

## 1 Einleitung

Der Vorgang der Evolution stellt sich als Abfolge schrittweiser Veränderungen dar, der von einfachen zu komplexen Individuen führte (Allsopp 1969). Wendet man dieses Prinzip auf die Entwicklung der eukaryotischen Zelle an, so lassen sich diese Schritte teilweise durch rezente Zwischenformen belegen. Unbestritten ist, dass alle Organismen einem Vorfahren entstammen (Florkin und Mason 1960-1964), da der Triplett-Code in allen Organismen grundsätzlich universell ist (Watson 1965, Dayhoff 1969). Auf einige wenige Ereignisse lässt sich auch die Entstehung der eukaryotischen Zelle mit Hilfe der Endosymbiontenhypothese zurückführen (Schimper und Meyer 1882, in Wilson 1925, Portier 1918, Wallin 1927, Schanderl 1948, in Lange 1966). Die interne zelluläre Symbiose war bereits in den 50er und 60er Jahren als zentraler Mechanismus zum Erwerb von Zellorganellen in der Evolution diskutiert worden (Lederberg 1952, Karakashian 1963, Karakashian und Siegel 1965). Lynn Margulis (1970) greift diese Theorie wieder auf, um sie anhand neuer biochemischer, genetischer, zytologischer und paläontologischer Informationen weiterzuentwickeln.

Der Wirt der Endosymbiose („Protoeukaryot“) musste als Voraussetzung für die Aufnahme von festen Partikeln, bereits über Endomembranen und Zytoskelett verfügen, nur so war die Aufnahme eines Eubakteriums und damit der Erwerb von Organellen möglich. Allgemein anerkannt ist heutzutage, dass der Ursprung der Mitochondrien in der Gruppe der  $\alpha$ -Proteobakterien liegt (Gray und Spencer 1996, Yang *et al.* 1985, Larsen *et al.* 1993, Viale und Arakaki 1994, Gupta 1995).

Alle Plastiden wiederum können auf ein einziges endosymbiotisches Ereignis zurückgeführt werden, bei dem ein primitiver Eukaryot ein photosynthetisches Cyanobakterium aufnahm (Burger *et al.* 1999, Delwiche und Palmer 1997, Douglas und Penny 1999, Turmel *et al.* 1999, Baldauf *et al.* 2000, Moreira *et al.* 2000). Einige eukaryotische Organismen erwarben die Photosynthese erst durch sekundäre Endosymbiose, wobei eine eukaryotische Zelle als Symbiont diente (Douglas und Gray 1991, McFadden 2001). Besonderes Kennzeichen dieser Eukaryoten sind Plastiden mit drei oder mehr Membranen (Douglas 1992).

Die „klassische“ Endosymbiontenhypothese, wie sie in den 70er Jahren von Margulis formuliert wurde, ist aufgrund hinzugewonnener molekularer Sequenzdaten heute weithin akzeptiert.

Die Entstehung und der Ursprung des Kerns sind bis heute noch weitgehend unverstanden. Gray und Doolittle (1982) gingen von unterschiedlichen Ursprüngen des Kerngenoms und der Organellengenome aus. Die genaue Untersuchung des Kerngenoms führte zu der Feststellung, dass die Kerngene für Replikation, Transkription und Translation archaebakteriellen Ursprungs sind, während viele Gene, die für Stoffwechselaktivitäten benötigt werden, einen eubakteriellen Charakter zeigen (Doolittle und Brown 1994, Olsen und Woese 1997).

Im Kern von Eukaryoten sorgen RNA-Polymerasen, die im Aufbau den eubakteriellen RNA-Polymerasen ähneln, für die Transkription spezifischer Gene. Bereits in den 70er Jahren zeigten Untersuchungen, dass die eukaryotischen Kern-RNA-Polymerasen I, II und III für die Synthese von großen ribosomalen RNAs, prä-mRNAs und snRNAs sowie tRNAs verantwortlich sind (zusammengefasst in Chambon 1975, Roeder 1976). Ähnlichkeiten in der Struktur der RNA-Polymerase-Untereinheiten und Antigenreaktionen weisen daraufhin, dass diese Enzyme hoch konserviert sind (zusammengefasst in Paule 1981, Lewis und Burgess 1982, Sentenac und Kedinger 1985). Im Gegensatz zu eubakteriellen RNA-Polymerasen, welche aus nur 4-5 Untereinheiten zusammengesetzt sind, bestehen diese eukaryotischen Kern-RNA-Polymerasen jeweils aus 9 bis 14 Untereinheiten, wobei einige Untereinheiten von allen drei Enzymen geteilt werden, andere wiederum einzigartig sind. Für die selektive Transkriptionsinitiation werden zusätzliche Faktoren benötigt, die eine zeitliche und zellspezifische Regulation erlauben.

Neben Mitochondrien und Chloroplasten fand man in einigen Eukaryoten ein besonderes Organell, das Hydrogenosom, dessen Ursprung lange Zeit rätselhaft blieb. Da es grundsätzlich kein eigenes Genom besitzt, ist es genetisch vollkommen abhängig vom Kern (Müller 1997). Hydrogenosomen sind weit verbreitet, jedoch nur in Trichomonaden näher charakterisiert. Die genauere Untersuchung der Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* zeigte, dass der Kern von *Trichomonas* auch Gene für mitochondriale Hitzeschockproteine enthält und es sich daher bei den Hydrogenosomen um stark abgeleitete Mitochondrien handeln muss (Bui *et al.* 1996, Horner *et al.* 1996, Roger *et al.* 1996, Germot *et al.* 1996, Bozner 1996).

Hydrogenosomen benutzen für Anaerobier typische Stoffwechsellzyme und produzieren große Mengen Wasserstoff. Sie sind sehr stark an eine anaerobe Lebensweise angepasst. Die nachfolgend beschriebene Wasserstoff-Hypothese bietet eine Erklärung für die Entstehung der Hydrogenosomen.

