

Untersuchungen über Virus-Befall
bei marinen Braunalgen

Diplomarbeit von Stefan Lanka
Universität Konstanz 1989

Untersuchungen über Virus-Befall
bei marinen Braunalgen

Diplomarbeit

eingereicht von **Stefan Lanka**

Konstanz, Dezember 1989

Angefertigt unter Betreuung

von

Prof. Dr. Dieter G. Müller

und

Prof. Dr. Rolf Knippers

Fakultät für Biologie
Universität Konstanz

Mit herzlichem Dank an meine Familie,
an die Professoren
Dieter G. Müller und Rolf Knippers
und deren Mitarbeiterinnen und
Mitarbeiter für die Unterstützung,
Betreuung, Kooperativität und
Toleranz.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	6
2.1	Algenmaterial	6
2.2	Kulturmethoden	6
2.3	Isolation der Viruspartikel	7
2.3.1	Aufbrechen der Zellen	7
2.3.1.1	Ultraschall	7
2.3.1.2	French-Press	8
2.3.1.3	Mörsern in flüssigem Stickstoff	8
2.3.2	Puffersubstanzen	8
2.3.3	Differentielle Zentrifugation	9
2.3.4	Fällung der Viruspartikel	9
2.3.5	Gradiententechniken	10
2.4	Elektronenmikroskopie	10
2.5	Biochemische Charakterisierung der Viren	11
2.5.1	Virale Proteine	11
2.5.2	Virale Nucleinsäure Pulsed-Field-Gradient-Gelelektrophorese (PFGE)	12
3	Ergebnisse	15
3.1	Virus-Präparation	15
3.2	Isolierte Viruspartikel im Elektronenmikroskop	16
3.3	Infektionsversuche mit isolierten Viruspartikeln	17
3.4	Virale Proteine	18

3.5	Virale Nucleinsäure	19
4	Diskussion	20
5	Zusammenfassung	26
6	Literatur	27

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Isolation und vorläufige biochemische Charakterisierung eines Virus, das in einer stabilen Infektion die marine, eukaryotische Braunalge Ectocarpus siliculosus befällt.

Über Viren in marinen eukaryotischen Algen liegen bisher nur wenige Befunde vor, die hier kurz referiert werden. *Oliveira* und *Bisalputra* (1978) beschrieben eine Virusinfektion in der marinen Braunalge Sorocarpus uvaeformis. Der pathogene Effekt des Sorocarpus uvaeformis - Virus besteht in der Zerstörung der intrazellulären Struktur von vegetativen Zellen und Zoosporen. Er ist im Lichtmikroskop deutlich sichtbar, da die Zellen, in denen das Virus experimentiert wird, ihre Pigmentierung verlieren. Nach der Lyse der Zellen werden die neugebildeten Viruspartikel ins Medium freigesetzt. Durch Neu-Infektion konnte die Pathogenität des Virus demonstriert werden.

In den marinen Braunalgen Chorda tomentosa (*Toth an Wilce, 1972*) Ectocarpus fasciculatus (*Clitheroe and Evans, 1974*), Pilayella (*Markey, 1974*) und Streblonema (*La Claire and West, 1977*) wurden virus-ähnliche Partikel beobachtet, ohne daß deren Infektionsfähigkeit demonstriert werden konnte. In keinem dieser Fälle ist es gelungen, die Viruspartikel aus der Alge zu isolieren oder aus dem Medium anzureichern. (Übersichtsartikel: *Lemke, 1976; Dodds, 1983 und Ushiyama, 1985*)

Resultate aus eigenen Vorarbeiten mit einem virus-ähnlichen Partikel aus einer *Feldmannia*-Art veranlaßten die Suche nach einem virus-befallenen Wirt, von dem auch uninfiziertes Material vorhanden ist, mit dem dann Versuche zur Neu-Infektion durchgeführt werden konnten. Im September 1988 wurden in einer Aufsammlung lebenden Materials von Ectocarpus siliculosus aus Neuseeland Pflanzen mit deformierten Gametangien entdeckt (Abb. 1).

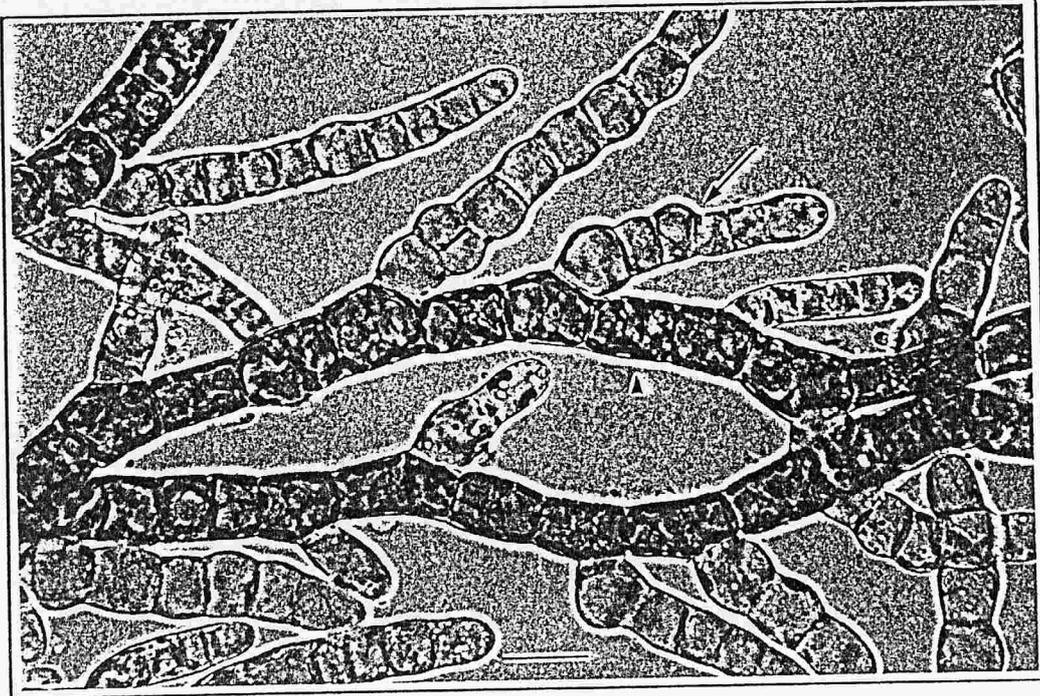


Abb. 1 : Infizierter *Ectocarpus siliculosus* - Gametophyt. Den Gametangien fehlt aufgrund der intrazellulären Zerstörung, bedingt durch die Expression des *Ectocarpus* - Virus, die Pigmentierung (Pfeil). Die vegetativen Zellen zeigen normale Pigmentierung (Pfeilspitze). Balken : 20 μm .

Nachdem Klone dieses Materials in Kultur genommen waren, konnte gezeigt werden, daß die Zellen dieser deformierten Gametangien virus-ähnliche Partikel enthalten (Abb. 2).

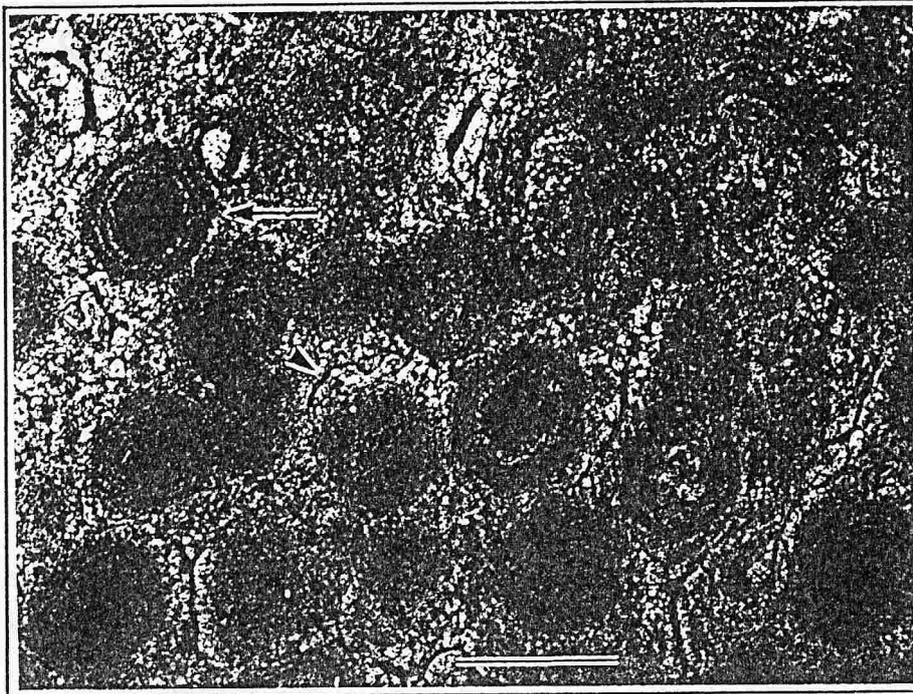


Abb. 2 : Die Viruspartikel (Pfeil) haben bei Beobachtung im Transmissions-Elektronenmikroskop einen Durchmesser von 150 nm. Sie zeigen einen dunklen Kernbereich, der von 3 Hüllen einer unbekanntem Zusammensetzung umgeben ist. Weiterhin ist fibrilläres Material (Pfeilspitze) mit einem hellen Hof (wahrscheinlich DNA) und membranöses Material (*) zu sehen. Diese Aufnahme wurde von H. Kawai und B. Stache, AGMüller, zur Verfügung gestellt.
Balken : 200 nm.

