120 <i>petC3</i> 24-48	<i>XhoI</i>	5'-Primer (Amplifikation der 5'-Region von <i>petC3</i>)
205	CTGCTAGCGGATCCCCT ACCCAATTGATGAAATC CCGACG	A. 7120 <i>petC3</i> 2189-2164	<i>NheI</i> - <i>Bam</i> HI	3'-Primer (Amplifikation der 5'-Region von <i>petC3</i>)
206	CAGCTAGCGGATCCAAC TTACGCCGCAAGATTG AGGGTG	A. 7120 <i>petC3</i> 2517-2542	<i>NheI</i> - <i>Bam</i> HI	5'-Primer (Amplifikation der 3'-Region von <i>petC3</i>)
207	CACTGCAGCTCACTTTT TGCCTGTTGTTCTGG	A. 7120 <i>petC3</i> 4490-4467	<i>PstI</i>	3'-Primer (Amplifikation der 3'-Region von <i>petC3</i>)
208	CCTACCTCGCTTGAAAT CCC	A. 7120 <i>petC1A</i> - Op. 860-879	---	5'-Primer (Amplifikation der <i>petC1</i> -Promotor- Region)
209	AAACTTTCTCACCTTTTC	A. 7120 <i>petC2</i> 2696-2679	---	3'-Primer (Amplifikation der <i>petC2</i> -Promotor- Region)
210	GGGAGTAGCATTGAGTA AGC	A. 7120 <i>petC2</i> 1661-1680	---	5'-Primer (Amplifikation der <i>petC2</i> -Region)

211	TATGGGTCTCCTTAAAA ATTG	A. 7120 <i>petC4</i> 2431-2411	---	3'Primer (Amplifikation der <i>petC4</i> -Promotor- Region)
212	GCATAAAGGGAACTAAC GCC	A. 7120 <i>petC4</i> 1394-1413	---	5'Primer (Amplifikation der <i>petC4</i> -Region)
213	AGCCACTGAAGTTATGT ATTAG	A. 7120 <i>petC3</i> 2157-2136	---	3'Primer (Amplifikation der <i>petC3</i> -Promotor- Region)
214	CTGCACACTGGTTAAAC C	A. 7120 <i>petC3</i> 1116-1134	---	5'Primer (Amplifikation der <i>petC3</i> -Promotor- Region)
223	CTTGCTGTAGCCCTACC AGTAGC	A. 7120	---	5'-Primer (Amplifikation der <i>devB</i> -Region)
224	GCTTGGATATCCCTGGG AGAACC	A. 7120	---	3'Primer (Amplifikation der <i>devB</i> -Region)
230	GTGGGGGATTTTGGTAA TGAGTCG	A. 7120	---	5'-Primer (Amplifikation der <i>devT</i> -Region)
231	GATAATTGTCTCACAGG CTGCAC	A. 7120	---	3'Primer (Amplifikation der <i>devT</i> -Region)
234	CAGCGCAATTCATCCTC TGCG	A. 7120 <i>petC3</i> 2989-2969	---	3'-Primer (Amplifikation der <i>petC3</i> -Region)
242	GATGGTCAATAATGCCA CTAGC	A. 7120 <i>petC2</i> 3716-3695	---	3'-Primer (Amplifikation der <i>petC2</i> -Region)
243	CTGGATCCGCAAATAGA TGAGGGCCAATCACG	A. 7120 <i>petC4</i> 1450-1473	<i>Bam</i> HI	5'-Primer (Amplifikation der 5'-Region und des <i>petC4</i> -Gens)
244	GAGGATCCGCTGGAGC CGCAAGCCATAACC	A. 7120 <i>petC4</i> 3038-3017	<i>Bam</i> HI	3'-Primer (Amplifikation der 5'-Region und des <i>petC4</i> -Gens)
264	GCGGATCCAGCATAACG AACTATAGATAGG	A. 7120 <i>petC1A</i> - Op. 981-1003	<i>Bam</i> HI	5'-Primer (Amplifikation der Promotorregion des <i>petC1A</i> -Operons)
265	GGACTAGTAATCTACGC GCTCTTCGTGTATTTTG	A. 7120 <i>petC1A</i> - Op. 2031-2005	<i>SpeI</i>	3'-Primer (Amplifikation der Promotorregion des <i>petC1A</i> -Operons)
266	CCACTAGTCAATCGTTG CCCCTATAGAG	A. 7120 <i>petC1A</i> - Op. 2662-2682	<i>SpeI</i>	5'-Primer (Amplifikation des <i>petA</i> -Gens)
272	GACATGCATATGGATCC CATGGATGGGCTTTTTTC TGTTCTCCC	A. 7120 <i>petC1A</i> - Op. 4033-4008	<i>Bam</i> HI- <i>NdeI</i>	3'-Primer (Amplifikation des <i>petA</i> -Gens)

Tabelle 4.4: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Die angegebenen Positionen kennzeichnen die jeweilige Bindestelle des Oligonukleotids in den in die EMBL-Datenbank übermittelten Sequenzen (s. auch Anhang). A. 7120 = *Anabaena* sp. PCC 7120; A.v. = *Anabaena variabilis* sp. ATCC 29413.

4.2.9 RT-PCR (nach Rupp und Weintraub, 1991)

4.2.9.1 cDNA Synthese (mit ReverdAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von MBI Fermentas)

Um RNA in cDNA umzuschreiben, wurden 1 µg Gesamt-RNA und je 20 pmol spezifischer Primer für das zu untersuchende Gen bzw. für das Kontrollgen mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 12 µl gebracht und der Ansatz 5 min bei 70°C denaturiert. Nach Zugabe von 4 µl 5x Puffer (1st Strand Buffer), 1 µl RNase Inhibitor und 2 µl 10 mM dNTP-Mix wurde 5 min bei 37°C inkubiert. Die reverse Transkription erfolgte mit 1µl RT (200 U) für 1 h bei 42°C. Anschließend wurde das Enzym noch 10 min bei 70°C inaktiviert.

Als Test der eingesetzten Gesamt-RNA auf Kontamination mit DNA diente ein Kontrollansatz ohne Reverse Transkriptase.

4.2.9.1 Amplifikation der cDNA mittels PCR (mit MasterTaq[®] Kit von Eppendorf)

Das Volumen eines cDNA-Ansatzes wurde geteilt (Kontrolle und Ansatz). Zu jeder Hälfte kamen 8 µl 10x Puffer, 20 µl Master Mix, 0,3 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl), 20 pmol der entsprechenden Primer und bis zu einem Endvolumen von 100 µl Wasser. Nach einer anfänglichen, 3 minütigen Denaturierung bei 94°C, schlossen sich je nach cDNA 13 bis 25 Zyklen (empirisch ermittelt für jedes Gen) mit 30 sec bei 94°C, 60 sec bei der und jeweiligen Annealingtemperatur (verwendet wurde jeweils der T_m-Wert der eingesetzten Oligos) und 90 sec bei 72°C an. Danach folgte eine Inkubation von 7 min bei 72°C.

4.2.10 Inverse PCR

Gesamt-DNA von *Anabaena* sp. wurden mit einem geeigneten Restriktionsenzym verdaut. Nach Reinigung der geschnittenen DNA mit dem NucleoTrap[®] Kit von Macherey-Nagel wurden die Fragmente in einer Konzentration von 10-50 ng/µl ligiert, was zur Zirkularisierung führte. Diese zirkuläre DNA wurde als "template" in die PCR-Reaktion eingesetzt, nachdem Einzelstrangbrüche durch 5 minütiges Erhitzen auf 95°C erzeugt worden waren. Als Primer wurden gegenläufige Oligonukleotide verwendet.

4.2.11 DNA-Sequenzierung und Sequenzauswertung

Die Sequenzierung von DNA wurde von den Firmen PEQLAB und Geneart durchgeführt. Bei Sequenzauswertungen und -vergleichen auf Gen- bzw. Proteinebene wurden in erster Linie die Programme DNAMAN Version 4.0 (Lynnon Biosoft.), ClustalX Version 1.64b (Thompson et al., 1997), ExPasy Analyse von DNA- und Proteinsequenzen (<http://www.expasy.ch/>) und das UWGCG-Packet (University of Wisconsin, Genetic Computer Group) nach Devereux et al. (1984) benutzt. Für die Suche nach Sequenzhomologien, sowie DNA- und Protein-Sequenzen im Internet wurden hauptsächlich die Programme BLAST 2.0 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und BLAST/SRS (<http://www.ebi.ac.uk/Databases/index.html>) herangezogen. Sequenzinformationen über *Synechocystis* PCC 6803 und *Anabaena* PCC 7120 stammen aus der Cyanobase-Datenbank (<http://www.kazusa.or.jp/KDRI/service-e.html>), über *N. punctiforme* aus (<http://spider.jgi-psf.org>). Die verwendeten Symbole in den DNA- und Proteinsequenzen entsprechen der Vereinbarung der IUB Nomenklaturkommission (Eur. J. Biochem. 150, 1-5, 1985).

4.2.12 Markierung von DNA-Sonden

Zur Hybridisierung mit immobilisierter DNA bestimmte DNA-Sonden wurden mittels PCR (4.2.8.) mit den entsprechenden Oligonukleotiden und dem DIG DNA PCR Labeling Kit der Firma Roche

(Boehringer Mannheim) hergestellt. Die Menge und Richtigkeit der Digoxigenin-markierten Sonde wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

4.2.13 "Southern Blot" Analyse

Lösungen:

Denaturierungslsg.:	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
Neutralisierungslsg.:	3 M NaCl, 0,5 M TrisCl, pH 7,5
20xSSC:	0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl
Hybridisierungslsg.:	5xSSC, 1 % Trockenmilchpulver, 0,1 % N-Lauroyl-Sarcosin, 0,02 % SDS, 50 % Formamid
2xWaschpuffer:	2xSSC, 0,1 % SDS
0,1xWaschpuffer:	0,1xSSC, 0,1 % SDS

Etwa 2-10 µg genomischer DNA wurden mit Restriktionsenzymen verdaut und über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Nach Denaturierung (2 mal 30 min) und Neutralisation (2 mal 30 min) wurde die DNA mittels Kapillartransfer (Southern, 1975) auf positiv geladene Nylonmembranen der Firma Roche (Boehringer Mannheim) übertragen und 30 min bei 120°C fixiert.

Die Membran wurde 2 h in Hybridisierungslösung vorhybridisiert und 12 h bei 42°C mit der Digoxigenin-markierten Sonde (4.2.12) in Hybridisierungslösung inkubiert. Nach Waschen (2 mal 5 min) bei RT in 2xWaschlösung und (2 mal 15 min bei 68°C) in 0,1xWaschlösung wurde die Detektion mit dem DIG DNA Detection Kit der Firma Roche (Boehringer Mannheim) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

4.2.14 Gezielte Mutagenese von *Anabaena*

4.2.14.1 Konjugation von *Anabaena* und *E. coli*

Der Transfer von Plasmiden durch Konjugation von *Anabaena* mit *E. coli* wurde mittels "triparental mating" durchgeführt (Wolk et al., 1984; Elhai und Wolk, 1988b). Das zu übertragende Plasmid ("Cargoplasmid") wurde in den *E. coli*-Stamm HB101 mit dem Helfer-Plasmid pRL528 transformiert. Das Plasmid pRL528 codiert für Enzyme, die durch Methylierung der Aval und Avall-Schnittstellen den konjugativ in das Cyanobakterium übertragenen Vektor vor Restriktionsabbau schützen. Von den *E. coli*-Stämmen HB101 (+ "Cargoplasmid" + pRL528) und J53 mit dem konjugativen Plasmid RP-4, das die genetische Information (*tra*⁺, *IncP*) für alle bei der Konjugation benötigten Komponenten besitzt, wurden ÜN-Kulturen zum Animpfen von je 10 ml LB-Medium (+ Ab) benutzt. Nach einem dreistündigem Wachstum wurden die Kulturen geerntet und in LB-Medium ohne Antibiotikum wieder aufgenommen. Beide wurden erneut zentrifugiert, das Pellet des "Cargostammes" in 200 µl LB-Medium resuspendiert und mit dieser Suspension die sedimentierten Zellen des das RP-4-Plasmid tragenden Stammes gelöst. Diese Bakterienmischung inkubierte im 30°C-Brutschrank für 1-2 h. Hierbei gelangt das Plasmid RP-4 während einer Konjugation in den Empfängerstamm HB101.

Von den zur Konjugation vorgesehenen, in NO₃⁻-haltigem Medium gezogenen Blaualgen wurden 10 ml geerntet und in 200 µl A+A/4 + NO₃⁻ wieder aufgenommen. Zusätzlich wurden von dieser Algensuspension 1:100 und 1:1000-Verdünnungen hergestellt.

Auf eine Agarplatte (A+A + NO₃⁻) ohne Antibiotika wurde ein steriler HATF-08250-Filter der Firma Millipore gelegt. Darauf wurde eine Mischung aus 200 µl der *E. coli*-Suspension mit 100 µl der vorbereiteten Blaualgen mit Hilfe von Glasperlen (Durchmesser 5 mm, Sigma) verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 24-48 h bei 30°C im Licht wurde der Filter auf ein Antibiotika enthaltendes Medium überführt bis nach 1-2 Wochen unter gleichen Bedingungen Exkonjuganten zu erkennen waren.

4.2.14.2 Übertragung von Integrationsvektoren und Selektion auf Doppelte Rekombination

Zur Erzeugung von doppelten Rekombinations-Ereignissen zwischen homologen DNA-Abschnitten auf mobilisierbaren Integrationsvektoren und genomischer DNA wurde der DNA-Abschnitt in den "Suicidevektor" pRL271 kloniert, der das für Levansucrase codierende *sacB* Gen trägt (Cai und Wolk, 1990). Nach der Konjugation zwischen *Anabaena* und *E. coli* (4.2.14.1) wurden die erhaltenen Exkonjuganten ("Singlerekombinanten") in antibiotikahaltigem Flüssigmedium (A+A/4) mit NO₃⁻ angezogen und auf antibiotikahaltigem A+A-Medium mit NO₃⁻ und 5 % Saccharose ausplattiert. Durch Selektionsdruck mittels der *sacB*-vermittelten konditionalen Letalität wurden "Doppelrekombinanten" begünstigt, die nach einigen Tagen isoliert werden konnten.

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 Chlorophyllbestimmung bei *Anabaena*

Die Chlorophyllbestimmung von *Anabaena*-Kulturen wurde nach der Methode von Mackinney (1941) durchgeführt. 1 ml *Anabaena*-Kultur wurde 3 min zentrifugiert, die Zellen in 1 ml Methanol resuspendiert und 1 h im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach Abtrennung der Zelltrümmer wurde die optische Dichte des Überstandes bei 665 nm gegen Methanol bestimmt. Die Berechnung der Chlorophyllkonzentration in mg Chlorophyll/ml Kultur erfolgte nach folgender Formel:

$$OD_{665\text{nm}} \times (\text{Proben-Vol in ml} + \text{MeOH-Vol in ml}) / (74,5 \times \text{Proben-Vol in ml}) = \text{mg Chlorophyll/ml Kultur}$$

Nach der Faustregel von Schmetterer et al. (1986) entsprechen 0,3 µg Chlorophyll/ml Kultur einer Zelle/ml Kultur.

4.3.2 Heterocysteninduktion bei *Anabaena*

Für die Induktion der Heterocystenbildung wurden bis dahin in A+A/4 mit KNO₃ oder NH₄NO₃ gewachsene *Anabaena*-Kulturen in Medium ohne gebundenen Stickstoff umgesetzt. Für diesen "Stickstoff-Stepdown" wurden die Zellen bei RT 10 min bei 4000 rpm pelletiert und anschließend dreimal in frischem, NH₄NO₃-freiem Medium (A+A/4) gewaschen (Maldener, 1991) und im Ausgangsvolumen A+A/4 aufgenommen.

4.3.3 Färbung mit Diaminobenzidin

DAB-Lösung: 0,5 µg/ml Diaminobenzidin (Sigma) in 25 mM N-Trishydroxymethyl-2-aminoethansulfonsäure (TES, pH 8,0)

Die lichtunabhängige Oxidation von Diaminobenzidin (DAB) in Heterocysten wurde nach der Methode von Murry et al. (1981), verändert nach Ernst et al. (1992) durchgeführt.

1 ml *Anabaena*-Kultur wurde 24-48 h nach Heterocysteninduktion (4.3.2) geerntet, in 200 µl DAB-Lösung resuspendiert und 30 min bei 30°C im Dunkeln inkubiert.

4.3.4 Heterocystenisolierung aus *Anabaena*

Lösungen:

TEM 50 mM TrisCl, 25 mM EDTA, 25 mM Mannit, pH 8,1

Die Isolierung von Heterocysten aus *Anabaena*-Kulturen erfolgte nach Strohmeier et al. (1994). 48 h nach Heterocysteninduktion wurde 1 l *Anabaena*-Kultur geerntet, zweimal in TEM gewaschen und in 20 ml TEM mit 1 mg/ml Lysozym für 30 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation und Resuspension in 20 ml TEM wurden die Lysozym-sensitiven, vegetativen Zellen durch 10 min Ultraschallbehandlung in einem Sonorex RK-100 der Firma (Bandelin Electronics) zerstört. Die intakten Heterocysten wurden von den Zelltrümmern der vegetativen Zellen durch 20 min Zentrifugation bei 300 x g abgetrennt, 2 mal in TEM gewaschen und in 5 ml TEM resuspendiert.

4.3.5 Schnellaufschluß von *Anabaena*-Zellen

Lösungen:

T₁₀E₁ 10 mM TrisCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

5 ml einer in der exponentiellen Wachstumsphase geernteten Kultur wurden mit TE-Puffer gewaschen, in 200 µl TE aufgenommen und ÜN bei -20°C eingefroren. Die so schon teilweise aufgebrochenen Zellen wurden nach Zugabe von 100 µl Glasperlen (0,45-0,5 mm Durchmesser von B. Braun Biotech International) 5 x 1 min gevortext. Nach 5' Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge 13400 rpm) wurde der Überstand für PCR-Schnelltests und "Western-Blots" verwendet.

4.3.6 Anreicherung des *b₆f*-Komplexes

Cytochrom *b₆f*-Komplexe aus *Anabaena* sp. wurden nach Krinner et al. (1982) mit folgenden Änderungen isoliert und angereichert. Als Detergenz zur Solubilisierung wurde Dodecylmaltosid anstelle von Octylglycosid verwendet und die Reinigung wurde schon nach der Dialyse der Ammoniumsulfatfällung beendet. Bei der üblicherweise folgenden Aufreinigung in einem

Saccharosedichtegradienten dissoziierte aufgrund der Anwesenheit von Triton die Rieske-Untereinheit vom *b₆f*-Komplex.

4.3.7 Proteinisolierung aus *Anabaena*

Lösungen:

T₁₀E₁₀: 10 mM TrisCl, 10 mM EDTA, pH 8,0

Die Herstellung zellfreier Extrakte aus ganzen Filamenten oder aus Heterocysten (4.3.2.) erfolgte nach Resuspension der geernteten Zellen in einem geeigneten Vol TE durch 2 min Beschallung auf Eis mit Hilfe eines Branson Sonifiers B-12 (konische Spitze, Stellung 4) der Firma Branson Sonic Power Company. Die Trennung von Membranen und löslichen Proteinen erfolgte durch 1 h Zentrifugation bei 48000 x g (Sorvall Superspeed RC2-B, DuPont).

4.3.8 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt verschiedener Proben wurde nach Lowry et al. (1951) oder mittels des BCA-Tests (Pierce) nach Angaben des Herstellers ermittelt.

4.3.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

4.3.9.1 SDS-PAGE

Proteine wurden in 15 %igen Polyacrylamidgelen (nach Laemmli, 1970) in BioRad Minigel Apparaturen aufgetrennt. Bei einer angelegten Spannung von 160-200 V erfolgte die elektrophoretische Auftrennung ca. 1 h bei RT.

4.3.9.2 SDS-Harnstoff-PAGE

SDS-Harnstoffgele wurden analog zu normalen SDS-Gelen hergestellt, wobei dem Trenngel allerdings ultrareiner Harnstoff zu einer Endkonzentration von 6 M zugesetzt wurde. Die Auftrennung erfolgte je nach eingesetzter Proteinmenge 2-4 h bei RT und einer Spannung von 80 V.

4.3.8.3 Coomassie-Färbung (nach Cabral und Schatz, 1979)

Lösungen:

Coomassie-Lösung: 45 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,2 % Coomassie Blue R250

Entfärber: 25 % Methanol, 10 % Essigsäure

SDS-Gele (4.3.9.1) wurden nach der Elektrophorese 15 min in Coomassie-Lösung geschüttelt und anschließend entfärbt bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

Nach dem Photographieren des Gels wurde es 1 h bei 90°C und 1 h bei RT im Vakuum oder alternativ zwischen Celluphan getrocknet.

4.3.10 "Western Blot" Analyse

Lösungen:

Transferpuffer: 20 % Methanol, 0,2 % SDS, 192 mM Glycin,
25 mM TrisCl, pH 8,3

Proteine wurden über SDS-PAGE (4.3.9.1) aufgetrennt und auf Immobilon-P-PVDF (Millipore) übertragen. In einer mit Eis gekühlten BioRad Mini Trans Blot Apparatur erfolgte der Elektrotransfer bei einer Stromstärke von 200 mA in Transferpuffer innerhalb von 15-20 min.

Zur Färbung wurde die Membranen 10 min in filtrierter Coomassie-Lösung geschüttelt und anschließend mehrere Stunden entfärbt.

Antiserum wurden in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration in „Western Blot“, Analysen eingesetzt, die mittels des Chemilumineszenz Western Blotting Kits der Firma Roche (Boehringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurden.