Die Wasserstoff-Hypothese wurde 1998 von Martin und Müller aufgestellt und basiert, anders als die Endosymbiontenhypothese, vor allem auf dem Vergleich der Biochemie der Energiestoffwechselwege. Martin und Müller gehen, ebenso wie Margulis (1970), von einer Symbiose zwischen zwei Partnern als Ursprung für Eukaryoten aus. Dabei sehen sie in der Wasserstoff-Abhängigkeit eines strikt anaeroben Archaeobakteriums als Wirt, gegenüber einem Eubakterium ( $\alpha$ -Proteobakterium), das zur Atmung befähigt war und Wasserstoff unter anaeroben Bedingungen produzierte, die treibende Kraft der Symbiose.

Sofern der zweite Partner ein Archaeobakterium war, nutzte dieses  $H_2$  und  $CO_2$  als Energie- bzw. Kohlenstoffquelle, so wie auch viele heutige Archaeobakterien sehr stark auf Wasserstoff für ihre ATP-Produktion angewiesen sind (Schönheit und Schäfer 1995, Thauer *et al.* 1993). Eubakterium und Archaeobakterium konnten nebeneinander mit unterschiedlichen Stoffwechselwegen in anaerober Umgebung existieren. Erst bei Abwesenheit von  $H_2$ , der zuvor aufgrund geologischer Gegebenheiten vorlag, entstand ein Selektionsdruck, welcher das Archaeobakterium von dem Eubakterium und dessen „Abfallprodukten“  $H_2$  und  $CO_2$  abhängig machte. Eine engere physikalische Assoziation und ein stärkerer Oberflächenkontakt zwischen Wirt und Symbiont wurden dadurch forciert. Anschließend endosymbiotischer Gentransfer vom Symbiont zum Wirt, so wie er heute für viele Fälle des endosymbiotischen Gentransfers (Gray 1992, Brennicke *et al.* 1993) mit und ohne Rückführung der Genprodukte (Fenchel und Finlay 1995, Brinkmann und Martin 1996) in die Organellen bekannt ist, ermöglichte es dem Wirt, den Symbionten komplett zu umgeben. Es vollzog sich auf diesem Weg ein Wandel der Lebensweise des Wirts. Der Symbiont ging nach dem Transfer seiner Gene in den Kern entweder verloren, entwickelte sich zu einem Hydrogenosom oder einem Mitochondrium.

Anschließend folgte in den endosymbiotisch erworbenen Organellen eine Anpassungsphase, in deren Verlauf es zu Genverlust, Gentransfer und einer Abstimmung der Regulation zwischen Kern und Organellen kam. Im jeweiligen Organellengenom blieben die Gene übrig, die für die Regulation der organelleneigenen Stoffwechselwege (Atmung, Photosynthese), sowie für die Transkriptions- und Translationsprozesse essentiell waren. Als zentrales Enzym der Genexpression geriet die RNA-Polymerase in den Fokus der Untersuchungen der Organellentranskription.

Bereits in den 80er Jahren (zusammengefasst in Chamberlin und Ryan 1983) wurde die eubakterielle RNA-Polymerase von *Escherichia coli* untersucht. Sie besteht aus insgesamt vier verschiedenen Polypeptiden, die als Untereinheiten  $\alpha$  (*rpoA*),  $\beta$  (*rpoB*),  $\beta'$  (*rpoC*) und  $\sigma$  (Sigma-Faktor; *rpoD*) bezeichnet wurden. Die Elongation wird durch das „core“-Enzym, welches aus den Untereinheiten  $\alpha_2\beta\beta'$  zusammengesetzt ist, katalysiert. Zur selektiven Initiation wird zusätzlich zum „core“-Enzym die  $\sigma$ -Untereinheit benötigt. Die  $\sigma$ -Untereinheit scheint essentiell für eine ordnungsgemäße Transkriptionsinitiation zu sein. Die einzelnen Untereinheiten wirken bei den meisten Transkriptions-Aktivitäten mit, haben aber auch eigene definierte Aufgaben während der Transkription. So sind z. B.  $\beta$  und  $\beta'$  bei der Promotorerkennung wirksam, während  $\beta'$  außerdem für die DNA-Bindung zuständig zu sein scheint und  $\beta$  Bindungsstellen für Substrate und einen Teil für die katalytische Stelle für die RNA-Synthese besitzt.

Aufgrund des prokaryotischen Ursprungs der Organellen und deren Erwerb durch Endosymbiose (Gray und Doolittle 1982, Gray 1992, Gray 1999) erwartete man in den Genomen von Chloroplasten und Mitochondrien RNA-Polymerasesequenzen mit Homologien zu den RNA-Polymerasesequenzen von *E. coli*. Man ging davon aus, dass das für die Transkription benötigte Enzym, die RNA-Polymerase, im jeweiligen Organell kodiert sei.

In *Chlamydomonas reinhardtii* konnten plastidäre DNA-Sequenzen gefunden werden, die mit RNA-Polymerase-Genen von *Escherichia coli* hybridisierten (Watson und Surzycki 1983). Darauf folgende Sequenzanalysen von Landpflanzen zeigten, dass plastidäre DNA-Regionen für Polypeptide ähnlich der *Escherichia coli* RNA-Polymerase Untereinheiten  $\alpha$  (*rpoA*),  $\beta$  (*rpoB*),  $\beta'$  (*rpoC*) existieren (z. B. Ohme *et al.* 1986, Sijben-Müller *et al.* 1986, Shinozaki *et al.* 1986). Die zu *rpoC* aus *Escherichia coli* homologe Sequenz ist in Aufbau und Gestalt in verschiedenen Pflanzen sehr unterschiedlich (Ohyama *et al.* 1986, Igloi *et al.* 1990, Shimada *et al.* 1990). Zum bakteriellen *rpoD*-Gen homologe Sequenzen konnten dagegen nicht gefunden werden. Bereits die Hybridisierungen wiesen auf eine zusätzliche kernkodierte RNA-Polymerase in Chloroplasten hin.

