

## 5 Zusammenfassung

Die pleiotrope Mutation *etched1* bei *Zea mays* L. bewirkt bei Maiskörnern und in Maissämlingen deutlich sichtbare Entwicklungsstörungen der Plastiden. Dabei zeigen reife Körner eine Vielzahl von Rissen und Fissuren, vor allem im Bereich der oberen Endospermschichten. In extremer Ausprägung des Phänotyps sind die Körner sehr stark deformiert und nicht mehr keimfähig. Junge Sämlinge aus *etched1*-Mutanten hingegen zeigen einen „virescenten“ Phänotyp. Die ersten beiden Blätter der Pflanzen sind weiß bis blaßgrün, aber regenerieren sich 10 bis 15 Tage nach der Keimung zu normal grünen Blättern. Alle weiteren Blätter der *etched1*-Pflanzen sind gleich von Anfang an genauso grün wie Blätter einer Wildtyp-Pflanze in der gleichen Wachstumsphase.

In dieser Arbeit sollte vorrangig die Fragestellung bearbeitet werden ob und wie das von da Costa é Silva klonierte *Etched1* Gen in *etched1*-Mutantenlinien vorhanden ist, die über Transposonumlagerung (mit dem Mutatorelement) hergestellt wurden. Die Sequenzanalyse unterschiedlicher *etched1*-Mutantenlinien hat gezeigt, daß das *Etched1* Gen in allen Linien durch die Insertion eines Mutatorelementes mutiert ist. Außerdem hat sich gezeigt, daß es für die Insertion von Mutatorelementen innerhalb des *Etched1* Gens einen Hot Spot im Bereich des Exon1 gibt. Die Insertionspräferenzen der Mutatorelemente führten dazu, daß in vier von fünf bisher analysierten Linien die Insertionen innerhalb von vier Basenpaaren, kurz vor dem Startcodon des *Etched1* Gens erfolgten. Dabei sind je zwei der vier Mutantenlinien bezüglich der Insertionssequenz/Zielsequenz ihres Mutatorelementes (Mu8) identisch (Linien *et1-m3/et1-m15* bzw. *et1-m10/et1-m12*). Sie unterscheiden sich teilweise aber durch die Orientierung (Insertionsrichtung) des Mutatorelementes und den genetischen Hintergrund.

Durch biolistische Transformation hergestellte transgene *Et1*-Pflanzen und ihre Analyse zeigten zum Teil einen „*etched1*-ähnlichen“ Phänotyp in Körnern und Sämlingen. Dies gibt einen weiteren Hinweis darauf, daß das untersuchte Gen tatsächlich für die *etched1*-Mutation verantwortlich ist.

Durch *in situ* Experimente mit sense und antisense RNA-Sonden der kompletten *Etched1*-cDNA, konnte die Expression des Gens in Maiskörnern des Wildtyps nachgewiesen werden. Die Expression des *Etched1* Gens scheint im Bereich des Aleurons, den äußeren Endospermschichten, im äußeren Perikarp und im Embryo zu erfolgen. Erwartungsgemäß konnte in der Mutantenlinien *et1-ref* keine *Etched1*-mRNA detektiert werden.

Die Effizienz des Photosystems II, ermittelt durch Messung der Chlorophyllfluoreszenz, ist bei Sämlingen von *et1-ref*-Pflanzen deutlich niedriger als bei transgenen *Etched1*-Sense- und Wildtyp-Pflanzen. Durch die Messung wird deutlich, daß die *et1*-Mutation nicht nur auf anatomischer, sondern auch auf physiologischer Ebene Einfluß auf die Chloroplasten-Entwicklung nimmt. Dieser Einfluß konnte bei den transgenen Linien nicht nachgewiesen werden.

In Westernblots, die mit dem Gesamtprotein und dem Chloroplastenprotein verschieden alter Wildtyp und *et1-ref* Pflanzen, mit *Etched1*-Antiseren, durchgeführt wurden, konnten vermutlich nur unspezifische Protein-Banden detektiert werden. Bei einem spezifischen Nachweis für das ET1-Protein hätte man Proteine mit einem Molekulargewicht von 11 kDa in den Chloroplasten (prozessiertes Protein) und 18 kDa im pflanzlichen Gesamtproteinextrakt erwartet. Proteine mit einem Molekulargewicht von 11 kDa konnten aber auch in Wildtyp-Chloroplasten nie mit den Antiseren nachgewiesen werden. Alle in Chloroplasten detektierten Proteine waren mindestens 17 kDa groß.

Weiterführende Analysen der Arbeitsgruppe Krupinska/Universität Kiel deuten darauf hin, daß aufgereinigte *Etched1*-Antikörper bei der Immunodetektion mit verschiedenen hochaufgereinigten Chloroplastenfraktionen von Mais und Spinat ein 11 kDa großes Protein detektieren, das Teil des „transcriptionally active chromosome“ ist (Krupinska, Müller, pers. Mitteilung).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die erfolgreiche Klonierung des *Etched1* Gens aus *Zea mays*. Durch die umfangreiche Analyse Mutator-induzierter Mutantenlinien und das Auftreten eines „*etched1*-ähnlichen“ Phänotyps in *Etched1*-transgenen Pflanzen, konnte gezeigt werden, daß Mutationen des *Etched1* Gens mit *etched1*-Phänotypen korrelieren. Das putative ET1-Protein könnte in die Regulation der frühen Plastidenentwicklung in Körnern und Blättern, möglicherweise als Komponente des TAC-Komplexes, involviert sein. Somit könnte das ET1-Protein an Metabolismen beteiligt sein, die direkt oder indirekt in die Plastidenentwicklung eingreifen. Es sind aber noch weitere vertiefende Analysen nötig, um die Art der Interaktion des *Etched1* Genproduktes innerhalb der Plastidenentwicklung näher charakterisieren zu können.