

## Plastidiale DNS und extrachromosomale Vererbung\*

Von A. BOSCHETTI

Institut für organische Chemie der Universität, Länggäßstraße 7, CH-3000 Bern

### Summary

The importance of the plastidial DNA for the cells, especially in connection with the extrachromosomal heredity, is reviewed. Different findings have led to the conclusion that the chloroplasts contain hereditary information. Particularly the plastidial DNA, a so-called satellite DNA, which is linear and which is mainly characterised through its GC-content, could be isolated. An insight into the information content of this DNA can be gained through renaturation and hybridisation experiments. The role, which the plastidial DNA plays in the cell function, is still dubious. There are several experimental evidences of replication and transcription of plastidial DNA, but hypotheses concerning the translation and also the autonomy of the chloroplast remain speculative.

Unseren heutigen Kenntnissen entsprechend müssen wir in der plastidialen DNS (DNS der Chloroplaste, im folgenden mit P-DNS abgekürzt), der mitochondrialen und den anderen cytoplasmatischen DNS-Sorten die molekulare Grundlage der extrachromosomalen Ver-

erbung suchen. Die Problematik um die P-DNS<sup>1</sup> ist daher eng mit einer Frage verknüpft, deren Tragweite man gegenwärtig noch kaum ermessen kann, nämlich mit der Frage nach dem Wesen und der Bedeutung der extrachromosomalen Vererbung für die Lebensvorgänge und insbesondere für deren Regulation.

### 1 Die extrachromosomale Vererbung<sup>2</sup>

Am Anfang der Forschungen über extrachromosomale (auch nicht-chromosomale oder cytoplasmatische) Vererbung – und damit indirekt auch am Anfang der Arbeiten über nicht-chromosomale DNS – steht eine Ziervarie-

<sup>1</sup> Vgl. z. B. Übersichtsarbeiten über P-DNS von T. IWAMURA, *Progr. Nucl. Acid Res.* 5 (1966) 133; S. GRANICK und A. GIBOR, *Progr. Nucl. Acid Res.* 6 (1967) 143; R. M. SMILLIE und N. S. SCOTT, *Progr. Molec. Subcell. Biol.* 1 (1969) 138.

<sup>2</sup> Monographien über extrachromosomale Vererbung: R. HAGEMANN, *Plasmatische Vererbung*, vEB Gustav Fischer, Jena 1964; J. L. JINKS, *Extrachromosomale Vererbung* (deutsche Übersetzung), Verlag Gustav Fischer, Stuttgart 1967.

\* Vorgetragen am Symposium über Biopolymere, veranstaltet vom Schweizerischen Chemiker-Verband, 26. bis 28. August 1970 in Bern.

tät der Mexikanischen Wunderblume, *Mirabilis jalapa albomaculata*, welche sich durch ihre gelblich-weiße Blattscheckung auszeichnet. C. CORRENS, einer der Wiederentdecker der Mendelschen Erbgregeln, beschrieb 1909 an dieser Pflanze zum erstenmal die extrachromosomale Vererbung<sup>3</sup>.

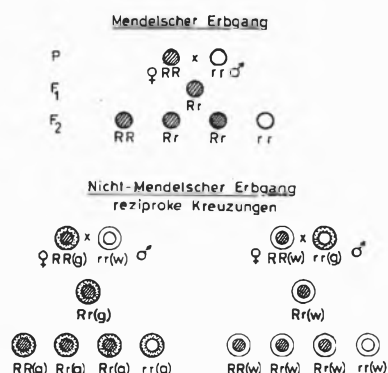


Abb. 1. Erbgang der Blütenfarbe und Blattscheckung bei *Mirabilis jalapa albomaculata* nach CORRENS (innerer Kreis schraffiert = rote Blüten; innerer Kreis leer = weiße Blüten; äußerer Kreis punktiert = grüne Blätter; äußerer Kreis leer = gescheckte Blätter; R bzw. r = dominantes Allel für rote bzw. rezessives für weiße Blüten; g bzw. w = extrachromosomale Gene für grüne bzw. weißgescheckte Blätter; P = Eltern; F<sub>1</sub> und F<sub>2</sub> = erste und zweite Filialgeneration)

Die in Abb. 1 schematisch dargestellten Resultate einer Kreuzungsanalyse von CORRENS zeigen, daß das Merkmal «Blattscheckung» nicht den Mendelschen Regeln gehorcht. Während in Kreuzungen von homozygot weißblütigen mit homozygot rotblütigen Pflanzen das dominante Merkmal «rote Blüten» und das rezessive «weiße Blüten» gemäß den Mendelschen Regeln stets im Verhältnis 3 : 1 aufspalten, weist das Merkmal «Blattscheckung» kein solches Verhältnis auf. Zudem zeigen reziproke Kreuzungen, daß die Blattfarbe nur durch die mütterliche Pflanze bestimmt wird, daß also Reziprokenunterschiede bestehen. Aus diesen Resultaten folgte CORRENS, daß die Blattscheckung nicht durch die Chromosomen, sondern extrachromosomal vererbt wird.

Neben den beiden beschriebenen Phänomenen, dem Nicht-Mendeln und den Reziprokenunterschieden, tritt bei der extrachromosomalen Vererbung häufig noch als drittes Charakteristikum eine Entmischung der Merkmalsträger auf. Eine solche Entmischung wurde an einem weißrandigen Geranium, *Pelargonium zonale albomarginatum*, 1909 von E. BAUR erstmals untersucht<sup>4</sup>. Auch hier weist die Blattscheckung einen nicht-chromosomalen Erbgang auf. Auf Grund genetischer und histologischer Untersuchungen schloß BAUR, daß eine gescheckte Pflanze aus einer Zygote entstanden sein müsse, welche zwei Sorten von Chloroplasten enthielt.