Ectocarpus siliculosus ist eine kosmopolitische, filamentöse Braunalge, die an allen Küsten der kalten bis warm-gemäßigten Klimazonen vorkommt. Die Alge zeigt einen sexuellen Lebenszyklus mit einer Abfolge von Gametophyten und Sporophyten, die durch Befruchtung und Reduktionsteilung miteinander verbunden sind (Abb. 3). Da sich die Alge leicht kultivieren läßt, sind viele Einzelheiten ihrer Entwicklung und Fortpflanzung bekannt (Müller, 1967, 1988).

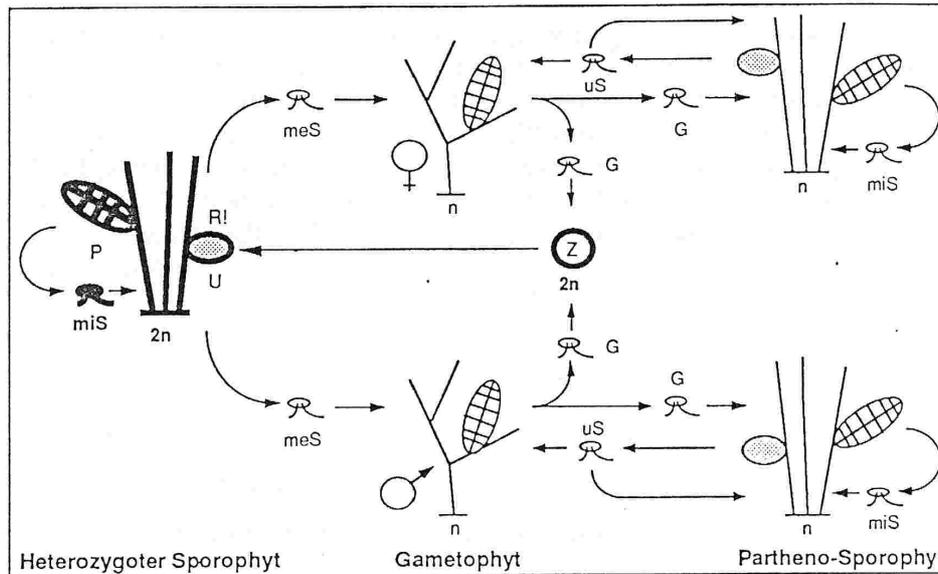


Abb. 3: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von Ectocarpus siliculosus. (Nach Müller, 1967)

Links: Der diploide Sporophyt bildet in der Entwicklung zum fertilen Stadium plurilokuläre (P) und unilokuläre Sporangien (U).

Das plurilokuläre Sporangium ist mehrkammerig. In jedem Lokulus wird eine Spore gebildet. Das unilokuläre Sporangium hat keine Zwischenwände. Die darin gebildeten Sporen sind nicht voneinander getrennt.

Die in den plurilokulären Sporangien entstehenden Sporen gehen aus Mitosen hervor. Sie werden Mito-Sporen (miS) genannt. Die in den unilokulären Sporangien der diploiden Sporophyten gebildeten Sporen sind aus einer Meiose (R!) hervorgegangen, sie werden Meio-Sporen (meS) genannt. Der Ort der Reduktionsteilung ist also das unilokuläre Sporangium des diploiden Sporophyten. Die Sporangien öffnen sich apikal und geben die Sporen frei. Die Zoo-Sporen haben zwei Geißeln, mit denen sie sich schwimmend fortbewegen können. Die diploiden Mito-Sporen bilden wieder diploide Sporophyten.

Mitte: Aus den Meio-Sporen gehen männlich und weiblich determinierte Gametophyten hervor. Die Gametophyten sind haploid und bilden ausschließlich plurilokuläre Gametangien. Wie in den plurilokulären Sporangien der Sporophyten sind in den Gametangien die Gameten durch Zwischenwände voneinander getrennt. Nach ihrer Freisetzung bewegen sich die Gameten (G) mit Hilfe zweier Geißeln. Die Verschmelzung eines weiblichen mit einem männlichen Gameten führt zur Befruchtung. Aus der Zygote (Z) entsteht wieder ein diploider Sporophyt.

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Abb. 3: Fortsetzung

Rechts: Wenn keine Befruchtung erfolgt, können die Gameten parthenogenetisch zu Sporophyten auskeimen. Diese haploiden Partheno-Sporophyten sind weiblich oder männlich determiniert. Sie können sich über die in ihren plurilokulären Sporangien gebildeten Mito-Sporen (miS) selbst replizieren. In den unilokulären Sporangien dieser haploiden Pflanzen findet keine Meiose statt. Aus ihren Sporen (uS) gehen zum überwiegenden Teil Gametophyten, aber gelegentlich auch einige Partheno-Sporophyten hervor.

Die Pathogenität des Virus von Ectocarpus siliculosus konnten *Müller et al.* (1990) durch Neu-Infektion gesunder Zellen demonstrieren. Außerdem konnte gezeigt werden, daß Virus-Partikel nur in reproduktiven Organen des Wirtes, den Sporangien oder Gametangien anzutreffen sind. Diese ersten biologischen Befunde wurden in der vorliegenden Arbeit mit molekularbiologischen Methoden erweitert und fortgeführt. Die Aufgabenstellung, die sich daraus ergab, bestimmte das weitere Vorgehen:

1. Die Massenkultivierung von virus-tragendem Algenmaterial.
2. Die Isolation und Reinigung des Ectocarpus siliculosus-Virus.
3. Die biochemische Charakterisierung der Viruspartikel.

2 Material und Methoden

2.1 Algenmaterial

Gearbeitet wurde mit einer Klonkultur von Ectocarpus siliculosus (Dillw.) Lyngb., (Bezeichnung **NZ 15 d2**, Abb. 1), einem virus-befallenen männlichen Gametophyten, der 1988 in Kaikoura auf Neuseeland isoliert wurde (*Müller et al. 1990*). Als Spezies- Reinkultur war dieses Material frei von anderen Algen und Mikro-Organismen. Es enthielt jedoch kommensale Begleit-Bakterien.

2.2 Kulturmethoden

Ectocarpus siliculosus wächst in einem Temperaturbereich von 5 bis 20°C. Da die Klonkultur NZ 15 d2 jedoch bei Temperaturen über 15°C auch normale, symptomfreie Gametangien bildet, wurde eine Aufzuchttemperatur von 15°C gewählt. Stammkulturen, denen das zu vermehrende Pflanzenmaterial entnommen wurde, wurden bei einer Temperatur von 12 °C und unter Kunstlicht (*Osram* - Leuchtstoffröhren, Typ *58W/60*) bei einer Bestrahlungsstärke von 20 $\mu\text{Mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für 16 Stunden täglich gehalten. Die Pflanzen wurden durch Zerschneiden der Filamente mit Metallnadeln vegetativ vermehrt und in Glasgefäßen von 14,5 cm Durchmesser mit 1,2 Liter Volumen angezogen. Das Kulturmedium bestand aus autoklaviertem Nordseewasser (Salzgehalt 28 ‰), das nach *Saga (1986)* angereichert und alle 5 Tage gewechselt wurde. Unter Rotlicht (*Philips* - Leuchtstoffröhren, Typ *TL 20W/15*) mit einer Bestrahlungsstärke von 10 $\mu\text{Mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für 16 Stunden täglich trugen die Algen nach 28 Tagen virushaltige Gametangien. Die Algenwatten wurden mit einem Nylonnetz mit einer Maschenweite von 0.1 mm aufgesammelt und vorsichtig zwischen Zellstoffpapier angetrocknet, bis die Farbe der Algenmasse von

dunkelbraun nach hellbraun umschlug.