In den Plastiden der nicht-photosynthetischen parasitischen Pflanze *Epifagus* stellten Morden *et al.* (1991) fest, dass die Transkription ohne jegliches *E. coli*-ähnliches RNA-Polymerase-Gen im Plastidengenom stattfand. Ob allerdings die Gene der *E. coli*-ähnlichen RNA-Polymerase in den Kern transferiert wurden, oder eine andere kernkodierte nicht *E. coli*-ähnliche RNA-Polymerase existiert, muss noch geklärt werden.

Bei hitzegebleichtem Roggen und einer Gerstemutante („Albostrians“) konnte trotz fehlender plastidärer Ribosomen eine Transkription bestimmter Plastidengene nachgewiesen werden. Die Translation der plastidenkodierten RNA-Polymerase-Untereinheiten fand jedoch nicht statt (Hess *et al.* 1993, 1994). Fehlende  $\sigma 70$ -ähnliche Promotor-Elemente bei einigen Plastidengenens wiesen zusätzlich auf eine Transkription durch eine andere RNA-Polymerase hin (Gruissem *et al.* 1986, Neuhaus *et al.* 1989, Klein *et al.* 1992, 1994, Vera und Sugiura 1995).

Zeitgleich fand Bogorad (1991) in der Chloroplasten-DNA von Mais Gene einer eubakterienähnlichen  $\alpha_2\beta\beta'$  RNA-Polymerase. Die Existenz mindestens zweier unterschiedlicher RNA-Polymerasen, die die plastidären Gene transkribieren, schien immer wahrscheinlicher.

Allison *et al.* (1996) konnten schließlich durch die Deletion des *rpoB*-Gens in Tabak die essentielle  $\beta$ -Untereinheit der plastidenkodierten RNA-Polymerase (PEP = plastid encoded plastid polymerase) ausschalten und damit die Existenz einer weiteren, kernkodierten plastidären RNA-Polymerase (NEP = nucleus encoded plastid polymerase) nachweisen.

In den meisten Chloroplasten existieren nach heutiger Kenntnis mindestens zwei RNA-Polymerasen, eine plastidenkodierte (*E. coli*-ähnliche) „multisubunit“-RNA-Polymerase und eine kernkodierte Phagentyp-ähnliche RNA-Polymerase.

Im Gegensatz zum Plastidengenom, wird das Mitochondriengenom, z. B. von Hefe, allein durch eine kernkodierte RNA-Polymerase transkribiert (Edwards *et al.* 1982, Wilcoxon *et al.* 1988), welche in ihrem Aufbau nicht der eubakteriellen RNA-Polymerase gleicht. Diese mitochondriale RNA-Polymerase setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, einer „core“-RNA-Polymerase, für die das RPO41-Gen kodiert (Kelly und Lehmann 1986, Greenleaf *et al.* 1986), und einem Spezifitätsfaktor, der für die selektive Initiation am neun Nukleotide umfassenden mitochondrialen Promotor benötigt wird (Osinga *et al.* 1982, Winkley *et al.* 1985).

In Hefe-Mitochondrien existieren mindestens 20 verschiedene Promotoren, die ein hoch konserviertes Sequenzmotiv (ATATAAGTA) besitzen, wobei die Transkriptionsinitiation am terminalen Adeninrest erfolgt. Mutagenesestudien haben gezeigt, dass das Consensus-Motiv allein in der Lage ist, hoch-effiziente Transkription *in vitro* zu dirigieren (Biswas *et al.* 1985, Schinkel *et al.* 1986). Es gibt bei Hefe keine upstream Promotor-Elemente, die denen der Tiere ähnlich sind. Sequenzvergleiche mitochondrialer Promotoren verschiedenster Pilzarten, unter anderen auch *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa*, zeigten deutlich die

Existenz einer konservierten Sequenz (Tracy und Stern 1995, Osinga *et al.* 1982, Clark-Walker 1985).

Die in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) auftretende mitochondriale RNA-Polymerase (Masters *et al.* 1987) ließ bei einem Vergleich der Aminosäuresequenz mit der *E. coli* RNA-Polymerase jegliche Homologie vermissen. Stattdessen wurde eine hohe Homologie zwischen der mitochondrialen RNA-Polymerase der Hefe und den DNA abhängigen RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T3 (McGraw *et al.* 1985), T7 (Moffat *et al.* 1984) sowie von SP6 (Kotani *et al.* 1987) festgestellt, speziell in Regionen, die auch zwischen beiden Phagen-RNA-Polymerasen hoch konserviert waren. Die „singlesubunit“-RNA-Polymerase (ssRNA-Polymerase) vom Bakteriophagen T7 benötigt keine zusätzlichen Faktoren für Initiation, Elongation und Termination der Transkriptionsreaktion (Moffat *et al.* 1984).

Erstaunlicherweise findet sich sowohl in den Mitochondrien der Tiere (Tiranti *et al.* 1997), als auch in den Mitochondrien der Landpflanzen (Hedtke *et al.* 1997, Weihe *et al.* 1997) und den Mitochondrien der Pilze (Masters *et al.* 1987) die Form der kernkodierte singlesubunit RNA-Polymerase (ssRNA-Polymerasen). Aufgrund der Existenz in einem  $\alpha$ -proteobakteriellen Endosymbionten wurde daher vermutet, dass ein T7-ähnlicher Phage, die ssRNA-Polymerase in den eukaryotischen Wirt eingebracht hat (Gray 1989, Schinkel und Tabak 1989) und den  $\alpha$ -proteobakteriellen Polymerase-Typ ersetzt hat (Gray 1992, Cermakian *et al.* 1996). Anschließend könnten dann die Replikations- und Transkriptionsmechanismen der Phagen begleitend in die Mitochondrien überführt worden sein (Schinkel und Tabak 1989, Clayton 1991).