Die eine Sorte war normal grün, während die andere zu Weiß mutiert war. Im Verlaufe der Zellteilungen und

des Wachstums hatten sich diese Chloroplasten vermehrt und zufallsmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Dabei trat mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit der Fall ein, daß in eine Zelle nur mutierte weiße, in eine andere nur normale grüne gelangten. Aus den rein weißen Zellen entwickelte sich dann das weiße Pflanzengewebe, aus den grünen die grünen Pflanzenteile.

Dieser Befund führte BAUR zum Postulat, daß die Chloroplasten nicht nur Merkmalsträger, sondern zugleich auch Träger der Erbinformation «weißer Blattrand» seien. Seither ist dieses Postulat durch neuere Befunde erhärtet worden.

## 2 Chloroplasten als Erbträger

### 2.1 Der Chloroplast der höheren Pflanzen<sup>5</sup>

Chloroplasten nennt man die grünen, chlorophyllhaltigen Zellorganelle. Lichtmikroskopisch sind beispielsweise in Spinatblattzellen 10 bis 20 Chloroplasten als grüne, ellipsoide Körperchen von etwa 3 bis 8 µ Durchmesser zu erkennen.

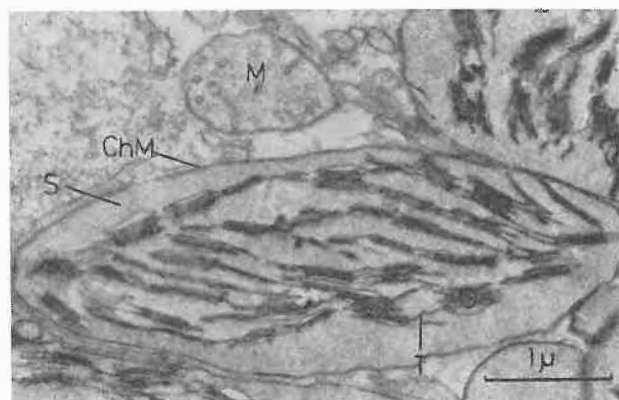


Abb. 2. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Dünnschnittes durch eine Blattzelle von *Spirodela oligorrhiza* (KMnO<sub>4</sub>-Fixierung, Aufnahme von J. RUFENER, Bern). ChM = Chloroplastenmembran, S = Stroma, T = Thylakoide, G = Granum, M = Mitochondrium

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Dünnschnitten durch Chloroplasten (Abb. 2) zeigen deren charakteristische Feinstruktur. Der Chloroplast ist umgeben von einer Doppelmembran. Im Innern, eingebettet in das elektronenoptisch fast leere Stroma, finden sich die sogenannten Thylakoide, das sind als Doppellamellen erkennbare, flache, sackartige Strukturen. Diese Thylakoide können stellenweise mehrfach übereinander gelagert sein und die sogenannte Grana bilden.

Die chemische Zusammensetzung der Chloroplasten ist in großen Zügen in Tabelle I wiedergegeben. Zu beachten ist insbesondere, daß auch geringe Mengen Nukleinsäuren vorhanden sind.

<sup>3</sup> C. CORRENS, Z. indukt. Abstamm.-Vererb.lehre 1 (1909) 291.

<sup>4</sup> E. BAUR, Z. indukt. Abstamm.-Vererb.lehre 1 (1909) 330, 3 (1910) 34.

<sup>5</sup> Übersichtswerke über Chloroplasten: T. W. GOODWIN, Biochemistry of Chloroplasts, Vol. I und II, Academic Press, 1966/67; J. T. O. KIRK und R. A. E. TILNEY-BASSETT, The Plastids, Freeman, 1967.

Tabelle I. Chemische Zusammensetzung von Spinat-Chloroplasten<sup>6</sup>

| Stoffklasse   | Gehalt in % des Trockengewichtes |
|---------------|----------------------------------|
| Proteine      | 69                               |
| lösliche      | 31                               |
| unlösliche    | 38                               |
| Lipide        | 21                               |
| Nukleinsäuren | 1 bis 8                          |
| DNS           | 0,02 bis 0,1                     |
| RNS           | 1,0 bis 7,5                      |
| Kohlenhydrate | variabel                         |

Falls nun ein Chloroplast gemäß dem Postulat von BAUR Erbinformation enthält, muß er folgenden Bedingungen genügen:

- Er muß eine somatische Kontinuität aufweisen, d.h. er muß sich durch Knospung oder Teilung vermehren und auf die Tochterzellen übertragen können.
- Er muß eine genetische Kontinuität besitzen. Seine Erbinformation muß über Generationen erhalten und übertragen werden können.
- Diese Erbinformation muß in irgendeiner Weise im Chloroplasten gespeichert sein. Nach unseren heutigen Vorstellungen kommt als Informationsträger besonders DNS in Frage.

## 2.2 Zur somatischen Kontinuität der Chloroplasten

Tatsächlich entstehen Chloroplasten nicht *de novo*, sondern entweder aus kleinen, wenig differenzierten Proplastiden oder durch Teilung vollständig ausgebildeter Chloroplasten. Während die Entstehung der Proplastiden wegen der Schwierigkeit, sie zu identifizieren, noch nicht geklärt ist, weiß man über die Chloroplastenteilung gut Bescheid. Bereits 1882 beschrieb STRASSBURGER eine Teilung von Chloroplasten der fadenförmigen Grünalge *Spirogyra*. GREEN gelang es 1964 sogar, eine Chloroplastenteilung bei der Grünalge *Nitella* zu filmen, in deren Verlauf aus 8 Chloroplasten deren 18 entstanden<sup>7</sup>.

## 2.3 Zur genetischen Kontinuität der Chloroplasten

Eine genetische Kontinuität der Chloroplasten konnte bis heute noch nie streng bewiesen werden. Der Grund liegt darin, daß man von keinem extrachromosomalen Erbmerkmal mit Sicherheit weiß, ob es tatsächlich durch Chloroplasten und nicht vielleicht doch durch andere cytoplasmatische Erbträger vererbt wird. Um die genetische Kontinuität der Chloroplasten nachzuweisen, müßte man eine Antwort finden auf die konkrete Frage: Gibt es biochemische Eigenschaften, welche, un-

abhängig vom Zellkern, einzig durch die Chloroplasten bestimmt werden? Im folgenden soll gezeigt werden, wie weit man bisher in der Beantwortung dieser Frage gekommen ist.