Nach dem Wiegen wurde dieses Material bis zur Präparation auf Eis aufbewahrt, je nach Anzahl der Kulturgefäße wurden Massen zwischen 4 und 20 Gramm Frischgewicht geerntet. Durch lichtmikroskopische Kontrolle wurde sichergestellt, daß nur gut gewachsene und reichlich mit virushaltigen Gametangien besetzte Kulturen weiterverarbeitet wurden.

2.3 Isolation der Viruspartikel

Aus dem Kulturmedium, in dem die Algen aufgezogen wurden, gelang es nicht, Viruspartikel durch Fällung mit herkömmlichen Methoden oder durch Zentrifugation anzureichern. Deshalb mußte nach Methoden gesucht werden, die befallenen Algen schonend aufzubrechen und die Viruspartikel hieraus zu isolieren.

Dabei wurde Wert darauf gelegt, nicht nur die virale Nucleinsäure, sondern intakte Viruspartikel zu isolieren und zu reinigen.

2.3.1 Aufbrechen der Zellen

2.3.1.1 Ultraschall

Zur Zerstörung der Zellwände der Wirtspflanzen wurde ein Ultraschallgerät der Firma B. Braun Melsungen, Typ Braunsonic 300S, mit einer Sonde von 19 mm Durchmesser verwendet, das bei einer Schwingungsfrequenz von 20.000 Hz eine Energie von 100 Watt überträgt. Das Algenmaterial, das nach dem Antrocknen in Würfel mit einer Kantenlänge von 5 - 10 mm geschnitten wurde, befand sich dabei in 35 ml Puffer- oder Meerwasserlösung in einem Aluminiumgefäß mit 3 cm Durchmesser.

Die vorgekühlte Sonde wurde 2 cm weit in die im Eisbad gekühlte Algen-Suspension eingetaucht; die für das Aufbrechen der Wirtszellen benötigte Zeitdauer der Ultraschalleinwirkung wurde durch lichtmikroskopische Kontrolle bestimmt.

2.3.1.2 French-Press

Die Anwendung der French-Press-Methode, bei der die Zellen unter hohem Druck starken Scherkräften ausgesetzt werden, führte zu keinem Erfolg. Bei niedrigem Druck waren die Zellen nicht zu öffnen, während bei hohem Druck (1000 kg cm^{-2}) die Zellen zwar geöffnet wurden, aber keine Viruspartikel daraus zu isolieren waren. Diese Methode wird hier deswegen nicht weiter beschrieben.

2.3.1.1 Mörsern in flüssigem Stickstoff

Eine andere Methode besteht im Zermörsern der Algen in flüssigem Stickstoff. Hierfür müssen die Algen nach dem Antrocknen in kleinere Würfel mit einer Kantenlänge von 2 - 5 mm geschnitten werden, um sie zerstoßen zu können. Auch hier wurde die Zeitdauer des Mörserns durch mikroskopische Kontrolle der Ansätze optimiert. Das zermörserte Material, das schließlich als feines, hellbraunes Pulver vorliegt, wurde in 35 ml Pufferlösung aufgenommen und durch kräftiges Schütteln oder unter Einsatz eines Magnetrührers suspendiert.

2.3.2 Puffersubstanzen

Zur Isolation der Viruspartikel wurden folgende Lösungen verwendet und

durch Autoklavieren sterilisiert:

- 100 mM NaCl, 40 mM Tris (HCl), 5 mM MgCl₂ pH 7,3 oder

- Nordseewasser, 40 mM Tris (HCl), pH 7,3

jeweils mit und ohne die Protease-Inhibitoren Leupeptin (1 µM, *Boehringer*) und Pepstatin (1 µM, *Boehringer*).

2.3.3 Differentielle Zentrifugation

Um Zelltrümmer und Verunreinigungen aus dem Überstand zu entfernen, wurde ein "Swing-out"-Rotor (Sorcal, HB-4) verwendet. Ectocarpus-Homogenisate wurden in Röhrchen mit einem Volumen von 35 ml bei 4 °C für 10 Minuten bei 10.000 g (8.000 U/min) zentrifugiert. Nach dieser Behandlung waren im Überstand noch ca. 20 - 30 % der Mitochondrien vorhanden (Schroer und Schmid, 1989). Die Chloroplasten wurden bei der Präparation zerstört und konnten nicht aus dem Überstand entfernt werden.

2.3.4 Fällung der Viruspartikel

Um die Viruspartikel aus dem Überstand zu isolieren und zu konzentrieren, mußten sie präzipitiert werden. Hierzu eignete sich die Standardmethode nach Maniatis et al. (1982): Fällung mit 10 % Polyethylenglycol 6000 (Serva), wobei zuvor die Lösung auf 500 mM NaCl gebracht wurde. Nach mindestens 1 Stunde auf Eis wurde der Ansatz im HB-4 bei 8.000 U/min und 0 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Wenn Meerwasser zur Präparation verwendet wurde, konnte auf den Einsatz von NaCl verzichtet werden. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und verworfen. Das Zentrifugenröhrchen wurde innen bis zum Pellet getrocknet und kam dann sofort wieder auf Eis. Danach wurde das Pellet mit 1 ml des Aufschluß-Puffers vorsichtig suspendiert.

2.3.5 Gradienten-Zentrifugations-Techniken

Aus linearen oder Stufen - Saccharosegradienten verschiedenster Konzentrationsbereiche konnten in keinem Fall Ectocarpus-Viruspartikel isoliert werden. Auch der Einsatz von Metrizamid, einem nichtionischen Röntgenkontrastmittel, das schon seit längerem mit großem Erfolg in der Dichtegradienten-Zentrifugation verwendet wird (*Rickwood and Birnie, 1975*), führte bis jetzt noch zu keinem befriedigenden Ergebnis. Diese Techniken werden deshalb hier nicht weiter erläutert.

Es gelang jedoch, die Ectocarpus-Viruspartikel in einem Cäsiumchlorid-Dichtestufengradienten (*Maniatis, et al. 1982*) zu präparieren. Hierzu wurde der *Beckman* "Swing-out"- Rotor Typ *SW 40* verwendet, dessen Zentrifugenröhrchen ein Volumen von 12 ml haben. Die Gradienten wurden durch Unterschichten von 5 verschiedenen Dichtestufen (je 2 ml) einer Dichte von 1,45-1,35-1,30-1,25 und 1,20 g/ml gegossen. Die Cäsiumchloridlösungen waren mit 5 mM $MgCl_2$ versetzt und mit 40 mM Tris (HCl) bei pH 7,3 abgepuffert. Zentrifugiert wurde in einer Beckman - Ultrazentrifuge für 2 Stunden bei 67.000 g (20.000 U/min) und 4 °C. Die interessierenden Banden wurden durch Punktieren mit einer Injektionsnadel abgezogen.

2.4 Elektronenmikroskopie

Von einer dialysierten (siehe 2.5) Virusfraktion wurde ein Aliquot von 10 μ l direkt auf ein mit einem dünnen Kohlefilm beschichtetes Kupfernetzchen mit einer Maschenzahl von 300/mm² aufgebracht. Dort wurde es für eine Minute belassen, so daß sich Viruspartikel adsorbieren konnten. Die Kohlebeschichtung darf erst kurz vor der Benutzung aufgebracht werden, da sie nur für kurze Zeit einen für die Adsorption der Viruspartikel günstigen hydrophoben Zustand aufweist. Die nicht adsorbierten Partikel wurden

entfernt, indem das Kupfernetzchen durch einen Tropfen destillierten Wassers gezogen und zurückbleibendes Wasser durch Zellstoffpapier vorsichtig abgesaugt wurde. Dann wurden 10 μ l einer 5 %igen Uranylacetatlösung, die mit Ammoniak auf einen pH von 6,5 eingestellt wurde, aufgebracht und sofort mit Zellstoffpapier wieder abgezogen. Damit wurde verhindert, daß das Kontrastmittel in die Partikel einzieht, was eine positive Kontrastierung erzeugen würde. Bei der angestrebten negativen Kontrastierung ("negative stain") legt sich das Kontrastmittel um die Partikel, trocknet dort an und liefert im Elektronenmikroskop eine Negativabbildung der Umrisse.

Die Präparate der Viruspartikel wurden in einem *Zeiss* - Elektronenmikroskop, Typ *EM 9S*, bei 20.000 facher Vergrößerung beobachtet und fotografiert.

2.5 Biochemische Charakterisierung der Viruspartikel

Die Virusfraktion bestand aus ca. 0,5 bis 1,5 ml. Sie wurde nach dem Punktieren aus dem Cäsiumchlorid-Gradienten über Nacht bei 4 °C gegen 1 Liter Meerwasser dialysiert. Hierfür wurde ein Dialysierschlauch der Firma *Roth*, Typ *8/32 Visking* verwendet. Dieses Material hatte eine Ausschlußgrenze von MG 12.000 bei einer Porenweite zwischen 1,5 nm und 3,0 nm. Nach der Dialyse wurde nochmals mit PEG 6000 gefällt, um die Viruspartikel zu konzentrieren.

