

Heterosis assoziierte Genexpression
in frühen Entwicklungsstadien von
Zea mays L.

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Departments Biologie der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Stephanie Meyer
aus Bienenbüttel

Hamburg, 2007

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. E. KRANZ
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. U. WIENAND
Tag der Disputation: 11. Mai 2007

Hamburg, den 23. April 2007



Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Diese Arbeit wurde an der Universität Hamburg am Biozentrum Klein Flottbek in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Erhard Kranz, Abteilung Entwicklungsbiologie und Biotechnologie, durchgeführt und von Herrn Dr. Stefan Scholten betreut.

1. Dissertationsgutachter: Prof. Dr. Erhard Kranz, Universität Hamburg
2. Dissertationsgutachter: Prof. Dr. Udo Wienand, Universität Hamburg

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht bzw. auf Kongressen präsentiert:

Lê, Q., Gutiérrez-Marcos, J., Costa, L. M., Meyer, S., Dickinson, H., Lörz, H., Kranz, E., Scholten, S. (2005) Construction and screening of subtracted cDNA libraries from limited populations of plant cells: a comparative analysis of gene expression between maize egg cells and central cells. *The Plant Journal* 44:167-178

Meyer, S., Pospisil, H., Scholten, S. (2007) Heterosis associated gene expression in maize embryo six days after fertilization exhibits additive, dominant and overdominant pattern. *Plant Mol Biol* 63:381-391

Meyer, S. und Scholten, S. Equal parental contribution to early plant zygotic development. (eingereichtes Manuskript)

Meeting COST 853: Agricultural Biomarkers for Array-Technology, 16.08.-17.08.2004, Helsinki, Finnland

8th Gatersleben Research Conference: Genetic Diversity & Genome Dynamics in Plants, 03.06-06.06.2005, Gatersleben, Deutschland

Symposium des DFG-Schwerpunktprogramms 1149: Heterosis in Plants, 18.05-20.05.2006, Potsdam-Golm, Deutschland

Plant Genetics Conference: 20.09-23.09.2006, Kiel, Deutschland

5 Zusammenfassung

Heterosis bezeichnet eine erhöhte Vitalität, die nur bei mischerbigen Pflanzen und Tieren auftritt und zu erheblichen Ertragssteigerungen führen kann. Obwohl Heterosis seit einem Jahrhundert in der Landwirtschaft extensiv eingesetzt wird, ist die molekulare Basis des Phänomens bislang weitgehend ungeklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, Heterosis in der frühen Kornentwicklung von Mais, kurz nachdem zwei unterschiedliche Genome durch die Befruchtung vereint wurden und gemeinsam die Entwicklung des Embryos und Endosperms steuern, zu untersuchen. Neben einer phänotypischen Charakterisierung zur Bestimmung des Ausmaßes von Heterosis in diesen beiden Geweben sollten assoziierte Gene, deren Expressionsmuster, sowie deren Regulation analysiert werden. Die Identifikation und Charakterisierung von Heterosis assoziierten Genen und Expressionsmustern sollte den Einstieg zur Erforschung von regulatorischen Netzwerken und Mechanismen ermöglichen, die für die Ausprägung des Phänomens von Bedeutung sind.

Zwei dent Inzuchtlinien und eine flint Inzuchtlinie mit unterschiedlicher genetischer Distanz und deren heterozygoten Nachkommen, die Heterosis verschieden stark ausprägen, bildeten die Basis für die Untersuchungen dieser Arbeit. Das diploide Embryogewebe und triploide Endosperm wurden getrennt analysiert, um Unterschiede, die durch die verschiedenen genomischen Verhältnisse bedingt sind, aufzeigen zu können.