Neben der beschriebenen Entmischung zweier Chloroplastensorten weisen auch andere Befunde, wofür hier zwei Beispiele erwähnt werden, deutlich auf eine genetische Kontinuität der Chloroplasten hin.

Nach Bestrahlung der einzelligen Grünalge *Euglena* durch UV-Licht bleichen die Zellen irreversibel aus. Auch die Nachkommen bleiben weiß, und man kann keine Chloroplasten mehr feststellen. Das Aktionspektrum der UV-Bestrahlung hat ein Maximum bei 260 nm, das dem Absorptionsspektrum der Nukleinsäuren entspricht<sup>8</sup>. Unter Verwendung eines Mikrostrahles von 1  $\mu^2$  Durchmesser gelang es GIBOR und GRANICK zu zeigen, daß *Euglena*-Zellen nur nach Bestrahlung des Cytoplasmas, nicht aber der Kernregion, ausbleichen<sup>9</sup>. Es muß also im Cytoplasma und nicht im Kern eine UV-Mutation stattgefunden haben. Da *Euglenen* sich nur asexuell vermehren, kann die Vererbungsart dieses Farbdefektes nicht untersucht werden.

Für genetische Untersuchungen eignet sich die einzellige, begeißelte Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* besser. Sie enthält nur einen einzigen, becherförmigen Chloroplasten, der wie mit Fingern den Zellkern umfaßt. Die Chloroplasten von Grünalgen enthalten keine Grana, hingegen oft das Pyrenoid, an dem die Stärkebildung beginnt (Abb. 3).

Von diesem Organismus konnten SAGER *et al.*<sup>10</sup> sowie GILLHAM<sup>11</sup> verschiedene Mutanten herstellen, deren

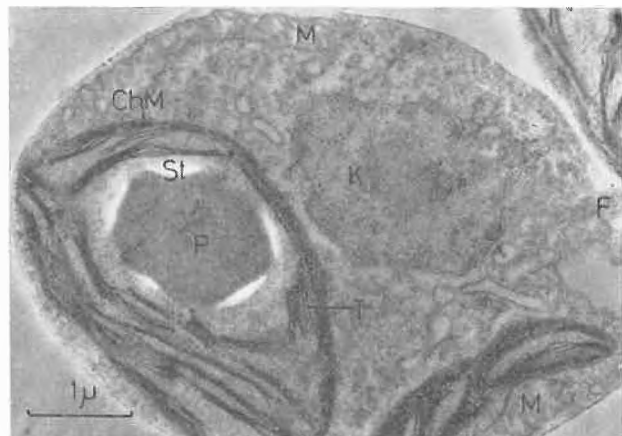


Abb. 3. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Dünnschnittes durch eine Zelle von *Chlamydomonas reinhardtii* (OsO<sub>4</sub>-Fixierung). ChM = Chloroplastenmembran, T = Thylakoide, P = Pyrenoid, St = Stärkekorner, K = Zellkern mit Membran und Nucleolus, M = Mitochondrium, F = Geißelansatz

<sup>8</sup> H. LYMAN, H. T. EPSTEIN und J. A. SCHIFF, *Biochim. Biophys. Acta* 50 (1961) 301.

<sup>9</sup> A. GIBOR und S. GRANICK, *J. Cell Biol.* 15 (1962) 599.

<sup>10</sup> R. SAGER und Y. Tsubo, *Z. Vererbungsl.* 92 (1961) 430; R. SAGER und Z. RAMANIS, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 50 (1963) 260; R. SAGER, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 40 (1954) 356.

<sup>11</sup> N. W. GILLHAM, *Genetics* 52 (1965) 529.

<sup>6</sup> Nach J. T. O. KIRK und R. A. E. TILNEY-BASSETT, *Freeman*, 1967, S. 6ff.

<sup>7</sup> P. B. GREEN, *Amer. J. Bot.* 51 (1964) 334.

Merkmal extrachromosomal vererbt wird. Es handelt sich dabei neben zwei Acetat-bedürftigen Stämmen um gewisse Antibiotikaresistenzen bzw. -bedürfnisse. Auch wir konnten extrachromosomal vererbte Streptomycinresistenzen in *Chlamydomonas reinhardi* erzeugen. Diese Merkmale zeigen einen nicht-Mendelschen Erbgang mit ausgesprochenem Reziprokenunterschied (Abb. 4), indem sie nur vom Plus-Stamm, und zwar (mit seltenen Ausnahmen) auf alle Nachkommen, übertragen werden.

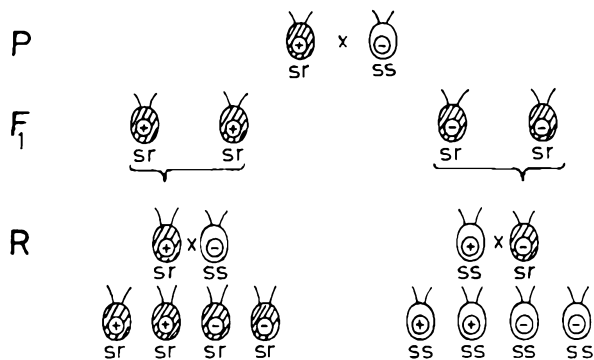


Abb. 4. Erbgang eines extrachromosomalen Merkmalsunterschiedes bei *Chlamydomonas reinhardi*. sr = Streptomycinresistenz (schraffiert), ss = Streptomycinempfindlichkeit, + und - : Kreuzungstypen («Geschlecht»), P = Eltern, F<sub>1</sub> = erste Filialgeneration, R = reziproke Rückkreuzungen