2.5.1 Virale Proteine

Um die Virus-Proteine zu charakterisieren, wurde eine Virus-Fraktion aus der Dichte-zentrifugation mit 80 %igem Aceton gefällt. Die Proteinmenge wurde mit dem nach *Peterson (1977)* modifiziertem *Lowry*-Essay bestimmt.

5 µg Protein wurden in einem denaturierenden SDS-Puffer gelöst und in einem 12 %igen Polyacrylamidgel mit diskontinuierlichem Puffersystem nach *Laemmli (1970)* elektrophoretisch aufgetrennt und nach *Heukeshoven (1985)* silbergefärbt.

2.5.2 Virale Nucleinsäure Pulsed-Field-Gradient-Gelelektrophorese (PFGE)

Die eingangs erwähnten Vorarbeiten mit einer befallenen Feldmannia-Art zeigten, daß die isolierte DNA des virus-ähnlichen Partikels eine Länge von ca. 160 kb hat (Abb. 6). Herkömmliche Elektrophoresetechniken, deren Auflösungsgrenze bei einer Länge von 75 kb liegt, können somit nicht eingesetzt werden (*Fangman, 1978* und *Maniatis, et al. 1982*) Noch vor der Isolation des Ectocarpus - Virus wurde deshalb eine Variante der Pulsed-Field-Gradient-Gelelektrophorese-Technik angewandt, mit der hochmolekulare DNA aufgetrennt werden kann. Das Prinzip und die technische Entwicklung werden hier kurz skizziert.

Mit der Einführung der Pulsed-Field-Gradient-Gelelektrophorese, PFGE (*Schwarz and Cantor, 1984*) gelang es erstmals, DNA-Fragmente aufzutrennen, die länger als 75 kb sind. Diese Technik basiert auf der Überlegung, daß die native Struktur langkettiger DNA-Moleküle im elektrischen Feld Konformationsänderungen erfährt, die bei Umorientierung dieses Feldes ein längenabhängiges Relaxationsverhalten mit entsprechender Mobilität im Gel zeigt. Die DNA-Trennung basiert somit auf dem Richtungswechsel des elektrischen Feldes und dem Zeitintervall, das dem Molekül zur Änderung seiner Wanderungsrichtung zur Verfügung steht.

Durch eine ausgeklügelte Elektrodenanordnung versucht man, elektrische Felder zu erzeugen, die die hochmolekulare DNA nicht nur zur Wanderung, sondern auch zu vergleichbaren Gelspurläufen führen soll. Mit der klassischen PFGE gelang dies nicht, da eine starke Bandverzerrung

wie auch ungenügende Vergleichbarkeit der Spuren auftrat.

Mit einer technischen Variante, der Orthogonal-Fiel-Alternation-Gelelektrophorese, OFAGE (Carle and Olson, 1984) verbesserte sich das Laufverhalten der inneren Spuren, die äußeren blieben noch stark verformt. Mit der Field-Inversion-Gelelektrophorese, FIGE (Carle et al. 1986) erkannte man die Notwendigkeit von Intervalländerungen linearer oder logarithmischer Natur, um eine befriedigende Auflösung von DNA in Bereiche bis 1500 kb zu erreichen. Mit den Techniken der Transverse-Alternating-Field-Gelelektrophorese, TAFE (Gardiner et al. 1986) und der Contour-Clamped-Homogenous-Electric-Field-Elektrophorese, CHEF (Chu et al. 1986) konnte man diese Probleme lösen und erreichte Auflösungen bis in den Megabasen-Bereich. Allerdings ist das Auflösungsvermögen durch die relativ kleinen Gelgrößen limitiert, die Trennwinkel sind apparativ bedingt unveränderbar.

Mit der Crossed-Field-Elektrophorese / Rotating-Gel-Elektrophorese, RGE (Southern et al. 1987) und der Rotating-Field-Elektrophorese, RFE (Ziegeler et al. 1987) konnten dann erstmals eine freie Trennwinkelwahl vorgenommen und große Gele (20 x 20 cm) verwendet werden, was das Auflösungsvermögen erheblich steigerte. Allerdings ist die Variierbarkeit der Trennwinkel bei der RGE-Technik durch die Konzeption stark eingeschränkt und es können auch keine Gele unter einer Konzentration von 1,5 % Agarose benutzt werden, da sich das Gel im Unterschied zur RFE-Konzeption im Puffer bewegt und sich daher leicht ablöst, was zu unreproduzierbaren Artefakten führt.

Für die Arbeit mit dem Ectocarpus - Virus stand das Gerät Rotaphor-RFE der Firma Biometra zur Verfügung, das den zur Zeit höchsten Entwicklungsstand dieser Technik repräsentiert und mehrere Vorteile gegenüber anderen Geräten bietet:

- Exakte, lineare Auftrennung von DNA in geraden Banden, im Bereich von 0,1 bis 6000 kb und möglicherweise noch darüber.
- Möglichkeit der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese.

Bei den Arbeiten wurden folgende Marker eingesetzt:

- Isolierte und gereinigte Chromosomen von *Schizosaccharomyces cerevisiae*, Stamm WAY5-4A, mit 13 Banden (225-2300 kb) der Firma *Biometra* und
- Lambda-Konkatemere der Firma *Clontech / Renner*.

Bei Laufdauern der Elektrophorese von 37 Stunden wurde eine gute Auflösung erreicht. Folgende Parameter gewährleisteten eine lineare Auftrennung der DNA im Bereich von 0,1 bis 440 kb: Spannung im elektrischen Feld: 200 V; Zeitintervall: von 30 Sekunden logarithmisch auf 3 Sekunden; Winkelintervall: von 120° auf 95°; Agarosekonzentration: 1 % (*Sigma Typ II*); Elektrophoresepuffer: 25 mM TBE; Temperatur des Puffers: 13 °C.

Die Anwendung der PFGE erforderte eine besondere Präparation der DNA. Sie muß für diesen Zweck in 0,5 %iger "low-melting agarose" eingebettet sein, da flüssiges Auftragen durch die Bewegung des Puffers nicht in Frage kommt. Außerdem ist darauf zu achten, daß die DNA für die PFGE während der Präparation keinen Scherkräften z. B. durch Pipettieren ausgesetzt wird. Dies läßt sich bei der Untersuchung von Virus-DNA dadurch erreichen, daß man die intakten Viruspartikel bei 40 °C in flüssige "low-melting-agarose" einbringt und in Blockformen von je 100 µl Volumen gießt, wo sie erhärten und anschließend weiterverarbeitet werden können. Für diesen Zweck muß "low-melting-agarose" verwendet werden, die keine Hemmstoffe für DNA-modifizierende Enzyme enthält (*LMP-Ultra Pure*, Firma *BRL*). Anschließend werden die Blöcke in 0,5 ml ESP-Puffer (0,5 M EDTA pH 9,0 ; 1 % Na-Lauryl-Sarcosin (*Fluka*); 10 mM Tris pH 9,0 und 2 mg/ml Proteinase-K) überführt. Die Probe bleibt darin für 48 Stunden bei 50 °C (*Barlow and Lehrach, 1986*). Die Proteine werden dabei abgebaut und die DNA aus den Viren freigesetzt. Danach werden die Blöcke in 0,5 M EDTA, pH 9,0 bei 4 °C aufbewahrt und sind so für Monate haltbar. Für die PFGE werden Aliquots der Blöcke auf das Gel aufgetragen. Nach Dialyse gegen Proteinase-Blocker können diese Blöcke und die darin enthaltene DNA auch

DNA-modifizierenden Enzymen ausgesetzt werden (*Smith et al. 1986*).

3 Ergebnisse

3.1 Virus-Präparation

Die drei in der Einführung genannten Aufgabenstellungen konnten im Rahmen dieser Arbeit gelöst werden. Es wurden Kulturbedingungen ausgearbeitet, unter denen ausreichende Mengen an virus-tragendem Algenmaterial erhalten werden können. Mit diesem Material konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, die Viren aus dem befallenen Stamm Ectocarpus siliculosus NZ 15 d2 zu isolieren, zu reinigen und mit molekularbiologischen Methoden weiter zu charakterisieren. Folgende wichtige Punkte müssen bei der Isolation und Reinigung beachtet werden:

- In 35 ml Pufferlösung können nicht mehr als 3,0 g Frischgewicht aufgenommen werden.
- Die Viren aus Gametangien von Ectocarpus siliculosus dürfen nur durch Zermörsern in flüssigem Stickstoff freigesetzt werden, andere Aufschluß-Methoden versagten.
- Bisher ist es nur gelungen, die Viruspartikel durch Zentrifugation in einem Cäsiumchlorid- Stufengradienten mit den Dichtestufen von 1,45-1,35-1,30-1,25 und 1,20 g/ml zu isolieren. Sie bilden eine Bande in der Dichtestufe von 1,35 g/ml.