Das Phagengenom, als Vektor für den Gentransfer in den Nukleus, wäre ein vorstellbares Szenario. Dagegen spricht allerdings die Tatsache, dass T7-ähnliche Phagen lediglich bestimmte Gruppen der Proteobakterien befallen, unter denen sich die Enterobakterien und andere  $\gamma$ -Proteobakterien (Hausmann 1988) befinden, nicht aber die Gruppe der Rickettsia-typischen  $\alpha$ -Proteobakterien. Woher genau die ssRNA-Polymerasen stammen, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Allerdings ist auch eine aktive DNA-Aufnahme in den Kern denkbar, wie bereits einmalig für den DNA-Import in Mitochondrien gezeigt werden konnte (Koulintchenko *et al.* 2003); der Gentransfer von Organellen zum Kern ist dagegen bereits vielfach beschrieben worden (Brennicke *et al.* 1993, Martin und Herrmann 1998).

Cermakian *et al.* (1997) konnten zeigen, dass das Gen für die kernkodierte ssRNAP (das Gen, das für die mitochondriale RNA-Polymerase in den meisten Eukaryoten kodiert) eindeutig monophyletischen Ursprungs ist, und scheinbar sehr früh in der Entwicklung der

eukaryotischen Zelle, gleichzeitig oder kurz nach der Endosymbiose der Mitochondrien, ihren Ursprung hat.

Nicht in allen Mitochondrien erfolgt die Transkription durch die kernkodierte Phagentyp-ähnliche RNA-Polymerase, bemerkenswerte Ausnahmen, die auf andere Entwicklungsstadien der mitochondrialen Transkription hinweisen, finden sich in ursprünglichen Organismen.

Lang *et al.* (1997) fanden zum Beispiel im mitochondrialen Genom des primitiven Protisten *Reclinomonas americana* überraschend vier Gene, die für eine eubakterielle RNA-Polymerase, wie sie auch im Chloroplastengenom zu finden ist, kodieren. *Reclinomonas americana* ist eng verwandt mit einer ursprünglichen Protozoen-Gruppe, die keine Mitochondrien enthält (O'Kelly 1993, Brugerolle und Mignot 1990, Cavalier-Smith 1987). Die mitochondriale DNA von *Reclinomonas americana* enthält die größte Anzahl von Genen (97), die bisher in Mitochondrien gefunden werden konnte; darunter befinden sich auch Gene, von denen zuvor nicht bekannt war, dass sie in Mitochondrien kodiert werden.

Der Gehalt, die eubakteriellen Charakteristika der Genomorganisation und die Expression des mitochondrialen Genoms von *Reclinomonas americana* ähneln dem proto-mitochondrialen Vorfahren-Genom (Lang *et al.* 1997) bisher am stärksten. Obwohl die Existenz von Phagentyp-ähnlichen RNA-Polymerasen mit Hilfe von PCR-Untersuchungen in vielen Eukaryoten nachgewiesen werden konnte, sind bisher jedoch keine derartigen Sequenzen in *Reclinomonas americana*, *Jakoba libera*, oder *Chlamydomonas reinhardtii* gefunden worden (Cermakian *et al.* 1996). *Reclinomonas americana* ist bisher der einzige Eukaryot, in dessen mitochondrialem Genom eine eubakterielle RNA-Polymerase gefunden werden konnte (Gray und Lang 1998).

Für die primitive Braunalge *Pylaiella littoralis* beschreiben Rousvoal *et al.* (1998) erstmalig die Existenz eines Gens einer Phagentyp-ähnlichen RNA-Polymerase im Mitochondriengenom. Zusätzlich konnten sie im mitochondrialen Genom dieser Braunalge Promotorregionen feststellen, bei denen es sich wahrscheinlich um Reste für einen Vorläufer der proteobakteriellen RNA-Polymerase handelt. Dieser Befund steht im starken Kontrast zu der Situation im Protisten *Reclinomonas americana*, welcher im mitochondrialen Genom die Gene für eine  $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ -70 proteobakterielle RNA-Polymerase trägt, und zu den Mitochondrien von Tieren, Landpflanzen und Pilzen, welche kernkodierte singlesubunit RNA-Polymerasen vom Phagentyp nutzen. Die Phagentyp-ähnliche RNA-Polymerase von *Pylaiella littoralis* besitzt im Vergleich zu den anderen Phagentyp-ähnlichen RNA-Polymerasen zehn der elf konservierten Aminosäure-Sequenz-Domänen (Masters *et al.* 1987, Oeser 1988), ebenso die katalytisch notwendigen Reste (Sousa *et al.* 1993). Das *Pylaiella littoralis*-RNA-Polymerase-

Gen ist im Vergleich zu allen anderen Phagentyp-ähnlichen RNA-Polymerase-Genen das kürzeste. Aufgrund der vorhandenen typischen proteobakteriellen  $\sigma$ -70 Promotoren kann bisher nicht ausgeschlossen werden, dass es in *Pylaiella littoralis* Mitochondrien nicht auch noch eine funktionierende kernkodierte RNA-Polymerase gibt, nachgewiesen wurde sie jedoch bisher nicht. Die Situation in *Pylaiella littoralis* scheint somit ein Zwischenstadium in der Evolution der Mitochondrien-Transkription darzustellen.

In Pflanzen (z. B. in Spinat, Senf, Tabak, Weizen und Mais; Allison *et al.* 1996, Bligny *et al.* 2000, Chang *et al.* 1999, Ikeda und Gray 1999a, Lerbs-Mache 1993, Pfannschmidt und Link 1994, Pfannschmidt und Link 1997, Pfannschmidt *et al.* 2000, Young *et al.* 1998) können die bisher gefundenen RNA-Polymerasen in zwei Klassen eingeteilt werden, einerseits die „multisubunit“-RNA-Polymerasen mit Ähnlichkeiten zum *E. coli*-Enzym, und andererseits die „singlesubunit“-RNA-Polymerasen, deren genaue Zusammensetzung noch nicht eindeutig geklärt ist, deren katalytische Untereinheit jedoch den RNA-Polymerasen von T3- und T7-Bakteriophagen ähnelt. In *Arabidopsis thaliana* sind mindestens drei RNA-Polymerasen für die Transkription im Chloroplasten notwendig, von denen nur eine plastidenkodiert ist (Hedtke *et al.* 1997, Hedtke *et al.* 1999, Hedtke *et al.* 2000), für Mitochondrien ist bisher nur eine kernkodierte RNA-Polymerase gesichert, eine weitere wahrscheinlich.