4.4 Biophysikalische Methoden

4.4.1 UV/Vis-Spektroskopie

Spektroskopische Untersuchungen im Bereich von 250-800 nm wurden entweder mit einem Photometer: der Firma Kontron Instruments (Kontron Uvikon 860) oder mit dem SPECORD S 100 B der Firma Analytik Jena durchgeführt.

4.4.2 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Licht und Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden mit einem Mikroskop der Firma Zeiss (Axioskop HBO 50) durchgeführt und mittels einer CCD-Kamera (MC-3254) von AVT HORN dokumentiert. Die Bilder wurden mit dem Programm Axiovision 2.0 bearbeitet. Für die Fluoreszenzmessungen wurden Filter mit folgenden Charakteristika (in nm) verwendet:

GFP-Fluoreszenz: Filter set 38 (Zeiss)	Anregung:	470/40
	"beamsplitter"	495
	Emission:	525/50
Phycobilisomenfluoreszenz: Filter set 15 (Zeiss)	Anregung:	546
	"beamsplitter"	580
	Emission:	590

4.4.3 Differenzspektroskopie zur Konzentrationsbestimmung der Cytochrome *b* und *f*

Quantifiziert wurden Cytochrom *b*₆ und Cytochrom *f* in den Isolaten des Cytochrom *b*₆*f*-Komplexes mittels Redox-Differenzspektroskopie (Cramer und Whitmarsh, 1977). Nach vollständiger Oxidation durch Ferricyanid, sowie nach anschließender Ascorbat- und Dithionitzugabe, wurden Spektren

5 Literaturverzeichnis

- Adams**, D.G. und Duggan, P.S. (1999). Tansley review Nr.107: Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytol.* 144, 3-33.
- Alfonso**, M., Perewoska, I. und Kirilovsky, D. (2000). Redox control of psbA gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. Involvement of the cytochrome *b₆/f* complex. *Plant Physiol.* 122(2), 505-516.
- Allen**, J.F. (1992). Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1098, 275-335.
- Allen**, J.F., Alexciev, K und Hakansson, G. (1995). Regulation by redox signalling, *Curr. Biol.* 5, 869-872.
- Allen**, M.B. und Arnon, D.I. (1955). Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica*. *Lemm. Plant. Physiol.* 30, 366-372.
- Bald**, D., Kruip, J., Boekema, E.J. und Rögner, M. (1992) Structural investigations on cyt. *b₆/f*-complex and PS I-complex from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803, In Murata, N. (Hrsg.) *Research in Photosynthesis I*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande, 629-632.
- Bendall**, D.S. und Manasse, R.S. (1995). Cyclic photophosphorylation and electron transport, *Biochim. Biophys. Acta* 1229, 23-38.
- Berthold**, D.A., Schmidt, C.L. und Malkin, R. (1995) The deletion of *petG* in *Chlamydomonas reinhardtii* disrupts the cytochrome *bf* complex. *J. Biol. Chem.* 49, 29293-29298.
- Black**, T.A., Cai, Y. und Wolk, C.P. (1993). Spatial expression and autoregulation of *hetR*, a gene involved in the control of heterocyst development in *Anabaena*. *Mol. Microbiol.* 9, 77-84.
- Black**, T.A. und Wolk, C.P. (1994). Analysis of a Het mutation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 implicates a secondary metabolite in the regulation of heterocyst spacing. *J. Bacteriol.* 176, 2282-2292.
- Bolivar**, F. und Backman, K. (1979). Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol.* 68, 245-267.
- Boronowsky**, U., Wenk, S.-O., Jäger, C., Schneider, D. und Rögner, M. (1998). In Garab, G. (Hrsg.) *Proceedings of the XIth international congress on Photosynthesis III. Investigations on native and recombinant subunits of a cyanobacterial Cytochrom *b₆f* complex*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande, 1541-1544.
- Bricker**, T. M. und Ghanotakis, D. (1996). In Yocum, C. F. und Ort, D. R. (Hrsg.) *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, Niederlande, Vol. 4, 113-136.
- Breyton**, C., Tribet, C., Olive, J., Dubacq, J.-P. und Popot, J.-L. (1997). Dimer to monomer conversion of the cytochrome *b₆f* complex, *J. Biol. Chem.* 272, 21891-21900.

- Breyton, C.** (2000). Conformational changes in the cytochrome b₆f complex induced by inhibitor binding. *J. Biol. Chem.* 275(18), 13195-13201.
- Bron, P., Lacapère, J.-J., Breyton, C. und Mosser, G.** (1999). The 9 Å projection structure of cytochrome b₆f complex determined by electron crystallography. *J. Mol. Biol.* 287, 117-126.
- Brown-Howland, E.B., Lindblad, P., Nierzwicki-Bauer, S.A. und Bergmann, B.** (1988). Dinitrogenase-reductase (Fe-protein) of nitrogenase in the cyanobacterial symbionts of three *Azolla* species: Localisation and sequence of appearances during heterocyst differentiation. *Planta* 176, 319-322.
- Brugna, M., Rodgers, S., Schricker, A., Montoya, G., Kazmeier, M., Nitschke, W. und Sinning, I.** (2000). A spectroscopic method for observing the domain movement of the Rieske iron-sulfur protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97(5), 2069-2074.
- Bryant, D.A.** (1994). Gene nomenclature recommendations for green photosynthetic bacteria and heliobacteria. *Photosynthesis-Research* 41 (1), 27-28.
- Butler, C.S. und Mason, J.R.** (1997). Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. *Adv. Microb. Physiol.* 38, 47-84.
- Cabral, F. und Schatz, G.** (1979). High resolution one- and two-dimensional electrophoretic analysis of mitochondrial membrane polypeptides. *Methods Enzymol.* 56, 602-613.
- Cai, Y. und Wolk, C.P.** (1990). Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *J. Bacteriol.* 172, 3138-3145.
- Carrell, C.J., Zhang, H., Cramer, W.A. und Smith, J.L.** (1997) Biological identity and diversity in photosynthesis and respiration: structure of the lumen-side domain of the chloroplast Rieske protein, *Structure* 5, 1613-1625.
- Carrell, C.J., Schlarb, B.G., Bendall, D.S., Howe, C.J., Cramer, W.A. und Smith, J.L.** (1999). Structure of the soluble domain of cytochrome *f* from the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Biochemistry* 38, 9590-9599.
- Chi, Y.I., Huang, L.-S., Zhang, Z., Fernández-Velasco, J.G. und Edward A. Berry** (2000). X-ray structure of a truncated form of Cytochrome *f* from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry*; 39(26); 7689-7701.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. und Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 69, 2110-2114.
- Cooley, J.W. und Vermaas, W.F.** (2001). Succinate dehydrogenase and other respiratory pathways in thylakoid membranes of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: capacity comparisons and physiological function. *J. Bacteriol.* 183(14), 4251-4258.
- Cramer, W.A. und Whitmarsh, J.** (1977). Photosynthetic cytochromes, *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 28, 133-172.

- Crofts**, A.R., Meinhardt, S.W., Jones, K.R. und Snozzi, M. (1983). The role of the quinone pool in the cyclic electron-transfer chain of *Rhodospseudomonas sphaeroides*: a modified Q-cycle mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 723, 202-218.
- Crameri**, A., Whitehorn, E.A., Tate, E. und Stemmer, W.P. (1996). Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol.* 14(3):315-9.
- Curtis**, S.E. und Martin, J.A. (1994). The transcription apparatus and the regulation of transcription initiation. In: Bryant, D.A. (Hrsg.) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande, Seiten, 613-639.
- Denke**, E., Merbitz-Zahradnik T., Hatzfeld O.M., Snyder C.H., Link T.A. und Trumpower B.L. (1998). Alteration of the midpoint potential and catalytic activity of the rieske iron-sulfur protein by changes of amino acids forming hydrogen bonds to the iron-sulfur cluster. *J. Biol. Chem.* 273(15), 9085-9093.
- Devereux**, J., Haeberli, P. und Smithies, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395.
- Dietrich**, J. und Kühlbrand, W. (1999) Purification and two-dimensional crystallisation of highly active cytochrome b6/f complex from spinach. *FEBS Lett.* 463, 97-102.
- Dworsky**, A., Mayer, B., Regelsberger, G., Fromwald, S. und Peschek, G.A. (1995). Funktional and immunological characterisation of both "mitochondria-like" and "chloroplast-like" electron/proton transport proteins in isolated and purified cyanobacterial membranes. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 38, 35-43.
- Elhai**, J. (1993). Strong and regulated promoters in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *FEMS Microbiol. Lett.* 114, 179-184.
- Elhai**, J. und Wolk, C.P. (1988a). A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene* 68, 119-138.
- Elhai**, J. und Wolk, C.P. (1988b). Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167, 747-754.
- Elhai**, J. und Wolk, C.P. (1991). Hierarchical control by oxygen in heterocysts of *Anabaena*. *Abstr.* 114B, *Abstr. 7th Intl. Symp. Photosynthetic Prokaryotes*, Amherst, MA.
- Ernst**, A., Black, T., Cai, Y., Panoff, J.-M., Tiwari, D.N. und Wolk, C.P. (1992). Synthesis of nitrogenase mutants in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 affected in heterocyst development or metabolism. *J. Bacteriol.* 174, 6025-6032.
- Fay**, P., Steward, W.D.P., Walsby, A.E. und Fogg, G.F. (1968). Is the heterocyst the site of nitrogen fixation in blue-green algae? *Nature* 220, 810-812.
- Fay**, P. (1992). Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol. Rev.* 56, 340-373.
- Fiedler**, G., Arnold, M., Hannus, S. und Maldener, I. (1998a). The DevBCA exporter is essential for envelope formation in heterocysts of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol. Microbiol.* 27, 1193-1202.

- Fiedler, G., Arnold, M., Hannus, S. und Maldener, I. (1998b).** An ABC exporter is essential for the localization of envelope material in heterocysts of cyanobacteria. In: Peschek, G.A., Löffelhardt, W. und Schmetterer, G. (Hrsg.) *The Phototrophic Prokaryotes*. Plenum Publishers, New York, 529-537.
- Fiedler, G., Muro-Pastor, A.M., Flores, E. und Maldener, I. (2001).** NtcA-dependent expression of the devBCA operon, encoding a heterocyst-specific ATP-binding cassette transporter in *Anabaena* spp. *J. Bacteriol.* 183(12), 3795-3799.
- Goldman, A., Engelman, D.M. und Steitz, T. A. (1986).** Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15, 321-353.
- Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R. und Hanahan, D. (1990).** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 4645-4649.
- Hager, R., Biehler, K., Illerhaus, J., Ruf, S. und Bock, R. (1999).** Targeted inactivation of the smallest plastid genome-encoded open reading frame reveals a novel and essential subunit of the cytochrome *b₆f* complex. *EMBO J* 18, 5834-5842.
- Haley, J. und Bogorad, L. (1989).** A 4-kDa maize chloroplast polypeptide associated with the cytochrome *b₆-f* complex: subunit 5, encoded by the chloroplast *petE* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1534-1538.
- Hamel, P., Olive, J., Pierre, Y., Wollman, F.-A. und de Vitry, C. (2000).** A new subunit of cytochrome *b₆f*-Komplex undergoes reversible phosphorylation upon state transitions. *J. Biol. Chem.* 275, 17072-17079.
- Hauska, G., Hurt, E., Gabellini, N. und Lockau, W. (1983).** Comparative aspects of quinol-cytochrome *c*/plastocyanin oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta.* 726(2), 97-133.
- Hauska, G., Nitschke, W. und Herrmann, R.G. (1988).** Amino acid identities in the three redox center-carrying polypeptides of cytochrome *bc₁/b₆f* complexes. *J. Bioenerg. Biomembr.* (2), 211-228.
- Hauska, G., Herold, E., Huber, C., Nitschke, W. und Sofrova, D. (1989).** Stigmatellin affects both hemes of cytochrome *b* in cytochrome *b₆f/bc₁* complexes. *Z. Naturforsch.* 44c, 462-467.
- Hauska, G., Schütz, M. und Büttner, M. (1996).** In Yocum, C. F. und Ort, D. R. (Hrsg.) *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, Niederlande, Vol. 4, 377-398.
- Hauska, G. und Arnold, M. (2000).** In Yunus, M., Pathre, U. und Mohanty, P. (Hrsg.) *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*. Energy transduction in the Z-scheme. 108-126.
- Heimann, S. und Schreiber, U. (1999).** Cytochrom *b-559* (Fd) participating in cyclic electron transport in spinach chloroplasts: evidence for kinetic connection with the Cytochrom *b₆/f* complex, *Plant Cell Physiol.* 40, 818-824.

- Henninger**, T., Anemüller, S., Fitz-Gibbon, S., Miller, J.H., Schäfer, G. und Schmidt, C.L. (1999). A novel Rieske iron-sulfur protein from the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*: sequencing of the gene, expression in *E. coli* and characterisation of the protein. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31, 119-128.
- Howitt**, C.A., Smith, G.D. und Day, D.A. (1993). Cyanide-insensitive oxygen uptake and pyridine nucleotide dehydrogenases in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Biochimica-et-Biophysica-Acta.* 1141 (2-3), 313-320.
- Iwata**, S., Saynovits, M., Link, T.A. und Michel, H. (1996). Structure of a water soluble fragment of the 'Rieske' iron-sulfur protein of the bovine heart mitochondrial cytochrome bc₁ complex determined by MAD phasing at 1.5 Å resolution. *Structure* 4(5), 567-79.
- Iwata**, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S. und Jap, B.K. (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex, *Science* 281, 64-71.
- Jeanjean**, R., Bédu, S., Havaux, M., Matthijs, H.C.P. und Joset, F. (1998). Salt-induced photosystem I cyclic electron transfer restores growth on low inorganic carbon in a type 1 NAD(P)H dehydrogenase deficient mutant of *Synechocystis* PCC 6803 *FEMS Microbiol. Lett.* 167, 131-137.
- Johnson**, T.W., Shen, G., Zybailov, B., Kolling, D., Reategui, R., Beauparlant, S., Vassiliev, I.R., Bryant, D.A., Jones, A.D., Golbeck, J.H. und Chitnis, P.R. (2000). Recruitment of a foreign quinone into the A(1) site of photosystem I. I. Genetic and physiological characterization of phylloquinone biosynthetic pathway mutants in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 275(12), 8523-8530.
- Jüttner**, F. und Carr, N.G. (1976). The movement of organic molecules from vegetative cells into heterocysts of *Anabaena cylindrica*. In: Codd, G.A. und Steward, W.D.P. (Hrsg.) *Proceedings of the Second International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes*, Univ. Dundee, Scotland, Seiten 121-123.
- Kallas**, T. (1994). The cytochrome b₆f Komplex. In Bryant, D.A. (Hrsg.) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande, 259-317.
- Karauchnov**, I., Herrmann, R.G. und Klösgen, R.B. (1997). Transmembrane topology of the Rieske Fe/S protein of the cytochrome b₆/f complex from spinach chloroplasts. *FEBS Lett.* 408, 206-210.
- Kauppi**, B., Lee, K., Carredano, E., Parales, R.E., Gibson, D.T., Eklund, H. und Ramaswamy, S. (1998). Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphtalene 1,2-dioxygenase, *Structure* 6, 571-586.
- Keren**, N. und Ohad, I. (1999). In Rochaix, J.-D., Goldschmidt-Clermont, M. und Merchant, S. (Hrsg.) *The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in Chlamydomonas*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande, 569-596.
- Ketchner**, S.L. und Malkin, R. (1996). Nucleotide sequence of the PetM gene encoding a 4 kDa subunit of the cytochrome b₆f complex from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta.* 1273(3), 195-197.

- Kim, H., Xia, D., Yu, C.-A., Xia, J.-Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L. und Deisenhofer, J. (1998).** Inhibitor binding changes domain mobility in the iron-sulfur protein of the mitochondrial *bc₁* complex from bovine heart. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 8026-8033.
- Kramer, D., Schoepp, B., Liebe, U. und Nitschke, W. (1997).** Cyclic electron transfer in *Helibacillus mobilis* involving a menaquinol-oxidizing cytochrome *bc* complex and an RCI-type reaction center. *Biochemistry* 36, 4203-4211.
- Krinner, M., Hauska, G., Hurt, E. und Lockau, W. (1982).** A cytochrome *f-b₆* complex with plastoquinol-cytochrome *c* oxidoreductase activity from *Anabaena variabilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 681, 110-117.
- Kuila, D. und Fee, J.A. (1986).** Evidence for a redox-linked ionizable group associated with the [2Fe-2S] cluster of *Thermus* Rieske protein. *J. Biol. Chem.* 261, 2768-2771.
- Kunstner, P., Guardiola, A., Takahashi, Y. und Rochaix, J.D. (1995).** A mutant strain of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking the chloroplast photosystem II *psbl* gene grows photoautotrophically. *J. Biol. Chem.* 270(16), 9651-9654.
- Kuras, R., de Vitry, C., Choquet, Y., Girard-Bascou, J., Culler, D., Büschlen, S., Merchant, S. und Wollman, F.-A. (1997).** Molecular genetic identification of a pathway for heme binding to cytochrome *b₆*. *J. Biol. Chem.* 272, 32427-32435.
- Kyte, J. und Doolittle, R.F. (1982).** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Liebl, U., Pezennec, S., Riedel, A., Kellner, E. und Nitschke, W. (1992).** The Rieske FeS center from the gram-positive bacterium PS3 and its interaction with the menaquinone pool studied by EPR. *J. Biol. Chem.* 267(20), 14068-14072.
- Lee, W.J. und Whitmarsh, J. (1989).** The photosynthetic apparatus of pea thylakoid membranes: Response to growth light intensity. *Plant. Physiol.* 89, 932-940.
- Link, T.A., Hagen, W.R., Pierik, A.J., Assmann, C. und von Jagow, G. (1992).** Determination of the redox properties of the Rieske [2Fe-2S] cluster of bovine heart *bc₁* complex by direct electrochemistry of a water-soluble fragment. *Eur. J. Biochem.* 208, 685-691.
- Lockau, W., Peterson, R.B., Wolk, C.P. und Burris, R.H. (1978).** Modes of reduction of nitrogenase in heterocysts isolated from *Anabaena* species. *Biochim. Biophys. Acta* 502, 298-308.
- Lockau, W., Schoeder, H.-U., Nitschke, W. und Ziegler, K. (1987).** Bound acceptors of photosystem I. In Biggens, J. (Hrsg.) *Progress in Photosynthesis Research*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Niederlande, 37-40.
- Lockau, W., Massalsky, B., Dirmeier, A. (1988).** Purification and partial characterization of a calcium-stimulated protease from the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Eur. J. Biochem.* 172, 433-438.

- Lowry**, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Mackinney**, H. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* 140, 315-322.
- Madueno**, F., Napier, J.A., Cejudo, F.J und Gray, J.C. (1992). Import and processing of the precursor of the Rieske FeS protein of tobacco chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 20, 289-299.
- Maldener**, I. (1991). Molekulargenetische Charakterisierung einer Ca^{2+} -abhängigen Protease der Blaualge *Anabaena*. Dissertation, Universität Regensburg.
- Maldener**, I., Fiedler, G., Ernst, A., Fernández-Piñas, F. und Wolk, C.P. (1994). Characterization of *devA*, a gene required for the maturation of proheterocysts in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 176(24), 7543-7549.
- Martinez**, S.E., Huang, D., Szepaniak, A., Cramer, W.A. und Smith, J.L. (1994). Crystal structure of the chloroplast cytochrom *f* reveals a novel cytochrome fold and unexpected heme ligation. *Structure*, 2, 95-105.
- Mason**, J.R. und Cammack, R. (1992). The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 277-305.
- Mitchell**, P. (1976). Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *J. Theor. Biol.* 62(2), 327-367.
- Mohamed**, A., Eriksson, J., Osiewacz, H.D. und Jansson, C. (1993). Differential expression of the *psbA* genes in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Mol. Gen. Genet.* 238, 161-168.
- Mosser**, G., Breyton, C., Olofsson, A., Popot, J.-L. und Rigaud, J.-L. (1997). Projection map of cytochrome *b₆f* complex at 8 Å resolution, *J. Biol. Chem.* 272, 20263-20268.
- Murakami**, A. und Fujita, Y. (1993). Regulation of stoichiometry between PSI and PSII in response to light regime for photosynthesis observed with *Synechocystis* PCC 6714: Relationship between Redox state of Cytochrom *b₆-f* complex and regulation of PSI formation. *Plant Cell Physiol.* 34, 1175-1180.
- Muro-Pastor**, A.M., Valladares, A., Flores, E. und Herrero, A. (1999). The hetC gene is a direct target of the NtcA transcriptional regulator in cyanobacterial heterocyst development. *J. Bacteriol.* 181(21), 6664-6669.
- Murry**, M.A., Olafsen, A.G. und Benemann, J.R. (1981). Oxidation of diaminobenzidine in the heterocysts of *Anabaena cylindrica*. *Curr. Microbiol.* 6, 201-206.
- Murry**, M.A. und Wolk, C.P. (1989). Evidence that the barrier of the penetration of oxygen into the heterocysts depends upon two layers of the cell envelope. *Arch. Microbiol.* 151, 469-474.
- Nilsson**, F., Andersson, B., und Jansson, C. (1990). Photosystem II characteristics of a constructed *Synechocystis* 6803 mutant lacking synthesis of the D1 polypeptide. *Plant. Mol. Biol.* 14, 1051-1054.
- Nitschke**, W., Hauska, G. und Crofts, A.R. (1988). Fast electron transfer from low- to high potential cytochrome *b₆* in isolated cytochrome *b₆f* complex. *FEBS Lett.* 232, 204-208.