Die gezielte Isolation der Gewebe durch Mikrodisektion gewährleistete eine genaue phänotypische Charakterisierung und eine hohe Sensitivität in den molekularen Untersuchungen. Zur Identifikation von differentiell exprimierten Genen zwischen Hybrid- und Inzuchtgeweben wurde eine hoch effiziente PCR basierte cDNA-Subtraktionsmethode mit Microarrayhybridisierungen, die die gleichzeitige Untersuchung von tausenden Genen gestatten, kombiniert. Die Subtraktionsmethode ermöglichte die Anreicherung von stärker oder ausschließlich exprimierten cDNAs der Hybrid- bzw. Inzuchtgewebe. Angereicherte cDNA-Banken und -Populationen wurden sowohl zur Herstellung eines cDNA-Microarrays als auch in einem differentiellen Screening eingesetzt. Um in der frühen Entwicklung möglichst aussagekräftige Expressionsanalysen zwischen den Inzucht- und Hybridgenotypen durchführen zu können, wurde ein fokussiertes, 3000 cDNAs umfassendes Array produziert, in dem Genfragmente der frühen Embryogenese und Chromatin assoziierter Proteine zusammengestellt wurden. Da quantitative RT-PCR die sensitivste Technik zur Bestimmung der Transkriptmengen ist, wurde diese Methode zur Validierung der Microarraydaten und zur Erfassung von Expressionsmustern genutzt. Allelspezifische Analysen dienten dazu, die Expression der elterlichen Allele in Hybriden zu untersuchen, um Aussagen über Regulationsmechanismen und die paternale Genomaktivierung zu ermöglichen.

Für Hybridembryonen wurde eine erhöhte Zellteilungsrate gezeigt, die bereits 6 Tage nach der Befruchtung zu erheblichen Größenunterschieden gegenüber den Elternlinien führt. Die Größenzunahme war signifikant, beständig nachweisbar und betrug maximal 180% im

Vergleich zur mütterlichen Inzuchtlinie. Geringere Zuwachsraten und eine stark mütterlich geprägte Größe waren für das Endospermgewebe der Hybride feststellbar.

Sechs Tage nach der Befruchtung weist die Existenz der heterotischen Merkmale auf eine veränderte Genexpression in Hybridgeweben hin, die durch den Vergleich mit der Genexpression der elterlichen Inzuchtlinien sowohl im differentiellen Screening als auch in den Untersuchungen mit dem fokussierten Microarray nachgewiesen werden konnte.

Im Embryo konnte eine Assoziation von Heterosis mit Genen, die mit der Signaltransduktion und anderen regulatorischen Prozessen in Verbindung stehen, durch den verstärkten Nachweis differentiell exprimierter Gene dieser funktionellen Klassen festgestellt werden.

Im Endospermgewebe der Hybride wurde sechs Tage nach der Befruchtung vorwiegend dosisabhängige Genexpression nachgewiesen, aber auch ein deutlicher Einfluss der väterlichen Allele gezeigt.

Ein Indiz für die Beteiligung der hormonellen Regulation an Heterosis war die Identifikation der differentiellen Expression des Gens *dwarf8*, ein orthologes Gen zu dem Gibberellin insensitiven Gen aus *Arabidopsis*. *Dwarf8* wies in allen Hybrid-Inzucht-Vergleichen ein überdominantes Expressionsverhalten in den Endospermgeweben der Hybride auf.

Eine Beteiligung epigenetischer Mechanismen an den transkriptionalen Veränderungen zwischen Hybriden und Inzuchtlinien deutet sich durch die Heterosis assoziierte Expression von 38 Chromatingenen in Embryo- und Endospermgewebe an. Während Gene strukturgebender Chromatin assoziierter Proteine eine vorwiegend additive Expression zeigten, konnte für Chromatingene mit modifizierender, remodulierender oder regulierender Funktion eine hauptsächlich über- bzw. unterdominante Expression in Hybriden nachgewiesen werden.

Allelische genregulatorische Interaktionen in Embryo- und Endospermgewebe der Hybride konnten durch den Nachweis dominanter und überdominanter Genexpressionsmuster übereinstimmend in den Expressionsanalysen des differentiellen Screenings, der Microarray-hybridisierungen und der quantitativen RT-PCR Untersuchungen aufgezeigt werden.

