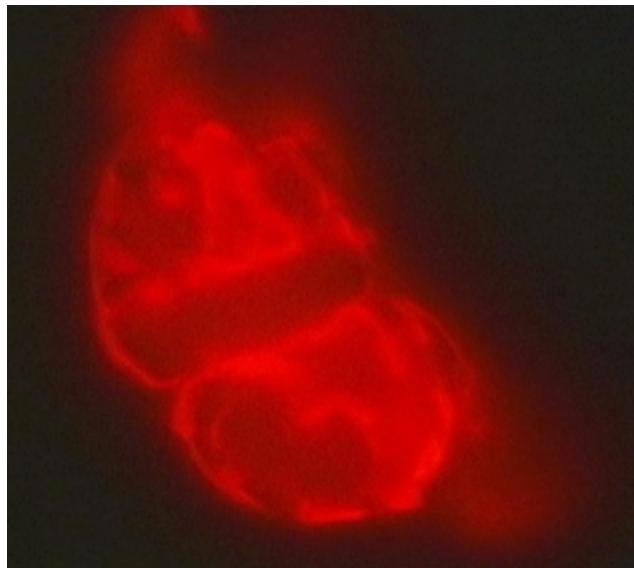


Entsprechen minizirkuläre Elemente dem Plastidengenom Peridinin-haltiger Dinoflagellaten?



Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Thomas Laatsch
aus Düsseldorf

Düsseldorf, 2001

Wer denkt etwas zu sein, hat aufgehört etwas zu werden.....

?.?.

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Referent:	Prof. Dr. K.V. Kowallik
Koreferent:	Prof. Dr. W. Martin
Tag der mündl. Prüfung:	30.11.2001

1. EINLEITUNG	1
DIE EVOLUTION DER PLASTIDEN, ODER: WIE WIRD AUS EINEM CYANOBAKTERIUM EIN CHLOROPLAST?	1
VOM CYANOBAKTERIELLEN CHROMOSOM ZUM PLASTIDENGENOM;.....	5
WAS ERKLÄRT DIE REDUKTION DER CHLOROPLASTENGENOME?.....	6
DINOFLAGELLATEN, DER WEIßE FLECK IN DER PLASTIDENEVOLUTION	7
ZIELSETZUNG	9
2. MATERIAL UND METHODEN	10
2.1. WAHL DER UNTERSUCHUNGSOBJEKTE	10
2.2. KULTIVIERUNG VON PERIDININ-HALTIGEN DINOFLAGELLATEN	12
2.2.1. Kulturmedien	12
2.2.2. Wachstumsbedingungen.....	13
2.3. GEWINNUNG RESTRIKTIONSFÄHIGER DNA MIT DER CTAB-METHODE (MURRAY UND THOMPSON, 1980; MILLIGAN, 1989).....	13
2.4. REKOMBINANTE PHAGEN-BANK.....	13
2.4.1. Immobilisierung, Hybridisierung von rekombinanten Phagenplaques	14
2.5. ISOLATION UND REINIGUNG DER CHLOROPLASTEN AUS <i>CERATIUM HORRIDUM</i>	14
2.5.1. DNase I-Behandlung von isolierten Chloroplasten	15
2.6. KOMBINierter CSCL-GLEICHGEWICHTS-DICHTEGRADIENT MIT ETHIDIUMBROMID UND BISBENZIMID	15
2.6.1. Dialyse	17
2.7. GELELEKTROPHORESE UND GELDOKUMENTATION	17
2.8. RESTRIKTION VON NUKLEINSÄUREN	18
2.9. ELUTION VON dsDNA AUS AGAROSEGELEN	18
2.10. DEPHOSPHORYLIERUNG VON VEKTOREN	18
2.11. HERSTELLUNG CHEMISCH-KOMPETENTER <i>E. COLI</i> ZELLEN MIT CaCl_2 , RbCl_2 UND HERSTELLUNG ELEKTROKOMPETENTER ZELLEN	18
2.12. TRANSFORMATION VON KOMPETENTEN BAKTERIEN.....	19
2.13. PRÄPARATION VON PLASMID-DNA AUS <i>E. COLI</i>	19
2.14. PRÄPARATION EUKARYOTISCHER PLASMIDE	19
2.15. PCR (POLYMERASE KETTEN REAKTION); DOP-PCR; RAPD; RACE	20
2.16. KLONIERUNG	21

2.17. SOUTHERNBLOTTING (SOUTHERN, 1975).....	21
2.17.1. Herstellung radioaktiver DNA-Sonden und Aufreinigung über eine Sephadex G50-Säule	22
2.17.2. Hybridisierung (mod. nach Sambrook et al., 1989).....	22
2.18. DNA-SEQUENZIERUNG (SANGER ET AL., 1977)	23
2.19. GPS-TRANSPOSONTAGGING	23
2.20. ELEKTRONENMIKROSKOPIE	23
2.21. <i>IN SITU</i> IMMUNOGOLD HYBRIDISIERUNG.....	24
2.22. FLUORESCENZMIKROSKOPIE	24
2.23. ABSORPTIONSMESSUNGEN.....	24
2.24. DOKUMENTATIONEN.....	24
2.25. COMPUTERPROGRAMME	25
3. ERGEBNISSE.....	26
3.1. WAHL DER UNTERSUCHUNGSOBJEKTE	26
3.1.1. Identifizierung von <i>Ceratium horridum</i> als Peridinin-haltigen Dinoflagellaten	26
3.2. HERSTELLUNG HOMOLOGER GENSONDEN	28
3.3. HYBRIDISIERUNG DER PCR-SONDEN AN GESAMT-DNA DER VERSCHIEDENEN DINOFLAGELLATEN	31
3.4. HYBRIDISIERUNGEN GEGEN REKOMBINANTE PHAGENBANK	35
3.5. INVERSE PCR ZUR VERVOLLSTÄNDIGUNG DES PSBC-ZIRKEL	37
3.6. AUFREINIGUNG DER <i>PYROCYSTIS LUNULA</i> PLASMIDE ÜBER EINEN KOMBINIERTEN CSCL-GRADIENTEN	39
Sequenzwiederholungen in <i>Pyrocystis lunula</i>	43
3.7. AUFREINIGUNG DER DINOFLAGELLATEN-PLASMIDE MIT HILFE DER PLASMIDPRÄPARATION	45
16S rRNA	47
23S rRNA	48
psaA	48
psaB	48
psbB	49
psbC	51

<i>psbD</i>	51
<i>petB</i>	52
<i>ycf16</i> und <i>ycf24</i>	53
Plastidengen-freier Zirkel.....	54
3.7.1. Untersuchungen zur Core-Region	55
3.8. ZELLFRAKTIONIERUNG VON <i>CERATIUM HORRIDUM</i>	58
3.9. LOKALISATION DER MINIZIRKEL UND BESTÄTIGUNG DER HOCHMOLEKULAREN PLASTIDEN-DNA	60
3.10. LOKALISATION DER MINIZIRKEL DURCH <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG	61
3.11. DIE „WAHRE“ PLASTIDEN-DNA PERIDININ-HALTIGER DINOFLAGELLATEN	62
3.11.1. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit Bisbenzimid	62
3.12. GEWINNUNG MOLEKULARBIOLOGISCHER DATEN DER „WAHREN“ PLASTIDEN-DNA	64
4. DISKUSSION	66
4.1. VERGLEICH DER MINIZIRKEL MIT REZENTEN PLASTIDENGENOMEN	67
4.2. VERGLEICH DER MINIZIRKEL BEI PERIDININ-HALTIGEN DINOFLAGELLATEN	76
4.3. LOKALISATION DER MINIZIRKEL	79
4.4. WIE PASSEN DIE MINIZIRKEL IN DAS BILD DER EVOLUTION VON CHLOROPLASTENGENOMEN?	85
4.5. DIE WAHRE PLASTIDEN-DNA	86
ZUSAMMENFASSUNG	88
LITERATUR	89
ANHANG	105
ABBKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1311

1. Einleitung

Die Evolution der Plastiden, oder: Wie wird aus einem Cyanobakterium ein Chloroplast?

Der Ursprung und die Evolution der Plastiden war lange Zeit Anlass für kontroverse Diskussionen zwischen Morphologen und biochemisch/molekularbiologischen Arbeitsgruppen. Eingeleitet wurde die Periode vor über hundert Jahren durch die Morphologen Schimper und Schmitz (1883). Schmitz erkannte durch Untersuchungen an Süßwasser- und Meeresalgen, dass die Chloroplasten autonome Zellorganellen darstellen und nicht *de novo*, sondern durch Teilung auseinander hervor gehen. In seiner Arbeit über „Die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper“ wies Schimper (1883) als erster darauf hin, dass die Plastiden, wenn sie in Eizellen von Pflanzen nicht neu gebildet werden, in ihrer Beziehung zu dem sie enthaltenden Organismus an eine Symbiose erinnern. Mereschkowsky (1905) vermutete in Cyanobakterien den möglichen Vorläufer der Plastiden, entgegen der bis dahin vorherrschenden Theorie, dass sich „die Chromatophoren aus dem farblosen Plasma des Zelleibes differenzieren“ (Wilson, 1902).

Mereschkowsky (1905) erklärte die verschiedenen Plastidentypen durch Aufnahme verschiedener Cyanobakterien durch heterotrophe Wirte und stellte die Hypothese auf, dass es sechs bis neun unabhängige primäre prokaryotisch/eukaryotische Endosymbiosen gegeben haben muss, an denen mindestens drei verschiedene prokaryotische Organismen beteiligt waren. Sie sollen die Vorläufer der drei großen Linien, d.h. der Rhodophyten, der Chromophyten und der Chlorophyten gebildet haben. Diese Ansätze wurden in den frühen Siebzigern wieder aufgenommen und führten zur Diskussion der multiplen primären Endocytobiosen (polyphyletischer Ursprung) und zur Suche nach anderen photoautotrophen Prokaryoten als Plastidenvorläufer (Raven, 1970; Whatley *et al.*, 1979; Margulis, 1981; Morden und Golden, 1989,1991). Die Polyphyly fand ihre Anhänger, weil eine Erklärungsnot bestand, alle Chloroplastentypen in einen direkten Zusammenhang mit den Blaualgen zu bringen, da sich die Chloroplasten im Pflanzenreich bezüglich der Pigmentierung, der Lage der Thylakoide und der Zahl der die Plastiden umgebenden Membranen unterscheiden.

Mit der Charakterisierung von Chloroplastengenomen (Plastomen) verloren die Gedanken zur polyphyletischen Chloroplastenentstehung immer mehr an Halt.

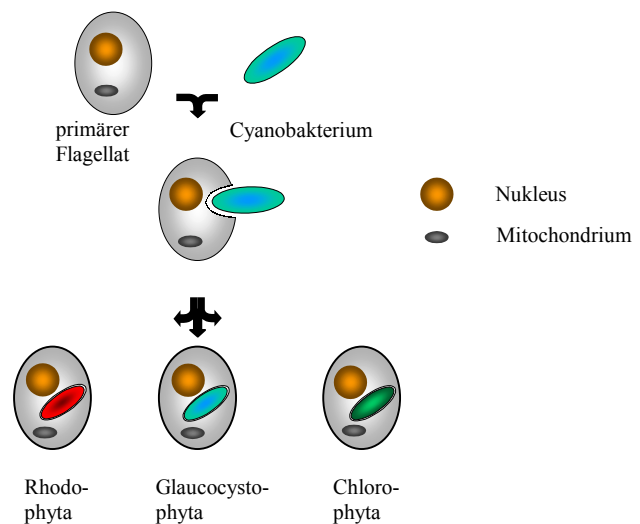
Die Analyse von Gengehalt, Genverlusten und Genanordnungen in vollständig sequenzierten Chloroplastengenomen aus fast allen Algenlinien sprechen eindeutig für die Entstehung aller Plastome aus einer primären Endocytobiose (Martin *et al.*, 1998; Stoebe und Kowallik, 1999), bei der ein Cyanobakterium durch einen heterotrophen Wirt aufgenommen und zur Plastide reduziert wurde.

Aus dem „gemeinsamen Chloroplasten-Vorläufer“ bildeten sich drei Chloroplastenlinien, die sich in den Rotalgen, den Glaucocystophyceen und in den Grünalgen widerspiegeln.

Diese primären Plastiden sind durch ihre doppelte Hüllmembran charakterisiert. Wahrscheinlich entspricht die äußere Plastidenmembran der äußeren Membran des phagocytierten Cyanobakteriums und die innere seiner Plasmamembran (Cavalier-Smith, 1982, 1993b).

Die Cyanellen, die Plastiden der Glaucocystophyta, werden als ursprünglich betrachtet, da sie u.a. Relikte der Peptidoglukanschicht des einverleibten Cyanobakteriums zwischen den beiden Membranen behielten (Schenk, 1970, 1994; Löffelhardt *et al.*, 1994, 1997). Auch vom Aussehen und der Feinstruktur ist die Cyanelle einem Cyanobakterium sehr ähnlich.

Die Plastiden der Rotalgen (Rhodophyta) gelten demgegenüber durch das Fehlen eines Mureinsacculus als fortgeschrittener. Sie besitzen neben dem ubiquitär verbreiteten Chlorophyll a noch die in Phycobilisomen organisierten Phycobiliproteine als akzessorische Pigmente (van den Hoek, 1995;

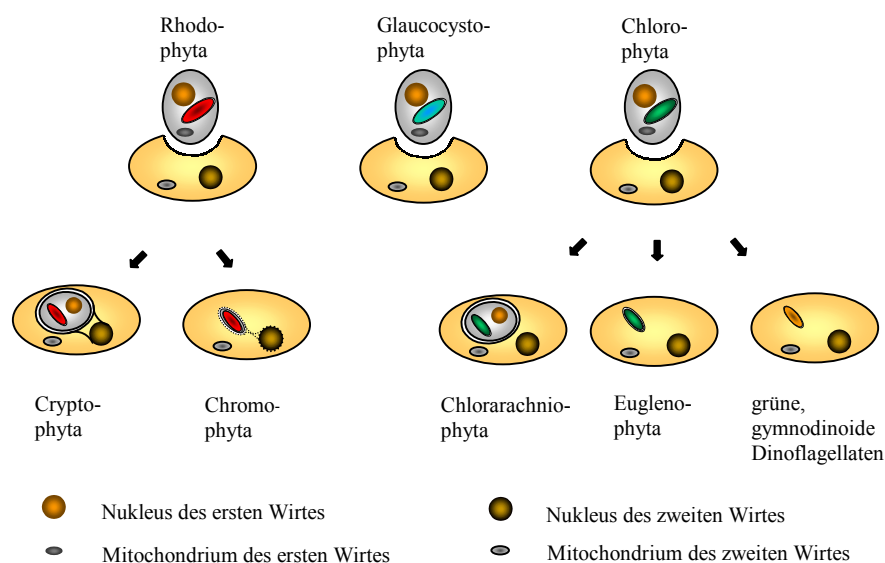


Darstellung der primären Endocytobiose zwischen einem heterotrophen eukaryotischen Wirt und einem Cyanobakterium und der daraus resultierenden Algenlinien.

Araoz *et al.*, 1998). Diese sind in den Grünalgen (Chlorophyta) verlorengegangen. Hier hat sich neben dem Chlorophyll a das Chlorophyll b etabliert. Von den Grünalgen leiten sich die Chloroplasten der Metaphyten (Landpflanzen) ab.

Das Szenario der Plastidenevolution blieb nicht auf der Ebene der primären Endocytobiose stehen, sondern setzte sich in multiplen sekundären Endocytobiosen fort. Hierbei wurden photoautotrophe Eukaryoten aus der primären Endocytobiose in heterotrophe Eukaryoten aufgenommen (Gibbs, 1981). Im Extremfall wurde der Endosymbiont im Laufe der Zeit bis auf eine komplexe Plastide reduziert, d.h. es entstand ein Organell mit drei oder auch vier Membranen.

Vertreter der Chlorophyta wurden mehrfach unabhängig von heterotrophen Wirten einverleibt, und es entstanden die gymnodinoiden Dinoflagellaten, deren Plastiden zwei Hüllmembranen besitzen, die Euglenophyceen (Gibbs, 1978) mit drei Plastidenmembranen und die Chlorarachniophyceen mit einem zwischen zweiter und dritter Hüllmembran gelegenen reduzierten primären Wirt, der im periplastidären Raum durch 80S Ribosomen und dem reduzierten Zellkern (Nukleomorph) repräsentiert wird.



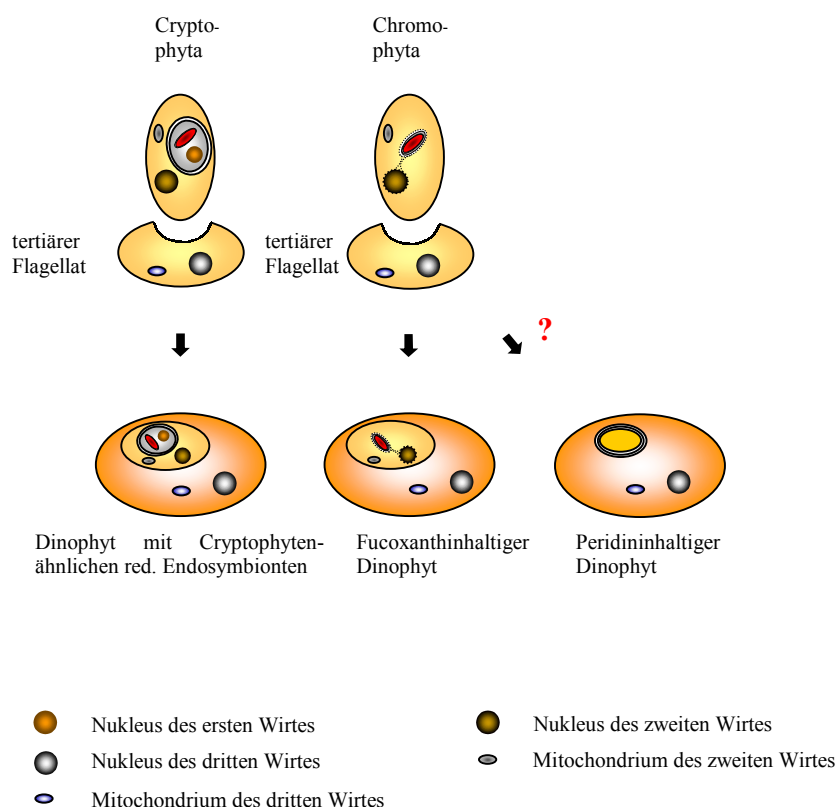
Schema der sekundären Endocytobiose. Die drei Linien der primären Endocytobiose wurden jeweils von einem eukaryotischen heterotrophen Wirt einverleibt und es entwickelten sich die dargestellten Algengruppen.

Aus Rotalgen entstanden durch die sekundäre Endocytobiose die Chromophyta mit ihren vier Plastidenhüllmembranen (Kowallik, 1993, 1997), wobei die äußere Membran als Chloroplasten-ER bezeichnet wird, da sie mit dem endoplasmatischen Reticulum verbunden ist und Ribosomen auf ihrer Oberfläche trägt. Die Chloroplasten der

Cryptophyta, die auch auf endosymbiontische Rotalgen zurückgehen, besitzen, ähnlich denen der Chlorarachniophyta, noch einen rudimentären Kern (Nukleomorph) des primären Wirtes (Gillot und Gibbs, 1980; Häuber *et al.*, 1994; Gilson und McFadden, 1997).

Die tertiäre Endocytobiose ist in ihrer Komplexität noch wenig verstanden. Als Ergebnis der tertiären Endocytobiose werden verschiedene Gruppen der Dinoflagellaten angesehen (Delwiche, 1999). Hier sind Individuen entstanden, die sich aus bis zu sechs verschiedenen genetischen Kompartimenten zusammensetzen.

Es existieren Dinoflagellaten, die offensichtlich das Resultat einer Endocytobiose eines heterotrophen Wirtes mit einer Cryptophycee sind (Ludwig und Gibbs, 1985; Douglas, 1992). Bei den Fucoxanthin-haltigen Dinoflagellaten lässt sich der Endosymbiont von Chromophyceen ableiten (Dodge, 1971; Tomas *et al.*, 1973; Chesnick, 1997). Bei den



Schema der tertiären Endocytobiose. Eine Cryptophycee bzw. eine Chromophycee wurde von einem eukaryotischen heterotrophen Wirt einverleibt und es entwickelten sich die dargestellten Algengruppen.

genannten tertiären Symbiosen sind von den Endosymbionten sowohl der Zellkern als auch die Mitochondrien des sekundären Wirtes erhalten geblieben. Im Fall der cryptophytischen Linie existiert sogar noch der Kern des primären Wirtes.

Es ist noch unklar, ob die Peridinin-haltigen Dinoflagellaten das Ergebnis einer tertiären Endocytobiose sind. Favorisiert wird

die Idee, dass die Peridinin-haltigen Dinoflagellaten durch eine sekundäre Endocytobiose entstanden sind (Bhattacharya und Medlin, 1995; Melkonian, 1996; Medlin *et al.* 1997).

Neuere Daten zeigen, dass sich die Peridinin-haltigen Dinoflagellaten eventuell von den Dinophyten mit Cryptophyten-ähnlichen Endosymbionten ableiten haben könnten (Kowallik, pers. Mitteilung).

Vom cyanobakteriellen Chromosom zum Plastidengenom; Wie evolvierte das Blaualgengenom?

Es ist generell akzeptiert, dass die Chloroplasten aus einem cyanobakteriellen Endosymbionten entstanden sind. Dabei wurde das zirkuläre cyanobakterielle Genom, wenn man von der Größe rezenter Blaualgengenome (Herdman *et al.*, 1979; Bancroft *et al.*, 1989; Chen und Widger, 1993; Schyns *et al.*, 1997) von etwa 3-13 Megabasen ausgeht, auf zirka 100-200kb zum rezenten Chloroplastengenom reduziert.

Für die Aufgabe als photosynthetisches Organell blieben dem Endosymbionten nach einem massiven Genverlust und einem Gentransfer zum Wirtsgenom im wesentlichen die Schlüsselproteine des Photosyntheseapparates, die F_1F_0 ATP-Synthase, zahlreiche Proteine für Transkription/Translation, ribosomale und transfer-RNAs, zwei hypothetische Leserahmen mit unbekannter Funktion (*ycf4* und *ycf9*) und die große Untereinheit der Ribulose-bisphosphat-carboxylase (Sugiura, 1992; Stirewalt *et al.*, 1995; Reith und Munholland, 1995; Glöckner *et al.*, 2000). In der Regel blieben den Chloroplastengenomen 60-210 kodierende Gene und so insgesamt nur 1-5% der Kodierungskapazität eines cyanobakteriellen Genoms (Martin, 1998b).

Eine Chloroplastengenomreduktion auf 35 Kilobasen ist in der Gruppe der Apicomplexa erfolgt, bei dem Erreger der Toxoplasmose *Toxoplasma gondii* und dem Malaria Parasiten *Plasmodium falciparum* (Wilson *et al.*, 1996). Das zirkuläre 35kb große DNA-Molekül befindet sich in einem Organell (Apicoplast), welches von vier Hüllmembranen umgeben ist.

Die Anzahl der Hüllmembranen ist konsistent mit dem Ereignis einer sekundären Endocytobiose. Bei diesem photosynthetisch nicht mehr aktiven Organell handelt es sich nach Köhler *et al.* (1997) um eine stark reduzierte Grünalge, wahrscheinlicher ist aber, dass es sich um eine stark reduzierte Rotalge handelt (Stöbe und Kowallik, 1999).

Was erklärt die Reduktion der Chloroplastengenome?

In erster Linie wird die Reduktion von Chloroplastengenomen durch Genverlust und Gentransfer zum Kern verursacht.

Genverluste sind in der Regel weniger aufschlussreich. Wird hingegen der Gentransfer zum Kern nachgewiesen, kann dies einen Rückschluss geben, warum bestimmte Gene nicht mehr in den Plastiden kodiert sind (Stöbe *et al.*, 1999).

Es scheint, dass Gene mit regulatorischen Funktionen eher in den Kern transferiert werden als Gene mit enzymatischen oder strukturellen Funktionen (Herrmann, 1997). Dies trifft z.B. für die γ -Untereinheit der Chloroplasten ATPase (*atpC*), für das *clpC* der *clp*-Protease (Martin *et al.*, 1998) und auch für die regulatorische Untereinheit der RuBisCO (*rbcS*) zu. Für den Transfer dieser und natürlich auch anderer Plastidengene zum Kern spricht, dass redox-assoziierte Funktionen in den Organellen eventuell die Konzentrationen an DNA-schädigenden freien Radikalen erhöhen und es dadurch zu einer Mutagenese der Plastidengene kommen kann (Allen und Raven, 1996).

Eine elegante Erklärung für den Gentransfer ist der Ansatz von Muller (1964). Durch den Verlust der Individualität als freilebendes Bakterium auf dem Weg zur Plastide hin kam es zur einer genetischen Isolation. Dies impliziert zugleich ein Stadium, welches nur eine asexuelle Vermehrung gestattet. Auf Grund des fehlenden genetischen Austausches kommt es zur einer Akkumulation „stiller“ Mutationen (Muller's ratchet) (Moran, 1996). Diese Anhäufung würde zwangsläufig zur Auslöschung dieses Organells führen. Mit der Verlagerung der Gene in den Kern werden diese wieder in den rekombinativen Zustand (sexuelle Vermehrung) versetzt.

Die einzige Schwachstelle in dieser Erklärung ist, dass die Zahl der Nukleotidsubstitutionen im Chloroplasten geringer ist als die im Kern (Wolfe *et al.*, 1987). Kompensiert wird das asexuelle Stadium zudem durch die Polyploidie der Chloroplasten,

die es erlaubt, durch Rekombinationen der Chloroplastengenome fehlerhafte Allele auszusortieren (Fischer *et al.*, 1996)

Dinoflagellaten, der weiße Fleck in der Plastidenevolution

Bei der Erforschung der Chloroplastengenome wurde die Gruppe der Dinoflagellaten stark vernachlässigt. Insbesondere die Plastidengenome der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten sind insofern interessant, da ihre Stellung in der Chloroplastenphylogenie noch nicht eindeutig festgelegt werden konnte.

Hinzu kommt, dass die Peridinin-haltigen Dinoflagellaten eine sehr merkwürdige Algengruppe darstellen, die in fast allen Belangen anders ist als andere. Um Chloroplastengenome von Dinoflagellaten zu erforschen, muß man die außergewöhnlichen Eigenschaften der Dinoflagellaten kennen.

Nach Cavalier-Smith sind die Dinoflagellaten wie auch die Sporozoen (Apicomplexa) Angehörige der Gruppe der Alveolaten, in die auch die Ciliaten fallen und die als gemeinsames Merkmal kortikale Alveoli besitzen (Cavalier-Smith, 1991, 1993a, 1998).

Dinoflagellaten sind einzellige, eukaryotische Organismen. 50% der rezenten Vertreter leben photosynthetisch. Sie kommen in Marine- und Süßwasserhabitaten vor. Nach den Kieselalgen zählen sie zu den größten Primärproduzenten des Phytoplanktons in unseren Weltmeeren.

Dinoflagellaten zeigen sich hinsichtlich ihrer Morphologie extrem vielfältig (Kofoid, 1928). Generell besitzen Dinoflagellaten einen Panzer aus Zelluloseplatten, die auch zur Einteilung und Wiedererkennung im Tabulatsystem (Kofoid 1907, 1909; Loeblich, 1965) und damit zur Identifizierung der einzelnen Spezies verwendet werden können. Zur Fortbewegung dienen vielen Dinoflagellaten eine tranverse (richtungsstabilisierende) und eine longitudinale (schubgebende) Geißel.

Zytologisch gesehen unterscheiden sich die Dinoflagellaten von allen anderen photosynthetischen Organismen dadurch, dass ihre Chromosomenzahl von einigen

Dutzend bis zu eintausend variiert (Loeblich, 1976). Die Chromosomen liegen im permanent kondensierten Zustand vor und besitzen keine typischen Histone (Loeblich, 1976; Sala-Rovira, 1991; Ausseil, 1999) und keine Zentromere. Stabilisiert wird die Struktur wahrscheinlich durch bivalente Kationen, speziell Ni, Fe, Cu, Zn, Ca, Mg (Sigee, 1986) und einer speziellen Art von RNA (Soyer-Gobillard und Herzog, 1985). Es ist unklar, warum die Kernchromosomen in ihrer Organisation eher prokaryotischen als eukaryotischen Genomen ähneln. Raikov (1995) erklärt diese Ähnlichkeit durch einen sekundären Verlust der Histone bei Dinoflagellaten und eine konvergente Entwicklung zu den prokaryotischen Genomen.

Fast zwangsläufig ist die mitotische Zellteilung der Dinoflagellaten sehr ungewöhnlich (Soyer-Gobillard *et al.*, 1990, 1999; Bouligand und Norris, 2001). Die Kernmembran bleibt während der Teilung erhalten. Die Mikrotubuli durchtunneln den Kern und kommen zudem ohne Zentriolen aus (Oakley und Dodge, 1976), die eher im Zytoplasma als im Kern liegen (entgegen den geschlossenen Mitosen der Euglenoiden).

Üblicherweise haben Dinoflagellaten ein bis zwei Chloroplasten, die wie bei den Euglenoiden meist von drei Hüllmembranen umgeben sind. Eine Ausnahme stellen hier die Dinoflagellaten aus grünen sekundären Endosymbiosen mit zwei Hüllmembranen dar.

Die Thylakoide der Plastiden sind meist in Zweier- oder Dreierstapeln und seltener in Granastapeln angelegt. Das dominanteste Xanthophyll in der Gruppe der photosynthetisierenden Dinoflagellaten ist das Peridinin (Jeffrey *et al.*, 1975).

Auch biochemisch und molekularbiologisch stellen die Peridinin-haltigen Dinoflagellaten eine Besonderheit dar. Kernkodierte Plastidengene werden als Polyproteine in die Chloroplasten importiert (Hiller, 1995).

Die Ribulosebisphosphatcarboxylase (RuBisCO) wird als Form II RuBisCO bezeichnet, da sie in ihrer Sequenz homolog zur der L2-Typ RuBisCO von α -Proteobakterien ist (Morse, 1995; Rowan, 1996; Jenks, 2000). Gemeinsam mit den α -Proteobakterien ist auch, dass sie sich nur aus großen Untereinheiten zusammensetzt, die bei den Dinoflagellaten tandemartig im Kern kodiert sind (Rowan, 1996).

Über die Plastidengenome der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten war bis vor kurzen kaum etwas bekannt. Boczar (1991) zeigte durch Restriktionsanalysen, dass die Plastidengenome

von *Protogonyaulax catenella*, *P. tamarensis* und *Glenodinium* sp. eine Größe von etwa 114 bis 125kb haben.

Seit kurzem liegen die ersten Ergebnisse zum Plastidengenom von Peridinin-haltigen Dinoflagellaten vor. So konnte gezeigt werden, dass bei den Dinoflagellaten *Heterocapsa triquetra* und *Amphidinium operculatum* eine „ein Gen, ein Zirkel“ Organisation der Plastidengene existiert (Zhang *et al.*, 1999, 2000; Barbrook und Howe, 2000). Die bisher etwa ein Dutzend gefundenen typischen Plastidengene wurden über die Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) gewonnen, die zwar aussagt, dass diese Gene vorhanden sind, aber nicht ihre Lokalisation in der Zelle beschreibt.

Aus phylogenetischen Analysen wird für die Plastiden der Dinoflagellaten eine Verwandtschaft mit den chromophytischen und rhodophytischen Algen vermutet (Zhang *et al.*, 1999). Nach Fast *et al.* (2001) sind die Plastiden der Apicomplexa und die der Dinoflagellaten das Ergebnis einer einmaligen Endocytobiose, welche sich relativ früh in der eukaryotischen Evolution ereignete.

Zielsetzung

Es existierte zu Beginn dieser Arbeit über die Plastome von Peridinin-haltigen Dinoflagellaten keinerlei Information, lediglich Teilsequenzen der ribosomalen RNAs waren bekannt. Erschwert wurden Untersuchungen vor allem durch die Separation plastidärer DNA von nukleärer bzw. mitochondrialer DNA. Voraussetzung für eine erfolgreiche Trennung sind die unterschiedlichen Dichten der DNAs, aber die Unkenntnis über die Schwebedichten der verschiedenen DNAs von Peridinin-haltigen Dinoflagellaten verhinderte eine erfolgreiche Separation der Plastiden-DNA. Mit den bisher benutzten Peridinin-haltigen Dinoflagellaten war es zudem nicht möglich eine Zellfraktionierung erfolgreich durchzuführen.

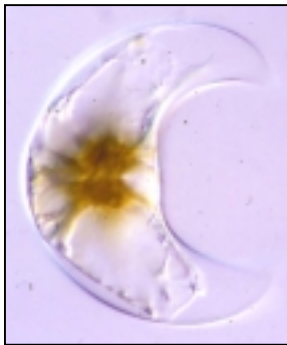
In den ersten Schritten sollten deshalb Phagenbanken aus Gesamt-DNA der Dinoflagellaten angelegt werden und mit homologen Gensonden entsprechende Bereiche des Chloroplastengenoms aus dieser Bank extrahiert werden.

Andere Methoden sollten entwickelt, verbessert und etabliert werden, um eine Aufreinigung der Chloroplasten-DNA der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten zu ermöglichen. Die aufgereinigte Plastiden-DNA der Dinoflagellaten sollte dann auf Struktur, Organisation und Gengehalt des Chloroplastengenoms hin untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Wahl der Untersuchungsobjekte

Es wurden fünf verschiedene Peridinin-haltige Dinoflagellaten in dieser Arbeit verwendet. Die Auswahlkriterien der Dinoflagellaten kamen zum Teil erst durch das methodische Vorgehen in dieser Arbeit zustande. Dabei wurden die jeweiligen Vorteile der verwendeten Arten genutzt.



Lichtmikroskopische Aufnahme von *Pyrocystis lunula* in enzystierten Zustand als halbmondförmige Zelle. Vergrößerung 400x

Pyrocystis lunula gehört zu den ubiquitär vorkommenden Dinoflagellaten, die in Meereswassern der subtropischen als auch gemäßigten Zonen zu finden ist. Sie liegt meist auf dem Grund der euphotischen Zone (Apstein, 1909; Sukhanova, 1973). Die halbmondförmige Ruhezyste stellt die zeitlich überwiegende Erscheinungsform von *P. lunula* dar. Sie ist im Durchschnitt etwa 90µm groß. Die asexuelle Reproduktion erfolgt über ein bis zwei gymnodinoide Schwärmer (~20µm), die sich innerhalb der Zystenwand der Mutterzelle entwickeln. Nach Aufbrechen der Zystenwand, was wahrscheinlich enzymatisch vonstatten geht, werden die begeißelten Schwärmer freigesetzt und schwimmen einige

Sekunden herum, um dann die Geißeln abzuwerfen und innerhalb kürzester Zeit (5-10min) wieder auf die Größe und Form der Mutterzelle heranzuwachsen.

Die „weiche Hülle“ (Schütt, 1895) der halbmondförmigen Zyste stellt ein Kuriosum dar. Sie ist resistent gegen Säuren und Basen und zusätzlicher Erhitzung. Analysen haben gezeigt, dass die Zellwand aus mehreren Komponenten besteht, aus zwei Schichten fibrillär angeordneter Zellulose und einer abschließenden chemisch resistenten Schicht aus Fettsäuren und Proteinen (Swift, 1970).

Der Zellkern von *Pyrocystis lunula* liegt zentral in der Zyste, die zwei Chloroplasten strömen bei moderaten Lichtverhältnissen in die lobenförmigen Plasmaverzweigungen. Bei

zu hoher Lichtintensität ziehen sich die Chloroplasten in die Mitte zum Zellkern hin zurück.

Ceratium horridum hat eine Größe von etwa $230\mu\text{m}$ – $260\mu\text{m}$. Charakteristisch sind die drei an den Enden offenen Hörner, die in ihrer Länge variieren können und wahrscheinlich Auswirkung auf das Schweben/Sinkverhalten haben (Kofoid, 1908). Das eigentliche Schwimmverhalten entsteht durch die Längs- und die Quergeißeln mit denen sich die Zellen etwa $0,03 - 0,12\text{mh}^{-1}$ fortbewegen (Peters, 1929). Die asexuelle Teilung geht asymmetrisch vonstatten, in der die Quertfurche als Sollbruchstelle dient. Die beiden Tochterzellen besitzen somit ein bzw. zwei Hörner und bilden die fehlenden nach. Eine Besonderheit von *C. horridum* ist es, dass er viele Chloroplasten besitzt anstelle der üblichen ein bis zwei bei Dinoflagellaten.



Ceratium horridum
400fach vergrößert.

Charakteristisch sind die langen Hörner. Unten links ist die Längsgeißel zu erkennen.



800fache Vergrößerung von *Prorocentrum micans*. In der Zelle ist die große Pusule zu erkennen. Die Geißeln befinden sich apikal (rechts oben).

Prorocentrum micans ist zirka $40\text{--}50\mu\text{m}$ groß und einer der bestuntersuchtesten Dinoflagellaten. Der apikale Sporn ist ein taxonomisches Merkmal für Prorocentrum. Morphologisch unterscheiden sich die Prorocentrales von anderen Dinoflagellaten dadurch, dass sie keine Gürtelfurche oder Sulkus besitzen. Die beiden Geißeln sind apikal inseriert. Die Theka besteht aus zwei großen Platten (Valven) und einigen kleineren um die flagellaren Poren (periflagellare Plättchen) herum. Die Prorocentrales besitzen zwei Chloroplasten die lobenförmig den Halbschalen anliegen (Dodge, 1973). Sein mengenmäßig großes Vorkommen im Sommer und Herbst in Form der roten Tiden geht mit einem großen Fischsterben einher.



Phasenkontrastaufnahme von *Amphidinium carterae* zirka 800fach vergrößert.

Amphidinium carterae ist einer der bekanntesten Dinoflagellaten. *A. carterae* ist bis zu 20µm groß und ist in Brackwassern zu finden, kommt aber auch an sandigen Stränden vor (Taylor, 1971). Er hat im Labor eine Generationszeit von 1½ Tagen und besitzt keinen Zellulosepanzer, was die Präparation vereinfacht. *Amphidinium carterae* besitzt nur eine Plastide, die in der Peripherie der Zelle liegt. *Amphidinium carterae* ist nicht axenisch zu kultivieren (Nayak *et al.*, 1997).

Mit *Thecadinium inclinatum* wurde ein Dinoflagellat untersucht, von dem noch nicht viel bekannt war. Gefunden wurde er 1997 von Herrn Prof. Kowallik in Roscoff (Ile de Bas). Bei Ebbe traten große Ansammlungen dieser goldgelben Organismen aus dem Sand hervor. Isoliert wurde *T. inclinatum* von Frau Dr. Stöbe und identifiziert von Herrn Dr. Wenderoth. Beschrieben ist dieser Dinoflagellat in Balech (1956, 1959) als zugehörig zu den *Peridinales*. *Thecadinium inclinatum* zeigt eine ausgeprägte Phototaxis, die u.a. zur Ernte verwendet wurde.

2.2. Kultivierung von Peridin-inhaltigen Dinoflagellaten

2.2.1. Kulturmedien

Die Kulturlösung für die Anzucht der Algen wird auf der Basis natürlichen Seewassers hergestellt (Schreiber, 1927). Dieses stammt aus dem Gebiet um die Ile de Bas aus der französischen Bretagne.

Die Aufbereitung, Reinigung, Sterilisation und die Zugabe von Additiven und Vitaminen wird wie in Laatsch (1997) beschrieben durchgeführt.

Künstliches Seewasser (hergestellt aus „Tropic-marin“-Salz, Firma: Dr. Biener GmbH-Aquariertechnik, Wartenberg) hat sich als gute Alternative herausgestellt. Nach Einwaage

von 33,3g Tropic-marin-Salz pro Liter Millipore-Q-Wasser und Einstellen des pH-Wertes auf 7,2 bis 7,5 ist die weitere Vorgehensweise analog zum natürlichen Seewasser.

Im Falle von *Ceratium horridum* hat sich gezeigt, dass 10ml Laubextrakt pro Liter Kulturmedium zu einer schnelleren Teilungsrate führt.

2.2.2. Wachstumsbedingungen

Die Dinoflagellatenkulturen werden bei einer Temperatur von 16-18°C und einer Beleuchtungsstärke von 10-20µE angezogen. Die Beleuchtungsperioden sind im Zeitraum von 8Uhr bis 22Uhr (14:10, L:D) festgelegt. Circadiane Rhythmen, ob im Tagesverlauf oder Jahreszeitenabhängig, müssen berücksichtigt werden.

2.3. Gewinnung restriktionsfähiger DNA mit der CTAB-Methode (Murray und Thompson, 1980; Milligan, 1989)

Zur Gewinnung restringierbarer DNA hat sich die Lyse mit dem Detergenz Hexadecyltrimethyl-ammoniumbromid (CTAB) als sehr erfolgreich erwiesen.

Hartschalige Dinoflagellaten wie *Pyrocystis lunula* werden vor der Lyse mit CTAB in flüssigem Stickstoff gemörser. Fragile Dinoflagellaten und isolierte Plastiden können direkt in CTAB-Lösung (2% CTAB; 100mM Tris/HCl pH 8.0; 20mM Na₂EDTA; 1,4M NaCl; 0,2%β-MET) lysiert werden.

Die Methode wird durchgeführt wie in Laatsch (1997) beschrieben.

2.4. Rekombinante Phagen-Bank

Zur Erstellung einer genomischen Bank wurde das Lambda Dash® II/BamHI Vektor System von Stratagene verwendet. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. 1µg Gesamt-DNA von *Pyrocystis lunula* wurden mit BamHI bzw. BglII restringiert und jeweils in 0,5µg BamHI restringierten Lambda/Dash Vektor ligiert.

Für die *in vitro* Verpackung der λ-DNA kam das Gigapack® III Gold von Stratagene zur Anwendung. Das Amplifizieren, die Titerbestimmung und das Austesten der Phagen wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.4.1. Immobilisierung, Hybridisierung von rekombinanten Phagenplaques

Die Untersuchung nach homologen DNA-Fragmenten geschah mit Hilfe der Southern-hybridisierung und radioaktiv markierten Sonden.

Ausplattierte Phagenplaques wurden auf BioTraceTM Nitrozellulose Rundfilter (Firma Pall Gelman Sciences) abgezogen, vorbehandelt und hybridisiert nach Sambrook *et al.* (1989).

Signalgebende Phagenplaques wurden ausgestochen und ein zweites Mal in Bakterien transfiziert.

Aus den hieraus resultierenden positiven Plaques wurden die rekombinanten DNAs nach Sambrook *et al.* (1989) präpariert.

2.5. Isolation und Reinigung der Chloroplasten aus *Ceratium horridum*

Zur Trennung der Plastiden von übrigen Zellbestandteilen wird ein Percollgradient (Amersham Pharmacia Biotech; Dichte 1,13g/ml; Osmolarität <25mOs/kg H₂O) benutzt.

Der Vorteil eines Percollgradienten gegenüber anderen Gradienten liegt in seiner geringen Osmolarität, die entscheidenden Einfluss auf die Intaktheit der Plastiden hat.

Alle nachfolgenden Schritte werden bei 4°C durchgeführt und lichtmikroskopisch kontrolliert.

Durch zweimaligen Hub des Kolbens in einem Glaspotter werden angereicherte Ceratienzellen (ca. 50-100ml gut wachsende Kulturen) in 2ml Isolationsmedium aufgeschlossen. Dieses Homogenat wird durch eine 20µm Gaze „gesiebt“, um größere Zellbestandteile, wie große Zelluloseplatten und Hörner zurückzuhalten. Der Durchfluss, der u.a. die Plastiden enthält ist anschließend für 5min bei 3400xg zu zentrifugieren. Die Plastiden, kontaminierende Mitochondrien, vielleicht noch intakte Kerne und übriggebliebene kleinere Zellwandbestandteile befinden sich im Sediment. Im Überstand verbleiben cytoplasmatische und zerstörte Zellkompartimente.

Der Überstand muss vollständig entfernt sein, bevor das Sediment in 150µl Isolationsmedium vorsichtig resuspendiert wird.

Diese Resuspension wird auf 500µl einer 30%igen Percolllösung (Percoll/Isolationsmedium) aufgeschichtet und 10min bei 4000xg zentrifugiert. Die lichtmikroskopisch intakten und sauberen Plastiden finden sich im Sediment wieder.

Für eine weitere DNase I-Behandlung werden die Plastiden in 50-100µl Isolationsmedium resuspendiert. Ansonsten wird die Lyse mit der CTAB Methode durchgeführt.

Wichtig:

- a) Schonendes Pottern resultiert in weniger aufgeschlossenen Zellen; zu häufiges Pottern vermindert die Ausbeute an intakten Chloroplasten.
- b) Werden anfänglich ältere Kulturen benutzt, führt die hohe Stärkeeinlagerung in den Dinoflagellaten dazu, dass im Percollgradienten ein weißes Sediment entsteht, welches schwer von den ebenfalls sedimentierenden Plastiden zu trennen ist.

2.5.1. DNase I-Behandlung von isolierten Chloroplasten

Die DNase-Behandlung von isolierten Chloroplasten ist ein Kompromiss zwischen dem optimalen Puffer- und Temperaturbedingungen sowie der Inkubationszeit der DNase und der Stabilität der Chloroplasten bei diesen Bedingungen. Jede Volumenvergrößerung mit Puffern und dem damit auch verbundenen Anstieg der Ionenkonzentration als auch Temperaturen über 4°C vermindern die Anzahl der intakten Chloroplasten.

Durchgeführt wurde die Plastidenbehandlung mit DNase I der Firma Promega. Auf 50µl Plastidenlösung kamen 1/10 Volumen DNase-Puffer der Hersteller-Firma und 3-10U DNase I (pro 20µl Plastidensuspension). Es wurde 15min auf Eis inkubiert.

2.6. Kombiniertes CsCl-Gleichgewichts-Dichtegradient mit Ethidiumbromid und Bisbenzimid

Standardmäßig wird für eine isopyknische Zentrifugation Cäsiumchlorid (CsCl) eingesetzt. Cäsium-Ionen bilden in den benutzten Schwerfeldern aufgrund ihrer hohen Ionenmasse innerhalb eines entsprechenden Zeitintervalls stehende Gradienten aus.

Abhängig von der Ausgangsdichte entstehen Gradienten im Bereich von 1,0-1,9g/ml (Alberts *et al.*, 1995; Knippers, 1995). Makromoleküle sedimentieren in diesen Gradienten so lange, bis eine Schwebelage (eigene Dichte gleich der Umgebungsdichte) erreicht ist. Verantwortlich für Dichteunterschiede bei DNAs sind ihre Konformation und Basenzusammensetzung. Die Dichte steht in einem linearen Zusammenhang zum molekularen Anteil an GC-Paarungen (Schildkraut *et al.*, 1962; Knippers, 1995).

Für die Auftrennung von Dinoflagellaten DNA wurden zwei gekoppelte isopyknische Zentrifugationen durchgeführt.

In einem ersten Gradienten wird ein unkooperativ interkalierender Farbstoff (Ethidiumbromid) verwendet, der durch seinen molekularen Aufbau in der Lage ist, eine Basenpaarung zu simulieren. Der Einschub des Ethidiumbromid in die DNA-Doppelhelix bewirkt eine Aufweitung des DNA-Moleküls und führt damit zu einer Herabsetzung der Dichte, die u.a. abhängig ist von der Konformation des DNA Moleküls (Lewin, 1996). Der Farbstoff Bisbenzimid 33258 (Hoechst-Dye) lagert sich speziell an AT-haltige Basenfolgen und vermindert somit die Dichte dieses DNA-Moleküls. Dieser Farbstoff wird im zweiten Gradienten verwendet.

Die Gradienten unterscheiden sich zusätzlich in ihrer Ausgangsdichte für das CsCl. Der Ethidiumbromid-Gradient wird mit einer CsCl-Lösung hergestellt, die einen Brechungsindex von $n = 1,388$ (gemessen mit einem Abbé-Refraktometer) besitzt. Für den Bisbenzimid-Gradienten beträgt $n = 1,397$.

Da der Anteil an genomischer DNA bei Dinoflagellaten sehr hoch ist, müssen bis zu 500µg DNA eingesetzt werden um 1-5µg Plasmide zu erhalten.

Die in 3,5ml TE-Puffer (10mM Tris/HCl; 1mM EDTA, pH8,0) rückgelöste DNA wird dazu mit 3,5g CsCl versetzt und in ein 5ml Quickseal-Röhrchen (Fa. Beckman), in das zuvor 100µl EtBr-Lösung (4mg/ml) gegeben wurden, überführt. Es wird mit einer CsCl-Lösung (hergestellt aus gereinigtem, umkristallisierten CsCl in TE-Puffer) ($n = 1,388$) aufgefüllt und verschweißt.

Die Zentrifugation erfolgt im Vertikalrotor VTi 80 in einer L7 Ultrazentrifuge (Fa. Beckman) bei 55000U/min und 18°C für 16h.

Unter UV-Licht werden die DNA-Banden sichtbar gemacht und mit einer silikonisierten Pasteurpipette geerntet. Die Entfärbung der Banden geschieht durch Ausschütteln des Ethidiumbromid mit einer Mischung aus 3:1 Sekundärbutanol/Isoamylalkohol.

Die DNA-Banden werden in ein neues Quickseal-Röhrchen gegeben und mit 50µl Bisbenzimid versetzt. Aufgefüllt wird das Röhrchen mit einer CsCl-Lösung mit einem Brechungsindex von 1,397.

Der Zentrifugationslauf, das Ernten und das Entfärben der DNA-Banden erfolgt analog zum Ethidiumbromid-Gradienten.

2.6.1. Dialyse

Um das CsCl aus der Lösung zu entfernen, wird die Probe in einen Dialyseschlauch (Porengröße 18-22µm) überführt und für 3h bei 10°C gegen TE-Puffer dialysiert. Ständiges Rühren und mehrmaliges Wechseln des Puffers ist hierbei notwendig.

Die Volumenzunahme der DNA-Lösung kann mit Sekundärbutanol wieder eingeengt und die DNA anschließend mit 1/20 Volumen 4M Natriumacetat und 2-3 Volumen 100% Ethanol ausgefällt werden.

2.7. Gelelektrophorese und Geldokumentation

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Molekülen wurde Agarose der Firma Biozym benutzt. Je nach Trennbereich kamen Gele zwischen 0,8 und 1,5% zum Einsatz. 1x TAE (0,04M Tris/HCl, pH 8,0, 1mM Na₂EDTA, 20mM Essigsäure) diente als Laufpuffer. Zum Beschweren der Proben wurde 1/10Vol. Bromphenolblau-Lösung, 0,3% in 30% Glyzerin, hinzugefügt.

In der Regel wurde Längenstandard verwendet, der aus drei Komponenten besteht: EcoRI/HindIII-geschnittene λ-DNA, HindIII-geschnittene λ-DNA und linearisiertem pUC18 (modifiziert nach Helling *et al.*, 1974). Es kommen folgende Restriktionsfragmente zustande: 23,13kb; 21,23kb; 9,42kb; 6,56kb; 5,12kb; 4,98kb; 4,36kb; 4,30kb; 3,53kb; 2,68kb; 2,32kb; 2,03kb; 1,90kb; 1,58kb; 1,38kb; 0,95kb; 0,83kb; 0,56kb; 0,13kb.

Die nachträgliche Färbung der Gele erfolgte mit Hilfe von EtBr (200µl EtBr-Stammlösung (4mg/ml) pro Liter H₂O) gefärbt.

2.8. Restriktion von Nukleinsäuren

Benutzt wurden Restriktionsendonukleasen der Firmen Boehringer, Pharmacia und AGS mit den von den Firmen dafür vorgesehenen Reaktionspuffern.

Für eine Standardreaktion wurden 3U/ μ g DNA eingesetzt und der Restriktionsansatz für 1h bei 37°C inkubiert.

2.9. Elution von dsDNA aus Agarosegelen

Zur Rückgewinnung gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente aus einem Agarosegel wurden drei Methoden verwendet.

Bei der **Agarase-Methode** werden die DNA-Fragmente zunächst in „low gelling temperature“-Agarose gelelektrophoretisch aufgetrennt und die ausgeschnittenen Agarosestückchen mit Agarase der Firma Boehringer nach Herstellerangaben zurückgewonnen.

Mit der **Qiaex II**-Methode können die DNA-Fragmente über Silikatpartikel aus normalen Gelen eluiert werden. Die Durchführung geschieht nach Anleitung.

Mit **Millipore** Ultrafree®-DA-Säulchen wird die DNA aus den ausgeschnittenen Agaroseblöckchen durch einfache Zentrifugation eluiert.

2.10. Dephosphorylierung von Vektoren

Die Dephosphorylierung wurde mit der Shrimps alkalischen Phosphatase durchgeführt und abhängig von den DNA-Überhängen mit 0,1U (5'Überhang), 0,3U (glatte Enden) und 0,5U (3'Überhänge) pro 2,5 μ g eines 3kb großen Vektors eingesetzt.

2.11. Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen mit CaCl₂, RbCl₂ und Herstellung elektrokompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter Bakterien geschah nach Sambrook *et al.* (1989).

2.12. Transformation von kompetenten Bakterien

Die Transformation der Bakterienzellen erfolgte durch Hitzeschockbehandlung wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben. Alternativ wurden die Zellen mit dem Elektroporator 2510 der Firma Eppendorf mit 1800V bei 10µF Impulsentladung und einer Entladungszeit bis maximal 5ms transformiert.

2.13. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmid-DNA wird nach Anleitung des "Qiagen Plasmid Mini/Midi Kits", oder mit der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979) unter Auslassung aller Inkubationszeiten (Freier, 1995) präpariert. Die Methoden liefern RNA-freie, sequenzierbare DNA.

2.14. Präparation eukaryotischer Plasmide

Die Dinoflagellaten wurden zwischen 5000 und 8000xg zentrifugiert. Das überstehende Kulturmedium wurde vollständig entfernt. Mit einem Pistill für Eppendorfreaktionsgefäße wurden die Dinoflagellaten (20-50µl Pellet) in 250µl Puffer1 der Firma Qiagen homogenisiert. Nach Angaben des Herstellers wurde 250µl Puffer 2 und 350µl N-Puffer hinzupipettiert und anschließend für 15 Minuten bei 12000xg zentrifugiert. Die Plasmide wurden aus dem Überstand über die beiliegenden Säulchen wie vom Hersteller beschrieben aufgereinigt.

Für die Zysten von *Pyrocystis lunula* muss vor der Plasmidpräparation ein CTAB-Schritt eingefügt werden. 20-50µl Zellen werden eine Minute in 200µl CTAB-Lösung (s. Punkt 2.3.) bei 65°C präinkubiert. Durch kurzes Zentrifugieren (1min) bei 12000xg werden die Zellen sedimentiert und die CTAB-Lösung wird entfernt. Die weiteren Schritte der Plasmidpräparation werden wie oben beschrieben durchgeführt.