Zusammengenommen ergibt sich für die Transkription in Mitochondrien folgendes Bild: Tiere und Pilze nutzen eine einzelne kernkodierte Phagentyp-ähnliche RNA-Polymerase (Masters *et al.* 1987, Tiranti *et al.* 1997, Weihe *et al.* 1997). Im mitochondrialen Genom vom einfachen Protisten *Reclinomonas americana* finden sich stattdessen Gene, die für eine  $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ -70 eubakterielle RNA-Polymerase (Lang *et al.* 1997) kodieren. Ob es in *Reclinomonas* auch noch eine kernkodierte Phagentyp-ähnliche RNA-Polymerase gibt, ist bisher nicht bekannt. In *Pylaiella littoralis* existiert ein Gen für eine Phagentyp-ähnliche RNA-Polymerase im mitochondrialen Genom, sowie potentiell aktive  $\sigma$ -70 eubakterielle Promotor-Regionen. Wann und wie die Phagentyp-ähnliche RNA-Polymerase erworben wurde, bleibt eine offene Frage. Denkbar wäre deren Existenz bereits in den Vorläufern der  $\alpha$ -Proteobakterien, oder eine Aufnahme in der frühen Mitochondrienentwicklung. Reste von Phagentyp-ähnlichen DNA- und RNA-Polymerasen im Genom von Pilz- und Pflanzen-Mitochondrien (Robison *et al.* 1991, Weber *et al.* 1995) weisen auf eine frühe Aufnahme in die Mitochondrien und eine darauffolgende Duplikation und einen Transfer der mitochondrialen Gene in den Kern hin.

Bestimmte Phagentyp-ähnliche RNA-Polymerasen werden in *Arabidopsis*, Tabak und in dem Moos *Physcomitrella patens* sowohl in Mitochondrien als auch in Chloroplasten importiert, und eine Beteiligung an der Transkription beider Organellen wird angenommen (Cahoon und Stern 2001, Hedtke *et al.* 2000, Hedtke *et al.* 2002, Kobayashi *et al.* 2001, Richter *et al.* 2002). Diese RNA-Polymerasen sind neue Mitglieder einer sehr kleinen Gruppe von pflanzlichen Proteinen (Small *et al.* 1998), deren Import in beide Organellen (Chloroplasten wie Mitochondrien) experimentell nachgewiesen werden konnte.

Sowohl Chloroplasten als auch Mitochondrien besitzen noch ein eigenes Genom, auch wenn sich die Anzahl an Genen im Organellengenom seit der Endosymbiose dramatisch verringert hat. Die eukaryotische Zelle bedarf somit einer effektiven Methode, um die Kontrolle und Regulation von insgesamt zwei, bzw. drei verschiedenen Genomen zu ermöglichen.

Zwischen diesen drei Genomen besteht ein auffälliges Ungleichgewicht, was das Verhältnis an Genen anbelangt. Während im Kerngenom grundsätzlich 2 Allele pro Gen vorliegen, existieren pro Organell rund zehnmal so viele Kopien eines Gens. Bedenkt man die Menge an Organellen pro eukaryotischer Zelle, so kommt man auf ein Genverhältnis von 2 Allelen (im Kern) zu 1.000-10.000 in den Organellen.

Diese Tatsache macht deutlich, dass der Transkription dieser Gene eine zentrale Rolle in der Organellen-Biogenese zukommt. Eine Steuerung der Organellen-Biogenese durch Regulation der Transkriptmengen erscheint als eine Kontroll-Möglichkeit dieses Prozesses. Damit erhalten die für die Transkription essentiellen Enzyme, die RNA-Polymerasen, eine entscheidende Bedeutung. Die Kontrolle über verschiedene RNA-Polymerasen, Spezifitäts- und Transkriptionsfaktoren, und die Anzahl und Gestalt der Promotoren, ermöglicht den eukaryotischen Zellen eine entwicklungs- und gewebsspezifische Regulation der Transkription.

Die Interaktion zwischen Plastiden- und Kern-Genom werden durch komplexe Mechanismen gesteuert (Stern *et al.* 1997). Obwohl einige prokaryotische Genexpressionsmuster in Chloroplasten immer noch auftreten, sind die vielfältigen genetischen Mechanismen der RNA- und Proteinsynthese in den Chloroplasten neu, und scheinen der benötigten Flexibilität, bedingt durch den Entwicklungs- und Umgebungsstatus der Pflanze, Rechnung zu tragen.

Die Identifizierung und Charakterisierung der Chloroplasten-Promotoren wurde mit Hilfe von deletierten und mutierten Genen sowie in *in vitro*-Transkriptionssystemen durchgeführt (Gruissem und Zurawski 1985a, Gruissem und Zurawski 1985b, Link 1984). Die prokaryotischen Promotoren, die auch vor Genen und Genclustern in Algen und höheren

Pflanzen im Genom der Chloroplasten zu finden sind, werden von einer *E. coli*-ähnlichen RNA-Polymerase erkannt, die meist im Chloroplastengenom kodiert wird (plastid-encoded plastids RNA-Polymerase-Promotoren; Hajdukiewicz *et al.* 1997). Die Chloroplasten-PEP identifiziert, analog der *E. coli* RNA-Polymerase, Promotoren mit den Consensus-Elementen TTGACA und TATAAT, die an den Positionen -35 und -10 lokalisiert sind (Weihe und Börner 1999). Die -35/-10-Elemente funktionieren sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, die Anwesenheit des -35-Elements ist allerdings variabel. Bisher ist nicht geklärt, ob das verbleibende -10-Element dieselbe Funktion erfüllt, wie sein Gegenstück im -35/-10-Promotor (Igloi und Kössel 1992). Außer diesem prokaryotischen Promotor scheint es noch einige andere Promotoren in Chloroplasten zu geben.

So wird z. B. von Gruissem *et al.* (1986) für tRNA-Gene in Chloroplasten von Spinat und von *Chlamydomonas* (Jahn 1992) beschrieben, dass für diese keine upstream Sequenzen zur *in vitro* Transkription benötigt werden.

Ein weiterer Promotor-Typ findet sich primär in ribosomalen RNA- und anderen „housekeeping“-Genen, welche z. B. für Proteine des normalen Stoffwechsels der Chloroplasten kodieren. 16S rRNA-Gene besitzen typischerweise einen oder sogar mehrere bakterielle Promotoren, sowie einen NEP-Promotor, der ausschließlich von der kernkodierten RNA-Polymerase erkannt wird (Hajdukiewicz *et al.* 1997). Der NEP-Promotor kommt bei einer Reihe anderer Gene vor, grundsätzlich aber nicht bei photosyntheserelevanten Genen (Kapoor *et al.* 1997, Hajdukiewicz *et al.* 1997). Hajdukiewicz *et al.* (1997) stellten fest, dass die unterschiedlichen RNA-Polymerasen für die Transkription verschiedener Genklassen im Chloroplasten zuständig sind und diese zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten des Chloroplasten aktiv sind (siehe auch Mullet 1993, Hess *et al.* 1993). Die Existenz solch unterschiedlicher Promotoren ließ entweder auf unterschiedliche RNA-Polymerasen oder auf unterschiedliche Hilfsfaktoren in Chloroplasten schließen.

Der in Bakterien für die RNA-Polymerase essentielle  $\sigma$ -Faktor, konnte auch in Chloroplasten nachgewiesen werden. Jedoch fehlt dem Plastidengenom ein Gen für den  $\sigma$ -Faktor, der eine essentielle Komponente des RNA-Polymerase-Holoenzym in Eubakterien ist (Allison 2000). In einigen Rhodophyta wurde dieser Faktor als kernkodiert identifiziert (Liu und Troxler 1996, Tanaka *et al.* 1996).

Die plastidenkodierte RNA-Polymerase benötigt diesen kernkodierten  $\sigma$ -ähnlichen Faktor zur Promotorauswahl (Link 1994). Zusätzlich wird die Transkriptionsaktivität einiger Promotoren durch kernkodierte Transkriptionsfaktoren, die mit upstream-Elementen des

Promoterzentrums interagieren, moduliert (Sun *et al.* 1989, Iratni *et al.* 1994, Allison und Maliga 1995, Kim und Mullet 1995). In *Arabidopsis* sind sechs kernkodierte  $\sigma$ -ähnliche Faktoren beschrieben worden (Isono *et al.* 1997, Tanaka *et al.* 1997, Yao und Allison 1998, Lerbs-Mache 1999), die vorzugsweise in den Blättern akkumulieren (Allison 2000). Beardslee *et al.* (2002) berichten von dem sechsten  $\sigma$ -ähnlichen Faktor, AtSig5, der anders als die restlichen fünf Faktoren möglicherweise, sowohl in Chloroplasten als auch in Mitochondrien benötigt wird. Eine genauere Bestimmung der Funktion und der Lokalisierung steht hier jedoch noch aus.

Während der Chloroplastenentwicklung verändert sich die Plastidentranskription dramatisch, auch wenn die relative Transkriptionsrate vieler Plastidengene konstant bleibt. Man vermutet, dass bei der differenzierten Genexpression in den Chloroplasten posttranskriptionale und Translationsmechanismen eine wichtige Rolle spielen. In der frühen Chloroplastenentwicklung werden Gene mit NEP-Promotor aktiviert, während Photosynthese-Gene mit PEP-Promotoren zu diesem Zeitpunkt kaum nachweisbar sind; erst durch Belichtung verstärkt sich die Transkription an den PEP-Promotoren. Stern *et al.* (1997) beschreiben in ihrem Modell die Regulation von Chloroplasten-Transkription aus der Perspektive der Chloroplastenentwicklung. Dabei wird ersichtlich, dass der Kern mit Hilfe einer Phagentyp-ähnlichen RNA-Polymerase und einem CDF 2-Faktor (chloroplast DNA binding factor 2) die Transkription von „housekeeping“-Genen in der frühen Chloroplastenentwicklung „überwacht“, während nach zunehmender Belichtung (mit weißem und Blau/UVA-Licht) die Transkription mit Hilfe der plastidären RNA-Polymerase (vom *E. coli*-Typ) übernommen wird. Transkriptionsfaktoren aus dem Kern sorgen weiterhin für eine gewisse Kontrolle über den plastidären Transkriptionsapparat.

Bligny *et al.* (2000) untersuchten in Spinatplastiden den CDF 2-Faktor, welcher die Promotorerkennung durch die NEP-RNA-Polymerase ermöglicht. Eine Variante dieses Proteins, CDF2A, interagiert erstaunlicherweise mit der PEP. Somit könnte ein einziger Transkriptionsfaktor in Spinatchloroplasten zwei verschiedenen Transkriptionssystemen dienen.

Das Zusammenspiel zwischen den verschiedenen RNA-Polymerasen und unterschiedlichsten Transkriptions- und Hilfsfaktoren scheint gerade während der komplexen Entwicklungsprozesse, die in den reifenden Chloroplasten ablaufen, von großer Bedeutung zu sein.

Bei pflanzlichen mitochondrialen Promotoren stellten Gray *et al.* (1992) eine begrenzte Ähnlichkeit fest, die sowohl intra- als auch interspezifisch auftritt. In den untersuchten mitochondrialen RNAs von Mais (Mulligan *et al.* 1988), Weizen (Covello und Gray 1991), *Oenothera berteriana* (Binder und Brennicke 1993) und Sojabohne (Brown *et al.* 1991) konnte eine Transkription an mehreren Promotoren innerhalb des mitochondrialen Genoms festgestellt werden. Anders als bei den Pilzen, kann die Transkriptionsinitiation an variablen und mehreren Stellen relativ zum Promotor erfolgen. Die einzige Gemeinsamkeit, die sich in den lose konservierten mitochondrialen Pflanzenpromotoren finden lässt, ist die Consensus-Sequenz CRTA an oder neben der Transkriptionsinitiationsstelle. Caoile und Stern (1997) beschreiben diese Consensus-Sequenz allgemeiner mit dem Element YRTA (Y = C oder T, und R = A oder G). Für den mitochondrialen Promotor des *atpA*-Gens in Mais konnte durch Mutagenese-Analysen *in vitro* gezeigt werden, dass es sich bei diesem Consensus-Element tatsächlich um ein essentielles Element handelt, aber weitere up- und downstream-Sequenzen Einfluß nehmen, jedoch verzichtbar sind (Rapp *et al.* 1993).

Mit Hilfe eines Erbsenextrakts war es möglich, eine Transkription von mRNA- und tRNA-Promotoren der Sojabohne zu erreichen, was für einen konservierten Transkriptionsinitiationsmechanismus über die Artgrenzen hinweg spricht, der unabhängig von Primärsequenz-Homologien ist. Denkbar wäre zur Modulation der unterschiedlichen Promotoren der Einsatz verschiedener RNA-Polymerasen und unterschiedlicher kernkodierter Transkriptions- oder anderer Hilfsfaktoren, die die Transkription spezifizieren (Newton *et al.* 1995).

Während die „echte“ Bakteriophagen-RNA-Polymerase keinen Transkriptionsfaktor benötigt, kennt man bei der menschlichen Mitochondrien-RNA-Polymerase (Fisher und Clayton 1985, Fisher *et al.* 1987), bei der Hefe-Mitochondrien-RNA-Polymerase (Levens und Howley 1985, Winkley *et al.* 1985, Schinkel *et al.* 1986) und bei den pflanzlichen Mitochondrien-RNA-Polymerasen (Bligny *et al.* 2000, Cahoon und Stern 2001) mindestens einen Hilfsfaktor, der zur Transkription benötigt wird. Der Hefe-Mitochondrien-Hilfsfaktor ist entfernt verwandt mit den  $\sigma$ -Faktoren aus Eubakterien und den „multisubunit“-RNA-Polymerasen des Kerns.

In Pflanzen wurde bisher ein Spezifitätsfaktor der Phagentyp-ähnlichen RNA-Polymerase in Weizenmitochondrien untersucht (Ikeda und Gray 1999b). Dieser Faktor (p63) konnte *in vitro* die Transkription an einem mitochondrialen Promotor aktivieren, dabei kam es allerdings zu keiner direkten Interaktion mit der RNA-Polymerase. Die Transkripte, die für das p63-Protein kodieren, werden nur in einem sehr frühen Stadium der Keimung exprimiert.

In verschiedenen Pflanzen (*Arabidopsis*, Tabak, *Physcomitrella*) werden kernkodierte Phagentyp-ähnliche RNA-Polymerasen sowohl in Mitochondrien als auch in Chloroplasten importiert (Cahoon und Stern 2001, Hedtke *et al.* 2000, Hedtke *et al.* 2002, Kobayashi *et al.* 2001, Richter *et al.* 2002). Das legt die Vermutung einer Doppelfunktion dieser Enzyme in den Organellen nahe. Ein wichtiger mit der Transkription eng verbundener Mechanismus, das RNA-Editing, findet sich ebenfalls in Mitochondrien und Chloroplasten (Hoch *et al.* 1991, Kudla *et al.* 1992, Maier *et al.* 1996, Hanson *et al.* 1996). Da der genaue Mechanismus des RNA-Editings in den Pflanzenorganellen noch nicht geklärt ist, wäre es durchaus denkbar, dass die Phagentyp-ähnlichen RNA-Polymerasen eine Rolle in diesem posttranskriptionalen Prozess spielen.

In Plastiden höherer Pflanzen handelt es sich beim RNA-Editing hauptsächlich um Cytidin-zu-Uridin-Konversionen, die an hochkonservierten Stellen auftreten. Auch in den Mitochondrien tritt dieser Editingtyp auf, bei dem Cytidine zu Uridine desaminiert werden. Allerdings gibt es in Mitochondrien ebenso die umgekehrte Version (wie auch in Plastiden von Hornmoosen), also die Uridin-zu-Cytidin-Variante, diese jedoch sehr viel seltener (Covello und Gray 1989, Gualberto *et al.* 1989, Hiesel *et al.* 1989, Maier *et al.* 1995). Auch wenn sich die Editingsysteme von Chloroplasten und Mitochondrien in einigen Punkten sehr ähnlich sind (Maier *et al.* 1996, Hanson *et al.* 1996), so unterscheiden sie sich doch in der Anzahl der Editingstellen in den Transkripten beträchtlich. Im Genom von Chloroplasten ist die Anzahl von Editingstellen relativ niedrig (Bock 2000). Es befinden sich im Chloroplastengenom von Mais z. B. lediglich rund 25 Editingstellen (Maier *et al.* 1995), in anderen untersuchten Chloroplastengenomen wurden zwischen 4 und 27 Editingstellen gefunden. Dagegen konnten zum Beispiel im mitochondrialen Genom von *Oenothera* über 1000 Editingstellen (Brennicke *et al.* 1996) und im Mitochondriengenom von *Arabidopsis thaliana* 456 Editingstellen festgestellt werden (Giegé und Brennicke 1999).

Bei der Untersuchung von plastidärer und mitochondrialer mRNA zweier homologer Gene in *Arabidopsis* konnte nur eine Editingstelle gefunden werden, die von beiden Organellen geteilt wurde. Das legt die Vermutung nahe, dass, obwohl das Editing in beiden Organellen von einem einzelnen System ausgegangen ist, eine unabhängige Weiterentwicklung in Mitochondrien und Plastiden stattgefunden haben muss.

Eine Gemeinsamkeit des mitochondrialen und plastidären RNA-Editings ist die Präferenz der zweiten Codonposition und die Vorliebe für ganz bestimmte Codon-Umwandlungen. Aminosäurereste, die am häufigsten umgewandelt werden, sind Prolin zu Leucin, Serin zu

Leucin und Serin zu Phenylalanin (Bonnard *et al.* 1992, Kössel *et al.* 1993, Giegé und Brennicke 1999). In mitochondrialer mRNA von *Arabidopsis* werden hauptsächlich mRNA-Codons für hydrophile Aminosäuren durch das RNA-Editing in Codons für hydrophobe Aminosäuren verändert. Giegé und Brennicke (1999) stellen fest, dass es als eine der Konsequenzen des RNA-Editings zu einer Veränderung der generellen biochemischen Gestalt der mitochondrialen Proteine kommt. Es konnte sogar gezeigt werden, dass Proteine, die von nicht-editierter mRNA translatiert werden, nicht funktionsfähig sind (Mulligan *et al.* 1999, Giegé und Brennicke 1999).

In diesen Fällen führt das RNA-Editing zu einer qualitativen Änderung der Transkripte und damit auch der resultierenden Proteine. Da aufgrund des RNA-Editings aber auch nachträglich Start- und Stoppcodons in mRNA-Transkripte eingefügt werden können (Hoch *et al.* 1991, Kudla *et al.* 1992, Wakasugi *et al.* 1996, Schuster und Brennicke 1991), kann das RNA-Editing auch auf der quantitativen Ebene der Transkription starken Einfluß nehmen. Aufgrund dessen kommt dem RNA-Editing auch eine wichtige regulative Funktion zu, die der Kern durch die Steuerung des RNA-Editings übernimmt. Es ermöglicht auf diesem Wege einen gezielten Eingriff des Kerns in die Genexpression der Organellen.

Ebenso wie die Transkription, erfordert das RNA-Editing verschiedene Hilfsfaktoren für die unterschiedlichen Prozesse. So konnten *in vivo*-Studien mit transformierten Chloroplasten zeigen, dass neben *cis*-Elementen in den Sequenzen des Chloroplastengenoms zusätzlich auch *trans*-agierende Faktoren an der Erkennung der Editingstellen beteiligt sind. Die Einführung von zusätzlichen *psbL*-Editingssites in Tabakchloroplasten hatte z. B. eine Verringerung der Editing-Aktivität genau für diese Stelle, nicht jedoch für andere Editingstellen zur Folge (Chauduri *et al.* 1995). Die Beteiligung von *trans*-agierenden Faktoren konnte ebenso bei Tabakplastiden RNA-Editing Mutanten gezeigt werden, denen mittels Chloroplastentransformation eine RNA-Editingstelle aus Spinat eingefügt worden war, die nicht in Tabakchloroplasten editiert werden konnte. Nach der Fusion von Mutantenzellen mit Spinatprotoplasten konnte jedoch wieder eine ordnungsgemäße Editierung der Spinatplastiden-Editingssite beobachtet werden. Dies würde auf die Notwendigkeit eines site-spezifischen *trans*-agierenden Faktors extra-plastidären Ursprungs hindeuten (Bock *et al.* 1994, Bock und Koop 1997).

Karcher und Bock (1998) haben die Sensitivität von plastidärem Editing gegenüber Hitzeschock- und Antibiotika-Behandlung untersucht. Sie konnten dabei zeigen, dass sowohl Hitzeschockbedingungen als auch Behandlung mit prokaryotischen Translationshemmern das plastidäre RNA-Editing hemmen können. Allerdings wirkte dieser inhibitorische Effekt nur

auf eine begrenzte Anzahl von Editingsites, was die Vermutung nahe legt, dass lediglich einige Site-spezifische Faktoren von diesen Bedingungen betroffen waren. Nicht jedoch der gesamte RNA-Editing-Mechanismus ausgefallen oder beeinflusst war.

## Ziel der vorliegenden Arbeit

Um Aufschluss über Genstruktur, phylogenetische Zusammenhänge und Lokalisierung der verschiedenen RNA-Polymerasen in *Arabidopsis thaliana* zu erhalten, sollten die Gene kloniert und charakterisiert werden. Mit Hilfe von *in organello*-Importversuchen und *in vivo*-GFP-Studien sollte eine Lokalisierung der Genprodukte in der Zelle vorgenommen werden. Der Schwerpunkt der Arbeit sollte auf der gezielten Beeinflussung der Expression dieser Gene gelegt werden. Dazu wurde die *Antisense*-Methode gewählt, um gezielt einzelne kernkodierte RNA-Polymerasen herunter- bzw. herauf zu regulieren.

Aufgrund der Zusammenhänge von Transkription, Translation und RNA-Editing in höheren Pflanzen sollte zudem untersucht werden, ob eine gezielte Reduktion von RNA-Polymerasen Einfluss auf die Effizienz des RNA-Editings in den Organellen nimmt. Da phänotypische Veränderungen durch Störungen des RNA-Editings und der Transkription bekannt sind, sollten mögliche Auswirkungen auch bei diesen geplanten *Antisense*-Pflanzen beobachtet werden.

Zusätzlich sollte die Untersuchung von knock-out-Linien für die entsprechenden RNA-Polymerasen einen Vergleich mit den selbst hergestellten *Antisense*-Pflanzen ergänzen. In diesem Zusammenhang sollte die Aufgabenverteilung der verschiedenen RNA-Polymerasen besser verstanden werden, besonders die Abstimmung der Regulation zwischen Kern und Organellen.