Durch kurze UV-Bestrahlung der Plus-Gameten vor der Kopulation gelang es jedoch SAGER und RAMANIS<sup>12</sup>, künstlich Ausnahmezygoten herzustellen, welche die extrachromosomalen Erbanlagen beider Eltern gleichzeitig enthalten und auf die Nachkommen übertragen. Sie sind also extrachromosomal heterozygot. In den Nachkommen entmischen sich diese Merkmale mit einer ganz bestimmten Rate. Zudem konnten neue, durch Rekombination extrachromosomaler Gene entstandene Stämme isoliert werden. Kürzlich konnten SAGER und RAMANIS<sup>13</sup> auf Grund der Rekombinationshäufigkeit und auch der Entmischungsgeschwindigkeit acht extrachromosomale Gen-Loci kartieren. Bemerkenswert ist, daß sie linear angeordnet sind und daß an einem Ende ein «attachement point» analog dem Centromer der Chromosomen definiert werden kann.

Solche Befunde, wie das Ausbleichen von *Euglena*-Zellen nach UV-Bestrahlung des Cytoplasmas und die Kartierung extrachromosomaler Gene, weisen deutlich darauf hin, daß Nukleinsäuren auch Träger der extrachromosomalen Erbinformation sind.

## 2.4 Zum cytologischen Nachweis von DNS und DNS-Synthese in Chloroplasten

Nachdem sich durch cytochemische Farbreaktionen das Vorhandensein von DNS in Chloroplasten nicht eindeutig hatte nachweisen lassen, konnten 1962 RIS und

PLAUT<sup>14</sup> licht- und elektronenoptisch überzeugend die plastidiale DNS in *Chlamydomonas*, später auch in *Anthoceros* (Lebermoos), *Elodea* (Wasserpest) und *Zea mays* (Mais) nachweisen. Nach Kontrastierung von Dünnschnitten mittels Uranylacetat beobachteten sie im Elektronenmikroskop «helle Stellen», welche 25 bis 30 Å dicke Fibrillen enthielten. Diese Fibrillen ähneln denjenigen im Nukleoplasma von Bakterien<sup>15</sup> und sind nach DNase-Behandlung nicht mehr nachweisbar. Die Befunde von RIS und PLAUT sind mehrfach reproduziert worden.

Daß DNS in Chloroplasten auch synthetisiert wird, wurde durch den Einbau von tritisiertem Thymidin, einem spezifischen DNS-Baustein, nachgewiesen. Obwohl viele Pflanzen Thymidin nur schlecht oder überhaupt nicht einbauen<sup>16</sup>, konnten SWIFT und Mitarbeiter<sup>17</sup> mit Mikroautoradiographie die Markierung der Chloroplasten zeigen. SPENCER und WHITFIELD<sup>18</sup> gelang es, <sup>3</sup>H-Thymidin-Triphosphat in Gegenwart der anderen Triphosphonukleotide in isolierte Spinachchloroplasten einzubauen. Dieser Einbau wird durch DNase und Actinomycin D gehemmt. Damit scheint das Vorkommen von DNS-Polymerase, welche spezifisch durch Actinomycin D gehemmt wird, in Chloroplasten gesichert.

Ein anderer, eleganter Beweis dafür, daß DNS auch außerhalb des Zellkerns synthetisiert wird, gelingt mit der riesigen, einzelligen Grünalge *Acetabularia*. Diese Alge kann eine Länge von einigen Zentimetern erreichen. Wenn man den unteren, den Zellkern enthaltenden Drittel der Zelle wegschneidet, kann der kernlose, chloroplastenhaltige obere Teil noch mehrere Monate am Leben erhalten bleiben<sup>19</sup>. <sup>3</sup>H-Thymidin wird nun in solche entkernte *Acetabularien* und in deren Chloroplasten-DNS eingebaut. Folglich muß auch in diesem Falle außerhalb des Zellkerns, vermutlich in den Chloroplasten, DNS-Polymerase vorhanden sein.

## 3 Isolierung von plastidialer DNS

Fast gleichzeitig mit dem cytologischen Nachweis der plastidialen DNS gelang auch deren Isolierung. Eine der ersten Arbeiten auf diesem Gebiet stammt von CHUN, VAUGHAM und RICH<sup>20</sup>, welche DNS aus *Spinacea oleracea* (Spinat), *Beta vulgaris* (Futterrübe), *Chlorella* und *Chlamydomonas reinhardi* isolierten. Sie ultrazentrifugierten diese DNS-Präparate im selbstbildenden CsCl-

<sup>14</sup> H. RIS und W. PLAUT, *J. Cell Biol.* 13 (1962) 383.

<sup>15</sup> A. RYTER und E. KELLENBERGER, *Z. Naturforsch.* 13 (1958) 597.

<sup>16</sup> L. SAGAN, *J. Protozool.* 12 (1965) 105; R. WOLLIGHEM und K. MOTHES, *Exptl. Cell Res.* 35 (1964) 52; F. DE VITRY, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 47 (1965) 1353; A. LIMA-DE-FARIA und M. J. MOSES, *Hereditas* 52 (1964) 367.

<sup>17</sup> H. SWIFT, *Amer. Naturalist* 99 (1965) 201; N. KISLEV, H. SWIFT und L. BOGORAD, *J. Cell Biol.* 25 (1965) 327.

<sup>18</sup> D. SPENCER und P. R. WHITFIELD, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 28 (1967) 538.

<sup>19</sup> J. HÄMMERLING, *Roux' Arch. Entwicklungsmech. Organ.* 131 (1934) 627.

<sup>20</sup> E. H. L. CHUN, M. H. VAUGHAM und A. RICH, *J. Mol. Biol.* 7 (1963) 130.

<sup>12</sup> R. SAGER und Z. RAMANIS, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 58 (1967) 193.

<sup>13</sup> R. SAGER und Z. RAMANIS, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 65 (1970) 593.