2.15. PCR (Polymerase Ketten Reaktion); DOP-PCR; RAPD; RACE

Standardmäßig wird für die PCR 100ng Template-DNA eingesetzt. Die Primer werden mit 1pmol pro μ l PCR-Ansatz hinzugegeben. Für degenerierte Oligoprimer (**DOP**) können auch doppelte Mengen verwendet werden. Die Konzentration der dNTPs im Ansatz beträgt 200nM. Die $MgCl_2$ -Konzentration wird abhängig von der Art der PCR zwischen 0,5-2,5mM variiert. Der Programmablauf richtet sich nach der Art der durchgeführten PCR.

Mit der **RAPD** Methode (Random amplified polymorphic DNA) können unbekannte DNAs oder Bereiche identifiziert werden. Es werden Primer benutzt, die sechs Nukleotide lang und statistisch zufällig angeordnet sind (pd(N₆) von der Firma Pharmacia).

Es wird 10fach konzentrierter Oligo-Puffer angesetzt [50 OD₂₆₀ pd(N₆); 100mM $MgCl_2$; 500mM Tris/HCl pH 7,5; je 500 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP], der dann anstelle der Standardprimer in der PCR zum Einsatz kommt.

Um 5'- und 3'-Bereiche auf dem Genom von bekannten Sequenzregionen zu bekommen, kann die **RACE**- Methode (Rapid amplification of cDNA ends) angewendet werden.

Eine PCR-Reaktion mit 15 Zyklen wurde mit einem Primer, der aus einer bekannten Sequenz abgeleitet wurde, durchgeführt.

Mit **terminaler Transferase** der Firma New England BioLabs konnten an das 3'-Ende der einzelsträngigen Transkripte in einer 15 minütigen Reaktion 15-30 Guanosinnukleotide angehängt werden. Ausgehend von diesem Template wird mit dem abgeleiteten Primer aus der bekannten Sequenz und einem Poly-Cytosin-Primer (18mer) eine Standard-PCR durchgeführt.

Alle PCR-Varianten wurden in einem „Mastercycler gradient“ der Firma Eppendorf ausgeübt. Bei der Amplifizierung großer DNA-Bereiche (>6kb) wurde das PCR-Gerät Crocodile der Firma Appligene benutzt. Bei der Verwendung von 200 μ l PCR-Reaktionsgefäßen in den gerätespezifischen 500 μ l-Einsätzen konnten PCRs für größere Produkte erfolgreich durchgeführt werden. Temperaturmessungen der Firma Eppendorf an diesem Gerät mit 200 μ l Tubes in 500 μ l Einsätzen haben gezeigt, dass bei einer Denaturierung von 94°C, 72°C Elongationstemperatur und einem Annealing bei 50°C ein wellenförmiges Temperaturprofil entsteht, bei dem sich die Amplitude von 60-80°C erstreckt.

Die resultierenden Produkte standen dann der Klonierung zur Verfügung.

2.16. Klonierung

Die aus den Elutionsmethoden gewonnenen Fragmente aus Plastiden-, Plasmid- und PCR-DNA wurden in den Vektor pUC 18 (Amp^r, lacZ, 2686bp) ligiert.

Die Ligationsreaktion mit Ligase der Firma Boehringer erfolgt entweder über 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C und in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Es werden 0,5 - 3 µg eluierte DNA eingesetzt. Entsprechend aufgeschnittener Vektor und Fragment-DNA werden im Verhältnis 1:3, bezogen auf die Konzentration der Enden, zusammenpipettiert.

PCR-Produkte wurden mit Hilfe des „pGEM®-T-Vektor System“ von Promega nach Herstellerangaben kloniert.

Das T-Vektor-System nutzt die Eigenschaft der *Taq*-Polymerase, nach erfolgreicher Amplifizierung ein einzelnes Adenosin-Nukleotid an das 3'-Ende eines PCR-Produktes zu hängen. Mit einem linearisierten Vektor, der überhängende T-Nukleotide am 3'-Ende besitzt, können solche PCR-Produkte kloniert werden. Die Klonierung erfolgt nach Herstellerangaben.

2.17. Southernblotting (Southern, 1975)

Restringierte, gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA wird durch einen vertikalen Pufferstrom aus dem Gel auf einen aufgelegten Nitrozellulosefilter oder eine Nylonmembran überführt. Dieser Transfer, der DNA aus einem zu untersuchenden DNA Gel, erfolgte nach der Methode des Kapillarverfahrens wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben ohne Pufferzufuhr (Trockenblot). Der Aufbau des Blots geschah in umgekehrter Reihenfolge mit der Membran unterhalb des Gels und einer Pufferlaufrichtung von oben nach unten. Transferiert wurde auf eine Nylonmembran (Immobilon-N, Fa. Millipore).

2.17.1. Herstellung radioaktiver DNA-Sonden und Aufreinigung über eine Sephadex G50-Säule

Die Sonden wurden mit Hilfe der Random Prime Methode markiert. 200-400ng DNA werden hitzedenaturiert und mit 1/10 Volumen 10x Oligopuffer [50 OD₂₆₀ pd(N₆); 100mM MgCl₂; 500mM Tris/HCl pH 7,5; je 500µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP] versetzt.

Durch Zugabe von 2µl α-³⁵S-ATP und 5U Klenow-Fragment wird die Sonde radioaktiv markiert.

Zur Trennung der nicht inkorporierten radioaktiven Nukleotide wird die Sonde über eine Sephadex-Säule gegeben.

Sephadex ist ein vorgequollenes, aber in Wasser unlösliches Kohlenhydrat. Dieses bildet kleine Kügelchen, in die kleinere Moleküle auf ihrem Weg durch die Säule eindringen können. Größere Moleküle haben eine schnellere Durchflussrate, da sie an den Kügelchen vorbei fließen.

In die Verjüngung einer Pasteurpipette wird etwas Watte gestopft und dann bis 0,5cm unterhalb der Oberkante mit Sephadex gefüllt. Mit 5x 100µl TE-Puffer wird die Säule equilibriert. Die radioaktiv markierte DNA-Probe wird zur visuellen Kontrolle mit 1/10 Volumen Bromphenolblau versehen und auf das Sephadex aufgebracht.

Beim Durchlauf trennt sich die hochmolekulare DNA von den nicht inkorporierten Nukleotiden. Die schneller laufende markierte dsDNA-Fraktion wird im Reaktionsgefäß aufgefangen, auf Eis gestellt und für die Hybridisierungsreaktion verwendet.

2.17.2. Hybridisierung (mod. nach Sambrook *et al.*, 1989)

Die Prähybridisierung erfolgt in Prähybridisierungspuffer [6x SSPE (20xSSPE: 3M NaCl, 0,2M NaH₂PO₄, 0,02M EDTA pH7,4), 5x Denhardt's (50xDenhardt's Lösung: 1%(w/v) Ficoll, 1%(w/v) PVP, 1%(w/v) BSA), 1/20 Volumen Heringssperma (2mg/ml)] und wird für mindestens eine Stunde bei der Temperatur durchgeführt, die auch für die Hybridisierung gewählt wird.

Die Hybridisierung erfolgt in Hybridisierungslösung (wie Prähybridisierungslösung, aber mit 3xSSPE) über Nacht bei einer Temperatur von 58-65°C für heterologe Sonden und bei 65-70°C für homologe Sonden.

Der Blot wird mindestens dreimal für je 20 Minuten bei Hybridisierungstemperatur mit Spülpuffer gewaschen, bis keine Strahlung mehr nachweisbar ist.

2.18. DNA-Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977)

Für die Sequenzierung wurden 2-3µg Template-DNA und 15pmol Primer eingesetzt und nach Angaben des Herstellers (Pharmacia) mit dem T7-Sequenzierungskit unter Verwendung von α -³⁵S-ATP durchgeführt.

2.19. GPS-Transposontagging

Eine elegante Methode als Alternative zur Subklonierung und dem Primerwalking ist das Transposontagging mit dem GPS-Transposon-Kit der Firma New England Biolabs. In ein kloniertes Fragment wird ein Transposon integriert, welches eine Resistenzkassette trägt. Der Ort der Integration ist willkürlich. Insertionen in die Resistenzkassette des Vektors oder den „Origin of Replication“ werden bei der Transformation und auf selektierenden Platten von erfolgreichen Insertionen im Insert getrennt. Man erhält mit einer Transformation Hunderte von Subklonen, die mit transposoninternen Primern ansequenziert werden können. Bei der Durchführung wurde strikt nach Anweisung des Herstellers vorgegangen.

2.20. Elektronenmikroskopie

Aufgereinigte Plasmide oder Plasmidfraktionen konnten mit Hilfe der „Monolayer Technik für Elektronenmikroskopie von Nukleinsäure Molekülen“ von Albrecht K. Kleinschmidt (1968) dokumentiert werden.

Als optimal hat sich die Diffusionsmethode bewiesen, um gute Aufnahmen von Minizirkeln der Dinoflagellaten zu erhalten. Hierzu wird eine Lösung hergestellt, die neben den zu untersuchenden Nukleinsäuren auch Cytochrom c enthält. Das Cyt_c oxidiert

an der Luft/Flüssigkeitsgrenze und bildet einen Monolayer aus. Die Nukleinsäuremoleküle in der Lösung diffundieren so lange, bis sie auf den Proteinfilm treffen und an ihm irreversibel haften. Durch Abklatsch mit einem Grid, welches mit Kollodiumfolie versehen ist, kann dieser Proteinfilm mit der gebundenen DNA kontrastiert und unter dem Elektronenmikroskop dokumentiert werden.

2.21. *In situ* Immunogold Hybridisierung

Die *in situ*-Hybridisierung wurde in Marburg von M. Johannsen nach der Methode von McFadden (1991) durchgeführt.

2.22. Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmessungen wurden die Zellen durch Absetzen angereichert und in 1ml Kulturmedium aufgenommen. Durch Zugabe von 10-20µl Bisbenzimid und 10-15min Inkubation wurden die Zellen gefärbt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskop durch UV-Bestrahlung mit einer Hg-Lampe.

2.23. Absorptionsmessungen

Gemörserte Zellen wurden in Wasser bzw. 80% Aceton aufgenommen und 20min auf Eis inkubiert. Feste Substanzen konnten durch Zentrifugation entfernt und der Überstand in geeigneten Verdünnungen für die Messung verwendet werden. Die Absorption wurde in 0,5nm Abständen in einem Zweistrahlphotometer gemessen.

2.24. Dokumentationen

Gelfotos:

Die Agarosegele wurden computergestützt mit der Dokumentationsanlage BioDocAnalyse der Firma Biometra dokumentiert.

Autoradiographie:

Für die Autoradiographie werden die Filter mit einem Röntgenfilm (Fuji-X-100 oder Kodak-X-Omat AR-5) belegt. Die Expositionsdauer hängt von der nach der Hybridisierung auf dem Filter gemessenen Signalstärke ab. Der Film wird in „Kodak LX

24“ für 2min entwickelt, in „Kodak AL-4“ fixiert (20min), 20min gewässert und getrocknet.

Fotografie:

Fotos von Algen und lichtmikroskopische Aufnahmen wurden mit der Digitalkamera Nikon Coolpix 960 mit bis zu 3,3 Millionen Bildpunkten durchgeführt.

2.25. Computerprogramme

Für die Computerauswertung stand das Programmpaket GCG (Genetics Computer Group, Inc; Madison, USA; Version 7.3 für UNIX) (Devreux, 1984, 1991) über einen Großrechner der Universität Düsseldorf zur Verfügung, welches auch über das Interface euklid.rz.uni-duesseldorf.de/w2h zu erreichen ist. Ebenso bietet aber auch das Internet zahlreiche nützliche Programme an. Neue Sequenzen wurden über das National Center for Biotechnology Information (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, dem European Bioinformatics Institute (EMBL) <http://www.ebi.ac.uk/> und dem tRNAscan-SE Search der Washington University in St. Louis <http://www.genetics.wustl.edu/eddy/tRNAscan-SE/> primär ausgewertet.

Als lokale Softwaretools zur Sequenzbearbeitung wurden die Programme BioEdit (Department of Microbiology North Carolina State University) und Clone Manager for Windows Version 4.0 benutzt.

Die Sekundärstrukturberechnungen wurden mit Hilfe des Programms „RNAdraw V1.0“ vom Dept. Medical Biophysics Karolinska Institute S-17177 Solna Schweden durchgeführt.

3. Ergebnisse

Auf Grund der geringen molekularbiologischen Daten über Peridinin-haltige Dinoflagellaten musste nach eigenen Ansätzen gesucht werden, die Aufschlüsse über Organisation und Struktur des Plastidengenoms geben sollten.

3.1. Wahl der Untersuchungsobjekte

Für die Untersuchungen standen insgesamt fünf verschiedene Peridinin-haltige Dinoflagellaten zur Verfügung (s. Material und Methoden), die alle ihre Vorzüge, aber auch Nachteile mit sich brachten.

Das Kultivieren dieser Dinoflagellaten stellte sich als äußerst schwierig dar. Die geeigneten Bedingungen mussten erst ermittelt werden, um ein relativ zügiges Wachstum dieser Organismen zu erhalten. Die Teilungsrate vieler Dinoflagellaten liegt in einem Bereich, der eine schnelle Kultivierung nicht möglich macht (Tang, 1996). Die meisten Dinoflagellaten können nicht axenisch kultiviert werden, sie benötigen bestimmte Bakterien, die als Vitaminlieferanten dienen (Iwasaki, 1984).

Die Schwerpunkte dieser Arbeit wurden auf *Pyrocystis lunula* und *Ceratium horridum* gelegt. Mit *Pyrocystis lunula* ist ein Objekt gegeben, welches eine Verdopplungszeit von etwa 10-15 Tagen hat. Es ist auch mit zirka 120µm relativ groß im Gegensatz zu den meisten Dinoflagellaten. Ein Nachteil dieses Dinoflagellaten ist, dass er eine sehr harte und chemisch resistente Schale besitzt. Erfolgreich für die DNA-Gewinnung waren daher nur Aufschlüsse, die vorweg in flüssigem Stickstoff gemörsert wurden. Die Isolation von intakten Chloroplasten, von denen *Pyrocystis lunula* zwei besitzt, war somit nicht möglich. *Ceratium horridum* eignete sich hervorragend für die Isolation intakter Plastiden. Nachteilig war das langsame Wachstum.

3.1.1. Identifizierung von *Ceratium horridum* als Peridinin-haltigen Dinoflagellaten

Von *Ceratium horridum* existierten keine Daten über die Pigmentausstattung. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass *Ceratium horridum* in der Organisation seiner Chloroplasten etwas anders gestaltet ist als die „typischen“ Plastiden der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten. Die Anzahl der Plastiden in der Zelle ist viel höher

als bei anderen Dinoflagellaten. *Ceratium horridum* besitzt in der Regel Thylakoide, die in Zweierstapeln angeordnet sind (Kowallik, pers. Mitteilung). Im Lumen der Thylakoide befindet sich elektronendichtes Material, welches typisch ist für die Phycobiliproteinkomplexe in Cryptophyceenplastiden (Araoz, 1998). Um sicher zu gehen, dass es sich nicht um einen Dinoflagellaten mit cryptophytischen Endosymbionten handelt, sondern um einen typischen Peridinin-haltigen Dinoflagellaten, wurden Absorptionsspektren in einem Zweistrahlsspektrophotometer von wasserlöslichen und wasserunlöslichen Pigmenten durchgeführt.

Bei einem cryptophytischen Chloroplasten müssten Phycocyanin und Phycoerythrin nachzuweisen sein. Für den Nachweis der Phycobiliproteine wurde ein Absorptionsspektrum in 90% Aceton durchgeführt (Abb. 2).

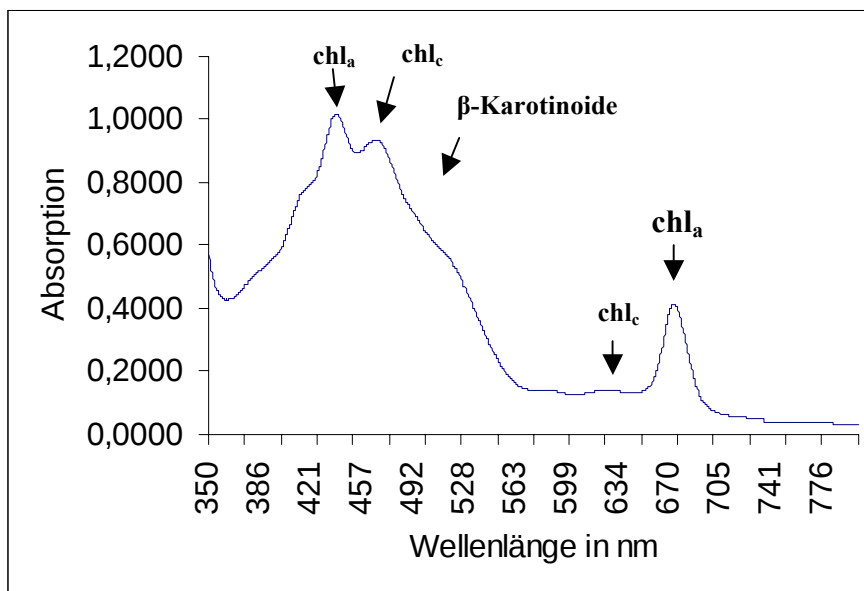


Abb. 1:
Absorptionsspektrum
der wasserlöslichen
Komplexe von *Ceratium
horridum*.

Die Absorption wurde in
0,5nm Schritten der
Wellenlängen gemessen.

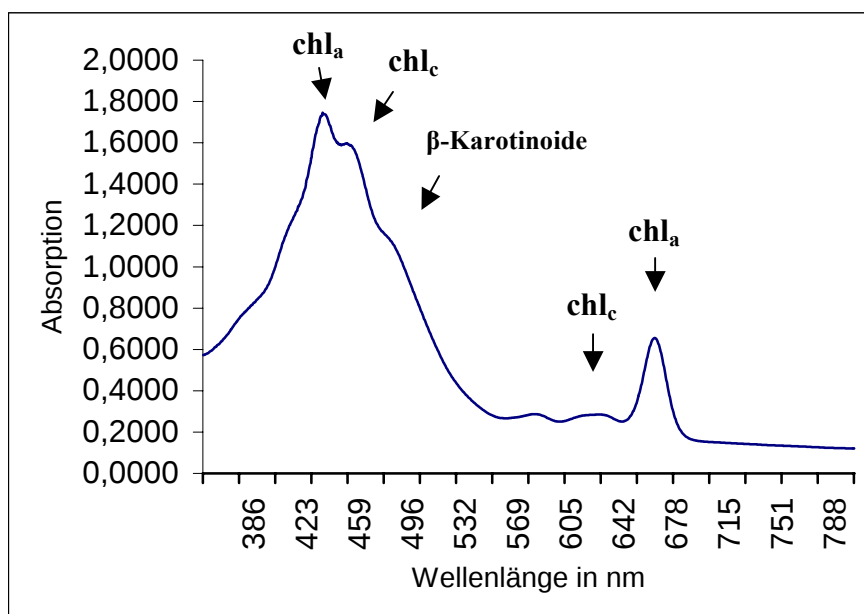


Abb. 2:
Absorptionsspektrum
der wasserunlöslichen
Komplexe von *Ceratium
horridum*.

Die Absorption wurde in
0,5nm Schritten der
Wellenlängen gemessen.

Die Absorptionskurve zeigt einen Verlauf mit den typischen Absorptionsmaxima von chl_c (450-460nm und 630nm), chl_a (430-440nm und 660nm) und den Karotinoiden bei etwa 495nm. Das Spektrum ist vergleichbar mit dem typischen Verlauf bei Peridinin-haltigen Dinoflagellaten (Taylor, 1987).

Die Kurve in Abbildung 2 für die wasserunlöslichen Komponenten unterscheidet sich kaum von der für wasserlösliche Komplexe (Abb.1). Deutlich wird aber, dass keine Signale für Phycocyanin oder Phycoerythrin (630-640nm) in diesen Kurven auftreten.

Zur vollständigen Aufklärung wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Holzward 77K-Fluoreszenzspektren durchgeführt von *Synechocystis* sp. (Positivkontrolle für Phycobiliproteine), *Pyrocystis lunula* (Negativkontrolle) und *Ceratium horridum*, aus denen ebenso hervorgeht, dass kein Phycocyanin und/oder Phycoerythrin bei den verwendeten Dinoflagellaten existiert. Es konnten sogar die Peridinin-Chlorophyll-a-bindenden Proteine (PCP) isoliert und separat gemessen werden (pers. Mitteilung).

Ausgehend von diesen Ergebnissen konnten nun die weiteren Untersuchungen durchgeführt werden.

3.2. Herstellung homologer Gensonden

Der erste Ansatz, um Sequenzinformation von Chloroplastengenomen aus Dinoflagellaten zu erhalten, ist die Herstellung von homologen Gensonden, die für weitere Untersuchungsverfahren benutzt werden können.

Dazu wurden PCR-Primer erstellt, die aus multiplen Alignements der Photosynthesegene für psbA und psbC aus *Synechocystis spec.*, *Cyanophora paradoxa*, *Odontella sinensis*, *Porphyra purpurea*, *Chlorella vulgaris*, *Euglena gracilis*, *Marchantia polymorpha*, *Pinus thuringensis*, *Zea mays* und *Nicotiana tabacum* abgeleitet wurden. Es wurden deshalb zwei Photosynthesegene gewählt, weil nicht von axenischen Kulturen ausgegangen werden konnte.

Die nachfolgende Abbildung 3 zeigt die Positionen der PCR-Primer in den jeweiligen Genen. Die Primer für psbA entstammen aus den konservierten Nukleotidregionen bei etwa Position 320 und 980. Für psbC waren es die Positionen bei etwa 170 und 1200.

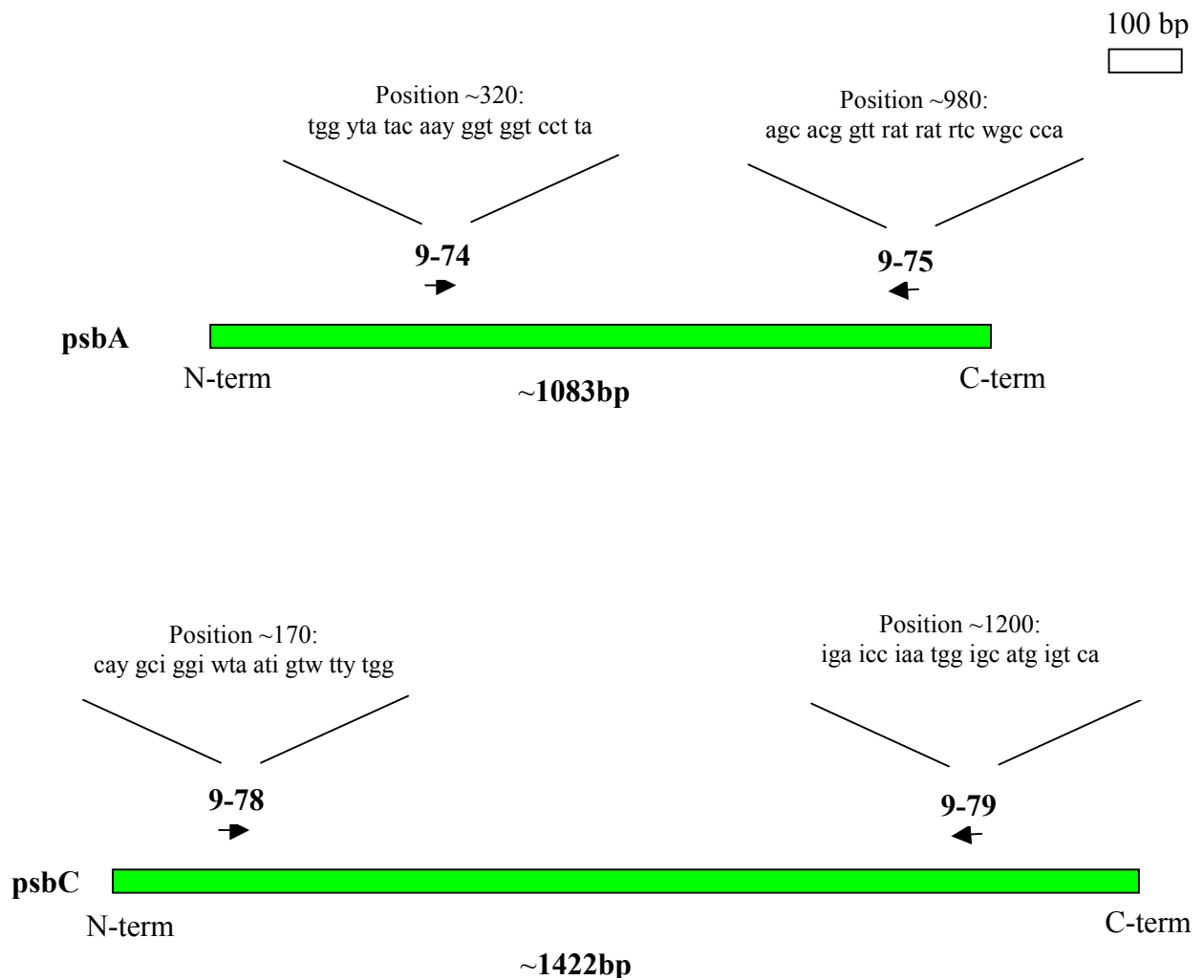


Abb. 3: Darstellung von psbA und psbC. Eingezeichnet sind die abgeleiteten degenerierten Oligonukleotide aus den Nukleoditsequenzen bekannter psbA/psbC-Gene und deren ungefähre Position.

Für **psbA** sollte zwischen den Primern 9-74/75 ein PCR-Produkt entstehen, das eine Größe von ungefähr 600bp hat. Für **psbC** war eine Größe zwischen den Primern 9-78/79 von ungefähr 1000bp vorherzusagen.

In Abbildung 4 ist zu erkennen, dass Produkte entstanden, die in etwa der zu erwartenden Größe entsprachen.

Die Amplifizierung diverser anderer Gene (siehe Oligoliste im Anhang), u.a. auch an anderen Peridinin-haltigen Dinoflagellaten, lief parallel vonstatten (Sequenz s. Anhang). Die klarsten Ergebnisse bei allen Dinoflagellaten waren jedoch bei *Pyrocystis lunula* und bei den Genen für **psbA/psbC** zu erhalten.

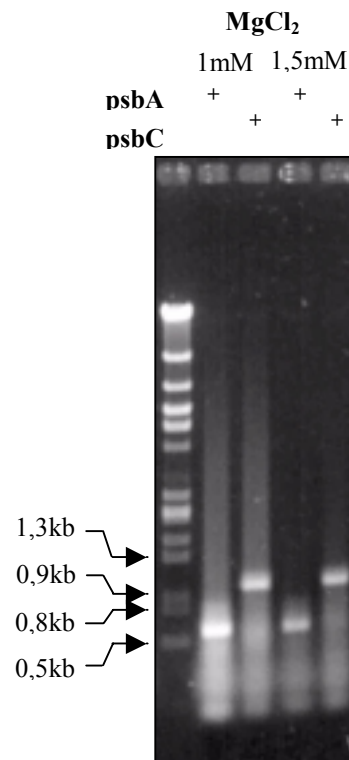


Abb. 4: Amplifizierung von Bereichen der psbA- und psbC-Gene aus *Pyrocystis lunula* mit degenerierten Oligonukleotidprimern (DOP) und verschiedenen Magnesiumchloridkonzentrationen.

Für *Prorocentrum micans* wurden zwei verschiedene psbC-Gene mittels PCR erhalten, wobei ein Produkt „normal“ ist und das andere Produkt eine Insertion von 26 bp aufweist (s. Abb. 5). Durch diese Insertion kommt es zu einem Sprung im Leserahmen. Die Nukleotidregionen vor und nach dem Insert sind bei den beiden psbC-Genen identisch. Ob es sich bei dieser Insertion um ein Artefakt der Polymerasekettenreaktion handelt, konnte bis hierhin noch nicht gesagt werden.

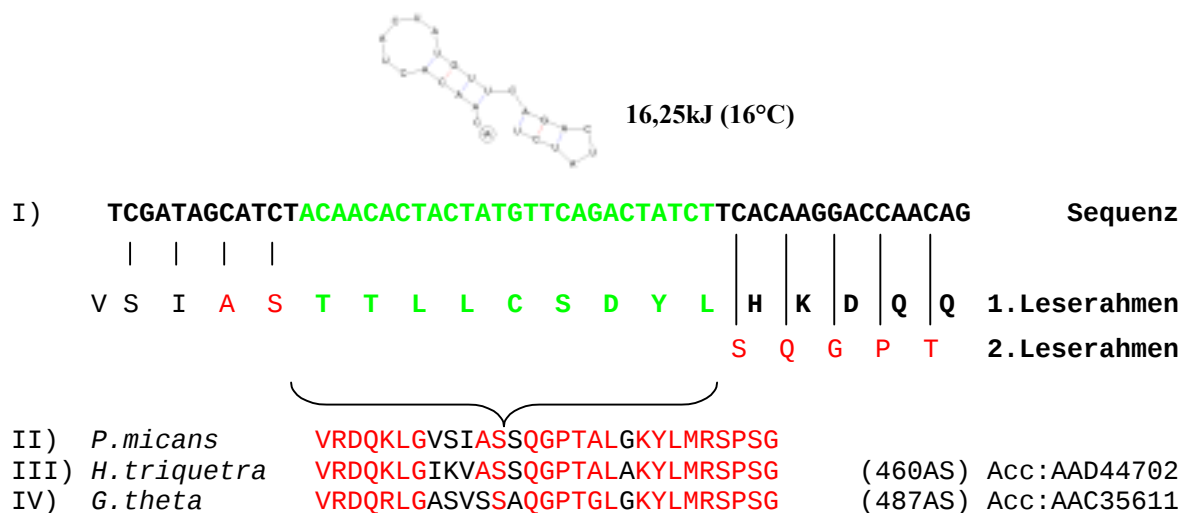


Abb. 5: Partielles Alignment von psbC. I) psbC von *P. micans* mit einer 26bp Insertion (in grünen Buchstaben). Die Translation zeigt, dass der Leserahmen durch diese Insertion nicht erhalten bleibt. II), III) und IV) sind die an der Stelle entsprechenden psbC-Gene ohne Insertion von II) *P. micans* (zweites PCR-Produkt), III) *Heterocapsa triquetra* [Nukleinsäureposition 306 bis 334] und IV) *Guillardia theta* [Nukleinsäureposition 333 bis 361].

3.3. Hybridisierung der PCR-Sonden an Gesamt-DNA der verschiedenen Dinoflagellaten

Mit Hilfe der durch PCR gewonnen Sequenzen von *psbA* und *psbC* ließen sich nun Sonden herstellen, mit denen restringierte Gesamt-DNAs der Dinoflagellaten beprobt wurden. Die identifizierten Fragmente sollten isoliert, kloniert und sequenziert werden, um mehr Informationen über angrenzende Bereiche zu erhalten. Diese Auskünfte sind für weitere Vorgehensweisen zur Klonierung des(r) Chloroplastengenoms(e) wichtig.

Die nachfolgenden Southernblots wiesen ein unerwartetes Bild auf.

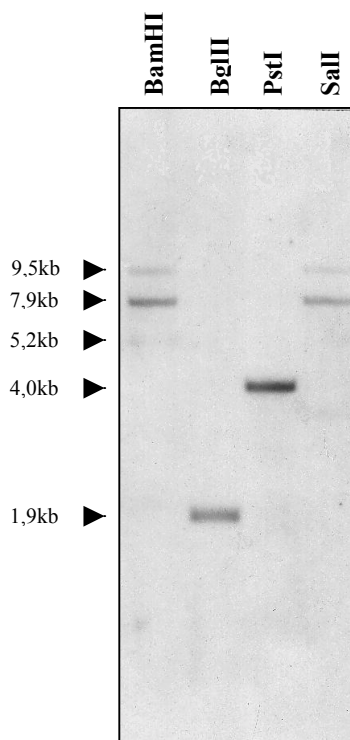


Abb. 6a: Southernhybridisierung von *Pyrocystis lunula* Gesamt-DNA mit einer radioaktiv markierten homologen *psbA*-Sonde.

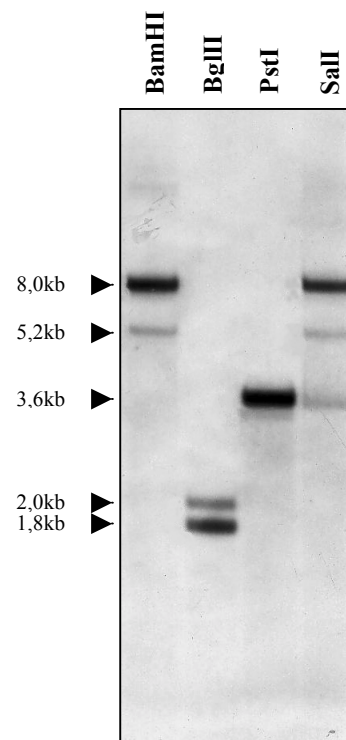


Abb. 6b: Southernhybridisierung von *Pyrocystis lunula* Gesamt-DNA mit einer radioaktiv markierten homologen *psbC*-Sonde.

Sowohl das Muster der *psbA*-Southernhybridisierung als auch das der *psbC*-Hybridisierung sieht auf den ersten Blick fast gleich und verwirrend aus. Beide zeigen eher kleine Fragmentensignale und erscheinen in den BamHI und SalI Restriktionen wie ein ungeschnittenes Plasmid, das als offener Ring, lineares und superhelikales Molekül vorliegt. Verwunderlich ist, das Hybridisierungssignale in hochmolekularem Bereich nicht festzustellen sind, was bei einem Chloroplastengenom mit durchschnittlicher Größe zu erwarten gewesen wäre.

Ob das Muster nun wirklich dem unrestringierten Zustand entspricht, wurde mit dem nächsten Versuch (Abb. 7) verifiziert.

Pyrocystis lunula Gesamt-DNA wurde in ungeschnittener Form neben zwei Restriktionsansätzen aufgetragen und mit Hilfe der psbC-Sonde in einer Southernhybridisierung untersucht.

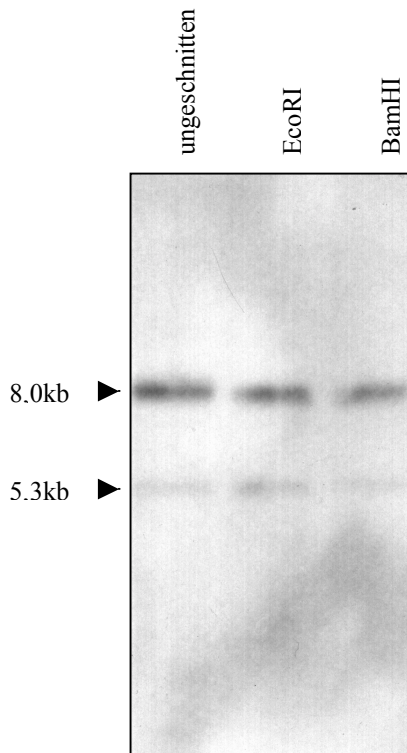


Abb. 7: Southernhybridisierung von *Pyrocystis lunula* Gesamt-DNA mit einer homologen psbC-Sonde.

Auch im nativen Zustand zeigen die Hybridisierungssignale mit der psbC-Sonde ein Muster, welches dem der BamHI-Restriktion und hier zusätzlich dem der EcoRI-Restriktion entspricht.

Diese drei Hybridisierungen betrachtend können folgende Aussagen getroffen werden, die für die weitere Vorgehensweise berücksichtigt werden müssen:

- a) es handelt sich aller Wahrscheinlichkeit nach nicht um ein gewöhnliches Chloroplastengenom, welches vergleichbar wäre mit den bisher bekannten Chloroplastengenomen mit einer durchschnittlichen Größe von 100-200kb, b) zusammen mit Abbildung 6a und b scheint es, dass psbC und psbA wahrscheinlich auf Plasmiden kodiert sind, c) diese Plasmide scheinen sehr ähnlich zu sein, aber die Gene für psbA und psbC sind wahrscheinlich nicht auf dem selben Plasmid

kodiert, denn wenn der native Zustand des Plasmids in der BamHI Restriktion realisiert ist (s. Abb.6a und b), ist hier ein Unterschied im Bandierungsbereich zuerkennen.

Ein Hinweis, dass für psbC vielleicht mehrere Genkopien vorliegen, zeigt sich in Abb. 6b in der BglII Restriktion, denn die benutzte psbC-Sonde besitzt keine interne Schnittstelle für das Enzym BglII; dennoch sind zwei Signale (1,8kb und 2,0kb) zu erkennen, die beide größer sind als die Sonde selbst mit ihren zirka 1000bp.

Des weiteren fällt auf, dass die Intensität der 2kb Bande nur halb so stark zu sein scheint wie die der 1,8kb Bande. Mit unvollständigen Restriktionen lässt sich dies nicht erklären, denn dann hätten noch weitere Signale erscheinen müssen.

Ist diese ungewöhnliche Erscheinung vielleicht nur ein Phänomen, welches bei *Pyrocystis lunula* auftritt?

Weitere Hybridisierungen bei anderen Peridinin-haltigen Dinoflagellaten wurden durchgeführt mit ebenso indifferenten Hybridisierungsmustern.

Z. B. wies *Prorocentrum micans* wie *Pyrocystis lunula* in der Southernblotanalyse (Abb. 8) mit einer homologen psbC-Sonde ein schwer interpretierbares Hybridisierungsmuster auf. Im nichtrestringierten Zustand sieht es ebenfalls so aus, als wenn hier Plasmidkonfigurationen vorliegen. Die Signale bandieren in einem Bereich von ungefähr

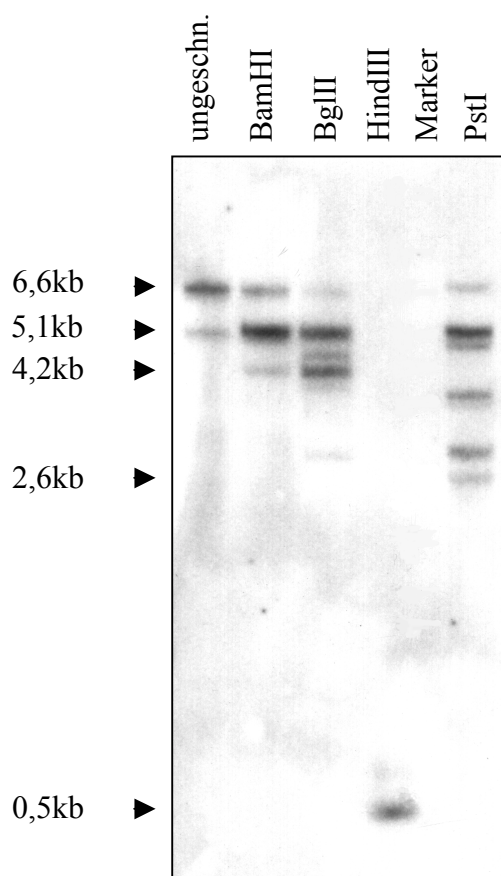


Abb. 8: Southernhybridisierung von *Prorocentrum micans* mit homologer radioaktiv markierter psbC-Sonde.

5,1-6,6kb. Die restringierten Ansätze beinhalten anscheinend noch unrestringiertes psbC Plasmid, aber die vielen Signale deuten darauf hin, dass vermutlich ein Restriktionspolymorphismus im psbC-Gen vorliegt.

In Abbildung 5 wurde gezeigt, dass wahrscheinlich zwei psbC-Gene bei *Prorocentrum micans* existieren. Diese Tatsache könnte eine Erklärung für das ungewöhnliche Hybridisierungsmuster sein.

Warum im Restriktionsansatz mit Hind III nur ein einziges Signal bei etwa 0,5kb erscheint, könnte vielleicht darauf zurückzuführen sein, dass die verwendete psbC-Sonde insgesamt drei HindIII-Erkennungssequenzen besitzt. Zwei HindIII-Schnittstellen in dieser Sonde liegen zirka 500bp auseinander.

Bei dem Dinoflagellaten *Thecadinium inclinatum* war, im Gegensatz zu *Pyrocystis* und *Prorocentrum*, das Ergebnis der Southernhybridisierung mit einer homologen psbC-Sonde anders. Hier zeigten sich Hybridisierungssignale im hochmolekularen Bereich.

Der nichtrestringierte Zustand besitzt zwar auch die Plasmidkonfiguration, aber die signalgebenden Banden migrieren in einem wesentlich höheren Bereich als bei den anderen Dinoflagellaten.

Eine ungefähre Abschätzung der Molekülgröße ist nicht möglich, denn die Signale des ungeschnittenen Zustandes liegen außerhalb des Referenzstandards.

Ausgehend von den Signalen

aus der PstI-Restriktion mit über 9,4kb Größe kann gesagt werden, dass es sich im Gegensatz zu den anderen untersuchten Dinoflagellaten um ein wesentlich größeres Molekül handeln muss, auf dem das psbC-Gen lokalisiert ist.

Bei dem Hybridisierungssignal, welches in der Spur des Standards zu erkennen ist, handelt es sich um die Bande des pUC18-Vektors. In pUC18 war die Sonde kloniert. Bei der Herstellung der Sonde durch Herausschneiden aus dem Vektor und anschließender Elution der Sonde kommt es gelegentlich zu Kontaminationen durch den Vektor.

Aus diesen ersten Untersuchungen der Southernanalyse konnte geschlossen werden, dass das Chloroplastengenom der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten in seiner Organisation sehr stark von den bisher bekannten Chloroplastengenomen abweicht.

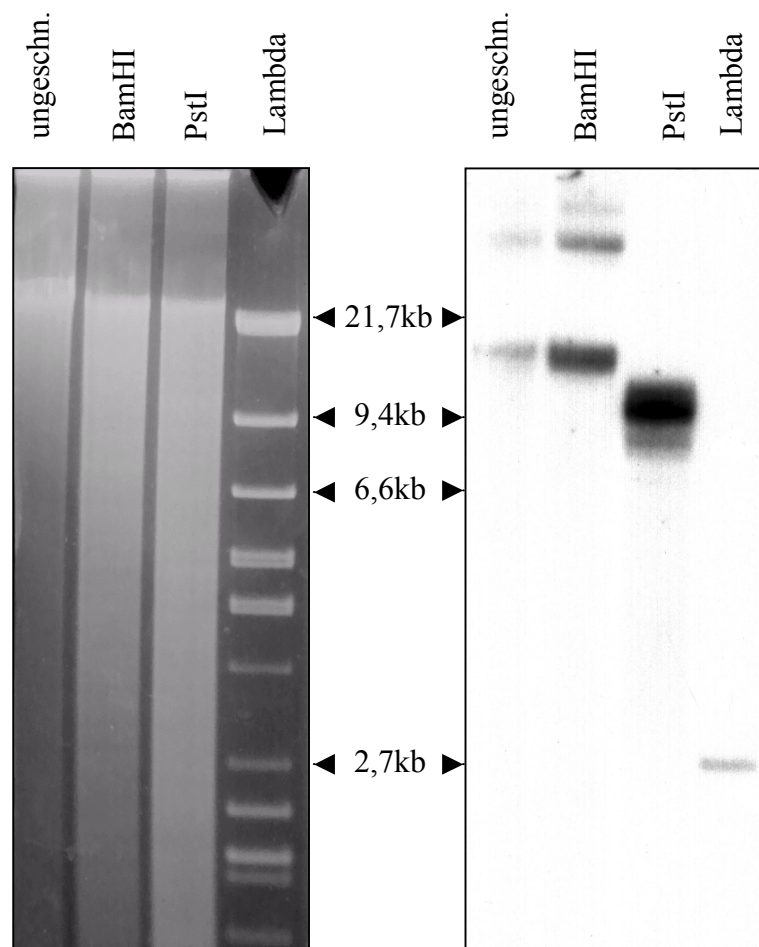


Abb. 9: Southernhybridisierung von *Thecadinium inclinatum* mit homologer radioaktiv markierter psbC-Sonde (rechts). Auf der linken Seite das dazu gehörige Agarosegel.

3.4. Hybridisierungen gegen rekombinante Phagenbank

Parallel wurden zwei Phagenbanken (Lambda-Dash-BamHI und Lambda-Dash-BglII) aus *Pyrocystis lunula* Gesamt-DNA hergestellt. Sie sollten weitere Informationen über das Chloroplastengenom bringen. Es wurden Hybridisierungen gegen die Phagenbanken mit denen aus der PCR gewonnenen homologen Gensonden und mit ganzen Genklustern als heterologe Gensonden von *Odontella sinensis* durchgeführt. Ziel war es, weitere Gene des Photosyntheseapparates und Gene der Transkription-/Translationmaschinerie zu erhalten. Die heterologen Hybridisierungen mit ganzen Genklustern ergaben keine Resultate. Mit Hybridisierungen von 23S rRNA von *Odontella sinensis* wurden Fragmente erhalten, die nicht einwandfrei als Dinoflagellatensequenz zugeordnet werden konnten. Hybridisierungssignale mit der homologen psbC-Sonde wurden nur in der Phagenbank, die mit BglII geschnittener Gesamt-DNA von *Pyrocystis lunula* erstellt wurde, erhalten. Dies wäre im Einklang zu den Untersuchungen in den Abbildungen 6b und 7, dass in dem psbC-kodierenden Molekül keine BamHI Schnittstelle existiert. Es zeigten sich schon bei der Untersuchung der Phagenminilysate Unterschiede, die anscheinend auf einen Restriktionspolymorphismus hinwiesen. In Abbildung 10 wurden zwei Signale erhalten, die eine Größe von 1,7kb bzw. 1,9kb besitzen. Da die benutzte psbC-Sonde aber keine interne BglII-Schnittstelle besitzt, muss die Größendifferenz auf zwei verschiedenen Sequenzen beruhen. Dies entspricht der BglII-Restriktion in Abbildung 6b, die auch zwei Fragmente von etwa dieser Größe aufweist.

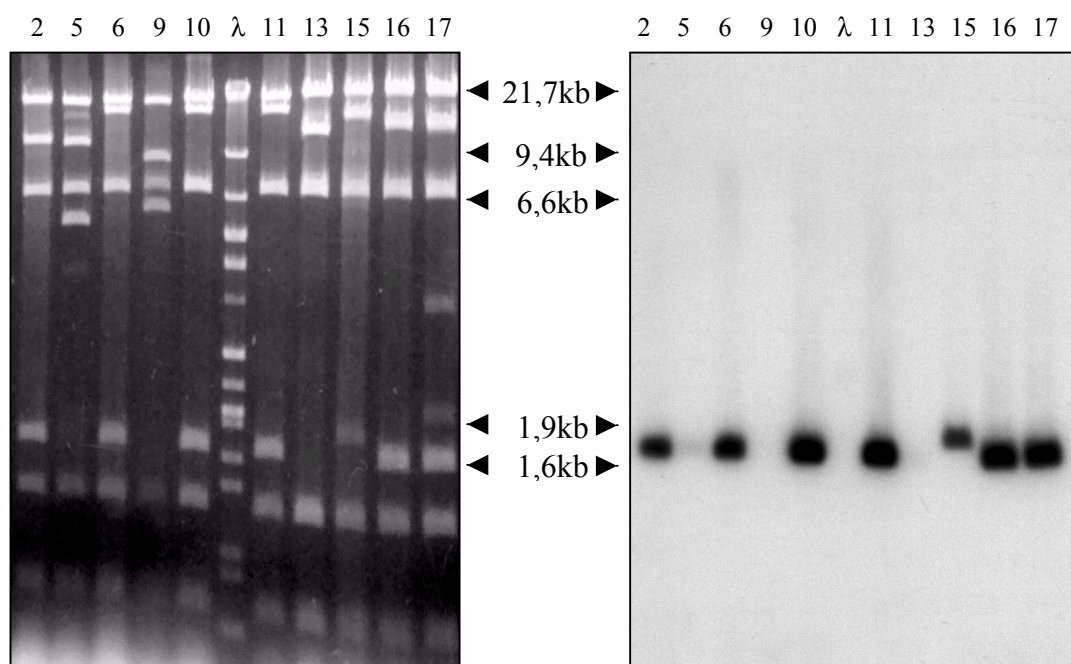


Abb. 10: Phagenminilysate von positiv gewerteten rekombinanten Phagenplaques aus BglII-Phagenbank, restringiert mit BglII und hybridisiert mit radioaktiv markierter psbC-Sonde von *Pyrocystis lunula*. Phagenlysate Nr. 2,6,10,11,15,16,17 ergeben jeweils ein Hybridisierungssignal, wobei das von Phagenlysat Nr. 15 eindeutig größer ist.

Durch Umklonierung in pUC18-Vektor konnten die Fragmente auf ihre Sequenz hin geprüft werden. Durch die vollständige Sequenz des N-Terminus von psbC und Bereiche der 5'-Region zeigte sich, dass es keine Überlappung mit dem C-Terminus eines psbD-Gens gibt. PsbD und psbC sind stets in der angegebenen Reihenfolge auf den Chloroplastengenomen als Operon organisiert und besitzen einen überlappenden Leserahmen. Dies ist hier nicht der Fall.

Das Fragment aus dem Phagenminilysat Nummer 15 zeigt eine um etwa 300 Nukleotide größere Sequenz und eine fehlende BglIII-Schnittstelle gegenüber den anderen Phagenlysaten. Die nachstehende Skizze des fast vollständigen psbC-Gens (Abb. 11a) zeigt die Unterschiede in den Klonen, die durch die Phagenbank gewonnen wurden.

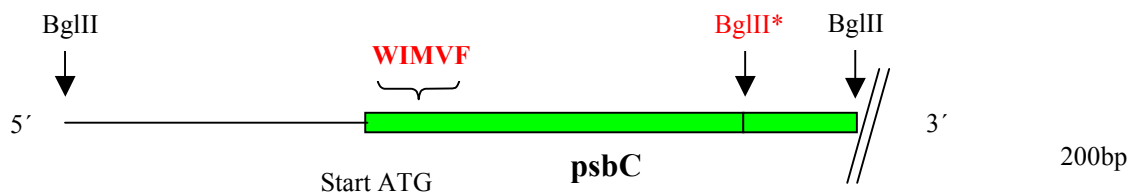


Abb. 11a: Darstellung des psbC-Gens und dem angrenzenden 5'-Bereich.

In roten Buchstaben wird gezeigt, wodurch sich der Phagenklon 15 von den anderen Klonen unterscheidet. Phagenklon 15 weist neben einer fehlenden BglIII Restriktionsschnittstelle eine 15 Nukleotid-Insertion im psbC-Gen auf. Bis auf etwa 30AS ist das psbC in den Phagenklonen enthalten.

Neben der Restriktionsschnittstellenpolymorphie zeigt sich im Phagenklon 15, dass das psbC-Gen etwa 40AS (120bp) nach dem N-Terminus eine 5AS (15 Nukleotide) große Insertion hat. Sie hat keinen Einfluss auf den Leserahmen, aber ein multiples Alignment (Abb. 11b) verdeutlicht, dass anderer Organismen die Insertion im psbC-Gen nicht haben.

1) <i>P. lun</i> Phagenklon 15	MRGCYLNGRTRLGRSRSFWSWSGNARLIYLSGKLLGAHVFSHGLILL	WIMVFWSGTIGLF
2) <i>P. lun</i>	MRGCYLNGRTRLGRSRSFWSWSGNARLIYLSGKLLGAHVFSHGLILL	-----WSGTIGLF
3) <i>H. tri</i>	MRISCLKKRTLIGSRYSWWSGNARFIELSGKFLGAHLAHAGLIM	-----FWSGSMTLF
4) <i>O. sin</i>	MKTLYSLRRYYHVETPFNSS--IAGRDIESTGFAWWSGNARLINVSGKLLGAHVHAGL	-----MVFWAGAMVLF
5) <i>P. pur</i> MKVFVLGWLLKINLMKTLYSQRRFYHVETP-NTNVGVGGRDIESTGFAWWSGNARLINVSGKLLGAHVHAG	-----IMVFWTGAMTLF	
6) <i>C. cal</i>	MKILYSQRRFYHVEMPFNNRIEFAGRSIESTGYAWWAGNARLINVSGKLLGAHVHAGLI	-----VFWTGAMTLF
7) <i>A. tha</i>	MKTLYSLRRFYHVETLFNGTLALAGRDQETTGFAWWAGNARLINLSGKLLGAHVHAGLI	-----VFWAGAMNLF
8) <i>C. par</i>	METLFNSSVAVSGRDQSTGFAWWSGNARLINLSGKLLGAHVHAGLI	-----VFWTGAMTLF
9) <i>O. hoo</i>	MKTLYSLRRFYPVETLFNGTLALAGRDQETTGFAWWAGNARLINLSGKLLGAHVHAGLI	-----VFWAGAMNLF
10) <i>O. sat.</i>	MKILYSLRRFYHVETLFNGTFVLAGRDQETTGFAWWAGNARLINLSGKLLGAHVHAGLI	-----VFWAGAMNLF
11) <i>Syn. PCC 6803</i>	MKTLSLRRFSPVVTLSN-TSMVGGDLPTSTGFAWWSGNARLINLSGKLLGAHVHAGLI	-----VFWAGAMTLF
12) <i>S. ole</i>	MKTLYSLRRFYPVETLFNGTLTAGRDQETTGFAWWAGNARLINLSGKLLGAHVHAGLI	-----VFWAGAMNLF
Konsensus	* * * * *	* * * *

Abb. 11b: Multiples Alignment mit partiellen Aminosäuresequenzen von psbC. 1) *Pyrocystis lunula* Phagenklon Nr. 15, 2) *Pyrocystis lunula* Phagenklon 16, 3) *Heterocapsa triquetra*, 4) *Odontella sinensis*, 5) *Porphyra purpurea*, 6) *Cyanidium caldarium*, 7) *Arabidopsis thaliana*, 8) *Cyanophora paradoxa*, 9) *Oenothera hookeri*, 10) *Oryza sativa*, 11) *Synechocystis* sp. PCC6803, 12) *Spinacia oleracea*.

In Abbildung 11b wird deutlich, dass psbC der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten (Reihe 1, 2 und 3) N-terminal verkürzt ist, was auf den fehlenden Überlappungsbereich von psbC und psbD zurückzuführen ist.

3.5. Inverse PCR zur Vervollständigung des psbC-Zirkel

Da davon ausgegangen werden musste, dass die Plastidengene eventuell auf Plasmiden liegen, konnte mit den Phagenbanken nicht gewährleistet werden, dass, wenn es sich um Plasmide handelt, diese auch erfasst werden. Es wurde die Strategie der Invers-PCR angewendet. Für die inverse PCR wurden Primer mit entgegengesetzten Laufrichtungen aus der bekannten psbC-Sequenz abgeleitet. Bei Zirkularität des psbC-kodierenden Moleküls würde bei einer PCR eine Bande entstehen.

