

Zusammenfassung

Etched1 (*et1*) ist eine rezessive pleiotropische Mutation in Mais, welche die normale Plastidenentwicklung in Körnern als auch in den Blättern verhindert. Reife *et1* Körner zeigen viele Einkerbungen und Vertiefungen auf der Oberfläche des Endosperms. Normalerweise werden in den Amyloplasten des Endosperms Stärkekörner synthetisiert. Die Abwesenheit dieser Stärkekörner in den im Bereich der Einkerbungen liegenden Speicherzellen wird für den „etched“ Phänotyp verantwortlich gemacht. In extremen Variationen des *et1* Phänotyps sind die *et1* Körner geschrumpft und in einigen Fällen sogar unfähig zu keimen. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten phänotypischen Analysen 20 Tage alte *et1* Körner zeigen, daß Zellen ohne Stärke auch in der zentralen Region des Endosperms vorkommen, strahlenförmig nach außen reichen und deshalb später auf der Oberfläche des reifen Korns als Einkerbungen gesehen werden. *Et1* Keimlinge sind „virescent“, da die Blätter in den ersten 10-15 Tage nach der Keimung vermutlich aufgrund einer verzögerten Entwicklung der Chloroplasten blassweiss oder blassgrün bleiben. Das *et1* Gen wurde für vertiefende genetische und molekularbiologische Analysen ausgewählt, weil es zwei verschiedene Entwicklungsstadien beeinflusst, die wichtig für das Überleben der Pflanze sind. Außerdem sind molekulare Untersuchungen der an der Endospermentwicklung beteiligten Mechanismen bei Mais aufgrund der wichtigen ökonomischen Bedeutung dieser Pflanze von besonderem Interesse.

Molekulare Analysen weisen darauf hin, daß die Abwesenheit des *et1* Genproduktes Ursache für den *et1* Mutanten Phänotyp sein könnte. Das *et1-R* „reference“ Allel entspricht einer Deletion des kompletten *et1* Gens vom Locus (Ahrend, 1998) Außerdem konnte in Northern Analysen an verschiedenen *Mu*-Transposon induzierten *et1* Mutanten kein *et1* Transkript detektiert werden (da Costa e Silva *et al.*, 2001). Ziel dieser Arbeit war deshalb die Untersuchung von Struktur und Funktion des *et1* Gens und seines Genproduktes in der Wildtyp Inzuchtlinie Line C (LC). Northern Analysen zeigten eine starke *et1* Expression in allen Entwicklungsstadien von Blättern und in Körnern, beginnend 6 Tage nach der Pollinierung. Eine geringere *et1* Expression konnte auch in der Fahne, dem Stengel und in der Koleoptile, beobachtet werden. In allen anderen getesteten Geweben war eine sehr schwache Grundexpression des *et1* Gens festzustellen.

Analysen sowohl der genomischen Sequenz als auch von cDNA Klonen zeigen, dass das *et1* Gen für ein putatives Protein mit 163 Aminosäuren kodiert. Import-Experimente mit Chloroplasten konnten zeigen, dass das Protein in Plastiden transportiert wird. Basierend auf der Proteinsequenz und *in silico* Analysen des Präproteins wird für das prozessierte Protein eine Länge von ca. 99 Aminosäuren vermutet. Folglich handelt es sich um ein relativ kleines Protein. Theoretische Strukturanalysen des Proteins weisen darauf hin, dass das ET1 Protein eine zentrale Domäne mit Ähnlichkeit zu einem „zinc ribbon“ Motiv enthält. Dieses wird auf beiden Seiten von helikalen Subdomänen flankiert. „zinc ribbon“ Domänen sind durch eine antiparallele dreisträngige β -Faltblatt-Struktur charakterisiert, die mit Hilfe eines Zn^{2+} Atoms zusammengehalten wird. Zusätzlich ist das Motiv durch weitere topologische Merkmale charakterisiert, wie z.B. bestimmte Aminosäuren, die aufgrund ihrer physikochemischen Natur bei intermolekularen Wechselwirkungen in der funktionellen Domäne eine Rolle spielen. Diese Wechselwirkungen können in verschiedenen „zinc ribbon“ Proteinen entweder mit Nukleinsäuren oder mit homologen Proteindomänen (Dimerisierung) erfolgen. Allerdings kann, basierend auf den Vergleichen zwischen dem ET1 Protein und „zinc ribbon“ Domänen von verschiedenen Proteinen, die sich sowohl in Struktur als auch in Funktion voneinander unterscheiden, dem ET1 Protein keine eindeutige Funktion zugeordnet werden. Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit, daß es sich hierbei um eine neue Variante einer „zinc ribbon“ Domäne handelt. Dieser Aspekt muss in weiteren Analysen behandelt werden. Vom jetzigen Wissensstand über genetische Systeme in Plastiden sowie über die verschiedenen

Mechanismen der Genregulation, könnte dem *et1* Gen eine möglicherweise regulatorische Funktion während der Plastidenentwicklung, entweder auf der transkriptionellen oder auf der post-transkriptionellen Ebene (inklusive Translation), zugeordnet werden.