- Peschek**, G.A. (1987). Respiratory electron transport. In Fay, P. und Van Baalen, C (Hrsg.) The Cyanobacteria. Elsevier, Amsterdam, Niederlande, 119-161.
- Peterman**, E.J.G., Wenk, S.-O., Puleritis, T., Palsson, L.-O., van Grondelle, R., Dekker, J.P., Rögner, M. und van Amerongen, H. (1998). Fluorescence and absorption spectroscopy of the weakly fluorescence chlorophyll *a* in cytochrome *b₆f* of *Synechocystis* PCC 6803, *Biophys. J.* 75, 389-398.
- Peterson**, R.B. und Wolk, C.P. (1978). High recovery of nitrogenase activity and of ⁵⁵Fe-labelled nitrogenase in heterocysts isolated from *Anabaena variabilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 6271-6275.
- Pierre**, Y., Bryton, C., Lemoine, Y., Robert, B., Vernotte, C. und Popot, J.-L. (1997) On the presence and role of a molecule of chlorophyll *a* in the cytochrome *b₆f* complex, *J. Biol. Chem.* 272, 21901-21908.
- Pils**, D., Greger, W. und Schmetterer, G. (1997). Evidence for in vivo activity of three distinct respiratory terminal oxidases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 152, 83-88.
- Pfannenschmidt**, T., Nilsson, A. und Allen, J.F. (1999). Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* 397, 625-628.
- Poggese**, C., Polverino de Laureto, P., Giacometti, G.M., Rigoni, F. und Barbato, R. (1997). Cytochrom *b₆f* complex from the cyanobacterium *Synechocystis* 6803: evidence of dimeric organization and identification of chlorophyll-binding subunit. *FEBS Lett.* 414, 585-589.
- Ponamarev**, M.V. und Cramer, W.A. (1998). Perturbation of the internal water chain in cytochrom *f* of oxygenic photosynthesis: loss of the concerted reduction of cytochromes *f* and *b₆*, *Biochemistry* 37, 17199-17208.
- Ramaswamy**, K.S., Carrasco, C.D., Fatma, T. und Golden, J.W. (1996). Direkt in GenBank eingereicht.
- Rathinasabapathi**, B., Burnet, M., Russell, B.L., Gage, D.A., Liao, P.C., Nye, G.J., Scott, P., Golbeck, J.H. und Hanson, A.D. (1997). Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: prosthetic group characterization and cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(7), 3454-3458.
- Rich**, P.R. (1984). Electron and proton transfers through quinones and cytochrome *bc* complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* 768, 53-79.
- Rich**, P.R. und Bendall, D.S. (1980). The redox potentials of the b-type cytochromes of higher plant chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 591(1), 153-161.
- Riedel**, A., Rutherford, A.W., Hauska, G., Muller, A. und Nitschke, W. (1991). Chloroplast Rieske Center. EPR study on its spectral characteristics, relaxation and orientation properties. *J. Biol. Chem.* 266(27), 17838-17844.

- Rieske**, J.S., Hansen, R.E. und Zaugg, W.S (1964). Studies on the Elektron Transfer System. J. Biol. Chem. 239, 3017-3030.
- Rupp**, R.A. und Weintraub, H. (1991). Ubiquitous MyoD transcription at the midblastula transition precedes induction-dependent MyoD expression in presumptive mesoderm of *X. laevis*. Cell 65(6), 927-937.
- Salih**, G.F. und Jansson, C. (1997). Activation of the silent *psbA1* gene in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 produces a novel and functional D1 protein. Plant Cell 9, 869-878.
- Sambrook**, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning - a laboratory manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Band 1-3.
- Schäfer**, G., Purschke, W. und Schmidt, C.L. (1996). On the origin of respiration: electron transport proteins from archaea to man. FEMS Microbiol Rev. 18(2-3), 173-188.
- Schlenzka**, W., Shaw, L., Kelm, S., Schmidt, C.L., Bill, E., Trautwein, A.X., Lottspeich, F. und Schauer, R. (1996). CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase: the first cytosolic Rieske iron-sulphur protein to be described in Eukarya. FEBS Lett. 385(3), 197-200.
- Schmetterer**, G. (1994) Cyanobacterial Respiration. In Bryant, D.A. (Hrsg.) The Molecular Biology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande, 409-435.
- Schmetterer**, G., Wolk, C.P. und Elhai, J. (1986). Expression of luciferase from *vibrio narveyi* and *vibrio fischeri* in filamentous cyanobacteria. J. Bacteriol. 167, 411-414.
- Schmidt**, C.L. und Shaw, L.. (2001). A comprehensive phylogenetic analysis of Rieske and Rieske-type iron-sulfur proteins. J. Bioenerg. Biomembr. 33(1), 9-26.
- Schmitt**, M.E.und Trumpower B.L.. (1990). Subunit 6 regulates half-of-the-sites reactivity of the dimeric cytochrome *bc1* complex in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 265(28), 17005-17011.
- Schneider**, D. (2000). Untersuchungen zur Struktur, Funktion und Regulation des cyanobakteriellen *b₆f*-Komplexes. Dissertation, Universität Bochum.
- Schneider**, D., Berry, S., Rich, P., Seidler, A. und Rögner, M. (2001a). A regulatory role of the PetM subunit in a cyanobacterial cytochrome *b₆f* complex. J Biol Chem. 276(20), 16780-16785.
- Schneider**, D., Skrzypczak, S., Anamüller, S., Schmidt C.L., Seidler, A. und Rögner, M. (2001b). Heterologous Rieske proteins in the cytochrome *b₆f* complex of *Synechocystis* PCC 6803? eingereicht.
- Schütz**, M., Zirngibl, S., Le-Coutre, J., Büttner, M., Xie, D.L., Nelson, N., Deutzmann, R. und Hauska, G. (1994). A transcription unit for the Rieske FeS-protein and cytochrome *b* in *Chlorobium limicola*. Photosynthesis Research 39 (2), 163-174.
- Schütz**, M., Brugna, M., Lebrun, E., Baymann, F., Huber, R., Stetter, K.O., Hauska, G., Toci, R., Lemesle-Meunier, D., Tron, P., Schmidt, C. und Nitschke W. (2000). Early evolution of cytochrome *bc* complexes. J. Mol. Biol. 300(4), 663-675.

- Shen, G.,** Boussiba, S. und Vermaas, W.F.J. (1993). *Synechocystis* sp PCC 6803 Strains Lacking Photosystem I and Phycobilisome Funktion. *Plant Cell* **5**, 1853-1863.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Steinmetz, M.,** Le Coq, D., Aymerich, S., Gonzy-Treboul, G. und Gay, P. (1985). The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Mol. Gen. Genet.* **200**, 220-228.
- Strohmeier, U.,** Gerdes, C. und Lockau, W. (1994). Proteolysis in heterocyst-forming cyanobacteria: Characterization of a further enzyme with trypsin-like specificity, and of a prolyl endopeptidase from *Anabaena variabilis*. *Z. Naturforsch.* **49c**, 70-78.
- Studier, F.W.** und Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**(1), 113-30.
- Takahashi, T.,** Rahire, M., Breyton, C., Popot, J.-L., Joliot, P. und Rochaix, J.-D. (1996). The chloroplast *ycf7* (*petL*) open reading frame of *Chlamydomonas reinhardtii* encodes a small functionally important subunit of the cytochrome *b₆f* complex. *EMBO J.* **15**, 3498-3506.
- Takahashi, Y.,** Matsumoto, H., Goldschmidt-Clermont, M. und Rochaix, J.D. (1994). Directed disruption of the *Chlamydomonas* chloroplast *psbK* gene destabilizes the photosystem II reaction center complex. *Plant Mol. Biol.* **24**(5), 779-788.
- Tandeau de Marsac, N.** und Houmard, J. (1993). Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: New steps towards molecular mechanisms. *FEMS* **104** (1-2), 119-189.
- Tel-Or, E.** und Stewart, W.D.P. (1977). Photosynthetic components and activities of nitrogen fixing isolated heterocysts of *Anabaena cylindrica*. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* **169**, 61-86.
- Thiel, T.** (1990). Protein Turnover and Heterocyst Development in the Cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Phycol.* **26**, 50-54.
- Thompson, J.D.,** Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. und Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuc. Acid Res.* **22**, 4573-4680.
- Toelge, M.,** Ziegler, K., Maldener, I. und Lockau W. (1991). Directed mutagenesis of the gene *psaB* of photosystem I of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *Bioch. Biophys. Acta*, **1060** (2), 233-236.
- Trumpower, B.L.** (1981). Function of the iron-sulfur protein of the cytochrome *b-c₁* segment in electron-transfer and energy-conserving reactions of the mitochondrial respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta* **639**, 129-155.
- Trumpower, B.L.** (1990). The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome *bc₁* complex. *J Biol Chem.* **265**(20), 11409-11412.

- Trumpower**, B.L. und Gennis, R.B. (1994). Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 675-716.
- Vener**, A.V., van Kan, P.J.M., Rich, P.R., Ohad, I. und Anderson, B. (1997). Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome *bf* mediates signal transduction between light and proton phosphorylation: Thylakoid protein kinase deactivation by a single-turnover flash. *Proc. Natl. Sci. USA* 94, 1585-1590.
- Vener**, A.V., Ohad, I. und Andersson, B. (1998). Protein phosphorylation and redox sensing in chloroplast thylakoids. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 1(3), 217-223.
- Vioque**, A. (1997) The RNase P RNA from cyanobacteria: short tandemly repeated repetitive (STRR) sequences are present within the RNase P RNA gene in heterocyst-forming cyanobacteria. *Nucleic Acids Res.* 25(17), 3471-3477.
- de **Vitry**, C., Breyton, C., Pierre, Y und Popot, J.-L. (1996) The 4-kDa Nuclear-encoded PetM polypeptide of the chloroplast cytochrome *b₆f* complex, *J. Biol. Chem.* 271, 10667-10671.
- Walsby**, A.E. (1985). The permeability of heterocysts to the gases nitrogen and oxygen. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 226, 345-366.
- Widger**, W.R., Cramer, W.A., Herrmann, R.G. und Trebst, A. (1984). Sequence homology and structural similarity between cytochrome *b* of mitochondrial complex III and chloroplast *b₆-f* complex: position of the cytochrome *b* hemes in the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 674-678.
- Widger**, W.R. und Cramer, W.A. (1991). The cytochrome *b₆f* complex. In Bogorad, L. und Vasil, I.K. (Hrsg.) *The Photosynthetic Apparatus: Molecular Biology and Operation*. Academic press, San Diego, USA, . 149-176.
- Witt**, H.T. (1971). Coupling of quanta, electrons, fields, ions and phosphorylation in the functional membrane of photosynthesis. Results by pulse spectroscopic methods. *Q. Rev. Biophys.* 4, 365-477.
- Wolk**, C.P. (1968). Movement of carbon from vegetative cells to heterocysts in *Anabaena cylindria*. *J. Bacteriol.*, 2138-2143.
- Wolk**, C.P. (2000). Heterocyst formation in *Anabaena*. In: Brun, Y.V. und Shimkets, L.J. (Hrsg.) *Prokaryotic development*, Washington DC: American society for Microbiology, 83-104.
- Wolk**, C.P., Vonshak, A., Kehoe, P. und Elhai, J. (1984). Construction of shuttle vectors capable of conjunctive transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1561-1565.
- Wollmann**, F.-A. (1999). The structure, function and biogenesis of cytochrome *b₆f* complexes. In Rochaix, J.-D., Goldschmidt-Clermont, M. und Merchant, S. (Hrsg.) *The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in Chlamydomonas*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande, 459-476.

- Xia, D.**, Yu, C.A., Kim, H., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L. und Deisenhofer, J. (1997). Crystal structure of the cytochrome bc₁ complex from bovine heart mitochondria. *Science* 277(5322), 60-66.
- Xu, Q.**, Hoppe, D., Chitnis, V.P., Odom, W.R., Guikema, J.A. und Chitnis, P.R. (1995). Mutational analysis of photosystem I polypeptides in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Targeted inactivation of *psaI* reveals the function of *psaI* in the structural organization of *psaL*. *J. Biol. Chem.* 270(27), 16243-16250.
- Xu, X.** und Wolk, C.P. (2001). Role for *hetC* in the transition to a nondividing state during heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. *J. Bacteriol.* 183(1), 393-396.
- Yanisch-Peron, C.**, Vieira, J. und Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.
- Yoon, H.S.** und Golden, J.W. (1998). Heterocyst pattern formation controlled by a diffusible peptide. *Science* 282(5390), 935-938.
- Zhang, H.**, Carrell, C.J., Huang, D., Sled, V., Ohnishi, T., Smith, J.L. und Cramer, W.A. (1996). Characterisation and Crystallisation of the lumen side Domain of the Chloroplast Rieske Iron-Sulfur Protein. *J. Biol. Chem.* 271, 31360-31366.
- Zhang, Z.**, Huang, L., Shulmeister, V.M., Chi, Y.-I., Kim, K.K., Hung, L.-W., Crofts, A.R., Berry, E.A. und Kim, S.-H. (1998). Electron transfer by domain movement in cytochrome *bc₁*. *Nature* 392, 677-684.
- Zhang, H.**, Huang, D. und Cramer, W.A. (1999) Stoichiometrically bound β -carotene in the cytochrome *b₆f* complex of oxygenic photosynthesis protects against oxygen damage. *J. Biol. Chem.* 274, 1581-1587.
- Zhang, H.**, Whitelegge, J.P. und Cramer, W.A. (2001). Ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase is a subunit of the chloroplast cytochrome *b₆f* complex. *J Biol Chem.* in press
- Ziegler, K.**, Maldener, I. und Lockau, W. (1989). 5' Monohydroxyphyloquinone as a component of photosystem I. *Zeitschrift für Naturforschung* 44 (5-6), 468-472.
- Zito, F.**, Finazzi, G., Delosme, R., Nitschke, W., Picot, D. und Wollman, F.-A. (1999). The Qo site of cytochrome *b₆f* complex controls the activation of the LHCII kinase. *EMBO J.* 11, 2961-2969.

6 Anhang

6.1 In Genbanken übermittelte Sequenzen

Gen(e)	Protein(e)	<i>Anabaena variabilis</i> sp. ATCC 29413	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120
<i>petBD</i> -Operon	Cytochrom <i>b</i> ₆ (PetB) und Untereinheit IV (PetD)	AJ271818	AJ319645
<i>petC1A</i> -Operon	Rieske FeS-Protein (PetC1) und Cytochrom <i>f</i> (PetA)	AJ271819	AJ319646
<i>petC2</i>	alternatives Rieske FeS-Protein (PetC2)	AJ311360	AJ319647
<i>petC3</i>	kurzes alternatives Rieske FeS-Protein (PetC3)	AJ311361	AJ319648
<i>petC4</i>	alternatives Rieske FeS-Protein (PetC4)	----	AJ319649 P70758*
<i>petG</i>	PetG	AJ271820	AJ319650
<i>petM</i>	PetM	AJ299220	AJ319651
<i>petN</i>	PetN	AJ271821	AJ319652

Tabelle 6.1: Accession-Nr. der hinterlegten Sequenzen. * Die AS-Sequenz von PetC4 wurde schon 1996 von Ramaswamy et al. (1996) ermittelt.

6.2 Sequenzen der Gene von *Anabaena variabilis* sp. ATCC 29413 und flankierender Bereiche

6.2.1 *A. variabilis* *petBD*-Operon (Accession-Nr: AJ271818)

```

1 GGAAAATGCCTTCAATTTTTTCACAAATGCGATCGCGCGGTTTTAATACCCGCTTGATCTG 60
61 CTGGCGAACCCGCAATCGGAGAAAACCACTCCAACCTTCCACTCTGTGGATTTAAGGCGA 120
121 TTTGTAAACCCACTCCGGTCAGTTCTCCAGAAGTACTAACCTGTAAGCTGCGGTATTGCT 180
181 CAGGGTCTAAAAATCTCGTAAAAGGATCACCTAAAGTCTTGAGCATATTCTGAATCGCCC 240
241 CATAAGCAGCTTTATGGTCTGTAAGGGGCTTTTCCAATGCCTTCTGTCTCACATTCGCC 300
301 AATTTTGTATGGTTAAACGTCTCATCCAAATAAGAGCGATTGACAATTCGCCACACTTCG 360
361 AAAGTAGTTTCTGTTCCCTCCGTCAATGCTGTGGCTGGTTGAACTACTACTCCTACAGCCA 420
421 AACTCAAAGCCACCAATAGCGAAAAATCCTAGCCGAAAAAACTGTTTTTGCATGAACCCCA 480
481 TTTGCAGTTTTACCTCAACCGAAATTGCCTAGAATTGCCAGTTGCATGATCAATAATGA 540
541 AATCTATCTCTCGACTATGTTACTTTTTTTATAGAAGTGGTGCATTATTCTCATCAAGTT 600
601 GTTAAGGCAGCTGATATTAGTGCATCCCCTTTACCAAAGGATTATGATCTACTTTGTAC 660
661 CCACCAATCGGGTTGGCTTGCAAAGAGAACGCAATATATTCCATATTTACAGAGTGTAA 720
721 GTTTGTGAAAACCTTGACATTCTGCAAGAGTGAAAAACAGACGAAAAACTCCTCTTAAA 780
781 AGAAAATCCCAAAATTGCCAATTGGGAGATTGAATCAACCGCAACCGATTTTTAGGAACT 840
841 TGAGATTGTATGGCCAACGTTTACGACTGGTTTGAGGAACGCTTAGAGATCCAAGCAATT 900
    PetB ► M A N V Y D W F E E R L E I Q A I
901 GCTGAAGATGTCACAAGCAAATACGTCCCTCCCCACGTCAACATCTTCTACTGCTTGGGT 960
    A E D V T S K Y V P P H V N I F Y C L G
961 GGTATTACCCTAGTTTGCTTTCTAATCCAGTTTGCCACTGGATTGCTATGACGTTCTAT 1020
    G I T L V C F L I Q F A T G F A M T F Y
1021 TACAAGCCAACAGTTGCTGAAGCTTACTCCTCCGTTCAATACATTATGAACGAGGTGAAC 1080
    Y K P T V A E A Y S S V Q Y I M N E V N
1081 TTCGGTTGGTTAATTCGCTCCATTTCATCGCTGGTCTGCCAGCATGATGGTGTGATGATG 1140
    F G W L I R S I H R W S A S M M V L M M
1141 ATTCTGCACGTCTTCCGCTTACCTAACTGGTGGTTTTCAAAAAGCCCCGTGAATTAACC 1200
    I L H V F R V Y L T G G F K K P R E L T

```

1201 TGGGTAAGTGGTGTGATCCTCGCTGTCATCACCGTTTCTTTCCGGTGTACAGGCTATTCT 1260
 W V S G V I L A V I T V S F G V T G Y S
 1261 CTACCTTGGGATCAAGTAGGTTACTGGGCTGTGAAAATCGTTAGTGGTGTACCAGAAGCG 1320
 L P W D Q V G Y W A V K I V S G V P E A
 1321 ATTCCTGTAGTCGGTGTACTCATCTCCGACCTACTGCGTGGTGGTCCAGTGTGGTCAA 1380
 I P V V G V L I S D L L R G G S S V G Q
 1381 GCAACCCTGACCCGCTACTACAGCGCCACACATTTGTACTACCTTGGTTGATTGCAGTA 1440
 A T L T R Y Y S A H T F V L P W L I A V
 1441 TTTATGCTGTTCCACTTCTTGATGATCCGCAAGCAAGGTATTTCCGGGCCCTTTGTAATCC 1500
 F M L F H F L M I R K Q G I S G P L *
 1501 AGCAACCAGTTCTCAGAGCCAGTAGTTTGTTTTAAACTGATGAAAAATCAGCAATTAAGA 1560
 1561 CTCATAAGTCAAAAACACTAGTATCTGAAAACCTCAAAGCTGTTAAAAACCTCAATAAAGGT 1620
 1621 TTGACCAAGGCTTTAACTGAATTTTAAAGCAGGAGAGCGCATTCAAAAATGGCTACACAAA 1680
PetD ▶ M A T Q K
 1681 AAAAACCCGATCTGAGCGATCCTACGTTAAGAGCTAAACTCGCCAAAGGCATGGGTCCACA 1740
 K P D L S D P T L R A K L A K G M G H N
 1741 ACTACTATGGTGAACCAGCTTGGCCCAACGACTTGCTGTATGTATTCCCAATTGTAATCA 1800
 Y Y G E P A W P N D L L Y V F P I V I M
 1801 TGGGTTTCATTTCGCTTGTATCGTGGCTCTAGCCGCTACTAGACCCCGCTATGACAGGCGAAC 1860
 G S F A C I V A L A V L D P A M T G E P
 1861 CAGCAAATCCTTTTCGCTACACCACTGGAAATTTTACCAGAGTGGTATTTGTACCCAGTAT 1920
 A N P F A T P L E I L P E W Y L Y P V F
 1921 TCCAAATTTTTCGATCGCTTCTTAACAAATTTGTTGGGAGTATTAGCAATGGCTTCTGTAC 1980
 Q I L R S L P N K L L G V L A M A S V P
 1981 CTTTGGGACTAATCCTCGTTCCTTCATTGAGAACGTCAACAAGTTCCAAAACCCCTTCC 2040
 L G L I L V P F I E N V N K F Q N P F R
 2041 GTCGTCCAGTTGCAACCACAGTGTCTTGTGTTTGGAACTTGGTAACTCTGTGGTTGGGTA 2100
 R P V A T T V F L F G T L V T L W L G I
 2101 TTGGTGTGCTTACCATTGGACAAATCTTTGACCTTAGGATTGTTCTAAGCTAGTCACC 2160
 G A A L P L D K S L T L G L F *
 2161 TAGAAGCTTCTTGACACCTGTAGGTTTTCAGGAGCGTATATCTGGAAGTTATGATGTCTAA 2220
 2221 TGACAAATCACCCCTGAAGGTGTGTGTAGTTCGAAAATGCCATTCATATCAAGGATATGCGC 2280
 2281 TCTTGAACACACCACACAGGTGTCAATTTTGTAGTATAGGGGTTGCTGAGATAAAGTTCCCT 2340
 2341 AGTGTGACCAATGACTAATGACCAAATTAATTTTGTAGCTTTGGATACAAAAATCATC 2400
 2401 CAAAACTAAAAATAGACTGAAGACGATAGATTACATAAAATTCCTTACTCATAATTACATG 2460
 2461 AAAGCTACGGTCAATGCTTGGCATAATGCAGCACGACCATTTAAACAATTAAGAGCGAACT 2520
 2521 GAAGCTCCTTAACCAAGTACAACAATGGTTTGGAGACTTTTCCCTAAAATATCTGTCTCA 2580
 2581 ACTCGGCTGGACAGAAGGTCAACTTTATCGCCTCAACTTAGCACTAGCGGAGGTTTTTAC 2640
 2641 AAATGCAGTTCGTCATGCACATCGTACTTTACCGCCAGAAACGACCATAGAAATGAGGT 2700
 2701 CAGTCTATGGATTAACAAAATAGAAATTTAGAAATTTGGGATCATGGCAATCCGTTTGTACC 2760
 2761 TGATGCGATCGCTGAACCAGCACCAGGTACTCTACAAGTGGGAGGCTATGGCTGGTTTTCT 2820
 2821 CCTCCGGCGCTTGGCTGACCGTGTGGTCTACGAACGTAGCGAGGATGGTAGAAATTTGTTT 2880
 2881 GGTCATAGTTAAGTATGCCAAGGAAGGGCAATATTAGGGGAGTGAGGGAAGATGAGTAAG 2940
 2941 AATTTTTACTTAGGCACTTCCAGATAAAAAATATGAAAAATATACAAGGGTGCCTACCT 3000
 3001 GCGATAGAACCTAAATACACTCAGAAATTTTCTACTGACGCACCCTACCAAACCATCA 3060
 3061 ATTTCCGATGATTTATTTTGGTGTTCCTTACCTTGTCTACCTGATCCTCTTTATCTC 3120
 3121 CTGACTTCTTCACTTATATCTAGTGAACGGCTTCCAGTAAAGAGAAATTTTGTATAAAAA 3180
 3181 ATTATACCTATAGCAGTAGAGTTAGCATACGAG 3213