Abbildung 11c zeigt das Ergebnis der invers-PCR. Unabhängig von der Magnesiumchloridkonzentration und Varianten der Annealingtemperatur in der PCR entstanden immer zwei Hauptbanden (bei etwa 3,7 und 4,7kb). Kloniert wurde die 4,7kb Bande. Die 3,7kb Bande konnte nicht kloniert werden.

Mit Hilfe der Subklonierung und dem Transposon GPS-System war es möglich, das Plasmid schnell und fast vollständig zu sequenzieren. Die Primerwalkingmethode ließ sich nicht anwenden, denn auf Grund des hohen Maßes an repetitiven Sequenzen, die im Zirkel existieren, kam es sehr häufig zu nicht interpretierbaren Doppelreaktion bei der Sequenzierung.

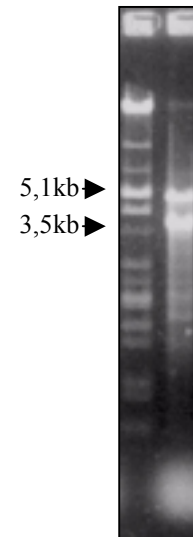


Abb. 11c: Invers-PCR am psbC-Plasmid von *Pyrocystis lunula*. In ersten Spur wurde Lambda-Standard aufgetragen. In der zweiten Spur sind die beiden Banden (3,7kb und 4,7kb) zu erkennen, die bei variablen PCR's entstanden.

In Abbildung 12 ist der psbC-Zirkel dargestellt. Er ist ungefähr 5,2kb groß, von denen 5kb sequenziert sind. Neben dem psbC-Gen existieren auf diesem Zirkel keine weiteren Plastidengene. Das psbD-Gen, welches mit dem psbC-Gen in allen Chloroplastengenomen als transkriptive Einheit vorliegt, ist auf diesem Minizirkel nicht vorhanden.

Der nicht-kodierende Bereich des psbC-Zirkels ist zirka 3,8kb groß und frei von Genen und offenen Leserahmen. In diesem genfreien Bereich wurden direkte und indirekte Sequenzwiederholungen gefunden (s. auch Auflistung Seite 43, Tab. 2). Es konnten

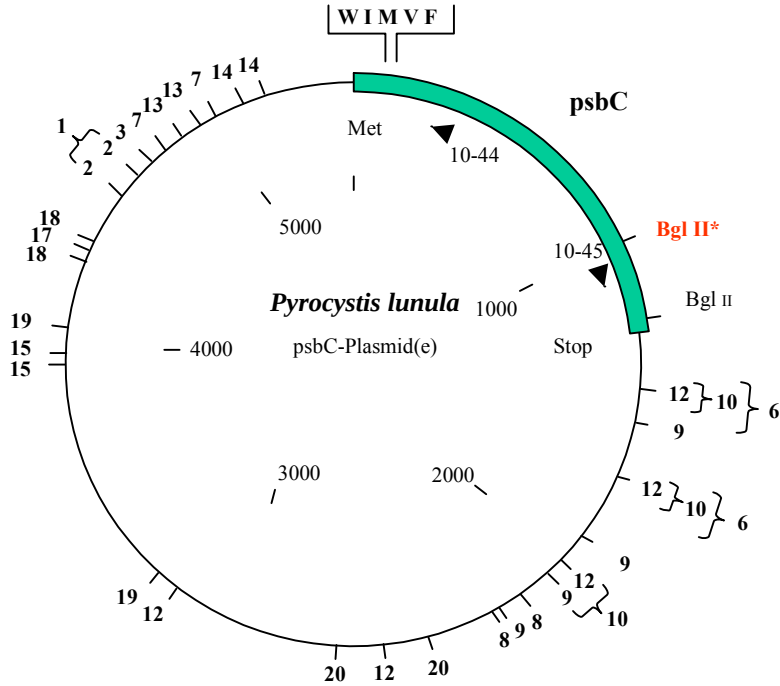


Abb 12: Darstellung des(r) psbC-Plasmid(e) von *Pyrocystis lunula* mit einer ungefähren Größe von 5,2kb. Die Position 1 des Zirkels beginnt mit dem Methionin (ATG) vom psbC. Gezeigt wird die fünf Aminosäuren-Insertion (s. oben) nahe des N-Terminus von psbC, die Restriktionspolymorphie des BglII (in rot). Die Position der Repeats sind als Zahlen dargestellt (s. auch Tabelle 2). Eingetragen sind die Primer der Invers-PCR 10-44/45 (Pfeilköpfe).

Mit der Kenntnis über das psbC-Plasmid wird verständlich, warum die Untersuchungen mit den erstellten Phagenbanken nur von begrenztem Erfolg waren. Diese wurden angefertigt für Inserts, die eine bestimmte Mindestgröße aufweisen. Mit dem Beweis des psbC-Minizirkel und der Annahme, dass Plastidengene (wahrscheinlich auch psbA) auf Zirkeln kodiert sind, konnten die Phagenbanken diese auf Grund fehlender Restriktionsstellen nicht erfassen. So wurde z.B. kein psbC-Signal in der BamHI-Phagenbank detektiert, weil psbC keine BamHI-Schnittstelle besitzt.

Es sollten Methoden zum Einsatz kommen, die die Natur der Plasmide berücksichtigen.

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) ergab keine Auftrennung der Zell-DNAs. Mit homologer Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass das Signal für *psbC* in der

Geltasche verbleibt (hier nicht gezeigt), was auf seine zirkuläre Natur zurückzuführen wäre, denn zirkuläre Moleküle wandern nicht im Pulsfeld (Sambrook *et al.* 1989).

Die Trennung von Gesamt-DNA über einen CsCl-Gleichgewicht-Dichtegradienten wurde optimiert, um eine Separation der verschiedenen DNA-Spezies zu erhalten.

3.6. Aufreinigung der *Pyrocystis lunula* Plasmide über einen kombinierten CsCl-Gradienten

Wie im Material- und Methodenteil beschrieben, wurden zwei aufeinanderfolgende CsCl-Gradienten durchgeführt, wobei der eine den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid benutzt und der zweite mit Bisbenzimid 33258 durchgeführt wurde. Mit dem Ethidiumbromidgradienten wurde die Gesamt DNA in zwei Banden aufgetrennt. Die leichtere (obere) Bande wurde in einem zweiten Gradienten mit Bisbenzimid ein weiteres Mal zentrifugiert. Es resultierten vier Banden.

Das Ernten des zweiten Gradienten geschah durch Fraktionierung von der geringsten bis zur höchsten Dichte (Tabelle 1 und Abb. 13a). In der anschließenden Dokumentation auf einem 1%igen Agarosegel ergab sich folgendes Bild (Abb. 13b).

Fraktion	Menge(µl)	Brechindex	Dichte(g/cm ³)	Rücklösevol.	aufgetragen
1	200	1,3902	1,6003	20µl	2µl
2	200	1,3905	1,6036	20µl	2µl
3	200	1,3908	1,6068	20µl	2µl
4	600	1,3917	1,6166	40µl	4µl
5	200	1,3921	1,6209	20µl	2µl
6	600	1,3939	1,6405	40µl	4µl
7	200	1,3949	1,6514	20µl	2µl
8	200	1,3952	1,6546	20µl	2µl
9	200	1,3957	1,6600	20µl	2µl
10	200	1,3961	1,6644	20µl	2µl
11	200	1,3970	1,6742	20µl	2µl
12	800	1,3983	1,6883	80µl	6µl
13	200	1,4000	1,7067	20µl	2µl
14	200	1,4010	1,7176	20µl	2µl
15	200	1,4020	1,7285	20µl	2µl
16	200	1,4020	1,7285	20µl	2µl
17	200	1,4030	1,7393	20µl	2µl
18	200	1,4035	1,7448	20µl	2µl

Tab. 1: Auflistung und Angaben zur Fraktionierung des zweiten CsCl-Gradienten (Bisbenzimid).

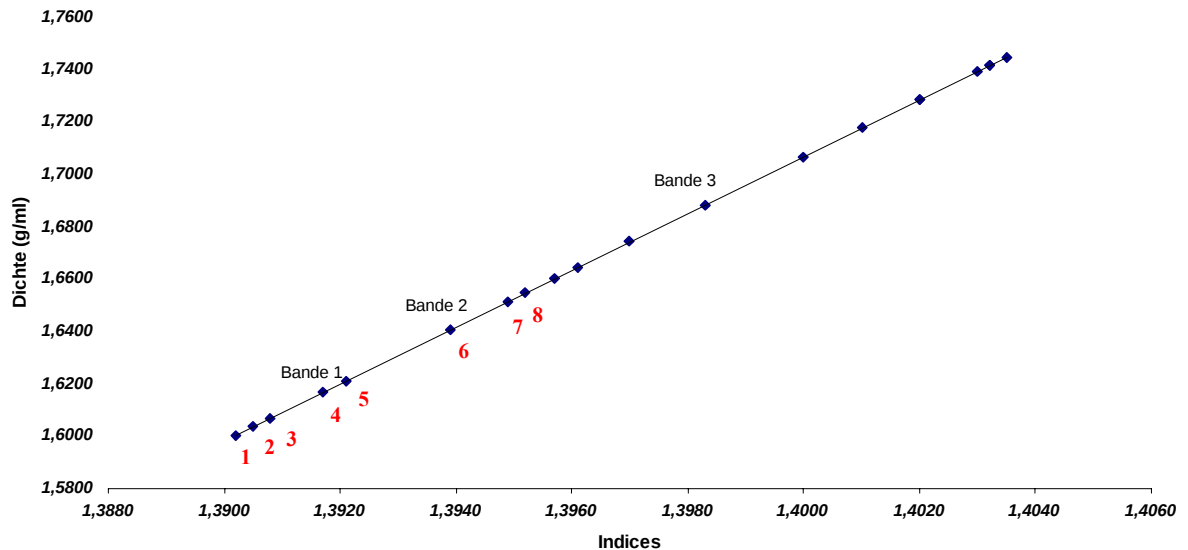


Abb. 13a: Graphische Darstellung zur Tabelle 1. Abszisse: Brechungsindex der CsCl-Fraktion, Ordinate: berechnete Dichte der CsCl-Fraktion aus den Brechungsindices. In die Abbildung eingetragen sind die Lokalisation der unter UV sichtbaren DNA-Banden und die Fraktionen, die auf ein Agarosegel aufgetragen wurden (rote Zahlen).

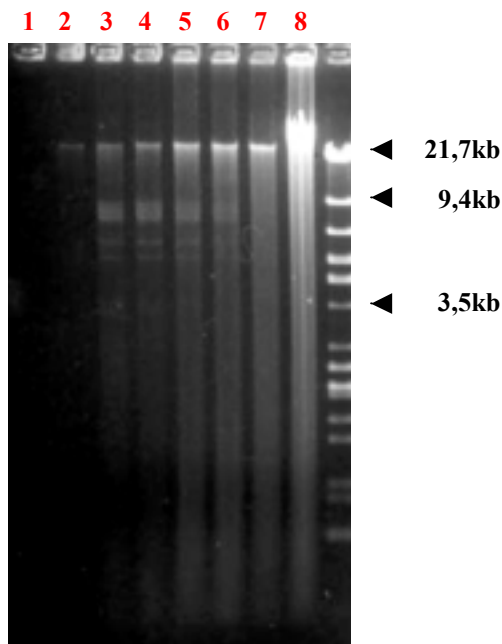


Abb. 13b: Fraktionierung des zweiten CsCl-Gleichgewichtgradienten nach Bisbenzimid. Aufgetragen sind die ersten acht Fraktionen aus dem Bisbenzimid-Gradienten. Die roten Zahlen entsprechen den roten Zahlen in Abbildung 13a. Besonders in Fraktion 3 und 4, die den leichteren Banden im Bisbenzimid-Gradienten entsprechen, sind im Agarosegel niedermolekulare Banden zu erkennen.

Mit diesem Foto (Abb. 13b) des fraktionierten Gradienten war zum ersten Mal ein direkter Nachweis der Plasmide über ein Agarosegel gelungen. Bis *dato* konnten Plasmide nur indirekt mittels der DNA-Hybridisierung oder diverser PCR-Techniken dargestellt werden. Auf dem Foto sind sechs prominente Banden, besonders in den Fraktionen 3, 4 und 5 zu sehen, die in einem Bereich von etwa 3,5 bis 9,5kb migrieren. In diesem Bereich wurden auch die Hybridisierungssignale für *psbC* und *psbA* detektiert (siehe 3.3.).

Die Bande, die ebenfalls in den Fraktionen 3, 4 und 5 erscheint und oberhalb des Referenzstandards bandiert, könnte kontaminante hochmolekulare DNA sein. Sie ist in fast jeder Fraktion vorhanden.

Mit der DNA aus den Fraktionen 3 und 4 des CsCl-Gradienten wurden pUC18-Banken hergestellt. Es wurden dafür die Enzyme BglII, XbaI, HindIII und PstI benutzt. Ungefähr 250 Klone (~50000 Nukleotide) wurden sequenziert und analysiert. Gefunden wurden nur wenige Gene, darunter das schon bekannte psbC-Gen. Entdeckt wurden auch zwei ribosomale Proteine der großen Untereinheit, rpl28 und rpl33, die beide in der selben Transkriptionsrichtung, durch 39 Nukleotide getrennt, hintereinander liegen. Des weiteren konnte ein mitochondriales Cytochromoxidase-Gen, coxI, entdeckt werden. Unsicherheit herrscht noch über die Herkunft des dnaB-Gens, einer Helikase, die Homolog zur DNA-Helikase (Acc. Nr.: CAA74140) von *Rhodothermus marinus* ist.

Mit dem rpl28/33-Gencluster wäre der erste Fall gegeben, in dem zwei Gene auf einem Zirkel liegen würden, was entgegen der von Zhang *et al.* (1999) aufgestellten „one gene, one circle“ Hypothese stünde. Dazu musste nun belegt werden, dass die beiden Gene sich auf einem Plasmid befinden. Hierfür wurde eine Southernhybridisierung gegen Gesamt-DNA von *Pyrocystis lunula* durchgeführt mit den rpl-Genen als radioaktiv markierter Sonde.

In Abbildung 14 zeigt sich, dass das Signal der ungeschnittenen rpl-Gene auf Höhe von 3kb bandiert. Die Signale in den Spuren von BamHI und XbaI entsprechen dem Signal des ungeschnittenen Zustandes. BglII hingegen besitzt ein Signal bei zirka 4,3kb. Da das restringierte Signal wesentlich höher im Gel gelaufen ist als das unrestringierte Signal, deutet dies möglicherweise auf die Existenz einer superhelikalen Konfiguration hin, was wiederum für das Vorhandensein eines Plasmids spricht. Somit wäre dies das erste Beispiel für mindestens zwei Gene auf einem Plasmid.

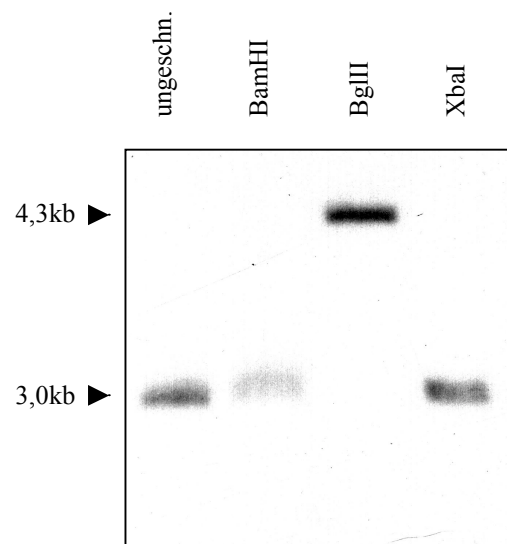


Abb. 14: Southernblotanalyse von Gesamt-DNA aus *Pyrocystis lunula*. Hybridisiert wurde mit einer radioaktiv markierten rpl28/33-Sonde.

Die vollständige Sequenz des rpl28/33 kodierenden Klons betrug 1149bp. Das Genprodukt von rpl28 hat hier eine Größe von 81AS und ist bis auf wenige Aminosäuren komplett in der Klonsequenz enthalten. Das rpl33-Gen ist mit seinen 186 Nukleotiden vollständig und hat dieselbe Transkriptionsrichtung wie rpl28. Etwa 80 Nukleotide nach dem rpl33-Gen folgt ein offener Leserahmen (ORF) mit einer Größe von 57 Aminosäuren (s. Abb. 15a). Er weist Ähnlichkeiten in Größe und Sequenz zum rpl33 auf (s. Abb. 15b) und schließt mit einer 35 Nukleotid langen Haarnadelstruktur ab. Es könnte angenommen werden, dass dieser Leserahmen eine Transkriptionseinheit mit den rpl-Genen bildet.

250 Nukleotide nach den rpl-Genen und ORF 57 befindet ein Leserahmen, der homolog zu ftsY ist, einer GTPase, die an Zellteilungsprozessen beteiligt ist (s. Abb. 15c).

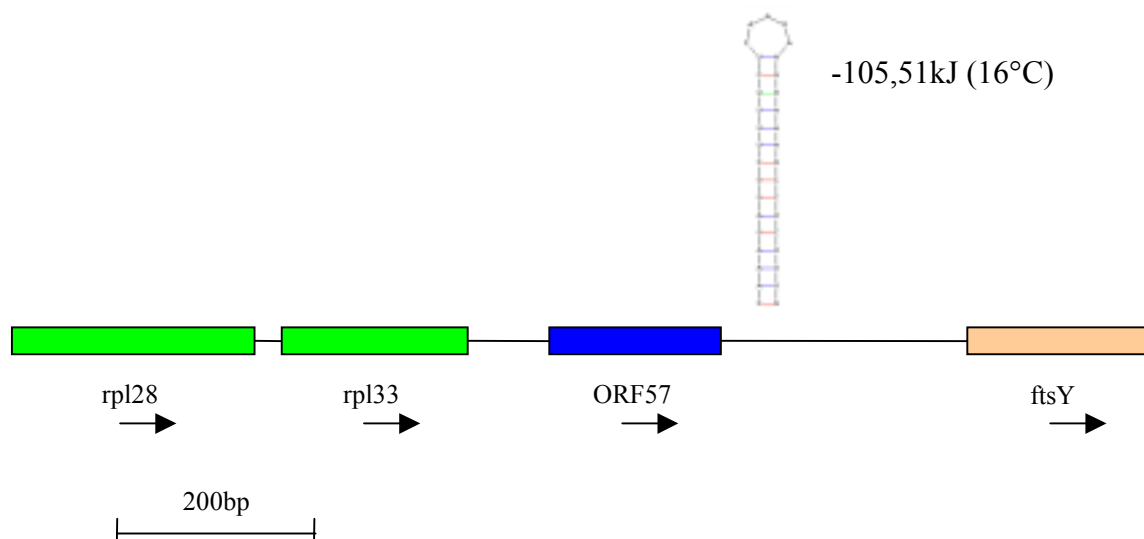


Abb. 15a: Darstellung des rpl28/33-Klons. Die Kästchen stellen die Gene dar. Die ribosomalen Proteine sind durch grüne Kästchen symbolisiert, offene Leserahmen durch blaue Kästchen. In Ocker ist ein Leserahmen dargestellt, der Homologien zum ftsY von *Bacillus halodurans* aufweist. Pfeile unter den Gennamen geben die Leserichtung an. Hinter dem offenen Leserahmen ist die Sekundärstruktur aufgezeigt, die eventuell das Operon terminiert.

orf57 **MAK****V****S****K****N****A****R** - - - **V****A****Q****R****K****A****N****A****G****S****G****R****D****F****V****K****V****V****Q****S****V****K****N****P****K** - - **T****G****T****Y****S****Y****K****E****V****M****I****H****K****D****K****V****K****A****F****L****A****K** 57
rpl33 **MAK****K****S****K****G****N****R****L****Q****V****I****M****E****C****T****E****H****K****A****S****G****M****P****G****T****S****R****Y****V****T****Q****K****N****R****K****N****T****P****D****R****L****E****L****K****K****F****N****P****I****L****K****R****V****T****I****H****R****E****I****K** 62

Abb. 15b: Alignment von Rpl33 und dem ORF57 von *Pyrocystis lunula*. Die Sequenzidentitäten werden durch rote Buchstaben symbolisiert.

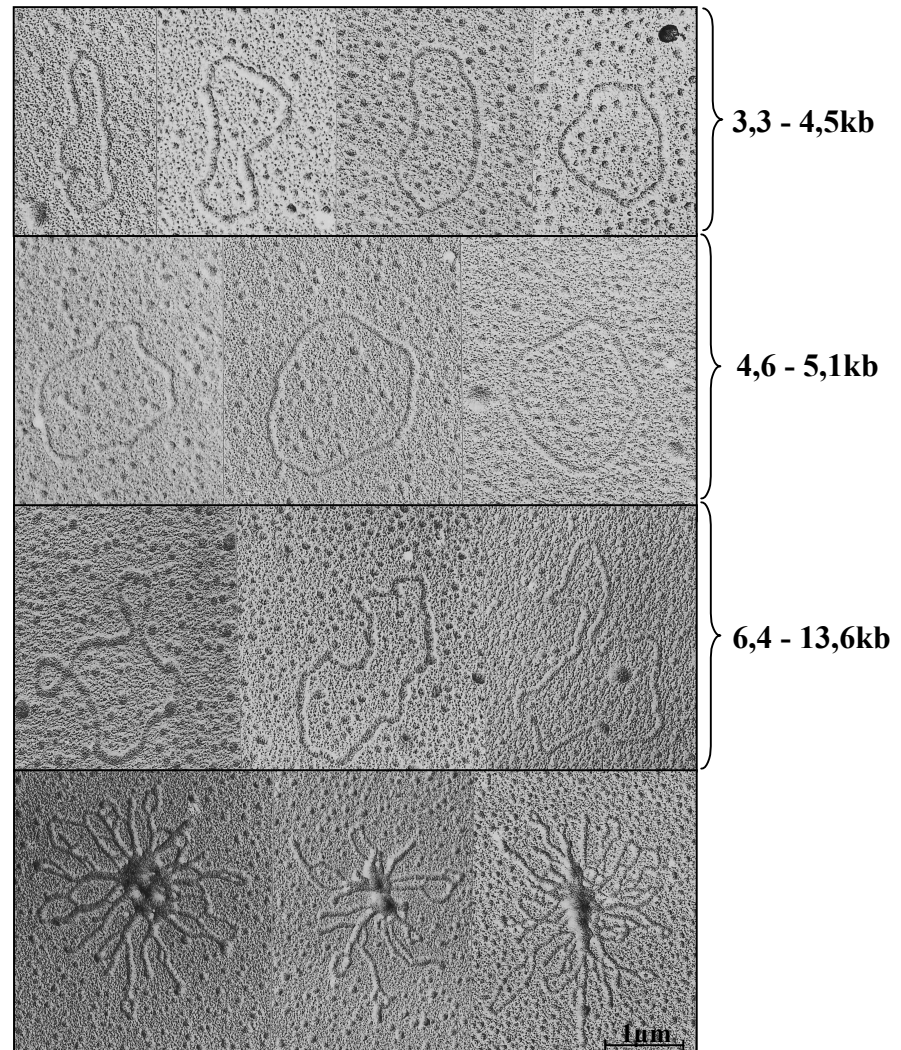
B. hal **MS****F****F****K****L****K****E****K****I****S****T****Q****T****T****E****V****T****E****K****F****K****A****G****L****E****K****T****R****D****S****F****A****G****K****M****N****D****L****V****Y****K****Y****R****S****V****D****E****D****F****F****E****E****L****E****E****I****L****I****G****A****D****V****G****V** 66
P. lun **MS****F****F****S****K****F****F****N****K** - - - - - **E****K****K****E****D****L****D****K****G****L****E****K****T****K****T****S****F****L****G****K****L****S****K****A****I****A****G****K****S****T****V****D****I****E****V****L****D****E****L****E****N****I****L****V****S****S****D****V****G****L** 60

Abb. 15c: Partielles Alignment des FtsY von *Pyrocystis lunula* und *Bacillus halodurans* (Takami, 1999). Die roten Buchstaben geben die Sequenzidentitäten an.

Index	Sequence	Length
1	TTCAGAAATGAATACTAGTATGAACGAATAGTGAAATACTAGTATGAATGTATTTA	55N
2	AATACTAGTATGAA	14N
3	TGTGTGTTGCTTTTGGA	17N
4	TTAGAAAGAGG	11N
5	TTCATATCTGTT	12N
6	TGTGTATTCAAGAATGAATAATAGTCAAGCCTTAGTAATAAAGCTTGACCTATACCTGAT	60N
7	ATGTATTTATTAATTG	16N
8	GCTTGAATA	9N
9	TGAATAGTCAAGC	13N
10	AATAGTCAAGCCTTAGTAATAAAGCTTGACCTATACCTGAT	41N
11	TCTAAATTGTGAATAGTGAAGAGATAAAGAAAGAATAAAACCTGTTTCATATCTGTGAA	59N
12	GCTTGACCTATACCTGAT	18N
13	AAGAGACTCTTCTTTGAA	18N
14	TTATTTGAAATAGGTAGTTGCTTTTT	26N
15	TATTACTCTAATTCCTATTAGTATTTCACTATTCGTTCCATACTAATACTCAACGAGTAATAT	64N
16	TGATTGTTAGGTTTCAGCAGTAGGTACTAATACTTAGTATAGTATTAGTAAATCATCAGGTA TAGGTCAAGCTTTATTACTAAGGCTTGACTATT	96N
17	TCTAAATTGTGAA	13N
18	GAATAAAACCTGTTTCATATCTGTGAA	27N
19	GGTGGTTTATAGAGTTGCAGCTTTCTTTCTTTCTTTATTTTAAATTTCTTTCTTT	55N
20	AAACAGAAAAAGTGCATTGCCGATTTATTTAAGGTAGATTTTACTGCGGTAAATTGGTATTTTT TCAATAAGTAATT	76N

Die Aufreinigung von *Pyrocystis lunula* Gesamt-DNA über den Gradienten brachte zwar die niedermolekularen Banden zum Vorschein, aber die tatsächliche zirkuläre Natur war damit noch nicht bestätigt. Mit der Methode der DNA-Spreitung und anschließender Kontrastierung mittels Kohle/Platin-Bedampfung sollte die DNA aus den Fraktionen 3 bzw. 4 unter dem Elektronenmikroskop visualisiert werden (s. Abb. 16).

Abb. 16: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der niedermolekularen Banden von *Pyrocystis lunula*, die über den CsCl-Dichtegradienten isoliert wurden. Aus der Fraktion 3 (s. Abb. 13) wurden 5pg DNA mit der Diffusionsmethode gespreitet und mit Kohle/Platin rotierend in einem 6,5 Gradwinkel bedampft. Die Minizirkel wurden fotografisch festgehalten und mit Hilfe eines elektronischen Maßstabsberechners ließen sich distinkte Größenklassen bestimmen. Bei schonender Lyse von *Pyrocystis lunula* konnte eine Anhäufung superhelikaler Plasmide in einem rosettenförmigen Gebilde gesehen werden. Die Plasmide scheinen einen Protein-ähnlichen Assoziationspunkt zu besitzen.



Mit diesen elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 16 konnte zum ersten Mal die Zirkularität der niedermolekularen DNA dokumentiert werden. Es wurden 89 zirkuläre Plasmide fotografiert und mittels eines Maßstabberechners (electronic graphic calculator) von μm auf kb rückgerechnet. Tabelle 3 gibt einen ungefähren Überblick über die Größenverteilung und Anzahl der Minizirkel.

Größe (kb)	2,2-3,0	3,1-4,0	4,1-5,0	5,1-6,0	6,1-7,0	>7,1
Anzahl	12 (13,8%)	33 (37,9%)	35 (40,2%)	2 (2,3%)	3 (3,5%)	2 (2,3%)

Tab. 3: Verteilung der Plasmidgrößen von *Pyrocystis lunula*. Die Tabelle gibt einen ungefähren Überblick, mit welcher Häufigkeit bestimmte Minizirkelgrößen in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen auftraten.

Außer den Minizirkeln wurden in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen rosettenförmige Gebilde entdeckt. Diese scheinen sich aus vielen superhelikalen Plasmiden zusammenzusetzen, die zentral durch Proteine zusammengehalten werden.

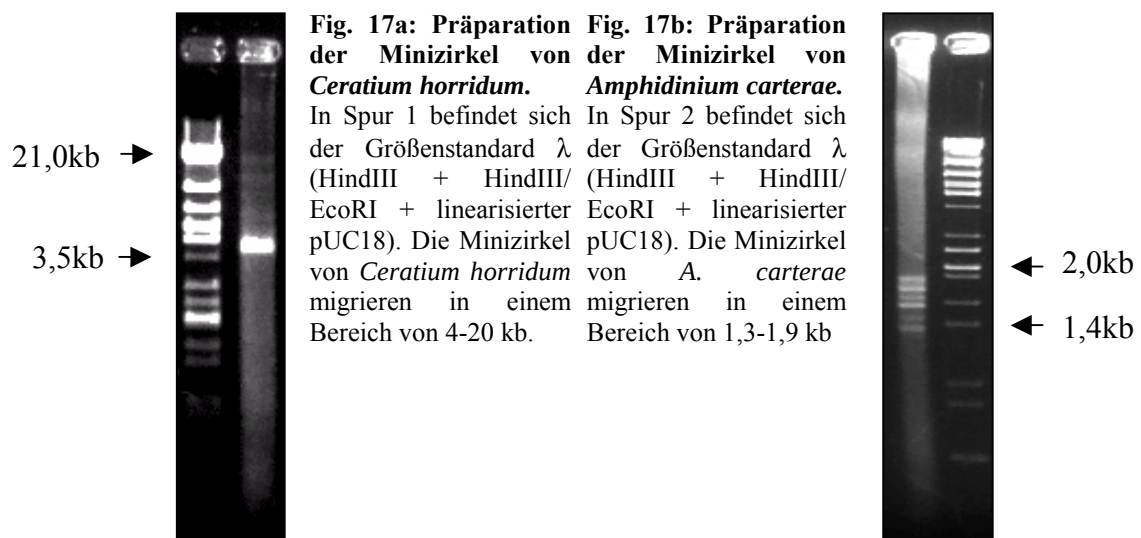
3.7. Aufreinigung der Dinoflagellaten-Plasmide mit Hilfe der Plasmidpräparation

Nach dem es eindeutig war, dass es sich hier um Plasmide handelt, bot es sich an diese von der übrigen DNA auf Grund ihrer Konfiguration zu trennen.

Die Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) konnte so abgewandelt werden, dass sich damit die Plasmide aus den Dinoflagellaten isolieren ließen. Mit gängigen Plasmidpräparation-Kits ließen sich schnell und relativ sauber die Minizirkel verschiedener Dinoflagellaten rein darstellen (s. Abb. 17a,b).

Da die einzelnen Dinoflagellaten verschieden in ihrem Zellwandaufbau sind, mussten diese auf verschiedene Weise vorbehandelt werden (s. Material und Methoden).

Besonders geeignet erwiesen sich *Amphidinium carterae* und *Ceratium horridum*. Hier handelt es sich um Dinoflagellaten, die einfach aufzubrechen waren auf Grund ihrer labileren Zellwandbeschaffenheit. *Amphidinium carterae* besitzt keine Zelluloseplatten und *Ceratium horridum* ist durch seine langen Hörner sehr fragil.



In der Plasmidpräparation von *Ceratium horridum* (Abb. 17a) sind Banden zu erkennen, die in einem Bereich von 4-20kb migrieren. Die Bande bei 4kb ist sehr dominant. Bei entsprechend schonendem Aufschluss der Zellen wurde auch die Ausbeute an größeren Minizirkeln erhöht.

In der Plasmidpräparation von *Amphidinium carterae* sind sechs Banden zu erkennen, die zwischen 1,4 und 2kb migrieren.

Für *Pyrocystis lunula* war die Methode der Plasmidpräparation weniger gut geeignet, da die harte und resistente Zellwand der Zysten sich nicht aufschließen ließ.

Durch Testen verschiedener Plasmidpräparation-Kits hat sich gezeigt, dass die Präparation mit dem Qiagen-Kit anscheinend schonend ist, aber nicht unbedingt effektiv. Anhand von Geldokumentationen und EM-Aufnahmen konnte die Intaktheit der Zirkel überprüft werden, die sich bei der Qiagenmethode in größeren Mengen an zirkulären Molekülen äußert.

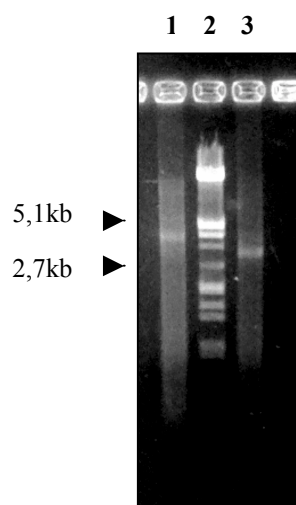


Abb. 18: Plasmidpräparation von *Ceratium horridum* mit dem Kit von Invitex (Spur 1) und Qiagen (Spur 3). Die prominente Plasmidbande läuft bei der Qiagenprobe viel weiter in das Gel ein und bandiert bei etwa 3kb. Die Invitexprobe migriert bei zirka 4kb.

Mit dieser Methode der Plasmidpräparation für Dinoflagellaten war es nun möglich, innerhalb kürzester Zeit die Minizirkel zu isolieren.

Ob die isolierten Minizirkel von *C. horridum* ähnlich sind zu den Zirkeln von *Pyrocystis lunula* und ebenfalls Plastidengene kodieren, sollte mit Hilfe von Schrotschußklonierungen überprüft werden. Über hundert Klone wurden sequenziert und deren Sequenz überprüft. Es wurden über 61000bp analysiert. Zusätzlich wurden die hier aufgereinigten Minizirkel in Marburg von Dr. S. Zauner aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U.-G. Maier nochmals

schrotschußkloniert, sequenziert und Zirkel komplettiert. Es kamen 60000bp an Sequenzinformation hinzu.

Folgende Gene (vollständig oder partiell) konnten gefunden werden:

Die kleine ribosomale Untereinheit	16S rRNA
Die große ribosomale Untereinheit	23S rRNA
Photosystem I P700 Apoprotein A1	psaA
Photosystem I P700 Apoprotein B1	psaB
Photosystem II CP47 Chlorophyll Apoprotein	psbB auf einem 5,8 kb Zirkel
Photosystem II CP47 Chlorophyll Apoprotein	psbB auf einem 3kb Zirkel
Photosystem II CP43 Chlorophyll Apoprotein	psbC
Photosystem II Reaktionszentrum-Protein	psbD
Photosystem II Cytochrom b_{559} α -Untereinheit	psbE
Cytochrom b_6f Apoprotein	petB
Cytochrom b_6f Apoprotein	petB (N-terminal verkürzt)
Abc-Transporter	ycf16
Abc-Transporter	ycf24

Zusätzlich konnte aus der Menge der Daten ein Sequenzbereich identifiziert werden, der im Nachfolgenden als Core-Region bezeichnet wird. Diese Region konnte später auf allen identifizierten Plasmiden nachgewiesen werden.

16S rRNA

Die 911 Nukleotide der hier gefundenen 16S rRNA zeigen in ihrer Sequenz Homologie zum 3'-Bereich der 1544 Nukleotid großen 16S rRNA von *Heterocapsa triquetra*, ebenfalls ein Peridinin-haltiger Dinoflagellat, aber zu sonst keiner weiteren ribosomalen RNA-Sequenz anderer Organismen. Nach Überprüfung der 16S rRNA von *Heterocapsa triquetra* hatte dieses Gen keine Homologie zu anderen 16S Sequenzen. Es war nicht eindeutig zu klären, ob der Datenbankeintrag (Acc. Nr.: AF130038) von *Heterocapsa triquetra* wirklich 16S rRNA ist.

23S rRNA

Die 23S rRNA ist homolog zur 2421 Nukleotid großen 23S rRNA von *Protoceratium reticulatum* (Acc. Nr.: AF206702), weist aber einige Lücken zu dieser auf. Es werden durch die Sequenz mehrere Klone etwa 600bp des 3'-Bereiches und 700bp des 5'-Bereiches (beginnend an Nukleotid Position 300 von *Protoceratium reticulatum* 23S rRNA) abgedeckt. Neben der 23S rRNA treten in vielen Klonen Sequenzbereiche auf, die sich von der 23S rRNA ableiten, aber nur eine geringe Größe haben. Es sind die Sequenzen:

5'-CAGTACGCAAGGACCAGCAACAAAT-3' vergleichbar mit *Protoceratium reticulatum* an der Position 2285 -2309 und

5'-CTGTTTCATTGGGGCGATAACCTTCTTTAATCAAACAAAGGTGAACAAAGCT-3' bei Position 2505-2557.

Im Folgenden werden diese Sequenzen als Pseudogene (ψ) bezeichnet.

psaA

Das psaA-Gen wurde nur partiell gefunden mit etwa 80AS. Ähnlich wie bei der 23S rRNA gibt es Fragmente des psaA, die in manchen Klonsequenzen auftreten. Es sind Bereiche aus dem psaA-Gen, die zwischen 10 und 16 Aminosäuren groß sind:

- I) **YGFIFIRAHFLWAFSL** Position 668-684 bei *Heterocapsa triquetra*
- II) **RGYWEQL** Position 690-697 bei *Heterocapsa triquetra*

Im Folgenden werden diese psaA-Bereiche als Pseudogene (ψ) bezeichnet.

psaB

Von psaB sind 226AS des C-Terminus bekannt. Auch hier treten in manchen Klonen fragmentarische Aminosäurebereiche von psaB auf, die 10-20 AS groß sind.

In Abbildung 19 ist das partielle psaB-Gen und der Zusammenhang zur „Core-Region“ dargestellt.

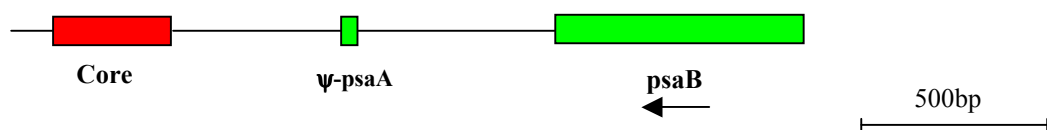


Abb. 19: Darstellung der Anordnung des Core-Bereiches zu psaB.

Ein Klon, der 226 Aminosäuren des C-Terminus von psaB (grünes Kästchen) und die Core-Region (rotes Kästchen) aufweist, ist hier skizziert. Zwischen psaB und der Core-Sequenz ist ein Motif von psaA.

psbB

Das psbB-Gen ist vollständig sequenziert und weist etwa in der Mitte der Sequenz eine Insertion von 20 Nukleotiden auf, die zu einem Leserahmensprung führt (s. Abb. 20). Diese Insertion erinnert an die Insertionen in *Prorocentrum micans* (psbC, Abb. 5) und *Pyrocystis lunula* (psbC, Abb. 11b), die von ähnlicher Größe sind.

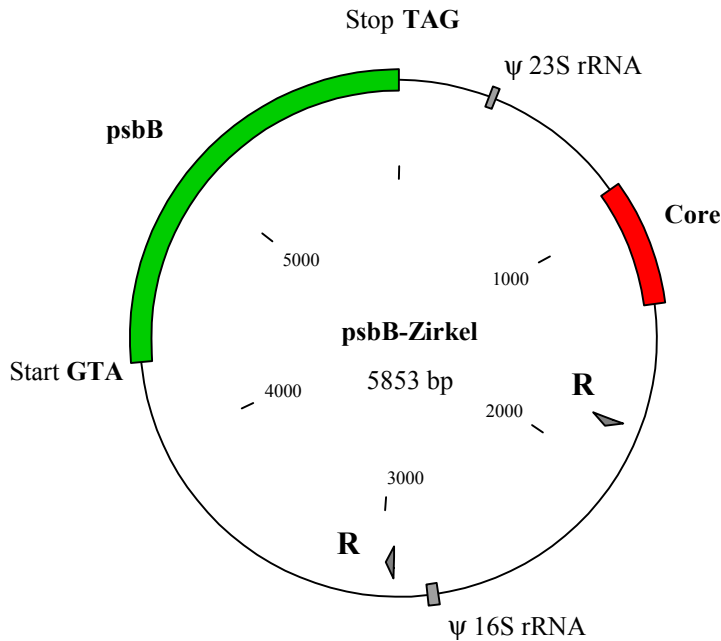
		1		40
<i>C. hor</i>	100.0%	VARNALFFSIPWFRVHIIILNDPGR LVS VHLMHRA FVTGW.....		
1 <i>H. tri</i>	68.0%	-----MRLPWFRVHIVILNDPGR LISVHIMHTALVAGW.....		
2 <i>A. ope</i>	54.2%	-----VRLPWFRVHIVVLNDPGR LISVHLMHTGLISGW.....		
3 <i>G. the</i>	51.5%	-----MGLPWYRVHTTVLNDPGR LIAVHLMHTALVAGW.....		
4 <i>C. par</i>	50.7%	-----MALPWYRVHTTVLNDPGR LISVHLMHTALVSGW.....		
5 <i>O. sin</i>	49.9%	-----MALPWYRVHTTVLNDPGR LIAVHLMHTALVAGW.....		
6 <i>P. pur</i>	49.5%	-----MGLPWYRVHTTVLNDPGR LIAVHLMHTALVAGW.....		
7 <i>C. vul</i>	48.9%	-----MGLPWYRVHTTVLNDPGR LIAVHLMHTSLVSGW.....		
		** ** * * * * * * * * * * * *		
		241		300
1. Leserahmen		EEVLCSSIASVFFTTFIN AISLLI TLLCGMGLYQVE*		
2. Leserahmen		*LANHSLMWYGSVSSGVELYGPSRYHWDNGYFSLEVERRV		
1		EGALSSSIAAVFFTA FIT-----SATMWYGS LSTALELFGPSRYHWDNGYFSLDIERRV		
2		ESVLASSIAVFFTA LIT-----SSASWYGS LTQPVELNGPTRYHWDNAYFNQE IETQV		
3		ETVLSSSIAAVFFAA FIT-----TGTMWYGS ATTPIELFGPTRYQWDSGYFQQE IERRV		
4		ETVLSSSIAAVFFA SFV-----VSGTMWYG AASTPIELFGPTRYQWDSGYFQQE IEKRV		
5		ETVLSSSIAAVFFAA FVT-----SGTMWYG AAATPIELFGPTRYQWDSGYFQQE IERQV		
6		ETVLSSSISAVFFA FIT-----CGTMWYGS ATTPIELFGPTRYQWDSGYFQQE IEKRV		
7		ETVLSSSIAAVFWAA FV-----VSGTMWYG SAATPIELFGPTRYQWDLGFFQQE IERRV		
		* * * * * * * * * * * *		

Abb. 20: Partielles psbB Alignment von *Ceratium horridum*.

Gezeigt wird der verlängerte N-terminale Bereich des Gens, welcher wahrscheinlich mit einem Valin (GTA) beginnt und eine Insertion (rote Buchstaben), die sich etwa bei Aminosäureposition 260 befindet. Diese Insertion von 23 Nukleotiden führt zu einem Leserahmensprung (Pfeil). (1) *Heterocapsa triquetra*, (2) *Amphidinium operculatum*, (3) *Guillardia theta*, (4) *Cyanophora paradoxa*, (5) *Odontella sinensis*, (6) *Porphyr a purpurea*, (7) *Chlorella vulgaris*.

Die Abbildung 20 zeigt, dass PsbB N-terminal verlängert ist und wahrscheinlich mit einem Valin (GTA) beginnt. Weiter wird deutlich, dass die Insertion in anderen psbB-Genen nicht existiert.

Die Sequenzen der Schrotschußklonierung ergaben darüber hinaus, dass es zwei Kopien des psbB-Gens gibt, welche auf jeweils einem Zirkel liegen. Beide psbB-Gene sind in ihrer kodierenden Sequenz identisch und haben jeweils die Insertion von 20 Nukleotiden. Ein psbB-Gen liegt auf einem 5,8kb großen Zirkel und das zweite auf einen zirka 2,3kb großen Zirkel. Der Unterschied, der die Größendifferenz ausmacht, liegt im nichtkodierenden Bereich der Zirkel. Die Abbildungen 21 und 22 geben die beiden Zirkel wider.



R: 5'-AACCTTGTCTCCATTAGTAGCACTCTATTGGATAA-3'

Abb. 21: Darstellung des vollständig sequenzierten psbB-Zirkels.

Zu sehen ist die 449bp große Core-Region, die etwa 1000bp hinter dem C-Terminus des psbB liegt. Es existieren auch die oben genannten Sequenzfragmente von der 23S rRNA und der 16S rRNA.

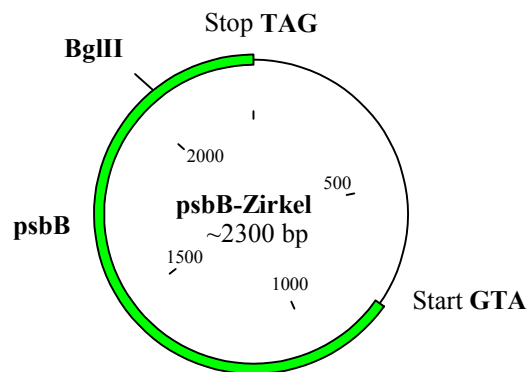


Abb. 22: Skizze des zweiten psbB-Zirkels, der nicht vollständig sequenziert ist. Mit einer singulären BglII-Schnittstelle im psbB konnte der ganze Zirkel in einen pUC18-Vektor kloniert werden. Durch Restriktionsanalysen wurde die Größe des Zirkels bestimmt.

Im großen psbB-Zirkel finden sich neben der Core-Region auch die oben angesprochenen Genfragmente der 23S rRNA und 16S rRNA wieder. Hier existiert auch eine Sequenzwiederholung (R) mit einer Größe von 35 Nukleotiden, welche zweimal im großen psbB-Zirkel auftritt.

Die Core-Region im kleinen psbB-Zirkel ist noch nicht gesichert und deswegen in Abbildung 22 nicht eingezeichnet.

psbC

Vom psbC-Gen wurden etwa 50 Aminosäuren des C-Terminus gefunden. Der Leserahmen, der kolinear zu anderen psbC-Sequenzen ist, existieren zwei Terminations-Codons (s. Abb. 23). Sie sind durch das Triplet TGA gekennzeichnet. Das „tatsächliche“ Stoppkodon hat das Triplet TAA.

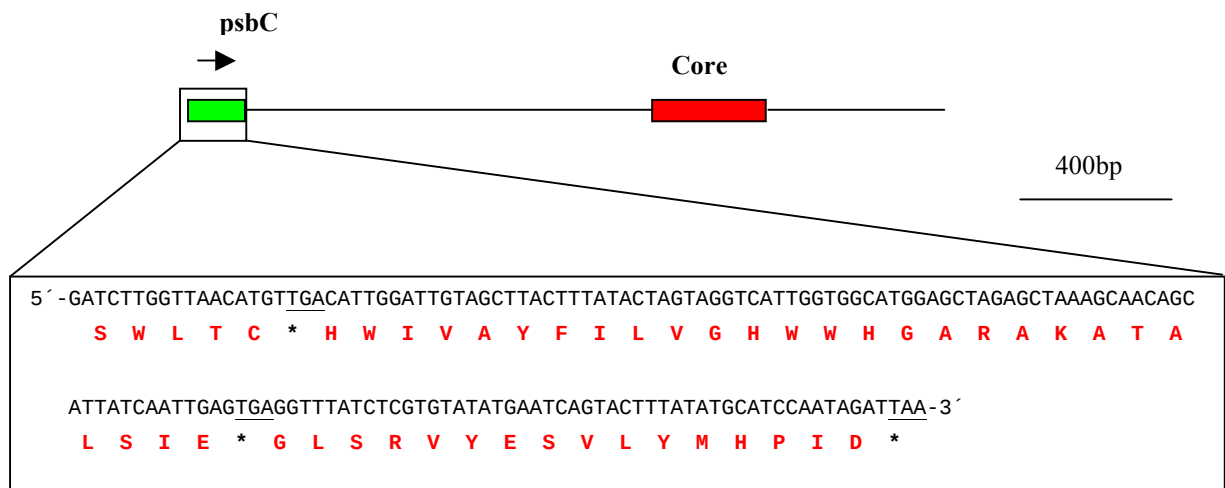


Abb. 23: C-Terminus des psbC-Gens von *Ceratium horridum*. Abgebildet ist die Nukleinsäuresequenz und die in Aminosäuren übersetzte psbC-Sequenz. In der Nukleotidsequenz sind die Terminationskodons unterstrichen. In der Aminosäuresequenz (rote Buchstaben) sind Terminationskodons durch Sternchen dargestellt.

psbD

Der komplette Minizirkel, der psbD kodiert, wurde in zwei Klonen gefunden, wobei der Klon pCh26 den N-Terminus und der Klon pCh30 den C-Terminus des Gens enthält (s. Anhang). Dass diese Klone zusammen einen Zirkel ergeben, wurde mit PCR über die BglII-Schnittstellen hinweg geprüft.

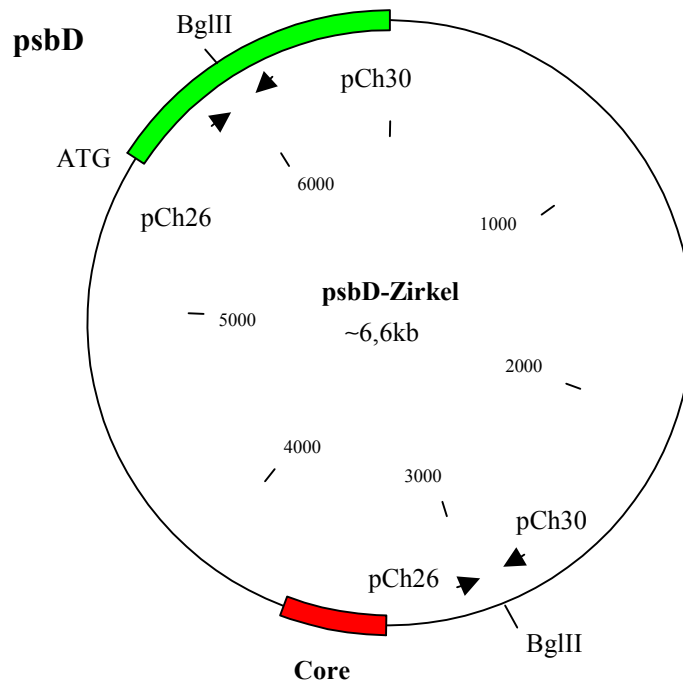


Abb. 24: Der psbD-Zirkel aus *Ceratium horridum*. Der psbD-Minizirkel ist etwa 6,6kb groß und weist neben dem psbD-Leserahmen (grünes Kästchen) die Core-Region (rotes Kästchen) auf. Das psbD-Gen, die Core-Region und Teile des Zirkels sind sequenziert. Die beiden Klone, pCh26 und pCh30, die durch die BglII- Schnittstellen getrennt werden, wurden mit PCR auf ihre Zusammengehörigkeit hin überprüft.

petB

Das petB-Gen wurde in zwei Varianten gefunden. Es existiert sowohl mit einem „normalen“ N-Terminus als auch um ein durch 16 Aminosäuren verkürztes Genprodukt, welches vermutlich mit einem Valin (GTA) beginnt.

		1		67
<i>C. hor</i>	100.0%	MGFLYRWCEERFEFQVI	ADDILAKFVPVHMNI	FYCFGGILLTSFLFHINARELKVILLQTTFGWLIR
<i>C. hor</i>		-----	VADDILAKFVPVHMNI	FYCFGGILLTSFLFHINARELKVILLQTTFGWLIR
1 <i>H. tri</i>	59.7%	MGFIYDWSEERLEIQSI	ADDILSKFVPSHVNI	FYCFGGIVLTAFIFQVEASSIQLILYHVNLGWFIR
2 <i>A. car</i>	59.7%	VGFIYDWCEERLELQSI	ADDILSKFVPSHVNI	FYCFGGIVLTCFIYRPNVVEVYITNEVSFGWLVR
3 <i>O. sin</i>	55.2%	MGKVYDWFEERLEIQAI	ADDISSKYVPPHVNI	FYCFGGIVFTCFLVQVATASVEYIMTSVNF
4 <i>S. cos</i>	55.2%	MGKVYDWFEERLEIQAI	ADDISSKYVPPHVNI	FYCFGGIVFTCFLVQVATASVEYIMTSVNF
5 <i>N. oli</i>	55.2%	MSKIYDWFEERLEIQAI	ADDISSKYVPPHVNI	FYCFGGITLTCFLVQVATASVEYIMTSVNF
6 <i>M. pol</i>	55.2%	MGKVYDWFEERLEIQAI	ADDISSKYVPPHVNI	FYCLGGITLTCFLVQVATASVQYIMTEVNF
7 <i>G. the</i>	49.3%	MGKVYDWFEERLEIQAI	ADDISSKYVPPHVNI	FYCIGGITFTCFIIVQVATASVEYIMTEVNF
		* * * * *	* * * * *	* * * * *

Abb. 25: Partielles petB Alignment. Es existieren zwei petB-Gene, wobei eines einen verkürzten N-Terminus aufweist. Möglicherweise ist ein Valin (GTA) der Beginn. Rote Buchstaben zeigen die Identitäten zwischen den petB-Genen, die auch auf Nukleotidebene identisch sind. In Blau ist ein Aminosäurebereich gekennzeichnet, der in Dinoflagellaten verändert ist. (1) *Heterocapsa triquetra*, (2) *Amphidinium carterae*, (3) *Odontella sinensis*, (4) *Skeletonema costatum*, (5) *Nephroselmis olivacea*, (6) *Marchantia polymorpha*, (7) *Guillardia theta*.

ycf16 und ycf24

Mit den Genen ycf16 und ycf24 sind zwei hypothetische Chloroplasten-Leserahmen entdeckt worden. Für ycf16 existiert eine vollständige Sequenz. Die theoretische Größe von Ycf24 beträgt bei einem vergleichbaren Organismus, wie *Cyanophora paradoxa*, 486 Aminosäuren. Demnach fehlen hier die ersten 116AS des N-Terminus. Beide Gene liegen direkt hintereinander in der Sequenz, wobei hier noch nicht bewiesen ist, ob es sich auch hierbei um einen Minizirkel handelt.