Mitochondrien, intakt gebliebene Chloroplasten und zelluläre Fragmente schichteten sich darüber, in den Dichtestufen von 1,30 und 1,25 g/ml, ein. Beide verwendeten Pufferlösungen, jeweils mit und ohne Protease-Inhibitoren erwiesen sich als gleichwertig.

3.2 Isolierte Viruspartikel im Elektronenmikroskop

Die isolierten Viruspartikel (Abb. 4) zeigten die gleiche Morphologie wie Viruspartikel in situ (Abb. 2).

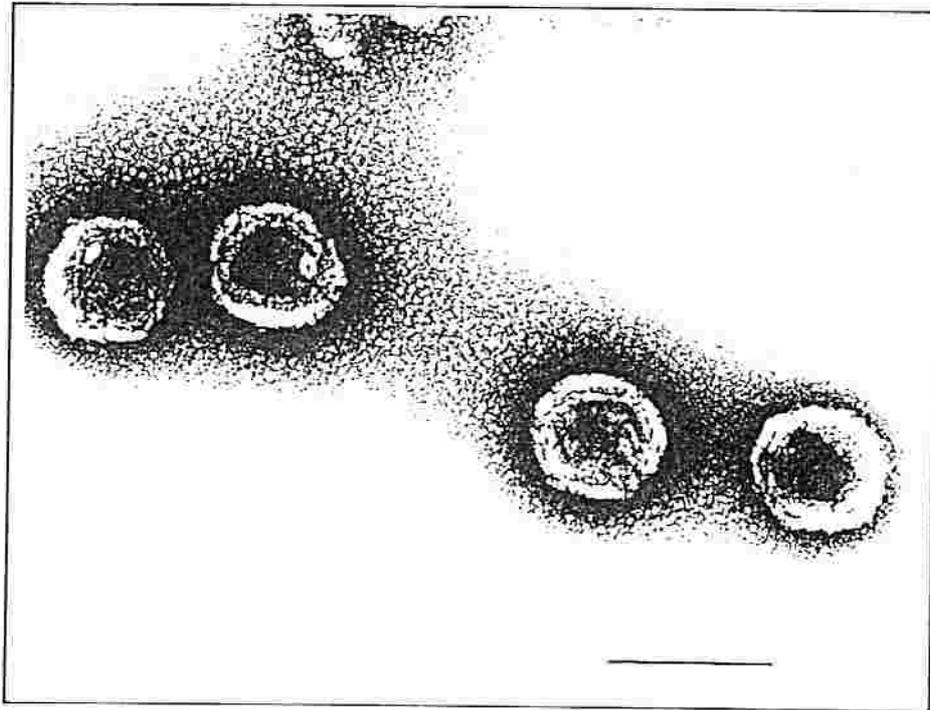


Abb. 4 : Die isolierten Viruspartikel, mit Uranylacetat kontrastiert. Sie zeigen im Elektronenmikroskop die gleiche Morphologie wie in situ (Abb. 2).
Balken : 200 nm.

3.3 Infektionsversuche mit isolierten Viruspartikeln

In 2 Versuchen wurden isolierte Viruspartikel über Nacht gegen Meerwasser dialysiert und mit frisch entlassenen weiblichen Gameten von Ectocarpus siliculosus inkubiert. Die aus diesen Ansätzen erhaltenen Nachkommen (Partheno-Sporophyten) zeigten keine Infektionssymptome. Dieselbe Versuchstechnik mit frischen, auf "natürliche" Weise freigesetzten Viruspartikeln ergab hingegen deutliche Erfolge (*Müller et al. 1990*). Die fehlende Virulenz der isolierten und gereinigten Viruspartikel ist möglicherweise auf eine Schädigung der Viren während der Isolation zurückzuführen.

3.4 Virale Proteine

Das in Abb. 5 gezeigte silbergefärbte Polyacrylamid-Gel zeigt die viralen Proteine, die sich in 15 erkennbare Banden, zwischen ca. 31 bis 98 kDa auftrennen ließen. Die Darstellung der viralen Proteine muß noch weiter verbessert werden; bis jetzt stand dafür nicht genügend Material zur Verfügung.

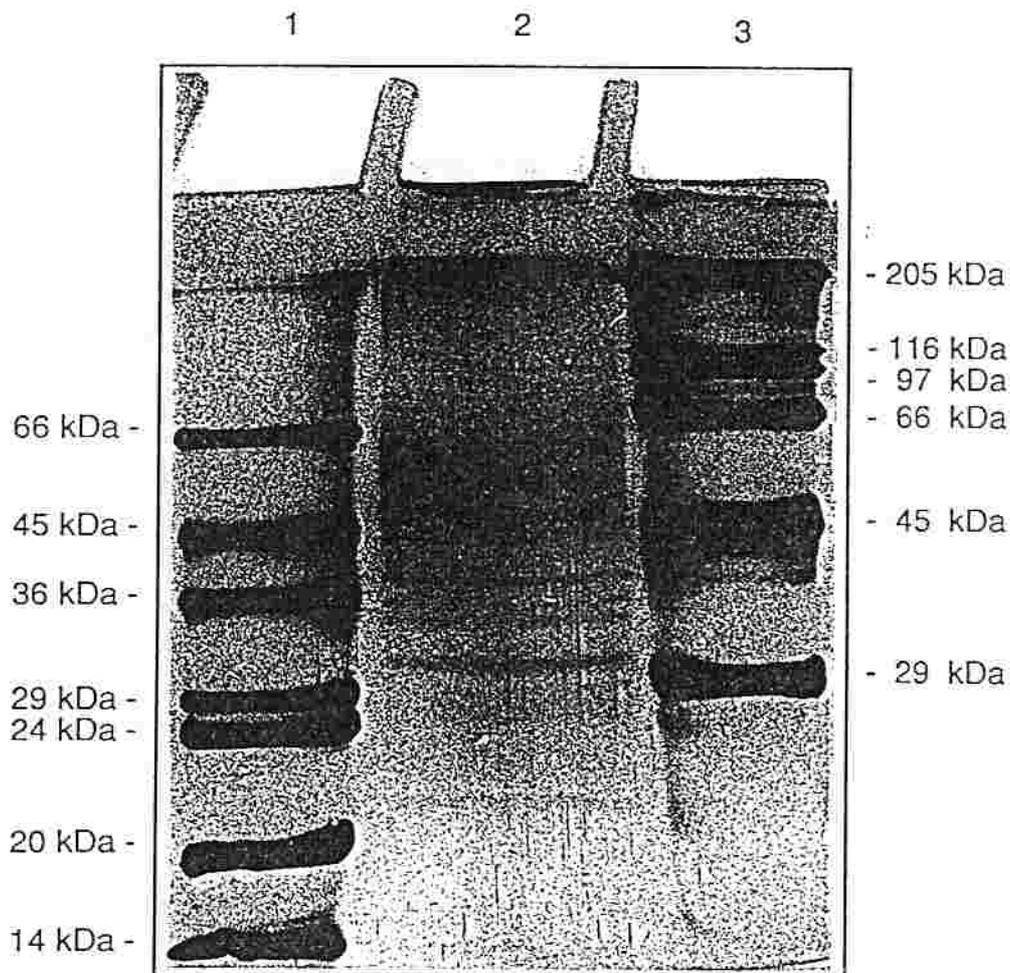


Abb. 5 : *Ectocarpus siliculosus* - Virus-Proteine.

SDS - PAGE nach Laemmli : Sammelgel: 4 % AA, 50 V

Trenngel: 12 % AA, 150 V

Spur 1+3 : Markerproteine

Spur 2 : *Ectocarpus siliculosus* - Virus-Proteine

Dieses Gel wurde von Nora Schroer, AG. Müller angefertigt.

3.5 Virale Nucleinsäure

Mit Hilfe der beschriebenen Methoden konnte die Nucleinsäure aus den isolierten Viruspartikeln gewonnen und charakterisiert werden. Da sie sich mit den Restriktionsenzymen EcoR1 und BamH1 (*Boehringer*) schneiden ließ, muß sie als doppelsträngige DNA vorliegen. Mit der PFGE-Methode konnte die virale DNA elektrophoretisch aufgetrennt werden. Aus ihrem Laufverhalten läßt sich eine Länge von 340 kb ableiten (Abb. 6).