In früheren Untersuchungen der *et1-R* Linie konnten genomische Klone isoliert werden, die mit der *et1* cDNA hybridisieren, aber nicht zum *et1* Allel gehören (Ahrend, 1998). Die in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzanalysen dieser genomischen Klone zeigen, daß diese sehr wahrscheinlich einem anderen neuen Gen, *zmzr1*, zuzuordnen sind, welches eine hohe Homologie zu *et1* besitzt. Southern-Analysen mit genomischer DNA der Linie LC zeigen, dass das *zmzr1*-Gen in dieser Linie auch eine sehr ähnliche genomische Struktur besitzt. Ein Vergleich der Promoter Sequenzen des *et1* und des *zmzr1* Gens zeigen, daß diese Regionen zwischen beiden Genen sehr verschieden sind – ein Merkmal das häufig bei paralogen Genen auftritt. Eine *in silico* Analyse der Promoterregion hinsichtlich möglicher cis-regulatorischer Elemente weist darauf hin, dass beide Gene wahrscheinlich völlig unterschiedlich reguliert werden. Northern Analysen mit Gesamt-RNA und *zmzr1*-spezifischen Sonden konnten bislang keine Expression dieses Gens in den untersuchten Geweben nachweisen. In den „online“ Datenbanken wurde außerdem ein EST Klon aus Mais mit hoher Homologie zum *zmzr1* Gen gefunden. Ein Vergleich der ZMZR1 und ET1 Proteine zeigt eine hohe Homologie zwischen beiden Proteinen. Die größten Unterschiede zwischen beiden Proteinen treten in der Region des Transitpeptids für den Plastidentransport auf. Die reifen Proteine der beiden zeigten ähnliche Sekundärstruktur

Ein Vergleich der beiden Proteine mit den „online“ EST Datenbanken ergab Homologien zu einer Vielzahl von pflanzlichen Proteinen, wobei auch ein potentielles neues *et1/zmzr1* homologes Gen aus Mais identifiziert werden konnte. Basierend auf den Homologien zwischen allen Proteinen konnten zwei Proteingruppen identifiziert werden. Zu einer der Gruppen gehören die Proteine, die eine höhere Homologie zum ET1 und ZMZR1 Protein besitzen. In der zweiten Gruppe sind Proteine mit einer höheren Homologie zu dem neuen, dritten ET1 homologen Protein aus Mais enthalten. Bei dieser Gegenüberstellung wurde deutlich, daß aus vielen Pflanzen jeweils zwei homologe Proteine in den Datenbanken identifiziert wurden, von denen eines mehr homolog zu der ET1/ZMZR1 Gruppe ist, während das andere Protein in die Gruppe mit dem dritten ET1 homologen Maisprotein passt. Dieses Ergebnis läßt vermuten, dass es sich hier um zwei paraloge Sequenzgruppen handelt, die sehr wahrscheinlich bereits vor der Aufspaltung monocotyler und dicotyler Pflanzen entstanden sind. Dagegen repräsentiert das putative ZMZR1 Protein aus Mais, welches zu der ET1 Gruppe gehört, wahrscheinlich eher eine jüngere Genduplikation innerhalb des Maisgenoms dar, weil bislang nur in Mais drei *et1*-homologe Gene gefunden wurden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern weitere Beweise dafür, dass das in dieser Arbeit untersuchte Gen, wenn es mutiert ist, für den *et1* Phänotyp verantwortlich ist. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß andere, unabhängige oder epistatische Faktoren auch an der phänotypischen Ausprägung mitbeteiligt sein könnten. Diese könnten Ursache für die hohe Variabilität der Mutation in verschiedenen Maislinien sein. Das putative *Et1* Gen ist sehr wahrscheinlich an der Regulation früher Plastidenentwicklung in Körnern und Blättern beteiligt. Weitere Analysen sind jedoch notwendig, um die Funktionsweise aufzuklären, wie ET1 als ein regulierender Faktor in den Plastiden beteiligt ist.

Summary

Etched1 (*et1*) is a pleiotropic mutation of maize, which visibly affects plastid development in the kernels and seedlings. The mature kernels show a large number of indentations and crevices on the endosperm surface. The absence of starch grains, produced normally in the amyloplasts of the starchy-endosperm cells, around the crevices causes the “etched” appearance. In more extreme phenotypic variations, the kernels appear shrivelled and in some cases also fail to germinate. Phenotypic analysis carried out in this study on 20 DAP kernels showed that the starchless cells were also present in the central region of the endosperm radiating out up to the periphery and were, then, observed superficially as surface indentations in mature kernels. The seedlings were virescent, as the leaves remained white to pale green in the first 10 to 15 days after germination, due to delayed chloroplast development. The *et1* gene was chosen for further genetic and molecular analysis, as it affected two distinct developmental stages of the plant, which were also critical to the plant survival. Moreover, molecular examinations of the regulatory mechanisms involved in endosperm development of maize have long been of interest due to its economic importance.