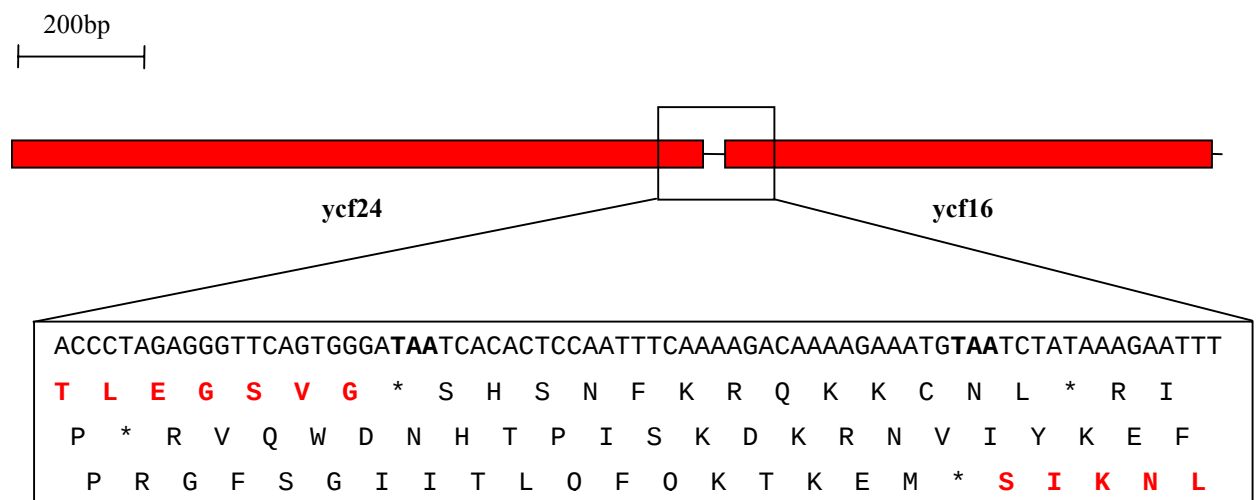


Abb. 26a: Die Gene ycf24 und ycf16 liegen beide direkt hintereinander auf demselben Klon. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt den Bereich zwischen dem C-Terminus von Ycf24 und dem N-Terminus von Ycf16. Es existiert kein Initiationskodon für Methionin (ATG) oder Valin (GTA).

Wird der Bereich zwischen den beiden ycf-Genen näher betrachtet (s. Abb. 26a), so scheint ycf24 ein normales Ende zu besitzen, wie es auch bei anderen ycf24-Genen erscheint (s. Abb. 26b).

<i>Ceratium horridum</i>	G I I F C S F S E A V K E H P E L V R K H M G T V P T S D N Y F A A L N S A V F S D	
<i>Escherichia coli</i>	G I I F C S F G E A I H D H P E L V R K Y L G T V V P G N D N F F A A L N A A V A S D	495 Acc. Nr.: P77522
<i>Synechocystis sp. 6803</i>	G V I F C S I S E A L Q E H P D L V Q K Y L G S V V P T A D N F F A A L N S A V F S D	480 Acc. Nr.: Q55790
<i>Cyanophora paradoxa</i>	G V I F C P I S E A V Q K Y P D L I K K Y L G S V S T S D N Y F S C L N A A V F S D	486 Acc. Nr.: P48260
<i>Porphyra purpurea</i>	G V I F C S I S E A I R N Y P D L I Q K Y L G T V V P S G D N Y F A A L N S A V F S D	487 Acc. Nr.: P51240
<i>Odontella sinensis</i>	G V I F S S I S E A I Q E Y P E L I E K Y L G S V V P I G D N Y F S A L N S A V F T D	486 Acc. Nr.: P49530
<i>Guillardia theta</i>	G V L F C P L S E A T N K Y S T L V E K Y L G S V V P I G D N Y F A A L N S A V F S E	483 Acc. Nr.: 078473

Abb. 26b: Multiples Alignment der C-terminalen Regionen von ycf24-Genen. In roten Buchstaben sind die Sequenzidentitäten angegeben.

Der Anfang von ycf16 hingegen ist nicht eindeutig. Es gibt kein Methionin- oder Valin-Startkodon. Die erste Aminosäure, die in einem multiplen Alignment (s. Abb. 26c) noch Homologien zu anderen ycf16-Genen besitzt, ist Serin (s. Abb. 26a rotes „S“ im unteren

Leserahmen). Möglich wäre es, dass Methionin, welches direkt vor Serin liegt und durch ein Stoppkodon von diesem getrennt wird, den Anfang des Proteins darstellt.

Dieser Fall der internen Stoppkodons wäre vergleichbar zum psbC-Gen von *Ceratium horridum* (s. Abb. 23), welches zwei interne Stoppkodons besitzt.

<i>Ceratium horridum</i>	M*SIKNLEARIEEKEILRGINLEVKPGEIHAIMGPNNGSGKSTLASV	
<i>Escherichia coli</i>	MLSIKDLHVSVEDKAILRGLSLDVHPGEVHAIMGPNNGSGKSTLSAT	Acc.Nr. : P77499
<i>Synechocystis. sp.6803</i>	MSQTI LSIKNLT ASVDGNQILKGVNLEIKAGEVHAIMGRNGSGKSTLSKV	Acc.Nr. : Q55791
<i>Cyanophora paradoxa</i>	MST E TKILEVKNLKAQVDGTEILKGVNLTINSGEIHAIMGPNNGSGKSTFSKI	Acc.Nr. : P48255
<i>Porphyra purpurea</i>	MSDYILEIKDLHASVNDVPILKGVNLSIKPGEIHAIMGPNNGSGKSTLSKV	Acc.Nr. : P51241
<i>Odontella sinensis</i>	MNTNYPIL EIKNLK ACINENEILKDLNLKIHKGEIHAIMGPNNGSGKSTFSKV	Acc.Nr. : Q00830
<i>Guillardia theta</i>	MKKKILEVTNLHA AVNEIK IVKGLNLVVNAGEIHAIMGKNNGSGKSTFAKI	Acc.Nr. : 078474

Abb. 26c: Multiples Alignment der N-terminalen Regionen von yc16-Genen. Rote Buchstaben zeigen die Sequenzidentitäten an. Das Sternchen entspricht dem Stoppkodon aus Abbildung 26a.

Plastidengen-freier Zirkel

Aus den vielen Sequenzdaten von *C. horridum* Plasmiden hat sich auch herauskristallisiert, dass es anscheinend auch Minizirkel gibt, die kein Plastidengen kodieren. Diese besitzen aber die Core-Region und die o.g. Pseudogene. In Abb. 27 ist ein Minizirkel dargestellt, der „genlos“ ist, aber wie der psbB-Zirkel eine Core-Region und zahlreiche Genfragmente aufweist. Die Größe des Minizirkels liegt im Größenbereich der anderen Zirkel.

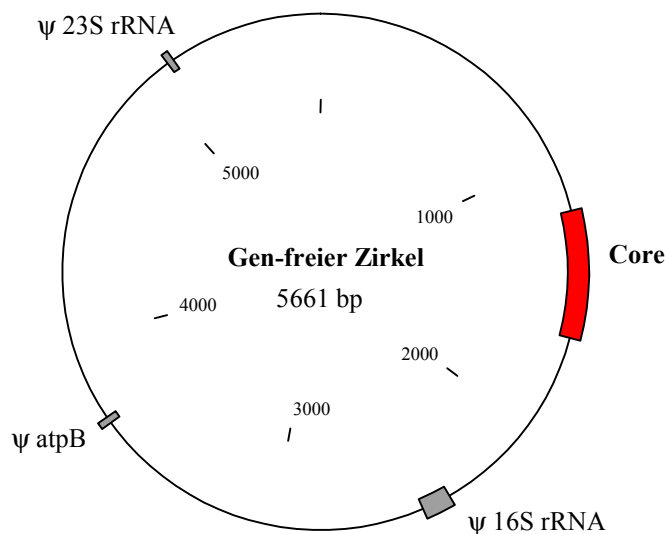


Abb. 27:
Plastidengen-freier Zirkel. Beispiel eines Minizirkels, der kein Gen kodiert. Es tauchen die aus dem psbB-Zirkel bekannten Pseudogene für die 16S und 23S rRNA auf. Ein kleiner Bereich des atpB ist auf diesem Zirkel zusätzlich enthalten.

3.7.1. Untersuchungen zur Core-Region

Die Core Region hat eine Größe von 449bp. Im Falle des psbB-Zirkels ist die Region nur 344bp groß (s. auch Abb. 41), besitzt aber einen gleichen 5' und 3'-Bereich. Vergleicht man die Sequenz des Core vom psbB-Zirkel mit der Core-Region des Gen-freien Zirkels, zeigt sich, dass hier ein Unterschied von nur 5 Nukleotiden besteht. 4 Nukleotide sind deletiert und ein Nukleotid ist substituiert in dem Core-Bereich des Gen-freien Minizirkels (s. rote Buchstaben in Abb. 28).

Core-psbB	10	20	30	40	50
Core-kein-gen	AGTCTTGTGC	AACTGTTGAG	CTGTCTCTGT	TTGTTGCTGC	TTGCAGCATC
	AGTCTTGTGC	AACTGTTGAG	CTGTCTCTGT	TTGTTGCTGC	TTGC-GAATC
Core-psbB	60	70	80	90	100
Core-kein-gen	ACTAAACAAA	CAGAGATGTA	TGTATACGTA	GTATACATAC	ATATACATGT
	ACTAAACAAA	CAGAGATGTA	TGTATACGTA	GTATACATAC	ATATACATGT
Core-psbB	110	120	130	140	150
Core-kein-gen	TTAAGTCTTA	AGACTTAAAC	ATGTATAACA	TCGTTACTTC	TTTAAGAAGT
	TTAAGTCTTA	AGACTTAAAC	ATGTATAACA	TCGTTACTTC	TTTAAGAAGT
Core-psbB	160	170	180	190	200
Core-kein-gen	AACGATGTAG	TCTGTGTTTG	TTATACAAAC	ACAGACATAT	GTATACTACG
	AACGATGTAG	TCTGTGTTTG	TTATACAAAC	ACAGACATAT	GTATACTACG
Core-psbB	210	220	230	240	250
Core-kein-gen	TATACATATA	TACAGGTCTT	AAGACCTGTA	TGTCTCTGTT	TGTTATACAA
	TATACATATA	TACAGGTCTT	AAGAC-TGTA	TGTCTCTGTT	TGTTATACAA
Core-psbB	260	270	280	290	300
Core-kein-gen	ACAGAGACAG	TAGTCTGTGT	TTGTTATACA	AACACAGACA	TATGTATACT
	ACAGAGACAG	TAGTCTGTGT	TTGTTATACA	AACACAGACA	TATGTATACT
Core-psbB	310	320	330	340	350
Core-kein-gen	ACGTATACAT	ATATACAGGT	CTTAGTGATG	CTGCAAGCAG	GAGACCTGT
	ACGTATACAT	ATATACAGGT	CTTAGTGATG	CTGCAAGCAG	-CAGACCTGT
Core-psbB	360	370	380	390	400
Core-kein-gen	ATATACCAAT	TGCACAAGAC	TTCATGTCTT	GATGCTAGTA	GCGGAGCTAA
	ATATACCAAT	TGCACAAGAC	TTCATGTCTT	GATGCTAGTA	GCG-AGCTAA
Core-psbB	410	420	430	440	
Core-kein-gen	AGTCCTGTT	TAAGGTACTA	ATAACAATAG	CTCAATAGTT	GCACAAGAC
	AGTCCTGTT	TAAGGTACTA	ATAACAATAG	CTCAATAGTT	GCACAAGAC

Abb. 28: Alignment zwischen den Sequenzen der Core-Regionen des psbB und des Gen-freien Zirkels von *Ceratium horridum*. In roten Buchstaben sind die Unterschiede der Sequenzen zu erkennen.

Mit Hilfe eines Programms zur Sekundärstrukturberechnung (RNAdraw) wurden die Strukturen der Core-Regionen für bestimmte Temperaturen berechnet.

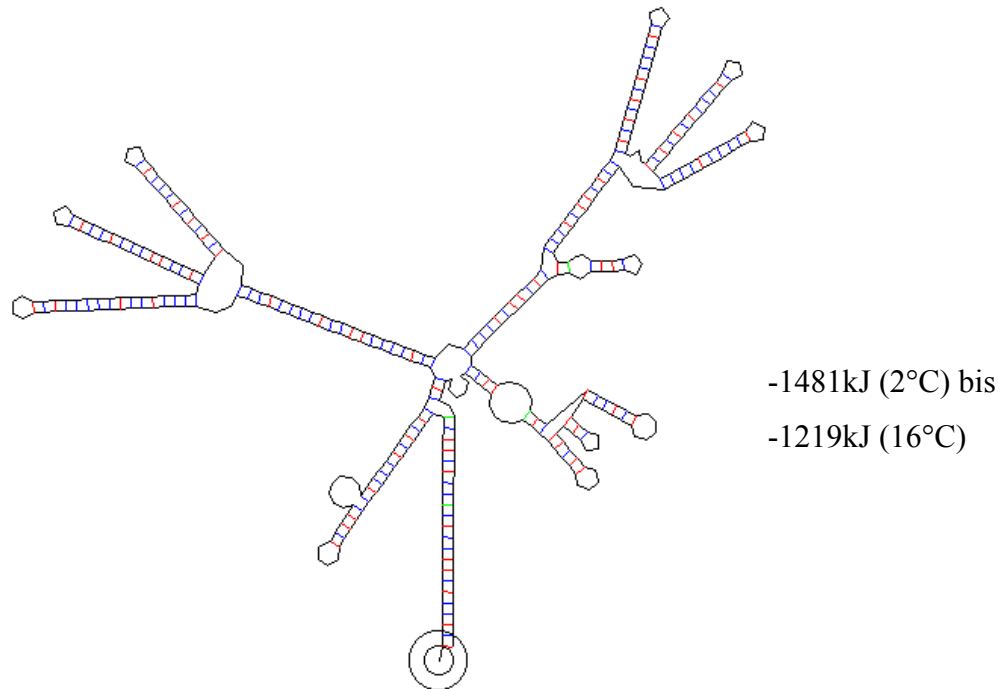


Abb. 29a: Sekundärstruktur der 449bp Core-Sequenz aus dem psbB-Zirkel von *Ceratium horridum*. Berechnet wurden die Strukturen, die sich ergeben in einem Bereich von 2°C bis 16°C. Das 5'-Ende der Sequenz wird durch einen Kreis gekennzeichnet. GC-Basenpaarungen sind in roten Linien, AT-Basenpaarungen in blauen Linien und GT in grünen Linien dargestellt.

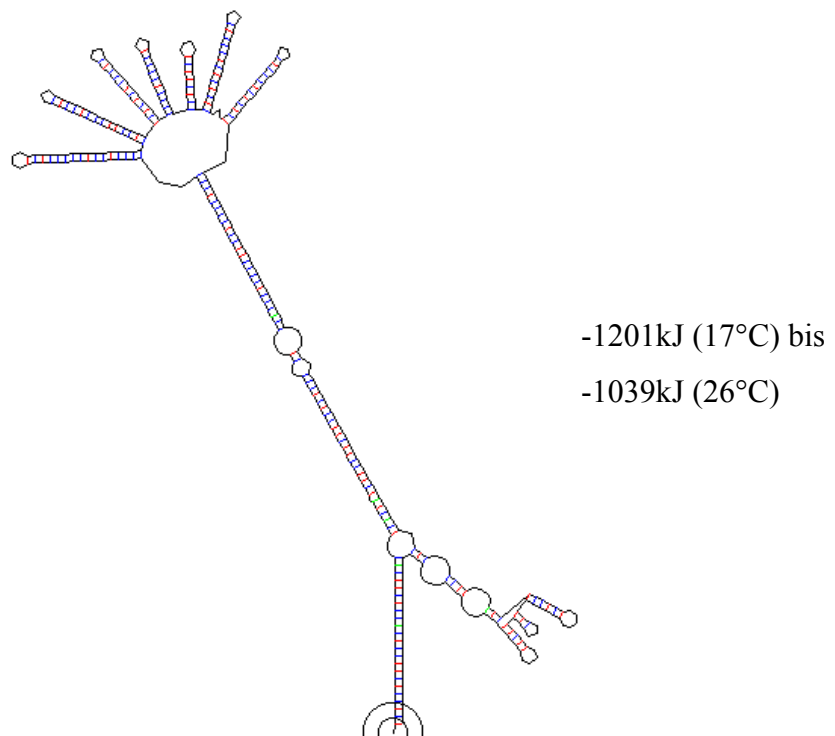


Abb. 29b: Sekundärstruktur der 449bp Core-Sequenz aus dem psbB-Zirkel von *Ceratium horridum*. Berechnet wurden die Strukturen, die sich ergeben in einem Bereich von 17°C bis 26°C. Das 5'-Ende der Sequenz wird durch einen Kreis gekennzeichnet. GC-Basenpaarungen sind in roten Linien, AT-Basenpaarungen in blauen Linien und GT in grünen Linien dargestellt.

Erkennbar wird, dass sich die Sekundärstruktur der Core-Sequenz in einem Temperaturintervall von 2-16°C nicht ändert. Bei einer Temperatur von 17°C wechselt diese plötzlich in eine andere Struktur um und bleibt so bis mindestens 26°C erhalten.

Werden diese Strukturberechnungen an der Sequenz des Core-Bereiches vom Gen-freien Zirkel von *Ceratium horridum* durchgeführt, ergibt sich ein anderes Bild (s. Abb 30).

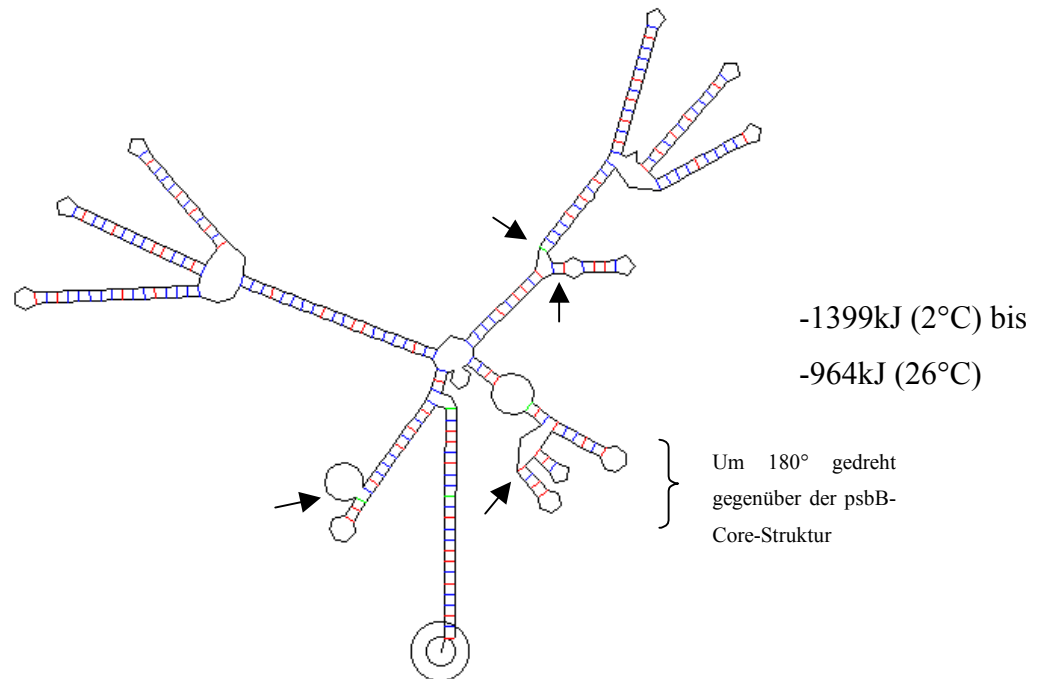


Abb. 30: Sekundärstruktur des 445bp großen Core Bereiches aus dem Gen-freien Zirkel von *Ceratium horridum*. Vier Nukleotide sind gegenüber der Core-Sequenz aus dem psbB-Zirkel deletiert; eines ist substituiert. Die Berechnung der Sekundärstruktur ist von 2°C bis 26°C dargestellt. Das 5'-Ende der Sequenz wird durch einen Kreis gekennzeichnet. GC-Basenpaarungen sind in roten Linien, AT-Basenpaarungen in blauen Linien und GT in grünen Linien dargestellt. Pfeile und Klammer zeigen die Unterschiede zur Core-Sekundärstruktur des psbB-Zirkels bei Temperaturen bis 16°C.

Auf den ersten Blick sehen die Sekundärstrukturen der Core-Regionen bis 16°C identisch aus. Sie sind sich aber in der Struktur nur ähnlich. Z. B. unterscheidet sich der rechte Stamm der beiden Strukturen (s. Abb. 29a und 30). Er ist spiegelbildlich gedreht und besitzt eine zusätzliche Basenpaarung in einer Haarnadelstruktur. Auch die anderen Ästen weisen Unterschiede in den Basenpaarungen auf.

Entgegen des Cores aus dem psbB-Zirkel, springt die Struktur des Cores aus dem Gen-freien Zirkel bei Temperaturen ab 17°C nicht um.

Die Sekundärstrukturberechnungen der anderen vollständigen Core-Bereiche von genträgenden *Ceratium*-Minizirkeln wechseln ebenfalls bei 17°C ihre Struktur, wie es beim Core-Bereich des psbB-Zirkel der Fall ist.

3.8. Zellfraktionierung von *Ceratium horridum*

Die Zellfraktionierung von Dinoflagellaten wurde parallel zu den Plasmidaufreinigungen etabliert. Es sollte versucht werden, durch Chloroplastenaufreinigung die Minizirkel von der Gesamt-DNA zu trennen. So könnten die Minizirkel auch eindeutig in den Plastiden lokalisiert werden. Es existierte keine Methode für die Isolation intakter Plastiden aus einem Peridinin-haltigen Dinoflagellaten.

Hier konnte die Methode über Percollgradienten, die schon für die siphonalen Grünalgen erfolgreich verwendet wurde (Laatsch, 1997), im Grundprinzip angewendet werden.

Die meisten Dinoflagellaten besitzen einen oder zwei große Chloroplasten. Diese liegen lobenförmig in der Peripherie der Zelle (Dodge, 1973). Die Voraussetzung für die Anwendung eines Percollgradienten ist, dass die Plastiden bei einem mechanischen Aufschluß der Zelle intakt bleiben. Das Aufbrechen der Zellwände, die aus Zelluloseplatten und anderen organischen Kompartimenten bestehen, führt auch zur Zerstörung der labilen Plastiden.

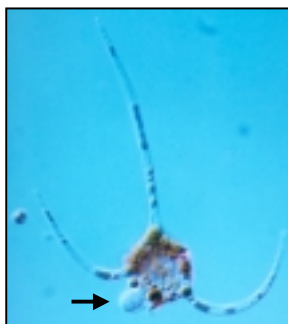


Abb. 31a:
Lichtmikroskopische Aufnahme eines Quetschpräparates von *Ceratium horridum* in isotonischem Milieu. Die Zelle bricht auf und entlässt einen intakten Zellkern (Pfeil) und intakte Plastiden.



Abb. 31b:
Lichtmikroskopische Aufnahme von einem *Ceratium horridum* Zellkern und einer intakten Plastide in isotonischem Milieu.

Die wahrscheinlich einzigen Ausnahmen, was die Anzahl der Plastiden betrifft, sind die *Ceratien*-Arten, die viele kleine Plastiden besitzen.

Als isotonisches Isolationmedium für die Plastiden hat sich gezeigt, dass 0,4M Mannit; 1mM $MgCl_2$; 10mM Na_2EDTA ; 0,25% PVP; 50mM Tris/HCl pH 7,5 in 1l H_2O [modifiziert nach Jensen und Bassham (1966); Kolodner und Tewari, (1975)] die Plastiden nicht zerplatzen lässt. Der Kern scheint in diesem Medium ebenfalls intakt zu bleiben (s. Abb. 31a und b).

Nach mechanischem Aufbrechen, Filtern des Homogenats, differentiellen Zentrifugationen und Auftrennung über den Percollgradienten befanden sich die optisch intakten Chloroplasten im Sediment des Gradienten wieder (Abb. 32) und standen für weitere Schritte zu Verfügung.

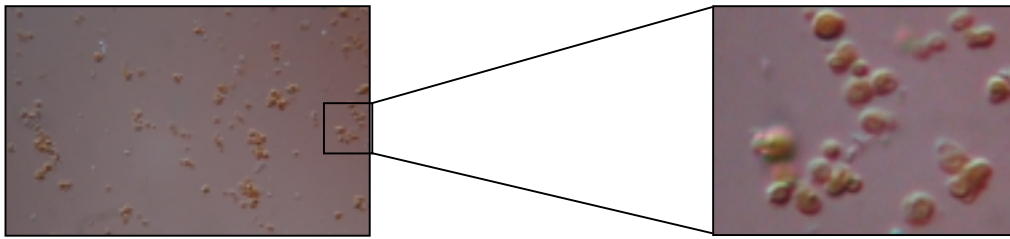


Abb. 32: Lichtmikroskopische Aufnahme von präparierten Chloroplasten von *Ceratium horridum*. Die Aufnahme zeigt, dass die isolierten Plastiden lichtmikroskopisch intakt sind. Hier in Isolationsmedium nach Aufreinigung über Percollgradient.

Aus den aufgereinigten Chloroplasten sollten die Minizirkel in sauberer Form präpariert werden. Nach der Lyse der Plastiden und dem Auftragen der daraus gewonnenen DNA ergab sich folgendes Bild (s. Abb 33).

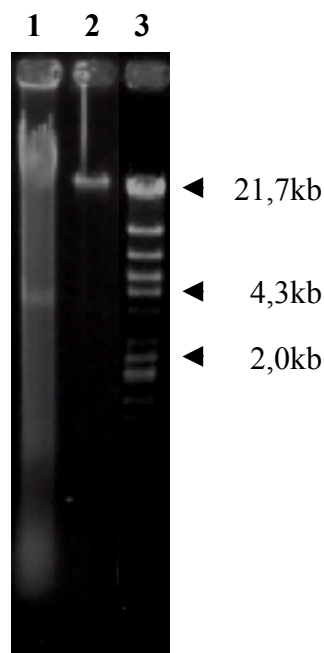


Abb. 33: Fraktionen aus dem Percollgradienten wurden lysiert und die DNA wurde präpariert. Spur 1 entspricht dem Überstand aus dem Percollgradienten. Spur 2 entspricht dem Sediment (Plastiden). In Spur 3 ist der Längenstandard aufgetragen. Die Minizirkel von *C. horridum* sind nicht in der Plastidenfraktion enthalten, sondern im Überstand (Spur 1). In der Plastidenfraktion ist aber eine hochmolekulare Bande zu erkennen.

Die DNA-Präparation von intakten Chloroplasten enthielt keine detektierbare Menge an Minizirkeln. Die Chloroplastenfraktion enthielt eine hochmolekulare DNA.

Die Fraktion, die den Überstand im Percoll darstellte und lichtmikroskopisch keine Chloroplasten enthielt, wies nach der Lyse und DNA-Präparation die Minizirkel auf. Die Bande, die bei etwa 4kb migriert, ist der Hauptbande aus Minizirkelpräparationen (Vergleiche hier zu Abbildung 17a) zuzuordnen.

3.9. Lokalisation der Minizirkel und Bestätigung der hochmolekularen Plastiden-DNA

Eine erneute Zellfraktionierung, die in allen Schritten in Abbildung 34 dokumentiert ist, wurde durchgeführt. Die Minizirkel sollten eindeutig zugeordnet werden können. Zusätzlich wurde versucht, das Vorhandensein einer hochmolekularen DNA in den Chloroplasten (s. Abb. 33) durch DNase-Versuche zu bestätigen. Dazu wurden die Plastiden isoliert und die DNA aus allen Zwischenschritten isoliert und dokumentiert.

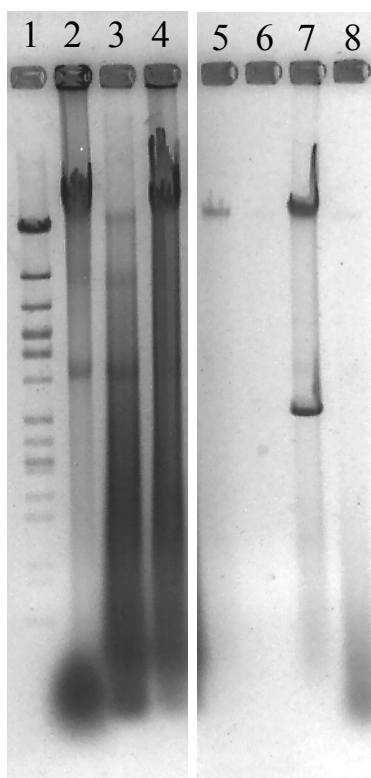


Abb. 34: DNA-Profile der Zellfraktionierung von *Ceratium horridum*. Spur 1: λ-Standard; Spur 2: Gesamt-DNA mit den darin erkennbaren Minizirkeln (sichtbar bei etwa 4kb); Spur 3: Überstand aus der ersten differentiellen Zentrifugation; Spur 4: Zentrifugationsüberstand aus dem Percollgradienten; Spur 5: CTAB-lysierte intakte Plastiden aus dem Percollsediment; Spur 6: identisch zu Spur 5 mit anschließender DNaseI-Behandlung; Spur 7: intakte Plastiden aus dem Percollsediment mit zugesetzten linearisierten pUC18 als Kontrolle und anschließender CTAB-Lyse; Spur 8: identisch zu Spur 7 mit DNaseI-Behandlung vor der CTAB-Lyse.

Die hochmolekulare DNA (Pfeilspitze), wie in Spur 5, war DNase geschützt. Die pUC18-DNA war nicht geschützt und ist durch die DNase-Behandlung vollständig verschwunden.

Es bestätigte sich das Vorexperiment. Die Minizirkel waren in der Plastidenfraktion (Spur 5) nicht nachweisbar. Zu sehen sind die Minizirkel vor allem in Spur 2, 3 und 4. Dies sind neben der aufgetragenen Gesamt-DNA (Spur 2) der Überstand aus der differentiellen Zentrifugation und der Überstand aus dem Percollgradienten.

Die hochmolekulare DNA aus den Chloroplasten wurde in den isolierten und intakten Chloroplasten bestätigt (Spur 5). In Spur 6 wird gezeigt, dass die hochmolekulare DNA auch DNaseI-sensitiv ist. Eine DNaseI-Behandlung von intakten Plastiden zeigte, dass sich diese DNA in den Chloroplasten befindet (Spur 8).

3.10. Lokalisation der Minizirkel durch *in situ* Hybridisierung

Ein weiterer Beweis dafür, dass die Minizirkel nicht in den Chloroplasten lokalisiert sind, wurde mit Hilfe einer Immunogold *in situ* Hybridisierung gezeigt. Ein 1244bp großes Fragment aus der kodierenden Sequenz des psbB-Zirkels von *Ceratium horridum* wurde markiert und gegen trypsinbehandelte Schnitte von *Ceratium horridum* hybridisiert. Die *in situ* Hybridisierungen wurden von Fr. M. Johannsen aus der Arbeitsgruppe Maier in Marburg durchgeführt.

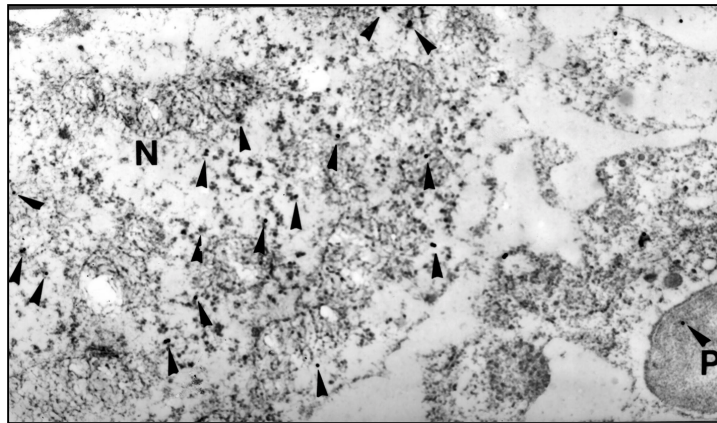


Abb. 35: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Immunogold *in situ* Hybridisierung Proteinase-behandelter Schnitte von *Ceratium horridum*. Als Sonde dient eine biotinmodifizierte psbB-DNA-Sonde. Die Markierungen durch Goldkugeln (Pfeilköpfe) befinden sich überwiegend im Kern (N) und kaum in der Plastide (P). Vergrößerung 11130fach

In Abbildung 35 ist zu erkennen, dass die psbB-Probe sehr stark mit der Kern-DNA hybridisiert und weniger Markierungen in den Plastiden zu sehen sind.

In situ Versuche bei *Pyrocystis lunula* ergaben ebenfalls, dass die Sonde hauptsächlich die nukleäre DNA markiert und weniger die des Chloroplasten (nicht gezeigt).

Mit den Ergebnissen aus den Experimenten der Zellfraktionierung und der *in situ* Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass

- a) die Plasmide nicht in den Chloroplasten sind,
- b) es eine hochmolekulare DNA in den Chloroplasten gibt.

3.11. Die „wahre“ Plastiden-DNA Peridinin-haltiger Dinoflagellaten

Die Versuche der Chloroplastenisolation zeigen, dass es eine hochmolekular laufende Plastiden-DNA gibt. Ergänzt werden diese durch Untersuchungen und Abbildungen aus frühen Publikationen über die Plastiden-DNA von *Prorocentrum micans* (Kowallik, 1971; Kowallik und Haberkorn, 1971). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass sich im Stroma von *Prorocentrum micans*-Plastiden eine hochmolekulare DNA befindet (s. Abb. 36).



Abb. 36: Chloroplasten DNA von *Prorocentrum micans*.
Die DNA wurde nach tryptischer Behandlung des Stromas sichtbar gemacht. Bar 0.5 μm . (Foto aus Kowallik 1971)

Abbildung 36 zeigt, dass die Plastiden DNA chromosomenartig geknäuelte im Stroma vorliegt

Es wird sogar sichtbar, dass die DNA eine Art Torsion aufweist.

3.11.1. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit Bisbenzimid

Mit Hilfe von DNA-markierenden Stoffen wurde versucht, DNA in den Chloroplasten nachzuweisen. Wenn die DNA-Menge so groß ist wie sie sich schon in Abbildung 36 darstellt, müsste dies in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen sein.

Zellen von *Pyrocystis lunula* wurden mit Bisbenzimid behandelt. Diese Zellen haben den Vorteil, dass sich die Chloroplasten sehr weit vom Kern bis in die Spitzen der Zyste

entfalten. In anderen Dinoflagellaten zeigte sich, dass die Fluoreszenz, die durch die Färbung der Kern-DNA zustande kommt, mögliche Signale der Organell-DNA überstrahlt. Es wurden zusätzliche Aufnahmen gemacht, um fluoreszierende Quellen festzulegen, die nicht von der Bisbenzimidfärbung her rühren. Neben der Autofluoreszenz des Chlorophylls treten bei Peridinin-haltigen Dinoflagellaten die Biolumineszenz (Swift und Taylor, 1967) und die Fluoreszenz der „fluorescence bodies“ auf (Klut *et al.*, 1988).

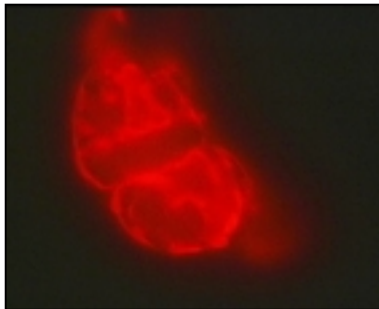


Abb. 37a: Kontrolle ohne Bisbenzimid. Autofluoreszenz von *Pyrocystis lunula*-Chloroplasten durch Anregung mit UV-Licht. Erkennbar ist die lobenförmige Verteilung des Chloroplasten in der Zelle.

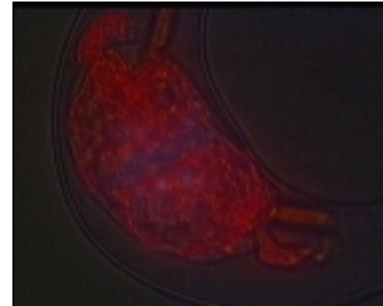


Abb. 37b: Kontrolle ohne Bisbenzimid. Autofluoreszenz von *Pyrocystis lunula*-Chloroplasten durch Anregung mit UV-Licht mit Übergang zum Phasenkontrast. Im Zentrum der Zelle werden kleine weißblau fluoreszierende Kügelchen sichtbar. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um die „fluorescence bodies“.

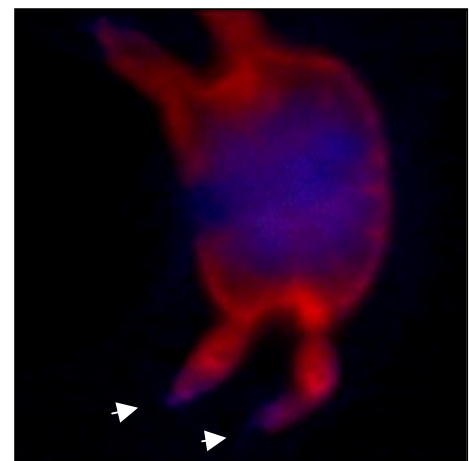
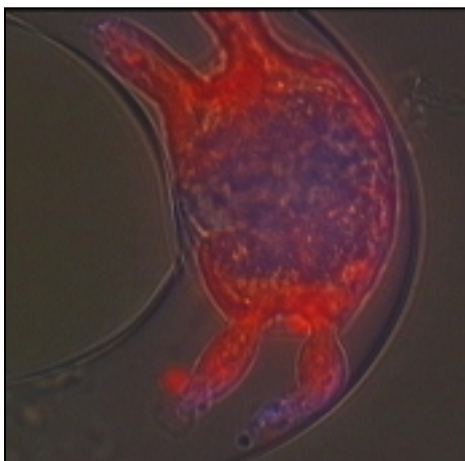


Abb. 38: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Pyrocystis lunula* mit Bisbenzimid. Links; Phasenkontrastaufnahme mit UV-Bestrahlung einer Zelle von *Pyrocystis lunula* nach 2 minütiger Inkubation mit Bisbenzimid. Rechts: identische Zelle, nur mit UV bestrahlt. Zu sehen sind die Autofluoreszenz der Chloroplasten (rot) und die durch das Bisbenzimid angefärbten DNAs (blauviolett). In den Enden der Chloroplasten sind eindeutige Bereiche zu erkennen, die auf DNA hinweisen (Pfeilspitzen).

Auch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen die mögliche Existenz einer plastidären DNA. In Abbildung 38 ist neben der Kern-Fluoreszenz auch eine Färbung in den äußersten Bereichen des Chloroplasten zu erkennen. In der Kontrolle (Abb. 37b) wird bestätigt, dass dies kein Phänomen der Autofluoreszenz ist.

Bei diesen Aufnahmen ist zu berücksichtigen, dass sich die verzweigten Chloroplasten von *Pyrocystis lunula* bei Dunkelheit zum Kern hin zurückziehen (Kyung, 2000). Diese natürliche Erscheinung wird auch hier durch die versuchsbedingte Abdunkelung hervorgerufen.

3.12. Gewinnung molekularbiologischer Daten der „wahren“ Plastiden-DNA

Versuche, Informationen über die Sequenz der „wahren“ Plastiden-DNA zu bekommen, stellten sich als sehr schwierig dar.

Schon aus den Experimenten mit homologen und heterologen Sonden (s. Kapitel 3.3.) wurde ersichtlich, dass hier keine Hybridisierungen mit den radioaktiv markierten Plastidengenensequenzen im Bereich der hochmolekularen DNA zu detektieren waren.

Eine Schrotschussklonierung der aufgereinigten Plastiden-DNA sollte die ersten Sequenzinformationen geben. Es wurde eine Plastidenisolation durchgeführt, um hochmolekulare Plastiden-DNA für weitere molekularbiologische Methoden zu erhalten.

Es stellte sich heraus, dass sich die DNA nicht restringieren ließ. Auch nicht-methylierungssensitive Enzyme, wie *DraI* konnten die DNA nicht schneiden (s. Abb. 39).

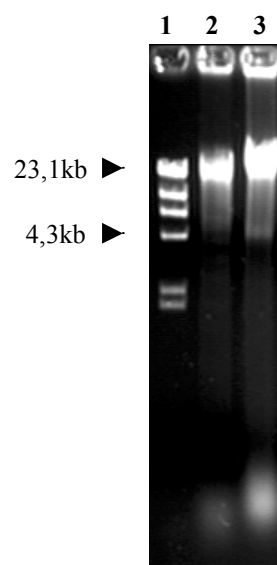


Abb. 39: Restriktionsansatz der hochmolekularen Plastiden-DNA von *Ceratium horridum*. Spur 1: Lambda-Standard mit HindIII geschnitten. Spur 2: Plastiden-DNA im unrestringierten Zustand. Spur 3: Plastiden DNA mit *DraI* geschnitten.

Zur Kontrolle wurden wiederholt DNase-Experimente gemacht, die wie schon in Abbildung 34 dargestellt, zeigen, dass die DNA DNase I-sensitive ist.

Mit der zufälligen Amplifizierung von DNA-Bereichen, der hochmolekularen Plastiden-DNA, mit Hilfe der RAPD-PCR (Random amplified polymorphic DNA) wurden nur wenige Sequenzen erhalten (etwa 4000bp, s. Anhang).

Für diese Sequenzen wurden in Gendatenbanken keine homologen Nukleinsäure-/Aminosäuresequenzen gefunden.

Die einzige Aussage, die mit diesen Sequenzen getroffen werden konnte war, dass es sich bei der hochmolekularen Plastiden-DNA nicht um kontaminierte Bakterien-DNA handelt.

4. Diskussion

Mit der Kodierung von Plastidengenen auf Minizirkeln, wie sie hier nachgewiesen werden konnte, nehmen die Peridinin-haltigen Dinoflagellaten in der Plastomorganisation eine Sonderstellung ein.

Vergleichende Analysen von Chloroplastengenomen zeigen, dass insbesondere die Chloroplastengenome von Algen in ihrer Struktur aufschlussreich sind (Palmer, 2000). Die Strukturen sind geprägt durch Deletionen und Umorganisationen von Genen, die herangezogen werden können für die Aussage evolutionärer Ereignisse (Palmer, 1982, 1990, 1991; Kowallik, 1989, 1994, 2000; Boudreau, 1995). Auch die Anordnung von plastidären Leserahmen in Genklustern kann als wertvoller Marker zur Aufklärung phylogenetischer Zusammenhänge beitragen (Kowallik, 1993, 1994; Stöbe und Kowallik, 1999).

Die Peridinin-haltigen Dinoflagellaten scheinen alle diese phylogenetischen Werkzeuge unbrauchbar zu machen.

Die Lokalisation der Minizirkel außerhalb der Plastiden unterstreicht die Sonderstellung der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten in der Gruppe der photosynthetischen Organismen.

Im Folgenden soll erörtert werden:

- I) der Vergleich zwischen Plastidengenen/Plastomorganisation der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten und Chloroplastengenomen anderer Organismen
- II) der Vergleich der Minizirkel bei verschiedenen Peridinin-haltigen Dinoflagellaten und eine nähere Betrachtung der ribosomalen RNAs
- III) die Lokalisation der Minizirkel im Kern
- IV) der evolutionäre Kontext der Minizirkel
- V) die Existenz einer wahren Chloroplasten-DNA

4.1. Vergleich der Minizirkel mit rezenten Plastidengenomen

Anstelle eines „gewöhnlichen“ Plastidengenoms mit einer durchschnittlichen Größe von 120-200kb (Ohyama *et al.*, 1986b; Shinozaki *et al.*, 1986; Hiratsuka *et al.*, 1989; Hallick *et al.*, 1993; Wakasugi *et al.*, 1994, 1997; 1998; Kowallik *et al.* 1995; Maier *et al.*, 1995; Reith und Munholland, 1995; Stirewalt *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1999; Turmel *et al.*, 1999; Glöckner *et al.*, 2000; Lemieux *et al.*, 2000) haben die Dinoflagellaten ein System von kleinen genetischen Elementen entwickelt.

Die Minizirkel als Plastidengen-kodierende Einheit sind ein unbekanntes System in der Chloroplastengenomorganisation. Auf diesen zirka 1,5-6kb großen Plasmiden sind die plastidären Gene in der Regel einzeln kodiert.

In den Peridinin-haltigen Dinoflagellaten sind auch die konservierten Genkluster, wie sie vom cyanobakteriellen Chromosom bis hin zum Plastom der Plastiden aus der sekundären Endocytobiose Bestand haben, nicht anzutreffen (Stöbe und Kowallik, 1999).

Bislang galten die Plastidengenome der Sporozoen (*Toxoplasma gondii* und *Plasmodium falciparum*) als die kleinsten Plastome (Wilson *et al.*, 1996), aber selbst in diesen Plastidengenomen blieben Genkluster der ribosomalen Gene erhalten, wodurch die Sporozoenplastiden der Rotalgenlinie zugeordnet werden konnten (Stöbe und Kowallik, 1999).

Das heutige Verständnis über Chloroplastengenome resultiert aus mehr oder weniger großen Abweichungen von den allgemein bekannten Genomen mit einer durchschnittlichen Größe von 120kb und deren konservierter Struktur (Douglas, 1994).

Die ungewöhnliche Gestaltung des Plastidengenoms in Minizirkeln der Dinoflagellaten wird in einem direkten Vergleich mit bekannten Chloroplastengenomen deutlich (Abb. 40).

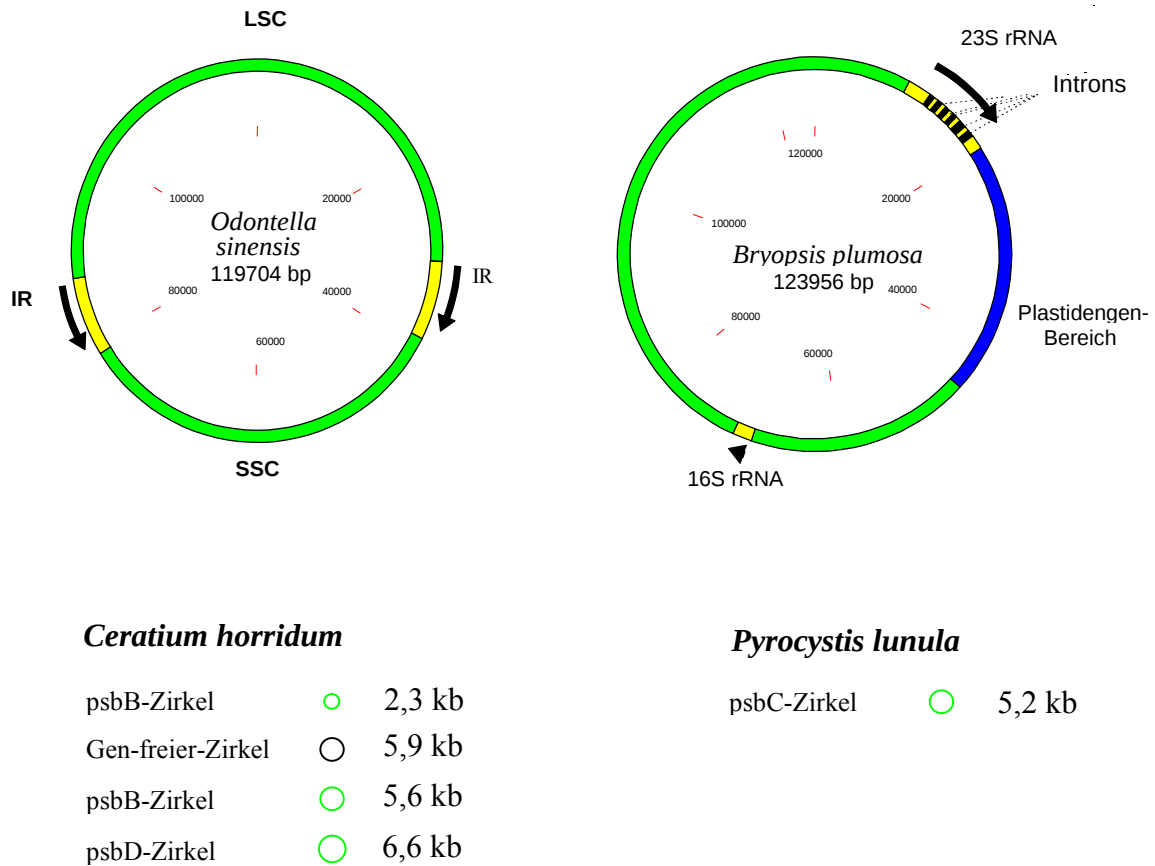


Abb. 40: Darstellung und Größenvergleich zwischen den Chloroplastengenomen von *Odontella sinensis* (Kowallik *et al.*, 1995), *Bryopsis plumosa* und den Minizirkeln der Dinoflagellaten *Ceratium horridum* und *Pyrocystis lunula*. Grün: kodierender Bereich für Plastidengene, gelb: ribosomale RNAs, blau: nicht-Chloroplasten-DNA und schwarz: Introns. Details zu den Minizirkeln sind im Ergebnisteil dargestellt.

Bei der Betrachtung von Abbildung 40 wird sofort ersichtlich, dass bei den Peridinin-haltigen Dinoflagellaten das Plastom während der Evolution anders verwirklicht wurde.

Mit *Odontella sinensis*, einer Kieselalge, ist ein Plastom dargestellt, welches repräsentativ für viele der Chloroplastengenome steht. Dieses Plastidengenom besitzt eine große einfach kodierende Region (Large-Single-Copy-Region, LSC) und eine kleine einfach kodierende Region (Small-Single-Copy-Region, SSC). Beide Regionen werden durch eine invertierte Sequenzduplikation (IR) voneinander getrennt (Kowallik *et al.*, 1995).

Mit *Bryopsis plumosa*, einer siphonalen Grünalge, ist ein ungewöhnliches Plastom aufgezeigt, welches stark von der Standardstruktur rezenter Plastidengenome abweicht, durch das Fehlen der invertierten Sequenzduplikation und das Vorhandensein von Introns in den Plastidengenomen (Nitsch, 1995).

Werden im Vergleich hierzu die Minizirkel betrachtet, wird deutlich, dass sie nichts gemeinsam haben mit der Größe oder der Struktur der bekannten Plastidengenome. Die

Kodierungskapazität der Minizirkel ist sehr begrenzt und es stellt sich die Frage, ob das Plastidengenom durch eine große Anzahl an Minizirkeln dargestellt wird oder ob neben den Minizirkeln noch ein „normales“ Plastidengenom existiert.

Ein kompletter Satz an gefundenen Plastidengenen existiert momentan in keinem Dinoflagellaten.

	<i>Ceratium horridum</i>	<i>Pyrocystis lunula</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Thecadinium inclinatum</i>	<i>Heterocapsa triquetra</i>	<i>Amphidinium operculatum</i>
atpA					+	
atpB						+
petB	+ ¹⁾²⁾				+	
petD						+
psaA	+				+	+ ²⁾
psaB	+				+	
psbA	+	+	+	+	+	+
psbB	+ ¹⁾				+	+ ²⁾
psbC	+	+ ¹⁾	+ ¹⁾	+	+	
psbD	+					
psbE	+					
16S	+				+	
23S	+				+	
rpl28		+				
rpl33		+				
ycf16	+					
ycf24	+					
ftsY		+				
dnaB		+				

Tab. 4: Auflistung aller bekannten Plastidengene bei Peridinin-haltigen Dinoflagellaten. Die Daten der plastidären Gene anderer Peridinin-haltiger Dinoflagellaten sind mit *A. operculatum* (Barbrook und Howe, 2000) und *Heterocapsa triquetra* (Zhang et al, 1999) vertreten. Das Suffix, 1), bedeutet, dass die Gene in mehr als einer Kopie vorkommen und das Suffix 2), dass die Gene mit Valin (GTA) beginnen.

In der Tabelle 4 fällt auf, dass hauptsächlich Gene des Photosyntheseapparates, ATP-Synthase-Untereinheiten und die ribosomalen RNAs (16SrRNA und 23SrRNA) vertreten sind.

Wird von einem Gengehalt von 60-210 Plastidengen anderer Plastidengenome ausgegangen (Martin *et al.*, 1998; Stöbe *et al.*, 1999), ist zu erkennen, dass in der Gruppe der Dinoflagellaten noch sehr viele Plastidengene fehlen. Mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Zhang *et al.*, 1999; Barbrook und Howe, 2000) und den hier gewonnenen Ergebnissen sind erst über ein Dutzend Plastidengene bei Peridinin-haltigen Dinoflagellaten bekannt. Es wäre also möglich, dass weitere bislang noch nicht gefundene Plastidengene der Dinoflagellaten nach dem „normalen“ Prinzip der üblichen Plastome angeordnet sind.

Ein Beispiel für eine normale Anordnung könnte das ycf24-Gen und das ycf16-Gen von *Ceratium horridum* sein. Diese Plastidengene mit noch unbekannter Funktion (hypothetical chloroplast frames = ycf), sind bei anderen Dinoflagellaten noch nicht bekannt. Sie liegen bei *Ceratium horridum* in direkter Nachbarschaft vor und werden nur durch 29 Nukleotide voneinander getrennt. Es ist noch nicht geklärt, ob die beiden Gene auf einem Minizirkel liegen oder einen Ausschnitt des wahren Chloroplastengenoms repräsentieren.

Bei dem ycf24/16-Kluster scheint es sich um ein cyanobakterielles Kluster zu handeln, welches speziell in der Rotalgenlinie erhalten geblieben ist. In Plastidengenomen von Rotalgen (Reith und Munholland, 1995, Glöckner *et al.*, 2000) sind ycf24 und ycf16 ebenfalls benachbart und treten auch in abgeleiteten Plastomen von *Guillardia theta* (Douglas und Penny, 1999) und *Odontella sinensis* (Kowallik *et al.*, 1995) in direkter Nachbarschaft auf.

Zusammenliegende Gene müssen aber nicht bedeuten, dass tatsächlich eine normale Chloroplastengenomorganisation vorliegt, wie das folgende Beispiel zeigt.

In dieser Arbeit wurden zusätzlich Gene für die ribosomalen Proteine rpl28 und rpl33 bei *Pyrocystis lunula* gefunden. Damit existieren die ersten Sequenzen für plastidäre Proteine, die an der Translationsmaschinerie beteiligt sind. Diese Gene liegen zusammen mit dem offenen Leserahmen (ORF57) und ftsY, einer GTPase, welche u. a. für die Integration des LHCP (light-harvesting chlorophyll proteins) in die Thylakoidmembran zuständig ist (Tu *et al.*, 1999), auf einem 3kb großen Minizirkel.

Die Dinoflagellaten machen deutlich, dass Aussagen über den Vergleich von Minizirkel-Plastidengenomen mit rezenten Chloroplastengenomen mit äußerster Vorsicht getroffen werden müssen.

Erst die Auswertung und Entschlüsselung der hier zusätzlich gewonnenen Ergebnisse über die Lokalisation der Zirkel außerhalb der Plastiden und das Vorhandensein einer hochmolekularen DNA in den Plastiden könnten die Existenz der Minizirkel erklären und relativieren.

Warum wurden bislang nur wenige Plastidengene von Peridinin-haltigen Dinoflagellaten gefunden?

Ein Nachteil bei der Auffindung von Plastidengenomen in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten ist, dass eine Separation der Plastiden-DNA durch die Unkenntnis über deren Eigenschaften (Konfiguration, GC-Gehalt) erschwert wird. Die Auflösung eines relativ großen Plastidengenoms in viele kleine Zirkel erschwert die Entdeckung neuer Plastidengene zusätzlich.