Dichtegradienten und beobachteten dessen UV-Absorption nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes. Dabei fanden sie neben der Hauptbande eine bis zwei Neben- oder Satellitenbanden. In DNS-Präparaten aus Chloroplastenfractionen waren die Satellitenbanden angereichert, wogegen in jenen aus der Kernfraction nur die Hauptbande zu erkennen war. Die Chloroplasten scheinen demnach eine spezifische DNS zu enthalten, welche sich von der Kern-DNS durch ihre Schwebedichte im CsCl-Gradienten unterscheidet.

Leider konnte, im Gegensatz zur mitochondrialen DNS, die P-DNS bisher nie frei von Kern-DNS isoliert werden. Da die Mitochondrienmembran für DNase undurchlässig ist, kann vor der Isolierung der mitochondrialen DNS aus der Mitochondrienfraction die verunreinigende Kern-DNS enzymatisch entfernt werden. Bei den Chloroplasten geht das offenbar nicht; denn die Chloroplastenmembran scheint für DNase durchlässig zu sein. Dafür spricht, daß in isolierten Chloroplasten die RNS-Synthese durch DNase gehemmt wird<sup>21</sup>.

Zur Isolierung der P-DNS aus *Chlamydomonas reinhardtii* haben wir folgendes Verfahren verwendet: Die Zellen werden mit Ultraschall<sup>22</sup> aufgebrochen, und aus dem Homogenat wird durch Zentrifugation im Saccharose-Gradienten eine Chloroplastenfraction gewonnen, worin die P-DNS gegenüber der Kern-DNS angereichert ist. Nach Behandlung mit Natrium-Laurylsulfat werden die Nukleinsäuren mit Phenol extrahiert, und die RNS wird enzymatisch abgebaut. Die so erhaltene DNS-Lösung wird durch Zentrifugation im CsCl-Gradienten in die in Abb. 5 gezeigten Fractionen aufgetrennt.

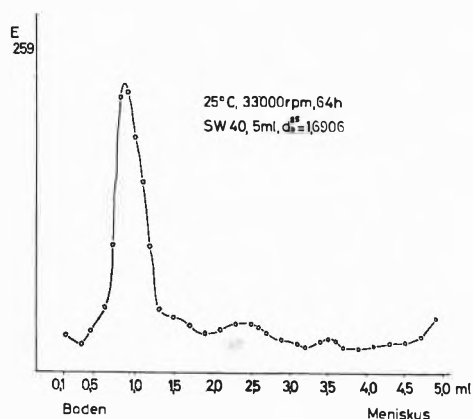


Abb. 5. Elutionsprofil eines präparativen CsCl-Gradienten von DNS aus *Chlamydomonas reinhardtii*.  $E_{259}$  = relative Extinktionswerte einzelner 0,1-ml-Fractionen bei 259 nm

Die Auftrennung des gleichen Extraktes in der analytischen Ultrazentrifuge nach Gleichgewichtszentrifugation im CsCl-Gradienten ist in Abb. 6 dargestellt. Die Schwebedichte der Hauptbande berechnet sich aus der Anfangsdichte der Lösung und dem Abstand von der

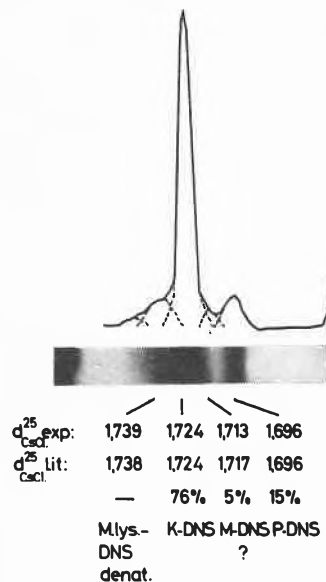


Abb. 6. UV-Aufnahme und Densitogramm der Auftrennung von DNS aus *Chlamydomonas reinhardtii* in der analytischen Ultrazentrifuge (Spinco Model E, 44770 U/min, 20 h, 25°); Literaturwerte vgl. <sup>20, 23, 24, 25</sup>

Rotorachse zu 1,724, was gut mit den Literaturwerten für die Kern-DNS übereinstimmt<sup>20, 23, 24</sup>. Die zum Vergleich zugefügte, denaturierte DNS aus *Micrococcus lysodeikticus* erscheint als Schulter mit einer Dichte von 1,738<sup>25</sup>. Die Schulter bei einer Dichte von 1,713 ist nach Zentrifugation im Winkelrotor (Abb. 5) deutlicher abgetrennt und wird der mitochondrialen DNS zugeschrieben<sup>23</sup>, während die Nebenbande mit einer Dichte von 1,696 der P-DNS entspricht<sup>20, 23, 24</sup>. Der kleine Neben-Peak in Abb. 5 scheint Protein zu sein.

Aus den Daten der analytischen Ultrazentrifugation kann man die DNS-Menge jeder Bande berechnen. In intakten Zellen von *Chlamydomonas reinhardtii* macht die P-DNS etwa 6% der Gesamt-DNS aus<sup>24</sup>, kann aber in DNS-Extrakten, dank Isolierung einer Chloroplastenfraction bei der Aufarbeitung, bis 40% angereichert werden. Eine bessere Anreicherung ist bei *Chlamydomonas reinhardtii* sehr mühsam, da in diesem Falle eine saubere Chloroplastenisolierung außerordentlich schwierig ist.

Der Gehalt an P-DNS beträgt nach unseren Berechnungen bei *Chl. Reinh.* 1,2 bis  $2,4 \cdot 10^{-14}$  g pro Chloroplast. Für *Acetabularia* wird mit  $0,01 \cdot 10^{-14}$  g DNS/Chloroplast<sup>26</sup> der niedrigste, für Spinat mit  $4 \cdot 10^{-14}$  g<sup>27</sup> der höchste Wert angegeben. Im Mittel enthält ein Chloroplast etwa 0,1 bis  $1 \cdot 10^{-14}$  g DNS.