6.2.2 A. *variabilis* *petC1A*-Operon (Accession-Nr: AJ271819)

1 AAGCTTACGGAGCAAGCGTTTTTCCCAGTGCAGAGTCAAGAGTGGATTGCTTCCCACATAT 60
 61 TCTTATAGTCTGACATATTTTCTGTTCATCCTTGCCCAATCTGGAAATTTTCGCTTTGA 120
 121 GTGGGTTTTCTCCTATCGTGGTAGCTGCTTCCCCAGATACAATAGTTAGCAAATGTTGCCT 180
 181 ACCACCTGAGCCATGACACCCTCACAAGAAGTAGATACAAGAACCCTCCTGAGATTGAT 240
 241 ACAGAAGGATACGGCAACTCAGATATTGATTCTCTCGATGAGTTGCCTGGTGAAGTCGAA 300
 301 ATGTCTCTATTCGACCACCTAGAAGAATTAAGACAGCGCATTTTTATTCACTGATTGCC 360
 361 GTAGCAGTGGGTGTAGTTGGCTGCTTCTTCGCGTCAAGCCAATTGTTCAATTACTAGAA 420

421 GTCCCAGCTCAAGGCGTTAAATTTCTCCAGCTAGCCCCGGAGAATATTTCTTTGTTTCT 480
 481 CTCAAAGTTGCAGGCTACACTGGCTTGTTACTTTCTAGTCCTTTTCATTCTCTACCAAATT 540
 541 ATTTTGTTTGTTCTCCCTGGATTAACTCGGCGCGAACGTGGTCTACTTGGGCCTATTGT 600
 601 TTAGGGTCAAGTGTGCTGTTTGCCGCGGTTTAGTCTTTGCTTATTTACTTTTGATTCCC 660
 661 GCCGCTTTGAATTTTTTCATCAGTTACGGCGCGGATGTAGTCGAACAACCTGTGGTCTATC 720
 721 GACAAATATTTTGAATTTGTACTATTGCTTTTTATTTAGTACTGGGTTGGCTTTCCAAGTT 780
 781 CCCATCATCCAACTTTTACTAGCTAATTTAGGTATCGTTTCATCCCAAAGAATGATTTCT 840
 841 GGCTGGCGATTTGTAATTATGGCAGCCGTAGTTTTAGGTGCTGTACTTACACCTTCCACA 900
 901 GACCCCTAACTCAAAGTCTTTTGGCAGGCGCAGTACTTACCCCTTACTTTGGTGGTATT 960
 961 GGTTTAGTGAAGCTCACAGGTAATGAAAAACCTGCGATGTGAGAATTCAGGAGTCAGAA 1020
 1021 TATATCAGATTGTGATATTTCAAGTTTAGTACTTTGAAGAAAACAAAAGCCATCAGAATTT 1080
 1081 CTTGACTTTATATCATTTTGAATTCTGAATTCTGATTTCTGAATTCCTCCTTCGCTTAAA 1140
 1141 TTCATAACTTGA AAAATACGCACATTAGTTATGAAAATTTAGCAAAGTACTATTATAA 1200
 1201 AAAATATTTTAAAGACTCCTTAATAATCACCACCTTCTGCTGCGAATATTTTCAAGATAATC 1260
 1261 CATTCAGATGCACGTTTACCCAGATCTAGAGGTATGCTCACAGCTTTACCGAGTCGAGGG 1320
 1321 CGCTCTTTTGTGTTGTGTAATAAATGTTTTACTTGGACTGCACCACCTAAAGCATGAAG 1380
 1381 TAATTGGCGACACTATCAAGATGCTCTTGATATTCGGTTTTCACTCATAGGGAAAGAAGCT 1440
 1441 TGCTCCAAGTATTTCCACATGACTTGTAAAAATATCTTGCCTTGTGTCCGGCGAAACTGG 1500
 1501 ACATCATAAGAGTATCCCCATTTATCCAGCAATAGTTGGCGTAATTCCTGTCTGTCTATA 1560
 1561 GTTTTTCTCAACTAGATTTTACATTTAGTTATGACGTTAAGTTCCGTAACCTCAAGTATGA 1620
 1621 TAAGGATATAAAGAAATGTAATGCTAGCAGAAAGGATGCGAGATATATCTTGAACAAAG 1680
 1681 AATAACAGCATCGTTACAAGCGTTAGCATTTCAACCAGACAGGAGTTGCTCAAGCATTTA 1740
 1741 GCGCTCTTGTGCAATGCTTAACAAAATACACGAAGAGCGCGTAGATTATGGCTCAATTTT 1800

PetC1 ► M A Q F S
 1801 CTGAATCCGTAGACGTTCCCGATATGGGGCGACGTCAGTTCATGAACCTGCTAACTTTTG 1860
 E S V D V P D M G R R Q F M N L L T F G
 1861 GAACCGTACTGGTGTGGCTCTGGGTGCATTTGTATCCCGTTGTCAATTACTTTTATCCAC 1920
 T V T G V A L G A L Y P V V N Y F I P P
 1921 CTGCAACTGGTGGCGCTGGTGGCGGTACAACAGCAAAAAGATGAGCTGGGCAACGATGTTA 1980
 A T G G A G G G T T A K D E L G N D V S
 1981 GCGTCAGCAAATTTCTAGAAAAGCCATAATGTAGGCGATCGCACTCTAGTTCAAGGACTCA 2040
 V S K F L E S H N V G D R T L V Q G L K
 2041 AGGGCGACCCACCTATATCGTGGTAGAAAGCAAAGAAGCCATCACAGATTATGGCATCA 2100
 G D P T Y I V V E S K E A I T D Y G I N
 2101 ACGCCGTCTGCACCCACTTGGGTTGCGTCTGCCCTGGAACGCGGCAGAAAACAAATTTA 2160
 A V C T H L G C V V P W N A A E N K F K
 2161 AATGCCCTTGCCACGGTTCTCAATACGATGCAACGGGTAAGGTTGTTTCGCGGCCAGCAC 2220
 C P C H G S Q Y D A T G K V V R G P A P
 2221 CAAAGTCTCTGGCTTTGAGTCACGCTAAAACCGAAAACGACAAAATCGTTTTAATCCTT 2280
 K S L A L S H A K T E N D K I V L T P W
 2281 GGACTGAAAACCGACTTCCGCACCGGTGAAGAACCCTGGTGGTCTTAATGATTTTCGTTCTG 2340
 T E T D F R T G E E P W W S *
 2341 TGTCAGTAGTCAGTTGTTAGTTGTGAATTTGCCACTGACCACTGACCACTGACCACTGAC 2400
 2401 TATTGACTCTTGACTAAATTC AATCGTTGCCCTATAGAGATGAGAAATGCTTGTACAAG 2460

PetA ► M R N A C T R
 2461 AGCGAGGTTAACTCGCACTGCTAGAGCAATGGTAAAAACATTGTTTCATAGCGATCGCCAG 2520
 A R L T R T A R A M V K T L F I A I A S
 2521 CGTGACATTTTTCTTACCAGCGACTTAGCCCTTCCCAATCAGCTGCTGCATATCCTTT 2580
 V T F F F T S D L A L P Q S A A A Y P F
 2581 CTGGGCGCAGCAAACCTTACCAGAAACCCCCGCGAACCGACAGGTAGAATTGTTTGGCG 2640
 W A Q Q T Y P E E T P R E P T G R I V C A
 2641 TAAGTGTACCTAGCAGCGAAGCCACAGAGTAGAAGTTCCCTCAATCCGTACTACCCGA 2700
 N C H L A A K P T E V E V P Q S V L P D
 2701 TACCGTATTTAAAGCCGTTGTTAAAAATCCCTTACGACACCAGCGTGCAACAAGTTGGTGC 2760
 T V F K A V V K I P Y D T S V Q Q V G A
 2761 TGATGGCTCTAAGGTCGGCTTAAACGTCGGTGTACTGATGTTACCCGAAGGCTTCAA 2820
 D G S K V G L N V G A V L M L P E G F K

2821 GATTGCTCCTGAAGACCGCATTCCCGAAGAAGTAAAGAAAGAAATCGGCGATGTTTACTT 2880
 I A P E D R I P E E L K E E I G D V Y F
 2881 CCAACCCTACGGCGAAGATAAAGACAACATCGTCATCGTCGGGCCTTTACCCGGTGAACA 2940
 Q P Y G E D K D N I V I V G P L P G E Q
 2941 GTACCAGGAAATCGTCTTCCCTGTTCTTTCTCCCAACCCCGCCAACGACAAGAACATTCA 3000
 Y Q E I V F P V L S P N P A N D K N I H
 3001 C'TTCGGTAAATATTCAGTTCATGTTGGTGGCAACCCGGGACGTGGACAGGTTTATCCCAC 3060
 F G K Y S V H V G G N R G R G Q V Y P T
 3061 AGGTGAAAAGAGCAACAACAACCTTTATAGCGCTGCTGCTACTGGGACAATTAGCAAGAT 3120
 G E K S N N N L Y S A A A T G T I S K I
 3121 TGCCAAACAAGAAGGCGAAGATGGTAGCGTTAAATATCTAGTAGACATCAAAACTGAGTC 3180
 A K Q E G E D G S V K Y L V D I K T E S
 3181 TGGAGAAGTTGTGACGCGACACTATTCCTGCAGGCCAGAACTGATTGTTTCTGAAGGACA 3240
 G E V V S D T I P A G P E L I V S E G Q
 3241 AGCTGTCAAAGCAGGCGACGCTTTGACCAATAACCCCAACGTTGGTGGTTTCCGGTCAATT 3300
 A V K A G D A L T N N P N V G G F G Q L
 3301 AGACGCAGAAATCGTTCCTCAAGATGCTAANTAGAGTTGGCTGGTTGATTGCTTTCGTTGC 3360
 D A E I V L Q D A N R V G W L I A F V A
 3361 TCTGGTGTGTTAGCTCAAGTCATGCTAGTTCTGAAGAAGAAGCAGGTGGAAAAAGTCCA 3420
 L V M L A Q V M L V L K K K Q V E K V Q
 3421 AGCTGCGGAAATGAATTTCTAATACTCTCTGATAAATCAATACTTTTCAGACAGGCGATC 3480
 A A E M N F *
 3481 GCCTGTCTTTTTTATGTCCTTAAAGTCTCAATGAAGCAAGTTTTCACAGTCAAATATGAAAG 3540
 3541 AAGTCTTTTCTCCCCCTGCTCTTTTCAAGCTAGAGGTGGGAAATACCCCTACCGGACTAGTCG 3600
 3601 GCATACACACCTCTAGATATATTGCAAACCTTTGTTGCAATAAAGTTATATTTATTTACAT 3660
 3661 AAAGTTACAAAGATATAAAAAAGAGGTTTGTGATGGCTATCTTATTTGCAGTATTACTTT 3720
 3721 TAGGTTGGGTTGCAGCTTCGGTTATAGGTTCTCTTGCTTACTTCTTGGGAGAACAGAAAA 3780
 3781 AGCCATCCATGAGCGTAACTGGCGTTCTGAGTCTTTTGGAGAAGTTGGCTAAGTCTATCA 3840
 3841 CTGGGATGGAAATAGACTACAGCGATCGCGCTCTGCTTATGCGATGGATGCGTATACCA 3900
 3901 GCAGGACTCTGCCCAATAGCAGCGAAAATGCTTACACTCATACAAATAAAACCCCAAT 3960
 3961 CATTGATGTTGGGGGTTTTGCTTTTTCATGATAAAAAAGGAAGTCCGAGGCTCAAACTCA 4020
 4021 GCACTCCTTACAAAGGACGGTAAACCCGATAATTAATATTGGGAAAATATTATCCATCA 4080
 4081 ACTCAACTTTTTTCTAACCAACCCTGTCAAACCTTGCCAACCTTTAGCATCTTCGTATAGCT 4140
 4141 TATTAAAACGCATGAGGTGCGATCGCGTCCGTCTCACAGCATAAGGAACCATTGTTCCCG 4200
 4201 TCCGCATAATAAATGCCAGTCAGAAGATTGTGCCAACAGCAGTTCTCTTGCTGCTTGGT 4260
 4261 TAAGCGCCCTCCATCCCAACTCATCTTCTGTTTCTAGGGTAGATATTTTCGATCATGCGTT 4320
 4321 CAGCCGCTTTGTGCAAATGTGGATAAATCCAAGCATTGTTTTCATTCAACCAATATTCAT 4380
 4381 GGAAACCCCTATAACCCAGCTTGACTGGGAAGGACGACAGACTTGTGG 4429

6.2.3 A. *variabilis* petC2 (Accession-Nr: AJ311360)

1 GGGAGTAGCATTGAGTAAGCAAATGGCAATACTCTGCCATTCCCCAGATGAATCTGATTT 60
 61 GGCTCAATTGCTGTAACTGCTGCGTTTTCAATAAATTCTACCCCTCGTTCTGCCATGAAT 120
 121 TTTGTCACTAACTCGGCAGAATTAGCCATCCCACCGATAACCAAATGTCCCGCATAAGGT 180
 181 TCTGGAGTTACAAAAGTAATCGATACTTGTCTCTTAATCCCTTTTTTCCCTCAGTACGTAG 240
 241 TCGGCTAATAGCGTAACTCGTAGGCAGGGCCTAAACAACCTCGTTTTTGGTAATGCCCT 300
 301 ACTACTAATGGCCCTGGTGTAAAGAGAAAGTTTTGCCAAGCCTGAAACGCCTTGATTGCA 360
 361 TGATGCGGATTGCATACTGATTGAGTATATCCATCGGGGCCTAAACCAGCTACTGCATCT 420
 421 AATGCCAGTTCCGCACCTGTGGCGATAATTAAGTAATCATAAGTAATACTTTGCTCTCCA 480
 481 AACGATATTTTTTGGTCTTTGAGGATTCAAGTAATCTACTCGCCCTAGTATCCAATTAATA 540
 541 CCCTTTTGGCTTTAGCCGTGGTTGCAGACTCACCTGAATGGACTCTAGGGAAAGTTAAACCC 600
 601 ATTGCTACCAAGGCAATGAAGGAATAAATGTAAGTCAAGGTTTCTGAAATGACCGTA 660
 661 ACTTGATGCTGTTTTGGGAGGATATGCCGTAATTCATAAGCGGTGGGTAAACCACCCAAC 720
 721 CCTGCACCGACGATAACAATGTGAGCCATTGCCGAAAATCTCCGAATATTTGATTGTTGA 780
 781 TTAGCAAAAAATGAAGGTTTGTAGACTGGGGTTTGTGATGTTGTGTGTTTTTTATACTC 840
 841 AATTTTCAAATTCATAGCATAGATTGATTCTGATAATTATTATTTGTCAGCTATCAGAA 900
 901 CTCTTGATGACTTTTAATAAAGCTACAGACTGTAAAACACGAAGTAAGGAAAATAAGAT 960
 961 CCTTTTGGAACTCTCATATATAACTATATAGTAGTATAGTATAGTATAATTTAATGA 1020

1021 AAAGGTGAGAAAAGTTTATGGACGATACCTTAAATCAGCTCAATCCTTCCATGTCCAGGCG 1080
PetC2 ▶ M D D T L N Q L N P S M S R R
1081 GCAACTCCTGAATTTCTTCACTGGGGCTATTGTGGCAGCTACGGCTAGTGC GGCCATATA 1140
Q L L N F F T G A I V A A T A S A A I Y
1141 TCCAGCGACTAAGTTTTTTATGCCTCCAGCCGAAAGTACGGACGCAGAAGGTGGTGTCT 1200
P A T K F F M P P A E S T D A E G G V L
1201 CGCTAAAGACAAAATCGGTCATCCCATCCAGCCAGCCAAAATTTTAGTCCAAGCATCAGG 1260
A K D K I G H P I P A S Q I L V Q A S G
1261 AACACGGGCTTTAATTGCTGGACTAGCTGGCGAGCCTACCTATTTAACTGTTAGGGAAGA 1320
T R A L I A G L A G E P T Y L T V R E D
1321 TGGCACTCTTGATCCGATGGGTATTGTTAATAACTGTACTCATTTGGGTTGTACCTTCCC 1380
G T L D P M G I V N N C T H L G C T F P
1381 TTGGAATCCTGTTGATCAACAGTTTCAATGTCCTTGTACGGTTCACGCTATGATGCCCA 1440
W N P V D Q Q F Q C P C H G S R Y D A Q
1441 AGGTTCCGTAGAACGTGGACCTGCTAACCGTCTCTGAAGTTGGTTCACGTCCAGGTTAA 1500
G S V E R E P A N R P L K L V H V Q V K
1501 AGATGATTACACTTTGGATTTTCATCTTGGCAAGAAACAGACCCCGTACTGGTGAAAAACC 1560
D D Y I W I S S W Q E T D P R T G E K P
1561 TTGGTGGGTTTAAATTTTTTAAAAAGCAAGCTGCTAGAAGATAATTTTTGAAAACATGGCTTA 1620
W W V *
1621 CTGCATTAATCCCCACAAAATAGAAAAAAGCCAGAATATGCAAATATCAAAGATTAAT 1680
NADP-Thioredoxin Reduktase ▶ M Q I S K I N
1681 ATTTCCGGAACGTCTTGACCATGTTTATGATGCAATTATTGTTGGTGGTGGTGCCTGGTGGT 1740
I S E R L D H V Y D A I I V G G G A G G
1741 TTATCTGCTGGAATCTACTTACAAAAGATACCGTCTTTCTAGCCTAATTATTGATAAAGGT 1800
L S A G I Y L Q R Y R L S S L I I D K G
1801 AAGGCTCGTTCTTTCTGGATGCAGGAATTACATAACTATCTAGGATTGCCTCCAGACACT 1860
K A R S F W M Q E L H N Y L G L P D T
1861 CCCGGTCGTGTGTGCTACAACAAGGGAAAAAANCATTATGAATCATTGGCTPGGAGATTTT 1920
P G R V L L Q Q G K K H Y E S L A G D F
1921 TTAAGTCTTACGTTGAAGAGGTTGTGGACGAAGGTGATACTTTTGCTGTGCGAGTGAAA 1980
L T A Y V E E V V D E G D T F A V R V K
1981 GTTGGTCGTCAAAATAGTACTTACTTTGTGTTGCATTCTAAGTATTTGATTGCGGCTAGT 2040
V G R Q N S T Y F V L H S K Y L I A A S
2041 GGCATTATTGACCATCTACCATCTTTAGAAAATATGCAGAATGTTTTTGAATACGCTGGC 2100
G I I D H L P S L E N M Q N V F E Y A G
2101 TATAATTTGCACGTTTGTATGGTTTGTGACGGTTATGAAATGATAGATAAACAGTGC GGC 2160
Y N L H V C M V C D G Y E M I D K Q C G
2161 TTTTTTGACGCTAGTGAAGCTAGTATTGAGGAAATGGTGTTTAATCTGAGTTGGTTTACA 2220
F F A G S E A S I E E M V F N L S W F T
2221 CCTTACATTACTCTTTACTCATGGATTGTTTACTGTAAGTACAGAATTGCGTTCTAAA 2280
P Y I T I F T H G L F T V S T E L R S K
2281 TTACAGCAGTATGGTTATCGCTTAGTGGAAACACCAATTAAGCGGTTTTTAGTCCAGAAT 2340
L Q Q Y G Y R L V E T P I K R F L G Q N
2341 CATCATATGTCAGGTGTGGAATTGGTAGATGGTACGGTAGTTGAGTTAGAAACTGGTTTA 2400
H H M S G V E L V D G T V V E L E T G L
2401 ATCTCAATGGGTTCTCGCTATCACAATACCTATTTGCAAAGAATCGACTTAGAGTTAAAA 2460
I S M G S R Y H N T Y L Q R I D L E L K
2461 GGGGGTAATCTCGTCACAGATAAGATGTGTGCGACCTCCCACCCACGTATTTTTGCCATT 2520
G G N L V T D K M C R T S H P R I F A I
2521 GGTGATCTGAAAAGTTGGTTTAAATCAAGTCGTGATTGCTGCTGGCGATGGTGCCTTAGCT 2580
G D L K V G L N Q V V I A A G D G A L A
2581 GCTACACAGATTTGGCGTG 2599
A T Q I W R X