Trotz Schrotschußklonierung von bereits aufgereinigten Minizirkeln konnten z. B. keine tRNAs, RNA-Polymerase-Untereinheiten oder Proteine für die Chlorophyllbiosynthese gefunden werden. Diese Gene müssten noch auf Minizirkeln entdeckt werden, um sagen zu können, dass das Plastidengenom durch Minizirkel repräsentiert wird.

Außerdem müsste der Nachweis erbracht werden, dass die Plasmid-kodierten Plastidengene wirklich die Transkriptvorlage für die plastidären Proteine sind. In Zhang *et al.* (1999) wird mit einer nicht eindeutigen Northernanalyse gezeigt, dass die Plasmid-kodierten Plastidengene transkribiert werden.

Was gegen eine Transkription spricht, ist die Anzahl der Sequenzanomalien in den Minizirkel-kodierten Plastidengenomen. Die Sequenzanomalien äußern sich in Pseudogenen, Leserahmensprüngen und internen Stoppkodons.

Deuten die Anomalien der plastidären Minizirkelgene bei Peridinin-haltigen Dinoflagellaten auf eine Kernlokalisation hin?

Wie in Zhang *et al.* (1999) beschrieben, zeigen die in Minizirkeln gefundenen Gene, dass sie ihren Ursprung in der Rotalgenlinie haben. Mit der Kenntnis, dass die Minizirkelgene nicht in der Plastide lokalisiert sind, werden die Aussagen über die phylogenetische Abstammung der auf den Minizirkeln kodierten Plastidengene unzuverlässig. Dies wird auch in den von Barbrook und Howe (2000) berechneten phylogenetischen Stammbäumen für *psaA* und *psaB* deutlich. Sie deuten durch sehr lange Äste auf eine hohe Substitutionsrate in den Gensequenzen hin. Die Bäume sind dadurch nicht mehr zuverlässig (Felsenstein, 1978).

Eine hohe Substitutionsrate ist eher das Kennzeichen von kernlokalisierten Genen als das von plastidenlokalisierten Genen (Wolfe *et al.*, 1987).

Weitere ungewöhnliche Eigenschaften, wie z. B. die in dieser Arbeit entdeckten Mehrfachkopien von Genen und die Insertionen in den Genen, zeigen, dass ein Vergleich mit Plastidengenen anderer Organismen mit Vorsicht zu betrachten ist.

Schon in den anfänglichen Untersuchungen mit homologen Gensonden und Hybridisierung gegen Gesamt-DNA von Peridinin-haltigen Dinoflagellaten hat sich gezeigt, dass *psbC* von *Pyrocystis lunula* und *Prorocentrum micans* anscheinend in je zwei Gen-Kopien vorliegt. Die Hybridisierungsergebnisse (3.3. Abb. 6b und Abb. 8) sprechen dafür, dass beide Kopien auf Zirkeln liegen.

Während eine der beiden Kopien den Zustand des „normalen“ *psbC*-Gens widerspiegelt, hat die andere Kopie eine Insertion. Im *psbC* von *Pyrocystis lunula* ist die Insertion 15 Nukleotide groß und in *Prorocentrum micans* 26 Nukleotide. Diese Insertionen liegen nicht an gleichen Stellen im *psbC*-Gen und haben auch keine Sequenzähnlichkeiten.

Während das *psbC*-Gen von *P. lunula* trotz dieser Insertion im Leserahmen bleibt, führt die Insertion im *psbC* bei *P. micans* zu einem Leserahmensprung.

Das *psbB*-Gen von *Ceratium horridum* ist ebenfalls auf zwei Zirkeln von je 2,3kb und 5,8kb vorhanden. Der Größenunterschied der beiden *psbB*-Minizirkel entsteht durch die nicht kodierende Minizirkelsequenz. Beide Gensequenzen sind identisch. Das Initiationskodon beider *psbB*-Gene ist wahrscheinlich GTA (Valin). 260 Aminosäuren

vom N-Terminus entfernt haben beide psbB-Gene eine identische 23 Nukleotid große Insertion, die zu einem Leserahmensprung führt.

Vielleicht handelt es sich bei den Insertionen um Introns, die dann aber nicht den üblichen Plastidengenintrons entsprechen würden (Xu *et al.*, 1990; Kuhsel *et al.*, 1990; Turmel *et al.*, 1993; Nitsch, 1995). Auch die 5'-3'-konservierte GT-AG-Sequenz der Gruppe-II-Introns und die interne TACTAAC-Region für die spleißosomalen Introns des Kerns (Parker, 1987) sind in der Sequenz der Insertionen nicht vorhanden.

Von den Größen und den nicht konservierten Sequenzen der Insertionen her haben sie am ehesten Ähnlichkeit mit Introns in tRNAs, wie sie z. B. bei *Arabidopsis thaliana* (Akama, 1996, 1997) vorkommen.

Diese Intron-Variante würde im Falle der Minizirkelgene voraussetzen, dass sich diese im Kern befinden.

Unabhängig von der Plasmidlokalisation, der Anzahl an Kopien oder dem Vorhandensein von Insertionen unterscheiden sich die psbC-Gene der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten durch die Aufhebung des konservierten psbD/C-Genklusters von psbC-Genen anderen Organismen (Kowallik, 1993).

Die Aufhebung der Koregulation des psbD/C-Klusters, eines Operons mit prokaryotischen Eigenschaften, und die dadurch aufgehobene koordinierte Expression der beiden Proteine könnte ein weiteres Indiz für die Lokalisation der Plasmide außerhalb des Chloroplasten sein.

Das psbD-Gen, scheint im Vergleich mit anderen psbD-Sequenzen in Größe und Sequenz normal zu sein. Trotz der fehlenden Überlappung mit dem psbC-Gen am C-Terminus unterscheidet sich das C-terminale Ende von PsbD nicht von PsbD-Sequenzen anderer Organismen.

Bei der Sequenzierung von Klonen aus der Schrotschußklonierung von *Ceratium horridum* wurden auch zwei Gene für das PetB gefunden. Hier liegt der Unterschied in der N-terminalen Sequenz der Gene. Es existiert ein PetB mit „normlen“ N-Terminus und ein PetB, welches N-terminal um 17 Aminosäuren verkürzt ist (3.7. Abb. 25). Durch eine

Transition des Isoleucin-Kodons ATA nach GTA beginnt vermutlich das verkürzte PetB mit Valin, ebenso wie das psbB bei *Ceratium horridum*.

Aus dem multiplen Alignment des PetB (3.7. Abb. 25) ist ersichtlich, dass das Protein eine für Dinoflagellaten typische Region (Aminosäureposition 46 bis 61) aufweist. Sie unterscheidet sich an dieser Stelle von einem konservierten Aminosäureblock, der bei roten und grünen photosynthetischen Vertretern erhalten geblieben ist.

Signalisieren die intergenischen Stoppkodons eine Degradation oder existiert ein alternativer genetischer Kode?

In dem Leserahmen für das psbC-Gen von *Ceratium horridum* sind am C-terminalen Ende zwei interne Stoppkodons (TGA) enthalten (3.7. Abb. 23). Auch ycf16 scheint direkt am N-Terminus ein Stoppkodon zu besitzen (3.7. Abb 26a und 26c).

Es wurde nicht untersucht, ob diese Gene transkribiert werden, denn es wäre denkbar, dass diese Stoppkodons in der Sequenz eine Indikation für die Degradation der Gene sind. In *Rickettsia*-Arten tritt ein ähnliches Phänomen auf, welches als Vorstufe zur Pseudogenentwicklung gedeutet wird (Andersson und Andersson, 1997). Das Gen für die S-Adenosylmethionin-Synthetase, das metK, ist in der Typhus-Gruppe von *Rickettsia*-Arten intakt (Andersson und Andersson, 1997, 1999). In der Gruppe der *Rickettsia*-Arten, die Auslöser des Fleckenfiebers sind, besitzt das metK interne Stoppkodons und ist nicht mehr funktionell und wird als Vorstufe der Pseudogenentwicklung von metK in vielen Linien von *Rickettsia* gesehen.

Was gegen die Degradation des psbC-Gens von *Ceratium horridum* spricht, ist die ansonsten sehr konservierte Sequenz.

Vielleicht gibt es, wie im Falle einiger Vertreter der Ciliaten, Abweichungen vom klassischen genetischen nukleären Kode. So werden z. B. im Genom von *Tetrahymena* und *Paramecium* die Stoppkodons UAA und UAG als Glutamin (Baroin-Tourancheau *et al.*, 1995) und im *Euplotes*-Genom das Stoppkodon UGA als Cystein gelesen (Kervestin *et al.*, 2001; Lazupone *et al.*, 2001).

In den Mitochondrien der Grünalge *Scenedesmus opliquus* wird das Kodon UAG als Leucin und das Kodon UCA als Stoppkodon gelesen (Kück *et al.*, 2000).

Die Dinoflagellaten gehören, wie die Ciliaten, zur Gruppe der Alveolaten (Cavalier-Smith, 1993a). Es wäre denkbar - mit dem Wissen, dass die Minizirkel im Kern liegen -, dass auch Dinoflagellaten einen alternativen genetischen Kode benutzen, entgegen dem in Algen und den höheren Pflanzen benutzten Aminosäurekode (Campbell und Gowri, 1990).

Auch durch phytopathogene RNA-Viren (Tabak Mosaik, Tabak Rassel und Kartoffel-Blattvöll Virus) wird ein Weg aufgezeigt, der es ermöglicht, die Stoppkodons in Sinnkodons umzuwandeln. Diese Viren benutzen Suppressor-tRNAs in der Wirtszelle, um bestimmte Proteine auf unkonventionellem Wege zu exprimieren (Grimm *et al.*, 1998).

Die Suppressor tRNAs sind in der Lage, auf der 3'-Seite der Stoppkodons unorthodoxe Antikodon-Wechselwirkungen einzugehen und somit das Stoppkodon als Sinnkodon zu lesen (Junker *et al.*, 1997; Akama *et al.*, 1998).

Um zu zeigen, dass eine alternative Kodonnutzung auch in den Dinoflagellaten existiert, müsste für die Gene von Peridinin-haltigen Dinoflagellaten, die interne Stoppkodons besitzen, eine Transkriptanalyse durchgeführt werden, die zeigt, dass diese Gene aktiv sind. Die Aminosäuren der Proteine müssten dann an den Stellen untersucht werden, welche auf Nukleotid-Ebene für das Stoppkodon standen.

Ist ein Vergleich von Minizirkel-Plastidengenen und normalen Plastidengenen zulässig?

Bei der Betrachtung der gravierenden Unterschiede (Anomalien der Plastidengene und deren mutmaßliche Lokalisation außerhalb der Plastiden) lassen sich erst dann zuverlässige Aussagen treffen, wenn eine vollständige Information über alle Plastidengene existiert.

Mit dem momentanen Stand des Wissens über die Plastidengene können nur Tendenzen vermutet werden. Erst mit der Sequenz der „wahren“ Plastiden-DNA werden Vergleiche mit normalen Plastomen erlaubt sein.

4.2. Vergleich der Minizirkel bei Peridinin-haltigen Dinoflagellaten

Das „ein Gen, ein Zirkel“ Prinzip (Zhang *et al.*, 1999) trifft im Großen und Ganzen auch auf die hier untersuchten Dinoflagellaten zu. Es wurden Minizirkel gefunden, die jeweils nur für ein Plastidengen kodieren. Im Falle des psbB, psbD bei *Ceratium horridum* und des psbC (wahrscheinlich auch psbA) von *Pyrocystis lunula* liegt nur ein Gen auf einem Zirkel.

Doch die hier gewonnenen Daten haben auch gezeigt, dass darüber hinaus noch andere Möglichkeiten existieren. Das Vorkommen von Gen-freien Zirkeln (3.7. Abb. 27) und die Existenz von Genstücken von psaA, psaB und der 23S rRNA auf den Minizirkeln sind klare Abweichungen vom „ein Gen, ein Zirkel-Prinzip“.

Mit den ycf-Genen (ycf16/24) von *Ceratium horridum* und den rpl-Genen (rpl28/33) von *Pyrocystis lunula* scheint es auch die Möglichkeit für mehr als ein Gen pro Zirkel zu geben. Für die rpl-Gene konnte gezeigt werden, dass mehr als ein Gen auf einem Plasmid liegt (Ergebnisse Abb. 14). Die Konstellation von rpl28/33 in direkter Abfolge existiert in keinem anderen photosynthetischen Organismus. Das rpl28-Gen ist zudem nur in *Synechocystis PCC6803* und in Plastiden von *Cyanophora paradoxa*, *Cyanidium caldarium* und *Porphyra purpurea* vorhanden. Mit dem ORF57 scheinen die rpl-Gene eine Transkriptionseinheit gebildet zu haben, die mit einer Haarnadel-Sekundärstruktur terminiert wird. Zudem weist die Ähnlichkeit des ORF57 zu Rpl33 in der Aminosäuresequenz darauf hin, dass es sich bei ORF57 entweder um ein Gen mit ähnlicher Funktion handelt oder es ein Pseudogen ist.

Mit FtsY, von dem jedoch bislang nur 60AS des N-Terminus bekannt sind, wären nach ORF57 mindestens vier Gene auf einem Minizirkel kodiert (Ergebnisse Abb. 15a). Auch das ftsY-Gen ist in keinem anderen photosynthetischen Organismus bekannt.

Die ribosomalen RNA-Gene von *Ceratium horridum* sind in vielen Klonen und Zirkeln fragmentarisch vorhanden. Neben den Klonen, die über große Bereiche ihrer Sequenz Homologien zu den ribosomalen RNA-Genen von *Heterocapsa triquetra* zeigen, existieren Klone mit 20-40 Nukleotid großen Fragmenten der 23S/16S rRNA. Warum dies so ist,

kann noch nicht klar gesagt werden. Diese Fragmente zeigen Homologien zu den ribosomalen RNA-Genen von *Heterocapsa triquetra*. Bei näherer Untersuchung der 23S rRNA und der 16S rRNA von *Heterocapsa triquetra* hat sich gezeigt, dass es sich hier vielleicht gar nicht um die ribosomalen RNAs handelt (s. 4.3.). In diversen Datenbanken existieren keine homologen ribosomalen Sequenzen zu den ribosomalen Genen von *Heterocapsa triquetra*. Auch Alignements gegen die ribosomalen Sequenzen von *Plasmodium* und *Toxoplasma*, aus denen die Primer abgeleitet wurden, um die 23S rRNA und die 16S rRNA aus *H. triquetra* zu amplifizieren, zeigten, dass es sich wahrscheinlich nicht um die angegebenen ribosomalen Gene handelt. Da die ribosomalen Gene von *Ceratium horridum* nur Homologien zu den „angeblichen“ *Heterocapsa triquetra*-rRNA-Genen zeigen, ist eine Aussage mit Vorsicht zu betrachten.

Ein Vergleich der Minizirkel Peridinin-haltiger Dinoflagellaten, unabhängig von den kodierten Plastidengenen, zeigt, dass die Minizirkelstrukturen in jedem Dinoflagellaten anders sind.

Die Minizirkel von *Heterocapsa triquetra* haben eine durchschnittliche Größe von 1,5- 3kb (Zhang *et al.*, 1999, 2000). Diese Minizirkel, die jeweils ein Plastidengen kodieren, weisen im nichtkodierenden Bereich eine konservierte Region auf, die als 9G-9A-9G Region bezeichnet wird. Neun Adeninnukleotide liegen in Zentrum einer 188 Nukleotid großen konservierten Sequenz. Zu beiden Seiten dieser Sequenz liegen zwei nicht identische aber hochkonservierte 135 Nukleotid große Sequenzblöcke, die im Zentrum je neun Guanine haben.

Die Minizirkel von *Amphidinium operculatum* sind im Durchschnitt 2,3 bis 2,4kb groß (Barbrook und Howe, 2000). Sie haben einen Bereich in der nicht kodierenden Sequenz des Zirkels, die als „Core-Region“ bezeichnet wird und etwa 400 Nukleotide groß ist. Diese Core-Region ist der 9G-9A-9G-Region aus *Heterocapsa triquetra* nicht ähnlich.

Mit dem hier untersuchten psbC-Zirkel von *Pyrocystis lunula* ist erst ein vollständig sequenzierter 5,2kb großer Minizirkel vorhanden. Es zeigt sich, dass hier repetitive Sequenzen über den ganzen Bereich der nicht kodierenden Region existieren (3.5. Abb.

12). Eine eventuell vorhandene Core-Region kann auf Grund eines fehlenden zweiten komplett sequenzierten Minizirkels nicht festgelegt werden.

Ceratium horridum besitzt Minizirkel, die eine Größe von 2,3 bis 6,6kb haben. Im nicht kodierenden Bereich weisen die Zirkel eine etwa 449bp große Core-Region auf. Diese Core-Region weicht je nach Zirkel nur um einige Nukleotide oder um ganze Sequenzblöcke ab (s. Abb. 41).

<i>psbB-Core</i>	1	AGTCTTGTGCAACTGTTGAGCTGTCTCTGTTTGTGCTGCTTGCAGC	70
<i>psbD-Core</i>	1	AGTCTTGTGCAACTGTTGAGCTGTCTCTGTTTGTGCTGCTTGCAGC	68
<i>psaB-Core</i>	1	AGTCTTGTGCAACTGTTGAGCTGTCTCTGTTTGTGCTGCTTGCAGC	70
<i>self-Core</i>	1	AGTCTTGTGCAACTGTTGAGCTGTCTCTGTTTGTGCTGCTTGCAGC	69
<i>psbB-Core</i>	71	TGTATACGTAGTATACATACATATACATGTTTAAAGCTTAAAGACTTAAACATGTATAACATCGTTACTTC	140
<i>psbD-Core</i>	69	TGTATACGTAGTATACATACATACATGTTTAAAGCTTAAAGACTTAAACATGTATAACATCGTTACTTC	138
<i>psaB-Core</i>	71	TGTATACGTAGTATACATACATACATGTTTAAAGCTTAAAGACTTAAACATGTATAACATCGTTACTTC	140
<i>self-Core</i>	70	TGTATACGTAGTATACATACATACATGTTTAAAGCTTAAAGACTTAAACATGTATAACATCGTTACTTC	139
<i>psbB-Core</i>	141	TTTAAGAAGTAACGATGTAGTCTGTGTTTGTATACAAACACAGACATATGTATACTACGTATACATATA	210
<i>psbD-Core</i>	139	TTTAAGAAGTAACGATGTAGTCTGTGTTTGTATACAAACACAGACATATGTATACTACGTATACATATA	208
<i>psaB-Core</i>	141	TTTAAGAAGTAACGATGTAGTCTGTGTTTGTATACAAACACAGACATATGTATACTACGTATACATATA	210
<i>self-Core</i>	140	TTTAAGAAGTAACGATGTAGTCTGTGTTTGTATACAAACACAGACATATGTATACTACGTATACATATA	209
<i>psbB-Core</i>	211	TACAGGTCTTAAGACCTGTATGTCTCTGTTTGTATACAAACACAGACAGTAGTCTGTGTTTGTATACA	280
<i>psbD-Core</i>	209	TACAGGTCTTAAGACCTGTATGTCTCTGTTTGTATACAAACACAGACAGTAGTCTGTGTTTGTATACA	278
<i>psaB-Core</i>	211	TACAGGTCTTAAGACCTGTATGTCTCTGTTTGTATACAAACACAGACAGTAGTCTGTGTTTGTATACA	221
<i>self-Core</i>	210	TACAGGTCTTAAGACCTGTATGTCTCTGTTTGTATACAAACACAGACAGTAGTCTGTGTTTGTATACA	278
<i>psbB-Core</i>	281	AACACAGACATATGTATACTACGTATACATATATACAGGTCTTAGTGATGCTGCAAGCAGG	350
<i>psbD-Core</i>	279	AACACAGACATATGTATACTACGTATACATATATACAGGTCTTAGTGATGCTGCAAGCAGG	347
<i>psaB-Core</i>	221	GTGATTGCGCAAGCAGG	246
<i>self-Core</i>	279	AACACAGACATATGTATACTACGTATACATATATACAGGTCTTAGTGATGCTGCAAGCAGG	347
<i>psbB-Core</i>	351	ATATACCAATTGCACAAGACTTCATGTCTTGATGCTAGTAGCGG	420
<i>psbD-Core</i>	348	ATATACCAATTGCACAAGACTTCATGTCTTGATGCTAGTAGCGG	417
<i>psaB-Core</i>	247	AGCTAAAGCTCCTGTTTAAAGGTACTA	315
<i>self-Core</i>	348	ATATACCAATTGCACAAGACTTCATGTCTTGATGCTAGTAGCGG	416
<i>psbB-Core</i>	421	ATAACAATAGCTCAATAGTTGCACAAGAC	449
<i>psbD-Core</i>	418	ATGGGACATTAGTAGCATGAGCTGTGCTC	446
<i>psaB-Core</i>	316	ATAACAATAGCTCAATAGTTGCACAAGAC	344
<i>self-Core</i>	417	ATAACAATAGCTCAATAGTTGCACAAGAC	445

Abb. 41: Aligement der Core-Regionen von *Ceratium horridum* Minizirkeln.

Die Core-Region scheint nur innerhalb einer Art konserviert zu sein und unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Dinoflagellaten-Spezies in der Sequenz beträchtlich.

In der durchschnittlichen Größe der Minizirkel unterscheiden sich die verschiedenen Peridinin-haltigen Dinoflagellaten zusätzlich. Während die Minizirkel von *Heterocapsa triquetra* und *Amphidinium operculatum* eine durchschnittliche Größe von 2,5kb aufweisen (Zhang *et al.*, 1999, 2000; Barbrook und Howe, 2000), haben die Minizirkel von *Pyrocystis lunula* und *Ceratium horridum* eine Größe von durchschnittlich 5kb. Ein Grund für diesen Größenunterschied könnte in der Wahl der Methoden zum Erhalt der Minizirkel sein.

Bislang führten „gezieltes Suchen“ von Plastidengenen zu Sequenzinformationen der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten. Dies geschah durch PCR-Techniken mit degenerierten Primern, Hybridisierungen gegen Gesamt-DNA-Banken und inverser PCR.

Wenn mit degenerierten Primern gearbeitet wird, muss sicher sein, dass das Gen existiert und in seiner Primär-Sequenz hinreichend konserviert ist, welches amplifiziert werden soll. Hier vermindert sich das Spektrum der in Frage kommenden Gene auf die in der Photosynthese beteiligten Gene und einige andere sehr konservierten Gene.

Inverse PCR-Techniken haben zudem den Nachteil, dass kleine Zirkel bevorzugt amplifiziert werden und größere Zirkel deshalb im Verborgenen bleiben.

Diese Nachteile wurden mit Hilfe der Aufreinigung der Minizirkel über den kombinierten CsCl-Gradienten und die Plasmidpräparation (3.6. und 3.7.) umgangen. Dies führte über Schrotschußklonierung zum Erhalt diverser anderer Gene (rpl-Gene, ycf-Gene und ftsY) und auch zum Nachweis, dass mehrere Kopien für ein Gen existieren.

4.3. Lokalisation der Minizirkel

Die in dieser Arbeit charakterisierten Minizirkel wurden durch Zellfraktionierungsversuche (3.9. Abb. 34) und *in situ* Hybridisierung (3.10. Abb. 35) in den Kernen der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten lokalisiert.

Mit dem Vorhandensein der Minizirkel stellen die Dinoflagellaten eigentlich keine Besonderheit dar, denn es existiert ein weites Spektrum an gefundenen Plasmiden in eukaryotischen Organismen (Esser *et al.*, 1986). Auch einige Spezies der Algen besitzen

kleine zirkuläre extrachromosomale DNA. Es handelt sich dabei größtenteils um cytoplasmatische, mitochondriale Plasmide.

Aber Zirkel, die Plastidengene kodieren und zudem im Kern liegen, waren bis jetzt noch nicht bekannt.

Warum sind Plastidengene, die sich auf Minizirkeln befinden, im Kern lokalisiert?

Um die Frage der Lokalisation zu beantworten, muss erst verstanden werden, wie die Minizirkel entstehen könnten.

Es gibt eine Vielzahl an Beispielen, in denen Plasmide existieren, die in den Organellen lokalisiert sind und sogar hybridisierende Sequenzbereiche mit dem entsprechenden Organellengenom aufweisen, wie z. B. bei *Euglena gracilis* (Heizmann *et al.*, 1982), *Acetabularia cliftonii* (Ebert *et al.*, 1985). Bei der Diatomee *Cylindrotheca fusiformis* wurden die beiden Plasmide pCf1 und pCf2 gefunden (Jacobs *et al.*, 1992), die anscheinend in der Lage sind, durch Resolvasen, die auf den Plasmiden liegen, ins Genom zu inserieren (Hildebrand *et al.*, 1992). *Chlamydomonas moewusii* weist eine 5,9kb große DNA-Species auf, die sich in die Chloroplasten-DNA integrieren kann (Turmel *et al.*, 1986).

Bei der Dasycladophyceae *Acetabularia cliftonii* konnte ein 14,1kb großes Plasmid bestimmt werden, welches die Fähigkeit besitzt, an unterschiedlichen Stellen ins Plastidengenom zu inserieren (Ebert *et al.*, 1985, Leible *et al.*, 1989).

Homologe Sequenzen zwischen Organellengenom und Plasmid scheinen also ein Indiz dafür zu sein, dass diese Plasmide im Stande sind, in das Organellengenom zu integrieren. Würden im Falle der Minizirkel der Dinoflagellaten ebenfalls homologe Sequenzen zwischen Zirkeln und Kern-/Plastiden-DNA gefunden, dann könnte angenommen werden, dass die Zirkel auch aus diesen Genomen hervorgehen oder im Stande sind, in diese zu inserieren.

Mit den Core-Regionen, die auf allen Minizirkeln der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten vorkommen, besteht ein möglicher Sequenzbereich zur Rekombination mit anderen Molekülen.

Mit der Auslagerung der Plastidengene auf Zirkeln in den Kern wäre es interessant zu wissen, welche Aufgaben die Zirkel haben.

Sind die Plastidengene auf den Minizirkeln aktiv oder sind sie nicht aktiv?

a) In dem Fall, dass die Plastidengene auf den Minizirkeln nicht transkribiert/translatiert werden, bestehen folgende Erklärungsmöglichkeiten:

Die Zirkel könnten ein System für den Austausch von Nukleinsäuren zwischen Chloroplast und Kern sein. Vielleicht ist mit der Existenz der Minizirkel ein Schritt erhalten, der in der Evolution noch nicht beobachtet werden konnte, der Versuch der Etablierung von plastidären Genen im nukleären Genom. Die Minizirkel hätten die Aufgabe Plastidengene zum Kern zu transportieren. Die Plastidengen-freien Zirkel und Plastidengenfragmente auf Minizirkeln könnten als fehlgeschlagene Excisionen aus dem Chloroplastengenom gewerten werden. Für eine Existenz der Minizirkel als „Gen-Shuttle“ zwischen Organell und Kern spricht, dass die Zirkel keine regulatorischen Sequenzen, wie z. B. Promotor- oder ribosomale Bindungsstellen haben und es wahrscheinlich ist, dass kein Genprodukt direkt von den Zirkeln entsteht. Auch mit der Größe, Struktur und Menge der Minizirkel wäre eine Möglichkeit gegeben, an vielen Stellen in das Kerngenom zu inserieren. Es würde sich die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass sich die Minizirkel (bzw. das Gen auf dem Minizirkel) direkt an regulatorische und signalgebende Elemente anschließen könnten, die eine Expression der inserierten Plastidengene erlauben. Die Southernhybridisierungen zeigen, dass kein Signal detektiert werden kann, welches Rückschlüsse auf eine Genkopie der plasmidkodierten Plastidengene in einer hochmolekularen DNA geben könnte. Die Etablierung der Minizirkel ins Kerngenom wäre somit noch nicht gelungen. Die Zirkel müssten als Übergangszustand angesehen werden.

Eine ganz andere Überlegung ist, dass die Zirkel aus dem Kern hervorgehen und ihr Ziel die Plastiden sind. Es bestünde alternativ zum Proteintransport ein Nukleinsäuretransport in die Chloroplasten. Durch die Insertion in einen Masterzirkel würden die Minizirkel dann aktiviert. Auch in diesem Falle müsste durch Southernhybridisierung eine hochmolekulare DNA markiert werden. Die Abbildungen 6, 7 und 8 zeigen, dass dies nicht der Fall ist.

b) Die andere Möglichkeit wäre, dass die Plastidengene auf den Minizirkeln transkribiert/translatiert werden:

Da die Peridinin-haltigen Dinoflagellaten zweifelsfrei Photosynthese betreiben, muss davon ausgegangen werden, dass die Plastidengene auf den Minizirkeln aktiv sind und transkribiert/translatiert werden.

Die natürlichen Plasmide P1, P2 und P3 in der Sonnenblume sind Belege für die Koexistenz als kleine replikative Einheit (Crouzillat *et al.*, 1989). Auch zwei etwa 2,2kb große, neben den S-Plasmiden vorhandene Plasmide im Mitochondrium von *Zea mays* (Leon *et al.*, 1989, Fauron, 1995), die u.a. die tRNA^{trp} kodieren, spielen eine essentielle Rolle für die Organellenfunktion. Diese Aufgabe könnte den Minizirkeln in den Peridinin-haltigen Dinoflagellaten auch zukommen.

Durch die Lokalisation der Minizirkel außerhalb der Plastiden wird der Kern in die Lage versetzt, präzise auf Umwelteinflüsse zu antworten, indem er die plastidären Gene nach Bedarf aktiviert oder inaktiviert. Der Kern besäße damit die Möglichkeit, den Chloroplasten bzw. die Photosynthese nach Bedarf regulieren zu können. Gerade vor dem Hintergrund, dass vielen Dinoflagellaten neben der Photosynthese alternativ die heterotrophe Ernährung zur Verfügung steht (von Stosch, 1967), wäre eine exakt abgestimmte Regulation der Photosynthese von Vorteil.

Mit dieser Überlegung könnte auch erklärt werden, warum nur bestimmte Plastidengene (Schlüsselproteine der Photosynthese) auf Zirkeln gefunden wurden.

Mit dem Wissen über die Kernlokalisation der Zirkel tritt dann aber die Frage auf, wie die Plastidengene bzw. deren Produkte (RNA oder Protein) in den Chloroplasten gelangen.

Die erste Annahme wäre, dass die Gene ganz normal transkribiert und translatiert werden und die Genprodukte in den Chloroplasten gelangen. Voraussetzung hierfür wäre eine Signal- und Transitsequenz, die den Bestimmungsort und den Transport über die drei Hüllmembranen des Chloroplasten ermöglicht.

Die bisher vollständig sequenzierten Plasmide zeigen deutlich, dass auf ihnen keine Transit- oder Signalsequenzen kodiert sind.

Wenn sich die ribosomalen RNA-Gene/Fragmente (23SrRNA, 16SrRNA) bestätigen, die auch auf Minizirkeln gefunden wurden, könnten diese als RNA über die Plastidenhülle

geschleust werden, wie es auch für die tRNA Cystein (UGC) bei *Epifagus virginiana* (Taylor *et al.*, 1991) bekannt ist.

Eine zweite Möglichkeit für den Transport in die Plastiden wäre ein Polyproteintransport von plastidären Proteinen. Nur ein Protein müsste die Sortierungs- und Transportsequenz besitzen, um alle weiteren Proteine als Kette über die Membranen hinter sich her zu ziehen, ähnlich wie die Anordnung des Peridinin-Chlorophyll_a-bindenden Proteins PCP bei *Gonyaulax polyedra* (Le *et al.*, 1997). Dann gäbe es wiederum eine Ausnahme für die Gene der ribosomalen RNAs.

Eine dritte Möglichkeit wäre, wenn die Plasmide selbst die Transporteinheit bilden. Alle plasmidkodierte Gene, ob für Proteine oder ribosomale RNAs, wären gleichberechtigt für einen Transfer über die Plastidenmembranen. Es würde nur eine Art eines Translokationskomplexes benötigt und alle Plasmide hätten eine gemeinsame Erkennungssequenz für diesen theoretischen Transport, den Core-Bereich.

Dagegen sprechen die Ergebnisse der Zellfraktionierung und der *in situ*-Hybridisierung, die zeigen, dass keine Minizirkel im Chloroplasten nachzuweisen sind.

Was haben die repetitiven Sequenzen (Core-Regionen) zu bedeuten?

Neben allen Fragen, die die Plasmidgene aufwerfen, sollten auch die nichtkodierenden Bereiche auf den Zirkeln berücksichtigt werden. Da ein Plasmidgen bei unterschiedlichen Peridinin-haltigen Dinoflagellaten-Spezies kaum in seiner Größe variiert, sind die unterschiedlichen Plasmidgrößen ausschließlich auf den genfreien Bereich zurückzuführen.

Zhang *et al.* 2000 beschreibt die 9A-9G-9A-Region der nichtkodierenden Bereiche von *H. triquetra* Plasmiden als Rekombinationsmöglichkeit zur Entstehung von Subzirkeln. Aber auch ein potentieller Replikationsursprung der Plasmide wird diesem Core-Bereich zugesprochen (Barbrook und Howe, 2000).

Bei Betrachtung der Sekundärstrukturen dieser homologen Partien wird deutlich, dass es sich um wichtige und vielleicht auch regulierende Sequenzbereiche handelt.

Wie im Abschnitt 3.7.1. gezeigt, wäre es denkbar, dass diese Core-Regionen noch andere Funktionen besitzen könnten.

Über ein Temperaturspektrum von 2-28°C wurden die Sekundärstrukturen von Core-Regionen von *Ceratium horridum*, die auf Plastidengen-tragenden Minizirkeln sind, mit denen auf Plastidengen-freien Minizirkeln verglichen. Über einen Bereich von 449bp unterscheiden sich diese Core-Regionen nur durch ein substituiertes und vier deletierte Nukleotide. Die berechneten Sekundärstrukturen für beide Core-Bereiche sehen fast identisch aus bis zur einer Temperatur von 16°C (s. Abb. 29a und 30). Ab einer Temperatur von 17°C, die der optimalen Wachstumstemperatur entspricht, faltet sich nur die Core-Region des Plastidengen-tragenden Plasmids in eine völlig andere um. Die Core-Region des Plastidengen-freien Zirkels behält ihre Struktur bei.

Die Core-Regionen der anderen Plastidengen-kodierenden Minizirkel von *Ceratium horridum* zeigen ebenfalls das Phänomen des Umfaltens der Sekundärstruktur bei 17°C. Es könnte angenommen werden, dass die Zirkel über einen „temperatur-sensitiven Schalter“ der Sekundärstruktur aktiviert oder auch deaktiviert werden können. Die Struktur ab 17°C entspräche der aktiven Form, wobei „aktiv“ nicht als transkribiertes Gen betrachtet werden muss. Die Aktivierung könnte auch darin bestehen, das Plasmid in einen transportfähigen Zustand zu überführen oder eine Erkennungssequenz für ein bindendes Protein zu verlieren oder zu erhalten. Nur Plastidengen-tragende Zirkel würden aktiviert. Die Plastidengen-freien Zirkel blieben inaktiv. Z. B. könnten die Rosetten-förmigen Strukturen aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (3.6. Abb 16) als Depot für inaktive Zirkel dienen. Die Gen-tragenden Minizirkel, die durch die Core-Region in einem zentralen proteinösen Punkt verbunden sind, würden sich durch das Umfallen der Core-Region aus der Rosetten-förmigen Verbindung lösen.

Das plötzliche Auftreten der Algenblüte, welche alljährlich zum Massensterben von Fischen führt, könnte ebenfalls durch die „aktiv-inaktiv-Struktur“ des Core-Bereiches erklärt werden. Die Sommer- und Herbstmonate bringen höhere Wassertemperaturen mit sich. Ab einer bestimmten Temperatur faltet sich die Sekundärstruktur des Core-Bereiches in den „aktiven“ Zustand um. Die Aktivierung der Gene und die damit einhergehende Steigerung der Photosyntheserate könnte dazu führen, dass es zu einer schnellen Vermehrung der Dinoflagellaten kommt.

Wenn die Core-Region tatsächlich durch die Temperatur in ihrer Sekundärstruktur beeinflusst wird, ist dies dann auch bei den anderen Peridinin-haltigen Dinoflagellaten der Fall?

Der Bereich, der von Zhang *et al.* (1999) als Core-Bereich der Minizirkel von *Heterocapsa triquetra* beschrieben wird, hat in etwa eine ähnliche Größe wie der von *Ceratium horridum*. Da hier kein definierter Anfang und kein definiertes Ende dieser Region beschrieben ist, wurden Sekundärstrukturberechnungen für den ungefähren Bereich dieser Core-Region durchgeführt. Genau wie für *Ceratium horridum* wurde ein Temperaturspektrum von 2-26°C betrachtet. In allen Zirkeln von *Heterocapsa triquetra* faltete sich die Core-Region bei 18°C in eine andere Struktur um, ähnlich dem Erscheinungsbild („aktiv-inaktiv-Struktur“) der Core-Region von *Ceratium horridum*. Die einzige Ausnahme bei diesen Sekundärstrukturberechnungen waren die Core-Regionen der Zirkel, die die 23S rRNA und die 16S rRNA kodierten. Hier falteten sich die Strukturen der Core-Regionen bei 18°C nicht um. Sie behielten durchweg eine Struktur bei. Dies spricht möglicherweise dafür, dass es sich hier nicht um die ribosomalen RNA-Gene handelt, wie in schon in Abschnitt 4.2. beschrieben.

4.4. Wie passen die Minizirkel in das Bild der Evolution von Chloroplastengenomen?

Die Dinoflagellaten sind in vielerlei Hinsicht außergewöhnlich. Dies zeigte sich in molekularbiologischen Bereichen der Dinoflagellaten, z. B. der FormII-RuBisCO (Morse *et al.*, 1995; Palmer, 1995; Whitney und Yellowless, 1995; Whitney *et al.*, 1995), den morphologischen Eigenarten (Schnepf und Elbrächter, 1999) und wird auch durch die hier gewonnenen Erkenntnisse, über die Plastome wieder bestätigt. In der Organisation der Plastidengene und den Sequenzanomalien weichen die Peridinin-haltigen Dinoflagellaten von allen photosynthetischen Organismen ab.

4.5. Die wahre Plastiden-DNA

Aus den Versuchen der Zellfraktionierung und der *in situ* Hybridisierung hat sich herausgestellt, dass die Minizirkel nicht in den Plastiden lokalisiert sind. Anstelle der Minizirkel existiert hier eine hochmolekulare DNA (3.8. Abb. 33 und 3.9. Abb. 34). Auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (3.10. Abb. 35 und 3.11. Abb. 36) zeigen, dass in den Chloroplasten eine hochmolekulare DNA existiert. Diese Abbildungen hinterlassen den Eindruck, dass die DNA stark kondensiert ist und organisiert sein könnte wie ein Kernchromosom der Dinoflagellaten. Bei genauerer Betrachtung ist festzustellen, dass die Plastiden-DNA eine Art Wirbel bzw. Torsion aufweist. Dies ist auch ein Charakteristikum, welches den Chromosomen im Dinoflagellatenkern zukommt (Kowallik und Haberkorn, 1971).

Mit der Erkenntnis der hochmolekularen DNA in den Plastiden der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten kommt auch die Frage nach der wahren Plastiden-DNA und nach den Sequenzen und Genen aus dieser DNA auf.

Erste Versuche mit Restriktion/Ligations-Ansätzen blieben ohne Erfolg. Es stellte sich heraus, dass diese DNA zwar DNaseI-sensitiv ist, aber resistent gegenüber Restriktionsendonukleasen zu sein scheint. Auch Methylierungs-insensitive Restriktionsendonukleasen vermochten die „wahre Plastiden-DNA nicht zu schneiden (3.12. Abb. 39).

Mit Hilfe der RAPD-Methode gelang es, erste Sequenzinformationen (etwa 4000bp) über diese DNA zu erhalten (s. Anhang). Leider gaben diese Sequenzen keine klaren Erkenntnisse über die Plastiden DNA. Sicher scheint aber, dass es sich hier nicht um kontaminante Bakterien-DNA handelt, weil keine Sequenzhomologien zu bakteriellen DNAs gefunden wurden.

Vielleicht besteht auch ein Zusammenhang zwischen der Plastiden-DNA und den rosettenartigen Strukturen, die in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen neben den Minizirkeln entdeckt wurden.

Die Rosetten scheinen mehrere Minizirkel in superhelikaler Form zu verbinden. Im zentralen Bereich der Rosetten-Strukturen sind die Minizirkel miteinander verbunden. Sie

weisen Ähnlichkeiten zur der Kinetoplasten-DNA der Trypanosomen auf, die aus einer großen Anzahl an Plasmiden besteht, die katenar angeordnet sind (Perez-Morga, 1993) und sich auch aus diesem Verband lösen können.

Eine vollständige Charakterisierung der Minizirkel und der Chloroplasten-DNA ist notwendig, um ein Verständnis für die Evolution der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten zu bekommen.

Auch die Mitochondrien-DNA müsste in diesem Zusammenhang untersucht werden. Während der Klonierung von aufgereinigten Minizirkeln wurde bei *Pyrocystis lunula* das *coxI*-Gen gefunden. Wenn das *coxI*-Gen auf einem Plasmid vorliegt, wie auch bei *Dicyema misakiense* (Watanabe, 1999), könnte bei Peridinin-haltigen Dinoflagellaten eventuell auf eine generelle Organisation der Organellengenome in Minizirkeln geschlossen werden.

Überlegungen:

Mit jeder Information über die Dinoflagellaten stellt sich heraus, dass diese Organismen mit dem normalen Verständnis vieler Vorgänge nichts gemein haben. Die Dinoflagellaten vermitteln auf Grund ihrer Besonderheiten den Eindruck, als würden sie nur semioptimale Möglichkeiten für das besitzen, was andere Organismen auszeichnet. Eine Form II RuBisCO, die eine geringere Substratspezifität zu CO₂ hat als die Form I RuBisCO; ständig kondensierte Kernchromosomen, die von zirkulärer Natur sind und auch durch das Fehlen von Histonen an prokaryotische DNA erinnern; Plastidengene, die auf Minizirkeln kodiert sind.

Erst detaillierte Kenntnisse über das Kerngenom und das „wahre“ Plastidengenom, das Verständnis über deren Organisation und die Genregulation würde die Existenz der Minizirkel erklären. Die methodischen Ansätze zur Isolation der Minizirkel und auch der wahren plastiden-DNA sind in dieser Arbeit gegeben.

Zusammenfassung

Mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit wurde ein Einblick in die Organisation und Struktur plastidärer Gene von Peridinin-haltigen Dinoflagellaten ermöglicht. Die Dinoflagellaten haben, abweichend vom Standardmodell des Plastidengenoms anderer Organismen, ein ungewöhnliches System aus Minizirkeln etabliert.

Mit den hier angewandten Methoden konnte gezeigt werden, dass die Plastidengene nicht auf einem großen Plastidengenom liegen. Vielmehr liegen die Plastidengene einzeln und auch in Genverbänden auf 2-6kb großen Minizirkeln vor.

Es gelang, diese elektronenmikroskopisch zu visualisieren und eine weitere ungewöhnliche Organisation der Minizirkel festzustellen. In einer Art Rosettenstruktur liegen viele Minizirkel in superhelikaler Form aneinander gebunden vor.

Mit Hilfe einer speziellen Plasmidpräparation für Dinoflagellaten war es möglich, durch Klonierung der aufgereinigten Minizirkel von *Ceratium horridum* und *Pyrocystis lunula* aus mehr als 170.000bp Informationen zu erhalten. In diesen Sequenzen befanden sich 18 verschiedene Gene mit eindeutigem plastidären Ursprung, Genfragmente sowie Gene mit internen Stoppkodons und artspezifische Sequenzbereiche. Es wurden sechs Minizirkel charakterisiert, wobei ein Zirkel kein Gen enthält, vier Zirkel jeweils nur ein Plastidengen enthalten, und ein Zirkel mindestens vier Gene kodiert.

Eine zusätzliche etwa 449bp große Sequenz, die als Core-Region bezeichnet wurde, kommt auf allen Plasmiden von *Ceratium horridum* vor. Die Sekundärstruktur dieser Core-Region faltet sich bei einer Temperatur von 17°C nur im Falle der getragenen Zirkel in eine andere Struktur um.

Mit einer Zellfraktionierung von *Ceratium horridum* ist es zum ersten Mal gelungen morphologisch intakte Chloroplasten von einem Peridinin-haltigen Dinoflagellaten zu isolieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Chloroplasten eine hochmolekulare DNA enthalten, nicht aber die bis hier im Chloroplasten vermuteten Minizirkel. Diese konnten durch *in situ*-Hybridisierung im Kern lokalisiert werden. Die hochmolekulare DNA, die hier als „wahre“ Plastiden-DNA bezeichnet wird, konnte mit unabhängigen Methoden im Chloroplasten bestätigt werden. Diese DNA, die DNaseI sensitiv ist, zeigte sich gegenüber Restriktionsendonukleasen als resistent.

RAPD-Versuche ergaben die ersten Sequenzen (4000bp) der wahren Plastiden-DNA.

Literatur

- Akama K., Kashihara M. (1996):** Plant nuclear tRNAMet genes are ubiquitously interrupted by introns. *Plant Mol. Biol.* 32(3), 427-434
- Akama K., Naß A., Junker V., Beier H. (1997):** Characterization of nuclear tRNATyr introns: their evolution from red algae to higher plants. *FEBS Lett.* 417, 213-218
- Akama K., Junker V., Beier H. (1998):** Characterization of a nuclear tRNACys gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 116, 446
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1995):** Molekularbiologie der Zelle. Dritte Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo
- Allen J.F., Raven J.A. (1996):** Free-radical-induced mutation versus redox regulation: costs and benefits of genes in organelles. *J Mol Evol* 42, 482-492
- Andersson J.O., Andersson S.G.E. (1997):** Genomic rearrangements during evolution of the obligate intracellular parasite *Rickettsia prowazekii* as inferred from an analysis of 52015bp nucleotide sequence. *Microbiology* 143, 2783-2795
- Andersson J.O., Andersson S.G.E. (1999):** Genome degradation is an ongoing process in *Rickettsia*. *Mol. Biol. Evol.* 16, 1178-1191
- Apstein C. (1909):** Die Pyrocysteen der Plankton Expedition. Ergebnisse der Plankton-Expedition der Humboldt-Stiftung, 4. M.c., 1-28
- Araoz R., Lebert M., Hader D.P. (1998):** Electrophoretic applications of phycobiliproteins. *Electrophoresis* 19(2), 215-219
- Ausseil J., Soyer-Gobillard MO, Geraud ML, Bhaud Y, Baines I, Preston T, Moreau H. (1999):** Characterization of p80, a novel nuclear and cytoplasmic protein in dinoflagellates. *Protist* 150(2), 197-211
- Balech E. (1956):** Étude des dinoflagellés di sable de Roscoff. *Revue Algologique*, n.sér., 2:29-52.
- Balech E. (1959):** Two new genera of dinoflagellates from California. *The Biological Bulletin*, v.116, no.2, p.195-203.
- Bancroft I., Wolk C.P., Oren E.V. (1989):** Physical and genetic maps of the genome of the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 171, 5940-5948
- Barbrook A.C., Howe C.J. (2000):** Minicircular plastid DNA in the dinoflagellate *Amphidinium operculatum*. *Mol Gen Genet.* 263(1):152-8.

- Baroin-Tourancheau A., Tsao N., Klobutcher L.A., Pearlman R.E., Adoutte, A. (1995):** Genetic code deviations in the ciliates: evidence for multiple and independent events. *EMBO J.*, 14, 3262–3267
- Bhattacharya D. and Medlin L (1995):** The phylogeny of plastids: A review based on comparisons of small-subunit ribosomal RNA coding regions. *J. Phycol.* 31, 489-498.
- Birnboim H.C., Doly J. (1979):** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc. Acids Res* 7, 1513-1523
- Boczar B.A., Liston J., Cattolico R.A. (1991):** Characterization of satellite DNA from three marine dinoflagellates (Dinophyceae): *Glenodinium* sp. and two members of the toxic Genus, *Protogonyaulax*. *Plant Physiol.* 97, 613-618
- Boudreau E., Turmel M. (1995):** Gene rearrangements in Chlamydomonas chloroplast DNAs are accounted for by inversions and by the expansion/contraction of the inverted repeat. *Plant Mol. Biol.* 27, 351-364
- Bouligand Y., Norris V. (2001):** Chromosome separation and segregation in dinoflagellates and bacteria may depend on liquid crystalline states. *Biochimie* 83(2),187-92
- Burgdorfer W., Barbour A.G., Hayes S.F., Benach J.L., Grunwaldt E., Davis J.P. (1982):** Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science*, 216, 1317–1319
- Campbell W.H., Gowri G. (1990):** Codonusage in higher plants, green algae and cyanobacteria. *Plant Physiol.* 92, 1-11
- Casjens S., Murphy M., DeLange M., Sampson L., van Vugt R., Huang W.M. (1997):** Telomeres of the linear chromosomes of Lyme disease spirochaetes: nucleotide sequence and possible exchange with linear plasmid telomeres. *Mol Microbiol* 26, 581–596
- Casjens S. (2000):** A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.*, **35**, 490–516
- Cavalier-Smith T. (1982):** The Origin of Plastids. *Biol. J. Linn. Soc.* 17: 289-306
- Cavalier-Smith T. (1991):** Cell diversification in heterotrophic flagellates. In: Patterson DJ, Larsen J (eds) *The biology of free living heterotrophic flagellates*. Oxford University Press, Oxford, 113-131
- Cavalier-Smith T. (1993a):** Kingdom Protozoa and its 18 phyla. *Microbiol. Rev.* 57, 953-994
- Cavalier-Smith T. (1993b):** The Origin, Losses and Gains of Chloroplasts, Origin of Plastids, Symbiogenesis, Prochlorophytes, and the Origins of Chloroplasts, edited by Ralph A. Lewin, Scripps Institution of Oceanography, Chapman & Hall, New York; London

- Cavalier-Smith T. (1998):** A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev.* 73, 203-266
- Chen X., Widger W.R. (1993):** Physical and genome map of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 7002. *J. Bacteriol.* 175, 5106-5116
- Chesnick J.M., Hooistra W.H., Wellbrock U., Medlin L.K. (1997):** Ribosomal RNA analysis indicates a benthic pennate diatom ancestry for the endosymbionts of the dinoflagellates *Peridinium foliaceum* and *Peridinium balticum* (Pyrrhophyta). *J Eukaryot Microbiol.* 44, 314-320
- Crouzillat D., Grentzbittel L., de la Canal L., Vaury C., Perrault A., Nicolas P., Ledoigt G. (1989):** Properties and nucleotide sequence of a mitochondrial plasmid from sunflower. *Curr. Genet.* 15, 283-289
- Delwiche C.F. (1999):** Tracing the thread of plastid diversity through the tapestry of life. *The American Naturalist* 154 (suppl.), S164-177
- Denhardt D.T. (1966):** A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 23, 641-646
- Devreux J. (1991):** The GCG Sequence Analysis Software Package, Version 7.0 - Unix, Genetics Computer Group, Inc., Univeristy Research Park, 575 Science Drive, Suite B, Madison, Wisconsin, 53711, USA
- Devreux J., Haeberli P., Smithies O. (1984):** A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* 12, 387-395
- Dodge J.D. (1971):** A dinoflagellate with both a mesokaryotic and a eucaryotic nucleus. *Protoplasma* 73, 145-157
- Dodge J.D., Bibby B.T. (1973):** The Prorocentrales (Dinophyceae). I. A comparative account of fine structure in the genera *Prorocentrum* and *Exuviaella*. *Botanical J. of the Linnean Society*, 67, No. 2, 175-187
- Douglas S.E. (1992):** Eukaryote-eukaryote endosymbioses: Insight from studies of a cryptomonad alga. *BioSystems* 28, 57-68
- Douglas S.E. (1994):** Chloroplast origins and evolution. *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (D.A. Bryant, ed.). Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht, 91-118.
- Douglas S.E., Penny S.L. (1999):** The plastid genome of the cryptophyte alga, *Guillardia theta*: complete sequence and conserved syntenic groups confirm its common ancestry with red algae. *J Mol Evol* 48(2),236-44
- Ebert C., Tymms M.J., Schweiger H.-G. (1985):** Homology between 4,3µm minicircular DNA and plastomic DNA in chloroplasts of *Acetabularia cliftonii*. *Mol. Gen. Genet.* 200, 187-192

- Esser K., Kück U., Lang-Hinrichs C., Lemke P., Osiewacz H.D., Stahl U., Tudzynski P. (1986):** Plasmids of eukaryotes. Springer-Verlag, Berlin
- Fast N.M., Kissinger J.C., Roos D.S., Keeling P.J. (2001):** Nuclear-encoded, plastid-targeted genes suggest a single common origin for apicomplexan and dinoflagellate plastids. *Mol. Biol. Evol.* 18(3), 418-26
- Fauron C., Casper M., Gao Y., Moore B. (1995):** The maize mitochondrial genome: dynamic, yet functional. *Trends in Genetic* 11 (6), 228-235
- Felsenstein J. (1978):** Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst. Zool.* 27, 401-410
- Fischer N., Stampacchia O., Redding K., Rochaix J.D. (1996):** Selectable marker recycling in the chloroplast. *Mol. Gen. Genet.* 251, 373-380
- Fraser C.M. (1997):** Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, 390, 580–586
- Freier U. (1995):** Sequenz, Gene und phylogenetische Analyse der SSC- und IR-Region im Plastidengenom der Kieselalge *Odontella sinensis*. Inaugural-Dissertation, Universität Düsseldorf
- Gellissen G. (1987):** Mobilität von DNA zwischen Organellen. *BIUZ* 17, 15-20
- Gibbs S.P. (1978):** The chloroplast of *Euglena* may be evolved from symbiotic green algae. *Can. J. Bot.* 56, 2883-2889
- Gibbs S.P. (1981):** The chloroplast of some algal groups may have evolved from eukaryotic algae. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 361, 193-208
- Gillot M.A., Gibbs S.P. (1980):** The cryptomonad nucleomorph: its ultrastructure and evolutionary significance. *J. Phycol.* 16, 558-568
- Gilson P.R., McFadden G.I. (1997):** Good things in small packages: the tiny genomes of the chlorarachniophyte endosymbionts. *Bioessays* 19, 167-173
- Glöckner G., Rosenthal A., Valentin K. (2000):** The structure and gene repertoire of an ancient red algal plastid genome. *J. Mol. Evol.* 51, 382-390
- Grimm M., Naß A., Schüll C., Beier H. (1998):** Nucleotide sequences and functional characterization of two tobacco UAG suppressor tRNA^{Gln} isoacceptors and their genes C40. *Plant Mol. Biol.* 38, 689-697
- Hallick R.B., Hong L., Drager R.G., Favreau M.R., Monfort A., Orsat B., Spielmann A., Stutz E. (1993):** Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. *Nuc. Acid. Res.* 21, 3537-3544

- Häuber M.M., Müller S.B., Speth V., Maier U.-G. (1994):** How to evolve a complex plastid? A hypothesis. *Bot. Acta* 383-386
- Heizmann P., Ravel-Chapuis P., Nigon V. (1982):** Minicircular DNA having sequence homologies with chloroplast DNA in a bleached mutant of *Euglena gracilis*. *Curr. Genet.* 6, 119-122
- Helling R.B., Goodman H.M., Boyer H.W. (1974):** Analysis of EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J. Virol.* 14, 1235-1244
- Herdman M., Janvier M., Rippka R., Stanier R.Y. (1979):** Genome size of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 73-85
- Herrmann R.G. (1997):** Eukaryotism, towards a new interpretation. In HEA Schenk, RG Herrmann, K.W. Jeon, W. Schwemmler, eds, *Eukaryotism and Symbiosis*. Springer, Heidelberg, Germany, 73-118
- Hildebrand M., Hasegawa P., Ord R.W., Thorpe V.S., Glass C.A., Volcani B.E. (1992):** Nucleotide sequence of diatom plasmids: identification of open reading frames with similarity to site-specific recombinases. *Plant Mol. Biol.* 19, 759-770
- Hiller R.G., Wrench P.M., Sharples F.P. (1995):** The light-harvesting chlorophyll *a-c*-binding protein of dinoflagellates: A putative polyprotein. *FEBS Lett.* 363, 175-178
- Hiratsuka J., Shimada H., Whittier R., Ishibashi T., Sakomoto M., Mori M., Kondo C., Honji Y., Sun C.-R., Meng B.-Y., Li Y.-Q., Kanno A., Nishizawa Y., Hirai A., Shinozaki K., Sugiura M. (1989):** The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: Intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol. Gen. Genet.* 217, 185-194
- Iwasaki H. (1984):** Growth physiology of red-tide microorganisms. *Microbiol. Sci.* 1(7), 179-82
- Jacobs J.D., Ludwig J.R., Hildebrand M., Kukel A., Feng T.Y., Ord R.W., Volcani B.E. (1992):** Charakterization of two circular plasmids from the marine diatome *Cylindrotheca fusiformis*: plasmids hybridize to chloroplast and nuclear DNA. *Mol. Gen. Genet.* 233, 302-310
- Jeffrey S.W., Sielicki M., Haxo F.T. (1975):** Chloroplast pigment patterns in dinoflagellates. *J. Phycol.* 11, 374-384
- Jenks A., Gibbs S.P. (2000):** Immunolocalization and distribution of Form II Rubisco in the Pyrenoid and Chloroplast stroma of *Amphidinium carterae* and Form I Rubisco in the symbiont-derived plastids of *Peridinium foliaceum* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 36, 127-138
- Jensen R.G., Bassham J.A. (1966):** Photosynthesis by isolated chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56, 1095-1101

- Junker V., Teichmann T., Hekele A., Fingerhut C., Beier H. (1997):** The tRNA^{Tyr}-isoacceptors and their genes in the ciliate *Tetrahymena thermophila*: C36cytoplasmic tRNA^{Tyr} has a QUA anticodon and is coded by multiple intron-containing genes. *Nucleic Acids Res.* 25, 4194-4200
- Kaneko T., Sato S., Kotani H., Tanaka A., Asamizu E., Nakamura Y., Miyajima N., Hirosawa M., Sugiura M., Sasamoto S., Kimura T., Hosouchi T., Matsuno A., Muraki A., Nakazaki N., Naruo K., Okumura S., Shimpo S., Takeuchi C., Wada T., Watanabe A., Yamada M., Yasuda M. and Tabata S. (1996):** Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *J. DNA Res.* 3 (3), 109-136
- Kempken F. (1997):** Mobile Nukleinsäuresequenzen und die Dynamik von Genomen. *BIUZ* 27, 114-122
- Kervestin S., Frolova L., Kisselev L., Jean-Jean O. (2001):** Stop codon recognition in ciliates: *Euplotes* release factor does not respond to reassigned UGA codon. *EMBO Rep.* 2(8), 680-684
- Kidwell F. (1992):** Horizontal transfer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2, 868-873
- Kleinschmidt A.K. (1968):** Monolayer techniques in electron microscopy of nucleic acid molecules. *In* *Methods in Enzymology*, L. Grossman and K. Moldave (eds), Academic Press, New York, Vol. 12B, 361-377
- Klut M.E., Bisalputra T., Antia N.J. (1988):** The use of fluorochromes in the cytochemical characterization of some phytoflagellates. *Histochem. J.*, 20 (1), 35-40
- Knippers R. (1995):** Molekulare Genetik. 6., neubearb. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Kofoed C.A. (1907):** Dinoflagellata of the San Diego Region III. Description of new species. *Univ. Calif. Publ. Zool.* 3, 299-340
- Kofoed C.A. (1908):** Exuviation, autotomy and regeneration in *Ceratium*. *Univ. Calif. Publ. Zool.* 4, 345-386
- Kofoed C.A. (1909):** On *Peridinium steini* Jürgensen, with a note on the nomenclature of the skeleton of the Peridinidae. *Arch. Protistenk.* 16, 25-47
- Kofoed C.A., Skogsberg T., (1928):** The Dinoflagellata: the Dinophysoidae. Harvard University, Museum of Comparative Zoology, Memoirs, 51:708 p., 19 pl.
- Kohler S., Delwiche C.F., Denny P.W., Tilney L.G., Webster P., Wilson R.J., Palmer J.D., Roos D.S. (1997):** A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science* 275(5305), 1485-9.