Molecular observations indicated that the absence of the *et1* gene product was the cause of the mutant phenotype. The *et1-R* reference allele revealed a deletion of the complete *et1* gene from its locus (Ahrend, 1998), and in the Northern analyses with the *Mu*-transposon induced *et1* mutants, no *et1* transcript was detectable (da Costa e Silva et al., 2001). Therefore, this study focused on the analysis of the structure and function of the *et1* gene as well as its gene product, which was evaluated using the wild type inbred line, LC. Northern analyses revealed strong *et1* expression at all stages of development in the leaves, and from 6 DAP onwards in the kernels. Other tissues with good *et1* expression included the tassels, stem and coleoptile. Otherwise, a weak basal *et1* expression was observed in all the other tissues analysed.

Sequence analysis of the *et1* gene as well as its cDNA clone revealed that it codes for a small protein, about 163 amino acids long. However, chloroplast import experiments revealed that the protein is plastid localised. Therefore, based on the sequence analysis as well as *in silico* analyses on the pre-protein, the mature protein, after cleavage of the transit sequence, was predicted to be only 99 amino acids long. Thus, it represented a comparatively small protein. Structural analyses of the protein and its comparison to structurally characterised proteins indicated that the ET1 protein probably contained a central zinc ribbon like motif, bordered on both sides by helical sub-domains. Zinc ribbon domains are characterised by the presence of a three-stranded antiparallel β -sheet, held together by a zinc ion, bound to four amino acid ligands in the domain. It is also characterised by the presence of other topological features such as the physiochemical nature of the amino acids, required for interaction with other molecules, which could either be nucleic acids or homologous protein domains, involved in dimerisation. Based on its comparison to the different functional as well as structural variations of the zinc ribbon domain from different proteins, all possible functions were attributable to the ET1 protein. On the other hand, it was possible that it represented another unique zinc ribbon domain. This aspect needs to be further researched. However, present knowledge about the plastid genetic system, as well as the various mechanisms controlling plastid gene expression, indicate that ET1 probably regulates plastid development at the transcriptional or post-transcriptional level, which includes translation.

Another analysis of the *et1-R* line (Ahrend, 1998) showed genomic clones hybridising with the *et1* cDNA, which did not correspond to the *et1* locus. Sequence analysis carried out in this study revealed that they represented another gene, *zmzr1*, with very high homology to *et1*. Southern analyses on LC indicated that *zmzr1* had a very similar structure in LC. Comparison of the upstream promoter region of *zmzr1* and *et1* showed that this was completely different between the two loci – a feature often observed among paralogous genes. Analysis of their promoter regions indicated the presence of different cis elements so that they were probably differently regulated. Northern analyses with *zmzr1* probes using total RNA blots did not reveal any expression. However, a cDNA clone could be amplified from an *et1-R* developing kernel cDNA library. Moreover, an EST clone expressed in tassels was also identified from online databanks. Comparison of the ZMZR1 protein to ET1 showed high homology between the two proteins. Most of the variation was present in the plastid transit sequence region. The mature proteins of both revealed similar secondary structure.

Comparison of the proteins to online EST databanks revealed a large number of plant homologues, with an additional paralogue identified from maize. Alignment of the protein sequences from all the ESTs indicated that it represented a third homologous transcript/gene in maize. Based on the homology among all the plant homologues, two groups of sequences could be identified from the alignment. In one group, sequences more homologous to ET1 and ZMZR1 were present, whereas the other contained sequences more homologous to the new maize paralogue of ET1. More importantly, two EST sequences each were obtained from different plant sources, including *Arabidopsis*, one of which showed higher homology to the ET1/ZMZR1 group and the other to the third maize EST. This indicated that these two groups of paralogous sequences probably arose very early, before the divergence of the dicots and monocots. On the other hand, ZMZR1, based on its high homology to the first group, represented a more recent duplication event – very probably within the maize genome, as the three different homologues were only found in maize.

The results presented in this thesis provide further evidence that it is the cloned gene analysed in this study, which, on mutation, is responsible for the *etched1* phenotype. Although, it cannot be ruled out that other independent or epistatic factors might also be influencing the *et1* phenotype, causing the variations observed among different maize lines. The putative *Et1* gene might be involved in regulating early plastid development. However, further analyses need to be carried out to determine the type of interactions in which the ET1 protein might be involved to bring about the regulatory affects in the plastids.