6.2.4 A. *variabilis* *petC3* (Accession-Nr: AJ311361)

1 TCATAAATTTTTATTTGCTCAAGATAAATCCACCCGTAGTCTTGCTGGTCTACGAGGTC 60

61 TAGTGATAGCAATTCAGTAATTCTGGAAGAACCTCTCCCCAACCCCTCTCCGACGCGGA 120
 121 GAGGGGAGTTTGGCTCCCCCTTCTCACAAGGGAAGGGGGCTGGGGGGTTAAGTTTTTGA 180
 181 TTAATGAATCGATGTTCTAATAGTGAAAAACGAAATATTTAATTTTGTGGCGCAGCCTT 240
 241 CCCGAGGGTATTTTGAATTGATTTATGCTGCTTACACCCGTGTGCAACTTCTCTCAAA 300
 301 CCTAACCCCAAACCCCTTCCCTGTCTTCGACACGCTACGCGAACGCAGGGAAGGGGAGTA 360
 361 AGATTCAAAGCCTCTCTCCGCTTCGGGGAGAGGTTTGGAGAGGGGTTTCAAAAATAAGTT 420
 421 GCACATCGCGCTACTTCAATGAATGACACGCCCGGATGTTTCACTGAAGGTAAGTCTAG 480
 481 AACTAAACCGGGGGGAACTGTAATCTTTTACATTGGCTAAATTTGTCAAGTGGCTTGTG 540
 541 TGAATGTTTATGTAACAATTTTCGATACTTCTAAGGTTATGTTGGGATCTAATGTAATA 600
 601 GTATAAGTAGCTACAGAATTCTAGTATTAATGCTTAAATTAATAATTAACATGCGTTTT 660
 661 CTGCATCACATATACTTAAACAAGTAGCCCAAAATGCCTGTAAAGCATTGCTACACTTTC 720
 721 CATCTCAGTTGTTAGTGAATATGCTCTAATACCTCATTCTAGATTGGTGTGATGAGATT 780
 781 TTACTGACTATTGACTATTGACTATTGACTATAAAAACTATGAAACGTCGGGATTTTATCAA 840

PetC3 ► M K R R D F I N

841 TTGGGTAGGTTTGGGTTGGATAGCAAGTAGTCTTACCTGTAGCGATCGCTGCTTGTCTCTC 900
 W V G L G W I A S S L P V A I A A C S S
 901 CCAGCCTGTAACATCTACAGAGGGGCAAGCGATCGGGACTGTTGCCGAATTAGATAAAAAC 960
 Q P V T S T E G Q A I G T V A E L D K T
 961 TGGTCAATTACTCAACGAAAATTCACCTATTGGCCCCGTTTGGTGGTGGGTACATCGAA 1020
 G Q L L N E N S P I G P V L V V G T S K
 1021 GGACGCAAATCTGATTGCTGTTAATCCTACTTGTAGCCACAAAGGCTGTACTATAGCATG 1080
 D A N L I A V N P T C S H K G C T I A W
 1081 GCAAGCCCAAGCCAAAAAATTTGTCTGCCCATGTGTCATGGCGCAGAATATGGAGTTGATGG 1140
 Q A Q A K K F V C P C H G A E Y G V D G
 1141 TAAAGTGCAGAAAGACCCAGCTACAAAACCACTCAAAACTTACGCCGCAAGATTGAGGG 1200
 K V Q K D P A T K P L K T Y A A K I E G
 1201 TGATTCAGTTGTAGTTAAGCAAAGCTAGTGAAGCAAGCAGAGAGCAGGGAGCAGGGGAA 1260
 D S V V V K Q S *

1261 GAATAAATTTTATTACTTATCACTCCCGACTCAGCACTGGCTAAACGCCGAGCTATGCC 1320
 1321 ACAGGGCTTTTACAGCACTCATAACTTCACCATTCCAAAGGTATTGTGAATAATATCGGTC 1380
 1381 AACTTTTGTAGTACAAGCGCAGGCGGCATAGTGCAGATGATTTGTGATTGGTGAATTAATG 1440
 1441 ATCTGCAACAGTTGATTTTGTAGTGGATAGCAATGAAATAGGTCACTCAGAACAACCTGCTGA 1500
 1501 AATTAGCCCTCTCTATTTTGTAGATGGGAGATTTTTCAGCAACGTTGGGATATTGCCAAGG 1560
 1561 TGTTAGTTTCAATTTGGGAAGTGCACCATCAACCCATTAATTGACATCTTAGAAGATGAAG 1620
 1621 ACGCAGAGGATGAATTGCGCTG 1642

6.2.5 A. *variabilis* *petG* (Accession-Nr: AJ271820)

1 GGTCTGCGCGTATCTAAACTTGATTGAGCTATAAAGTCTCCAAAAAGCTTAAAGGTCTG 60
 61 CCATTTCTTGTAGTGTGGGCTGAAATTTTGGCATTGGTGGTGTATCACCAGCTAATAACTT 120
 121 GGTGAATTAGTCCATACTTGGACTTACGCTTAGAAACTGCTTGTAAAGCTGGGGCCTACTC 180
 181 GGCCATCGGCTTCTAAACCATGACAACCAGCACAATTTATTTGAAAAATAGCGTGTCCCT 240
 241 GTATTGGGCTCTCCTTTTCATGGCAAGAACAACCTTAAACATAAGGGTCAGAGGCTTTCACCA 300
 301 ACTGAACACCAAAAAAGCCCAAAGGATTGCTAGCAGTATCACTAGCGCCACTAAAGCGA 360
 361 TACGCTGAACCAGAAATTCAGGTTTAGTAATCTGGTTATCCAAAAGGTGTGCTGTAAG 420
 421 TCTAGGTTTACTCAAATTTTTCATTTCTACACATAGCTTAAAAGTTCTTGATGATGTCT 480
 481 GCAAGCATGAACTACAGTTTCTCTCCAGGGTTCGCTTAAAAATACTGTAGGAAGCG 540
 541 GGATTCATCCGCAATTTGGTAAAAATCAAAGACGGGAAATAAATAATGAATAATCGTAACA 600
 601 GGAGATTTTAAAGTGGTTGAACCCCTACTTTTTCAGGCATCGTTCTTGGTTTGTGTTGTC 660

PetG ► V V E P L L S G I V L G L I V V

661 ACCCTCTCTGGGCTGTTCTACGCCGCTATAAGCAATACAAGCGCCCAATGAGTTGGGT 720
 T L S G L F Y A A Y K Q Y K R P N E L G
 721 GGTTGAGTATTGGAGTGTGAGTGCTAAAGCGCCTTAGCTACTGGGTGGGGAGTATGAGG 780
 G *

781 AATAAAGTAGATAAAAAATTTCTCTCATCTCCCCAATCCCAATCCAAGGCAAAAGTCAA 840
 841 AAGGCAAAAGTCAAAAAAATCTTCTACCTTTTTACTTTTTACTTTTCTTGTCCCCAATCCC 900
 901 TACCCCTAATTCCTCGCTGCGATAAAAAGTAAGCGCCGTGTTACCGTAGACTTTCTGG 960
 961 CGGCAATTTCCAGTTAGGAATTAATATATCTACCCATCCTTGGGGATTATGTTTCGATC 1020

1021 GCTATTTCCCACTTGGATCTAATAATTGATAAAGAGCGATCGCCTCTAGCACTGGCTGA 1080
 1081 TATAATCCACTAGCATAGGGTGGGTCAAATAAATTCTGTCTGAATTGCTGCCCTGATAAG 1140
 1141 TTTTTTAATTGCTGAAGGACATCTCCGCGCAATACTCGCCATTTTTGTTCGTTATTGGCT 1200
 1201 ATGCGCTGCCAGTTTTCTTGATAATTGCACAGGCTCGGCTTGATTTTTCAATCCGACC 1260
 1261 ACCAAGCTAGC 1271

6.2.6 A. *variabilis* *petM* (Accession-Nr: AJ299220)

1 TCCCAGTTGTCCCTTGTTCGCCACTGTGGGGATTTAAACCAGCGATCGCAATTCTCCCACT 60
 61 AGTGATGCCAAAATCTTTCTCTAAACACTCCACCAACAAATCTAATTTTTGCGTCAGCAA 120
 121 TGGCGGTGTTAGTGTATCCGCCACTTGACGTAAAGGTATATGGGTAGTTGCGAGTAAGGC 180
 181 TCTCAGTGTCCAACAGTGTGAGGCGATCGCGCGACAAATAACATCCCAAAGCGATCAAC 240
 241 ACCAGACTTTTCAGCTAGCAGTTCCGTTTGTCTGGGTAATTATAGCCTGCGGCTTTCCA 300
 301 TGCAGATTTAGCTATGGGGCCAGTCACAATTCATCAAATTCACCCGCTAGGGTTTGGGC 360
 361 GATCGCATATTCATATAAGTGAAACTGGCTGCACCACTAGCCGCGTTACCAGTTCCTAC 420
 421 ATTTATCTGTCCCGCAATTTCTTGATCAATAGTTACATCAATGATTTTTAATAAATTAGG 480
 481 ATCAGCCAAAGGCGCTAAATTTTCAGTCAAGCTTAGTTGTTGATACGTCCTTTATGAGTAA 540
 541 ATTTTTATTACCTACTACAGTTAAGTCATAGTGATGACCGATTTCTAAATCAGCCAAAGC 600
 601 TTTTAAAATCACTTCTGTCCCGATTCCGCCAGGATCTCCCACTGTTAGAGCTAAACGTGG 660
 661 GCGATATTTTTCAGGTGTATTTACTGTCTGATTTTGATTTAATTGGTACATATAAGTACT 720
 721 TTAGAGAAGAATTTTTGCTTGATTCCATCTCCCAATAGTAGGGATTGACTATCAAACCTA 780
 781 GTTTAAAATTGTTTACACAGGTCTAATCCAAATACAAGGGGCTAGGGATTAGAGGCTAGA 840
 841 AGAAGCAGGAGGCGAGAGAAGCAGATGAGGGAGAATGAACAAATTATCATTCAATACTCA 900
 901 TTACTCAGCACTCATGAATTAGCACTTCTGACTCCTGTGCCTGGATAAGACCAAAAAATC 960
 961 AAAATTTATTTCGTCAAGGAGAATCACATTAATGAGCGGCGAACTTCTGAATGCAGCTTT 1020
PetM ► M S G E L L N A A L
 1021 GTTATCTTTTCGGCTTAATCTTCGTAGGTTGGGCTTTGGGTGCTTTACTATTGAAAATCCA 1080
 L S F G L I F V G W A L G A L L L K I Q
 1081 AGGCGCAGAAGAATAATTTATCCGTATTTGCCTGCTTTCAACAGATGAGAAGC 1133
 G A E E *

6.2.7 A. *variabilis* *petN* (Accession-Nr: AJ271821)

1 ACCCAACCGATTTGGATAGCCAGATCAAGAGCGATCGCCGCCGTGCGAAACCACAATATG 60
 61 CTTTCACCAGCCATGACTGCAAAAGGTAAGACTGTGTTGCTGCTATTCCACCCCATTTCT 120
 121 AGCTGAGTTAAACCCCGCACCAAAACCAAAAGCCATCACAGCACCGTCTTTCAGATGAGAA 180
 181 TTTTTATCTGTGCGGATAATATAGCGGTAAGTAATACCGAATAATACACCAGAGAAACCA 240
 241 GCGATCGTCCAGTAAACAACCAAGGCCAATTAACATGTATTTGCGACTTAAGAGCGAG 300
 301 GAAAAATACTTCGCCAAAACAGAGTATTACAGCAACTAGTGATGATAAAAAGCCAAACCC 360
 361 AGCGAAAATCCGCCGATTATACCAGCCTTAATGGATTCTATCCGTTACGCCATTACTTGC 420
 421 CCATCGAAAATCTATTCATGATAAATTTGATTCCAGCAGCGTTCAACTAGAGATGA 480
 481 AACATGAGAAAAATGCCCAATACCCAATCCCTAGTACCCAGTCCCAGTATGATAAATAG 540
 541 TAGAGACATTTTGTAAATAATTTCCAAAAGAGAGACTATGGCGATTTTGACACTTGGTTGG 600
PetN ► M A I L T L G W
 601 GTATCACTGTTAGTTGTGTTTACTTGGTTCGATTGCGATGGTAGTTTGGGGACGTAACGGA 660
 V S L L V V F T W S I A M V V W G R N G
 661 CTGTAGGGGAATTGTGAAAAGTCCATTCCCTAAGTATTTTGGCTCTAGTCGCCTTAGTGCT 720
 L *
 721 GTTACTATC 729

6.3 Sequenzen der Gene von *Anabaena* sp. PCC 7120 und flankierender Bereiche

6.3.1 *Anabaena* PCC 7120 *petBD*-Operon (Accession-Nr: AJ319645)

1 CCATTGAGGCATTGGCATTGAATTGAGTGAGGCGAAGATAGCCGAAAGACTTACCTTCGG 60
 61 GGGATGAGCGTAATTTCTGCCACAACAGGGTTAAGAGCGATGCGATCGCGCCTATTCTGA 120
 121 TTTCTTTTTCCCTTCTCCGTCACGTTCAATTACAAGCGTGACTAAACTACCTATGGGGC 180
 181 CGCGCATCCTCGTGGCTGCTTCATCGAGAGTCAAATCCGTTGTGAAATTCCTTCAATTT 240

241 TCACAATGCGATCGCGTGGTTTAAATACCCGCTTGATCTGCCGGCGAACCCGCAATAGGAG 300
 301 AAACCACTTCCAATTTTCCACTCTGGGGATTTAAGGCGATTTGTAAACCCACTCCGGTCA 360
 361 GTTCTCCAGAAGTATTAACCTGTAAACTGCGGTATTGCTCAGGGTCTAAAAACCTCGTAA 420
 421 AAGGATCACCTAAAGTCTTGAGCATATTCTGAATCGCCCCATAAGCAGCTTTATGGTCTG 480
 481 TCAGGGGCTTTTCCAATGCCTTCTGTCTCACATTTGCCCAATTTTGATGGTTAAACGTCT 540
 541 CATCTAGATAAGAGCGATTGACAATTCGCCACACTTCTGAAACTAGTTTCTGTTCCCTCCG 600
 601 TCAATGCTGTGGCTGGTTGAACTACTATTCTACAGCCAAACTCAAAGCCACCAATAGCG 660
 661 AAAATCCTAGCCGAAAAAACTGTTTTTGCATGAACCCCATTTGCAGTTTTACCTCAACCG 720
 721 AAATTGCCTAGAATTGCCAGTCGCATGATCATTAAATGAAATCTATCTCTCGACTATGTT 780
 781 ACTTTTTTTTATAGAAGTGGTGCATTATTCTCATCAAGTTGTTAAGGCATCTGATATTAGT 840
 841 GCATCCCTTTACCAAAGGATTATGATCTACTTTGTACCCACCAATAGAGTTGGCTTGC 900
 901 AAAGAGAACGCAATATATTCCATATTTACAGAGTGTTAAGTTTGTGAAAACCTTTGACAT 960
 961 TCTGCAAGAGTTAAAAACAGACGAAAAACTCCTCTTAAAAGAAAATCCCAAATTTGCCAA 1020
 1021 TTGGGAGATTGAATCAAACGCAACCGATTTTGTAGAACTTGAGATTGTATGGCCAACGTT 1080

PetB ► M A N V

1081 TACGACTGGTTTGAGGAACGCTTGAAATCCAAGCAATTGCTGAAGATGTCACAAGCAAA 1140
 Y D W F E E R L E I Q A I A E D V T S K
 1141 TACGTCCCTCCCCACGTCAACATCTTCTACTGCTTGGGTGGTATTACCCTAGTTTGCTTT 1200
 Y V P P H V N I F Y C L G G I T L V C F
 1201 CTAATCCAGTTTGGCACTGGATTTCGCTATGACGTTCTATTACAAGCCAACAGTTGCTGAA 1260
 L I Q F A T G F A M T F Y Y K P T V A E
 1261 GCTTACTCCTCCGTTCAATACATTATGAACGAGGTAAACTTCGGTTGGCTAATTCGCTCC 1320
 A Y S S V Q Y I M N E V N F G W L I R S
 1321 ATCCATCGCTGGTCTGCCAGCATGATGGTGTGATGATGATTCTCCACGTCTTCCGCGTC 1380
 I H R W S A S M M V L M M I L H V F R V
 1381 TACCTAACTGGTGGTTTCAAAAAGCCCCGTGAATTAACCTGGGTAAGTGGTGTGATCCTC 1440
 Y L T G G F K K P R E L T W V S G V I L
 1441 GCTGTAATTACCGTTTCTTTTCGGTGTACAGGCTATTCTCTACCTGGGATCAAGTAGGT 1500
 A V I T V S F G V T G Y S L P W D Q V G
 1501 TACTGGGCTGTGAAAAATCGTTAGTGGTGTACCAGAAGCGATTCCCTGTAGTCGGTGTACTC 1560
 Y W A V K I V S G V P E A I P V V G V L
 1561 ATCTCCGACCTACTGCGTGGTGGTTCCAGTGTGGTCAAGCAACCCTGACCCGCTACTAC 1620
 I S D L L R G G S S V G Q A T L T R Y Y
 1621 AGCGCCACACATTTGTACTACCTTGGTTGATTGCAGTATTTATGCTGTTCCACTTCTTG 1680
 S A H T F V L P W L I A V F M L F H F L
 1681 ATGATCCGCAAGCAAGGTATTTCCGGGCCTTTGTAATCCAGCAACTAGTTTTTCAGAGCCA 1740
 M I R K Q G I S G P L *
 1741 GTAGTTTGTTTTAACTGATGAAAAATCAGCAATTAAGACTCATAACTCAAAAAACTAGT 1800
 1801 ATCTGAAACTCAACGCTGTCAAAAAACCTCAATAAAGGTTTGATCAAGGCTTTAACTGAA 1860
 1861 TTTTAAGCAGGAGAGCGCATTCAAAAATGGCTACACACAAAAAACCCGATCTGAGCGATC 1920

PetD ► M A T H K K P D L S D P

1921 CTACGTTAAGAGCTAAACTCGCCAAAAGGCATGGGTCACTACTACGGCGAACCAGCTT 1980
 T L R A K L A K G M G H N Y Y G E P A W
 1981 GGCCCAACGACTTGCTGTATGTATTCCCAATTGTAATTATGGGTTTCATTGCTTGTATCG 2040
 P N D L L Y V F P I V I M G S F A C I V
 2041 TGGCTCTAGCCGTA TAGACCCCGCCATGACAGGCGAACCAGCAAATCCTTTTCGCTACAC 2100
 A L A V L D P A M T G E P A N P F A T P
 2101 CACTGGAAATTTTACCAGAGTGGTATTTGTACCCAGTATTCCAAATTTTTCGATCGCTTC 2160
 L E I L P E W Y L Y P V F Q I L R S L P
 2161 CTAACAAATTTGGGAGTATTAGCAATTGGCTTCCGTACCCTTGGGACTAATCCTCGTT 2220
 N K L L G V L A M A S V P L G L I L V P
 2221 CCTTCATTGAGAACGTCACAAGTTCCAAAACCCCTTCCGTCGTCAGTTGCAACCACAG 2280
 F I E N V N K F Q N P F R R P V A T T V
 2281 TGTTCCTTTGGAACCTTGGTAACTCTGTGGTTGGGATTGGTGTGCGTTACCATTAG 2340
 F L F G T L V T L W L G I G A A L P L D
 2341 ACAATCTTTGACCTTAGGATTGTTCTAAGCTAGTCACCTAGAAGCTTCTTGACACCTGT 2400
 K S L T L G L F *
 2401 AGGTTTCAGGAGCGTATATCTGGAAGTTATGATGTCTAATGACAAGTCACCCTTAAGGTG 2460

2461 TACGTAGTCGAAAATGCCATTCATATCAAGGATATGCGCTCTTGAAAACACCACACAGGT 2520
 2521 GTCAATTTTAGTGTAGAGGGGGTGTGAGATGTAGTTCCTAGTGTGACCAATGACTAA 2580
 2581 TGACCAAATTAATTTTAGCTTTGGATACAAAAATCATCCAAAACTAAAATAGACTG 2640
 2641 AAGACGATAGATTACATAAAATCTTACTCATAATTACATGAAAGCTACGGTCAATGCCT 2700
 2701 GGCATAATGCAGCACGCCATCTAACAATTAAGAGCGAACTAAAGCTCCTTAACCAAGTA 2760
 2761 CAACAATGGTTTGAGGACTTTTCCCTAAAATACCTGTCTCAACTCGGCTGGACAGAAGGT 2820
 2821 CAACTTTATCGCCTCAACTTAGCACTAGCAGAGGGCTTTACCAATGCAGTTCGTCATGCA 2880
 2881 CATCGTGCCTTACCGCCAGAAAACGACCATAGAAATTGAGGTGAGCCTATGGATTAACAAA 2940
 2941 ATAGAAATTAGAAATTTGGGATCATGGCAATCCGTTTGATCCTGATGCGATCGCTGAACCA 3000
 3001 GTACCAGTACTCTACAAGTGGGAGGCTATGGCTGGTTTCTCCTCCGGCGCTTGGCTGAC 3060
 3061 CGTGTGGTCTACGAACGTAGCGAGGATGGTAGAAATTGTTTAGTCATAGTTAAGTATGCC 3120
 3121 AAGGAAGGACAATATTAGGGGAGTGAGGGGAAGATGAGTAGAAATTTTGTAGAGACTT 3180
 3181 CCAGATAAAAAAATATGCAAGATGTAGGGTGCCTGAGTGTGACAGAACCACCCTAGCAAA 3240
 3241 CTTCAATTAACCGAGTAGGGTGCTTTAACTTAAAGCATTTTTGTATAAAAAATTTACT 3300
 3301 TGTAGCAGTAGAGTTAGCATACGAGTTGCTGTTAATACTTTGTTAAAATTAGGCAAAAT 3360
 3361 ATTGTAGTGGGAAGTCGAATTGAGATGTTTATAAGTAGA 3400