- Kolodner R., Tewari K.K. (1975):** The molecular size and conformation of the chloroplast DNA from higher plants. *Biochem. Biophys. Acta* 402, 372-390
- Kowallik K.V. (1971):** The use of proteases for improved presentation of DNA in chromosomes and chloroplasts of *Prorocentrum micans* (Dinophyceae). *Arch Mikrobiol.*, 80(2), 154-65.
- Kowallik K.V., Haberkorn (1971):** The DNA-Structures of the chloroplast of *Prorocentrum micans* (Dinophyceae). *Arch Mikrobiol.*, 80(2), 252-261.
- Kowallik K.V. (1989):** Molecular aspects and phylogenetic implicationen of plastid genomes of certain chromophytes. *The Chromophyte Algae: Problems and Perspectives* (J.C. Green, B.S.C. Leadbeater, W.L. Diver, eds.). *The Systematics Association Special Vol.38*, 101-124, Clarendon Press Oxford
- Kowallik K.V. (1993):** Origin and evolution of plastids from chlorophyll a+c-containing algae: Suggested ancestral relationship to red algal plastids. *Origin of Plastids* (R.A. Lewin, ed.). Chapman and Hall, New York, London, 223-263
- Kowallik K.V. (1994):** From endosymbionts to chloroplasts: Evidence for a single prokaryotic/eukaryotic endocytobiosis. *Endocytobiosis and Cell Res.* 10, 137-149
- Kowallik K.V., Stöbe B., Schaffran I., Freier U., (1995):** The chloroplast genome of a chlorophyll a+c-containing alga, *Odontella sinensis*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 13, 336-342
- Kowallik K.V. (1997):** Origin and Evolution of Chloroplasts - Current Status and Future Perspectives. *In: Eukaryotism and Symbiosis. Intertaxonic combination versus symbiotic adaption* (Schenk, H.E.A., Herrmann, R.G., Jeon, K.W., Müller, N.E. and Schwemmler, W, eds.) Springer Verlag Berlin, Heidelberg: 3-23.
- Kowallik K.V. (2000):** Endosymbiose-Motor der Evolution. *In Aufbruch der Biowissenschaften. Sammelband zur Jahrestagung Münster 2000*, vdbiol München, 25-34
- Kück U., Jekosch K., Holzamer P. (2000):** DNA sequence analysis of the complete mitochondrial genome of the green alga *Scenedesmus obliquus*: evidence for UAG being a leucine and UCA being a non-sense codon. *Gene* 25, 253(1), 13-18
- Kuhse M.G., Strickland R., Palmer J.D. (1990):** An ancient group I intron shared by eubacteria and chloroplasts. *Science* 250, 1570-1573
- Kyung S.S. and Lawrence Fritz (2000):** Cell Ultrastructural changes correlate with circadian rhythms in *Pyrocystis lunula* (Pyrrophyta). *J. Phycology* 36, 351-358
- Laatsch T. (1997):** Molekulare Charakterisierung eines 40kb großen Bereiches im Plastidengenom von *Bryopsis plumosa* durch Klonierung, partielle Sequenzierung und Transkriptanalysen. Diplomarbeit, Universität Düsseldorf
- Lozupone C.A., Knight R.D., Landweber L.F. (2001):** The molecular basis of nuclear genetic code change in ciliates. *Curr. Biol.*, 11, 65-74

- Le Q.H., Markovic P., Hastings J.W., Jovine R.V.M., Morse D. (1997):** Structure and organization of the peridinin-chlorophyll *a*-binding protein gene in *Gonyaulax polyedra*. Mol. Gen. Genet. 255, 595-604
- Leible M.B., Berger S., Schweiger H.-G. (1989):** The plastome of *Acetabularia mediterranea* and *Batophora oerstedii* : Inter- and intraspecific variability and physical properties. Curr. Genet. 15, 355-361
- Lemieux C., Otis C., Turmel M. (2000):** Ancestral chloroplast genome in *Mesostigma viride* reveals an early branch of green plant evolution. Nature 403, 649-652
- Leon P., Walbot V., Bedinger P. (1989):** Molecular analysis of the linear 2,3kb plasmid of maize mitochondria: apparent capture of tRNA genes. Nuc. Acids Res. 17, 4089-4099
- Lewin B. (1996):** Gene V.
- Lockhart P.J., Howe C.J., Bryant D.A., Beanland T.J., Larkum A.W.D. (1992):** Substitutional bias confounds inference of cyanelle origins from sequence data. J. Mol. Evol. 34, 153-162
- Lockhardt P.J., Steel M.A., Hendy M.D., Penny D. (1994):** Recovering evolutionary trees under a more realistic model of sequence evolution. Mol. Biol. Evol. 11, 605-612
- Loeblich A.R. III (1965):** Dinoflagellate nomenclature. Taxon, 14(1),15-18.
- Loeblich A.R. (1976):** Dinoflagellate evolution: Speculation and Evidence. J. Protozool. 23 (1), 13-28
- Löffelhardt W. and Bohnert H.J.(1994):** Molecular biology of cyanelles. In: *The molecular biology of Cyanobacteria* (ed D.A. Bryant), Kluwer, Dordrecht, 56-89
- Löffelhardt W., Bohnert H.J., Bryant D.A.(1997):** The cyanellen of *Cyanophora paradoxa*. Critical Reviews in Plant Science. 16, 393-413.
- Ludwig M., Gibbs S.P. (1985):** DNA is present in the nucleomorph of cryptomonads: further evidence that the chloroplast evolved from a eukaryotic endosymbiont. Protoplasma 127, 9-20
- Ludwig M., Weizenegger D., Betzl D., Leidel E., Lenz T., Ludvigsen D., Möllenhoff D., Wenzig P., Schleifer K.H. (1990):** Complete nucleotide sequence of seven eubacterial genes coding for the elongation factor Tu: Functional, structural and phylogenetic evaluations. Arch. Microbiol. 153, 241-247
- Maier U.G., Rensing S.A., Igloi G.L., Maerz M. (1995):** Twintrons are not unique to the *Euglena* chloroplast genome: Structure and evolution of a plastome cpn60 gene from a cryptomonad. Mol. Gen. Genet. 246, 128-131

- Maier R.M., Neckermann K., Igloi G.L., Kössel H. (1995):** Complete sequence of maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. *J. Mol. Biol.* 251, 614-628
- Manhart J.R., Kelly K., Dudock B.S., Palmer J.D. (1989):** Unusual characteristics of *Codium fragile* chloroplast DNA revealed by physical and gene mapping. *Mol. Gen. Genet.* 216, 417-421
- Margulis L. (1981):** Symbiosis in cell evolution. Freeman, San Fransisco
- Martin W., Stoebe B., Goremykin V., Hansmann S., Hasegawa M., Kowallik K.V. (1998):** Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* 393, 162-165.
- Martin W., Herrmann R.G. (1998b):** Gene transfer from Organelles to nucleus: How much, what happens, and why?
- McFadden, G.I. (1991):** *In situ* hybridization techniques: molecular cytology goes ultrastructural. In: *Electron Microscopy of Plant Cells*. J.L. Hall and C.R. Hawes (eds), 219-255. Academic Press, London.
- McFadden G.I., Gilson P.R., Hofmann C.J.B., Adcock G.J., Maier U.G. (1994):** Evidence that an amoeba acquired a chloroplast by retaining part of an engulfed eucaryotic alga. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3690-3694
- Medlin L.K., Kooistra W.H.F., Potter D., Saunders G.W., Andersen R.A. (1997):** Phylogenetic relationship of the 'golden algae' (haptophytes, heterokont, chromophytes) and their plastids. *Plant Systematics and Evolution (Supplement)* 11, 187-219
- Melkonian M. (1996):** Phylogeny of photosynthetic protists and their plastids. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft* 89, 71-96
- Mereschkowsky C. (1905):** Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol. Centralb.* 25: 593-604
- Milligan B.C. (1989):** Purification of chloroplast DNA using Hexadecyltrimethylammonium bromide. *Plant Mol. Biol. Rep.* 7, 144-149
- Moore L.J. (1990):** The nature and extend of intraspecific variation in chloroplast DNAs of sexually isolated populations of *Pandorina morum*. Bory. Ph. D. Thesis, Brown University, USA
- Moran N.A. (1996):** Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2873-2878
- Morden C.W., Golden S.S. (1989):** psbA genes indicate common ancestry of prochlorophytes and chloroplasts. *Nature* 337, 382 - 384

- Morden C.W., Delwiche C.F., Kuhsel M., Palmer J.D. (1992):** Gene phylogenies and the endosymbiotic origin of plastids. *BioSystems* 28, 75-90
- Morden C.W., Golden S.S. (1991):** Sequence analysis and phylogenetic reconstruction of the genes encoding the large and small subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from the chlorophyll b-containing prokaryote *Prochlorothrix hollandica*. *J. Mol. Evol.* 32, 379-395
- Moreira D, Le Guyader H, Phillippe H. (2000):** The origin of red algae and the evolution of chloroplasts. *Nature* 405 (6782), 32-33
- Morse D., Salois P., Markovic P., Hastings J.W. (1995):** A nuclear-encoded form II RuBisCO in dinoflagellates. *Science* 268, 1622-1624
- Muller HJ (1964):** The relation of recombination to mutational advance. *Mut Res* 1, 2-9
- Murray M.G., Thompson W.F. (1980):** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8, 4321-4325
- Nayak B.B., Karunasagar I., Karunasagar I. (1997):** Influence of bacteria on growth and hemolysin production by the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Marine Biology* 130, 35-39
- Nitsch T. (1992):** Molekulare Charakterisierung des Plastidengenoms der siphonalen Grünalge *Bryopsis plumosa*. Diplomarbeit, Universität Düsseldorf
- Nitsch T. (1995):** Das Chloroplastengenom der siphonalen Grünalge *Bryopsis plumosa*, Klonierung und Sequenzierung phylogenetisch relevanter Bereiche, Inaugural-Dissertation Universität Düsseldorf
- Oakley B.R., Dodge J.D. (1976):** Mitosis and cytokinesis in the dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Cytobios.* 17(65), 35-46.
- Ohyama K., Fukuzawa H., Takayuki K., Shirai H., Sano T., Sano S., Umesono K., Shiki T., Takeuchi M., Chang Z., Shin-Ichi A., Inokuchi H., Ozeki H. (1986):** Chloroplast gene organization of *Marchantia polymorpha* chloroplast genome. I. Cloning and gene identification. *J. Mol. Biol.* 203, 281-298
- Ohyama K., Fukuzawa H., Kohchi T., Shirai H., Sano T., Sano S., Umesono K., Shiki Y., Takeuchi M., Chang Z., Aota S., Inokuchi H., Ozeki H. (1986b):** Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322, 572-574
- Palmer J.D., Thompson W.F. (1982):** Chloroplast DNA rearrangements are more frequent when a large inverted repeat sequence is lost. *Cell* 29, 537-550
- Palmer J.D. (1990):** Plastid chromosomes: Structure and evolution. In: The molecular biology of plastids Vol. 7 (Bogorad L., Vasil I.K., Hrsg.). In: Cell culture and somatic cell genetics in plants.

- Palmer J.D., (1991):** Plastid chromosomes: Structure and evolution. In: Cell culture and somatic cell genetics of plants, Vol. 7a: The molecular biology of plastids (Bogorad L., Vasil I.K., eds). Acad. Press, San Diego, 5-53
- Palmer J.D. (1992):** Green ancestry of malarial parasites? Mol. Evol. 2 (6), 318-320
- Palmer J.D. (1995):** Rubisco rules fall; gene transfer triumphs. Bioessays 17, 1005-1008
- Palmer J.D. (2000):** A single birth of all plastids? Nature 405 (6782), 32-33
- Parker R., Siliciano P.G., Guthrie C. (1987):** Recognition of the TACTAAC box during mRNA splicing in yeast involves base pairing to the U2-like snRNA. Cell 49, 229-239
- Peters N. (1929):** Orts- und Geisselbewegung bei marinen Dinoflagellaten. Arch. Protistenk. 67, 291-321
- Perez-Morga D.L., Englund P.T. (1993):** The attachment of minicircles to kinetoplast DNA networks during replication. Cell 74, 703-711
- Pfanzagl B., Zenker A., Pittenauer E., Allmaier G., Martinez-Torrecuadrada J., Schmid E.R., De Pedro M.A., Löffelhardt W. (1996):** J. Bacteriology 178 (2), 332-339
- Pring D.R., Tang H.V., Shaw L., Mullen J.A., Kempken F., Salazar R. (1993):** Mitochondrial DNA rearrangements and cytoplasmic male sterility in *Sorghum*. A. Brennicke, U. Kück (Hrsg.). Plant Mitochondria. VCH, Weinheim, 367-374
- Race H.L., Herrmann R.G., Martin W. (1999):** Why have organelles retained genomes? Trends Genet. 15, 364-370
- Raikov I.B. (1995):** The dinoflagellate nucleus and chromosomes: Mesokaryote concept reconsidered. Acta Protozoologica 34, 239-247
- Raven P.H. (1970):** A multiple origin for plastids and mitochondria. Science 169, 641-646
- Raven J.A., Johnson A.M., Parsons R., Kübler J.E. (1994a):** The influence of natural and experimental high O₂ concentrations on O₂-evolving phototrophs. Biol. Rev. 69, 61-94
- Raven J.A., Johnson A.M., Parsons R., Kübler J.E. (1994b):** The occurrence, and influence on photolithotrophs, of high O₂ concentrations. Proc. R. Soc. Edinb. 102B, 193-201
- Reith M. (1995):** Molecular biology rhodophyte and chromophyte plastids. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46, 549-575
- Reith M., Munholland J. (1995):** Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome. Plant Mol. Biol. Rep. 13, 320-326

- Rowan R, Whitney SM, Fowler A, Yellowlees D. (1996):** Rubisco in marine symbiotic dinoflagellates: form II enzymes in eukaryotic oxygenic phototrophs encoded by a nuclear multigene family. *Plant Cell* 8(3), 539-53
- Sala-Rovira M, Geraud ML, Caput D, Jacques F, Soyer-Gobillard MO, Vernet G, Herzog M. (1991):** Molecular cloning and immunolocalization of two variants of the major basic nuclear protein (HCC) from the histone-less eukaryote *Cryptocodinium cohnii* (Pyrrhophyta). *Chromosoma* 100(8), 510-8
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989):** Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory USA
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977):** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74, 5463-5467
- Sato S., Nakamura Y., Kaneko T., Asamizu E., Tabata S. (1999):** Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* 6, 283-290
- Schenk H.E.A. (1970):** Nachweis einer lysozymempfindlichen Stützmembran der Endocyanellen von *Cyanophora paradoxa* (Korschikoff). *Z. Naturforsch. Sect. B* 25, 656
- Schenk H.E.A. (1994):** Glaucocystophyta model for symbiogenous evolution of new eukaryotic species. *Evolutionary Pathways and Enigmatic Algae.* (ed.) J. Seckbach. 19-52
- Schildkraut C.L., Marmur J., Doty P. (1962):** Determination of the base composition of DNA from its buoyant density in CsCl. *J. Mol. Biol.* 4, 430-443
- Schimper A.F.W. (1883):** Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Bot. Z.* 41, 102-113
- Schmitz F. (1883):** Die Chromatophoren der Algen. Vergleichende Untersuchungen über Bau und Entwicklung der Chlorophyllkörner und analogen Farbkörper der Algen. *Verh. Nat. Ver. Preuss. Rheinlande und Westfalen* 40, 1-180
- Schnepf E., Elbrächter M. (1999):** Dinophyte chloroplasts and phylogeny- A review. *Grana* 38, 81-97
- Schreiber E. (1927):** Die Reinkultur von marinen Phytoplankton und deren Bedeutung für die Erforschung der Produktionsfähigkeit des Meerwassers. *Wiss. Meeresunters.* 16 (10), 2-35
- Schuster W., Brennicke A. (1994):** The plant mitochondrial genome: physical structure, information content, RNA editing, and gene migration to the nucleus. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 45, 61-78
- Schütt F. (1895):** Die Peridineen der Plankton-Expedition. *Ergeb. Plankton-Exped. Humboldt-Stiftung.* Bd. IV. M.a. , 1-170

- Schyns G., Rippka R., Namane A., Campbell D., Herdman M., Hounard J. (1997):** *Prochlorothrix hollandica* PCC 9006: genomic properties of an axenic representative of the chlorophyll a/b-containing oxyphotobacteria. Res. Microbiol. 148, 345-354
- Shinozaki K., Ohme M., Tanaka M., Wakasugi T., Hayashida N., Matsubayashi T., Zaita N., Chunwongse J., Obokata J., Yamagushi-Shinozaki K., Ohto C., Torozawa K., Meng B.Y., Sugita M., Deno H., Kamogashira T., Yamada K., Kusuda J., Takaiwa F., Kato A., Tohdoh N., Shimada H., Sugiura M. (1986):** The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: Its gene organization and expression. The EMBO J. 5, 2043-2049
- Sigee D.C. (1986):** The dinoflagellate chromosome. Adv. Botan. Res. 12, 205-264
- Sitte P. (1993):** Symbiogenetic evolution of complex cells and complex plastids. Eur. J. Protistol. 29, 131-143
- Southern E.M. (1975):** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517
- Soyer-Gobillard M.O., Herzog M. (1985):** The native structure of dinoflagellate chromosomes. Involvement of structural RNA. Europ. J. Cell Biol. 36, 334-342
- Soyer-Gobillard M.O., Geraud M.L., Coulaud D., Barray M., Theveny B., Revet B., Delain E. (1990):** Location of B- and Z-DNA in the chromosomes of a primitive eukaryote dinoflagellate. J Cell Biol 111(2),293-304
- Soyer-Gobillard M.O., Gillet B., Geraud M.L., Bhaud Y. (1999):** Dinoflagellate chromosome behaviour during stages of replication. Int Microbiol 2(2),93-102
- Stirewalt V., Mochalowski C.B., Löffelhardt W., Bohnert H.J., Bryant D.A (1995):** Nucleotide sequence of the cyanelle genome from *Cyanophora paradoxa*. Plant Mol. Biol. Rep. 13, 327-332
- Stöbe B. (1995):** Ursprung und molekulare Evolution der Chloroplasten der centralen Kieselalge *Odontella sinensis*. Inaugural-Dissertation, Universität Düsseldorf
- Stöbe B., Martin W., Kowallik K.V. (1998):** Distribution and nomenclature of protein-coding genes in 12 sequenced chloroplast genomes. Plant. Mol. Rep. 16, 234-255
- Stöbe B., Hansmann S., Goremykin V., Kowallik K.V., Martin W. (1999):** Proteins encoded in sequenced chloroplast genomes: an overview of gene content, phylogenetic information and endosymbiotic gene transfer to the nucleus. In: Molecular systematics and plant evolution. Hollingsworth PM, Batemen RM and Gornall RJ (eds), Taylor & Francis, London, 327-352
- Stöbe B., Kowallik K.V. (1999):** Gene-cluster analysis in chloroplast genomics. Trends Genet. (9), 344-7

- Stosch H.A. von (1967):** D. Dinophyta. In Ruhland H. (ed.), Handbuch der Pflanzenphysiologie, 18, Springer-Verlag, Berlin 18, 626-636
- Sugiura M. (1992):** The chloroplast genome. Plant Mol Biol. 1992 May;19(1):149-68. Review.
- Sukhanova I.N., (1973):** Vertical distribution of some peridiniums in the equatorial Pacific. In Vinogradov, M.E.[Ed.] *Life Activity of Pelagic Communities in the Ocean Tropics* [Trans. from Russian]. Israeli Progr. Sci. Transl., Jerusalem, 210-217
- Swift E., and Remsen C.C. (1970):** The cell wall of *Pyrocystis* spp. (Dinococcales). J. Phycology 6, 79-85
- Swift E., and Taylor W.R. (1967):** Bioluminescence and chloroplast movement in the dinoflagellate *Pyrocystis lunula*. J. Phycology 3, 77-81
- Takami H. (1999):** Genome analysis of facultatively alkaliphilic *Bacillus halodurans* C-125. Extremophiles in deep-sea environments, 249-284
- Tang E.P.Y. (1996):** Why do dinoflagellates have lower growth rates? J. Phycol. 32, 80-84
- Taylor D.L. (1971):** Taxonomy of some common *Amphidinium* species. Br. Phycol. J. 6 (2), 129-133
- Taylor F.J.R. (1987):** The biology of dinoflagellates. Blackwell Scientific Publications. Oxford London Edinburgh Boston Palo Alto Melbourne
- Taylor G.W., Wolfe K.H., Morden C.W., dePamphilis C.W., Palmer J.D. (1991):** Lack of a functional plastid tRNA(Cys) gene is associated with loss of photosynthesis in a lineage of parasitic plants. Curr. Genet. 20 (6), 515-518
- Tomas R.N., Cox E.R., Steidinger K.A. (1973):** *Peridinium balticum* (Levander) Lemmermann, an unusual dinoflagellate with a mesokaryotic and an eukaryotic nucleus. J. Phycol. 9, 91-98
- Trench R.K. (1987):** Dinoflagellates in non-parasitic symbioses. In Botanical Monographs 21, The Biology of Dinoflagellates, F.J.R. Taylor, ed (Oxford: Blackwell), 530-570
- Tu C.-J., Schuenemann D., Hoffman N.E. (1999):** Chloroplast FtsY, chloroplast signal recognition particle, and GTP are required to reconstitute the soluble phase of light-harvesting chlorophyll protein transport into thylakoid membranes. J Biol Chem 274, (38), 27219-27224
- Turmel M., Bellemare G., Lee R.W., Lemieux C. (1986):** A linear DNA molecule of 5,9 kilobase-pairs is highly homologous to the chloroplast DNA in the green alga *Chlamydomonas moewusii*. Plant Mol. Biol. 6, 313-319

- Turmel M., Gutell R.R., Mercier J.-P., Otis C., Lemieux C. (1993):** Analysis of the chloroplast large subunit ribosomal RNA gene from 17 *Chlamydomonas* taxa. Three internal transcribed spacers and 12 group I intron insertion sites. *J. Mol. Biol.* 232, 446-467
- Turmel M., Otis C., Lemieux C. (1996):** Evolution of the chloroplast genome in green algae. Abstr. SV-2.02 Annu. Meeting German Bot. Soc. Düsseldorf
- Turmel M., Otis C., Lemieux C. (1999):** The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Nephroselmis olivacea*: insights into the architecture of ancestral chloroplast genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10248-10253
- Tymms M.J., Schweiger H.G. (1985):** Tandemly repeated nonribosomal DNA sequences in the chloroplast genome of an *Acetabularia mediterranea* strain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1706-1710
- Tymms M.J., Schweiger H.G. (1989):** Significant differences between the chloroplast genomes of two *Acetabularia mediterranea* strains. *Mol. Gen. Genet.* 219, 199-203
- van den Hoek C., Mann D.G., Jahns H.M. (1995):** Algae. An introduction to phycology. Cambridge University Press
- Wakasugi T., Tzudzuki J., Ito S., Kakashima K., Tzudzuki T., Sugiura M. (1994):** Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9794- 9798
- Wakasugi T., Nagai T., Kapoor M., Sugita M., Ito M., Ito S., Tzudzuki J., Nakashima K., Tsudzuki T., Suzuki Y., Hamada A., Ohta T., Inamura A., Yoshinaga K., Sugiura M. (1997):** Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: The existence of genes possibly involved in chloroplast division. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5967-5972
- Wakasugi T., Sugita M., Tsudzuki T., Sugiura M. (1998):** Updated gene map of tobacco chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol. Rep* 16, 231-241
- Watanabe K.I., Bessho Y., Kawasaki M., Hori H. (1999):** Mitochondrial genes are found on minicircle DNA molecules in the mesozoan animal *Dicyema*. *J. Mol. Biol.*, 286, 645-650
- Whatley J.M., John P., Whatley F.R. (1979):** From extracellular to intracellular: the establishment of mitochondria and chloroplasts. *Proc. R. Soc. Lond.* 204, 165-187
- Whitney S.M., Yellowlees D. (1995):** Preliminary investigations into the structure and activity of ribulose biphosphate carboxylase from two photosynthetic dinoflagellates. *J. Phycol.* 31, 138-146
- Whitney S.M., Shaw D.C., Yellowlees D. (1995):** Evidence that some dinoflagellates contain a ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase related to that of the α -proteobacteria. *Proc. R. Soc. Lond.* 259, 271-275

Wilson (1902): The cellule

Wilson R.J.M., Paul W.D., Preiser P.R., Rangachari K., Roberts K., Roy A., Whyte A.,

Strath M., Moore D.J., Moore P.W., Williamson D.H. (1996): Complete Gene Map of the Plastid-like DNA of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. J. Mol. Biol. 261, 155-172

Winnacker E.L. (1985): Gene und Klone: Eine Einführung in die Gentechnologie. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim

Wolfe K.H., Li W-H, Sharp P. (1987): Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 9054-9058

Xu M.-Q., Kathe S.D., Goodrich-Blair H., Nierzwicki-Bauer S.A., Shub D.A. (1990): Bacterial origin of a chloroplast intron: Conserved self-splicing group I introns in cyanobacteria. Science 250, 1566- 1569

Yamada T., Higashiyama T. (1993): Characterization of the terminal inverted repeats and their neighboring tandem repeats in the *Chlorella* CVK1 virus genome. Mol. Gen. Genet. 241, 554-563

Zhang Z, Green BR, Cavalier-Smith T. (1999): Single gene circles in dinoflagellate chloroplast genomes. Nature. 400 (6740):155-9.

Zhang Z, Green BR, Cavalier-Smith T. (2000): Phylogeny of ultra-rapidly evolving dinoflagellate chloroplast genes: a possible common origin for sporozoan and dinoflagellate plastids. J Mol Evol. 51(1):26-40

Anhang

Primer für die Gewinnung homologer Sonden

petB

9-68 rgt wgc wac igg itt tgc aat gac
 9-69 ggi acw gci kci ggw acw cci g

psaA

9-70 cta aca aci tct tgg cat gct ca
 9-71 gcw ama cca acw gcw cga ccy tg

psaB

9-72 tci ggi gta tac caw tgg tgg ta
 9-73 tar gaa cat aaa icc wgt igc cca

psbA

9-74 tgg yta tac aay ggt ggt cct ta
 9-75 agc acg gtt rat rat rtc wgc cca

psbB

9-76 atc cia tgt ggc gic aag gia tg
 9-77 gca tgi cca aaw gtr wac car cc

psbC

9-78 cay gci ggi wta ati gtw tty tgg
 9-79 iga icc iaa tgg igc atg igt ca

psbD

9-80 tgt iac wtc wtg gta tac ica tgg
 9-81 tta aag rgc gtt tcc acg kgg ta

***Pyrocystis lunula* psbC-Zirkel** (Komplett bis auf Zirka 250bp)

1	TTG TGA ATT AGA AGT AAT AGT AAA CAT CGT TTT ATT CGT TGT AAG	46
47	GAA GAA TAA TAG CGG TAG CTA TAT TAT TCG ACT GGA ATT AGA ATA	91
92	AAA CTA TAT TAT AAA CTA ATC CTG TAT AAA GAA AGA AAT TAA AAA	136
137	TAA AGA AAG AAA GTA CCA ACC ACT GCT TTG CTC TAT CCA CCA TGG	181
182	AAA CAG CCC AAC AAA ATA ACC CAA AAC CAT CGA AAT CAC CAA CAA	226
227	ACA GCA TAA AGC TTG ACC TAT ACC TGA ATA GAG CTA TGA ACT TCA	271
272	GCT TAA ACC ATA ACA TCT TCA AGT AGC AAG AGA TGC ATA CTT GAT	316
317	TAC TAC TTC ATC ACC ACT GAT TAA TAG TCA ACC AAC AAC CAT CTC	361
362	CAC CAT GGA AAT GGA CCA ACA GAA ATT AGT AAA TTA CTT ATT GAA	406
407	ATT GTC CAT TTC TCT GCA GCA ACT TTT ACT TTA AAT TTA TAG CGT	451
452	TTC ACT ATT TCA TTT CAT GGT TAA GCA AAG CTT CAT CTC TAC AGC	496

PsbC

Insertion

2702	GCA	CAC	TTA	TCA	GTG	ATA	GGT	TGT	GCT	TCT	TTG	TTA	TTA	TTT	TGT	2746
153	A	H	L	S	V	I	G	C	A	S	L	L	L	F	C	167
2747	AAA	GCT	TTG	TAT	TTT	GAT	GGC	CTG	TAT	GAT	ACA	TGG	TCA	TCA	GGT	2791
168	K	A	L	Y	F	D	G	L	Y	D	T	W	S	S	G	182
2792	GGT	GGT	GAT	ATT	AGA	CTA	GTT	AAG	TAT	AGC	TCT	ATC	TGT	TTA	AAT	2836
183	G	G	D	I	R	L	V	K	Y	S	S	I	C	L	N	197
2837	CCG	TAT	ACT	CTT	GGT	AGA	TAC	TTA	CTA	AAA	GCT	CCT	TTT	GGT	TCA	2881
198	P	Y	T	L	G	R	Y	L	L	K	A	P	F	G	S	212
2882	GAT	GGA	TGG	ATT	GTT	AGT	GTG	AAT	AAC	TTG	GAA	GAT	ATT	GTT	GGT	2926
213	D	G	W	I	V	S	V	N	N	L	E	D	I	V	G	227
2927	GGT	CAT	TAT	TGG	GTT	GGT	CTT	TAC	TTA	TTT	GAA	GGT	TGT	ATA	TGG	2971
228	G	H	Y	W	V	G	L	Y	L	F	E	G	C	I	W	242
2972	CAC	TTA	CAA	ACA	AGA	CCT	TTC	AGT	TAT	GTT	GTA	AGA	GGT	TAT	ATA	3016
243	H	L	Q	T	R	P	F	S	Y	V	V	R	G	Y	I	257
3017	TGG	TCA	AGT	GAA	GCT	TAC	TTA	TCT	TAT	AGT	CTT	GTA	TCT	TTA	TCT	3061
258	W	S	S	E	A	Y	L	S	Y	S	L	V	S	L	S	272
3062	GTT	TGT	GGT	TTT	ATA	GCA	GCT	ACC	TAT	TCA	TGG	TAC	AAT	AAT	ACA	3106
273	V	C	G	F	I	A	A	T	Y	S	W	Y	N	N	T	287
3107	GCT	TAT	CCA	AGT	GAA	TTA	ATA	CGA	CCA	ACT	GGT	CCA	GAA	GCA	TCT	3151
288	A	Y	P	S	E	L	I	R	P	T	G	P	E	A	S	302
3152	CAA	GCA	CAA	GGG	TTT	ACA	TTT	CTA	ATA	CGT	GAT	CAA	AGG	TTA	GGT	3196
303	Q	A	Q	G	F	T	F	L	I	R	D	Q	R	L	G	317
3197	ATC	AGA	TTA	GAG	ACC	ACA	CAA	GGT	CCA	ACA	TCT	TTA	GGT	AAA	TAT	3241
318	I	R	L	E	T	T	Q	G	P	T	S	L	G	K	Y	332
3242	TTG	ATG	AGA	TCT	CCA	ACA	GGT	GAA	GTT	ATA	TTT	GGT	GGT	GAA	ACT	3286
333	L	M	R	S	P	T	G	E	V	I	F	G	G	E	T	347
3287	ATG	AGG	TTT	TGG	TCT	ATG	CAA	GGA	TGT	TGG	GTT	GAA	CCT	TTA	CGT	3331
348	M	R	F	W	S	M	Q	G	C	W	V	E	P	L	R	362
3332	ACA	GCA	CTA	GGT	TTA	GAT	ATT	TAC	AAG	ATT	AGA	TAT	GAT	ATA	CAG	3376
363	T	A	L	G	L	D	I	Y	K	I	R	Y	D	I	Q	377
3377	TCT	TGG	CAA	GAA	AGA	AGA	GCA	GCT	GAA	TAT	ATG	ACC	CAT	GCA	CCT	3421
378	S	W	Q	E	R	R	A	A	E	Y	M	T	H	A	P	392
3422	CTA	GGA	AGT	TTA	AAT	TCT	GTT	GGT	GGT	GTT	GCT	ACA	GAG	ATA	AAT	3466
393	L	G	S	L	N	S	V	G	G	V	A	T	E	I	N	407
3467	TCA	ATT	AAT	TAT	GTT	TCA	CCT	AGA	TCT	TGG	TTA	ACT	TGT	TGG	CAT	3511
408	S	I	N	Y	V	S	P	R	S	W	L	T	C	W	H	422
3512	TGG	ATA	TTA	AGT	TAT	TTC	ATG	CTT	ATA	GGT	CAT	TGG	TGG	CAT	GGT	3556
423	W	I	L	S	Y	F	M	L	I	G	H	W	W	H	G	437
3557	GGT	AGA	TCT	AGA	TCA	GCT	TCA	CAA	TCA	AGT	GAG	CGT	GGT	TTA	TCA	3601
438	G	R	S	R	S	A	S	Q	S	S	E	R	G	L	S	452
3602	AGG	AGT	TAT	GAA	CCT	GTG	CTT	TTC	ATG	AAG	GAC	ATA	AGT	TAA	TAT	3646
453	R	S	Y	E	P	V	L	F	M	K	D	I	S			
3647	CAA	GCC	ATA	GCT	CTA	AGT	ATA	GAG	CAT	TAT	AGT	GAT	GGT	TCA		3691
3692	TAG	CTT	ATG	ATT	GAT	AAT	CAC	AGG	TTA	ATT	GTA	TAT	GTC	ATT	CAC	3736
3737	TAC	TAA	GAG	TTG	TAA	CAT	TGG	TTA	TAA	GAT	TGG	TTA	TAA	CAT	TCA	3781
3782	TTC	ATA	GTT	TAT	ATT	TCA	GGT	ATA	GGT	CAA	GCT	TTA	TTA	CTA	AGG	3826
3827	CTT	GAC	TAT	TAT	TCA	TTC	TTG	AAT	ACA	CAG	ATA	AGG	CTT	GAC	TAT	3871
3872	TCA	CAG	CTC	TGC	TTA	GTA	ATC	AAG	CAT	TAC	ATC	TTA	CAA	GCA	TTA	3916
3917	CAT	CTT	AAT	CAG	GTA	TAG	GTC	AAG	CTT	TAT	TAC	TAA	GGC	TTG	ACT	3961
3962	ATT	ATT	CAT	TCT	TGA	ATT	ACA	CAG	ATA	AGG	CTT	GAC	TAT	TCA	CAG	4006
4007	CTC	TGC	TTA	GTA	ATC	AAG	CAT	TAC	ATC	TTA	ATC	AGG	TAT	AGG	TCA	4051
4052	AGC	TTT	ATT	ACT	AAG	GCT	TGA	CTA	TTC	ATT	TAT	AGT	GAA	GGT	TAG	4096
4097	ATA	TCT	TCA	AGT	ACA	GGT	TAT	AGA	ACA	TTC	AGT	TTA	TAA	TTT	TCT	4141
4142	TGC	ATT	ACA	TAT	TCA	AGC	ATG	AGA	GAT	GAA	ATA	ATA	GAT	GAA	ATG	4186
4187	CTT	GAC	TAT	TCA	AGC	TAT	TTC	TAG	AAT	GGT	TCC	ATT	TCA	TCT	CTA	4231
4232	AAT	TTG	TTC	CAA	TGT	CCA	ATT	CAC	TTG	GGC	TGT	TTC	CAT	GGG	TAA	4276
4277	ATG	AGA	AAT	ATA	TAC	CTA	TTT	ATA	CAA	AAG	TAA	GGG	TAT	ATA	TGG	4321
4322	ATA	TTA	TTC	ATT	TCA	GAG	GTA	GTT	TGG	AGG	TAT	ATT	CCA	AGA	GGA	4366

PsbC

4367	ATA	CCC	AAC	AAA	AGG	TGC	AAT	ATT	GCC	ATA	TGC	TCT	ATT	TAT	AGC	4411
4412	TCT	ATT	TTG	GGT	ATT	TAT	TTA	TCT	TCA	AAT	TAG	AGA	TAT	CGT	GCT	4456
4457	TGA	TTA	TGA	ATG	AAT	CTT	GAT	GAT	TCA	GCT	GTT	ATT	CTA	TTT	CTA	4501
4502	GAT	GTC	CAA	AGG	TCT	CCA	AAA	CAG	AAA	AGT	GCA	TTG	CCG	ATT	TAT	4546
4547	TTA	AGG	TAG	ATT	TTA	CTG	CGG	TAA	ATT	GGT	ATT	TTT	TCA	ATA	AGT	4591
4592	AAT	TAG	AGT	AGA	TTT	TAC	CGC	AGA	GAA	ATG	GAC	AAT	TTC	AAT	AAG	4636
4637	TAA	TTT	ACT	CAT	CTC	TTC	AAG	TGT	TAA	GCA	GTG	GTG	CTT	TAT	GGT	4681
4682	TGT	TGG	TTG	ACT	ATT	AAT	CAG	TGG	TTA	GTA	CAG	GTA	TAG	GTT	GTG	4726
4727	TAT	AAC	TCA	GGT	ATA	GGT	CAA	GCT	TTA	TAG	TTT	TAG	CTT	GTA	CCA	4771
4772	GAC	CAC	CAA	ACA	GAA	AAG	TGC	ATT	GCC	GAT	TTA	TTT	AAG	GTA	GAT	4816
4817	TTT	ACT	GCG	GTA	AAT	TGG	TAT	TTT	TCA	ATA	AGT	AAT	TTG	TTC	CAG	4861
4862		TTT	AAG	GTA	ACT	TTT	GCT	GCA								

***Pyrocystis lunula* PsbA**

Primer 9-74 →

1	TGG	TTA	TAC	AAT	GGT	GGT	CCT	TAT	CAA	TTT	ATT	GTA	TTT	CAT	TTT	45
	W	L	Y	N	G	G	P	Y	Q	F	I	V	F	H	F	
46	ATA	TTT	GGT	GTA	TCT	TCT	TGG	ATG	GGA	AGA	GAG	CGG	GAG	TTT	AGT	90
	I	F	G	V	S	S	W	M	G	R	E	R	E	F	S	8
91	TTT	AGA	TTG	GGA	ATG	AGA	GCT	TGG	ATA	TTT	ATT	GCT	TTC	TCA	GCA	135
9	F	R	L	G	M	R	A	W	I	F	I	A	F	S	A	23
136	CCT	GTT	GTA	GCA	GCT	ACA	GCT	GTA	TTT	ATA	TTT	TAT	CCT	ATT	GGT	180
24	P	V	V	A	A	T	A	V	F	I	F	Y	P	I	G	38
181	CAA	GGT	AGT	TTC	TCT	GAT	GGT	ATG	CCA	CTT	GGA	ATT	AGT	GGT	ACA	225
39	Q	G	S	F	S	D	G	M	P	L	G	I	S	G	T	53
226	TTT	AAC	TTC	ATG	TTA	GTA	TTT	CAA	GCT	GAA	CAT	AAC	ATA	CTT	ATG	270
54	F	N	F	M	L	V	F	Q	A	E	H	N	I	L	M	68
271	CAC	CCT	TTT	CAT	ATA	TTA	AGA	GTT	GCA	GGA	GTA	TTT	GGA	GGT	TCT	315
69	H	P	F	H	I	L	R	V	A	G	V	F	G	G	S	83
316	TTC	TTT	AGT	GCC	ATG	CAT	GGT	TCT	CTG	GTC	ACT	TCT	TCT	TTA	CTA	360
84	F	F	S	A	M	H	G	S	L	V	T	S	S	L	L	98
361	GTT	GAA	AGT	CAA	GCT	GAT	ATA	TCT	TTA	AAC	ACA	GGT	TAT	AGA	TTT	405
99	V	E	S	Q	A	D	I	S	L	N	T	G	Y	R	F	113
406	GGT	CAA	GAA	TAT	GTT	TCC	TAT	AGT	ATA	TCA	GCT	GCT	CAT	GGT	TAT	450
114	G	Q	E	Y	V	S	Y	S	I	S	A	A	H	G	Y	128
451	TTT	GGT	AGA	CTT	ATT	TTC	CAG	TAT	GCT	AGT	TTC	AAT	AAC	TCT	CGC	495
129	F	G	R	L	I	F	Q	Y	A	S	F	N	N	S	R	143
496	AGC	CTT	CAT	TTC	TTC	TTA	GCT	TCA	TGG	CCT	GTA	ATA	GGA	ATA	TGG	540
144	S	L	H	F	F	L	A	S	W	P	V	I	G	I	W	158
541	TGC	ACA	TCA	TTA	GGT	GTA	GGT	ACA	ATG	GCT	TTA	TTA	AAT	GGT	TTG	585
159	C	T	S	L	G	V	G	T	M	A	L	L	N	G	L	173
586	AAC	TTT	AAT	ATT	TCT	ATA	GTA	GAC	TCT	AAA	GGT	CAT	ATG	CTT	GGA	630
174	N	F	N	I	S	I	V	D	S	K	G	H	M	L	G	188
631	TCA	TGG	GCA	GAC	ATC	ATT	AAC	CGT	GCT	657						
189	S	W	A	D	I	I	N	R	A							

← Primer 9-75

Pyrocystis lunula Rpl28/33, ORF57 und FtsY

TCTAGAATATGTCAATTAAGTGGTAAGCGCCCGATTACGGGAAATAATGTGTCTCACTCT
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 AGATCTTATACAGTTAATTGACCATTTCGCGGGCTAATGCCCTTTATTACACAGAGTGAGA

a **S R I C Q L T G K R P I T G N N V S H S -** **Rpl28**
b L E Y V N * L V S A R L R E I M C L T L -
c * N M S I N W * A P D Y G K * C V S L * -

AATCGTAAGACCAAGCGACGTTTTTTTGCCTCACTTGTTCAAAAAGCGTTTCTTCATTCCT
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 TTAGCATTCTGGTTCGCTGCAAAAAACGGGTGAACAAGTTTTTCGCAAGAAGTAAGGA

a **N R K T K R R F L P N L F K K R F F I P -**
b I V R P S D V F C P T C S K S V S S F L -
c S * D Q A T F F A Q L V Q K A F L H S * -

GAAACTGAAGAATGGGTAACATTGAAAGTTTCTTCTACTGCGCTTCGTAACATCAACAAA
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 CTTTGACTTCTTACCCATTGTAACCTTCAAAGAAGATGACGCGAAGCATTGTAGTTGTTT

a **E T E E W V T L K V S S T A L R N I N K -**
b K L K N G * H * K F L L L R F V T S T N -
c N * R M G N I E S F F Y C A S * H Q Q T -

CTAGGTATCTACGCTTACCTCAAGAAATTGGAGCGTAAAGGAGTAGACACTGGTGTAA
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 GATCCATAGATGCGAATGGAGTTCTTTAACCTCGCATTTCCTCATCTGTGACCACAATTT

a **L G I Y A Y L K K L E R K G V D T G V K -**
b * V S T L T S R N W S V K E * T L V L N -
c R Y L R L P Q E I G A * R S R H W C * I -

TTGTAATTCGATCATTTTTTAAGTTAGCAATATCATGGCAAAGAAAAGTAAAGGAAATCGT
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 AACATTAAGCTAGTAAAAATTCAATCGTTATAGTACCGTTTCTTTTCATTTCTTTAGCA

a **L * F D H F * V S N I M A K K S K G N R -** **Rpl33**
b C N S I I F K L A I S W Q R K V K E I V -
c V I R S F L S * Q Y H G K E K * R K S S -

CTCCAGGTTATTATGGAATGTACTGAGCATAAAGCATCTGGTATGCCTGGCACTTCCCGT
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 GAGGTCCAATAATACCTTACATGACTCGTATTTTCGTAGACCATACGGACCGTGAAGGGCA

a **L Q V I M E C T E H K A S G M P G T S R -**
b S R L L W N V L S I K H L V C L A L P V -
c P G Y Y G M Y * A * S I W Y A W H F P L -

TATGTGACGCAAAAGAACAGGAAGAATACGCCTGATAGATTAGAATTAAAGAAATTCAT
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 ATACACTGCGTTTTCTTGTCTTCTTATGCGGACTATCTAATCTTAATTTCTTTAAGTTA

a **Y V T Q K N R K N T P D R L E L K K F N -**
b M * R K R T G R I R L I D * N * R N S I -

```

c      C D A K E Q E E Y A * * I R I K E I Q S -
      CCTATACTTAAGCGTGTAAACGATACATAGAGAAATCAAGTAAGTTGACCTCCACTTGCTT
421  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
      GGATATGAATTCGCACATTGCTATGTATCTCTTTAGTTTCATTCAACTGGAGGTGAACGAA

a      P I L K R V T I H R E I K * V D L H L L -
b      L Y L S V * R Y I E K S S K L T S T C F -
c      Y T * A C N D T * R N Q V S * P P L A L -

      TATATAGTGGATATGCTTATTTTTGGTTTTCTTATATCAGCTTCACGTTTAAATTTTAA
481  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
      ATATATCACCTATACGAATAAAAAACCAAAGAATATAGTCGAAGTGCAAATTTTAAATTT

a      Y I V D M L I F G F L I S A S R L K F * -
b      I * W I C L F L V F L Y Q L H V * N F N -
c      Y S G Y A Y F W F S Y I S F T F K I L I -

      TATTATGGCAAAGGTATCAAAGAACGCAAGGGTGGCCCAACGTAAGGCGAATGCTGGTTC
541  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
      ATAATACCGTTTCCATAGTTTCTTGC GTTCCCACCGGGTGCATTCCGCTTACGACCAAG

a      Y Y G K G I K E R K G G P T * G E C W F -
b      I M A K V S K N A R V A Q R K A N A G S -
c      L W Q R Y Q R T Q G W P N V R R M L V R -

      GGGTCGTGACTTCGTGAAAAGTCGTGCAAAGCGTAAAAAATCCTAAAACGGGTACTTATTC
601  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
      CCCAGCACTGAAGCACTTTCAGCACGTTTCGCATTTTTTAGGATTTTGCCCATGAATAAG

a      G S * L R E S R A K R K K S * N G Y L F -
b      G R D F V K V V Q S V K N P K T G T Y S -
c      V V T S * K S C K A * K I L K R V L I L -

      TTACAAAAGAGGTAATGATCCATAAGGATAAAGTGAAAGCATTTTTGGCGAAGAAATAATG
661  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
      AATGTTTCTCCATTACTAGGTATTCTTCTTCTTCTCGTAAAAACCGCTTCTTTATTAC

a      L Q R G N D P * G * S E S I F G E E I M -
b      Y K E V M I H K D K V K A F L A K K * C -
c      T K R * * S I R I K * K H F W R R N N A -

Terminations-Struktur
      CCAGAAATGATATTCAGCCCCCAAAGAGGCTTTTCTCAAGAAGGAAAGCCTCTTTGTGCA
721  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
      GGTCTTTACTATAAGTCGGGGGTTTCTCCGAAAAGAGTTCTTCTTTCGGAGAAACACGT

a      P E M I F S P Q R G F S Q E G K P L C A -
b      Q K * Y S A P K E A F L K K E S L F V H -
c      R N D I Q P P K R L F S R R K A S L C I -

      TTTGTAGATATCTGATGGGATTACCAATTAGCTATCCTCTTCGGATGGTTCTTCTAATC
781  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
      AAACATCTATAGACTACCCTAAGTGGTTAATCGATAGGAGAAGCCTACCAAGAAGATTAG

a      F V D I * W D S P I S Y P L R M V L L I -
b      L * I S D G I H Q L A I L F G W F F * S -
c      C R Y L M G F T N * L S S S D G S S N H -

```

```

      ACTTTGGCCTTGTTTATCCTATCATCAATACTGAAACAGGAGACTAGAAATTGGATTTT
841  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
      TGAAACCGGAACAAATAGGATAGTAGTTATGACTTTGTCCTCTGATCTTTAACCTAAAA

a      T L A L F I L S S I L K Q E T R N W I F -
b      L W P C L S Y H Q Y * N R R L E I G F F -
c      F G L V Y P I I N T E T G D * K L D F F -

      TTTAAGTAGGGCACCTTTTCCGACTTCCGATTTTTCTCTTCCGACTTCTGCATAATCAAT
901  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
      AAATTCATCCCGTGAAAAAGGCTGAAGGCTAAAAAGAGAAGGCTGAAGACGTATTAGTTA

a      F K * G T F S D F R F F S S D F C I I N -
b      L S R A P F P T S D F S L P T S A * S I -
c      * V G H L F R L P I F L F R L L H N Q S -
f      K * T P C R K R S G I K R K R S R C L * -

      CATCGCTATGAGTTTTTTCTCGAAATTTTTCAACAAAGAAAAGAAAGAAGACCTCGATAA
961  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
      GTAGCGATACTCAAAAAAGAGCTTTAAAAAGTTGTTTCTTTTCTTCTCTGAGCTATT

a      H R Y E F F L E I F Q Q R K E R R P R * -
b      I A M S F F S K F F N K E K K E D L D K - FtsY
c      S L * V F S R N F S T K K R K K T S I K -

      AGGCTTAGAAAAGACTAAAAGTAGTTTTCTAGGAAAGTTGTCTAAAGCCATCGCCGGCAA
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
      TCCGAATCTTTTCTGATTTTGATCAAAAGATCCTTTCAACAGATTTCGGTAGCGGCCGTT

a      R L R K D * N * F S R K V V * S H R R Q -
b      G L E K T K T S F L G K L S K A I A G K -
c      A * K R L K L V F * E S C L K P S P A N -

      ATCCACTGTCGATATCGAAGTTCTTGATGAATTAGAGAATATCTTGGTCTCTTCTGATGT
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
      TAGGTGACAGCTATAGCTTCAAGAACTACTTAATCTCTTATAGAACCAGAGAAGACTACA

a      I H C R Y R S S * * I R E Y L G L F * C -
b      S T V D I E V L D E L E N I L V S S D V -
c      P L S I S K F L M N * R I S W S L L M * -

      AGGTCTAGA
1141 ----- 1149
      TCCAGATCT

a      R S R -
b      G L -
c      V * -