Durch allelspezifische Analysen von 20 Genen, konnten Heterosis assoziierten Genexpressionsmustern in sechs und acht Tage alten Embryonen eine regulatorische Basis zugeordnet werden. Diese Daten deckten eine Regulationsumstellung in diesem Zeitraum auf. Während in sechs Tage alten Hybridembryonen eine stark *trans*-regulierte Expression festgestellt wurde, war diese in acht Tage alten Embryonen vorwiegend *cis*-geprägt. Diese Regulationsumstellung deutet auf molekulare Prozesse der frühen Embryogenese hin, die mit der Justierung einer kombinierten Expression der elterlichen Allele und damit auch mit der Etablierung von Heterosis in Zusammenhang stehen.

Gleichwertige elterliche Genomaktivitäten konnten in *Zea mays* schon vor der ersten Zellteilung sowie in drei und sechs Tage alten Embryonen durch allelspezifische Expressionsanalysen von 20 Genen gezeigt werden. Eine schwache Präferenz für maternale Transkripte verringerte sich schnell und ist sechs Tage nach der Befruchtung vollständig aufgehoben.

Diese Ergebnisse zeigen, dass in Mais die Embryonalentwicklung umgehend nach der Befruchtung durch beide elterlichen Genome kontrolliert wird. Damit sind wesentliche Voraussetzungen für Heterosis bereits in der Zygote gegeben und bieten eine Erklärung für die beachtlichen Größenunterschiede zwischen Hybridembryonen und Embryonen der mütterlichen Inzuchtlinie in der frühen Kornentwicklung.

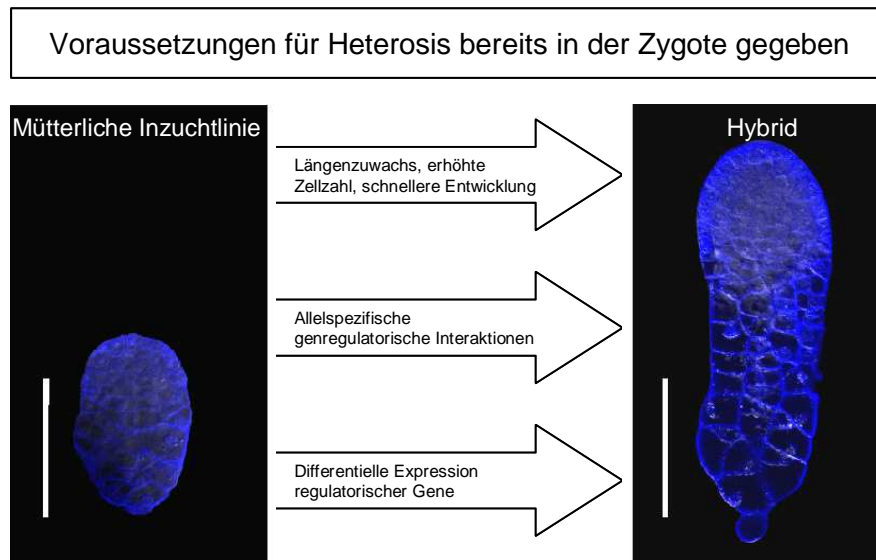


Abbildung 30: Heterosis in der frühen Embryonalentwicklung von *Zea mays* L. Gezeigt sind ein repräsentativer Embryo der mütterlichen Inzuchtlinie und ein Hybridembryo, die sechs Tage nach der Befruchtung isoliert wurden. Erkenntnisse, die in Bezug auf Heterosis für Embryogewebe im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden, sind dargestellt. Die Pfeile zeigen Hybridcharakteristika auf bzw. deuten eine putative Einflussnahme auf die Entwicklung des Hybridembryos an. Der Maßstab gibt jeweils 100µm wieder.