6.3.2 *Anabaena* PCC 7120 *petC1A*-Operon (Accession-Nr: AJ319646)

1 AGATATTGATTCTCCCGATGAGTTGCCTGGTGAAGTCGAAATGTCTCTATTTCGACCACCT 60
 61 AGAAGAATTAAGACAGCGCATCTTTTATTCACTGATTGCCGTAGCAGTGGGTGTAGTTGG 120
 121 CTGCTTCTTCGCTGTCAAGCCAATTGTTTCACTACTAGAAAGTCCCAGCCCAAGGTGTTAA 180
 181 ATTTCTCCAGTTAGCCCCGGAGAATATTTCTTTGTTTCTCTCAAAGTTGCAGGCTACAC 240
 241 TGGCTTGTACTTTCTAGTCCCTTCATTCTCTACCAAATTAATTTGTTTGTCTTCCTGG 300
 301 ATTGACTCGGCGCGAACGTGGTCTACTTGGGCCTATTGTTTTAGGGTCAAGCGTGCCTGT 360
 361 TGCCGGCGGTTTAGTCTTTGCTTATTTACTTTTGATTCCCAGCCGCTTTGAATTTTTTCAT 420
 421 CAGTTACGGCGCGGATGTTGTGGAACAACCTCTGGTCTATCGACAAATATTTTGAATTTGT 480
 481 ACTATTGCTTTTATTTAGTACTGGGTTGGCTTTCCAAGTTCCCATAAATCAACTTTTACT 540
 541 AGCTAATTTAGGGATTGTTTCATCCCAAGAATGGTTTTCTGGCTGGCGATTGTGAATTTAT 600
 601 GGCAGCCGTAGTTTTAGGTGCTGTACTTACACCTTCTACTGACCCTTAACTCAAAGTCT 660
 661 TTTGGCGGGCGCGGTGCTTGCCCTTTACTTTGGTGGTATTGGTGTAGTGAAGCTCACAGG 720
 721 TAAATGAAAAACCTGCGACGGGAGAATTGAGAAGTCAGGATATATCAGGTTTTGATATCT 780
 781 TCGTTTTAGTATTTTGAAGAAAAACAAAACTACGAGGATTTCTTGATTTTATATCATTTT 840
 841 TAATCTGATTTCTGAATTCCTACCTCGCTTGAATCCCAACTGAAAAAGTTAATAAAAT 900
 901 TAGTAATGAAACCTTAGAAAAAGTTGAGATTTCGTATTAGCAAAGTGATTAATGTAGAGG 960
 961 AATTTTCTAAAGCACGAAAACCAGCATACGAACTATAGATAGGTTTTGGTGATTTGGGCA 1020
 1021 TAAAAAATCTAGCGCCCAAATTAACAACCTTTATCAGTCAAAAGATAATATCAATCAAT 1080
 1081 AGATTAATATTTATCTGTGACTAATTTTTCCCATGTGAGATAGCTGATTTTCTATCTGAA 1140
 1141 GTTTTTGTGTTAGTGGTATTTTTAAATGATGATGAAGTTGCTTTAACTCAGCCAGATATA 1200
 1201 GGACTCATACTTGATTTTTGAAATACACGTAGGGGAGCCACTGCGTTGGACGGGTTTCCC 1260
 1261 GCTTGGAGCAAGTGGCGTTGGGCAATGCCACCGGCTCATGTTTTGGTGGGCATTGCC 1320
 1321 CACCCTGCAGATACTGAGAATTTTATGCGTAAGCGCAGGCTACGCCAACAGAAATCAAAT 1380
 1381 CGGACTCCTATAGAGATGTCCCTTTAGGTAAGAGAGTTTTATAGCCTGTAGCCGAAATTA 1440
 1441 TAAAAAATTTATTTAGGACTCCTTAATAATCACCACTTTCTAATCTTAATCTTTCAGATA 1500
 1501 ATCCATTCAGAAGCACGTTACCTAAATCTAGAGGTATGCTCACAGCTTTACCGAGTCGC 1560
 1561 GGGCGCTCTTTGGTTTGTGTAATAAATGTTTTACCTGGACTGCACCGCCTAAAGCATGA 1620
 1621 AGGTAATTGGCGACACTATCAAGATGTTCTTGATATTCCGTTTTATTTCATAGGAAAAGAA 1680
 1681 GCTTGCTCCAAATATTTCCACATTAATTTGCAAAAATATCTTGCTTGTGTCCGGCGAAAC 1740
 1741 TGGACATCATAAGAGTATCCCCATTTATCCAGCAATAGTTGGCGTAATTCCTGTCTGTCT 1800
 1801 ATAGTTTTTCTCAACCAGATTTTACATTTAGTTATGACGTTAAGTTCCGTAACCTCAAGTA 1860
 1861 TGATAAGGATATAAAGAAATGTAATGCTAACAGAAAGGATGCGAGATATATCTTGAAACA 1920
 1921 AAGAATAACAGCATCGTTACAAGCGTTAGCATTTCAACCAGACAGGAGTTGCTCAAGCAT 1980
 1981 TTAGCGCTCTTGTGCAATGCTTAACAAAAATACACGAAGAGCGGTAGATTATGGCTCAAT 2040

PetC1 ► M A Q F

2041 TTTCTGAATCCGTAGACGTTCCCGATATGGGGCGACGTGAGTTCATGAACCTGCTAACTT 2100
 S E S V D V P D M G R R Q F M N L L T F
 2101 TTGGAACCGTTACTGGTGTGGCTCTGGGTGCATTGTATCCCGTTGTCAATTACTTTATTC 2160
 G T V T G V A L G A L Y P V V N Y F I P

2161 CACCTGCTGCTGGTGGCGCTGGTGGCGGTACAACAGCAAAAGACGAGCTGGGCAACGATG 2220
 P A A G G A G G G T T A K D E L G N D V
 2221 TTAGCGTCAGCAAATTTTGTAGAAAGCCATAATGTAGGCGATCGCACTCTAGTTCAAGGAC 2280
 S V S K F L E S H N V G D R T L V Q G L
 2281 TCAAGGGTGACCCACCTATATCGTGGTAGAAAGCAAAGAAGCCATCACAGATTACGGCA 2340
 K G D P T Y I V V E S K E A I T D Y G I
 2341 TCAACGCCGTTTGCACCCACTTGGGTTGTGTGCTCCCTGGAACGCGGCAGAAAACAAAT 2400
 N A V C T H L G C V V P W N A A E N K F
 2401 TTAAATGCCCTTGCACGGTTCCCAATACGATGCAACTGGTAAGGTTGTTCCGCGTCCAG 2460
 K C P C H G S Q Y D A T G K V V R G P A
 2461 CACCAAAGTCTCTGGCTTTGAGTCACGCTAAAACCGAAAACGACAAAATCGTTTTAACTT 2520
 P K S L A L S H A K T E N D K I V L T S
 2521 CTTGGACTGAAACCGACTTCCGCACCCGGTGAAGAACCCTGGTGGTCTTAATGATTTGTTT 2580
 W T E T D F R T G E E P W W S *
 2581 TGTGTCAGTAGTCAGTTGTTAGTTGTGAATTTGCCACTGACCACTGACCACTGACCACTG 2640
 2641 ACTATTGACTCTTGACTAAATTCATCGTTGCCCTATAGAGATGAGAAATGCTTGTACA 2700
PetA ► M R N A C T
 2701 AGAGCGAGGTTAACTCGCACTGCTAGAGCGATGGTAAAAACATTGTTTCATAGCGATCGCC 2760
 R A R L T R T A R A M V K T L F I A I A
 2761 AGCGTGACATTTTCTTACCAGCGACTTAGCCCTTCCCAATCAGCTGCTGCATATCCT 2820
 S V T F F F T S D L A L P Q S A A A Y P
 2821 TTCTGGGCGCAGCAAACCTTACCAGAAACCCCCCGGAACCGACAGGTAGAATTGTTTGC 2880
 F W A Q Q T Y P E T P R E P T G R I V C
 2881 GCTAACTGTCACCTAGCAGCAAAGCCACAGAAGTAGAAGTTCCTCAATCCGTACTACCC 2940
 A N C H L A A K P T E V E V P Q S V L P
 2941 GACACCGTATTTAAAGCAGTTGTCAAATCCCTTACGACACCAGCGTGAACAAGTTGGT 3000
 D T V F K A V V K I P Y D T S V Q Q V G
 3001 GCTGTVGCTCTAAGGTCGGCTTAAACGTCCGGTGTACTGATGTTACCCGAAGGCTTC 3060
 A D G S K V G L N V G A V L M L P E G F
 3061 AAGATTGCTCCTGAAGACCGCATTCCCGAAGAAGTGAAGAAGAAATCGGCGATGTTTAC 3120
 K I A P E D R I P E E L K E E I G D V Y
 3121 TTCCAACCCTACGGCGAAGATAAAGACAACATCGTCATTGTGCGGCCTTTACCCGGTGAA 3180
 F Q P Y G E D K D N I V I V G P L P G E
 3181 CAGTATCAGGAAATCGTCTTCCCTGTTCTTTCTCCCAACCCCGCCAACGACAAGAACATT 3240
 Q Y Q E I V F P V L S P N P A N D K N I
 3241 CACTTCGGTAAATATTCAGTTTCATGTTGGTGGCAACCGGGGACGCGGACAAGTTTATCCT 3300
 H F G K Y S V H V G G N R G R G Q V Y P
 3301 ACAGGTGAAAAGAGCAACAACAACCTTTATAGCGCTGCTGCTACCGGTACAATTAGCAAG 3360
 T T G E K S N N N L Y S A A T G T I S K
 3361 ATTGCTAAACAAGAAGCGAAGATGAGTACGGTAAATATTTAGTAGACATCAAAAACGAG 3420
 I A K Q E G E D G S V K Y L V D I K T E
 3421 TCTGGAGAGGTTGTCAGCGACACTATTTCCCGCAGGCCCAGAAGTATTGTTTCTGAAGGA 3480
 S G E V V S D T I P A G P E L I V S E G
 3481 CAAGCAGTGACAGCAGGCGACGCTTTGACCAATAACCCTAACGTTGGTGGTTCGGTCAA 3540
 Q A V T A G D A L T N N P N V G G F G Q
 3541 CTAGACGCAGAAATGTTCTCCAAGATGCTAATAGAGTTGGCTGGTTGATTGCTTTCGTT 3600
 L D A E I V L Q D A N R V G W L I A F V
 3601 GCTCTGGTGTGTTAGCTCAAGTCATGCTAGTTCTGAAGAAGAAGCAGGTGGAAAAAGTC 3660
 A L V M L A Q V M L V L K K K Q V E K V
 3661 CAAGCTGCGGAAATGAATTTCTAAATTTCTGATAAATCAATACTTTTAAGACAGGCTAC 3720
 Q A A E M N F *
 3721 AGCCTGTCTTTTTTATTCTTAAAGTCCCTGAAGAAGCAAGTTTACAGTCAAACAAGAAA 3780
 3781 GATGCTTTTCTCCCCCTGCTCTTTCAAGCTAGAGGTGGGAAATACCCTACCGACTGATC 3840
 3841 GGTATGCACACCTCTAAAAGTATTGCAAATTTTGTGCAATAAAGTTATATTTATTTACA 3900
 3901 TAAAGTTACATAAATATAAAAAAGAGGTTTGTGATGGCTATCTTATTTGCAGTATTACTT 3960
 3961 TTAGGTTGGGTTGCAGCTTCGGTTATAGGTTCTCTAGCCTACTTCCCTGGGAGAACAGAAA 4020
 4021 AAGCCCATCCATGAGCGCAACTGGCGTTCTGAGTCTTTTGAGAAGTTGGCGAAATCGATT 4080
 4081 ACTGGTATGGAAATAGATTACAGCGATCGCGCTCCTGCTTATGCGATGGATGCTTACACC 4140

4141 AGCCGGACTCTGCCCAATAGCAGTAAAATGCTTACACCCATACAAATAAAACCCCAAT 4200
 4201 CGTTGATATTGGGGGTTTTGCTTTTCATGACAAAAAGGAAGTCCGAGGCTAACCAAGAG 4260
 4261 ATGAAATTGATTCACTCACAACCTCAGCACTCCTTACAAAGGACGGTAAACCCGATAATTA 4320
 4321 ATATTGGGGAAAAATGTTATCCATTACCTCGACTTTTTCTAACCAACCCTGTCAAACCTG 4380
 4381 CCGACTTTGGCGTCTTCGTATAGCTTATTAACGCGCATGAGGTGCGATCTCGTCCGTCTC 4440
 4441 ACAGCATAAGGAACCATGTTCCCGTCCGCATAATAAATGCCAGTCAGAAGATTGTGCC 4500
 4501 AACAGCAGTTCTCTTGCTGCTTGGTTAAGCGCCCTCCATCCCAACTCATCTTCTGGTTCT 4560
 4561 AGGGTAGATATTTCGATCATGCGTTCAGCCGCTTTGTGCAAATGTGGATAAATCCAAGCA 4620
 4621 TTTGTTTTCATTTAACCAATATTCATGGAAACCCTTATAACCCAGCTTGATTGGGAAGGA 4680
 4681 CGACAGACTTGTGTGTAGG 4700

6.3.3 *Anabaena* PCC 7120 *petC2* (Accession-Nr: AJ319647)

1 CAAAGCATCGGTAAAAGCGACTTCTAGACGTTTCGTTAATGACTTCGGCTACAGCTCTACC 60
 61 GACAAAAAAGCCTGTACAAGGGGGTACTCATAAATTTTTGTTACGCTCATCCGCAAGA 120
 121 GAATTATAACTTGCCCGTATGCTTTGCGGCTTCCTTCTGACAGCGTGCTGTTAGGTTTAT 180
 181 TTAGTTTTACGTTTTGCCATCTAGCAATTGTAACCTGTATAGATATATAATCAGCCAATGA 240
 241 TAGATATTGTATTAAATATTAATAAAGCTGAAATTTTTATCTCTTTTTTGTGGCCAACCT 300
 301 AATTAAGAGAATCGCGTAGCCTATTGTAGGCGATCGCCTGTTTTTTCCAAAATGATAAAA 360
 361 TAAACCCAGAAAATAGTGGAAACAAGCTGAGGAGAGGGCAGAATGTTGGCTACCAAACCTG 420
 421 CGAGAGTTAAGTTCAATATTGATCCACATACGATATAAATTACTCACTATTTTTGATTGA 480
 481 CAAAATCTCCATTTTTTTTACATATGGAGACCGGCCATCAGCATAGTGCAGGGGACACGC 540
 541 TCTAATAACAACCTACACAACGTTGGAAAGCAGGAAGATGGTGATTTTGGAAACATAGC 600
 601 GAAGTTGAGTAAAAGCATCTCGTAAATCAGGTTCTTGCACAAATTCTAAAAAGCAGTCAT 660
 661 ACATCTGGACATTGGCTATTTCTGATTCCACTCCTGCTTGACAGGCAGCTTGGAGAGTGT 720
 721 CAGGGGCTTGGACGTTTCCATAAAAATTATCAGGAGGAATCGGCAATCCGTATCTGGTAA 780
 781 ATAGATGACTCCACAAAAGAAACGTGTCTATCCTCGGCGTGAACAATATTACTAAAAGGAC 840
 841 GCACTTCGCCAAATTTGTTGATTACTGCTGTGTGTAATAAAGCAGCAGCATAAATTCATCGT 900
 901 TGATGGCATCAATCATTCGCTGTTTCGTTTTGGCATTAACTCGGTATGAGGATTAATAAAG 960
 961 CAGAAGTTGGTCTAGTGGTAGTATTGGCGCATCGCTACACCACACATACCACTTTTACCTT 1020
 1021 TATGATTTAATCTAAATATTTGATGATGTGCGCGCGGTTTTCTTGACAATTCATAATTG 1080
 1081 ATTCCTCATTTCTCATCTCTATATTCTTTAATAATTCTCTTGGCTGATATTTCTACTACT 1140
 1141 CTTTACTGCCAGAGGCGCAACTAAAGACAGTCCCAATAATTTCAAAGCTAGTTTTTCAA 1200
 1201 CCAAGGTACAGCAGTCCCGAAGCGCATTTTAGCTAGAAAATACCTTTCAAATGCGGCTTT 1260
 1261 AGCCCAAGTTACCCAAGCACCCTCAACGCTACAGCTCGCCGACGTTTTCTGTGGCTAA 1320
 1321 ATCTGGTAACACGGGTTAGCGAGAAAATAAAATTCCTGAATTACCAAAGTCAGCAAAGCA 1380
 1381 AATGGCATCAAGTGTGGAGTCACAGGCGGAGCAGAAAATACTCCCAATTCATGGCAAT 1440
 1441 ATTATGGGCTACTGCCATGCCATTGCTTCTGTCAATTTGTCCAGTTTTGGGTACTCCCAA 1500
 1501 GGGGAGAGGTGTACCTCTGATGGTTAATTTCTACTACAACCTCCACCGCATAAATTGA 1560
 1561 GCATATTCAGGATGTCTGTATGTAGGCAATACTGGAATAAAACCATCCTGATTACTTAA 1620
 1621 TCCTGGTACTTGCCGACAAAGCGGCCCCCGAAGGGTGGGAGTAGCATTGAGTAAG 1680
 1681 AAATGGTAATACTCTGCCATTTCCAGATGAATCTGATTTGCCTCAATTGCTGTAACCTGC 1740
 1741 TACGTTTTCAATAACCTCTACCCCTCGTTCTGCCATGAATTTTGTCACTAACTCGGCAGA 1800
 1801 ATTAGCCATCCACCTATAACCAAGTGTCTGCGTAAGGTTCTGGAGTCACAAAAGTAAT 1860
 1861 TGATACTTGCTCTCTTAATCCCTGTTTCTGAGTACGTAGTCAGCTAATAGCGTAACTC 1920
 1921 GTAGGCAGGGCCTAAACAACCTCGTTTTTGGTAATGCCCTACTACTAATGGCCCTGGTGC 1980
 1981 TAAGAGAAAGTTTTGCAAGCCTGAAACGCCTTGATTGCATGATGCGGATTGCATACTGA 2040
 2041 TTGAGTATATCCATCGGGCCTAAACCAGCTACTGCATCTAATGCCAGTTCGCGACCTGT 2100
 2101 GGCAATAAATTAAGTAATCGTAACATAACTTTGCTCTCCAAGCGATATCTTTTGGTTTTG 2160
 2161 AGGATTCAGTAATCTACTCGCCCTAGTATCCAATTAATGCCCTTTTGTCTTAGCCGTTG 2220
 2221 TTGCAGACTAACCTGAATTGACTCTAGGGAAGTTAAACCCATTGCTACCCAAGGCAATGA 2280
 2281 AGGAATAAATGTAAGTAAGGGGTTTCTGAAATGACGGTAACTTGATGCTGTTTGGGGAG 2340
 2341 GATATGCCGTAATTCATAAGCGGTGGGTAAACCAACCCTGCACCGACGATAACAAT 2400
 2401 GTGAGCCATTGCAGGAAATCTCCGAATATTTGATTGTTGATTAGCAAAAATGAAGGTTGA 2460
 2461 GAGACTGGGGTTTTGTGATGTGCTGTGTTTTTTATACTCGATTTTCAAATTCCTTAGCA 2520
 2521 TAGATTGATTCTGCTCATTATATTTGTCCGCTATCAGAACTCTTGTATAGCTGTTAATG 2580
 2581 AAGCTACAGACTGTAAAAACGAAGTAAGGAAAATAAAATTTCTTTCGGATTTTCCCATCA 2640

4321 CTCGAAGTCGCGCGAGGTTCAAATCTCTCCCACAGCTTATCTCTGAGTGAGTATCTACCCG 4380
 ←-----
 Haarnadelschleife
 4381 TCATCTTTTTCCCGTTGTTTATCCTAGATTTTCGCAGTTTTAATCTCAGCTTACCTAATTG 4440
 4441 ATGACACACCCTAGTGCTTTACTCAATAATTCTCTGTGCATAAAAAGCGCCTTCTACTAAG 4500
 4501 GTTGTGATTTTCTCAGATGCTAAAGTTGAACGTTAGTGTAAAACTCTATCCATGTTTTA 4560
 4561 CTAATGACATTTGCGTTATCTGGTAAATTTACTAAATCCCATCCGGGTATTGCCAAATCT 4620
 4621 TCCATCAAACGATTTATTTTGGGGTCATAACTCAAGGCAAAACAGCGACAACCTTCACTT 4680
 4681 GCTGCCATAATTAAACTGTGTAGCCTCATGCCGATCGCCATTTCAACGCCACGAAATACG 4740
 4741 CCTTTTAAAATCTGCGGGTCTTCTATACAGAAAATTTTCGCTAACATCTTTTAAATTTGTTG 4800
 4801 TGTATTGCTTGGGGCGATCGCTAAATCTTCGCTTTTTTTGAAATGGTAGTAATAAAAATAAA 4860
 4861 GGCTTGGGTAGATTTTTGCAGATTACCAAGGCTTGAGTTAAGTTAGCTAACCTTGCTGC 4920
 4921 TGTTAACTGCGGATGGTTTCTTAAGGTGACAGCAATTCTAGGGGTGGGTAAATCGGCAAG 4980
 4981 TTCTGGAAATGGTTTTGCCTGTAGCGCCAAACTGGGTCTGGTGAAGGATATGGGGAAAT 5040
 5041 CTGCCAATCAGCTAATAATGCAGCACTCACGCGATCGCGTACACTAACTTTTGTACAACC 5100
 5101 AGTAAAATTCGTGTGTGCTAACCAGCGAGTCTGGGGACGCACTAGGGGGCCAATCCCTTG 5160
 5161 CGCCCAAGCCACAGTCTTTAAACCTATTTTGGGCTAACGCCATCAGTCCCCCATAGTA 5220
 5221 AAAAGACTAATACTGCTGGTGACATCTGAATTTAGACTCCCACCACCCAAATAAAAGC 5280
 5281 ATCACAAGAACGTAAAGCTGGCAACACAGATGTGAGAGACATCCGATTGTGAGATTCTAC 5340
 5341 ACCATAGCGATCGCTGGTTTCTCTGGATTACCAGACAGCACCACAGGTGTAACATGAGA 5400
 5401 TGGTAACATTTGCAGCAGTGTGGCAATAAAGCTTCGTACCACCATTTCTTTACCGTA 5460
 5461 ATACCCAGATAATAATGCCCGCATTCCATTTAAAATTTTG 5500