```

***Pyrocystis lunula* CoxI**

1	GGA	TCT	TAT	TAT	CTA	ACA	TTA	AAG	ACT	ATG	CCA	TTA	TTC	CCT	TGG	45
	G	S	Y	Y	L	T	L	K	T	M	P	L	F	P	W	6
46	GCT	CTC	TTT	ATT	ACA	GGA	GGA	ATG	CTT	TTA	TTA	ACA	TTA	CCA	ATC	90
7	A	L	F	I	T	G	G	M	L	L	L	T	L	P	I	21
91	TTA	TCA	GGA	GCT	TTT	CTA	ATG	GTC	TTT	GCT	GAT	CTT	CAT	TCT	AAT	135
22	L	S	G	A	F	L	M	V	F	A	D	L	H	S	N	36
136	ACA	CTT	TTC	TTT	GAT	TCA	ATC	TTT	GGA	GGA	GAT	CCT	ATT	TTC	TAT	180
37	T	L	F	F	D	S	I	F	G	G	D	P	I	F	Y	51
181	CAA	CAC	TTA	TTT	TGG	TTT	TTT	GGA	CAT	CCA	GAA	GTT	TAC	ATC	TTA	225
52	Q	H	L	F	W	F	F	G	H	P	E	V	Y	I	L	66
226	ATA	ATT	CCT	GCT	TTT	GGG	ATC	ATT	AGC	ATA	ATA	ATT	TCT	GGA	ATT	270
67	I	I	P	A	F	G	I	I	S	I	I	I	S	G	I	81
271	TTA	CAA	ATA	ATA	ATC	TTT	GGG	AAC	CAA	TCA	ATG	ATC	TTT	GCC	ATG	315
82	L	Q	I	I	I	F	G	N	Q	S	M	I	F	A	M	96
316	AGC	TGT	ATT	TCT	CTT	CTA	GGA	ACT	GTT	GTT	TGG	GGA	CAT	CAT	ATG	360
97	S	C	I	S	L	L	G	T	V	V	W	G	H	H	M	111
361	TAT	ACT	GTA	GGT	TTA	GAA	ACT	GAT	ACA	AGA	GGT	TAT	ATT	ACA	GGA	405
112	Y	T	V	G	L	E	T	D	T	R	G	Y	I	T	G	126
406	GTT	ACA	ATC	TTG	ATA	TCT	TTA	CCG	ACT	GGT	ACA	AAA	ATC	TTT	AAT	450
127	V	T	I	L	I	S	L	P	T	G	T	K	I	F	N	141
451	TGG	TTA	AGC	ACA	TAT	CTT	GGG	AAT	CCG	CCA	TTG	TTA	CAC	CTC	AAA	495
142	W	L	S	T	Y	L	G	N	P	P	L	L	H	L	K	156
496	ACC	AAT	TCA	GCA	TTT	TTT	GGA	CTT	CTC	TTT	TTA	TTA	ATG	TTT	ACT	540
157	T	N	S	A	F	F	G	L	L	F	L	L	M	F	T	171
541	ATA	GGT	GGC	TCA	ACA	GGA	ATA	ATT	CTT	GGA	AAT	GCT	TTT	GTT	GAG	585
172	I	G	G	S	T	G	I	I	L	G	N	A	F	V	E	186
586	TTA	AAT	CTT	GTT	TTT	GAA	TAT	GTC	TGG	AAA	GGA	ATT	ATA	TTA	TTA	630
187	L	N	L	V	F	E	Y	V	W	K	G	I	I	L	L	201
631	ATC	TTC	CAA	TTG	TCA	CTT	CTT	TCT	TCT	CTT	TGG	AAA	TCC	TTT	GGA	675
202	I	F	Q	L	S	L	L	S	S	L	W	K	S	F	G	216
676	AAT	CTT	TTT	GTT	AAT	AAT	TTT	ATC	TAT	TTT	CTA	TTT	TCA	TTC	AAA	720
217	N	L	F	V	N	N	F	I	Y	F	L	F	S	F	K	231
721	TAT	AAT	TAT	GGA	AGA	TAT	CTA	CAA	TTT	AAT	TAA	AAT	AAT	AAT	CTT	765
232	Y	N	Y	G	R	Y	L	Q	F	N						
766	CTA	CAC	TTG	GAT	CAT	CTG	GAA	TGC	CAT	TTC	AAT	TAA	GGT	TTC	TAA	810
811	AGG	ACT	TGG	ACA	CTA	ATC	ACC	TGT	CAT	TCC	TTC	TCT	TTC	CTT	TAT	855
856	CTT	TTG	GTT	TAC	ATC	TTC	AAA	TAG	GAA	ATA	ATT	ATT	CAG	AAT	TCC	900
901	TGT	TGA	ACA	TTA	TCT	GAG	TTA	TCT	TCA	TGT	TGG	TAG	TCT	TCG	TCT	945
946	CTT	TGT	TAC	ATC	TCT	TCA	TTC	TAG	TTT	TTG	AGT	TTG	TTT	TCT	TTT	990
991	GTT	TAA	TTA	TTC	TTT	AAA	ATA	TTA	GAA	ATT	AAA	ACA	ACA	ATA	ATC	1035
1036	TTA	ATA	ATC	CTG	GAA	CAC	TTG	GAA	TAA	TTC	TCG	TAA	CAG	CTT	CTG	1080

CoxI

1081 GGA TGT TGG GCT TAG AGA CCT GGA CAT CAA CAG CTT CCA TCC 1122

Pyrocystis lunula DnaB (Helikase)

1 AAA GCT TGC CAC CAA CAA ACT TCC GGA CGA ACG CGA ACC GAA GAC 45
 46 CAG TCA GAC TAT CCA ACG GTG GGA GAT CTC GCA GGA GCA GAT AGA 90
 91 CAT ACT CGG TCT GGA ACA ATA AGC CGC CAA AGT CCG CGT ATT CAT 135
 136 CCC TTT CCG GCG TCT GCA CCA GGG GCA AGC CGG CAG ATA TGC ACC 180
 181 TTT CCT CAA GCG GTA AAG CAT TTG AGC CAA GGG CAT TTC AAC GAA 225
 226 TTT AAA ATC TCC CTC CAC GCG ATT AAA AAC GCA TCG ATA GTA GGG 270
 271 CGC GAA ACG GCC CAC AAG CTT CAT CGA ACA TGA GGT CCG TAA TTC 315
 316 CTA TTC TTT TCA ATA CAT TCT TCG CGG CGC TTG CTC TCT CGT TAA 360
 361 GGT TGT CAC ATT GCC GTA TTC GAT CAA CCT GAT GTC TTC ACG TTC 405
 406 ACG CTC ACC AGC GAT CAG ATT GGC GAC ATA GTC ATC CTG ATA ATA 450
 451 CAG AAT GGT ACC TCC TTT AGG TGT TTG GTC GGC CAG GTT TTC GAA 495
 496 TTG TGC CAG ATA GTC TTC GTA AGA TCC GTA GAG GGA GGG AAC TGG 540
 541 TCA GAA ACA TGG TGT AAA ACG ATG ATA TGG TGT TGA AAT TCA AAG 585
 586 AAC TTC GCC GTT TTA CCA TCC GCC GCT TCA TCC TGT GCT TCT ATT 630
 631 AGG ATC ACA GGT CGA TCG CTG ATG CTG TTT TTT CCA TCA GCC CAC 675
 676 CAA AAA TCA AAC TTT CTC TGA TTC TTT TCG AGT ATG TGC AAC GCG 720
 721 ATC TTC ATG ATT TCC GAA GAT CCT TCA CTA TCG ATG ATC AAT ATG 765
 766 CGC TGC TTG TCT TGA ATC TGC TCA AAT TGT ACT GGC ATG TGA TTG 810
 811 GGT TAA AGA TGC TAA AAT AAT TGA AAT TTG TAT GGC GCA CCA ATT 855
 856 CTG AAA TGC GTG TTG ATA AGC AGA ATA CTT ATC CAC GAT TGG ATG 900
M 1

901 TGG GTA GCG TGG ACA AAA CTT ATT CTA TTT TCC GTG TCC TCC GGC 945
2 W V A W T K L I L F S V S S G 16
 946 CGA GAC AAT TGG CGT AAG TTT GTT TTC TGG TCT CTT AAA GAT ATT 990
17 R D N W R K F V F W S L K D I 31
 991 TGT AAA TCG TCA ATG GAA AGC AAC AAA GCT GAA GCC CTC CGT GTG 1035
32 C K S S M E S N K A E A L R V 46
 1036 AAT CCT AAA TCT CGA AGA ATA GGT ATT CAG GAA CTC TCT AAT CAA 1080
47 N P K S R R I G I Q E L S N Q 61
 1081 CTG GGG GAA CTG CCC CCA CAA GCC GTA GAG ATA GAG CAG GTA GTG 1125
62 L G E L P P Q A V E I E Q V V 76
 1126 CTG GGT GCA CTG ATG CTC GAA AGA GAC GCT TTG TCC ACC GTA ATC 1170
77 L G A L M L E R D A L S T V I 91
 1171 GAC ATC CTG AAA CCA CAG AGT TTC TAT CGG GAT GCT CAT ATG AAG 1215
92 D I L K P Q S F Y R D A H M K 106
 1216 ATT TAT GAG GCC ATC GTT GAG CTC TTC AAC AAC ACT GAG CCA GTA 1260
107 I Y E A I V E L F N N T E P V 121
 1261 GAC ATC AAA ACG GTC GTT CAT CAA CTC CGA AAG ACT GGT AAT CTG 1305
122 D I K T V V H Q L R K T G N L 136
 1306 GAA GTG GTC GGT GGG GCT TAT TAT ATA GCA GGA CTG ACT ACC AAG 1350
137 E V V G G A Y Y I A G L T T K 151
 1351 GTC AAC TCG GCT GCC AAT ATT GAG TAC CAC GCA CGG ATC ATA TCC 1395
152 V N S A A N I E Y H A R I I S 166
 1396 GAA CAG TCC ATC AAA CGT GAA TTG ATC AAA ATT T 1428
167 E Q S I K R E L I K I

DnaB

***Ceratium horridum* PsbB-Zirkel**

1	TTG	ATG	TGT	CAT	TGA	AAT	TGT	CTT	GTT	TGG	ATA	TTT	CGA	GAT	GAA	46
47	TAT	TTA	TTA	GCT	TGC	TAA	TCA	GAT	GAA	TTG	TTA	TCT	GTA	CCT	TAC	91
92	TGT	AGG	TGT	ATA	TCT	ATG	CTT	GTC	TTT	GTT	ATT	AAC	AGC	TGA	TCA	136
137	GCA	GCT	GTA	TAT	CTA	CAG	GTC	TTA	ATG	GGC	CAT	TCC	AAA	GAA	TGG	181
182	AGA	CCT	GTA	TCT	TAT	GAG	CTC	ATG	TGA	TGC	TTT	ATG	CAT	CTG	TGT	226
227	CTT	TAG	ATC	TAT	AGA	TCT	GTA	GGC	ATA	TGA	GCT	AAT	GGT	TAT	CTA	271
272	TGT	CTT	TAC	ACA	AGA	GCT	GCA	TCT	TGA	TGC	ATT	AGC	TCT	GCT	ACA	316
317	TAT	CAG	TAC	GTT	TAC	ATC	TCA	GTA	CGC	AAG	GAC	CAG	CAA	CAA	AGA	361
362	GCT	CAA	GTA	GTG	CTA	CTA	ATC	CAT	AAC	TAA	GGT	AGT	GCT	TTT	CTT	406
407	GTT	CAC	CAA	ATG	CAG	CAA	TAG	TAT	CAT	ACT	TAA	GCT	TGT	CTC	TAC	451
452	TAC	AAT	ATC	CAT	TTT	GAT	GCT	AAG	ATT	ATT	TTC	CCA	AGT	GTT	CTG	496
497	ATA	TTT	ATC	ACC	TGA	TAT	ATA	GCT	ACT	GAA	GAC	CAT	TAC	ATG	AGC	541
542	TGT	GCT	CAT	TCA	TTA	CCT	ACT	GGT	GTA	CCT	ATT	CAT	ATG	CAT	CTA	586
587	TAA	GCT	TGG	TCT	GAA	AGA	CTG	TAA	GTG	TTG	TTT	ACC	TAA	TGC	TAC	631
632	TGA	TCT	ACT	GTA	ACA	CTG	TCT	TTT	ACC	TAC	TGG	TGC	AGT	GAT	ATA	676
677	TTA	ATA	ACC	TAC	TGG	TGT	GGT	ATG	CTT	CTT	TAT	GTA	TGT	GAA	CCT	721
722	ATA	TCT	ATG	CTT	GTA	AGA	CAA	GCA	GCT	GGT	GAA	ATA	ATA	TTT	CGA	766
767	AGA	ATA	ATC	CTT	GTT	GAA	GTG	GTG	CTA	TTA	GTG	TGG	TGC	ATC	CTT	811
812	ATG	TTA	TGC	ACC	TAT	CTT	ACA	GAA	GGT	TCT	AGC	AGA	GCT	AAA	GCT	856
857	CTT	GTT	TAA	GAG	ATA	TGG	ATG	GAT	ATC	CAT	ATT	GAA	GTC	TTG	TGC	901
902	AAC	TGT	TGA	GCT	GTC	TCT	GTT	TGT	TGC	TGC	TTG	CAG	CAT	CAC	TAA	946
947	ACA	AAC	AGA	GAT	GTA	TGT	ATA	CGT	AGT	ATA	CAT	ACA	TAT	ACA	TGT	991
992	TTA	AGT	CTT	AAG	ACT	TAA	ACA	TGT	ATA	ACA	TCG	TTA	CTT	CTT	TAA	1036
1037	GAA	GTA	ACG	ATG	TAG	TCT	GTG	TTT	GTT	ATA	CAA	ACA	CAG	ACA	TAT	1081
1082	GTA	TAC	TAC	GTA	TAC	ATA	TAT	ACA	GGT	CTT	AAG	ACC	TGT	ATG	TCT	1126
1127	CTG	TTT	GTT	ATA	CAA	ACA	GAG	ACA	GTA	GTC	TGT	GTT	TGT	TAT	ACA	1171
1172	AAC	ACA	GAC	ATA	TGT	ATA	CTA	CGT	ATA	CAT	ATA	TAC	AGG	TCT	TAG	1216
1217	TGA	TGC	TGC	AAG	CAG	CAG	ACC	TGT	ATA	TAC	CAA	TTG	CAC	AAG	ACT	1261
1262	TCA	TGT	CTT	GAT	GCT	AGT	AGC	GGA	GCT	AAA	GCT	CCT	GTT	TAA	GGT	1306
1307	ACT	AAT	AAC	AAT	AGC	TCA	ATA	GTT	GCA	CAA	GAC	TCT	ATT	AGT	AGC	1351
1352	ATA	CCA	ATT	GCA	CAA	GAC	TAG	CAC	CCC	ATT	AGT	AGC	ATA	CCA	CCT	1396
1397	ACC	CAT	ATG	TAA	CAC	CCT	TAC	AGT	AAA	TTC	AAG	ACA	AGA	GAA	GCT	1441
1442	TAT	CTT	TCT	CTC	TGT	CTC	TTA	CAC	AAG	AGC	TTT	AGC	TCT	GCT	AGA	1486
1487	TCA	TAC	CAA	AGG	ATG	GTT	GAA	GAA	TGA	AAC	CAT	AAC	AAG	ACT	ACT	1531
1532	GTC	TTC	AAC	CCC	TTA	AGA	TCA	TAC	CAA	TAC	CAC	TAC	AAA	TTA	GAG	1576
1577	GCG	TAA	AAT	ACA	AAA	CCA	TTA	CAC	CAG	CTA	ATA	ACT	GCT	GCT	AAA	1621
1622	TAC	CCA	TGC	TTA	TAT	TAT	CAA	CCT	CTT	TAA	ATT	AAG	CTG	CTT	CAT	1666
1667	TAA	TTC	ATT	ACG	CAA	CCA	GTA	TTT	TAG	GGG	GAA	AAA	CAA	GAT	ACA	1711
1712	TTC	ATT	TGG	GAT	CAT	TAT	GTT	GAA	TAG	GAG	ACT	AAT	ATT	ATA	TAC	1756
1757	ATA	CCG	CCC	GTC	AAG	CAA	ATA	AAC	ATA	ATA	ACA	ACC	CAT	GCT	TAT	1801
1802	AAC	CTT	GTC	TCC	ATT	AGT	AGC	ACT	CTA	TTG	GAT	AAC	ACT	TCA	TTA	1846
1847	GAT	CCA	CAG	CTG	TTA	TTA	TTC	AAT	CAC	ATG	AGC	TCA	TTA	CAC	AAA	1891
1892	AGG	CTT	CAT	CAA	GAT	AAA	CTT	AAC	AAA	TAT	CAC	TTG	CAC	AAT	ACC	1936
1937	ATT	CTA	TCA	CAA	CCC	ATA	ACA	CAG	ATG	CAT	ATG	TAT	AAG	ACA	AGG	1981
1982	ATT	CTT	GAT	ACC	ATT	TGA	TTC	TTC	AGC	TCC	ATT	ATC	GCA	AGC	TAA	2026
2027	TAT	CAA	GGT	AAA	ACA	CAT	GCA	TCT	TTC	TTC	AAA	AGA	CAC	ACA	TAA	2071
2072	CAA	TTA	CAG	CAT	CAC	TTT	ATA	CAC	TTT	ATA	CAC	TTT	CTA	CCC	AGC	2116
2117	CAA	GAA	GCT	AAT	TAC	CTT	GTG	CTA	TAG	GCA	TAA	CGA	TAT	TTA	TCA	2161
2162	CCA	CCC	AAT	AGT	AGT	CTT	GTT	TAT	AAC	CAA	GCA	TTA	TAC	AGG	TCT	2206
2207	CCA	TTC	TTT	GGA	ATG	GCC	CAT	TAA	GAC	CTG	TAG	ATA	TAC	AGC	TGC	2251
2252	TGA	TCA	GCT	GTA	ACA	TAA	AAC	CTT	AAC	AAA	GAC	ATT	GAG	CTC	TGC	2296
2297	TCA	ACC	ATT	ACA	CCA	GCT	AAT	AAT	ACC	TTG	TGA	TTC	CTT	AAT	TCC	2341
2342	TTA	CTT	TTC	TAT	AAC	CAT	GCT	TAT	AAC	ACA	AGA	GAT	TTA	TCG	TTA	2386
2387	CCC	ATA	CAT	ATA	GAA	CTC	ACT	TGG	CTC	CAA	TAA	ACA	TTA	CCA	TTA	2431
2432	CTC	TCT	TGT	TCT	TCT	AGA	TGG	CAC	ACA	ACT	CTA	ATA	AAC	CTC	ACT	2476
2477	AAA	TAC	AAC	AAT	AAC	ATA	AGA	CTC	CAT	TAA	AGT	CTT	ACA	GAT	GCA	2521
2522	TTA	ACA	CTA	CAC	CAC	CTA	ATG	CTT	GGT	TAT	AGA	TAA	GGA	CCC	ATT	2566
2567	AAA	GCA	GCA	CTC	TTA	CAG	CTA	CAT	ATC	AGT	AGC	ACT	AAT	GTT	ACT	2611
2612	CTT	ACA	GTC	TAA	TGT	TAC	TCA	TAA	CGA	TAG	TAC	CAA	CAC	CAA	CCA	2656

Core

2657	ACC	AAT	AAT	GTT	TCA	CAA	CAA	TAA	TGA	TGC	TAC	TAA	AGC	TAA	GCA	2701
2702	TTA	GCA	TCA	CAG	TAA	AAC	ACT	GCT	TGA	ATA	ATA	AAG	ATG	GAC	ACC	2746
2747	AGT	AAA	ATA	CCA	CAC	CAG	TAA	TTT	CAT	TCT	TCA	ATG	GAA	CGT	TAA	2791
2792	CAC	CAC	TTG	TTT	TGC	CGC	TGC	TGC	TGG	CAC	AAT	ATG	AAC	TCT	TAT	2836
2837	AAT	TTA	GCT	TTA	CTC	TTG	TTG	TGC	AAA	AGA	CAC	AAC	AAA	TAT	CAC	2881
2882	TTT	AAT	CCA	AAG	AGC	AGC	TAT	TAA	CCC	AGT	AGT	CTT	ATA	ACC	TTA	2926
2927	AGC	AGC	AGT	AAA	CTT	CAA	CAA	CCT	TGT	CTC	CAT	TAG	TAG	CAC	TCT	2971
2972	ATT	GGA	TAA	TAA	AAG	ACA	CTA	CTT	TTA	TTA	GTT	TAT	CAT	TAG	CTT	3016
3017	GCA	TTC	AGA	TAA	GTA	TGT	CTT	GAA	TAC	CCA	TCA	TTA	AAT	ATT	CAA	3061
3062	GAC	TAC	CAC	CTA	CCC	ATA	ACA	ATC	TCT	TCA	ATT	CTA	TCT	GTA	GCA	3106
3107	CTA	ATA	TAC	CAC	CAC	ACA	CTC	TCT	TTA	GCT	TGC	TAA	ATA	CTC	TTA	3151
3152	CAG	TCT	CTT	ACT	CTA	GGA	TAC	CAT	TAG	ACA	AGC	ATA	GAT	TAT	TCT	3196
3197	GTT	TAA	GAT	CAA	CTA	TGC	TCA	AGG	TAA	AAC	AGT	CTT	TCA	TAG	AGA	3241
3242	TAG	GTA	CAC	GCA	AGC	TTT	AAT	AAT	TCA	AGA	CCA	TAA	CAC	AGC	TGC	3286
3287	TGA	TCA	GCT	GTA	ATT	ACC	TTG	GTT	ATA	GAT	AAG	GAC	CCA	TAC	ATA	3331
3332	TTA	ATA	GCA	GAG	CTA	AAG	CTC	TTG	TTT	AAG	ATG	CAT	AGA	TAT	GCA	3376
3377	TTG	GAC	ATA	AGA	ATA	ACG	ATT	TAT	CGT	TAC	CCA	TCA	ATA	ACT	TCA	3421
3422	TTG	GGC	TTG	TCC	CAA	TAT	CTT	AAC	CAC	GTC	CAA	TAA	AGT	TTA	TCG	3466
3467	CTT	CAA	TAT	TAG	CTT	GGG	AAA	TGA	ATC	GAA	GAG	AAA	ATG	AAC	TTT	3511
3512	TAT	AAA	TTT	AGG	CTT	CAT	TCA	TGT	TTC	ATC	ATG	CTC	CAA	ACA	CAC	3556
3557	TTT	TAC	CAC	CGT	TAC	AAG	CAC	TTC	AAT	TAA	CCA	AAA	TTA	ACC	CTT	3601
3602	TTT	ACC	ATT	TGC	TTG	TAG	TTA	CCT	TAC	AGT	AGC	ATT	TCT	TCA	AAG	3646
3647	AAT	GGT	GCT	ATT	ATC	TTG	ATC	AAG	ACA	AGA	GAA	GTA	ATG	CCC	AAA	3691
3692	GCA	TTA	GTC	TTT	CTC	TCT	GTC	TCT	TAC	ACA	AGA	GCT	TTA	GCT	CTG	3736
3737	CTA	CAA	GAT	AAG	CTT	TAG	CTT	TAT	CGT	TAC	GAT	GGC	ATA	AGA	CTC	3781
3782	TTT	CTA	GCA	TAA	ACC	ACC	TAC	CCA	TAA	TTG	AGC	TGT	TAA	TAA	CAA	3826
3827	AGA	CTA	CCA	CCT	AAG	AAC	AGA	AGC	AAA	GCT	CTA	ACG	ATA	TAG	ATA	3871
3872	GGT	AAG	GTT	CTT	TCT	AAA	TAC	CAC	ACC	AGT	AAT	TTC	ATT	CTT	CAT	3916
3917	ATC	AGT	AGC	ACT	ATT	GAT	TAA	CTT	CTC	TGT	ACC	ATA	AGC	TTT	GAA	3961
3962	GAA	GAA	TTA	CAC	CTC	CAA	AGA	TTA	TTT	CAC	CAC	CTA	ATG	CAT	CTG	4006
4007	TAG	CTA	CAT	ATT	ACC	TTG	TGC	AAT	ACC	AAT	GCG	TAA	TGA	AGA	CAC	4051
4052	ACA	ACT	CTT	ACA	ATT	TCA	TGG	TCT	AAT	CTC	ATC	TTA	AGG	TTA	TGC	4096
4097	TAT	AAG	CAT	TTG	ATG	TTA	AGA	AGT	TTC	ACA	CCA	GTA	AAT	TTA	CAA	4141
4142	GAC	AAG	TCT	TTC	AAT	AAG	ACT	GTT	ATT	AGC	TTG	CGA	TAA	AAG	CAG	4186
4187	CAA	CTA	ATG	TCT	TGA	TCA	AAG	AAG	AAC	CTT	TCG	AAA	TAA	ATA	GAC	4231
4232	CAG	TAA	ATT	TCA	ATG	CAT	CTT	TCT	CTT	CTC	TTC	TGC	TTT	GCT	TAG	4276
4277	CTT	TAT	TCA	CGT	GAT	CAT	ATA	AAT	CTT	GTA	GCT	AGA	AAT	GCT	CTC	4321
4322	TTT	TTT	TCA	ATT	CCT	TGG	TTT	AGG	GTA	CAT	ATA	ATT	ATA	CTC	AAC	4366
2	F	F	S	I	P	W	F	R	V	H	I	I	I	L	N	16
4367	GAT	CCA	GGA	CGT	CTT	GTT	AGT	GTA	CAT	CTC	ATG	CAT	AGA	GCT	TTT	4411
17	D	P	G	R	L	V	S	V	H	L	M	H	R	A	F	31
4412	GTA	ACT	GGC	TGG	TCA	GAT	ATT	CTT	ATT	CTT	TAT	GAG	CTT	ATA	CTT	4456
32	V	T	G	W	S	D	I	L	I	L	Y	E	L	I	L	46
4457	GTT	GAT	TCA	ACA	GAT	CCT	ATT	TAT	AAT	CCA	ATA	TGG	AGA	CAA	GGT	4501
47	V	D	S	T	D	P	I	Y	N	P	I	W	R	Q	G	61
4502	TGT	TAT	GGT	ATA	CCA	TTC	ATT	TCA	CGT	CTA	GGT	GTT	CTT	TGT	TCT	4546
62	C	Y	G	I	P	F	I	S	R	L	G	V	L	C	S	76
4547	CTG	TAT	AAC	TGG	TCC	TTA	GGA	ATA	GAA	TTT	AAT	CTT	AAA	CCT	TAT	4591
77	L	Y	N	W	S	L	G	I	E	F	N	L	K	P	Y	91
4592	TGG	ACT	TAT	GAA	ACA	GTC	TTC	TTG	GCA	CAT	CTT	TCA	TTA	TCA	GGC	4636
92	W	T	Y	E	T	V	F	L	A	H	L	S	L	S	G	106
4637	TTT	TTG	ATT	GTC	TCT	TCT	CTT	TGG	CAT	TGG	GCA	TAT	TGG	GAT	CTA	4681
107	F	L	I	V	S	S	L	W	H	W	A	Y	W	D	L	121
4682	GAA	GTC	TTT	GTT	GGT	TAT	GGT	ACA	ACT	AAT	CTT	GTC	TTG	GAC	CTG	4726
122	E	V	F	V	G	Y	G	T	T	N	L	V	L	D	L	136
4727	AAT	CAA	CTC	TTT	GGT	ATA	CAT	CTC	TCT	TTA	GCA	TCT	ATT	CTT	TGT	4771
137	N	Q	L	F	G	I	H	L	S	L	A	S	I	L	C	152

PsbB

4772 153	AAT N	GGC G	TTT F	GGT G	TTA L	GCT A	CAT H	ATT I	AGT S	GGT G	TAT Y	CTT L	GGT G	CCT P	GGT G	4816 167
4817 154	CTA L	TGG W	ACA T	TCA S	GAC D	TCT S	TTA L	GGT G	ATT I	GTT V	GGT G	TCT S	ATT I	CGA R	TTT F	4861 182
4862 183	ATT I	AAA K	CCC P	TTC F	TAT Y	TCA S	TTC F	CTT L	GGA G	TTA L	GAT D	CCT P	TTT F	TGT C	TAT Y	4906 197
4907 158	GGC G	GTA V	ATC I	TCT S	TCC S	AAT N	CAT H	ATA I	GTA V	GCT A	GGA G	TTT F	ATG M	GGT G	ACT T	4951 212
4952 213	TAC Y	ATT I	AGT S	TTG L	TGG W	CAT H	ATC I	TCA S	TCA S	AGA R	CCA P	GGA G	CCA P	TTA L	GTC V	4996 227
4997 228	TAT Y	AAG K	CTC L	TTG L	AGC S	ATG M	GGT G	AAT N	GTA V	GAA E	GAG E	GTC V	TTA L	TGC C	AGT S	5041 242
5042 243	AGT S	ATT I	GCT A	TCT S	GTC V	TTC F	TTT F	ACA T	ACC T	TTT F	ATC I	AAT N	GCA A	ATT I	AGC S	5086 257
5087 258	TTG L L	CTA L A	ATC I N	ACT T H	CTC L S	TTA L L	TGT C M	GGT G W	ATG M Y	GGT G G	CTG L S	TAT Y V	CAA Q S	GTG V S	GAG E G	5131 272
5132 273	TAG * V	AGC	TGT	ATG	GTC	CAT	CTC	GAT	ATC	ACT	GGG	ATA	ATG	GAT	ATT	5176 287
5176 288	TTC F	TCT S	TTG L	GAG E	GTG V	GAA E	CGT R	CGT R	GTA V	ACG T	TTA L	AAT N	AGC S	AGC S	TTC F	5220 302
5221 303	TTT F	ATA I	AGA R	CAA Q	GCT A	TGG W	GAA E	CAA Q	GTA V	CCA P	GAG E	AAG K	TTA L	ATA I	CTT L	5265 317
5266 318	TAT Y	GAC D	TAT Y	ATT I	GGT G	TGT C	AAT N	CCA P	TCT S	AAA K	GGT G	GGT G	TTA L	TTT F	CGC R	5310 332
5311 333	TCT S	GGT G	CCC P	ATA I	CTA L	AAA K	GGT G	GAT D	GGT G	GTG V	GTC V	CAG Q	AAT N	TGG W	TTG L	5355 347
5356 348	GGG G	CAT H	TCA S	ATC I	TTT F	GAA E	AGA R	GGT G	TCA S	TTA L	GCT A	TTA L	ACG T	ATT I	CGG R	5400 362
5401 363	CGA R	ATG M	CCA P	GCT A	TTC F	TTT F	GAA E	ACA T	TTT F	CCA P	GTA V	CTT L	CTT L	ATT I	GAC D	5445 377
5446 378	CAA Q	GGT G	GGT G	ACT T	GTT V	CGA R	GCA A	GAC D	ATA I	CCT P	TTC F	CGT R	CGT R	GCT A	GAA E	5490 392
5491 393	TCT S	CGT R	TAT Y	AGC S	ATT I	GAA E	CAA Q	ACA T	TCA S	GTG V	GTT V	ATC I	TTC F	TTT F	TCA S	5535 407
5536 408	AGA R	GGT G	CTT L	TTA L	AAT N	GGT G	ACA T	GAG E	TAT Y	TCA S	TTA L	GCA A	TCT S	GTA V	GTT V	5580 422
5581	AAA	GAT	TAT	TCA	AGG	AAA	GCT	CAG	TTT	GGT	GAG	ATC	TTC	ACA	TTC	5625

Leserahmen-
sprung

PsbB

423 K D Y S R K A Q F G E I F T F 437
 5626 AAG AGA ACC ATA AAG CTT TTT GAT GGT GTC TTC AGA ACA TCT CCA 5670
 438 K R T I K L F D G V F R T S P 452
 5671 AGA GGT TGG TAT TCC TTT TCA CAT CTA GCA TTG GCA TTG CTA TTC 5715
 453 R G W Y S F S H L A L A L L F 467
 5716 CTC CTT GGT CAT TTG TGG CAT GCA GGT CGT GCT GTA TTC CAA GAT 5760
 468 L L G H L W H A G R A V F Q D 482
 5761 ATT TGG ACT GGT GTT ACT TTT ATC ATA CTA CAT CAG GTA GAG TAT 5805
 483 I W T G V T F I I L H Q V E Y 497
 5806 GGT CGT AAT GAA AAG CTT GGA GAT AAG ACC ACT AAG TGG ATC CAA 5850
 498 G R N E K L G D K T T K W I Q 512
 5851 TAG 5853
 *

PsbB

Ceratium horridum Gen-freier Zirkel (5661bp)

TCTAGATCCCTGTGATATTAATGGTGCTGCTTTTATAAAAAGGCACTGTTTTTATTAATTTATGCAACCACCTAAT
 GCCATAAGAGATGAGCATTTAATGAGCTCTTGGTTATATCAAGACTAATGCTTTGGGCATATGAATGCCTAATGC
 ATCTGTAGCTACAAAGCTTTGTCTAATGACTATGCATAGATACCTACTGGTGTGTTATTAATTAGCTGTAAGGAA
 GTAAAGCTAATGACCACGTTAAATAATTCGAATTGTAACCTTAACCTTTAGTGGCATAAGCATTGATGTTGTATTT
 AGATAAAGCTTCTCTGCATGCCTATAGCACAAAGTAATTTGATGTTACAAGACTTTGTTCTTGTCTTTTACACAA
 GAGCTTTAGCTCTGCTACTGGTTGCGTAATTCAGATACGTTAAGGTTTAAATGAGGTTGTGGTGGTATATTGCTAA
 AGCTTAATGGGCCATTCAAAGAATGGTGCTTTAGCTTAGCTCATATGAACAAAGCCTTGTTCATACAAGACAAG
 TCTTGTTACAGCTGATCAGCAGCTGGTATGAGCTCATGTTTAACTTGATAATGAAAGCCAATCCAATAAATTGA
 ATAATTCAGACTCTTATGCCATCGTTATTCTTGTGTTTGTAGATGAATACCTACTGGTGCAGTGATAAACCATC
 TGTGACTCTTTCAAAGATATCGTAACGCTTATGAGCTCATGTGATTGAATAATTCAAGACTCTTATGCCATCGTT
 ATTCTTGTGTTTGGGACCTAAACGTAGTGATTGTTATGGTCCTGAACCAAGCTTAAGGTTATCTTTTCAAGGCTC
 TTATTAGTGGTGAAGAAGGCTTCATAATGCATCTGTATCGAAGAGTCTATTCTTTAATGGGCTCTTCTTTGTCTT
 ATAATCAGTAGCTTATGTATATCTAATGGAGTCTAATGCAACCAGTAATATGTATGGGTAATACGTTATCTACTC
 CATTTATTTCCAACCTTATAGTAGTGCTACTGATATGTAGCTGTATTTAGTGGTCCCTGAACCAATGTCTATA
 TCAAGGTTTAAATGTAATGGTTCTCTTTAGCTAGTAACCTTCCTTCCCTTACCTATAGATACCTGTGATATTAATGGG
 CTCTTCTTTGCTCTAGCTATTGGAGTAGTGCTATATGAATAGGTAAGTACTGTAATGCAACTGTCTTTAGATAGGTGCT
 AGTCTTGTGCAACTGTTGAGCTGTCTCTGTTTGTGCTGCTTGGCGCAATCACTAAACAAACAGAGATGTATGTAT
 ACGTAGTATACATACATATACATGTTTAAAGTCTTAAAGACTTAAACATGTATAACATCGTTACTTCTTTAAGAAGT
 AACGATGTAGTCTGTGTTTGTATACAAACACAGACATATGTATACTACGTATACATATATACAGGTCTTAAGAC
 TGTATGTCTCTGTTTGTATACAAACAGAGACAGTAGTCTGTGTTTGTATACAAACACAGACATATGTATACTA
 CGTATACATATATACAGGTCTTAGTGATGCTGCAAGCAGCAGACCTGTATATACCAATTGCACAAGACTTCATGT
 CTTGATGCTAGTAGCGAGCTAAAGCTCCTGTTTAAAGGTACTAATAACAATAGCTCAATAGTTGCACAAGACAAGA
 GAATCTCTCTGTCTCTTACACAAGAGCTTTAGCTTGCTCATTACCCATGCTTATAACCTACAGTAGCACTATAGA
 TAAGGACCCATTAATAAGATACCATTCCAAACACTTAGATCTCTACAGCACCATACCATTACAAAGGATCTTTCA
 AATGAGCACAGCTCATAACGATAGTACCAACACCAAAAGAACAGAAAGAAGCACAGCTTCTCTATAACCCCACTAA
 TATTAGTCTCTATCTCTTCAATTGGGCTTGTCCTCAATACATAGCTCTATGCATATGAACCCATATAACACAAGCTT
 AACTAATGCCGATAATGCCCAAAGCATTAGTCTAATGATACATTACCAACCACCTATCTGTAGCACTAATATACC
 ACCTACCCATATGTAACACCCCTTACAGTACTGTACCAGTAAATTTCAATTCAATCTTTGATTGGTTATGAACCCA
 TACATATAGAAGTCACTTGGCTCCAATAAACTTAGCTTATCTTATATGCACAGCAATATAAGAATAACGATTACC
 CATGCTTATAACCTACAGTAGCACTAGCTAAATGCTTAGCTTTATTCAAAGCTTGCAATTGTATCTATTCTCTTGC
 GTTACGCTAATGCTTAGCTACTTAAACAGCACTAAACTACGATGGTTCTAGCAGAGCTAAAGCTCTTGTTTAAAG

Core

ACATAAGAATAACGATTTATCGTTACCCATTAATTGAAAGGTTTTTATAAAGGAGGAATTCTTAGTAAGCTTTGA
TTAGCAATTTAAAGTTGAATAGGAGACTAAAATTATATACATACCGCCCGTCAAGCAAATAAACATAATGATGCA
TCAGATAGATAAGGACCCATTAATGTTTCAGGTCCATTAAGCAAATAGCACTCTTTATTTTCCCAAGCTTATGGT
ACAGAGAAGACAAGAGAAGTAATGCCCAAAGCATTAGTCTTTCTCTCTGTCTCTTACACAAGAGCTTTAGCTCTG
CTACAAGATAAGCTTTAGCTTTATCGTTACGATGTCACATACTTAAACAACCACAGCTGTAATTACCTTGTGCTA
TAGGCATAAGAGTCTAATAGACATACAGATCCATTGCATAACATAAGGATGCATATAATATTTTCGAATAGAAATG
ATACATTACGCTTCAAATTTAAATTCGAAGACACTTTCAACGTATCTTACAGATTTATCGTTACGATAGTACCAAC
ACCATAACAAGCTCATACCAGCTGCTGATCAGCTGTATTGAACAAGGCTTTGTTTCATATGAGCTAAGCTAAAGCA
CCATTCTTTGAATGGCCCATTAAGCTTTAGCATAACCTTAAGCAATAGGTAAACAACACTGGTTCTAGCTTAAAT
GGAGATGTATAAGACAATGAGCTGCACCATAATGCACCACCAAGAAAAGAAAGTCCATCACTTGTCTTGAACATA
ACGATTTATCGTTACCCATTAATTTCAAGACCATAACAATTCAAAGATAAACAAGACTTGTCTTGTAAATAGCAC
TACCTAAAGGTATATATCACTGCTGCTTCATTAATTCATTACGCAACCAGTAAGCTCTTGTGTAAAAGAATAACGATTACCCATGCTTA
AATAACTGCTGCTTCATTAATTCATTACGCAACCAGTAAGCTCTTGTGTAAAAGAATAACGATTACCCATGCTTA
TTGGATCACGATAAATTCATTTCCATTACTTGTACACCACCTTGATACTCTATTTAGCACCTAATTCTCTGAGACC
AATAGCTAAATGCTTAGCTTTATATCAGTAGCACTAGTTCTCTTTGGATATGGAATAACATCTTGAAATGAATAT
CCTTTGTTCAAGGTTGTTCTTTAGCACCATAAATGGTTGTGTAAGATGCATAGATATGCATTGGACATAAGACTC
CATTAAAGCAGCACCACCTATTAGGCTGGTTCTAGCTTAAATATCAACACTAATATACCACCACAACCTCTCTTTA
GCTTTACTTTCTTCGATTCAAAGAAACCAATGGACACCAGTAAAATACCACACCAGTTATATTCTAGGTTTCATG
CATCTGATGATTTAACTGATCCAGCACCAGTGATTATCTTTCTTCAAAGACACTACTTTTATTAGTAAACACT
ATTTCAATGCATCCATTAGTAGCACTCTATTGAGCTCTGCTCAACCATTATTTTCATAAAATGAAGCTTGCTTGTA
GTTACCTTACAGTAGCATTTCTTGTTAATTTAAGTGCTTGTAACGGTGGTAAAAGTGTGTTTAAACATGAATGA
AGCCTAAATTTATAAAAGTTCATTTTCTCTTCGATTCAAGAAAAGCATTCAATTATTGTGCCACCTAATATCGCA
AGGTACCTATTTCATATGCCCAAAGCATTAGTCTTGAATACCATTCTTTGAATGGCCCATTAATTTCAAGACCATA
ACAATTCAAAGCTTTAGCTTTACACAGCTGCTGATCAGCTGTAATTACCTTGCAACAGTAAAGCACTACCTTAAT
GAAGACTTATTCACCACCAAAGATAGATCAAAAGAGTAAAGTTAAACAATTGATAGAGAAGAAAGACACTACTTT
TATTATTTATCGTTACCCATTAAGCAGCACCAGTAGGTATTCATTAGTCTCACAGATGGTCAAATCTTTTGAAG
TAGCATAACAAGACCTGAAGTGAAGTGTTATCCAACCTGCTATATTTAGCCCCATCTAAGCATAACTTCTTGACCC
ATAACATTTATCGCAAGCTAAGATTAACCACGTCCAATGGGTATCAAAGATGCAGCTCATTACACAAACCTTTAG
GTCCAAAGACCATTACCTGCTTGTCTATTGCTTAAGGTTATAGCACCAGAGAAGTAAATACCATTACAAAGGATC
TTAAACTCTAAACCAAGTTAAAGATTCATAGTTTTTTCATTGCAATGTTTACTGGTCTTATGGTACAGAGAGTAAT
TAGCTTGCTAATGAATTAATCTCTCTGTCTCTTACACAAGAGCTTTAGCTCTGCTACAAGATAAGCTTTAGCTTT
ATCGTTACGATATTAATTTTCGGCACATATTACTTTCTTATTTCAACGTATAAACCTTAGCTTTAGCTATCAGAGAT
GTAGAGGTTTATTATTTTTCGATGCAATGAGCTCATGTGAAAGAACCCTTACCTAATGGTTATCTATGAAGCAGTG
TTTAACAGCTTCTTTATCTTTAGGTTGTGCAGCTAATAGCACCTTAATAGGTGTCTATGAATCAGTACTTTATAT
GCATCCAATAGATTAATGGGCCATTCAAATGATCGAAGAGAATATAACCTTGGTTATAGAATGGTACAGTGCTTA
AGTTGCATCTCTTTAGTGGTGGTATATTGCTTAATGCTTTGGGTAAAAGCAAGAAAGAATTGTGGCTAGAATTA
ATTCAAGACTAATGTAAAGCTTGTGTTATACAAGTCTTGATGTAACGTTATTGTTACGATTAGAGTACGCAAGGA
CCAGCAACAAATAGCTCAAGATAATAGCAGCAGTGATATTAATAACCTACTGGTGTGGTATATTATAGTCTAA
TGCAACCAAGCTTAAGGTTATCTTTATCGTGATTACATACCTATTGATGTGTCATTGAAGAATGAAACCAATGCTG
TATTTATCACCTGCAATCGTTAGAGCTTAGGTAATGATCTTGTCTTGTCTTAGCTTTAGAGATGCATCATAGCAC
ATTTTCTTTGAGCTTAACTTTGGAATGAACCTTGCTGCTTGGTTATATAATGGTGCATATGGTGCATCTATTCTA
TCATATGGATGCATTGAATTCATATATCTCGATGACGAAACAGCATGTATGTATGACTGTTAGTGTTCTCATGC
TTGAGTTGAAATGAAATGATTAAGCTTGTCTTACCTACTAATGTAGTCTTGAATATTTAATGATGGGTATTCAAG
ACATACTTCTATGCCTATTCTTCTGTACCTGTATGTTACGCTATCAGACAGTACTTGACATCTATGACTTTTTG
AATTGTTTGTCTTATGCCATCGTTATTCTCTAGA

***Ceratium horridum* Gen-Sequenzen**

Gen: **16S rRNA**
 Name des Klons: pCh20p-1567-1590 (911bp)
 Homolog zu: *Heterocapsa triquetra* 16S rRNA (1544bp) Acc.Nr.: AF130038

Die homologen Bereiche zu *Heterocapsa triquetra* sind in roten Buchstaben dargestellt. Angegeben sind die theoretischen Nukleotid-Positionen der 16S rRNA und die Primer (unterstrichen) die benutzt wurden.

1496
CCCCATTAATTCAAGTGATAAATTCTGGCTTCTTAGAAATTGGATCTCTTTTTAGCATAGAAAGGTTATTAACCT
AAGGAGTACGCTTTCAAAAATGAAACTTAAATGTTCTGATGGTGGTTTAAATCAATAGTGGAAATAGATTCTTTAA
 1672 1710
TTCGATGTTCTGCGATAAAGCTTATCAGCAAAGTCAATGAATCTCAGGAGATAGGTCTCATCCC**ATTCATAGTAG**
 15-67 ▶ 1782 1863
TGCATGGCTGTTTCTAGAGAATGTTTTGTAATTCTGGTTCATTCAAGAATACCCGATACACTTTAACCTAGATA
 1930
GAAGAACATCAAGTCATTATGCTCTTTTGTTTCAGAGATATACATCTGTTACAAAGAGAGCTACGGAACAGCACTTA
 AGAATGGAATATTAGCTTTAGCTGGTAATGGTCTTGTGCGAAGAGGAATTAATGGATATGGAATATCAACTTGCTT
 ATATCTATAGGCATCTATATATTGAAGAACATTGAGTACCAGATCATTTAGCATACGGCATTGACAATTGAAAGG
 1997 15-90 ▶
 TTTTAT**AAGGAGGAATTCTTAGTAAGCTTTGATTAGCAATTTAAAGTTGAATAGGAGACTAAAATTATATACATA**
 2090
CCGCCCCGTCAAGCAAAAAGAAGAGATAGAGTGTGTAGCAAATGAATAACGATAGTGATTGGTTGGGACCAAGTGT
 TATGTAGATATCGAAGAGTAAGGTACGTAAGAGAATACTTTAGCTTGTGTTGTAATGAATCTATAGGCATCTATA
 TGTATGGTAATGTTTATCGTAGAGTAATGGCTCCATTTATACCTGCAACCCTAGTAAGGTACTTACTTATATAGC
 ACAAAGCTTTAGCTTGGTTGTAGTGAACGTATCTTTAATGGATGGATATCCATATTGAAGTCTTAGCATTAGGC
 TATGTTTATGG

Gen: **16S rRNA**
 Name des Klons: pCh49rp (403bp)
 Homolog zu: *Heterocapsa triquetra* 16S rRNA (1544bp) Acc.Nr.: AF130038

1285
 ATAATGCAAT**TTCACTGTTTACACCTAAAGAACCTCTAGAACGTTAACACCACTTGTTTTGCCGCTGCTGCTGGC**
 1218
ACAATATGAACCATTTGGTAGTAAACCTTGATCTTATAACCAATCGTTATGGTCCATACCAATAACACCACTAGA
 TTCCTTACTTTTCTATAACCATGCTTATAACACTACTAGGCTCTTATTCTATCTCAAGATAATAACGTTACAGCA
 TCAAAGAAGCAGATCATTTGTAACCCATGCAGGTATAAGACAAGCTTATGATGTCTTGAATACCCATCATTA
 ATATTCAAGACTACCACCTACTCTCTTGTATACTACTCTGGTAATGAGCAGAGCTAAAGCTCTTGTGTAAAAGAC
 ACACATAATATCAACTTTTAACGTAATT

Gen: **23S rRNA**
 Name des Klons: pCh12p-1559 (747bp)
 Homolog zu: *Heterocapsa triquetra* 23S rRNA (1544bp) Acc.Nr.: AF130039
Protocerotium reticulatum 23S rRNA (3772bp)
 Acc.Nr.: AF206702

851 *P. ret.* 829 *P. ret.* 776 *P. ret.*
GTTAATCCAACTTTTGGGCT**GATA**ATTTAGCTTCATGTTAAGC**TTCAAC**TTTAACCATTGATTTGGGCTT**GTCAT**
 710 *P. ret.*
TTGTAACACAAGTGAATACCCATCTTAACT**GAA**GGAATGAAAAAGAATAAGCATGTTACCTATAGATGTAAGTAA
 592 *H. tri.*
 CGATCATGGTTTGACGACATTTCTTTGAAAC**TTTTATATGTTTTGAACACATCCAGATATTAACACAGCTCGTAT**
 477 *H. tri.*
GACATTTAACCTCAAACTAT**CAGTGGTATGGCAGGTTTGTATCTCTTTACATTTTAATCTTTAGTAGACTCAAGT**
 15-59 ▶
 AGCGAATAATGAGCGATGAATAATTGAATGGAGTATCAGAATAACAAAAGGTAGTAGTGCATCATGAATGGTTGT
 TAAGAATTAGATCGCAGGCATTCGGGCAGACAATAGCGTAATGGACATGTAACAACCTGAATCTTAACGTTAGTT
 TAGTGCTACTATGCATAGAGCTATGTAGATCTATAGATCCCTGTGATATATAAGGTACTGGTATATAAGCTTTGA
 ATTCTTGATGCTAAATGTATCTTGATATTAAGCTTGATCAAGATATGAACCCATACATATGTAAGTGTAATGAG
 CTCATGATTTATAGAGCTGTAGTGAAACACTGTGATATTAATAGACACCTATGAATGAAAGAACCTTCTTGGTGC
 CGAAATGCTATTTGTTAAGTTGGTACAATACTCTTTAGGTTATTTAATAGCAGCAGTGATATATACCTTTA

Gen: **23S rRNA**
 Name des Klons: pCh49p (440bp)
 Homolog zu: *Protocerotium reticulatum* 23S rRNA (3772bp)
 Acc.Nr.: AF206702

CTAAAGACACAGATGCATAAATTAATAAAAAACAGTGCCTTTCAAGGCTCTTATAGTAGCTCATCTTTCAATAAA
 TAGGTGCATGATTCAATAACTAGGCTGGTTCTAGCATCAAGCTAATTGGTCTCTTTTTATTTTACAAGTGAAGAG
 2336
 ACAGAAACACTTAGAATTGACAGTGATTA**ACTATCTCACAGAATTCCTCTTGAGCTATTTGTTGCTGGTCTTGCT**
 2274
GTACTGAGAA**CAAC**AAATTCTATATCAACAGGCATGGAAATTTAAGGTATAAAATAAAGTCACAGATGCTTTCT
 TTAACCCAGTAGTCTATTAGCATAAGATAAACAAAGCCTTCTGATAGATACGTATACGTATACCAAAGCATAGAT
 CACGTGATATAAATACAGCTACATATCAGTAGCACATAGATAACAACCTCTGATAGGAAGGGGT

Gen: **23S rRNA**
 Name des Klons: pCh10rp (415bp)
 Homolog zu: *Protocerotium reticulatum* 23S rRNA (3772bp)
 Acc.Nr.: AF206702

TTAATGTTTATCGAATAAGGATGCAGCACTAGTAAGTCTAAAGCTAGAGAAATTGGGTTTAAATGGGCAAGCAGGT
 2630
 TG**CTCCAGTCTTTAACTGGTATCTTAATGATCTTAAAAAGAAGCTACCAAATAAAAGCTACTCAAGGGATAACAG**
 2772
GCTTCATCTTTTGGCTAGCTCACATTAAATGAAGGGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTTATCTTTTCCAAAATATG
 2955
 TAGTCTCGATT**CTTGGTGGGAGTGCTCATCCCAATTCAAGGTACGTGAGCTGGGTTCAAACGATGTAAATCAGT**
 3035

TTGGTCTCTATCTGTAACAATTGTCGTAGAGAATCAGTATAATGGTATGCATAAAGGTTGTGGTTAAGTAATTGA
AGAACAGTAGTCTTGTAGCAGAGCTAAAAGCTCTTGTTTT

Gen: **psaA**
Name des Klons: 38.seq (1090bp invertiert und im Komplement)
Homolog zu: *Heterocapsa triquetra* PsaA (732AS) Acc.Nr.: AF130031