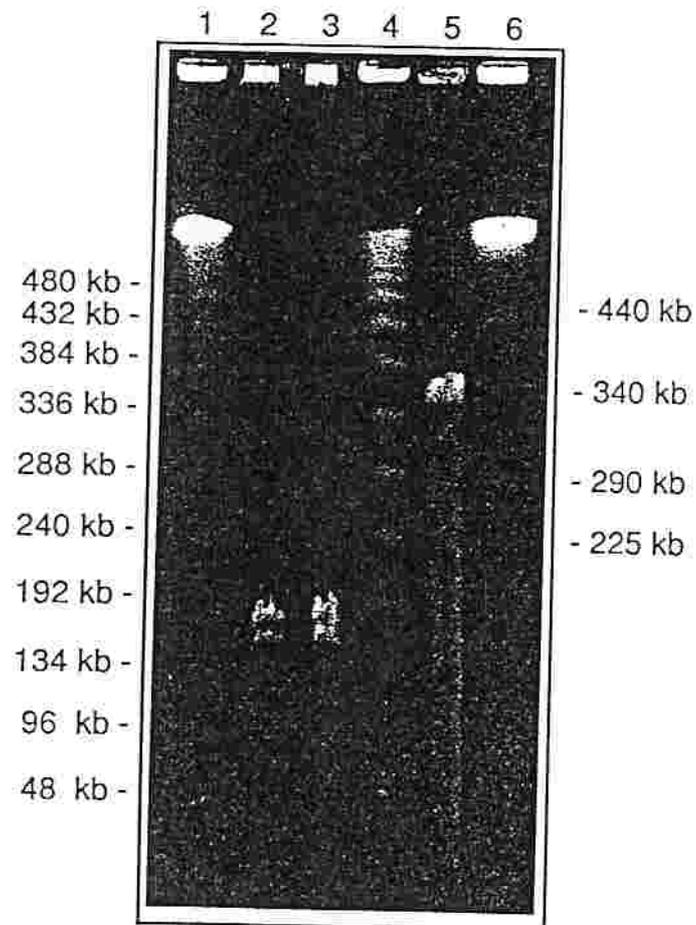


Abb. 6 : Mit Ethidiumbromid gefärbtes PFGE -
Agarose-Gel im UV-Licht.
Spur 1+4 : Marker DNA: Lambda-Konkatemere
Spur 2+3 : *Feldmannia* - Virus-DNA
Spur 5 : *Ectocarpus siliculosus* - Virus-DNA
Spur 6 : Marker DNA: Hefechromosomen

Als Marker wurden hierbei Lambda-Oligomere und Hefe-Chromosomen eingesetzt, deren Längen genau bekannt sind und die im Bereich von 0,1 bis 440 kb linear aufgetrennt werden. Im Vergleich hiermit kann die Länge der Ectocarpus-Virus-DNA mit einer Ablesegenauigkeit von +/- 10 kb bestimmt werden. Der im gefärbten Gel sichtbare Abbau unterhalb der Virus-Bande (Abb. 6) ist wahrscheinlich auf eine Aktivität von Nucleasen bei der Präparation in der "low-melting-agarose" zurückzuführen.

4. Diskussion

Im Verlauf der Experimente zur Ausarbeitung der Methoden gelang die Isolation von Viruspartikeln aus Ectocarpus siliculosus. Es stellte sich heraus, daß eine zu hohe Konzentration an Algen-Homogenisat die Isolation der Viruspartikel verhindert. Die obere Grenze liegt bei 0,1 g Homogenisat (Feuchtgewicht) in 1 ml Puffer. Bei höheren Konzentrationen präzipitierten die Viruspartikel wahrscheinlich schon im ersten Reinigungsschritt zusammen mit anderen zellulären Bestandteilen und gingen dadurch verloren.

Die Isolierung der Viruspartikel war nur dann erfolgreich, wenn der Aufschluß der Algen durch Mörsern in flüssigem Stickstoff vorgenommen wurde. Der Einsatz von Ultraschall zum Öffnen der Algenzellen erschwerte eine Isolierung der Viruspartikel in der Dichtegradienten-Zentrifugation, da eine große Menge verschiedenartiger Zellfragmente sich über den gesamten Dichtebereich des Gradienten erstreckte. Diese Verunreinigungen, Agglomerate aus Polysacchariden, Lipiden und Proteinen, die mit zellulärer DNA assoziiert waren, konnten nicht durch schnelleres Zentrifugieren im ersten Reinigungsschritt beseitigt werden. Nach der anschließenden Fällung mit PEG 6000 gelang die weitere Reinigung bisher nur mit einem Cäsiumchlorid- Stufengradienten, der aus folgenden Dichtestufen bestand: 1,45-1,35-1,30-1,25 und 1,20 g/ml. Die

Viruspartikel bandierten in der Dichtestufe von 1,35 g/ml. Dort waren sie als dünne, weißliche Schicht sichtbar und mit Pigmenten aus der Alge vermischt. Andere Verunreinigungen, Lipide, Proteine, Plastiden und zelluläre DNA, sowie die meisten Pigmente schichteten sich darüber ein. Deshalb mußte über der Virusbande der Dichte von 1,35 g/ml noch ein größeres Volumen an nahe beieinander liegenden Dichtestufen eingesetzt werden. Hierdurch konnte eine "Pfropfbildung" der Verunreinigungen an einem zu großen Dichte-Sprung umgangen werden, die den Durchtritt von Viruspartikeln verhindern würde. Die einzelnen Dichtestufen mußten ein Mindestvolumen von 2 ml haben. Kleinere Volumina beeinträchtigten die Isolation erheblich oder machten sie durch Pfropfbildung ganz unmöglich.

Die Virus-Fractionen konnten mit den angewandten Techniken nicht vollständig von den Algen-Pigmenten gereinigt werden. Deshalb konnte die Menge an isolierten Viruspartikeln spektrometrisch nicht quantifiziert werden. Da die virale DNA bei den Arbeiten im Vordergrund stand, wurde auch keine Protein-Konzentrationsbestimmung vorgenommen.

Das Versagen der Saccharose - Gradienten - Zentrifugation ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß die Viruspartikel in hoher Saccharose-Konzentration dissoziierten.

Die isolierten Viren sind sowohl in Puffer als auch in Meerwasser sehr instabil. In 24 Stunden alten Präparaten waren sie elektronenmikroskopisch nur noch als Bruchstücke zu erkennen.

Das Genom des Ectocarpus - Virus besteht aus doppelsträngiger DNA mit einer Länge von 340 kb. Dabei ist unklar, ob es sich um ein lineares oder ein zirkuläres DNA-Molekül handelt. Sollte das virale Genom als ein zirkuläres und nicht als ein lineares Molekül vorliegen, stimmt die Längenangabe nicht, denn zirkuläre DNA-Moleküle werden in der PFGE nicht entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. Eine noch durchzuführende elektronenmikroskopische Untersuchung der isolierten viralen DNA kann Auskunft darüber geben (*Delius et al. 1984* und *Davis et al. 1968*). Nach Schneiden mit den Restriktionsenzymen EcoR1 und BamH1 tauchte die Virus - DNA - Bande

nicht mehr im Gel auf. Ein Bandenmuster war nach der Restriktion auf dem großen PFGE-Gel nicht sichtbar, weil die Ausgangs- Konzentration an DNA in den Agaroseblöcken zu gering war. In den Agaroseblöcken kann die DNA-Konzentration nicht bestimmt werden. Deshalb waren im Rahmen dieser Arbeit quantitative Angaben zur Ausbeute an viraler DNA nicht möglich.

Da in der Virenfraktion aus dem Cäsiumchlorid-Stufengradienten elektronenmikroskopisch keine Zellorganellen oder Bakterien nachweisbar waren, kann mit großer Sicherheit gesagt werden, daß es sich bei der isolierten 340 kb – DNA um das Genom des Ectocarpus-Virus handelt. Die Virusbande sollte auch nicht mit genomischer DNA oder DNA aus zerstörten Organellen oder Bakterien kontaminiert sein, da DNA in Cäsiumchlorid-Gradienten bei einer Dichte von ca. 1,6 g/ml bandiert (*Schäfer, 1985*). Hochmolekulare DNA konnte im Pellet des Cäsiumchlorid-Stufengradienten nachgewiesen werden. Es handelte sich dabei wohl um zelluläre, Plastiden- und Chloroplasten – DNA, die zusammen mit den Viruspartikeln gefällt wurde. Bisher wurde nur aus 2 Braunalgen Chloroplasten – DNA isoliert. Bei Pilayella littoralis besteht das Plastiden – Genom aus 2 ringförmigen Molekülen von 58 und 133 kb DNA. Bei Dictyota dichotoma hat das ringförmige Plastidengenom eine Länge von 123 kb (*Loiseaux-de Goer, 1988*). Es ist anzunehmen, daß in Ectocarpus siliculosus das Plastidengenom auch eine ähnliche Größe hat. Damit ist unwahrscheinlich, daß es sich bei der isolierten 340 kb – DNA um Chloroplasten – DNA handelt. Aus Braunalgen-Mitochondrien wurde bis jetzt noch keine DNA isoliert, die zu einem Vergleich herangezogen werden könnte.