<sup>23</sup> K.S. CHIANG und N. SUEOKA, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 57 (1967) 1506.

<sup>24</sup> R. SAGER und M. R. ISHIDA, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 50 (1963) 725.

<sup>25</sup> S. RIVA, I. BARRAI, L. CAVALLI-SFORZA und A. FALASCHI, *J. Mol. Biol.* 45 (1969) 367.

<sup>26</sup> A. GIBOR und M. J. IZAWA, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 50 (1963) 1164.

<sup>27</sup> J. BIGGINS und R. B. PARK, *Nature* 203 (1964) 425.

<sup>21</sup> D. SPENCER und P. R. WHITFIELD, *Arch. Biochem.* 121 (1967) 336.

<sup>22</sup> A. BOSCHETTI und E. C. GROB, in *Progress of Photosynthetic Research*, ed. H. METZNER, Vol. I (1969) S. 245.

#### 4 Physikalisch-chemische Charakterisierung der P-DNS

Zur physikalisch-chemischen Charakterisierung der P-DNS werden verschiedene Größen herangezogen, am häufigsten wohl die Schwebedichte im CsCl-Dichtegradienten. Diese ist, vorausgesetzt, daß seltene Basen fehlen, proportional dem Mol-Gehalt an Guanin (G) + Cytosin (C)<sup>28</sup>. Tatsächlich wurden weder bei der P-DNS von *Chl. Reinh.*<sup>24</sup> noch von *Euglena*<sup>29</sup> seltene Basen, wie z. B. 5-Methyl-Cytosin, gefunden, so daß wir für die P-DNS von *Chl. Reinh.* einen GC-Gehalt von 37% und für die Kern-DNS von 69% errechnen können.

Auch die sogenannte Schmelztemperatur, d. h. die Temperatur, bei welcher gelöste DNS denaturiert und in die Einzelstränge zerfällt, ist bei gegebener Ionenstärke und bestimmtem pH proportional dem GC-Gehalt. Bei *Chl. Reinh.* ergaben unsere Messungen 36 Mol-% für die P-DNS und 67 Mol-% für die Kern-DNS. Dieses Schmelzverhalten zeigt zudem, daß die P-DNS doppelsträngig ist.

In Tabelle II sind die GC-Gehalte der Kern- und P-DNS einiger Pflanzen zusammengestellt. Auffallenderweise ist der Wert für die P-DNS bei Grünalgen meist kleiner, bei höheren Pflanzen größer als derjenige der Kern-DNS.

Tabelle II. Gehalt an Guanin + Cytosin von DNS verschiedener Pflanzen (Mol-%)

| Organismus                        | Kern-DNS | P-DNS | Ref. |
|-----------------------------------|----------|-------|------|
| <i>Chlorella ellipsoidea</i>      | 57       | 36    | 20   |
| <i>Chlamydomonas reinhardi</i>    | 67       | 36    | 43   |
| <i>Euglena gracilis</i> , Zellen  | 51       | 25    | 30   |
| <i>Beta vulgaris</i> (Rübe)       | 36       | 46    | 20   |
| <i>Spinacea oleracea</i> (Spinat) | 36       | 46    | 20   |
| <i>Nicotiana tabacum</i> (Tabak)  | 37       | 47    | 31   |

Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung von DNS bieten elektronenmikroskopische Aufnahmen von gespreiteten und metallbedampften Präparaten<sup>32</sup>. Abb. 7 zeigt als Beispiel gespreitete P-DNS aus *Chl. Reinh.* Die Moleküle sind linear. Bisher wurde noch nie ringförmige P-DNS gefunden. Da DNS-Moleküle in Lösung sehr leicht zerreißen, beispielsweise bereits durch die beim Schütteln oder Rühren auftretenden Scherkräfte, wird das mittlere Molekulargewicht natürlich erniedrigt, und man erhält unterschiedliche Moleküllängen, wie Abb. 7 zeigt. Für die P-DNS von *Chl. Reinh.* konnten wir kein Maximum in der Häufigkeit der Längenverteilung feststellen; die kurzen Bruchstücke treten am häufigsten auf. Bei einem mittleren Molekulargewicht von etwa

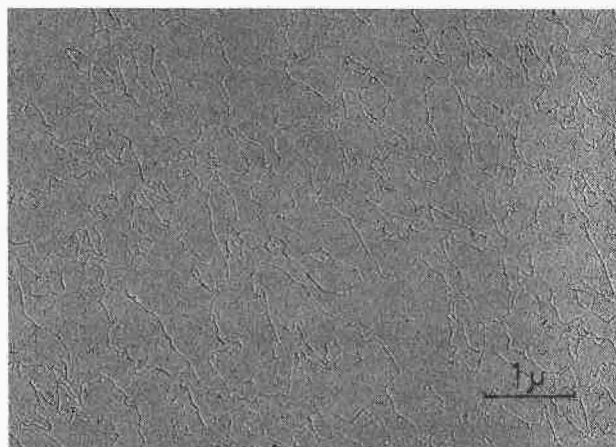


Abb. 7. Elektronenmikroskopische Aufnahme gespreiteter P-DNS aus *Chlamydomonas reinhardi* (Trägerfilm: Cytochrom c; Hypophase: 0,5-M Natriumacetat mit Formaldehyd pH 5,7; Beschattungswinkel 10°)

$3 \cdot 10^6$  war das größte von uns ausgemessene Molekül 16  $\mu$  lang, was einem Molekulargewicht von etwa  $3 \cdot 10^7$  entspricht.