6.3.4 *Anabaena* PCC 7120 *petC3* (Accession-Nr: AJ319648)

1 TTTTTGTACACAGCTACCTAAATGTGCATCTTTGCCGACTTTGCCACCCATATAGATGTC 60
 61 AACACCTTCCACGGCTTTACCGTTTTTACGAGCTTTTGTTCCCATTAAGCCAATGTCTGC 120
 121 AACTTGGGGCTGTCCGCAGGAGTTGGGGCAACCTGTCCAATGGATTTCGCCTGGACGAGT 180
 181 AAAGGTCAATTCGTCTTAAGCCTTTAATCATTCTTAGGGCGCGTTTTTGGTTTCGAT 240
 241 GAGGGCGAAGTTGCAAAAATGTGCGCCCGTCAGGAAAGTAGCGATCGCGTCAATGCC 300
 301 AGGATCAAGAGAAAATCTCTCTAGTAAGGGATCTGTCAACAAAGTCCTTAACCGGAGTC 360
 361 GGTAATGTTGGGAATGATGATGTTTTGTTCAACAGTCATGCGGATTTACCGCTACCGTA 420
 421 TACATCGGCTATCCGAGCCAATTCAAACATATCCTCGGCATACAATCTACCTACAGGGAT 480
 481 GTGTAACCCTACATAGTTCAATCCCTCTTGCTTTTGGCTTATAGACTCCGATATGGTCGCG 540
 541 TTTTCCCAATCAATTCGTCTTTGGGGCTGCGGGGAGTAAGGATTTACCCAAACGCTG 600
 601 TTCGACTTCTGCCGAACTTATCTATACCCCATTCATCAATTAGCCACATCAAGCGAGA 660
 661 CTTGAGCCGATTAGCCCTGAGTCCATTGTACGATAGACCTCTAAAATTGCTCTACATAA 720
 721 GGGTAAGACTTCTTCCGGAGTTACCCAAGCATTCAAAGGAATCGCCGCCTCACAGCGTTT 780
 781 AGCAGAAAAGAAACCACCAACTAACACGTTAAATCCAAAGACTTTTTGGTAAGTAGATGA 840
 841 TTCTTCCCAATCCCAATACCCAATCTCCAATCCCTTCTTTAAATGCTGGAACAAAGGC 900
 901 TAAATCGTTGATTTCCGCATGAACTGAATTATCCCGTCCACGGCGATCGCAATATTTAA 960
 961 TTTACGAGGCAAACTACTAACTCTCGATTGCCTTCTCCTTTGTTGGTGAGCATATCCTG 1020
 1021 AATTTGCTGCACTAACTCACGGGTGTACATACAACTCATCCGCATCTAACCCCGCTATCGG 1080
 1081 GTCGCCTGTGATGTTACGGATGTTGTCCATCCCTGACTGCACACTGGTTAAACCTACTGC 1140
 1141 ATGAAATTTATTGAATATGTGCGGTAAGTCTTCTATTCTGATACCTCGTAGTTGAATATT 1200
 1201 CTGCCCTAGTTGTAATATCAGCGTTGCCGTATCTCCGTAACGCTGCACCCTTCCGGCTAA 1260
 1261 AACACGCATCTGATCGCTGGTGAGGATAACCATTCCGGCATCCGCATCCGCATCATAAATTT 1320
 1321 ACCAGGGGTGACTGGGCGAAAGAATACACCCACCCATTTGAGGCGATGATCTCGGTCTGT 1380
 1381 TGCGTCCATTGCTTCCCATCCCAAGAGGCAATTTTTTCGATCTCTGACTTGATGGCAAG 1440
 1441 TCCATCTTTTTCCGGCTTTGAATTTCTCAAACCTATTGAGGCTGGCTTTGGGGGTAGTTAC 1500
 1501 TGTATCTGTATGAGCTGGTTCTCATAAAGTTTTTTTTGCTCAAGATCAATCCACCCGCTAG 1560
 1561 TCTTTGCTAGTTCTACGAGGTCTAGTATAGCAATTTAGTAATCTTGAAAGAACCCTCTC 1620
 1621 CCCAACCCCTCTCTCTTTAAAAGTTCTGTTCGGAGGAAACCTCCGCTCAGACTTTTCGCT 1680
 1681 CCGACCGCGGAGAGGGGAGTTTGGCTCCCACCTCCCTACAAGGGAAGGGGGCTGGGGGTA 1740
 1741 AGGTTTTTTGATTAATGAATCGATGCTCTAATAGTGAAAACCAAATATTTAATTTTGTG 1800
 1801 GCGCAGCCTTCCCGCAGGGTATTTTGAATTTGATTTATGCTACTTCAATGACTGACACGCC 1860
 1861 GCCGATGTTTCACTGAAGGTAACCTCTAGAATAAACCAGGGGAGAACTGTAGTCTTTTAC 1920
 1921 ATTGGCTAAATTTGTCAAGTGGTTTGTGTGAATGTTTATGTAACGATTTTCGATCTTCTA 1980

1981 AGGTTATGTCGGGATCTCAGGTAAAAATAGTATAAGTAGCTACAAAATTCCTCGTATTAATG 2040
 2041 CGTAAGTTTAATAGAGAAATATGCGTTTTCTGCATTACACTTAACTAATGAGTAGCTAAAA 2100
 2101 ATGTTGGTAAAAAAGGCTAGACTTTTTGTTTACAACATAACTTCAGTGGCTATG 2160
PetC3 ► M
 2161 AAACGTCGGGATTTTCATCAATTGGGTAGGTTTGGGTTGGATAGCAAGTAGCTTACCTGTA 2220
 K R R D F I N W V G L G W I A S S L P V
 2221 GCGATCGCTGCTTGTCTTCCCAGCCCACAACATCTACAGAGGGGCAAGCGATCGGGACT 2280
 A I A A C S S Q P T T S T E G Q A I G T
 2281 GTTGC TGA ACTAGATAAAA CTGGTCAATTACTCAACGAAAATTACCAATTGGCCCCGGTG 2340
 V A E L D K T G Q L L N E N S P I G P V
 2341 TTGGTCGTGGGTACATCTAAGGACGCAAATCTGATTGCTGTCAATCCTACTTGTAGCCAC 2400
 L V V G T S K D A N L I A V N P T C S H
 2401 AAAGGCTGTACCGTAGCATGGCAAGCCCAAGCGAAGAAATTTGTCTGCCCATGTCATGGC 2460
 K G C T V A W Q A Q A K K F V C P C H G
 2461 GCAGAATATGGAGTTGATGGTAAAGTGCAGAAAGACCCAGCTACAAAACCACTCAAAACT 2520
 A E Y G V D G K V Q K D P A T K P L K T
 2521 TACGCCGCCAAGATTGAGGGTGATTGAGTTGTAGTCAAGCAAAGCTAGTGTGAGCAAGTA 2580
 Y A A K I E G D S V V V K Q S *
 2581 GGAAGCAGGGAGCAGGGGAAAAGATTTACTCAGCACTCAGCACTGGCTAAACGCCGCA 2640
 2641 CTACTGCTCTCAGCGCAGCTATTGCCCGTAGGGCTTTACAGCACTCAAACTTCGCTATT 2700
 2701 CCAAAGGTATTGTGAATAATATCGGTCAAATTTTAGTGCAAGCGCAGGCGGCATAGTG 2760
 2761 CAGATGATTTGTCATTGGTGATTAATAATCTGCAACAGCTGATTTTAGTAGATACACATG 2820
 2821 ACACGGCTAATTCAGAACACTGCTGGAATTAGCACTCTCTATTTTTGAGTTGGGAGATT 2880
 2881 TTCAGCAACGTTGGGATATTGCCAAAAGTGTTAGTTAATTTGGGCAATGTGACCATCAACC 2940
 2941 CATTAATTGACATCCTAGAAGATGAAGACGCAGAGGATGAATTGCGCTGGTTTGTGCCC 3000
 3001 GAATTTTAGTGAAATTGCAGCACCCAGAGGCGATTATGCCTCTGGTGGAAATTGTTGAAA 3060
 3061 CTAGTGATGATGAGGAAAATTAAGCGATCGCCTCATCAGCAATAGCGCAAATGGGTACAA 3120
 3121 TCGCCATTCCGGTAATTTGAACTCTTAGCAAGAAAATACAAGACTTTTGGGCTAGTC 3180
 3181 GATCGCTTGCTTATATCCGACATACAAAACCATCGCCCTCTGTTGAGTGTGGTACAAG 3240
 3241 ATACCCAAGCATCTATCCGCGCCGAGCTATCGAAGCTCTCAGCAGTTTTTCATGATCAAC 3300
 3301 GTGTACCACCTATACTGTTGAACGCTTTAAATGATCTATCTGCCACAGTTAGACGTACAG 3360
 3361 CGATTCAGGGTTAAGTTTTCGCTCTGATTTATCTTCAGAATTAATTTGGTAGCTCAAA 3420
 3421 TTCAACCCAACTCTACGATTTTAATATAGAGTTTGTCTGTGCAGCCGCAATGCTCTGG 3480
 3481 CGCGTATGGGTGGTGATGATGCAGCTCAGCATTATATAAGGCTCTAATATCAGCTCATA 3540
 3541 CACCCATTACCTTACAACTAGAAATCATCCGCGCTTTAGTTTGGTTAGAATCGCTTATTA 3600
 3601 GCCTGGAATATTTACAACAAGCATTTAATCAAGTCACAACAGAAACACTATGGCAAGAAA 3660
 3661 TTGTACAGTTCTAGGAAGAATACAAAAGCCTGAGTTAAAAACACCAGCCACAGCCATT 3720
 3721 TATTAGAGATACTGAACTCGCCACATCCAGCTACAAAATTCATAGTATGAAAAGTGCGA 3780
 3781 TCGCCATTATCTTTGGGTGAGCTAGGTAATCGAGAAGCAACGGAAAGCTTAACATGCTGT 3840
 3841 CACAGATACAGATGAACTTGTTCGAGTCCATGCGATCGCTGCAAAAATATGCGT 3900
 3901 ATCTTTGAAAACCGCACTGGGGATCAAATCAGAAATAACAGCAGTGCATATGCGGAGCA 3960
 3961 TTGTCTTAGAGATAGCTGAAGAAGATTTCTTTCTTTACTTGTCTCTGTACAGATATAACCA 4020
 4021 TAATATGAGTTCAAGGTGATATTTCCGGTAAAATATTTGTAAATAACAATGACCTGGGAG 4080
 4081 GTAGAGTTTACAGACGAGTTTGAAATGTGGTGGGTTGAGTTAGAGGAAAGTACCCAGGTT 4140
 4141 GCTATCGATGTAGTAGTGCGACTAATTGAAGCGCGGGGAGCAAAGCTTCTTTTCCCTAC 4200
 4201 AGTTCAAAAATAAACAGTCCAGTCAATCCACATGAGAGAGTTGAGGGTGCAGCACAAA 4260
 4261 GGAGAACCGTACCGAATACTCTATGCCTTTGATCCAAGGAGAGTCGCTATTCTTCTCCTT 4320
 4321 GGAGGCAACAAGGGAGGAGATGATCGCTGGTATGAGGAGAATGTGCCAAAAGCAGATACG 4380
 4381 TTGTATGACGAACATTTAGAAGAATTA AAAACAGAGGGGTTCTTATGAAAACGAAGCCAT 4440
 4441 TTGATGAACCTTCGTAAAAAATGACTCCAGAACAACAGGCAGAAAGTGAGATGCAGGCAA 4500

6.3.5 *Anabaena* PCC 7120 *petC4* (Accession-Nr: AJ319649)

1 TATTCAGAGAAGTTTACACTATCAAATAATTA AAAAGGCTGATTCTGCAACGTTTAATGA 60
 61 ATATCTGCGTCAAAGGCGTACACATTATTGATGGTGGAAATTTTTCACGAATCGTTGCAC 120
 121 CTGCTTTAACCAAAAAATTCCTTAACTGAACGGTATTGGGTTTTAACAGTCAACGTTGGC 180
 181 ATATTTAGATCATTAGCGAGGTAGCAGCTATTTTATCAGTGTATCCACTGATATTTGAA 240
 241 ACTCATCCTTAATGTGCAGAGAGATGAAAGCGATCGCCGTTCTGCAATTATGAGAGTATC 300

301 GTACTGTCAATCAAGAGGATGTAAAAAGAAGCGCGTTCTTTGAGAAAAATGTGTCAACAA 360
 361 GCCATCAGGATTTGTGGCTTATATTTTAAAGCTAATGAATTTATAATCAAATCAAATATTT 420
 421 TTAAGGTAGTAGATAAAAAATTAACCTTATTTACCTAGCAAGATAGAAGAAATATTTTCTG 480
 481 TTTTATGTTTTATTGGGAAATCAGCTTATTAATCAGTAATTTGTGCAGACATTGAGCATT 540
 541 ATTAACTAGCGAATCTTTACCAGTCCGTAAAAATTGCTGCTGCCGGTACCGTGGAAATGGC 600
 601 ACGTCCAGGGGGAGATGAGTTGCCCTTTGTATATTCTGGAACCTTAGTAGGTCAAGGACA 660
 661 GGAATTTGCTCAAGTCCAAGCTGTGGGCGTTCAAACGGAGATGGGCAAGATTGGTAAGGC 720
 721 TTTGCAAAAAGTCAAGCCAGAACAGACTCCCCTACAACAGGAAATGACTCGGTTGGTGAG 780
 781 TCGCTTATTTGGCATCGCTTTATTGTTGTGTGTAGCGATCGCTCTCGTCATCTTTGTGGT 840
 841 TGCATATATCGCAGACAAGGCCAACTTGATGCCCGTGCTTTAACTTTTACGACGTTAAT 900
 901 TTTAGCGAATTTAGGACTAATTCTGAGCGAAAGTTCTTCATCTCGCCTCAGCCTCAAAT 960
 961 ACGAAATCCCCAATAATGCCCTTTGGTGGGTGATTGGTGGAGGACTGGCTTTTCTCGC 1020
 1021 ACTCGTGTCTTATGTCCCATTTTTGCGTCAATTGTTTAGCTTCTCCTTCTTACACCCCAT 1080
 1081 CGACCTGGCAATTTGTTTGGGCGGTGGGGCGATCGCTCTGCTTTGGTTTGAACAGTTAAA 1140
 1141 GTTCTCAATCGACCCCAACGAATTATTCAATCCAAATCAAGAAAACCTATCCAGAAAA 1200
 1201 TCTTTGATTTACATCTGCATTCATAGAACTCTTTAATCTGTAGCGTGAATAAATACCTAC 1260
 1261 GCTGCAACATTTCTCATCATTTGGCTCAAAAATCTTCTGCACAATTTGCACCCCTGTCACA 1320
 1321 GCTTGCCAGCCAAAACAATCCAGCAGAATAAGATTAGCGAAACGTGGATGCTACGAACC 1380
 1381 CAGTCATGCTTCTGCATAAAGGAACTAACGCCGAGAAAGTAGAAATCAATCCCACCATC 1440
 1441 CCTAAGCCAGCAAATAGATGAGGGCAATCACGATTTTGCCATTGTTAAAGTAGGTTACC 1500
 1501 ATTATCCCCCGATCGCACCCATTACCATCAACCCAGGAGGATAGAACCAATTTGGTGA 1560
 1561 TGGCGGATGGCAAACCGACCCTCACCAATTCTTTTTTATATCTCCGTTAGCCAGCCTC 1620
 1621 GTCCGTGCGACTTGACACCCAGGTACATCGCATAGAGCGCAACGACCAGCAAGATCCAC 1680
 1681 ATAGTAATAGGGTGAAAAAGCTGAGATAGGGCTTGAGCGCCGTAAGGTTTCTGAACTC 1740
 1741 ATAATAAGTATTTCCAAAAATAGCTATGGAGAATTAATCACAAAAAAGTATGACATTTCTG 1800
 1801 TTGTTTGAATCATGTTCTAATACTGGATAAATTTGTATGAATTTGCCTAGAAACATATAA 1860
 1861 TTCTTGATATTAATAATCTCTAGTAGTTTAGGAGTTATAATGAAAGAGAAAAACAAGGAAA 1920
 1921 AATGCCATCCCTTGAGGTTGCTTCTTGCATAATTGCACCAAGGGTTTTCTAGGGTTTT 1980
 1981 GCAGCCCATCAAGATTTTTATAAGGGTTTTGTAGCCTATTCAATATTGGAGATTACAGT 2040
 2041 TATGAAAACGAATGTTGGTTCGTTAGATCGCCTGATCCGTCTGTTGTTGGCTTCAGCGTT 2100
 2101 GTTTTATCTAGGACTTTTCCCGTACTACAGTACCGGATTGGGTATTGGTCTTGTCTGTTGC 2160
 2161 AGGTAGCGTATTGCTGGTGACAGCTTTAGTAGGATTTTGCGGTCTTTATAGCCTCCTGGG 2220
 2221 AATTCATACCAGCCAGATCAATGATCAACTTTAAGGACTTTCAAAAAATAAATTATCCAT 2280
 2281 CTTCTGGGGTATCCTACCCGCCCTGAATCTGGGATAGGTGTTTCGCGTAGTGGCACGTAGT 2340
 2341 GAGGACACCCATCCACAAGAGAATTTGGGATATTTTTTATTTTTTTCAGTCTCTTAAAGGG 2400
 2401 ATTCACTCATCAATTTTTAAGGAGACCCATAATGGACAATAGTATTTCCAATCGAAAGTCC 2460
PetC4 ▶ M D N S I P I E S P
 2461 ATCCCTATCAAGACGGCAACTACTTAACTTTATTACCGGAGCAACTGTTGCTGTCACTGC 2520
 S L S R R Q L L N F I T G A T V A V T A
 2521 GGGTGTGCTGCGTCTATCCTGCTGGCAAATTTCTTGATTGCTCCAGCAGAAAAAAGTAGGC 2580
 G A A L Y P A G K F L I A P A E K T G A
 2581 GGGAGGTGCTATTCTGGCTAAGGATATTTCTAGGGAAACAAATCCCCGCCTCGCAAATTTCT 2640
 G G A I L A K D I L G K Q I P A S Q I L
 2641 GGCTGAACCGCCCCAAACCCGCGCCCTGGTTGCCGGTTTTGGCAGGAGAACCCACCTATCT 2700
 A E P P Q T R A L V A G L A G E P T Y L
 2701 GATTGTCAAAGAAGATCACACCCTGGATCGTATTGGGCTTGTAGATAACTGCACTCACCT 2760
 I V K E D H T L D R I G L V D N C T H L
 2761 TGGTTGTACCTTCCCTTGAATCCCTTGGATCAGCAGTTTTCAATGTCCCTGTCATGGTTC 2820
 G C T F P W N P L D Q Q F Q C P C H G S
 2821 TCGCTATGCCCCAGATGGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT 2880
 R Y A P D G S V V R G P A P L P L K I V
 2881 CCAGTTGCAAGTATTGATAACAGCATTTTAACTCTCGCCGTGGACGGAAACTGATCCCCG 2940
 Q V A V I D N S I L I S P W T E T D P R
 2941 TACTGGAAAGAAACCCCTGGTGGGTCTAAGGATGAAGTATGGAACCGATTTCGGATTTT 3000
 T G K K P W W V *
 3001 TTACTTCCCTGGTTTTCTGGTTATGGCTTGCGGCTCCAGCATTTCTGATGATTATTGCTAGT 3060
 3061 TACTTGGCTTATAAAAAACGCAAGAATCGCCTCGTATTAAGCCAGAAGCTTTCTAGAAAAG 3120
 3121 CTGTTGCATGAAAAGTGAACGACTAAGGATTTATATAGCAGGCAAAACAATGAGATCGAA 3180