Der Vergleich des Ectocarpus – Virus mit anderen bekannten Viren ist beim derzeitigen Stand unserer Kenntnisse noch sehr schwierig.

Das Internationale Komitee für die Taxonomie der Viren (International Committee on Taxonomy of Viruses) führt unter pflanzen-pathogenen Doppelstrang – DNA – Viren nur die Blumenkohlmosaik-Viren auf (*Matthews,*

1982). Diese sind aber deutlich vom Ectocarpus – Virus verschieden, da ihre Genomlänge bei 8 kb und der Durchmesser der Viruspartikel bei nur 50 nm liegt (*Fraenkel-Conrat, 1985*). In der Pflanzenviren-Taxonomie bestehen zur Zeit Unsicherheiten, da das zuständige Subkomitee (Plant Virus Subcommittee) des ICTV bis heute keine einheitlichen Nomenklatur-Regeln aufgestellt hat. Viren werden nicht nach Familien, Gattungen und Arten klassifiziert, sondern in losen Gruppen zusammengefaßt. Dies macht einen Vergleich verschiedener Viren sehr schwierig und ist auch Gegenstand von Kontroversen zwischen den beteiligten Taxonomen (*Francki et al. 1985*).

Die Pflanzenviren werden derzeit in 24 Gruppen und 2 Familien eingeteilt. Dazu kommen weitere bisher nicht klassifizierte Gruppen. Das Ectocarpus – Virus zeigt zu keiner dieser Gruppen eine engere Beziehung. Auch die neuesten Monographien über aquatische Viren (*Block and Schwartzbrod, 1989*) und Viren allgemein (*Hull et al. 1989*) führen nicht weiter. Sie zitieren nicht einmal die schon lange publizierten Resultate über Algenviren.

Unter den Viren eukaryotischer Algen (Dodds, 1983) sind bisher nur 3 bekannt, deren Genom aus doppelsträngiger DNA (dsDNA) besteht. Diese sind das Cylindrocapsa – Virus (Hoffman and Stanker, 1976), das Uronema – Virus (Cole et al. 1980) und die Hydra viridis- bzw. Chlorella – Viren (*Van Etten, 1987*). Das Uronema – Virus ist deutlich vom Ectocarpus – Virus verschieden, da es eine Genomlänge von 115 kb und einen Kapsid-Durchmesser von 390 nm aufweist. Das Cylindrocapsa – Virus besitzt ein 280 bis 300 kb langes Genom und zeigt einen Kapsiddurchmesser von 200 bis 230 nm. Mit 10 Proteinen in einem Bereich von 10 bis 160 kDa, unterscheidet es sich jedoch deutlich vom Ectocarpus – Virus mit mindestens 15 Proteinen (31 bis 98 kDa). Dies und der bis heute fehlende Nachweis der Virulenz des Cylindrocapsa – Virus (Stanker and Hoffman, 1981) lassen einen weiteren Vergleich mit dem Ectocarpus – Virus als unergiebig erscheinen.

Interessanter erscheinen die Ähnlichkeiten zwischen den Chlorella -

Viren und dem Ectocarpus – Virus in Bezug auf das Genom. 30 inzwischen isolierte Chlorella – Viren-Typen besitzen ein Genom mit einer Länge zwischen 330 und 380 kb bei einem Durchmesser der Viruspartikel von 150 bis 190 nm (*Rohozinski et al. 1989*). Da es sich im Gegensatz zum Ectocarpus – Virus aber um lytische Viren handelt, die aus mindestens 50 Strukturproteinen im Bereich von 10 bis 82 kDa aufgebaut sind (*Skrdla et al. 1989*), erscheint eine enge Beziehung dieser beiden Virus – Typen eher fraglich. Mit Hilfe von Hybridisierungs-Versuchen klonierter DNA-Fragmente der zu vergleichenden Algen-Viren könnten in Zukunft eventuelle Homologien herausgearbeitet werden. Gemeinsamkeiten der Chlorella – Viren mit einigen Iridoviren (*Reiser, 1989a*) in Bezug auf das Methylierungsmuster der genomischen DNA und der Kapsid-Zusammensetzung und strukturelle Ähnlichkeiten der Algenviren mit den Iridoviren könnten durch gemeinsame Abstammung dieser beiden Virengruppen erklärt werden (*Reiser, 1989b*).

Iridoviren sind ikosaederförmige Desoxyriboseviren, die als Familie der Iridoviridae zusammengefaßt werden. Viren aus den Unterfamilien Iridovirinae und Chloriridovirinae wurden aus einer Vielzahl von Invertebraten isoliert. Die Viren der Gattungen Ranavirinae und Lymphocystivirinae befallen hauptsächlich Amphibien und Fische. Das Genom besteht, je nach Art, aus einer dsDNA der Länge zwischen 160 und 400 kb. Die Viruspartikel zeigen einen Durchmesser von 125 bis 300 nm und haben eine durchschnittliche Dichte von 1,16 bis 1,35 g/ml (*Fields and Knipe, 1985, Geißler, 1986* und *Hull et al. 1989*).

Nicht zuletzt durch das Fehlen von Fossilien ist bis heute noch kein Stammbaum der Viren erstellt worden (*Franki, 1989*). Da über Viren in Algen bislang nur sehr wenige Daten vorliegen (*Ushiyama, 1985*), ist die Frage nach ihrer evolutionären Herkunft ungeklärt.

Eine enge Beziehung des Ectocarpus – Virus mit Viren, die Pilze befallen, ist unwahrscheinlich, da die Genome der bisher isolierten Pilz-Viren aus RNA bestehen (*Buck, 1986*). Eine Verwandtschaft des Ectocarpus – Virus mit

Cyanophagen ist ebenfalls unwahrscheinlich: Das aus isolierten Cyanophagen gewonnene dsDNA-Genom hat eine Länge von ca. 45 kb (*Sherman and Brown, 1978* und *Bancroft and Smith, 1989*).

Die Arbeiten mit dem Ectocarpus – Virus werden weitergeführt. Dabei stehen zunächst eine Verbesserung der Isolations-Techniken und die Klonierung der viralen DNA im Vordergrund. Die Charakterisierung der viralen DNA, wobei den Endstrukturen eine besondere Bedeutung zufällt, ist das nächste Nahziel. Die Struktur der Enden kann Auskunft über den Mechanismus der Integration und/oder der Replikation der viralen DNA geben. Weiterhin soll untersucht werden, ob es sich bei dieser auffällig langen Virus-DNA um ein selbständig replizierendes episomales Element handelt oder ob diese DNA während des Infektionsprozesses ins zelluläre Genom integriert wird.

Das Ectocarpus-Virus-System eignet sich für diese Untersuchungen in besonderer Weise. Erstens handelt es sich bei diesem System, um eine stabile übertragbare Infektion, bei der sich die Viren ausschließlich in den reproduktiven Organen des Wirtes vermehren (*Müller et al. 1990*). Zweitens kann die Ausbreitung des Ectocarpus-Virus sowohl horizontal über Vermehrung somatischer Zellen, als auch vertikal, durch Neu-Infektion und auch durch die Keimbahn hindurch, stattfinden (*Müller, 1989*).

5 Zusammenfassung

Eine Klonkultur der marinen Braunalge Ectocarpus siliculosus aus Neuseeland ist von einer Virus-Infektion befallen. Das Virus wird nur in den Gametangien des Wirtes gebildet. Es wurden Methoden ausgearbeitet, dieses Material in großen Mengen zu kultivieren, um die Viren isolieren zu können. Der Aufschluß mußte in flüssigen Stickstoff vorgenommen werden. Die Fragmente der Wirtszellen wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Aus dem Überstand wurden die Viruspartikel mit PEG 6000 gefällt. Sie bandierten nach 2 Stunden Zentrifugation (67.000 g) in einen Cäsiumchlorid-Stufengradienten in der Dichtestufe von 1,35 g/ml.

Die isolierten Viruspartikel konnten im Elektronenmikroskop dargestellt werden und zeigten die gleiche Morphologie wie in situ. Eine Neu-Infektion gesunden Algen-Materials mit den isolierten Viruspartikeln war bisher nicht möglich. Die bisher nachgewiesenen 15 viralen Proteine haben Molekulargewichte zwischen 31 und 98 kDa. Das virale Genom, eine doppelsträngige DNA mit einer Länge von 340 kb konnte aus den Viruspartikeln isoliert und mit der Pulsed-Field-Gradient-Gelelektrophorese-Technik dargestellt werden.