1	GTA	CAC	CAT	ATA	CAT	GCA	TTT	ACG	ATT	CAT	GCT	GCT	TTA	TTA	ATC	45
1	V	H	H	I	H	A	F	T	I	H	A	A	L	L	I	15
512																
46	TTT	ACA	AAA	GGC	ATT	CTT	TAT	GCC	AGA	AAC	ACT	AGA	TTG	GTC	TCA	90
16	F	T	K	G	I	L	Y	A	R	N	T	R	L	V	S	30
91	GAG	AAA	TTG	GAT	CTA	GGT	TTT	CGA	TAT	CCA	TGT	GAT	GGT	CCT	GGT	135
31	E	K	L	D	L	G	F	R	Y	P	C	D	G	P	G	45
136	AGA	GGT	GGT	ACG	TGC	CAA	ATC	TCA	CCT	TGG	GAC	CAT	ATC	TAT	CTC	180
46	R	G	G	T	C	Q	I	S	P	W	D	H	I	Y	L	60
181	ATT	GTC	TTT	TGG	ATG	TAT	AAT	GCA	TTC	TCA	GCT	TGT	ATT	CTT	CCA	225
61	I	V	F	W	M	Y	N	A	F	S	A	C	I	L	P	75
587																
226	CTA	TTT	TTG	GAA	GAY	GCA	STC	AGA	YGY	ATG	GSG	CAW	ATA	TRA	GAC	270
76	L	F	L	E	A	A	X	R	X	M	*					
271	CCA	AGA	TGY	TAC	ATC	TTA	TGC	ATA	TCA	CAG	GCA	TTG	GTG	ATT	ATA	315
316	GCA	TTA	ATT	GGR	ATG	AAC	CAT	CGT	AAC	GAT	AAA	TCG	TTA	TCT	ATT	360
361	GGT	CTA	CAG	GTC	TTT	AGT	GGT	GCT	GCA	AGC	AGC	AGA	CCT	GTA	TAT	405
406	RAS	ACT	AGC	TCA	TAT	GAA	CAA	AGC	CTT	GTT	CAA	TAC	AAG	ACA	AGT	450
451	CTT	GTT	ACA	GCT	GAT	CAG	CAG	CTG	MTW	TGA	GCT	TGT	MAT	GGC	ATA	495
496	GAT	ACC	TAC	TGG	TGT	TGT	ATT	TAT	CGA	AGA	GTC	TTG	ATT	AAC	TTC	540
541	CTT	CCT	TAC	CTA	CTA	ATG	GGT	AAC	ATA	AGC	ATT	AGT	GCT	ACT	GAT	585
586	ATG	TAG	CTG	TAA	GAG	TGC	TRK	TTT	TAT	AAR	AGG	CAC	TGT	YYT	TAT	630
631	TAA	TTT	ATG	CAA	CCA	CCT	AAT	GCC	ATA	AGA	GAT	GAG	CAT	TTA	ATG	675
676	AGC	TCA	TGT	TTT	ACT	GTT	TTA	CCT	TGA	TAT	TAG	CTT	GCT	AAT	GAC	720
721	TAA	CCT	AAA	CCT	TAC	TGT	AAG	AGT	GCT	GCT	TGT	ATA	ATG	CTT	TGG	765
766	GCA	TAT	TGT	CTT	GTT	TGG	ATT	AAT	GGG	TCA	ACA	AGA	CTA	CCA	CCT	810
811	ACT	GTA	TTG	AGC	GAT	GAA	AGC	ATT	MAT	TAT	TTT	TCG	ATG	CTT	ATT	855
856	CTT	GTC	TAT	TTC	GGC	TTT	GTT	TAG	TGT	GAT	TTG	ACC	TAA	ATG	TAC	900
901	CTG	TAG	AGA	AGC	TGT	GCT	TCT	TCT	TTA	CAC	AAG	AGC	TTT	AGC	TCT	945
946	GCT	ACT	GTA	ACG	ATA	AAT	CGT	TAT	GTT	CAA	GAC	TAT	GCT	AAT	GGT	990
991	CTA	ATG	CTA	ATA	GAG	AAG	CTG	TGC	TTC	TTT	TAT	CGT	GCC	AAT	CCA	1035
1036	ATG	GAG	TAG	TGG	TTA	ATG	GCT	GTA	TCA	ATA	CCC	ATG	CTT	ATA	TAT	1080
1081	CTA	TTA	GCT													1089

Gen: **psaB**
Name des Klons: pCh14rp-1560-1585 (1046bp)
Homolog zu: *Heterocapsa triquetra* PsaB (776AS) Acc.Nr.: AF130032

1	CAC	CAT	GCG	ATA	TCA	TTA	GCT	TTG	CAT	GTG	ACA	AGT	CTT	ATT	GCC	47
	H	H	A	I	S	L	A	L	H	V	T	S	L	I	A	14
564																
48	TTG	AAA	GGA	TCT	TTA	GAT	GGT	TGT	GGA	TCT	AAA	CTA	ATA	CCA	GAT	92
15	L	K	G	S	L	D	G	C	G	S	K	L	I	P	D	29
93	AAG	CTT	CAT	CTT	GGC	TTA	GGT	TAT	GCT	TGT	GAT	GGT	CCT	GGT	AGA	137
30	K	L	H	L	G	L	G	Y	A	C	D	G	P	G	R	44
138	GGT	GGT	ACA	TGT	GAT	CTT	TCT	GCT	TGG	GAT	ACA	TCA	TAT	TTA	GCT	182

45	G	G	T	C	D	L	S	A	W	D	T	S	Y	L	A	59
183	ATC	TTC	TGG	TTA	CTT	AAT	GCC	TGT	ACT	TGG	ATA	ACA	TTT	TAT	TTC	227
60	I	F	W	L	L	N	A	C	T	W	I	T	F	Y	F	74
228	CAT	TGG	AAA	CAC	TTG	TCT	TTC	AAC	ACA	GTC	TTT	CAA	TTT	CAT	GAG	272
75	H	W	K	H	L	S	F	N	T	V	F	Q	F	H	E	89
273	TCT	TCA	ACC	TCT	TTA	AAT	GGT	TGG	TTT	CGT	GAT	TAC	TTA	TGG	TTC	317
90	S	S	T	S	L	N	G	W	F	R	D	Y	L	W	F	104
318	AAT	TCC	ACA	GCT	TTA	ATT	CAT	GGT	TAT	AAC	TCA	TTT	GGA	TCT	AAC	362
105	N	S	T	A	L	I	H	G	Y	N	S	F	G	S	N	119
363	ACA	GGA	TTA	TCT	ATT	TGG	GCA	TGG	GCT	TTT	CTA	GGT	GCT	CAT	CTT	407
120	T	G	L	S	I	W	A	W	A	F	L	G	A	H	L	134
408	TGT	TGG	GCT	ACT	GGC	TTC	ATG	TTT	TTA	ATA	AGT	TGG	CGT	GGT	TAT	452
135	C	W	A	T	G	F	M	F	L	I	S	W	R	G	Y	149
453	TGG	CAA	GAA	CTA	ATC	GAG	ACT	CTT	CTT	TAT	ATG	CAT	TTG	AAG	TGC	497
150	W	Q	E	L	I	E	T	L	L	Y	M	H	L	K	C	164
498	CCA	AAG	CTA	TCT	AAT	ATT	TGG	TCA	GGA	TAT	TTT	TAT	ACT	CCT	GTT	542
165	P	K	L	S	N	I	W	S	G	Y	F	Y	T	P	V	179
543	GCT	TTA	TCG	ATT	CTT	CAA	GCA	AGA	TTT	ATA	GGT	GTT	GTC	CAT	TTT	587
180	A	L	S	I	L	Q	A	R	F	I	G	V	V	H	F	194
588	GCA	TTG	GGC	TTC	ATA	GTC	TCT	TAT	TCA	TGC	TTT	CTC	TTT	GGA	GCA	632
195	A	L	G	F	I	V	S	Y	S	C	F	L	F	G	A	209
633	AGA	TGA	TTA	GCT	TGG	TTA	ATG	CAT	GGT	TTC	GAA	TAA	CGT	TGT	GCT	677
210	R	*														
678	TAA	GAT	TAT	TTT	TCG	ATG	TCT	ATT	TAT	CTA	TGC	TCA	AGG	TAA	ACT	722
723	TTG	GTA	TGA	TCT	AGC	AGA	GCT	AAG	GCT	CTT	GTG	TAA	GAG	ACA	GAG	767
768	AGA	AAG	ACT	AAT	GCT	TTG	GGC	ATT	ACT	TCT	CTT	GTC	TTG	CAT	TAG	812
813	GTG	CTA	ATG	GTC	TAA	TGA	CTA	TGC	ATA	GAT	ACC	TAC	TGG	TGT	TGT	857
858	ATT	TAT	TAG	CTT	GCT	AAT	GCA	TTA	TTC	CTC	CTT	GCC	ATT	ACA	GTC	902
903	ATA	GAG	CAA	TGG	TCC	TGA	ACC	AAT	GTC	TAT	TCT	TTA	TTT	CAC	CAC	947
948	CTC	CAA	TGG	AGC	TAA	TAG	TTT	AAT	GCT	TTG	GCG	GAA	GAA	TAG	CGT	992
993	GGT	TAT	TGG	CAA	GAA	CTT	AAT	AGT	CTC	ATG	CCT	TGA	TCT	ATA	GGC	1037
1038	ATC	TAT	AGT													1046

Gen: **psbC**
 Name des Klons: pCh57p-1593 (431bp)
 Homolog zu: *Heterocapsa triquetra* PsbC (460AS) Acc.Nr.: AF130035

1	TCT	TGG	TTA	ACA	TGT	TGA	CAT	TGG	ATT	GTA	GCT	TAC	TTT	ATA	CTA	47
	S	W	L	T	C	*	H	W	I	V	A	Y	F	I	L	14
48	GTA	GGT	CAT	TGG	TGG	CAT	GGA	GCT	AGA	GCT	AAA	GCA	ACA	GCA	TTA	92
15	V	G	H	W	W	H	G	A	R	A	K	A	T	A	L	29
93	TCA	ATT	GAG	TGA	GGT	TTA	TCT	CGT	GTC	TAT	GAA	TCA	GTA	CTT	TAT	137
30	S	I	E	*	G	L	S	R	V	Y	E	S	V	L	Y	44
138	ATG	CAT	CCA	ATA	GAT	TAA	TGG	GCT	AAT	GTT	TTA	ACC	TGT	ATC	TCG	182
45	M	H	P	I	D	*	W	A	N	V	L	T	C	I	S	59
183	TGG	TAT	CTG	ATA	GCT	TGT	GTA	GAA	TAC	TGC	TGC	TGA	TTG	TCT	TTG	227
228	GAA	TGG	TAT	TTC	CTT	TGC	TTG	ATT	GAT	TCA	AGC	TGT	AAT	TTC	ACT	272
273	GCT	GTT	TAA	TAC	TCT	TAT	AGC	TGA	ATG	CAT	GAA	TTG	TTT	AAG	CTG	317

318	ATA GAT AAT GTA ATG CAA AAG AGT AAA GTT AAG CTT TTG ATA AGG	362
363	CTT TGT TCA TAG AGT AGT GGT TTA CTG TAG TGA TTC ATC TTA TAT	407
408	ATC TAT GCA TAG ATA CCT ACT GGT CTT GAA TAT TTA ATG ATG GGT	452
453	ATT CAA GAC ATA CTT AAA CGT TAA ACC CTT CTA TTT ATC TAT GCC	497
498	TTT AGC AAG AGA AGC TTA TCT TAT TGC TTT ATT TAT CAG AGG TCC	542
543	TTG TTT ATT GCT GTG CTA CTA ATG GAT GTG AAA GAA CCT TAC CTA	587
588	ATG GTC TAA TGG GTT AGT GTT ATT AGC TTG CTA ATG TCT TTT TCA	632
633	CCA CGC TAT ATA ATT CTA TGC TTT GAA AGA ACC TTA CCT ATC TAT	677
678	ATG TAT CAG GTA AAT TGT TAT TTC GAA GGA GTC TAT TCT TTA ATG	722
723	GGC TCT TCT TTG TCT TAT AAT CAG TAG GCT TAT GTA TAT CTA ATG	767
768	GAG 770	

Gen: **psbD**
Name des Klons: pCh26p-1570-1586 (1062bp invertiert und im Komplement)
Homolog zu: *Cyanidium caldarium* PsbD (351AS) Acc.Nr.: CAA44459

1	ATG CAT ATA ATA TTT CGA ATA GAA ATG ATA CAT TAC GCT TCA AAT	47
48	TAC CTT GTG ATT CCT TAA TTC CTT ACT TTT CTA TAA CTG CAC CAC	92
93	CAT AAA GTT ATA AGA AAT ATC ACA ACA ACT TAA TAG CTT GGT TGG	137
138	TAA CAA GAA GAG AAA TAA AGA TTT CAA CAT CTT GAA CAC TAA TTG	182
183	GAT TGC AAT TCA TAT GAG TAG CAG AGC TAA ACA TTC ATT CTT CAT	227
228	TAA GCT CTT GTG TAA AGA AGA AGC TGT GCT TCT TAA CAA TAC CTT	272
273	AAC TCT AAT AAA CCT CAC TAA ATA CAA CAT CTC TTC TCA TCC ATA	317
318	TAG ATA GGT ATT GAT ACA GCC ATT AAC CAC GTC CAA TAA CAT AAG	362
363	ACT CCA TTA ATC TTT AAC CCA GTA GCA CTA AAT GGT CAA ATG TAC	407
408	ATA GCT CTA TGC ATA GTA GCA CTA AAC CAC AGC TGG TTA AAC CCA	452
453	TCA TTC AGT ATT CTT CCT ACA CAC TCT GCT TCT CCA AAA CCA TAA	497
498	ATA AGC TTG TCT TAT AAG TAG TGC TAA AGA TAA ACT TTC TTG ACC	542
543	AGT AAA TTT CAA TGC ATC TTT CTT CAA TCC ACA GCT GTT AAT GCT	587
588	TTG TTT ACC TAT TTC TCT GGT GCT GTA CCA GGA CCA TTA GCT TAA	632
633	TCT TTC AGA CCA TCT ATG AAG CTC AAG CGA TAA CCA TCT TGA TGT	677
678	TAA CGT TAC AAG GCT TTG TTA TTG TCA AGA CTG TAT CTT CTC TAC	722
723	TCA ACC AAA TAT ATG GCA ATT CAA GGT TAT TTC CTT GGA ACA TTC	767
	M A I Q G Y F L G T F	11
768	ACT TTA CTG GAT GAT TGG CTT AAA CGA GAT AGG TTT GTT TAT ATC	812
12	T L L D D W L K R D R F V Y I	26
813	GGC TGG TCA GGT ATA TTC TTC TTT CCG AAT GCT TAT TTA AGC TTG	857
27	G W S G I F F F P N A Y L S L	41
858	GGT GCA TGG CTT TCT GGA ACA ACA TTT GTG ACA TCT TTA TTT ACA	902
42	G A W L S G T T F V T S L F T	56
903	CAT GGT TTA GCC AGC TCT TAT TTA GAA GGC TGT AAC TTT ATA ACA	947
57	H G L A S S Y L E G C N F I T	71
948	GCT TCA GTA TCA ACA CCT GCC AAC TGT ATG GGC CAT TCA TTG CTC	992
72	A S V S T P A N C M G H S L L	86
993	TTT CTT TGG GGA GCA GAA TCT CAA CTG ATC TAT GAC TGT TGG TTA	1037
87	F L W G A E S Q L I Y D C W L	101
1038	CAA ATA GGT GGA TTA TGG TCT TTT 1061	
102	Q I G G L W S F	109

Gen: **psbD**
Name des Klons: pCh30rp-1587 (932bp)
Homolog zu: *Cyanidium caldarium* PsbD (351AS) Acc.Nr.: CAA44459

1	CTA GAG GTT CAT GGG TTT CTT ATT CTT TTG GTA GCA TTT AAT TTA	46
120	L E V H G F L I L L V A F N L	135

47	CGG	CAA	TAT	GAA	ATA	GCT	AGG	TTA	GTT	AAG	ATT	AGA	CCA	TAC	AAT	91
136	R	Q	Y	E	I	A	R	L	V	K	I	R	P	Y	N	150
92	TCA	ATA	GCA	TTC	TCT	GGC	CCA	ATA	GTC	GTT	TAT	ACT	TCA	GTG	TTC	136
151	S	I	A	F	S	G	P	I	V	V	Y	T	S	V	F	165
137	ATA	ATT	TAT	CCA	CTT	GGA	CAA	TCT	AGC	TGG	TAT	TTT	GGA	CCA	AGC	181
166	I	I	Y	P	L	G	Q	S	S	W	Y	F	G	P	S	180
182	TTT	GGT	ATT	ACA	GCT	ATC	TTT	AGA	TTC	CTC	TTA	TTT	TTA	CAA	GGA	226
181	F	G	I	T	A	I	F	R	F	L	L	F	L	Q	G	195
227	TTT	CAT	AAT	TGG	ACA	TTA	AAT	CCA	TTT	CAT	ATG	ATG	GGT	GTT	GCT	271
196	F	H	N	W	T	L	N	P	F	H	M	M	G	V	A	210
272	GGT	ATA	TTG	GGT	GGT	GCA	TTA	TTA	TCA	GCC	ATT	CAT	GGT	GCT	ACA	316
211	G	I	L	G	G	A	L	L	S	A	I	H	G	A	T	225
317	GTG	ATT	AAC	ACT	CTT	TAT	CAA	GAT	GGT	GGT	GCA	TAT	ACA	ACC	TTC	361
226	V	I	N	T	L	Y	Q	D	G	G	A	Y	T	T	F	240
362	CGT	GCC	TTT	TCA	CCT	ACT	CAG	CCA	GAA	GAG	ACG	TAT	TCC	ATG	GTA	406
241	R	A	F	S	P	T	Q	P	E	E	T	Y	S	M	V	255
407	ACT	GCA	AAT	AGG	TTC	TGG	TCC	CAA	ATC	TTT	GGA	ATA	GCA	TTT	TCT	451
256	T	A	N	R	F	W	S	Q	I	F	G	I	A	F	S	270
452	AAT	AAA	CGA	TGG	CTG	CAT	TAC	TTC	ATG	TTG	TTT	GTC	CCA	CTA	GCA	496
271	N	K	R	W	L	H	Y	F	M	L	F	V	P	L	A	285
497	GGT	ATG	TGG	ACC	TCT	TCA	ATA	GGT	CTT	ATT	GGT	TTA	GCA	TTT	AAT	541
286	G	M	W	T	S	S	I	G	L	I	G	L	A	F	N	300
542	CTT	CGT	GCT	TAT	GAC	TTT	ATT	TCT	CAA	GAA	CTT	AAG	GGT	GGA	GAA	586
301	L	R	A	Y	D	F	I	S	Q	E	L	K	G	G	E	315
587	GAT	CCT	GAG	TTT	GAA	ACC	TTT	TAT	ACA	AAG	AAC	ATA	CTT	CTA	AAT	631
316	D	P	E	F	E	T	F	Y	T	K	N	I	L	L	N	330
632	GAA	GGA	ATA	CGT	CTT	TGG	ATG	GCA	GTG	CAA	GAT	CAA	CCA	CAT	GAA	676
331	E	G	I	R	L	W	M	A	V	Q	D	Q	P	H	E	345
677	AAC	CTA	CAA	TTC	CCA	GAA	GAA	GTA	TTA	CCA	AGA	GGG	AAT	TCT	CTT	721
346	N	L	Q	F	P	E	E	V	L	P	R	G	N	S	L	360
722	TAA	GCT	TGT	GTT	ATG	CAA	GCA	GAA	TGC	CTA	TCT	TTA	TGT	TGC	AAT	766
241	*															
767	TGG	TTC	TAA	AGA	GTT	CGA	AGA	GTT	CAT	AAC	ACT	TTG	CCT	GTA	GAT	811
812	GCA	CGT	TAG	TTT	AAT	CAA	GAG	ACA	AGA	TGT	TTT	CGA	TAT	CCA	GAG	856
857	TCT	ATG	ACT	TAT	GAG	TCT	ATG	AAT	CAG	TAC	TTA	TAT	GCA	TCC	AAT	901
902	AGA	TTA	ATG	GGC	TAT	GTT	AAG	CGA	TTA	GTG						931

Gen: **psbE**
Name des Klons: 43-cyc5.seq (1118bp)
Homolog zu: *Amphidinium carterae* PsbE (77AS) Acc.Nr.: CAC34541

1	TGA	ATA	ATT	AGT	ACC	GGT	GAA	AGA	CCT	ATC	GTT	GAT	ATC	TTA	CAG	46
1	*	I	I	S	T	G	E	R	P	I	V	D	I	L	Q	15
47	GAT	TGT	CGA	TAT	TGG	GTT	ATA	CAT	GTA	ATT	ACC	ATA	CCA	GCA	CTC	91

16	D	C	R	Y	W	V	I	H	V	I	T	I	P	A	L	30
92	TTT	ATA	TCT	GGT	GTT	GTC	TGT	GTT	GCA	TCA	GGA	ATT	CTC	TTT	AAT	136
31	F	I	S	G	V	V	C	V	A	S	G	I	L	F	N	45
137	GTT	GCT	GGT	ACA	GCT	AAT	TGG	TTA	GAT	TAT	TTC	TCT	TTT	GTA	ACA	181
46	V	A	G	T	A	N	W	L	D	Y	F	S	F	V	T	60
182	AGC	TTA	TCT	TTA	ATA	AAC	GAT	AGA	TTT	TCA	ATT	GGT	ATG	TAT	CTG	226
61	S	L	S	L	I	N	D	R	F	S	I	G	M	Y	L	75
227	TAG	GAC	AAT	AAA	GCT	TTT	AAC	AAG	GAA	TTC	TTT	ATA	TCA	GGT	GTT	271
76	*															
272	GTT	AAG	ACT	CAA	GAA	TGA	ATA	GGT	AGT	GTA	AAG	CTA	AAG	CTT	AAG	316
317	AAT	GCT	CTT	GCA	ATA	CTG	AAA	TTG	CAT	TGT	AGC	AGC	AGA	TCC	TTT	361
362	GTA	ATG	GTA	TGG	AGC	TAA	AGC	TTA	GTC	TTG	AAT	TTA	ATG	GGT	GGA	406
407	ATC	ATT	ATT	CAG	CTG	ATC	AGC	TGT	AAT	TAC	CTT	GTC	TTT	GGA	GGT	451
452	GGA	ATT	CTT	CTT	AGC	ACT	ACA	ATA	TCA	CTG	TTT	CAG	GCT	AAA	TGC	496
497	CCA	AAG	AAA	ATG	GGC	TCT	TAT	GAA	AAT	GAA	TCC	ATA	ACC	AAC	AGC	541
542	TAC	TGA	TTG	CAA	AGA	CCC	ATA	TCA	TTT	AAC	AAT	TCA	TTG	AAT	CCT	586
587	TTG	GTA	TCA	ATA	ACG	TTA	CGC	TAA	TGC	TTA	GCT	TTA	TTC	AAA	GCT	631
632	GTA	TTA	AGG	TAC	TAA	TCT	ACG	ATA	CTA	CTT	CAC	CAC	CTA	TCT	ATA	676
677	TGT	ATC	AGG	TAA	ATT	GTT	ATT	TAT	CGT	TAC	AAC	CCA	TGC	AGG	TAT	721
722	AAG	ACA	AGC	TTT	TCT	TAC	GAT	ATT	GCA	TTA	CAG	ATA	ATT	ACC	CAT	766
767	GCT	CAA	GAG	CTT	ATA	GCA	CTA	TAT	CAC	TGC	TGC	TTC	ATT	AAT	TCA	811
812	TTA	CGC	AAC	CAG	TAT	TTA	CAG	TAC	CTT	ATC	TAT	GAT	TGG	CAC	TAA	856
857	TGT	TTA	ATA	AAA	GTA	GCA	TTA	CTT	AAC	CAC	GTC	CAA	TGG	GTA	TCA	901
902	ACA	GTT	TCA	TTG	AGC	ACA	ATC	TTT	AAC	CCA	TCT	ATT	AAT	ATG	CAT	946
947	TTT	ACC	ACC	AAA	TAC	AAA	GGA	TTG	GAA	AAG	AAA	GAT	GTC	CAA	AAC	991
992	CAA	GAA	GGT	TCT	TTT	AGA	TTA	TTG	GAT	CCA	TTG	AAT	TCC	TTA	GTC	1036
1037	TCT	TGA	TTT	ATC	AGA	GAT	TTT	ACC	AGT	AAA	TTA	CCT	TGT	GCA	ATA	1081
1082	CCA	CTG	AAA	GAG	TCT	AAT	CTT	AAT	ATT	TCA	ATC	AAA				1118

Gen: **petB** mit normalen N-Terminus
 Name des Klons: pCh59rp-1566 (624bp invertiert und im Komplement)
 Homolog zu: *Heterocapsa triquetra* PetB (219AS) Acc.Nr.: AF130037

1	ACT	GTT	CTT	TAT	CGT	TAG	CAA	CCC	ATG	CAG	GTA	TAA	GAC	AAG	GCT	47
48	TCT	CTT	ACG	ATA	TTG	CAT	TAC	AGA	TAA	TTA	CCC	ATG	CTC	AAG	AGG	92
93	CTT	ATA	GCA	CTA	TAT	CAC	TGC	TGC	TTC	ATT	AAT	TCA	TTA	CGC	AAC	137
138	CAG	TAT	TTA	CAG	TAC	CTT	ATC	TAT	GAT	TGG	CAC	TAA	ACC	AAT	GCA	182
183	ACT	TTA	TAA	CGT	TAC	AAC	CCA	TTA	CAT	TAA	ACC	TTA	AGG	TTC	TTT	227
228	CAC	ATG	AGC	TCT	CTT	GAA	TCA	TTA	CAC	ACA	TGG	AGG	TAT	TGC	TTG	272
273	TAG	TTG	GGC	ATT	TTT	CAT	CTC	GAA	AGA	TAG	GTA	CAA	CAT	AAT	GGT	317
318	TTC	AAT	TCT	ATT	CTT	TAT	ACC	TAA	AGC	AGG	TAT	TCA	ATG	CTT	AAG	362
363	TTT	AAT	TCT	TCT	TGG	CTT	TAG	CTC	AGT	AGA	TAT	TTC	CCA	AGC	TCA	407
408	TTT	ATC	TTT	GGT	TCT	ATG	GGT	TTT	CTT	TAT	AGG	TGG	TGT	GAA	GAA	452
1						M	G	F	L	Y	R	W	C	E	E	10
453	CGT	TTT	GAG	TTT	CAA	GTT	ATA	GCA	GAT	GAT	ATT	CTA	GCT	AAG	TTT	497
11	R	F	E	F	Q	V	I	A	D	D	I	L	A	K	F	25
498	GTA	CCA	GTA	CAT	ATG	AAC	ATA	TTC	TAC	TGC	TTT	GGT	GGC	ATT	CTA	542
26	V	P	V	H	M	N	I	F	Y	C	F	G	G	I	L	40
543	TTA	ACT	TCC	TTT	CTT	TTT	CAT	ATC	AAT	GCA	AGA	GAG	CTT	AAG	GTA	587
41	L	T	S	F	L	F	H	I	N	A	R	E	L	K	V	55
588	ATA	TTA	CTT	CAA	ACT	ACT	TTT	GGT	TGG	TTA	ATA	AGA				623
56	I	L	L	Q	T	T	F	G	W	L	I	R				67

Gen: **petB** mit unnormalen N-Terminus
 Name des Klons: pCh19rp-1564 (645bp invertiert und im Komplement)
 Homolog zu: *Heterocapsa triquetra* PetB (219AS) Acc.Nr.: AF130037

1	GAT	ACT	GTC	TCA	ACC	ATT	AGT	TGT	GCA	CCC	ATT	AAA	TTA	TAT	CGT	47
48	TAC	AGC	TCT	TCT	TTG	TTG	CTG	GTC	CTT	AAT	CAA	TCA	ATT	CTT	GCC	92
93	AAT	AAC	TTT	CTC	TGC	CAC	CAA	GCA	TTG	TAC	AAA	GGA	TCT	TTA	GAT	137
138	GGT	TGT	GGA	TCT	AAA	CTA	ACG	TTA	AGG	TTT	AAT	GCC	AGA	TAA	TAA	182
183	ATA	TCG	TGA	TGT	ACC	AAT	TTA	GGT	TTC	AAG	CTA	TAA	GAT	TAA	ACA	227
228	CTG	CTT	TAA	ACA	CTA	ATG	ACT	TTC	ATT	TAG	GTC	TTG	GTT	ATT	GGT	272
273	ATA	TTA	TCT	TAA	GCA	TCA	CTC	TTC	TTG	TCT	TTG	ATC	TAG	TCT	TCT	317
318	CTT	CTG	CTT	TGC	TTA	GCT	CTA	TGG	ATA	ACA	ATT	TAA	TGC	CTG	TTG	362
363	TAT	TAT	AAT	GAT	GCA	ATA	AAC	TTT	AGG	CTG	GTT	CTG	TTG	AAA	TGA	407
408	AAT	GAT	TAA	GAC	TTC	ATT	ACC	TAC	CTT	AGT	ATT	TAG	CAA	GCT	AAA	452
												*	Q	A	K	149
453	GAG	AAC	CAA	TAT	CGT	AAC	GAT	AAA	GCT	AAA	GCT	TAT	CTT	GTA	GCA	497
	E	N	Q	Y	R	N	D	K	A	K	A	Y	L	V	A	17
498	GAT	GAT	ATT	CTA	GCT	AAG	TTT	GTA	CCA	GTA	CAT	ATG	AAC	ATA	TTC	542
18	D	D	I	L	A	K	F	V	P	V	H	M	N	I	F	32
543	TAC	TGC	TTT	GGT	GGC	ATT	CTA	TTA	ACT	TCC	TTC	CTT	TTT	CAT	ATC	587
33	Y	C	F	G	G	I	L	L	T	S	F	L	F	H	I	47
588	AAT	GCA	AGA	GAG	CTT	AAG	GTA	ATA	TTA	CTT	CAA	ACT	ACT	TTT	GGT	632
48	N	A	R	E	L	K	V	I	L	L	Q	T	T	F	G	62
633	TGG	TTA	ATA	AGA												644
63	W	L	I	R												66

Gen: **ycf24/16**
 Name des Klons: 69.seq (1954bp)
 Homolog zu: *Cyanophora paradoxa* Ycf24 (486AS) Acc.Nr.: P48260
Cyanophora paradoxa Ycf16 (259AS) Acc.Nr.: AAA81249

1	AAG	CTT	GGT	ATT	TCG	CTA	ACA	GAG	CAA	AAG	AGA	CTC	ACT	GGT	GTC	45
100	K	L	G	I	S	L	T	E	Q	K	R	L	T	G	V	115
46	GCA	GTA	GAT	GCA	GTG	ATC	GAC	TCC	GTA	TCT	GTT	GCC	ACT	ACA	TTT	90
116	A	V	D	A	V	I	D	S	V	S	V	A	T	T	F	130
91	AAA	GAT	ACA	CTG	GGT	AGA	CTT	GGT	ATT	ATT	TTC	TGT	TCA	TTT	TCC	135
131	K	D	T	L	G	R	L	G	I	I	F	C	S	F	S	145
136	GAG	GCA	GTA	AAA	GAG	CAT	CCA	GAA	CTA	GTC	AGA	AAA	CAT	ATG	GGT	180
146	E	A	V	K	E	H	P	E	L	V	R	K	H	M	G	160
181	ACA	GTA	GTA	CCT	ACT	TCC	GAT	AAC	TAC	TTC	GCT	GCC	TTG	AAT	TCT	225
161	T	V	V	P	T	S	D	N	Y	F	A	A	L	N	S	175
226	GCA	GTG	TTT	TCG	GAT	GGG	TCA	TTC	GCT	TAC	ATT	CCC	AAG	GGA	GTA	270
176	A	V	F	S	D	G	S	F	A	Y	I	P	K	G	V	190
271	AGA	TGC	CCA	ATG	GAG	CTT	TCT	ACA	TAT	TTC	AGA	ATC	AAT	GCA	GCC	315
191	R	C	P	M	E	L	S	T	Y	F	R	I	N	A	A	205
316	AAT	ACA	GGT	CAG	TTT	GAA	AGA	ACG	CTT	ATT	GTG	GCT	GAT	GAA	GGT	360
206	N	T	G	Q	F	E	R	T	L	I	V	A	D	E	G	220
361	TCT	TAT	GTT	AGT	TAT	TTA	GAA	GGC	TGT	ACA	GCA	CCA	CAA	CGC	GAT	405
221	S	Y	V	S	Y	L	E	G	C	T	A	P	Q	R	D	235

Ycf24

406	GAA	AAT	CAA	TTG	CAT	GCA	GCA	GTG	GTT	GAB	ATC	AAA	GCT	GCC	AAA	450
236	E	N	Q	L	H	A	A	V	V	A	I	K	A	A	K	250
451	GAT	GCT	GAG	GTA	AAG	TAT	TCA	ACT	GTA	CAA	AAC	TGG	TAC	CCT	GGA	495
251	D	A	E	V	K	Y	S	T	V	Q	N	W	Y	P	G	265
496	GAC	AAA	AAT	GGT	AAT	GGA	GGC	ATT	TAC	AAT	TTC	GTG	ACC	AAA	CGT	540
266	D	K	N	G	N	G	G	I	Y	N	F	V	T	K	R	280
541	GGT	ATT	TGC	GAA	GGC	GAT	AAC	TCC	AAA	ATT	TCA	TGG	ACA	CAG	GTT	585
281	G	I	C	E	G	D	N	S	K	I	S	W	T	Q	V	295
586	GAG	ACA	GGT	TCA	GCT	GTT	ACG	TGG	AAA	TAC	CCT	TCA	TGC	ATC	CTC	630
296	E	T	G	S	A	V	T	W	K	Y	P	S	C	I	L	310
631	AAA	GGA	GAT	AAT	TCT	CAA	GGC	GAG	TTC	TAT	TCA	GTG	GCT	GTT	ACT	675
311	K	G	D	N	S	Q	G	E	F	Y	S	V	A	V	T	325
676	AAT	AAC	TAC	CAA	CAG	GCA	GAT	ACG	GGT	ACA	AAA	ATG	ATC	CAC	ATA	720
326	N	N	Y	Q	Q	A	D	T	G	T	K	M	I	H	I	340
721	GGG	AAG	AAT	ACC	AAA	TCG	AGA	ATT	GTT	TCG	AAA	GGT	ATT	TCA	GCT	765
341	G	K	N	T	K	S	R	I	V	S	K	G	I	S	A	355
766	GGT	TAT	TCT	CAG	AAT	AGC	TAT	CGT	GGT	CAG	GTA	CAA	GTA	ATG	AAA	810
356	G	Y	S	Q	N	S	Y	R	G	Q	V	Q	V	M	K	370
811	CGT	GCT	GAG	AAT	GCA	AGA	AAC	TTC	TCA	CAA	TGT	GAC	TCA	TTA	TTA	855
371	R	A	E	N	A	R	N	F	S	Q	C	D	S	L	L	385
856	ATG	GGT	AAT	AAA	TGT	GGA	GCA	CAC	ACC	TTC	CCT	TAT	ATC	GAT	ATT	900
386	M	G	N	K	C	G	A	H	T	F	P	Y	I	D	I	400
901	GAA	AAC	TCA	TCT	GCA	CAA	GTT	GAG	CAT	GAG	GCA	ACT	ACA	TCA	AAA	945
401	E	N	S	S	A	Q	V	E	H	E	A	T	T	S	K	415
946	ATC	GGT	GAA	GAT	CAA	ATC	TTC	TAC	TGC	CAG	CAA	AGA	GGC	ATT	GAT	990
416	I	G	E	D	Q	I	F	Y	C	Q	Q	R	G	I	D	430
991	GAA	GAA	TCA	GCG	GTA	GCC	CTG	ATT	GTA	AAT	GGT	TAC	GCT	AAA	GAA	1035
431	E	E	S	A	V	A	L	I	V	N	G	Y	A	K	E	445
1036	GTA	TTG	AAT	AAA	TTA	CCA	ATG	GAG	TTT	GCC	GTT	GAG	GCA	CAA	AAA	1080
446	V	L	N	K	L	P	M	E	F	A	V	E	A	Q	K	460
1081	CTA	CTC	GCA	TTG	ACC	CTA	GAG	GGT	TCA	GTG	GGA	TAA	TCA	CAC	TCC	1125
461	L	L	A	L	T	L	E	G	S	V	G	*	S	H	S	
1126	AAT	TTC	AAA	AGA	CAA	AAG	AAA	TGT	AAT	CTA	TAA	AGA	ATT	TAG	AGG	CC 1170
	N	F	K	R	Q	K	K	C	N	L	*	R	I	*	R	
		F	Q	K	T	K	E	M	*	S	I	K	N	L	E	A 9
1173	AGA	ATC	GAA	GAG	AAA	GAA	ATT	CTC	AGA	GGT	ATT	AAC	CTA	GAA	GTA	1217
10	R	I	E	E	K	E	I	L	R	G	I	N	L	E	V	24
1218	AAA	CCT	GGA	GAG	ATT	CAT	GCC	ATA	ATG	GGG	CCC	AAT	GGA	TCT	GGA	1262
25	K	P	G	E	I	H	A	I	M	G	P	N	G	S	G	39
1263	AAA	AGT	ACA	CTC	GCT	TCT	GTA	CTT	GCT	GGT	CGT	GAG	GAC	TAC	GAG	1307
40	K	S	T	L	A	S	V	L	A	G	R	E	D	Y	E	54
1308	GTG	ACT	TCA	GGA	GAT	GTT	GAC	TTC	CTG	GGA	AAA	GAC	CTT	TTG	GAT	1352
55	V	T	S	G	D	V	D	F	L	G	K	D	L	L	D	69

Ycf24

Ycf24

Ycf16

1353	ATG	GAT	GCG	GAT	GAA	AGA	GCT	CGA	GAA	GGT	ATC	TTT	TTG	GCA	TGT	1397
70	M	D	A	D	E	R	A	R	E	G	I	F	L	A	C	84
1398	CAA	TAC	CCT	GTG	GAA	ATC	CCA	GGG	GTT	AGT	ACT	ACT	AAC	TTC	ATG	1442
85	Q	Y	P	V	E	I	P	G	V	S	T	T	N	F	M	99
1443	AAA	ACC	GCT	ATC	AAC	CAA	GTA	AGA	GAG	CAC	CAT	GGT	GAA	AAA	CCT	1487
100	K	T	A	I	N	Q	V	R	E	H	H	G	E	K	P	114
1488	TTA	GAT	GCT	GTT	TCT	TTC	TTG	AAG	TTG	ATG	AAA	GAG	AAG	ATG	AAA	1532
115	L	D	A	V	S	F	L	K	L	M	K	E	K	M	K	129
1533	CTT	GTT	GAA	ATC	GRT	CAG	TCA	TTG	CTA	AGC	CGA	TCA	CTA	AAC	GAA	1577
130	L	V	E	I	Y	Q	S	L	L	S	R	S	L	N	E	144
1578	GGC	TTC	TCT	GGA	GGT	GAA	AAG	AAA	AGA	AAT	GAG	ATT	TTC	CAA	ATG	1622
145	G	F	S	G	G	E	K	K	R	N	E	I	F	Q	M	159
1623	GCT	ATG	CTT	GAG	CCG	AAG	TTG	GCC	ATC	CTC	GAT	GAA	ACT	GAC	TCG	1667
160	A	M	L	E	P	K	L	A	I	L	D	E	T	D	S	174
1668	GGC	CTT	GAC	ATT	GAT	GCC	CTG	AAA	ATT	GTG	GCG	AAC	GGT	GTA	AAC	1712
175	G	L	D	I	D	A	L	K	I	V	A	N	G	V	N	189
1713	GCA	CTT	AAG	TCK	AAA	GAT	AAT	GCG	ACT	ATT	GTT	GTA	ACT	CAT	TAC	1757
190	A	L	K	?	K	D	N	A	T	I	V	V	T	H	Y	204
1758	CAG	AGA	CTA	CTG	GAT	TAC	ATT	GTG	CCG	GAT	TAT	GTA	CAT	GTA	TTG	1802
205	Q	R	L	L	D	Y	I	V	P	D	Y	V	H	V	L	219
1803	TAC	AAA	GGG	CGC	ATC	GTT	AAG	TCT	GGT	ACC	AAG	GAC	TTM	GCC	CTT	1847
220	Y	K	G	R	I	V	K	S	G	T	K	D	X	A	L	234
1848	GAA	TTA	GAG	GCA	AAA	GGT	TAC	GAT	TGG	ATT	AAA	GAA	GAA	GTG	ACG	1892
235	E	L	E	A	K	G	Y	D	W	I	K	E	E	V	T	249
1893	CAA	CTG	TTT	AAG	CAA	TGG	ATA	AAT	TAT	CAG	GTC	AAT	CTA	TTT	TAG	1937
250	Q	L	F	K	Q	W	I	N	Y	Q	V	N	L	F	*	263
1938	ATG	CAC	TGA	CTG	GTA											1952

Ycf16

Plastiden-DNA-Sequenzen, die aus der RAPD erhalten wurden:

Klonname: cp1p (kein Homolog; eine Sequenzwiederholung)

GGTTCCTTTGGCCCAATATGCCCAAAGCATTATACAAGCAGCACTCTTACAGTAAGGTTTAGGTTAGTCATTAGCA
AGCTAATATACCAGTACCTTAATGTGGTTCAATAACGTTACAACCTCATTGGTGGTAGTAGCTAAACATGTAATT
CGAATTCCTTACCTAAGCTTGCTTTATACTATAACAACCTTTTCATATCACAAACGGAATTTAACATACAGATGCAG
AGAAGCTTATGGTACAGAGAAGAAAGAATAACAAGCTCATACCAGCTGCTGATCAGCTGTAACAAGACTTGTCTT
GTATTGAACAAGGCTTTGTTCATATGAGCTAGTGTATATACAGGTCTGCTGCTTGCASACCACTAAAGACCTGT
AGATGGTTCATTCCAATTCTTCGAATTGTAGAGCTAGAGCAAAGAATAACAAGGtTCTTTCTAAATACCACACCA
GTAACCTAAGGtAGGTACCTATTTCATATGCATAAGACATGCACAACCTCTTAATGCAGGTGAGAAATACAGCTACTG
ATTGCAAAGACCCATACATATTGAAGCATTACCTTGTGCTATAGGCATACAGCTACTGATTGCAAAGACCCATAT
AGCTACGCTAAAGAATGAACCTTAAGCAGAGCTAAAGCTCTTGTGTAAAGAAGAAGCACAGCTTCTCTATTGACT
TTATTAATAGCGTGGtGAAAAAGACATTAGCATTAAATTGTAGCAAAGAAGTCATTGATATWATAACAGCcAGCA
TAGAAtTATATAGCGtGGTGAATCCYTATgTTTatAGGCATTacaGTAACAACcCTGATAAMCYTGaTCGAAAA
tAATCAWGCTTTCWCGCYCAWAcRtagGKGGTCHWGGAaTTtAACAMARCYCWCTGDWactGcTGAWWAWART

Klonname: cp1rp (kein Homolog)

GGTTCATGGGTTTCTATCTTTAATAGCATTAAATTTACGGCAATATGAAATAGCTAGGTTAGTTAAGATTAGACC
ATACAATTCAATAGCATTCTCTGGCCCAATAGTCGTTTATACTTCAGTGTTTCATAATTTATCCACTTGGACAATC
TAGCTGGTATTTTGGACCAAGCTTTGGTATTACAGCTATCTTTAGATTCTCTTATTTTTACAAGGATTTTCATAA
TTGGACATTAAATCCATTTTCATATGATGGGTGTTGCTGGTATATTGGGTGGTGCATTATTATCAGCCATTTCATGG
TGCTACAGTGATTAACACTCTTTATCAagATGGTGGTGCATATACaaccTTCCgTgCCTTTTCACCTACTCAGCC
AGAAGAGACGTATTCCATGGTAACTGCAAAATAGGTTCTGGTCCCAAATCTTTGGAATAGCATTTCCTAATAAACG
ATGGCTGCATTACTTCATGTTGTTTGTCCCACTAGCAGGTATGTGGACCTCTTCAATAGGTCTTATTGGTTTAGC
ATTTAATCTTCGTGCTTATGACTTTATTTCTCAAGAACCTAAGGGTGGAGAAGATCCTGAGTTTGAAACCTTTTA
TACAAAGAACATACTTCTAAATGAAGGAATACGTCTTTGGATGGCAGTGCAAGATCAACCACATGAAAACCTACA
ATTCCCAGAAGAAGTATTACCAAGAGGGAATTCTCTTTAAGCTTGTGTTATGCAAGCAGAATGCCTATCTTTATG
TTGCAATTGGTTCTYAAGaGTTTCGAAGAGTTTCatAAcACTTTACTGttgGaGCACGTTAKTTtAATCMaGaAGAc
AGawgTTTTtCCGWWtCMRRatctaWg

Klonname: cp4 (kein Homolog)

AAtAtGCCCAAAGCATTATACAAGCAGCACTCTTACagWAAGGwttagGtWAGtCAWtAGCAAGCtAAtAtACCA
GTACCTTAATGTGGTTCAATAACGTTACAACCTCATTGGTGGTAGTAGCTAAACatGTAAttCGAATtCctTACC
TAAGCttGCTTTAtActAtaACAACCTtTCatAtCACAAACGGAATTTAACAtACAGATGCAGAGAAGCtTatGGT
ACAGAGAAGAAAGAATAACAAGCWCatACCAGCWCWGAWCAGCtGTAACAAGACTWgtCttGtAttGAACAAGG
CtttGtTcAtAtGAGCtAGtGtWAWAWACAGGWCWGWCWGCAcACCACtAAAGACCTGTAGAtGGtWCAtWC
CAAttCtWCGAAttGTAGAGCTAGAGCAAAGAAWAACAAGGWWCWWCWAaAWACCACACCAGtAACWAAGGWAG
GtACCWAWWCAWAWGCATAAGACAWGCACAACWCWAAWGCAGGtGAGAAWACAGCWACWGAWtGCaAAGACCC
AWACAWAWWGAAGCAWtACCWWGWCWAAAGGCWACAGCWACaGaAWGCAAGACCCaAAtAGCWACGCaAAAG
AAWGAACCWAAAGCAGAGCWaAAGCWCWWGWGWAaAGAAGAAGCMCAGCaWCWCaAaWGACaWaAaa

Klonname: cp8 ([atpB](#))([psaB](#))(eventuell Minizirkel?)

ACATAGCTCTATGCATAGTAGCTTGGTTGGGTGCATATTATTTTCCaATAATGATAGTCTTGGTTCAATTCCATG
AGATTTAAAGACGTAACGATATTTATTGATGCTACCTTTATGTATGTCTATTAGACTCTTATGCCTATAGATATC
TACAAGACATTGTGCAACAGTCTTGATAAGCTTTATCGTAGAGTAAGGTTTAGCTGATGCCAAGAGATTAC[AAGG](#)
[AATCTATCCAGCTGTGGATCCATT](#)TGGGCCATAGATAATGCTTAGCTTTTGTTCATACAGTAGGTAATGATCTT
GTCTTGTTAATGTTTTACTGTGTTGCTTTAGCATTGGTCTCTTATGGTAGTCTTGAATATTTAATGATGGGTATT
CAAGACATACTTCTCTTTCAATTCAAATGGTGTGTGATAAAGACCTGTTTGGTCTCTAATTTACTGGTCAATCAA
CAAGAGTAGCGATAAACTTTATTGGCTCTCTTTATATCTTGAATTCGAAATACTTCTTCAATGCTTGGTTATATA
[ATGGTGCATCATGATACTATTGCTGCATTGTTGGAACAAGAAAAGCAGCTTTTAATAGAACCAGTACTTATGTAA](#)
[TGCACCTATCTTTAAGCTTGTCTTAGATACCTACTGGTGTGTATAAAGTACTGAAGATACTTGTCTCAACCATT](#)
[CTTTGTGGCATTGGtTATATATCTGTCTCTAATTCTATTCCCTGGTGTTCATCAGTTCTTTCACCTACTAATGG](#)
[GgAACATAAGCATTGtGtGtTtAMcAGCTGTGGATcTATaAcTc](#)

Klonname: cp8rp (kein Homolog)

GATCTAAAGACACAGATGCATAAAGCATCACATGAGCTCATAAGATACAGGTCTGCTGCTTGCAcACCATATAAG
 ACCTGTAGATATAGGCATATAGATAGGTACACATAACAATTCAAAGCTTTAGCTCCATACCATATAAGGGAAATG
 AGGAAATAACGATTACAACATCAAATTACCTTGTGCTATAGGCATGCAGAGATATAGGTTTCATGCTAACATAACA
 ATTACAGCATCACTTGGGTAACAAGAGTAGATAACGATTTATCGTTACCCATATCTATCACCAGCTTAAGGTTAT
 AGCACCATTACATTCTCTTCGATCATTTCATGGTTGTGTAAAAGACACACACTGTAACATAAAGGAtgcACCAcCA
 TAACaaGCTCATACCAGCTGCTGATCAGCTGTAACAAGACTTGTCTTGTATTGAACAAGGCTTTGTTTCATATGAG
 CTAGTGTTATATACAGGTCTGCTGCTTGCAcACcACTAAAGACCTGTAGATGGTTTCATTCCAAAGAGCTTTAGc
 tCTGCTACAAGACTACTGTCTTCAACCCCTTAAAGCTTTAGCTTTCTATAACCTTAAAGCTTGGTTGTATTTAGTG
 GTATGGTTCTAGCATCAATAGGTCTCAAAGAGCTTGTCTTACAAGCATAGATATATAGCTAGAGCAAAGAAcACT
 GCTACTCAGTAACCTCTTATTCAATAAAGCTATGAACCCATTAGACCATTAGCATAGTCTTGAAAtTWATATTGGG
 TTGGGAAAAGAAGAGACCAGTAAATTACCTTGTGCTATAGGcATATAAAtACAtTAGACAAGAAGGGTKGGAAta

Klonname: cp11 (kein Homolog)

RtgCAAgCtTGcATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGTTCTTTGGCCCAATATGCCCAAAGCATTATACAAGCAGC
 ACTCTTACAGtAAGGTTTtagGTTAGTCATTAGCAAGCTAATATACCAGTACCTTAATGTGGTTCAATAACGTTAC
 AACTCCATTGGTGGTAGTAGCTAAACATGTAATTCGAATTCCTTACCTAAGCTTGTCTTTATACTATAACAACCTT
 TCATATCACAACGGAATTTAAACATACAGATGCAGAGAAGCTTATGGTACAGAGAAGAAAGAATAACAAGCTCATA
 CCAGCTGCTGATCAGCTGTAACAAGACTTGTCTTGTATTGAACAAGGCTTTGTTTCATATGAGCTAGTGTTATATA
 CAGGTCTGCTGCTTGCAcACCACTAAAGACCTGTAGATGGTTTCATTCCAATTCTTCGAATTGTAGAGCTAGAGCA
 AAGAATAACAAGGTTCTTTCTAAATACCACACCAGTAACTAAGGTAGGTACCTATTTCATATGCATAAGACATGCA
 CAACTCTTAATGCAGGTGAGAAAATACAGCTACTGATTGCAAAGACCCATACATATTGAAGCATTACCTTGTGCTA
 TAGGCATACAGCTACTGATTGCAAAGACCCATATAGCTACGCTAAAGAATGAACCTTAAAGCAGAGCTAAAGCTCT
 TGTGTaAAGAAGAAGCACAGCTTCTCTATTGACTTTATTAATAGCGTGGtGAAAAAGACATTAGCATTAATTGt
 AGSCAAAGAAGTCATTGATATAATAACAGCMAGCATAGAATTATATAGCGtGGGTgAATCCTTATGTTTtaTAGGS
 ATTTaCaGtAAcCaACcCTGATAAACCTTGATcGAAAAtaATCAATGCTTTcTcSSStccAtAcAGKaGGKGGKc

Klonname: cp15 (psbB) (eventuell Minizirkel?)

gtgccAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCTACCAAAGCTGAGCTTTCCTTG
 AATAATCTTTAACTACAGATGctAATGAATACTCTGTACCATTTAAAAGACCTCTTGAAAAG
 AAGATAACCACTGATGTTTGTTCATGCTATAACGAGATTGAGCACGACGGAAAGGTATGTC
 TGCTCGAACAGTACCACCTTGGTCAATAAGAAGTACTGGAAATGTTTCAAAGAAAGCTGGCA
 TTCGCCGAATCGTTAAAGCTAATGAACCTCTTTCAAAGATTGAATGCCCAACCAATTCTGG
 ACCACACCATCACCTTTTAGTATGGGACCAGAGCGAAATAAACCACTTTAGATGGATTACA
 ACCAATATAGTCATAAAGTATTAACCTTCTCTGGTACTTGTTCCTCAAGCTTGTCTTATAAAGA
 AGCTGCTATTTAACGTTACACGACGTTCCACCTCCAAAGAGAAATATCCATTATCCCAGTGA
 TATCGAGATGGACCATACAGCTCTACTCCACTTGATACAGACCCATACCACATAAGAGAGTG
 ATTAGCAAGCTAATTGCATTGATAAAGGTTGTAAAGAAGACAGAAGCAATACTACTGCATAA
 GACCTCTTCTACATTACCCATGCTCAAGAGCTTATAGACTAATGGTCCTGGTCTTGATGAGA
 TATgYCACTTWCTAATGTAAGTaCCCATAAATCCAGCTACTATATGATTGGaAGAGATTACG
 CCATAACAAAAAGGRTCTAATCCaAGGAATGAATAGARGGGTTTAATAAATCGAATAGAACC
 AACAATACCTWAAGaGtctGATGTCctAGACCAGGGACcAgAtAcCAcTaATATGRGctAAc
 CMAAGCMtTaCAAaGAtAGAtGcWAAGaGgGTGtWTACcAAGgKTGaTYaGGgCCAgMMaG
 TWGTtKWCMtAMCA

Abbkürzungsverzeichnis

³² P	radioaktiver Phosphor
³⁵ S	radioaktiver Schwefel
Abb	Abbildung
Ac	Acetat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
Ci	Curie
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
CTP	Cytosintriphosphat
d	deoxy
dd	dideoxy
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	double strand
dYT	double Yeast Tryptone-Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
GTP	Guanosintriphosphat
IPTG	Isopropylthiogalactosid
IR	Inverted Repeat
kb	Kilobasenpaar
LSC	Large Single Copy
LGT	Low Gelling Temperature
N	Nukleosid
ORF	Open Reading Frame
P	Primer
p.a.	per analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
pt	Plastiden
R	Purin
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reverse Primer
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ss	single strand
SSC	Small Single Copy
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TTP	Thymidintriphosphat
Tris	Tris (hydroxymethylmethan) aminomethan
U	unit
X-Gal	5-bromo-4-chloro-indolyl-b-D-galactosid

Y
Ycf

Pyrimidin
hypothetical chloroplast reading frame

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

Die vorliegende Dissertation entstand am Institut für Botanik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in der Zeit von Februar 1998 bis September 2001.

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die mir geholfen haben, diese Arbeit anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt...

Herrn Prof. Dr. Klaus V. Kowallik für die Überlassung des Themas, seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft, sowie die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre in seiner Abteilung.

Herrn Prof. Dr. W. Martin für die Übernahme des Koreferates und Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. Bettina Stöbe, die einen sehr großen Anteil an dieser Arbeit hat.

Frau Christel von der Lippe, Frau Ina Schaffran, Frau Dr. Katja Schlink, Frau Dipl. Biol. Petra Fink, Frau Dr. Carola Leitsch und Herrn Dr. Wilfried Behn für die praktische Unterstützung und eine ständig freundliche Labor- und Büroatmosphäre.

Marion Pianka und Andrea Middelmann, das Beste was mir an dieser Uni passieren konnte.

Herrn Dipl. Biol. Andreas Michels für den gemeinsamen „Kampf“ durch das Studium bis hin zur Promotion.

Herrn Prof. Dr. U.-G. Maier, Herrn Dr. Stefan Zauner und allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Maier aus Marburg, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Herrn Prof. Dr. Holzwart für die 77K Fluoreszenzmessungen.

meinen Eltern, die so manches Kreuz mit mir zu tragen hatten, und meiner Freundin Stefanie, für den moralischen und seelischen Beistand, der sehr sehr nötig war.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Düsseldorf, Oktober 2001

Thomas Laatsch