3181 GCCATACGGTTTGTATTGTGTGTTTAACTTTGAGCCTGTAAACAGGCTGCTATCTCAA 3240
3241 TTTGGGTGGGCTGAGAGGCTCTGGAATAGTTAAGACCGAATCTAGAGAAGTGGGTGGATT 3300
3301 CTCATCCATTTCTAGTAAATCCGTAGGTAAAGTCAGGATACAGCAGACGGGAAAAGAGTC 3360
3361 CCTAAAGATCACCGCCGACGACAACATCCTACCGTTGCTAGAAAAGTCGTGTAGCTGACAA 3420
3421 GGTTCGTATCTACCATCGCAAAAAGATACAAATATGAATCCCACCAACCCCATGAGTT 3480
3481 TGTGTGGAGGTGAAAAGCCTAGAGAGGTTGAATATAGATGGTGTCCGGTAGTGTGAGAT 3540
3541 AAACGATATCCAAGGTAAACAGTTGTGCGATTTCCCTTGATGGGGTGGGTAGCATGACGAT 3600
3601 CGCCGGCAGTGTGATGTGCTTGAACCTCGATCTTCCGGGGTTGGAAGTTTCCAAGGTGA 3660
3661 AAATTTCCAGACTAAGCAGGCGACGGTTCGCAATAGCGGCGTGGGGAGTGTGTGGTTAA 3720
3721 TGTCACCTCAGCAGTTAGATGCGACTGTATCCGGCGTGGGTTCAATAGAGTATATTGGCTC 3780
3781 TCCTCAAGTTCGGGAATCTGGGCGGGGCGTGGGGTCAATCAAGAAACGTTAGCGAAGCGA 3840
3841 TCGCTTGATTACAGTAGAGAGAAAATTGAATTAGAGAATACAAAAAGGAGTTATATCAT 3900
3901 GAATGCCATCAAGATTGAAAATTTGGGTACAGGCTGTAAAAAATGCCAACAGCTAGAAGC 3960
3961 AAATGCGAAAAGAGCTGTAACATACTCAATTTAATTGCTGAAGTTTACATATTACCGA 4020
4021 CCCAATCGAAATGCTAAACGAGGTGTGATGTCTACTCCCGCTATGGCAATCAATGGCAA 4080
4081 AGTTGTCAGCAAAGGTCAAGTAATCAGTACCGAACAATTCAGCCCTATTGCGAGTTA 4140
4141 AAGAGGCAAATTCATGTTCGATCCGTTTTATCCGTTTGATTGGTTGGCAACCCAGATTGT 4200
4201 CACTCAAATCTTGGGCTTGTGCGATTTTCATCGCATTTAGGATCGAGTCTGCACCTCTTTCT 4260
4261 TTATGATGTGCCAAAAGTCTTAACTTACTGATTGTAATTAGCTTTATTGTTGGGACATT 4320
4321 TCAAAGCTTTTTAGAACAGAGCGGTTTCGCTCTTGTCTAGAAAGGAAAGCGTACTTTTTGC 4380
4381 CGGAAATATTTTGGCAGCAATGGTAGGAATCGTCACACCATTCTGTTCTTGTCTGCGGT 4440
4441 TCCTTTGTTTATCGGCTTTTTGGAAGCAGGTGTACCTTTAGGCGTGACTTTTTTCGTATCT 4500
4501 GATGGCAGCACCAATGGTAAATGAGGTTGCTGTTATCCTTTTTATGGGGATTGTTTGGGTT 4560
4561 AAAGGTGACACTGATCTACATCGGCTTTGGCGTGGGTTTAGCGATCGCCTCTGGATACAT 4620
4621 TATTGGACTCCTGAAAATTAGAAAAATGGGTAGAACCATTTGTTTGGGAATTGCAAAAATC 4680
4681 TCGTCAAGCAATACCTCTAGAAAGGGGAAGACAACCTAGAACAGTGGCGTTAACCTGGGG 4740
4741 ACAAGATTTGAGCAAGGAAGATTCCAATCTAGTGAATTTGTGCGATCGGTGTGGCTTTA 4800
4801 TGTGTGGGTGGAATTGCGATCGGTGCAGGATTCATGGTTATGTGCCGACAGATTTTAT 4860
4861 TGTAAATATGTCAGGTGCGAATAATCCTTTTGCAGTGCCGATCGCGTAATTTTGGGTGT 4920
4921 TCCACTCTATGCGAATATTGCGGGTGAATGCCGATTACTGAAGCTTTAGTAAATAAAGG 4980
4981 AATGCCATGGGTACAGTTTTAGCTTTCACTATGGCAGTAACAGCACTATCTCTTCTGTA 5040
5041 AATAGTGATTCTCAAAAAAGTGCTACGACCACAACCTGTTAGCTGTATTTGTCGGGTTAAT 5100
5101 GACCGTTGGCATTATCAGCATCGGCTACATATTCAACACCATAATTAATTGACTTGCTAC 5160
5161 TTTACAATTGCAAAAATTATATGATATGTAAAAAACTAATTCAGACCATATTGCTGGGATT 5220
5221 TGCTATGTGTTTTTACCTCTTGCTTGGTGTGGGCTAAACCCAACTCTAGCAGCAACTCT 5280
5281 CACACAAGTTGAATCAATCTCTCAACCCAGGATGCAAACTCTATCTGAACCCCGTA 5336

6.3.6 *Anabaena* PCC 7120 *petG* (Accession-Nr: AJ319650)

1 TGATGGATACCAGATATGAACAGATGTTGGATCAAGTCAGAAATGAGCTATCAAGTATGG 60
61 GTGTAGCTGTAACAGTACCTAAGACTACTACTGGTAATATTTTACGCACAATTGCTAAAA 120
121 CAGAAGTTGAACGGGCATTAATTTAGCTAGACTTCAGTCTCAACATCCTACAGTGAAAA 180
181 ACTTTGATGCTCAACTTCAGGATTTATATAAGCAACTAGCAAAACACACAACCGCAAGTAG 240
241 AGTCAGGGGTGGTAAAAAACCTGATAGCGAATGCAGCCTATGAGAAAATAGATGATCTAA 300
301 AGATAGAGCGATCGCAACTTTTGACAAAATATAACCTTGACAGTCCCATCATTTGGCGTAA 360
361 TTGATAGCCAGACAAGCGAATTAGAATCATTAATTCACCGTAATAAATTTAATCATCAT 420
421 TAAAAATATGAATCCTGATGTA AAAACCCCGGTTCTTCAAGAAATCGGGGTTTTGGGTC 480
481 TGCGCGTATCTAACTTGATTGAGCTATAAAGTCTCCAAAAGCTTAAAAGATCTGCCAT 540
541 TTCTTGGGTGTTGGGCTGAAATTTTGGCATTGGTGGTGTATCACCGCTAATAACTTGGTG 600
601 AATTAGCCCATACTTGGACTTACGCTTAGAAACTGCTTGTAAAGCTGGGGCCTACTCGGCC 660
661 ATCTGCTTCTAAACCATGACAACCAGCACAATTTATTTGAAAAATAGCGTGTCCCTGTAT 720
721 TGGTCTCCTTTTCATGGCAAGAACACTTTAACTAAGGGTGCAGAGGCTTTCCACCACTG 780
781 AACCCAAAAAGCCCAAAGGGATTGCTAGCAGTATCACTAGCGCCACTAAAGCAGTACG 840
841 CTGAATCAGAATTTTCAGGTTTGGTAATCTGGTTATCCAAAAGGTGTGCTGTAAAAGTTTA 900
901 GGTTTACTCAAATTTTTCATTTCTACACATAGCTTAAAAGTTCTTGATGATGTCTGCAA 960
961 GCATAAATACTACAGTTTTTTCATCTCTAGGGGTGCGCTAAAAATAGTGTAGGAAGCGGGATT 1020
1021 CATCCGCGATTTGGTAAAAATCAAAGATGGGAAATAAATAATGAATAATCGTAACAGGAGA 1080

1081 TTTTAAAGTGGTTGAACCCCTACTTTTCAGGCATCGTTCTTGGTTTGATTGTTGTCACCCT 1140
PetG ► V V E P L L S G I V L G L I V V T L
1141 CGCTGGGCTGTTTTACGCTGCCTATAAGCAATACAAGCGCCCAATGAGTTGGGTGGTTG 1200
A G L F Y A A Y K Q Y K R P N E L G G *
1201 AGTCTTGAAGTGCATGATTGCTAAAGCGCGTTAGCTACTGGGTGGGGGTATGAGGGATAA 1260
1261 AGTAGATAAAAAATCTTCTCATCTTCCCAATCCCAATCCAAGGCAAAGTCAAAAAGA 1320
1321 AAAAATCTTTTACCTTTTACCTTTTACTTTTCTTGTCCCAATCCCTACGCCCCTAATTC 1380
1381 CTCGCTTCGATAAAAAAGTAAGCGCCGTGTTACCGTAGACTTTTTGGCGGCAAATTTCCCA 1440
1441 GTCAGGAATTAATATATCTACCCACCCTTGGGGATTATGTTTCGATCGCTATTTCCCCACT 1500
1501 TGGATCTAATAAATGATGGTGAGCGATCGCCTCTAACACTGGCTGATATAATCCACTAGC 1560
1561 ATAGGGCGGATCAAAATAAATCTGTGCGAATTGCTGCCCTGATAAGTTTTTTAACTGCTG 1620
1621 AACGACATCTCCACGCAATATTCGCCATTGTTGTTTCGTTATTGGCTATGCGCTGCCAATT 1680
1681 CTCTTGGATAATTCGACAGGCTCGGCTTGATTTTTCAATTCGACCACCAAGCTAGCACC 1740
1741 TCGACACAAAGCCTCTGCACCCATTGAACCATTCCCGGCGCACAAATCTAGCCAGCGATA 1800
1801 CCCTTCTATTTCTCCCTGCCAAATATTA AAAACAGCTTCCCTAACCCCTCCAGTGGTGGG 1860
1861 TCTGGTTTTCTGGCCTGGTAAAGTTTTAATCTGGCGATTCCCGTAAATTTTTAGACTCAT 1920
1921 TGGTCAATGGTCATTAGTCATTAGTATTAGTTATTAATCATTAGTCTACTGACAAGTGA 1980
1981 CAACTGACGACTGACAACTAATATTATGCTGCTATTTTTTCCCGTACTTGAGAGACAAA 2040
2041 ATTAGACAGGATTTGCAGCCCAATATTTGACGATTTTTCTGGGTGAAATTTGACTGCCAT 2100
2101 CAGTTTTTCATGGGCAATGGCTGCCGTGACGGTTTTCGCTACCGTGAGTAACAGTTGCAGC 2160
2161 ACGAACTTGAGGTTCAAATGGGTCAACATAGTAGGAATGC 2200

6.3.7 *Anabaena* PCC 7120 *petM* (Accession-Nr: AJ319651)

1 TGTCGTTCTGACTCTAGCCAAGGAATTAACCAATCTAGTTCTTCTGTTCCAGTTGTCCT 60
61 TGTTCCGCACTGTGGGGATTTAAACCAGCGATCGCAATTCTCCCACTAGTGATGCCAAA 120
121 TCTTCTCTAAACACTCCACCAACAAATCTAATTTTTGCGTCAGCAATTGCGGTGTCTAGT 180
181 GTGTCGCCACTTGACGTAAAGGTATATGGGTAGTTGCGAGTAAGGCTCTCAGTGTCCAA 240
241 CCAGTGTAAAGCGATCGCGGACAAATAACATCCCAAAGCGTTCAACACCAGTCTTTTGG 300
301 GCTAACAGTTCCGTTTGTCTGGGTAAATTGTAGCCTGCGGCTTTCCATGCAGATTTAGCT 360
361 ATGGGGCCAGTCACAATTCATCAAAAATTACCTGCTAGGGTTTGGGCGATCGCATAATCC 420
421 ATATAGGCGAAACTGGCTGCACCACTAGCCGCTTACCAGTTCCTAAATTTATCTGTCTG 480
481 GCAGTTTCTCTATCAACAGTGACATCAATAATTTTTAATAAATTAGGATCAGCCAACGGC 540
541 AGTAAATTTTCCATCGAGCTTAATTGTTTATAAGTCTCTTGGAGTAAATTTTTATTACTT 600
601 ACTACAGTTAAGTCATAATTATGACCGATTTCTAAATCAGCCAAAGCTTTTAAAATCACT 660
661 TCCGCCCAATTCGCTGGATCTCCGACTGTTAGTGCTAAACGTGGGCGATATTTTTGA 720
721 GGTGTATTTACTGTCTGATTCTGATTTAATTGGTACATATAAGTGCTTTGGAGAAGAATT 780
781 TTTTGCTTGATTCCATCTCCAATAGTAGGGATTGACTATCAAAGTACTTTAAAATTTATT 840
841 TACACAGTCTAATCCAATAAAAAGTAGGAGTGAGAGGCTAAAAAAGCGGGAGAGCAGAGA 900
901 AGCAGATGGGGAAGGTGAATAAATTATCATTCAACACTAAATTTACTCGGCTCACATTACT 960
961 TAGCACTTCTGACTCCTGTGCCTAGATAAGACAAAAAATCAAAAATTTATTTCGTCAGGA 1020
1021 GAATCACATTAATGAGCGGCGAACTACTGAATGCAGCTTTGTTATCTTTTCGGCTTAATCT 1080
PetM ► M S G E L L N A A L L S F G L I F
1081 TCGTAGGTTGGGCTTTGGGTGCTTTATTATTGAAAATTC AAGGCGCAGAAGAATAATTTA 1140
V G W A L G A L L L K I Q G A E E *
1141 TCTGTATTTGCCTGCTTTCAACAGATGAGAAGCCTGAATATCACTGGCAAATAGCTTGT 1200
1201 CCAGGTACTCCTTTGAAGAAGCAGACTACCGCAGTCCACCCGGCGCTTCATACCGCGCGT 1260
1261 GTGGCTGCACTCACGAAAAACGCTGTTTTAGTGATTTTTTTCAGTATCAATTCGTTTCT 1320
1321 TAAAAACCATTAATTTTTATTTACAGATATAAATCTGTTAAGATTCTTTTCATAAAAAGTT 1380
1381 TAAAATTTGTTACAACCCCTCATGACATTATTAATAGTCCGTGCCACTGGCACCTTAGGAA 1440
1441 GACAAGTGGCTCGTCGGGCGATCGATGAGGGATATAAAGTTTCGCTGTCTTGTCCAGGAGT 1500
1501 CCAAAGAGCAGCTTTTTTAAAAGAGTGGGAGCCGAACCTCGTAAGAGGAGATTTATGTC 1560
1561 AACCCAGACTCTGGTAGAGGCGCTAGAAGGCGTAACAGCAGTAATTGATGCAGCAACCT 1620
1621 CTCGTGCTACAGATTCGCTGACAATTAAGCAAGTAGACTGGGAAGGACAAATAGCCCTAA 1680
1681 TTCAGGCAGCAAAGCGGCGGGTGTAGAACGTTTTATATTCTTCTATTTATTGATGCCG 1740
1741 ATAAGTATCCAGAAGTCCCACTGATGAAATTAACGGTGTACAGAATTTATTTTTAGCTG 1800
1801 AATCTGGGATAAATTACTGTTCTGCGCTTGGCCGGCTTCATGCAAGGGTTAATCGGTC 1860
1861 AGTATGGCATCCCCATTTAGAAGGACAGCCTGTTTGGGTA ACTGGCGCATCTTCCCCAG 1920

1921 TCGCTTATATGGACACTTTAGACATTGCTAAGTTTGGCTGTGCGGGCGTTGAGTGTGCCAG 1980
 1981 AAACAGAAAAACAAGCTTTCCCTGTATTGGGTACTCGTGCCTGGAGTGCCGAAGAAATCA 2040
 2041 TTAACCTTATGTGAACGCTTATCTGGCAAAGAAGCGAAAGTTAGACGAATGCCCATCAACC 2100
 2101 TACTACGAGCCGTGCGCGGTCTTGCCAAATTTCTTTCAGTGGGGATGGAATATAGCCGACA 2160
 2161 GACTCGCATTACCCGAAGTTTGGCTAGTGGTAGACCGCT 2200

6.3.8 *Anabaena* PCC 7120 *petN* (Accession-Nr: AJ319652)

1 TTGCTTTCACTATAGAAAATACACTCAGCACTAAAACTCATTATCCAACACTGAAGTTAG 60
 61 TTAAGTCATTGACAAGCGATCGCGTTATTTGCTCTGCTTCAGAAAAACAATATCTTGGCA 120
 121 AAACCTTAGGTGCTGATGTGCTTGATATGGAAGGATTTACTACCCTAGAGTATTTCAATG 180
 181 GATCTGGTGTAGCAGTAGCTATGCTTAGGGTAGTTAGCGATGATTGCCATCACAATATCC 240
 241 CTGACATCACAGCAGCCATCAATCCCCGACGGTTCTCTACAACCTTTATCCTTAGCATTAA 300
 301 GATTCTGGGTCAACCTATTGCAGCCGCTAGGCTAATTCAGGTTCCCTGCGGGGACTAA 360
 361 AAGTGTGGAAGAAGTGACAAAATCACTGGTTGCTGAATTGTAATTAACCTTGATGGAAAA 420
 421 GATTTACCCCAACCGAGTTGGATAGCCAGATCAAGAGCGATCGCTGCCGTGCGCAAACCAC 480
 481 AATATACTTTCACTAGCCATGACTATACAAGGTAATAATTGTGTTGCTGCTACTCCACCCC 540
 541 ATTTCTACCTGAGTTAATCCCCGCACCAAAACCAAAAGCCATCACAGCACCATCTTTTCAGA 600
 601 TGAGAATTTTGATCTGTGCGGATAATATAGCGGTAAGTAATACCAAATAATAAACCAGAG 660
 661 AAACCAGCGATCGTCCACTCAAAAACCAAGACAAGTTAACATCTATTTGCAGACTTACG 720
 721 AGTGTGGGAAAATACTTTGCCAAAACCTAGAGTATTCAGCAAACCTGGTGACAATAAAAGCC 780
 781 AAACCCAGCGAAAATCCGCCAATCATAACCAGCCTTAATGGATTCTATCCGTTCCAGCCATT 840
 841 ACTGGCTCATCAAAAATCTATTCATGATAAATCTTGGACTCACAGCAGCGATCAACTAG 900
 901 AGATGGAACATGAGAAAATTGCCCAATACCCAATCCCAATACCCAGTCCCAGTATGAT 960
 961 AAATAGTAGAGACATTTTGTAAATAATTTCCAAAGAGAGACTATGGCGATTTTGACACTT 1020

PetN ► M A I L T L

1021 GGTGGGTATCACTGTTAGTTGTGTTTACTTGGTCGATTGCGATGGTAGTTTGGGGACGT 1080
 G W V S L L V V F T W S I A M V V W G R

1081 AACGGACTATAGGGGAATCGTGAAAGTCCATTTCCTAAGTATTTTGGCTCTAGTCGCCCTT 1140
 N G L *

1141 AGTGCTGTTACTATCTGTTACAGGTGGCGTTGTTTATTTAACGGTAGCAGACTGGCGCGA 1200
 1201 TCGCCGCTTCGAGAAAAATGAAAAGCGCACACTCCGAAGCAGCACTCCCAAACGGCGATA 1260
 1261 ATTCTCAAGCGACAAATGAAACGAGTTTTTACAAAATCTTCTTCCAGGGACATGATTCT 1320
 1321 ATCGTGTCCCTAAATTTTATGTTTCTGTGGGTGTCATTTCGTCAATAGTCATTAGTTTTT 1380
 1381 CCACCTGCTCCTCTGCACCCCACTCTCTACTTGTACATTTCTCCTCCTTCGGGGAACTC 1440
 1441 TGAGATAGAAGGCTTGCAGATATTTTAAAGTCTACAGGGAATGGAAAACCTTCTACGGT 1500
 1501 ACAACCCATACAAACAACTTGTGAGCGAGAATCTCAACCAGATATGAAGACAGCTCTTTC 1560
 1561 GGGGTAGTTAGTCGGATTTCGCCAGTCTCTGGACATAGAAATAATATCCAAATTACCGT 1620
 1621 TACGGAAGTGGTCAATTATTAATGCTGATCGGGTAGGAGTATTCCGTTTCTATCCTGA 1680
 1681 GTTGAGATGGGAAGGGGAATTTATTTATGAAGATGTGGGTTCTGAATGGATTTTCAGTGT 1740
 1741 GACATCCGAATTAAGCGATGGACTATCCCATACCCAGGCTATGACTGCTTTGCTGAGGA 1800
 1801 ATTTGCTCAACCTTATCAGCAAGGCACAATCAAGGCAATAGATAATATCTACCAAGCGGG 1860
 1861 AATTAGTGATGATCACATTCAGATGCTGGAAAAGTTGCAAGTACGTGCTAACGTAGCTGC 1920
 1921 TCCTTTAATAAAAAGGAAAAGAGTTGTGGGATTANAGAATTCGTAATCATGGTCAAGCGTG 1980
 1981 TCTACAA 1987

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden auf Tagungen vorgestellt:

Arnold, M., Maldener, I. und Hauska, G. (1999). Studies on the cytochrome *b₆f* complex of *Anabaena variabilis*. Fourth European workshop on the molecular biology of cyanobacteria, Berlin.

Arnold, M., Maldener, I. und Hauska, G. (2001). An additional isoform of the Rieske FeS-protein in heterocyst forming cyanobacteria. GBM-Tagung, Bochum.

Weitere Veröffentlichungen

Fiedler, G., Arnold, M., Hannus, S. und Maldener, I. (1998a). The DevBCA exporter is essential for envelope formation in heterocysts of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol. Microbiol.* 27, 1193-1202.

Fiedler, G., Arnold, M., Hannus, S. und Maldener, I. (1998b). An ABC exporter is essential for the localization of envelope material in heterocysts of cyanobacteria. In: Peschek, G.A., Löffelhardt, W. und Schmetterer, G. (Hrsg.) *The Phototrophic Prokaryotes*. Plenum Publishers, New York, 529-537.

Fiedler, G., Arnold, M. und Maldener, I. (1998c). Sequence and mutational analysis of the devBCA gene cluster encoding a putative ABC transporter in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *Biochim Biophys Acta* 1375(1-2), 140-143.

Hauska, G. und Arnold, M. (2000). In Yunus, M., Pathre, U. und Mohanty, P. (Hrsg.) *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*. Energy transduction in the Z-scheme. 108-126.