6 Literatur

- Bancroft, I., and Smith, R.J., - Restriction mapping of genomic DNA from five cyanophages infecting the heterocystous cyanobacteria *Nostoc* and *Anabaena*. *New Phytol.* 113 (1989), 161-166.
- Barlow, D., and Lehrach, H., - Pulsed Field Gel Analysis Of Mammalian DNA. Private manuscript, not published (1986).
- Block, J.C., and Schwarzbrod, L., - *Viruses In Water Systems. Detection and Identification.* VCH Publishers, Inc. Weinheim FRG 1989.
- Buck, K.W., - *Fungal Virology.* Boca Raton, Fl., CRC- Press-Inc. 1986.
- Carle, G.F., and Olson, M.V., - Separation of Chromosomal DNA Molecules from Yeast by Orthogonal-Field-Alternation-Gel-Electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 12 (1984), 5617-5661.
- Carle, G.F., Frank, M., and Olson, M.V., - Electrophoretic Separations of Large DNA Molecules by Periodic Inversion of the Electrical Field. *Science* 232 (1986), 65-68.
- Chu, G., Vollrath, D., and Davis, R.W., - Separation of large DNA Molecules by Contour Clamped Homogeneous Electric Fields. *Science* 234 (1986), 1582-1585.
- Clitheroe, S.B., and Evans, L.V., - Viruslike Particles In The Brown Alga *Ectocarpus*. *J. Ultrastructure Research* 49 (1974), 211-217.
- Cole, A., Dodds, J.A., and Hamilton, R.I., - Purification and some properties of a double-stranded DNA containing virus-like particles from *Uronema gigas*, a filamentous eucaryotic green alga. *Virology* 100 (1980), 166.
- Davis, R.W., Simon, M., and Davidson, N., - Electron microscopy heteroduplex methods for mapping regions of base sequence homology in nucleic acids. *Methods Enzymol.* 21 (1968), 413-428.
- Delius, H., Darai, G., and Flügel, R.M., - DNA Analysis of Iridescent Virus 6: Evidence for Circular Permutation and Terminal Redundancy. *J. Virology* 49(2) (1984), 609-614.
- Dodds, A.J., - New Viruses Of Eukaryotic Algae And Protozoa. In R. Matthews, ed., *A Critical Appraisal Of Viral Taxonomie*, pp 177-188. Boca Raton, Fl., CRC-Press-Inc. 1983.

- Fangman, W.L., - Separation of very large DNA molecules by gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 15 (1978), 653-665.
- Fields, B.N., and Knipe, D.M., - *Fundamental Virology*. Raven Press, New York 1986.
- Fraenkel-Conrat, H., - *The Viruses. Catalogue, Characterization, And Classification*. Plenum Press, New York 1985.
- Francki, R.I.B., Milne, R.G., and Hatta, T., - *Atlas of Plant Viruses, Volume 1*. Boca Raton, Fl., CRC-Press-Inc. 1985.
- Gardiner, K., Laas, W., and Patterson, D., - Fractionation of large Mammalian DNA Restriction Fragments Using Vertical Pulsed-Field-Gradient-Gel-Electrophoresis. *Somatic Cell Molec. Genet.* 12 (1986), 185-195.
- Geißler, E., - *Fachlexikon ABC Virologie*. Verlag Harri Deutsch. Thun, Frankfurt / M. 1986
- Heukeshoven, J., and Dernick, R., - Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamid gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6 (1985), 103-112.
- Hull, R., Brown, F., and Payne, C., - *Virology. Directory & Dictionary of Animal, Bacterial and Plant Viruses*. Macmillan Press Ltd., London and Basingstoke 1989.
- La Claire II, J.W., and West, J.A., - Virus-Like Particles in the Brown Alga *Streblonema*. *Protoplasma* 93 (1977), 127-130.
- Laemmli, V.K., - Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970), 680-685.
- Lemke, P.A., - Viruses Of Eukaryotic Microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* 30 (1976), 105-145.
- Loiseaux-de Goer, S., Markowicz, Y., Dalman, J., and Audren, H., - Physical maps of the two circular plastid DNA molecules of the brown alga *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. *Curr Genet* 14 (1988), 155-162.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J., - *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, 1982.
- Markey, D.R., - A Possible Virus Infection in the Brown Alga *Pylaiella littoralis*. *Protoplasma* 80 (1974), 223-232.

- Matthews, R.E.F., - Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the international Committee on Taxonomie of Viruses. Intervirology 17 (1982).
- Müller, D.G., - Generationswechsel, Kernphasenwechsel und Sexualität der Braunalge *Ectocarpus siliculosus* im Kulturversuch. *Planta* 75 (1967), 39-54.
- Müller, D.G., - Studies on sexual compatibility between *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae) from Chile and the Mediterranean Sea. *Helgoländer Meeresuntersuch.* 42 (1988), 469-476.
- Müller, D.G., - Persönliche Mitteilung (1989).
- Müller, D.G., Kawai, H., Stache, B., and Lanka, S., - A Virus Infection in the Marine Brown Alga *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae). *Bot. Acta* (1990), in press.
- Oliveira, L., and Bisalputra, T., - A Virus Infection in the Brown Alga *Sorocarpus uvaeformis* (Lyngbye) Pringsheim (Phaeophyta, Ectocarpales). *Ann. Bot.* 42 (1978), 439-445.
- Peterson, G.L., - A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which is More Generally Applicable. *Anal. Biochem.* 83 (1977), 346-356.
- Reiser, W., - Chlorella-Viruses: A New Group of Plant Viruses. *Bot Acta* 102 (1989a), 117-118.
- Reiser, W., - Protokoll des Rundgespräches der DFG: Phytotoxische Planktonblüten. Am 28. bis 29.5.1989 in Bonn (1989b).
- Rickwood, D., and Birnie, G.D., - Metrizamide, A New Density-Gradient Medium. *FEBS Letters* 50(2) (1975), 102-110.
- Rohozinski, J., Girton, L.E., and Van Etten, J.L., - Chlorella Viruses Contain Nonpermuted Double-Stranded DNA Genomes with Covalently Closed Hairpin Ends. *Virology* 168 (1989), 363-369.
- Saga, N., - Pure culture of algae. In Yamoda, Y. and Okada, Y., eds., *Plant Biotechnology*. Tokyo Kajaku Dojin, Japan (in press).
- Schäfer, K.P., - Grundlegende Methoden der molekularen Genetik. In T. Knippers, *Molekulare Genetik*, Seite 343-407. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 1985.
- Schroer, N., and Schmidt, C., - Persönliche Mitteilung (1989).

- Schwarz, D.C., and Cantor, C.R., - Separation of Yeast Chromosome-Sized DNAs by Pulsed Fielding Gradient gel Electrophoresis. *Cell* (1984), 67-75.
- Skrdla, M.P., Burbank, D.E., Xia, Y., Meints, R.H., and Van Etten, J.L., - Structural proteins and lipids in a virus, PBCV-1, which replicates in a *Chlorella*-like alga. *Virology* 135 (1984), 308-315.
- Slanker, L.H., Hoffman, L.R., and MagLeod, R., - Isolation and partial chemical characterization of a virus-like particle from a eukaryotic alga. *Virology* 114 (1981), 357.
- Smith, C., Warburton, P.E., Gaal, A., and Cantor, C.R., - Analysis of Genome Organisation and Rearrangement by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. *Genetic Engineering*. Vol. 8 (1986), Newark, N.J., Plenum Press.
- Southern, E.M., Anand, R., Brown, W.R.A., and Fletcher, D.S., - A Model for the Separation of Large DNA Molecules by Crossed Field Gel Electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 15 (1987), 5925-5943.
- Toth, R., and Wilce, R.T., - Viruslike Particles In The Marine Alga *Chorda Tomentosa* Lyngbye (Phaeophyceae). *J. Phycol.* 8 (1972), 126-130.
- Ushiyama, R., - Viruses in fungi and eucaryotic algae: their possible origins and evolution. *Microbiol. Sci.* 2 (1985), 181-184.
- Van Etten, J. L., Xia, Y., and Meints, R.H., - Viruses of a *Chlorella*-like Green Alga. Kosuge, T. And Nester, E. W. eds., *Plant-microbe interactions 2*. Chapter 10, 307-325. Macmillan Publishing Co. New York 1987.
- Ziegeler, A., Geiger, K.H., Ragoussis, J., and Szalay, G., - An New Electrophoresis Apparatur for Separating Very Large DNA Molecules, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 25 (1987), 578-579.

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt.

Konstanz, den 28.12.1989

Stefan Lanka