Über das Molekulargewicht von nativer P-DNS wird viel spekuliert. Es liegt sicher höher als dasjenige der zyklischen Mitochondrien-DNS aus Tieren, kann aber wegen der leichten Zerreibbarkeit der Moleküle in Extrakten nicht bestimmt werden. Der bisher längste, mit einem Chloroplasten assoziierte DNS-Strang wurde von WOODCOCK und FERNANDEZ-MORAN<sup>33</sup> zu 150  $\mu$  gemessen, was einem Molekulargewicht von etwa  $3 \cdot 10^8$  entspricht. Dazu wurden isolierte, gereinigte und noch quellbare Spinachchloroplasten durch direkte Spreitung auf reinem Wasser osmotisch geschockt, wodurch sie platzen und die DNS sich auf der Wasseroberfläche ausbreitete. Solche DNS-Fäden sind häufig an einem Ende noch mit Chloroplastenbruchstücken verbunden.

#### 5 Über den Informationsgehalt der P-DNS

Die Bemühungen um die physikalisch-chemische Charakterisierung der P-DNS in Lösung bieten in bezug auf die extrachromosomale Vererbung keine neuen Erkenntnisse. Einzig aus den quantitativen Bestimmungen der P-DNS könnte man – unter der Voraussetzung, daß die Basensequenz sich nirgends wiederholt – die maximal mögliche Zahl von codierbaren Polypeptiden berechnen (Abb. 8).

Sofern jedoch die P-DNS polycistronisch ist (d. h. eine Sequenz mehrfach enthält) oder auch mehrere gleiche DNS-Moleküle in einem Chloroplasten vorhanden sind, ist der Informationsgehalt kleiner. Dieser effektive Informationsgehalt kann durch zwei Versuchsanordnungen abgeschätzt werden, nämlich durch RNS/DNS-Hybridisierung oder durch Renaturierungsversuche. Beide Ex-

<sup>28</sup> N. SUEOKA, J. MARMUR und P. DOTY, *Nature* 23 (1959) 1429.

<sup>29</sup> D. S. RAY und P. C. HANAWALT, *J. Mol. Biol.* 9 (1964) 812.

<sup>30</sup> G. BRAVERMAN und J. M. EISENSTADT, *Biochim. Biophys. Acta* 91 (1964) 477.

<sup>31</sup> B. R. GREEN und M. P. GORDON, *Fed. Proc.* 24 (1965) 539; siehe auch *Biochim. Biophys. Acta* 145 (1967) 378.

<sup>32</sup> A. K. KLEINSCHMIDT, in *Methoden der Enzymologie*, ed. L. GROSSMAN und K. MOLDAVE, Vol. XII, B (196) S. 361.

<sup>33</sup> C. L. F. WOODCOCK und H. FERNANDEZ-MORAN, *J. Mol. Biol.* 31 (1968) 627.

$3,2 \cdot 10^{-12}$  g DNS/Zelle  
 2-5% davon P-DNS  
 10 Chloroplasten/Zelle

$10^{-14}$  g DNS/Chloroplast  $\cong 6 \cdot 10^9$  Dalton  
 $\cong 10^7$  Basenpaare

1% codiert R-RNS  
 1% codiert t-RNS  
 98% codieren

14000 Polypeptide MG = 30000

Abb. 8. Zum Informationsgehalt der P-DNS von *Euglena* (nach SMILLIE und SCOTT<sup>1</sup>; DNS-Gehalt pro Zelle nach<sup>42</sup>)

perimente beruhen darauf, daß einsträngige DNS mit anderen einsträngigen Nukleinsäuren durch Basenpaarung wieder einen Doppelstrang bilden. Diese Dimerisierung ist um so ausgeprägter und verläuft um so rascher, je mehr komplementäre Basensequenzen vorhanden sind und je weniger komplex das Molekül gebaut ist. Eine durch Denaturierung einsträngig gemachte P-DNS wird also spezifisch die durch sie codierte RNS oder auch ihre komplementäre DNS binden<sup>34</sup>. Im ersten Fall spricht man von einer Hybridisierung, im zweiten von einer Renaturierung.

Chloroplasten enthalten Ribosomen, welche sich von denjenigen des Cytoplasmas durch eine andere Sedimentationskonstante unterscheiden<sup>35</sup>. Die naheliegende Vermutung, daß durch die P-DNS die RNS der Chloroplasten-Ribosomen codiert wird, konnte von verschiedenen Autoren experimentell bestätigt werden. Bei *Euglena* hybridisiert 1% der P-DNS mit der Chloroplasten-RNS. Diese Hybridisierung ist spezifisch; denn Zugabe fremder RNS erniedrigt diesen Wert unwesentlich, und RNS aus dunkel gewachsenen, farblosen *Euglena*-Zellen zeigt eine 100 mal geringere Hybridisierung<sup>36</sup>. Es scheint also, daß die ribosomale RNS der Chloroplasten durch die P-DNS codiert wird. Allerdings wird hierfür nur ein geringer Teil des Informationsgehaltes der P-DNS ausgenutzt.

Über die Anzahl polycistronischer Bezirke in der DNS geben Renaturierungsversuche Auskunft<sup>37</sup>. Die Reaktionsgeschwindigkeit, mit welcher sich die beiden komplementären DNS-Stränge wieder vollständig paaren, ist um so größer, je mehr gleiche Basensequenzen im Molekül vorhanden sind. Die Renaturierungsgeschwindigkeit dient bei bekanntem Molekulargewicht als Maß für die Komplexität und damit auch für den Informationsgehalt der DNS. Bei *Euglena* ist die Renaturierungsgeschwindigkeit der P-DNS vergleichbar mit derjenigen der T<sub>4</sub>-Phagen-DNS. Das entspricht einem Informa-

tionsgehalt von  $1,8 \cdot 10^8$  Molekulargewichtseinheiten<sup>38</sup>, was im Vergleich zu den  $6 \cdot 10^9$  Dalton je Chloroplast aus Abb. 8 etwa 30 mal weniger ist. Das bedeutet, daß, wenn die DNS-Bestimmung richtig war, die DNS-Sequenzen sich sehr häufig wiederholen.

## 6 Über die DNS-, RNS- und Protein-Synthese in Chloroplasten

Falls die P-DNS Erbinformation enthält, muß sie vor der Chloroplastenvermehrung repliziert werden und auch an der Synthese von RNS und gewisser Proteine beteiligt sein.

Das Vorkommen von DNS-Polymerase in Chloroplasten wurde, wie erwähnt, durch Einbau von <sup>3</sup>H-Thymin bewiesen (vgl. 2.4). Zudem konnten CHIANG und SUEOKA<sup>23</sup> an Synchronkulturen von *Chl. reinh.* mittels Markierung mit <sup>15</sup>N nach MESELSON und STAHL<sup>39</sup> zeigen, daß die P-DNS sich während der Lichtperiode, die Kern-DNS aber während der Dunkelperiode verdoppelt. In beiden Fällen geschieht die Replikation semikonservativ. Die Verdoppelung der P-DNS erfolgt somit unabhängig vom Zellkern, aber nach einem gleichen molekularen Mechanismus.

Der DNS-abhängige Triphosphonukleotid-Einbau in die RNS von Chloroplasten wurde von mehreren Autoren bei verschiedenen Organismen beschrieben. Er wird durch Vorbehandlung der Chloroplasten mit DNase, RNase oder Actinomycin D gehemmt. Zudem scheinen sich Kern- und Chloroplasten-RNS-Polymerasen durch verschiedene Metallionenempfindlichkeit zu unterscheiden. Die entstehenden RNS-Produkte haben auch eine unterschiedliche Sedimentationskonstante<sup>21</sup>. Zusammen mit den Resultaten der Hybridisierungsversuche deuten diese Befunde darauf hin, daß zumindest die RNS der Chloroplasten-Ribosomen an der P-DNS gebildet wird.

Einen Hinweis darauf, welche Proteine durch die P-DNS codiert bzw. an den Chloroplastenribosomen synthetisiert werden, mögen folgende Versuche geben. Wenn man im Dunkeln kultivierte, farblose *Euglena*-Zellen oder auch durch Glucosefütterung künstlich gebleichte *Chlorellen* wieder ergrünen läßt, dann steigt zuerst der RNS-Gehalt der Chloroplasten an<sup>40</sup>. Erst etwas später setzt die Chlorophyllsynthese ein. Da für Chlorophyll bislang kein Biosynthese-Gen gefunden wurde, welches extrachromosomal vererbt wird<sup>5</sup>, könnte man vermuten, daß die P-DNS über die Synthese von Chloroplastenribosomen und von m-RNS spezifisch am Aufbau der Lamellarstrukturen des Chloroplasten beteiligt sei. Erst nach Bildung dieser Strukturen würde dann das Chlorophyll eingebaut.

<sup>34</sup> B.D.HALL und S.SPIEGELMAN, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 47 (1961) 137.

<sup>35</sup> J.W.LITTELTON, *Exper. Cell Res.* 26 (1962) 312.

<sup>36</sup> N.S.SCOTT und R.M.SMILLIE, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 28 (1967) 598.

<sup>37</sup> J.G.WETMUR und N.DAVIDSON, *J. Mol. Biol.* 31 (1968) 349.

<sup>38</sup> E.STUTZ, *FEBS Letters* 8 (1970) 25.

<sup>39</sup> M.MESELSON und F.W.STAHL, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 44 (1958) 671.

<sup>40</sup> Vgl. etwa S.AKOI und E.HASE, *Plant Cell Physiol.* 8 (1967) 181; M.H.ZELDIN und J.A.SCHIFF, *Plant Physiol.* 42 (1967) 922.

<sup>41</sup> W.STUBBE, *Genetica* 35 (1964) 28.

## 7 Zur Autonomie der Chloroplasten

Daß die P-DNS nicht die gesamte Information für den Aufbau und die Funktion des Chloroplasten enthält, ist heute sicher. Die enge Wechselwirkung zwischen Kern- und Plastiden-Genom wird wohl am besten durch die Versuche von STUBBE<sup>41</sup> an *Euoenothera* (Nachtkerzengewächs) illustriert. Diese Gattung umfaßt verschiedene, untereinander kreuzbare Arten, welche sich durch ihre Kern-Genome und durch ihre Plastidensorten unterscheiden. Man kennt sechs verschiedene diploide Genome und fünf verschiedene Plastidensorten. Durch Kreuzungen konnten alle möglichen Genom-Chloroplasten-Kombinationen hergestellt werden. Aber nur ein Teil ergab grüne und voll lebensfähige Pflanzen, während andere gelbliche oder gescheckte und einige sogar letale Kreuzungsprodukte lieferten. Eine gewisse Verträglichkeit zwischen Chloroplast und Kern-Genom ist also unerläßlich.

<sup>42</sup> E.S. KEMPNER und J.H. MILLER, *Biochim. Biophys. Acta* 104 (1965) 11.

<sup>43</sup> A. BOSCHETTI, unveröffentlichte Werte.

Dennoch kommt dem Chloroplasten innerhalb des Zellgeschehens eine gewisse Autonomie in bezug auf Entwicklung, Vermehrung und Funktion zu. Wie weit diese geht, weiß man noch nicht. Extrem ausgedrückt, könnte man von einer sehr engen Symbiose zwischen Zelle und Chloroplast sprechen. Über die Entstehung dieser Symbiose im Verlaufe der Evolution wurde verschiedentlich spekuliert; z. B. könnte der Chloroplast aus einer Blaualge entstanden sein, welche von einem Protozoon eingefangen worden wäre und sich endosymbiontisch weiter differenziert hätte.

Solche Spekulationen sind aber beim heutigen Stand unserer Kenntnisse wohl verfrüht; denn zuvor warten die vielen, in den letzten Kapiteln angedeuteten Fragen auf ihre Beantwortung.

Die elektronenmikroskopischen Arbeiten durften wir in dankenswerter Weise am Zoologischen Institut der Universität Bern durchführen. Dem Theodor-Kocher-Institut danken wir für die tatkräftige Hilfe bei den Ultrazentrifugationen. Diese Arbeit wurde unterstützt durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung.