

Der Einfluss von CT2 auf die Entwicklung von *Zea mays* (L.)

Inauguraldissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften

dem Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie
des Fachbereichs Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Dave P. Stateczny

2021

Erster Gutachter: Dr. rer. nat. Peter Bommert

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Arp Schnittger

Datum der Disputation: 28.05.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Zusammenfassung/Abstract	1
Zusammenfassung.....	1
Abstract	2
Einleitung.....	3
Ergebnisse.....	16
Die gewebespezifische und subzelluläre Lokalisierung von CT2	16
CT2 interagiert nicht mit Mikrotubuli	24
Phospholipasen beeinflussen die GTPase-Aktivität von CT2.....	34
Die Rolle von CT2 in der Phytohormon-Signaltransduktion.....	56
Verlust des Fasziations-Phänotyps	62
Diskussion	75
Verwendete Methoden	99
Pflanzenmaterial und Wachstumsbedingungen	99
Molekularbiologische Methoden	104
Mikrobiologische Methoden	108
Proteinbiochemische Methoden	109
Mikroskopische Methoden	113
Computergestützte Methoden	115
Appendix.....	A
Supplement	A
Verwendete Materialien	S
Herstellerverzeichnis	EE
Abkürzungsverzeichnis.....	HH
Abbildungsverzeichnis	JJ
Tabellenverzeichnis.....	LL
Posterpräsentationen.....	OO
Eidesstattliche Erklärung.....	PP
Danksagung	QQ
Bibliografie	RR

Zusammenfassung/Abstract

Zusammenfassung

Heterotrimere G Proteine sind membranassoziierte Komplexe und bestehen aus den drei Untereinheiten $G\alpha$, $-\beta$ and $-\gamma$. Sie unterstützen die Signaltransduktion vom extrazellulären in den intrazellulären Raum um spezifische zelluläre Reaktionen hervorzurufen. Sie sind essentiell für eine Vielzahl von Wachstums- und Entwicklungs-Prozessen von Tieren und Pflanzen. Trotz ihrer Wichtigkeit sind bisher nicht alle Funktionen von G Proteinen in Pflanzen aufgeklärt und speziell in *Z. mays* ist wenig über ihr Wirken abseits der Kontrolle der Stammzellpopulation bekannt.

In *Z. mays* wurde COMPACT PLANT2 (CT2) als die kanonische $G\alpha$ -Untereinheit identifiziert. Der Phänotyp von *ct2*-Mutanten ist pleiotrop und indiziert so eine Beeinflussung der Zellproliferation und -elongation: Die Pflanzen weisen stark vergrößerte Meristeme auf, während ihre verkürzten Internodien einen Semi-Zwergwuchs bewirken und die Blattentwicklung der Pflanzen stark beeinträchtigt ist. Jedoch war bisher nicht bekannt, auf welche Weise CT2 dies beeinflusst. Daher war das Ziel dieser Dissertation die weitere Charakterisierung der Rolle von CT2 in der *Z. mays*-Entwicklung.

Die Analysen zeigten, dass posttranslationale Modifikationen verschiedener Isoformen von CT2-YFP gewebespezifische subzelluläre Lokalisierung bewirkten. Dies deutete auf distinkte Funktionen hin. In diesem Zusammenhang wurde unter anderem die Lokalisierung von CT2 am Phragmoplasten einer sich teilenden Zelle beobachtet, was zum Anlass genommen wurde zu untersuchen, ob CT2 die Dynamik kortikaler Mikrotubuli beeinflusst. Dies konnte überraschenderweise nicht gezeigt werden. Des Weiteren wurden Evaginationen der Plasmamembran von CT2-LOF-Zellen entdeckt. Diese und veröffentlichte Daten indizierten eine Interaktion von CT2 mit *Phospholipasen Da* (ZmPLDAs). Die Untersuchung der putativen Interaktion von CT2 mit ausgewählten ZmPLDAs zeigte, dass diese Proteine miteinander interagieren können und dass ZmPLDs die GTPase-Aktivität von CT2 erhöhen können. Damit stellen ZmPLDAs die ersten beschriebenen *GTPase-aktivierenden Proteine* (GAPs) in *Z. mays* dar. Ferner konnte keine Beeinflussung der Phytohormon-Signaltransduktion durch CT2 nachgewiesen werden, wohingegen die Introgression des CT2-LOF-Allels in den Mo17-Haplotyp eine Beeinflussung des Plastochrons in der Entwicklung der weiblichen Infloreszenzen durch CT2 indizierte. All diese Ergebnisse unterstrichen die Komplexität der G Protein-vermittelten Signaltransduktion.

Abstract

Heterotrimeric G proteins are membrane-associated molecular switches that are composed of the three subunits $G\alpha$, $-\beta$ and $-\gamma$. They support the transduction of extracellular signals to induce specific cellular responses by activating *downstream* effectors. As such, they are essential for a wide range of growth and developmental processes in animals as well as plants. Despite their importance, not all functions of G proteins have been elucidated in plants and, especially in *Z. mays*, little is known about their actions beyond stem cell population control.

In *Z. mays* COMPACT PLANT2 (CT2) was identified as the canonical $G\alpha$ -subunit. The phenotype of *ct2* mutants is pleiotropic, indicating an influence of CT2 on cell proliferation and elongation: the plants exhibit enlarged meristems, while their shortened internodes result in semi-dwarfism and the plants' leaf development is severely impaired. However, it was unknown in which way CT2 affects this. Therefore, the aim of this dissertation was to further characterize the role of CT2 in *Z. mays* development with forward genetic methods.

The analyses showed that posttranslational modifications of different isoforms of CT2-YFP caused tissue-specific subcellular localization. This indicated distinct functions. In this context, the localization of CT2 to the phragmoplast of a dividing cell was observed, which was taken as an opportunity to investigate whether CT2 affects the dynamics of cortical microtubules. Surprisingly, this could not be shown. Furthermore, evaginations of the plasma membrane of CT2-LOF cells were detected. These and published data indicated an interaction of CT2 with phospholipases D α (ZmPLD α s). Examination of the putative interaction of CT2 with selected ZmPLD α s revealed that these proteins can interact with each other and that ZmPLD α s can increase the GTPase activity of CT2. Thus, ZmPLD α s represent the first described *GTPase-activating proteins* (GAPs) in *Z. mays*. Furthermore, CT2 was not shown to affect phytohormone signal transduction, whereas introgression of the CT2-LOF allele into the Mo17 haplotype indicated that CT2 affects the plastochron in developing female inflorescences. All these results underscored the complexity of G protein-mediated signal transduction.

Einleitung

„**E** pluribus unum“ (dt.: „Aus vielen Eines“) steht seit 1782 auf dem Siegel der USA. Der ehemalige Wahlspruch des Landes, der vermutlich auf den antiken Schriftsteller *Heraclit* zurückgeht, versinnbildlicht unter anderem den heterotrimeren Komplex des *Guanosinriphosphat-bindenden Proteins* (*GTP-bindendes Protein* oder *G Protein*), der aus drei Untereinheiten ($G\alpha$, $G\beta$ und $G\gamma$) eine funktionale Signaltransduktionseinheit bildet. G Proteine ermöglichen in allen bisher bekannten Systemen die Weitergabe von Signalen vom extrazellulären Raum in das Innere der Zelle. Hoch konserviert kommen sie in allen untersuchten eukaryotischen Arten vor und sind damit ein essentieller Bestandteil des Lebens wie wir es kennen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die kanonische $G\alpha$ -Untereinheit COMPACT PLANT2 (CT2) von *Zea mays* (L.), welche Peter Bommert *et al.* im Jahr 2013 als solche charakterisierten [1], untersucht.

Warum *Zea mays*? *Zea mays* subsp. *mays* (L.) ist eine monokotyle Pflanze und gehört zu der Familie der *Süßgräser* (*Poaceae*). Ursprünglich dem Wildgras *Teosinte* entstammend, wird *Z. mays* bereits seit ca. 10.000 Jahren durch die Menschheit genutzt [2]. Nachdem *Z. mays* nach Europa gebracht worden war, wurde schnell das Potenzial zur Ernährung einer wachsenden Bevölkerung erkannt. Von Europa aus wurde die Pflanze über die ganze Welt verbreitet und dient seitdem als eine der wichtigsten Nutzpflanzen [3]. Seit Anfang des 19. Jahrhunderts wird *Z. mays* auch als Modellorganismus der Biologie genutzt. Die gute Zugänglichkeit aller Organe in verschiedenen Entwicklungsstadien, die Möglichkeit der Kontrolle von Kreuzungen sowie die hohe Zahl an Samen machten die Pflanze zu einem vielgenutzten Werkzeug der Genetik und der Entwicklungsbiologie des 20. Jahrhunderts [4]. Dies gipfelte in der Veröffentlichung der ersten vollständigen Sequenz des Genoms der *rekombinanten Inzuchtlinie* (*recombinant inbred line*, RIL) B73 im Jahr 2009 [5]. Auch die ökonomische Bedeutung von *Z. mays* nahm weiter zu. So wurden im Jahr 2018 weltweit mehr als 1 Mrd. Tonnen Mais [6] produziert. Gegenüber dem Jahr 1970 bedeutet dies eine Ertragssteigerung um mehr als das vierfache [6], während die bebaute Fläche in dieser Zeit nur um den Faktor 1,7 vergrößert wurde [6]. Diese Ertragssteigerungen begannen bereits mit der Domestizierung von *Z. mays*, indem bestimmte, den Ertrag steigernde Eigenschaften der Pflanzen bevorzugt propagiert wurden [7] und fanden ihren bisherigen Höhepunkt in der *Grünen Revolution* des 20. Jahrhunderts. Diese bereits seit Jahrtausenden andauernde Selektion förderte bestimmte anatomische Merkmale, die einen Einfluss auf den Ertrag haben. Dazu zählen unter anderem vegetative Merkmale wie die Pflanzenhöhe, der Grad der Sproßverzweigung, der Blattwinkel und -fläche sowie generative Merkmale wie z. B. die Anzahl bzw. Größe der Infloreszenzen und die Anzahl der Karyopse [8-12]. Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Protein CT2 beeinflusst all die-

se Merkmale [1, 10]. In Anbetracht einer steigenden Weltbevölkerung und der sich ändernden klimatischen Gegebenheiten des Planeten ist eine weitere Steigerung des Ertrags und auch eine Optimierung in Bezug auf die Resistenz gegenüber z. B. Hitze, Wassermangel und Versalzung des Bodens nötig [13-17]. Auch diese Merkmale werden teilweise durch das Protein CT2 beeinflusst (unveröffentlichte Daten, Peter Bommert), daher eröffnet dessen Erforschung potenziell neue Möglichkeiten der Steigerung des Ertrags von *Z. mays* [18].

Die von CT2 beeinflussten Merkmale von Pflanzen sind bekannte Ansatzpunkte der Ertragssteigerung in der Pflanzenzucht. Mindestens seit 1957 wurde vorgeschlagen, bestimmte *Zwergwuchs*-Mutanten in Maiszuchtprogramme einzubringen [19], da sie häufig den Ertrag steigernde Eigenschaften aufwiesen. Sofern die für diese phänotypischen Veränderungen verantwortlichen Mutationen einzelne Gene betreffen, lässt die Analyse von *loss-of-function* (LOF)-Mutanten den Rückschluss auf die Funktion des jeweiligen Gens bzw. Proteins in *Wildtyp* (WT)-Pflanzen zu. CT2-LOF-Mutanten weisen einen interessanten pleiotropen Phänotyp auf, der die Forschung bereits seit Jahrzehnten interessiert [19, 20]. Die augenscheinlichsten phänotypischen Merkmale von CT2-LOF-Pflanzen (im B73-Hintergrund) sind die verringerte Wuchshöhe (*Semi-Zwergwuchs*) und das veränderte Aussehen der generativen Organe. Im Vergleich zu WT-Pflanzen weist der weibliche Blütenstand (*Kolben*) von CT2-LOF-Pflanzen eine veränderte Anzahl der Körnerreihen auf, außerdem eine massive *Fasziation*. Auch der männliche Blütenstand (*Fahne*) weist Veränderungen auf, nämlich verdickte Rispenäste und eine höhere Dichte von Ährchen. Des Weiteren besitzen CT2-LOF-Pflanzen steiler in die Höhe ragende Blätter, die kürzer und gleichzeitig breiter sind, sowie einen dunkleren Grünton aufweisen (s. Abb. 1; [1]). Es wurde bereits früh erkannt, dass der Phänotyp der LOF-Pflanzen eine Rolle CT2s in der Meristementwicklung in WT-Pflanzen impliziert [20]. Im Jahr 2013 wurde von Peter Bommert *et al.* eine Charakterisierung von CT2 veröffentlicht, da gezeigt werden konnte, dass CT2 als G α -Untereinheit des heterotrimeren G Protein-Komplex in die Transduktion des CLAVATA-Signals von *Z. mays* involviert ist [1].

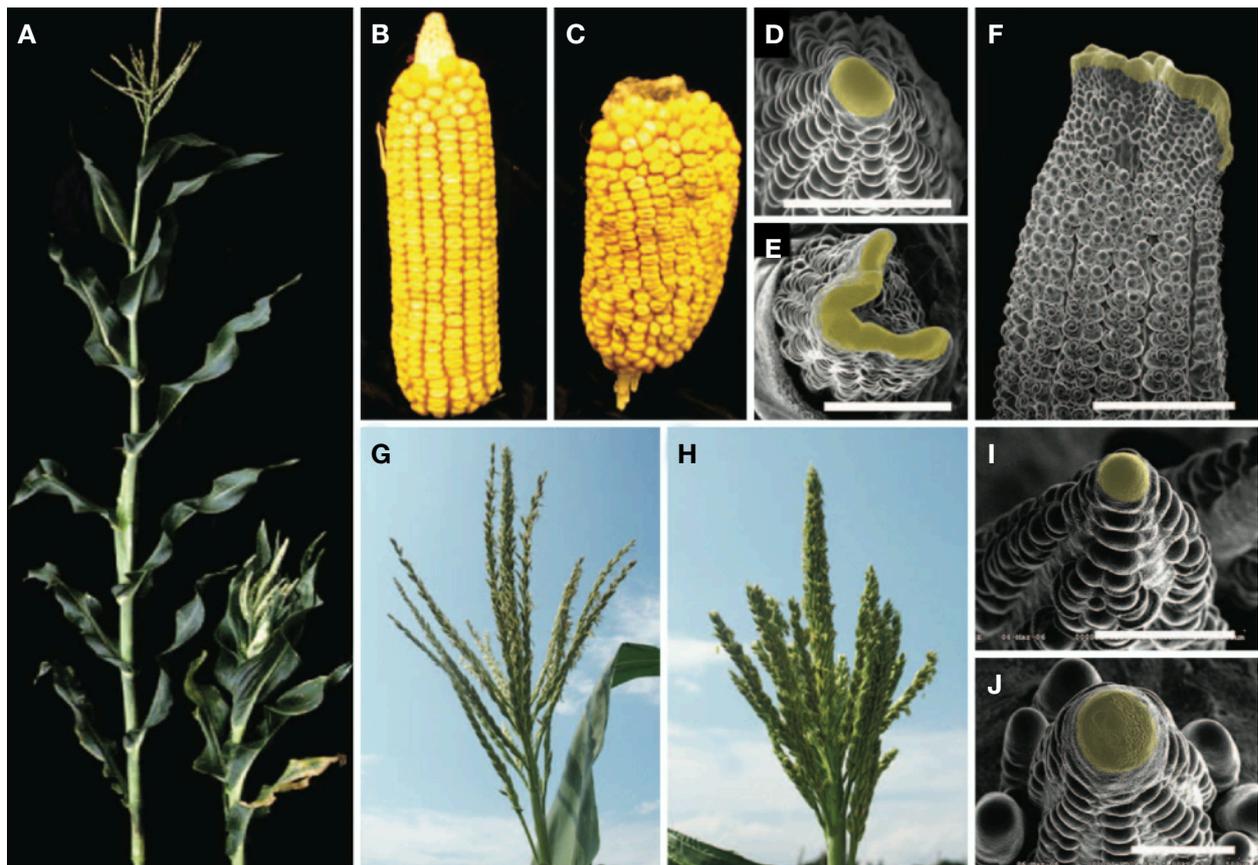


Abbildung 1: Phänotypische Merkmale von CT2-LOF-Pflanzen im Vergleich mit WT-Pflanzen

A CT2-LOF-Pflanzen (rechts) weisen im Vergleich zu WT-Pflanzen (links) eine verringerte Wuchshöhe (Semi-Zwergwuchs) auf. B/C Weibliche Infloreszenzen (Kolben) von CT2-LOF-Pflanzen (C) weisen im Vergleich zu Kolben von WT-Pflanzen (B) einen deutlich veränderten Phänotyp auf. D/E/F Das Infloreszenzmeristem (gelb markiert) von Kolben-Primordien von CT2-LOF-Pflanzen (E/F) weist im Vergleich zu demjenigen von WT-Pflanzen (D) eine massive Fasziation auf. Der Maßstabsbalken gibt 1 mm (D/E) bzw. 2 mm (F) an. G/H Die Fahne von CT2-LOF-Pflanzen (H) weist aufgrund einer erhöhten Ährchenzahl ein dickeres Aussehen als die Fahne von WT-Pflanzen auf (G). I/J Das Meristem (gelb markiert) der Fahne von CT2-LOF-Pflanzen (J) ist im Vergleich zu derjenigen von WT-Pflanzen deutlich vergrößert. Der Maßstabsbalken gibt 500 μ m an. Aus Bommert *et al.* (2013 [1]).

CT2 wirkt in der Kontrolle der Stammzellpopulation durch Transduktion des CLAVATA-Signals von *Z. mays* mit. Durch die Funktion in der CLV3/EMBRYO-SURROUNDING REGION7- (CLE7- [CLAVATA3-Ortholog]) Signalübertragung wirkt CT2 in der Kontrolle der Proliferation der Stammzellpopulation des Sprossapikalmeristems (*shoot apical meristem*, SAM) und der sich daraus entwickelnden *sekundären Meristeme* mit [1, 21, 22]. Das SAM, welches aus verschiedenen Zonen besteht, ist ein *Pool* aus pluripotenten Stammzellen. An der Spitze des SAM befindet sich mit der *Stammzellnische* die *zentrale Zone* (*central zone*, CZ), welche lateral von der *Peripheriezone* (*peripheral zone*, PZ) umgeben wird. Basal davon befindet sich das *organisierende Zentrum* (*organising center*, OC) [22]. Während der Embryogenese gebildet, wird das vegetative SAM mit der Bildung der ersten Blattprimordien aktiv [23]. Nach der Keimung

beginnt das Wachstum der Pflanze entgegen der Gravitation (*negativer Gravitropismus* [24]). In dieser *vegetativen Phase* wächst der Sproß der Pflanze durch die Bildung sogenannter *Phytomere* [22, 25, 26]. Jedes Phytomer besteht aus einem Nodium, einem Blatt, einem Achselmeristem (*axillary meristem*, AM) und einem Internodium [25]. Der Übergang des vegetativen SAM zum reproduktiven *Infloreszenzmeristem* (*inflorescence meristem*, IM) kennzeichnet den Übergang in die generative Phase der Pflanze [27]. Das IM und die AMs können sich zu *floralen Meristemen* (*floral meristem*, FM) entwickeln, welche sich zu den generativen Organen der Pflanze entwickeln [26]. Die Proliferation der Stammzellen des SAMs unterliegt einer engmaschigen Kontrolle, hauptsächlich durch die *CLAVATA-WUSCHEL-Feedback-Loop* (s. Abb. 2), um eine *Homöostase* aus der Erhaltung der Stammzellnische und der Verhinderung der Überproliferation von undifferenzierten Zellen zu bewirken [26, 28]. Diese Homöostase wird erreicht, indem die verschiedenen Zonen des SAMs miteinander kommunizieren [26]. Aus *Arabidopsis thaliana* (L.) ist bekannt, dass das Peptid CLAVATA3 (AtCLV3) von den Zellen der CZ exprimiert und sekretiert wird [22]. In *Z. mays* wird das Signal unter anderem durch das CLV3-Ortholog ZmCLE7 übertragen [21]. Nach der Diffusion in die OZ bindet das CLAVATA-Peptid als *Ligand* an *leucine-rich repeat* (LRR) -Proteine, was zu der Inhibition von WUSCHEL (AtWUS) führt, einem Transkriptionsfaktor der für die Initiation der Proliferation zur Erhaltung der Stammzellnische verantwortlich ist [26, 29]. In *Z. mays* wird das ZmCLE7-Signal von dem LRR-*receptor-like protein* (LRR-RLP) FASCIATED EAR2 (ZmFEA2) perzipiert [21]. Es ist bekannt, dass CT2 mit FEA2 an der Membran von meristematischen Zellen interagiert und bei der Transduktion des CLAVATA-Signals eine Rolle spielt [1]. Dies wurde belegt, indem WT- und CT2-LOF-Pflanzen [1] mit dem AtCLV3-Peptid behandelt wurden. Bei WT-Pflanzen verringerte sich daraufhin die Größe des SAMs, bei CT2-LOF-Pflanzen nicht [1].

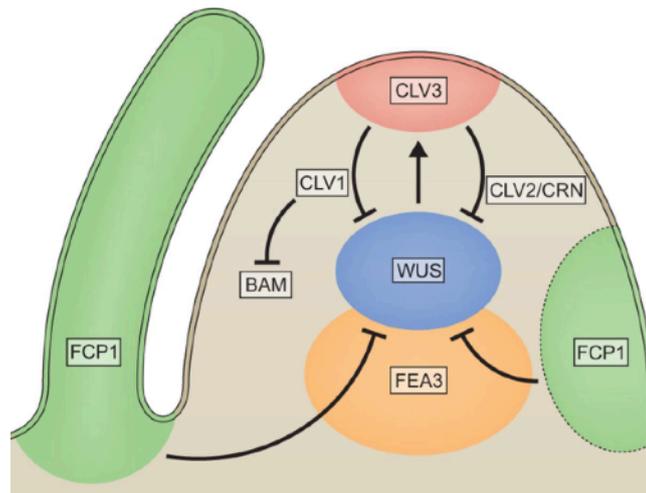


Abbildung 2: Modell der WUSCHEL-CLAVATA3-Feedback-Loop in Sprossmeristemen

Dieses Hybrid-Modell vereint Daten aus *A. thaliana* und *Z. mays*. Die WUS/CLV3-Feedback-Loop ist durch positive bzw. negative Pfeile symbolisiert. Des Weiteren sind der inhibierende Einfluss von CLAVATA1 (CLV1) auf die BARELY ANY MERISTEM (BAM) -Gene und von FON2-LIKE CLE PROTEIN1 (FCP1) (über FASCIATED EAR3 [FEA3]) auf WUS dargestellt. Aus Somssich *et al.* (2016 [28]).

Im Laufe dieser Arbeit sollen Eigenschaften von CT2-LOF-Pflanzen untersucht werden, um Rückschlüsse auf den Einfluss von CT2 auf die Entwicklung der Maispflanze ziehen zu können. Die Veränderungen der generativen Merkmale von CT2-LOF-Pflanzen können mit einer veränderten CLE-Signaltransduktion erklärt werden, andere phänotypische Merkmale wiederum nicht. Dazu gehören die verringerte Wuchshöhe, kürzere und gleichzeitig breitere Blätter die ein dunkleres Grün aufweisen, sowie die verkürzten Wurzeln der Pflanzen. Auch zeigen die Pflanzen eine höhere Toleranz gegenüber Trockenstress (unveröffentlichte Daten, Dr. Peter Bommert). Die Vielfalt der phänotypischen Merkmale wirft die Frage auf, wie genau CT2 direkt oder indirekt über putative Interaktionspartner diese entwicklungsbiologischen und metabolischen Merkmale beeinflusst. Um diese Frage im Laufe dieser Arbeit beantworten zu können, sollen in der vorliegenden Arbeit verschiedene Eigenschaften von CT2-LOF-Pflanzen analysiert werden. Diese Analyse lässt in der Folge Rückschlüsse auf die Funktion von CT2 in WT-Pflanzen zu (Vorwärts-Genetik).

Die subzelluläre Lokalisierung von CT2 soll mikroskopisch untersucht werden, da dies auf bisher unbekannt Funktionen des Proteins hindeuten könnte. CT2-YFP wies in den publizierten Daten eine Lokalisierung an der *Plasmamembran* (PM) auf [1]. Allerdings war in den veröffentlichten Abbildung ebenfalls eine *cytosolische Lokalisierung* zu erkennen. Dies trifft in ähnlicher Weise auch auf die Gα-Untereinheit von *A. thaliana*, *GUANINE NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN A SUBUNIT1* (AtGPA1), zu [30, 31]. Jedoch machen die bisher untersuchten Pfade der Signaltransduktion von CT2 dessen Anwesenheit an lediglich der PM nötig. Daher könnte eine Lokalisierung in anderen subzellulären Kompartimenten auf weitere, bisher

unbekannte Funktionen von CT2 hindeuten. Aus diesem Grund sollte die subzelluläre Lokalisierung von CT2 mithilfe der genomischen Reporterlinie mikroskopisch untersucht werden. Diese Linie trägt das genomische Reporterkonstrukt von CT2, in welchem CT2 intern mit YELLOW FLUORESCENT PROTEIN (YFP) fusioniert wurde. Das Reporterkonstrukt wird unter dem endogenen Promoter von *CT2* exprimiert und wird als funktional angesehen, da es den CT2-LOF-Phänotyp komplementierte [1]. Da Daten von mRNA-Sequenzierungen eine ubiquitäre Expression von *CT2* [32] indizieren, sollten insbesondere auch bereits differenzierte Gewebe mithilfe der *konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie* (*confocal laserscanning microscopy*, CLSM) analysiert werden.

Der Einfluss von CT2 auf die Dynamik von Mikrotubuli soll mikroskopisch und biochemisch untersucht werden, da bisher nicht bekannt ist, ob und inwiefern CT2 diese beeinflusst. Bemerkenswerterweise weist der Phänotyp von CT2-LOF-Pflanzen darauf hin, dass CT2 das Wachstum und die Entwicklung von Maispflanzen nicht allein über die CLE-Signaltransduktion des SAM beeinflusst. So sind die Internodien der Pflanzen, deren Wachstum durch *interkalare Meristeme* beeinflusst wird, verkürzt. Auch zeigen die Blätter von CT2-LOF-Pflanzen eine Verringerung der Zellproliferation [33]. Dies stellt einen Gegensatz zu der *Überproliferation* der generativen Meristeme dar. Von tierischen G α -Untereinheiten ist bereits bekannt, dass diese die Dynamik von *Mikrotubuli* (*microtubules*, MTs) beeinflussen können [34]. Die Dynamik *kortikaler Mikrotubuli* (*cortical microtubules*, cMTs) ist essentiell für die Proliferation und Elongation von pflanzlichen Zellen [35]. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit die Dynamik der cMTs von CT2-LOF-Pflanzen analysiert werden. Um dies untersuchen zu können, wurde die Introgression des *ct2*-Ref.-Allels [1] in die Reporterlinie *paTUB1::YFP- α -Tubulin1* [36] durchgeführt. Diese Reporterlinie trägt das genomische Reporterkonstrukt von α -Tubulin1 unter dessen endogenem Promoter. Mithilfe dieser Introgression sollen mögliche Veränderungen der Dynamik von MTs, insbesondere der cMTs, von CT2-LOF-Pflanzen gegenüber WT-Pflanzen analysiert werden. Diese Untersuchungen sollen einen Einblick geben ob und inwiefern CT2 die Dynamik der MTs beeinflusst und so auf die Zellproliferation und -expansion einwirkt.

In tierischen Systemen wird die Aktivität des G Proteins stimuliert. In den 1970er Jahren wurden G Proteine das erste Mal beschrieben [37], im Jahr 1994 wurde den Entdeckern dafür der Nobelpreis verliehen [38]. Seitdem sind sie das Thema von über 22.000 wissenschaftlichen Arbeiten gewesen. Der größte Teil dieser Abhandlungen thematisiert das tierische Modell der Signaltransduktion durch G Proteine, dieses Modell hat sich daher als das *kanonische Modell* etabliert [39]. G Proteine vermitteln die Signaltransduktion in einer Vielzahl von Prozessen, in *Metazoa* unter anderem in der Entwicklung von Zellen und Organismen [40, 41], der

Pheromonsignalübertragung [42], der Transduktion von Sinneswahrnehmungen wie dem Sehen, Schmecken oder der Geruchswahrnehmung [43-45]. Die bisher am gründlichsten untersuchten tierischen Systeme zeigen eine Art der Signalperzeption und -weitergabe, die einerseits eine Regulierung auf verschiedenen Ebenen und andererseits eine kaskadenartige Amplifizierung des Signals ermöglicht: Gemeinsam mit den weiteren Untereinheiten ($G\beta$ und $G\gamma$) ist CT2 für die Signaltransduktion vom extrazellulären in den intrazellulären Raum verantwortlich [46]. In dieser Arbeit soll des Weiteren die Regulation der G Protein-vermittelten Signaltransduktion untersucht werden, indem die Termination der Signaltransduktion betrachtet wird. Um die Besonderheit der Termination der Signaltransduktion in Pflanzen herauszustellen, muss zunächst die Regulation in tierischen Systemen erläutert werden. In tierischen, als kanonisch betrachteten Systemen ist der Komplex des heterotrimeren G Proteins vor der Perzeption eines Signals intrazellulär an ein *G Protein gekoppelten Rezeptor* (*G protein coupled receptor*, GPCR) gebunden. Diese stammen von prokaryotischen *Rhodopsinen* ab [47]. An die $G\alpha$ -Untereinheit des G Proteins ist dabei ein GDP-Molekül gebunden, dieser Zustand wird als inaktiv betrachtet [48] (s. Abb. 3). GPCRs werden unter anderem durch eine Struktur aus 7 N-terminalen *Transmembran-Helices* (7TM) charakterisiert [49]. Ein bereits beschriebenes Motiv der Aminosäuren Asparaginsäure (D), Arginin (R) und Tyrosin (Y) (DRY-Motiv) erlaubt die Bindung des GPCRs an die $G\alpha$ -Untereinheit des G Proteins [50, 51]. Ein Signal in Form eines extrazellulären Liganden kann an die extrazelluläre Domäne des GPCRs binden und eine Konformationsänderung des GPCRs bewirken, was wiederum zu einer konformationellen Änderung der $G\alpha$ -Untereinheit des G Proteins führt [48, 49]. Diese strukturelle Änderung führt zu einem Abstoßen des GDP-Moleküls, GPCRs werden daher als *GTP-Austauschfaktoren* (*GTP exchange factors*, GEFs) bezeichnet [52]. Die Affinität der $G\alpha$ -Untereinheit zu GDP oder GTP ist ähnlich, allerdings ist die Konzentration von GTP innerhalb der Zelle um nahezu den Faktor 10 höher. Aus diesem Grund kann die $G\alpha$ -Untereinheit ein GTP-Molekül binden, woraufhin $G\alpha$ -GTP sich nun vom Heterodimer aus $G\beta$ und $G\gamma$ lösen kann [53]. Sowohl $G\alpha$ -GTP als auch $G\beta\gamma$ können nun verschiedene *Downstream*-Signalwege beeinflussen [48]. Die intrinsische GTPase-Aktivität von $G\alpha$ führt zu einer Hydrolyse von GTP zu GDP, was die Signaltransduktion terminiert, indem $G\alpha$ -GDP erneut mit $G\beta\gamma$ interagiert und dieser heterotrimere Komplex bis zur erneuten Aktivierung an einen GPCR bindet [48]. In den bisher untersuchten pflanzlichen Systemen indizieren die publizierten Daten jedoch eine andere Form der Signaltransduktion.

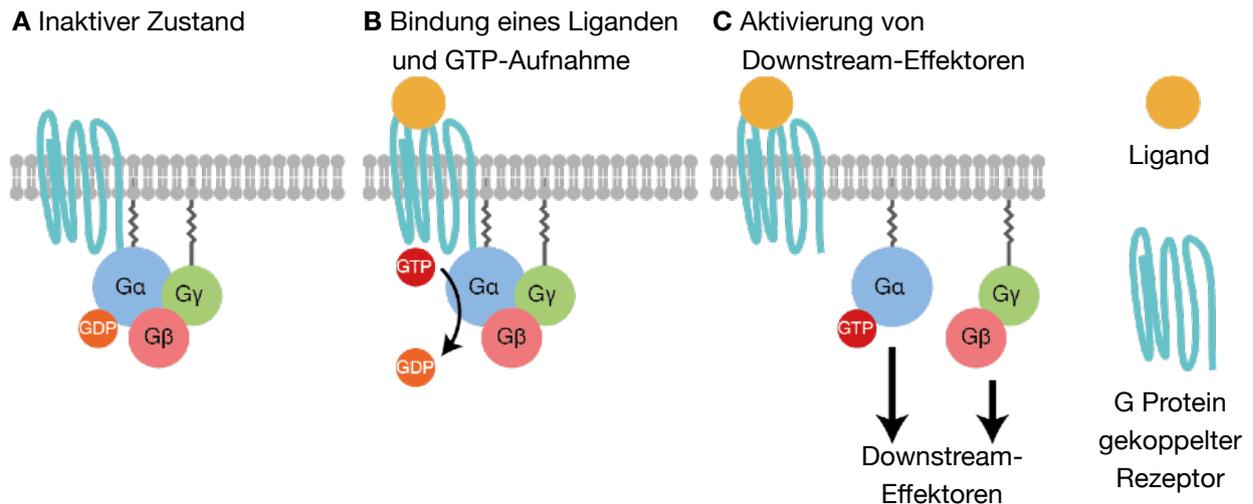


Abbildung 3: Das tierische Modell der durch den Komplex des G Protein vermittelten Signaltransduktion

A Im inaktiven Zustand ist die $G\alpha$ -Untereinheit mit dem $G\beta\gamma$ -Heterodimer assoziiert und mit GDP beladen. Der Heterotrimer Komplex wiederum ist intrazellulär über die $G\alpha$ -Untereinheit an einen inaktiven G Protein gekoppelten Rezeptor (*G Protein Coupled Receptors*, GPCR) gebunden. B Nach der Perzeption eines externen Signals in Form eines Liganden der an den GPCR zu binden in der Lage ist, wird eine konformationelle Änderung des GPCRs hervorgerufen. Dies führt zu einer konformationellen Änderung der $G\alpha$ -Untereinheit, was zu einem Abstoßen des GDP-Moleküls führt. C Die $G\alpha$ -Untereinheit kann nun GTP binden und $G\alpha$ -GTP löst sich vom $G\beta\gamma$ -Heterodimer. Dieser Zustand wird als aktiv betrachtet und die beiden Komplexe können verschiedene *Downstream*-Effektoren beeinflussen. Verändert nach Stateczny *et al.* (2016 [46]).

In pflanzlichen Systemen wird die Aktivität des G Proteins inhibiert. Die Signalperzeption und -transduktion durch G Proteine in Pflanzen unterliegt anderen Regeln als in Tieren [39]. Ein erster Unterschied wird bei der Betrachtung der Genome von Pflanzen ersichtlich, da Pflanzen im Allgemeinen ein kleineres Repertoire an Untereinheiten des G Protein Komplex als Tiere besitzen [39, 46]. Des Weiteren ist das Vorhandensein von GPCRs in Pflanzen umstritten [54, 55]. Zudem wurde gezeigt, dass die pflanzliche $G\alpha$ -Untereinheit eine höhere inhärente Affinität zu GTP als zu GDP zeigte und damit GTP spontan binden kann [56]. Auch ist die intrinsische GTPase-Aktivität der bekannten $G\alpha$ -Untereinheiten langsamer als die der tierischen $G\alpha$ -Untereinheiten, was theoretisch zu einer permanenten Aktivierung der Signaltransduktion führen würde [46, 56]. Diese kinetischen Unterschiede und das Fehlen von Genen, die für GPCRs codieren in den Genomen der bis *dato* untersuchten Pflanzen, erfordern eine andere Form der Regulation der Signaltransduktion [57].

GAPs können die Signaltransduktion durch Erhöhung der GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit terminieren. Im bisher am besten untersuchten System der G Protein-vermittelten Signaltransduktion von *A. thaliana* findet die Regulierung unter anderem über das Protein REGULATOR OF G PROTEIN SIGNALING1 (AtRGS1) statt [39]. *In vitro* Experimente zeigten,

dass AtRGS1 die GTPase-Aktivität der G α -Untereinheit erhöhte [58]. AtRGS1 bewirkt damit in diesem System als GTPase-aktivierendes Protein (*GTPase accelerating protein*, GAP) die aktive Terminierung der Signalweitergabe [59]. Obwohl in den meisten Genomen der bisher untersuchten monokotylen Pflanzen Homologe für RGS1 vorhanden sind, fehlen diese Proteine in fast allen *Poaceae* [60]. So wurde im Rahmen dieser Arbeit auch im Genom von *Z. mays* [61] kein Homolog für RGS1 gefunden, dies entspricht bereits publizierten Ergebnissen [60]. Es ist daher bis *dato* nicht bekannt auf welche Weise die Terminierung der Signaltransduktion in *Z. mays* geschieht [18].

Die putative Interaktion von CT2 mit PLDs soll mikroskopisch und biochemisch untersucht werden, da dies Rückschlüsse auf die Regulation der G Protein-vermittelten Signaltransduktion zulässt. Interessanterweise wurde für *A. thaliana* gezeigt, dass auch *PHOSPHOLIPASE D* α 1 (AtPLD α 1) die GTPase-Aktivität der G α -Untereinheit *in vitro* positiv beeinflussen kann [62]. Im Allgemeinen katalysiert die Proteinfamilie der *Phospholipasen D* (PLDs) die Hydrolyse des Phospholipids *Phosphatidylcholin* (*phosphatidylcholine*; PC) zu *Phosphatidsäure* (*phosphatidic acid*, PA) und *Cholin* [63, 64]. Das durch PLDs produzierte PA wirkt als *Second Messenger* und kann ein Vielzahl pflanzlicher Aktionen und Reaktionen orchestrieren. Dazu gehören die Antworten auf biotische und abiotische Stimuli, aber auch Wachstums- und Entwicklungs-Prozesse von Pflanzen [65-68]. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass PA die Reorganisation des Cytoskeletts bei Salzstress kontrolliert und damit die Toleranz gegenüber diesem Stress erhöht [69]. Die bereits in Publikationen untersuchte Interaktion von AtGPA1 mit AtPLD α 1 geschieht über das von tierischen GPCRs bekannte DRY-Motiv von AtPLD α 1 [62, 70, 71]. Des Weiteren indizieren die veröffentlichten Daten, dass durch die molekulare Interaktion mit der G α -Untereinheit die Aktivität von AtPLD α 1 inhibiert werden kann [62]. Die Proteine können also gegenseitig die Aktivität des jeweils anderen beeinflussen. Träfe dies auch für *Z. mays* zu, führte dies zu bemerkenswerten Schlussfolgerungen: I.) Eine Proteinfamilie mit 13 Mitgliedern, die jeweils gewebe- und stimuluspezifische Transkriptionsmaxima aufweisen, wäre dazu in der Lage die GTPase-Aktivität der ubiquitär vorhandenen G α -Untereinheit CT2 zu stimulieren und so möglicherweise die Signaltransduktion zu terminieren [72]. II.) *Vice versa* könnte durch die G α -Untereinheit CT2 die Aktivität der verschiedenen Mitglieder der PLD-Familie gehemmt werden. Diese gegenseitige Beeinflussung würde eine neue Sichtweise auf die Komplexität der G Protein-vermittelten Signaltransduktion werfen. Da Bommert *et al.* mithilfe einer *Immunpräzipitation/Massenspektrometrie*-Analyse (IP/MS) von Proteinextrakt aus jungen Kolben der funktionalen Reporterlinie von CT2 die Peptide einer ZmPLD α identifizierten [1], soll im Laufe der vorliegenden Arbeit die putative Interaktion von CT2 mit ZmPLD α s mithilfe mikroskopischer und biochemischer Methoden untersucht werden.

Der Semi-Zwergwuchs von CT2-LOF-Mutanten indiziert, dass CT2 an der Phytohormon-Produktion oder -Signalperzeption bzw. -transduktion beteiligt sein kann. Der Semi-Zwergwuchs bestimmter Mutanten legte in den 1940er Jahren den Grundstein für die sogenannte *Grüne Revolution*. Dieser Begriff bezeichnet eine bemerkenswerte Steigerung des Ertrags von Reis, Weizen und Mais durch das Einbringen bestimmter Allele, die den Semi-Zwergwuchs bewirkten [73]. So konnten die Pflanzen widerstandsfähiger gegenüber abiotischen Faktoren wie Wind, Regen oder Sturm gemacht werden [74]. Die ursprünglichen Allele welche die *Grüne Revolution* anstießen, bewirkten den Semi-Zwergwuchs-Phänotyp von Weizen durch eine verringerte Reaktion auf *Gibberellinsäure* (*gibberellic acid*, GA) [73, 74]. Auch der Ertrag von Reis wurde mithilfe von Mutationen gesteigert, welche in Zusammenhang mit GA stehen. In diesem Fall ließ sich der WT-Phänotyp durch exogene Applikation von GA wiederherstellen, ein Indiz dafür, dass in diesen *sd1*-Mutanten die Produktion von GA beeinträchtigt war [73]. Die Applikation von Phytohormonen, welche das Wachstum und die Entwicklung beeinflussen, in Verbindung mit der Quantifizierung der Auswirkungen auf WT- und Mutantpflanzen ist demnach ein bereits bekanntes Werkzeug um zu untersuchen ob die betroffenen Gene bzw. Proteine im Zusammenhang mit diesen Phytohormonen stehen. Da der Phänotyp des Semi-Zwergwuchses von CT2-LOF-Pflanzen an Phytohormon-Mutanten erinnert, wurde bereits ein ähnliches Experiment mit Bezug auf GA durchgeführt (unveröffentlichte Daten, Peter Bommert). Dabei wurde eine 1:1 segregierende Population von heterozygoten (entspricht WT) und homozygoten *ct2*-Ref.-Pflanzen (B73) [1] durch Gießen mit unterschiedlichen GA-Konzentrationen behandelt. Das Wachstum der Pflanzen wurde quantifiziert um Dosis-Wirkungskurven erstellen zu können. Die Auswertung dieser Kurven zeigte jedoch, dass die Wachstumsreaktion beider von WT- und CT2-LOF-Pflanzen ähnlich war. Daraus wurde geschlossen, dass CT2 in WT-Pflanzen keinen Einfluss auf die Produktion von GA bzw. die Perzeption oder die Transduktion des Signals hat. Ein ähnliches Experiment wurde unter Verwendung eines Brassinosteroids (*24-Epibrassinolid*) bzw. eines BR-Synthese-Inhibitors (*Propiconazol*) durchgeführt (unveröffentlichte Daten, Peter Bommert & Janna Varady). Auch in diesem Fall zeigten die behandelten Genotypen eine ähnliche Wachstumsreaktion, sodass aus diesen Daten geschlossen wurde, dass CT2 nicht an der BR-Produktion oder -Signaltransduktion beteiligt ist. Es gibt aber weitere Phytohormone an deren Stoffwechselwegen CT2 beteiligt sein könnte.

Die Reaktion von WT- und CT2-LOF-Pflanzen auf die Applikation von Auxin soll untersucht werden, um eventuelle Unterschiede zu ermitteln. Um die bereits gesammelten Erkenntnisse zu vervollständigen und hoffentlich aufzuklären zu können inwiefern CT2 die Elongation der Internodien beeinflusst, soll im Laufe dieser Arbeit untersucht werden, ob CT2 an der Signalperzeption oder -transduktion weiterer Phytohormone beteiligt ist. Eins der be-

kanntesten Phytohormone ist Auxin. Die Rolle von Mutationen, die Defizite in der Produktion oder dem Transport von Auxin hervorrufen, wurde bereits früh mit dem Zwergwuchs-Phänotyp von *Z. mays* in Verbindung gebracht [75]. Beispielsweise wurde gezeigt, dass der Zwergwuchs-Phänotyp der *brachytic2* (*br2*)-Mutante durch den Verlust eines *P-Glycoproteins* (*P-glycoprotein*, PGP) im Vergleich zum WT ein zu hohes Auxin-Level in den Nodien aufweisen. Dies supprimiert die Elongation der Internodien und verursacht den Zwergwuchs-Phänotyp [76, 77]. In anderen pflanzlichen Modellorganismen wurde zudem ein Zusammenhang der G Protein-vermittelten Signaltransduktion und der Auxin-Signaltransduktion gezeigt [78]. So zeigten Ullah *et al.* (2003, [79]), dass *A. thaliana* G β -LOF-Pflanzen (*A. thaliana* GTP BINDING PROTEIN BETA1 [AtAGB1]-LOF-Pflanzen) hypersensitiv auf die Anwesenheit von Auxin reagierten. Daraus wurde geschlossen, dass der G $\beta\gamma$ -Komplex in WT-Pflanzen ein Suppressor der durch Auxin induzierten Zellproliferation sei [79]. Analog dazu reagierten bei Experimenten mit *Solanum lycopersicum* (L.) diejenigen Pflanzen hypersensitiv auf die Auxin-Applikation, in denen eine G γ -Untereinheit mittels RNA-Interferenz stillgelegt wurde [80]. Des Weiteren wurde publiziert, dass bei CT2-LOF-Pflanzen signifikant mehr Axiliar-Kolben auswachsen als bei WT-Pflanzen [10]. In WT-Pflanzen sind diese Infloreszenzen in adulten Pflanzen zwar angelegt, unterliegen aber der sogenannten *Dormanz*, ihr Auswachsen wird also supprimiert [81]. Die Dormanz wird in Gräsern unter anderem durch die antagonistische Wirkung verschiedener Phytohormone erreicht, dazu gehören auch Auxine [25]. So könnte das vermehrte Auswachsen der Axiliar-Kolben durch Defizite der Perzeption des Auxin-Signals verursacht werden. All die aufgeführten Indizien führen dazu, dass im Rahmen dieser Arbeit die Reaktion von CT2-LOF-Pflanzen auf die externe Applikation eines Auxins (*Indol-3-Essigsäure* [*indole-3-acetic acid*, IAA]) mit der Reaktion von WT-Pflanzen verglichen werden soll. Eventuelle Unterschiede der Reaktion ließen Rückschlüsse darauf zu, ob und inwiefern CT2 in WT-Pflanzen an der Perzeption oder Transduktion des Auxin-Signals beteiligt ist.

Die Reaktion von CT2-LOF-Pflanzen auf die Applikation von *Abscisinsäure* soll untersucht werden. Auch *Abscisinsäure* (*abscisic acid*, ABA) stellt ein Phytohormon dar, in dessen Signalperzeption bzw. -transduktion die Rolle von CT2 im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden soll. Dies geschah ebenfalls aufgrund bereits veröffentlichter Evidenzen, die eine Beteiligung von G Proteinen an der ABA-Reaktion indizierten [82]. Beispielsweise reagierten *A. thaliana*-Mutanten von *AGB1* in der Keimung und der frühen Entwicklung von Keimlingen hypersensitiv auf die Applikation von ABA, woraus geschlossen wurde, dass AtAGB1 der Mediator der ABA-Reaktion ist [82]. Auch wurde eine Hypersensitivität von G PROTEIN COUPLED RECEPTOR1- (AtGCR1- [entspricht REGULATOR OF G PROTEIN SIGNALING1, AtRGS1]) und AtGPA1-Mutanten gegenüber ABA gezeigt [83]. Um zu überprüfen ob dies auch für *Z. mays* zutrifft, soll im Verlauf dieser Arbeit der Einfluss von ABA auf das Wachstum von WT- und CT2-

LOF-Pflanzen untersucht werden. Auch in diesem Fall können eventuelle Unterschiede der Reaktion einen Rückschluss auf durch CT2 beeinflusste Pfade der Signaltransduktion zulassen.

Um *Modifier* des CT2-LOF-Phänotyps zu finden, soll die natürliche genetische Variation von *Z. mays* genutzt werden. Ein anderer langfristiger Ansatz um potenzielle durch CT2 beeinflusste Pfade der Signaltransduktion zu identifizieren, ist die Analyse von CT2-LOF-Mutanten in einem anderen genetischen Hintergrund (Haplotyp). Bislang wurden alle Experimente mit einem CT2-LOF-Allel im B73-Haplotyp durchgeführt (*ct2*-Ref. [B73x6]) [vgl. 1, 10, 18, 33]. Die rekombinante Inzuchtlinie B73 stellt den bisher am besten untersuchten *Z. mays*-Haplotyp dar und ist einer der Gründer der Population, die für NAM (*nested association mapping*) geschaffen wurde. Diese NAM-Population wurde von Edward Buckler, James Holland und Michael McMullen *et al.* entworfen und sollte der Erforschung der genetischen Architektur komplexer Eigenschaften dienen [84, 85]. Es ist im Allgemeinen jedoch bekannt, dass die Diversifikation des genetischen Hintergrundes die Identifikation von neuen Genen, deren Funktion in RILs maskiert wird, erlaubt [86]. Die Introgression eines Mutanten-Allels in andere RILs erlaubt des Weiteren die natürliche genetische Variation dieser Haplotypen auszunutzen, um potenzielle *Verstärker* oder *Suppressoren* eines bestimmten Phänotyp-Merkmals zu identifizieren. Das Finden solcher (genetischen) *Modifier* stellt einen *Vorwärts*-gerichteten Ansatz der Genetik dar. Diese Methode hat beispielsweise dabei geholfen einen *Modifier* des *Oy1-N1989*-Allels zu identifizieren, welcher Expressionslevel-Polymorphismen verursachte [87]. So sollte die *Introgression* des *ct2*-Ref.-Allels von B73 in den Haplotyp *Mo17* durchgeführt werden. Dieser, aufgrund der langen Generationszeit von Mais, langwierige Prozess, soll dabei helfen mögliche *Modifier* zu finden, die beispielsweise erst durch die kleineren apikalen Meristem von *Mo17* im Vergleich zu B73 zum Tragen kommen [vgl. 88].

Im Laufe dieser Arbeit sollen verschiedene Eigenschaften des Proteins CT2 und von CT2-LOF-Pflanzen untersucht werden. Insgesamt sollen die erörterten experimentellen Ansätze im Rahmen dieser Arbeit dabei helfen, den Einfluss des Proteins CT2 auf das Wachstum und die Entwicklung von *Z. mays* besser zu verstehen. Dazu soll zunächst die subzelluläre Lokalisierung von CT2 mit Hinblick auf verschiedene Gewebe untersucht werden. Des Weiteren soll der potenzielle Einfluss von CT2 auf die Dynamik von Mikrotubuli analysiert werden, indem die Introgression des *ct2*-Ref.-LOF-Allels in eine α -Tubulin1-Reporterlinie durchgeführt und die dadurch erhaltenen CT2-LOF/YFP- α TUB1-Pflanzen mikroskopisch untersucht werden. Auch die Untersuchung einer potenziellen Interaktion von CT2 mit den ZmPLDAs sollen mithilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie und zusätzlich mit biochemischen Methoden durchgeführt werden. Der potenzielle Einfluss von CT2 auf die Signalperzeption bzw. -transduktion

verschiedener Phytohormone soll mithilfe von Wachstums-Assays analysiert werden. Die parallel zu diesen Experimenten geplante Introgression des *ct2*-Ref.-Allels in den Mo17-Haplotyp soll dazu dienen, potenzielle *Modifier* des CT2-LOF-Phänotyps zu identifizieren.

Ergebnisse

Um den pleiotropen vegetativen Phänotyp von CT2-LOF-Pflanzen und damit die Funktion von CT2 zu verstehen, wurden verschiedene mikroskopische, biochemische und makroskopische Experimente durchgeführt.

Die gewebespezifische und subzelluläre Lokalisierung von CT2

Weist CT2 nicht-kanonische Funktionen auf? Untersuchungen der Funktion und der subzellulären Lokalisierung von CT2 in meristematischen Geweben wurden bereits veröffentlicht [1]. Analysen von mRNA-Sequenzierungsdaten [32] von *Z. mays* zeigten jedoch, dass CT2 ubiquitär in der gesamten Pflanze transkribiert wird. Da CLAVATA-Signalwege in nicht-meristematischen Geweben von untergeordneter Bedeutung sind, könnte dies auf eine zusätzliche, noch nicht untersuchte Funktion von CT2 hindeuten. Um aus der Lokalisierung Rückschlüsse auf die nicht-kanonische Funktion von CT2 ziehen zu können, wurde die subzelluläre Lokalisierung von CT2 in verschiedenen Geweben von *Z. mays* pCT2::CT2-YFP-Pflanzen [1] mittels *konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie* (*confocal laser scanning microscopy*, CLSM) analysiert. Diese transgene Linie trägt das genomische Reporterkonstrukt von CT2, in welchem CT2 intern mit YELLOW FLUORESCENT PROTEIN (YFP) fusioniert ist. Die Expression des Reporterkonstrukts komplementiert den Phänotyp von CT2-LOF-Pflanzen und stellt damit die Funktionalität des Proteins sicher [1].

Die Lokalisierung von CT2-YFP variierte in verschiedenen Geweben. Um die Lokalisierung von CT2-YFP in meristematischen Geweben analysieren zu können, wurden ca. 2 cm große weibliche Infloreszenzen präpariert. Das Infloreszenzmeristem an der Spitze dieser wurde mittels CLSM untersucht. Die Analyse zeigte, dass CT2-YFP an der Zellperipherie lokalisierte (s. Abb. 4A). Die Lokalisierung an der Zellperipherie stellte wahrscheinlich eine Membranlokalisierung dar und entspricht damit bereits veröffentlichten Ergebnissen [1]. Dagegen zeigte die Analyse von älteren differenzierten, voll elongierten Epidermiszellen des Blattes, dass CT2-YFP in nicht-meristematischen Geweben eine andersartige Lokalisierung aufwies. Das CT2-YFP-Signal lokalisierte nicht nur an der Zellperipherie, sondern auch im Nukleus und im Cytosol (s. Abb. 4B). Zusätzlich wurden im Rahmen der Lokalisierungsstudien weitere teilungsaktive Gewebe untersucht. Die Analyse von mitotischen epidermalen Blattzellen von pCT2::CT2-YFP-Pflanzen zeigte ebenfalls eine auffällige Lokalisierung. In Abbildung 4C ist eine Cytokinese abgebildet. Das Signal von CT2-YFP lokalisierte an einer Struktur zwischen den beiden Zellkernen, dabei handelte es sich wahrscheinlich um den Phragmoplasten. Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass CT2-YFP eine subzelluläre Lokalisierung aufwies, die Gewebe- und Zell-Entwicklungsstadium-spezifisch zu sein scheint. In jungen, meristematischen Geweben

lag eine Membranlokalisierung vor, während in älteren, differenzierten Geweben zusätzlich eine nukleäre und cytoplasmische Lokalisierung vorlag. Außerdem wies CT2-YFP in mitotisch aktiven Zellen eine Lokalisierung am Phragmoplasten auf. Die unterschiedliche Lokalisierung von CT2 in verschiedenen Geweben und Zell-Entwicklungsstadien weist auf vielfältige Funktionen von CT2 in der Pflanze hin. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Lokalisierung von CT2 in verschiedenen Zelltypen sind unterschiedliche co- oder posttranslationale Modifikationen. Es ist bekannt, dass co- bzw. posttranslationale Modifikationen einen Einfluss auf die Lokalisierung von Proteinen im Allgemeinen haben können, im Speziellen wurde dies bereits für das CT2-Homolog von *A. thaliana* GPA1 gezeigt [89, 90]. Um einen genaueren Einblick in co- bzw. posttranslationale Modifikationsmöglichkeiten zu erhalten, wurden die cDNA- und die Aminosäuresequenz von CT2 *in silico* analysiert.

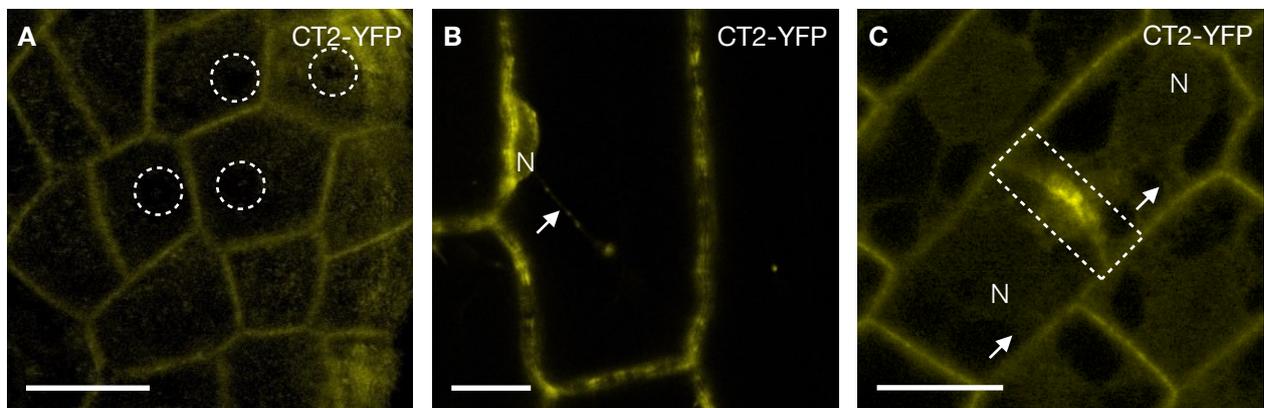


Abbildung 4: CT2-YFP wies in verschiedenen Geweben von *Z. mays* eine jeweils unterschiedliche Lokalisierung auf

A In meristematischen Geweben der Spitze junger Kolben lokalisierte CT2-YFP primär an der Plasmamembran. Die Nuklei sind durch gestrichelte Kreise markiert. Der Maßstabsbalken gibt 10 μ m an. B In elongierten Epidermiszellen des Blattes lokalisierte CT2-YFP an der Zellperipherie, im Nukleus und im Cytosol. Nukleus (N), Cytosol (\rightarrow). Der Maßstabsbalken gibt 10 μ m an. C In sich teilenden epidermalen Blattzellen lokalisierte CT2-YFP besonders stark am Phragmoplasten. Der Phragmoplast ist durch ein gestricheltes Rechteck gekennzeichnet. Nukleus (N), Cytosol (\rightarrow). Der Maßstabsbalken gibt 10 μ m an.

Die Analyse der Aminosäuresequenz von CT2 zeigte, dass für eine $G\alpha$ -Untereinheit notwendige funktionale Domänen vorhanden sind. Da die Aminosäuresequenz von CT2 (abgeleitet von [5, 61]) zu 86 % mit der Sequenz von AtGPA1 übereinstimmt [91], ließen sich Rückschlüsse aus der bereits bekannten Funktion [92] dieser auf die Funktion der entsprechenden Aminosäuren von CT2 ziehen. Die Aminosäuresequenz von CT2 lässt sich, ähnlich wie die Sequenz von AtGPA1, in zwei Teile teilen: das erste Drittel kann als helikale Domäne bezeichnet werden, die zweite Hälfte als Ras-Domäne [92]. In der helikalen Domäne befinden sich Motive, für die *in silico* eine helikale Sekundärstruktur prognostiziert wurde [93, 94]. Diese helikale Domäne bedeckt das gebundene Nukleotid und ist in pflanzlichen $G\alpha$ -Untereinheiten

für die schnelle Dissoziation des GDP-Moleküls verantwortlich [95]. Die Ras-Domäne dagegen ist für die GTPase-Aktivität der G α -Untereinheit verantwortlich [96]. Die Analyse zeigte, dass CT2 fünf GTP-Kontaktmotive (G1-G5) besitzt [97-101], welche über die gesamte Aminosäuresequenz verteilt sind (s. Abb. 5B). Die Untersuchung zeigte zudem, dass die GTP-Kontaktmotive eine Homologie zu der bereits charakterisierten AtGPA1-Sequenz aufweisen [vgl. 102]. Daher lässt sich postulieren, dass die P-Schleife (G₅₆AGESGKS) in G1 für die NTP-Bindung, das DxxGQ-Motiv (D₂₂₉VGGQ) in G3 für die Hydrolyse und das NKxD-Motiv (N₂₉₈KFD) in G4 für die Erkennung des GTP-Moleküls verantwortlich ist. Die Analyse zeigte ebenfalls die Anwesenheit von *Switch*-Regionen (S1-S2) an (s. Abb. 5B) [97, 99-101], deren Konformation sich in Abhängigkeit des gebundenen Nukleotids verändert [103]. Außerdem sind zwei Motive für die Bindung von zweiwertigen Metallkationen vorhanden (s. Abb. 5B) [98], diese bewirken die Notwendigkeit der Anwesenheit von Mg²⁺ als Co-Faktor [vgl. 18, 39]. Von der zweiten Kationen-Kontaktstelle bis zum Ende der zweiten *Switch*-Region S2 erstreckt sich das β -Bindemotiv, das für die Interaktion der G α -Untereinheit mit dem β -Komplex verantwortlich ist [97, 99-101]. Des Weiteren enthält die Aminosäuresequenz von CT2 eine putative zweiteilige *Kernlokalisierungssequenz* (*nuclear localization signal*, NLS; D₂₈₀WVLKQRCFEKTSFMLFLNKFDIFERKIQKVP; Score: 8 [104-106]), welche für die nukleäre Lokalisierung (s. Abb. 4B) verantwortlich sein kann. Diese *in silico*-Analyse der Aminosäuresequenz von CT2 zeigte, dass CT2 alle bereits bekannten Charakteristika einer pflanzlichen G α -Untereinheit aufweist [vgl. 103]. Interessanterweise enthält die Aminosäuresequenz von CT2, anders als AtGPA1, zwei Methionine, was darauf hindeutet, dass die cDNA-Sequenz zwei potenzielle *Startcodons* enthält (s. Abb. 5A). Die translationelle Nutzung jedes dieser Startcodons führt zu der Synthese von jeweils einem distinkten N-Terminus von CT2, von denen jeder individuelle Möglichkeiten der posttranslationalen Modifikation besitzt. Im Folgenden wurde untersucht ob es sich dabei um eine Eigenart von *Z. mays* handelt.

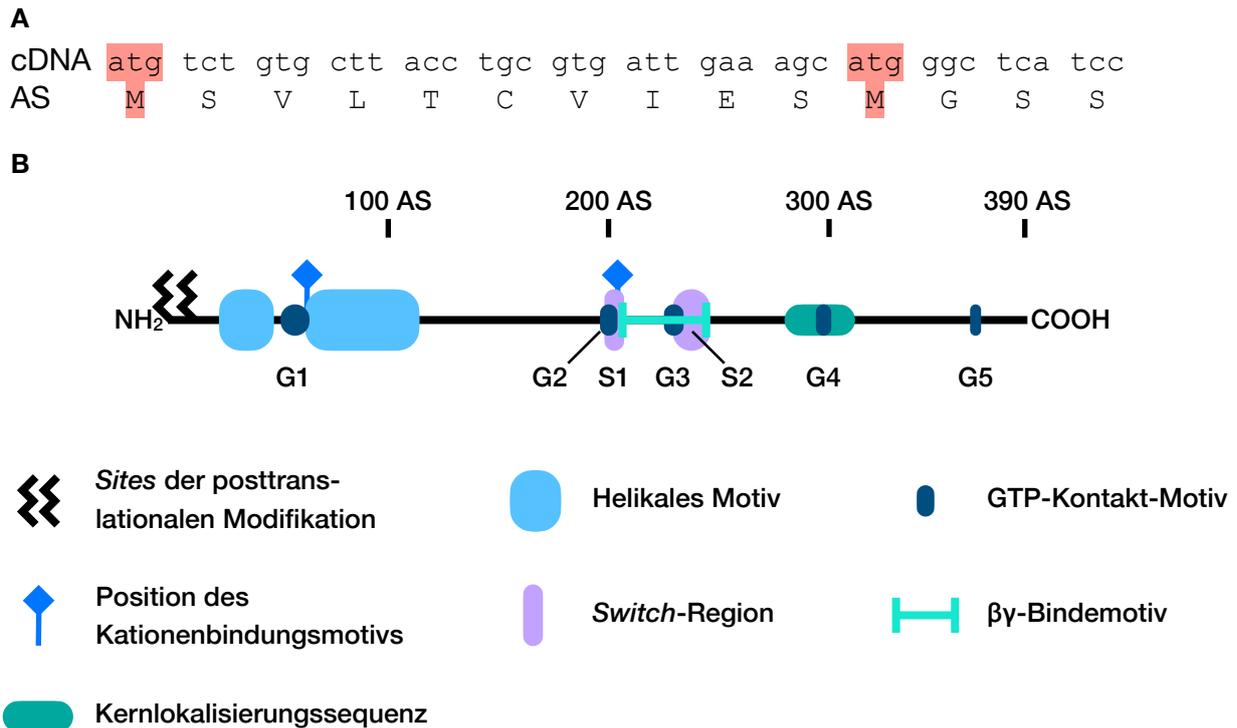


Abbildung 5: *In silico* Analyse von CT2

A Translatierte 5'-cDNA-Sequenz von CT2. Die 5'-cDNA-Sequenz von CT2 enthält zwei Startcodons, die jeweils für ein Methionin kodieren (rot hinterlegt). Aminosäuresequenz (AS). B Schematische Darstellung der Struktur von CT2. Die *in silico*-Analyse der Aminosäuresequenzen von CT2 zeigte, dass CT2 bereits von G α -Untereinheiten bekannte Domänen besitzt. Daher lässt sich die Aminosäuresequenz CT2 in zwei Bereiche teilen, eine N-terminale helikale Domäne [93, 94] und eine C-terminale Ras-Domäne. Am N-Terminus befinden sich Aminosäuren, die potenziell posttranslational modifiziert werden können. Ferner sind fünf GTP-Kontaktmotive (G1-G5) [97-101], zwei Switch-Regionen (S1-S2) [97, 99-101], zwei Kationenbindungsmotive [98], ein $\beta\gamma$ -Komplex-Bindemotiv [97, 99-101] und eine putative NLS [104-106] identifiziert worden.

Die cDNAs der G α -Untereinheiten der Süßgräser besitzen zwei potenzielle Startcodons. Anders als die bisher am besten untersuchte pflanzliche G α -Untereinheit AtGPA1, besitzt die cDNA von CT2 [5, 61] zwei Startcodons (s. Abb. 5A, s. Supplement Abb. 33A). Die translationelle Nutzung dieser Startcodons kann zu der Translation von zwei *Isoformen* von CT2 mit distinkten N-Termini führen, einer längeren Variante und einer N-terminal verkürzten (s. Abb. 5A; Supplement Abb. 33A). Der Vergleich von Proteinsequenzen der G α -Untereinheit von Arten verschiedener Familien zeigte, dass dies nicht der Familie der Süßgräser (*Poaceae*) bzw. den Monokotyledonen vorbehalten zu sein scheint (s. Abb. 6). Abgesehen von den untersuchten Arten der *Brassicaceae* scheinen alle untersuchten Pflanzenfamilien zwei Startcodons zu besitzen. Das Startcodon der untersuchten Arten der *Brassicaceae*, zu denen *Arabidopsis thaliana* gehört, scheint dem zweiten der *Poaceae* zu entsprechen (s. Abb. 6). Andere Familien der *Eudikotyledonen* - es wurden Sequenzen der *Rosaceae* und der *Solanaceae* analysiert -

besitzen ebenfalls das erste Startcodon, weisen allerdings einen nicht orthologen N-Terminus auf (Abb. 6). Da die bisherigen Untersuchungen der G Protein-vermittelten Signaltransduktion und auch Lokalisierungsstudien überwiegend mit AtGPA1 durchgeführt wurden [vgl. 39, 63], wurden die Möglichkeiten der posttranslationalen Modifikation der unterschiedlichen möglichen N-Termini und deren potenzieller Einfluss auf die Lokalisierung von CT2 *in silico* analysiert.

Monokotyledonen		
	<i>Poaceae</i>	1
	<i>Zea mays</i>	MSVLTCVIESMGSSCSRSHSF
	<i>Brachypodium distachyon</i>	MSVLTCVLESMSGSSCSRPHLN
	<i>Oryza sativa</i>	MSVLTCVLDNMGSSCSRSHSL
	<i>Setaria italica</i>	MSVLTCVIESMGSSCSRHHSL
	<i>Sorghum bicolor</i>	MSVLTCVIESMGSSCSRSHSL
Eudikotyledonen		
	<i>Brassicaceae</i>	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>MGLLCSRSRHH
	<i>Brassica rapa</i>MGLLCSRSRHH
	<i>Raphanus sativus</i>MGLLCSRSRHH
	<i>Rosaceae</i>	
	<i>Malus domestica</i>	. .MLSILNIENMGLLCSRNKHY
	<i>Prunus avium</i>	. .MLSIVIENMGLLCSRNKHY
	<i>Solanaceae</i>	
	<i>Solanum lycopersicum</i>	. .MLSVVFENMGLSLCSRNKHY
	<i>Nicotiana glauca</i>	. .MLCVVLENMGLLCSRNKGY

Abbildung 6: Die Gα-Untereinheiten der Poaceae besitzen im Vergleich zu Familien der Eudikotyledonen einen verlängerten N-Terminus

Die *in silico*-Analyse von Gα-Aminosäuresequenzen von Arten verschiedener Familien der Monokotyledonen und Eudikotyledonen zeigte, dass *Poaceae* zwei potenzielle Startcodons (Methionin [rot hinterlegt]) aufweisen, deren Translation von zwei Isoformen der Gα-Untereinheit mit distinkten N-Termini führen kann. Die zwei Isoformen der Gα-Untereinheit enthalten jeweils unterschiedliche Sequenzen die jeweils verschiedene posttranslationale Modifikationen (Palmitoylierung [blau hinterlegt], Myristoylierung [grün hinterlegt]) zulassen. In Arten der *Brassicaceae* fehlt der Bereich vor dem zweiten Startcodon, in Arten der *Solanaceae* und *Rosaceae* ist dieser Bereich nicht ortholog zur Sequenz der *Poaceae*.

Die individuelle Nutzung der zwei Startcodons von CT2 kann zu zwei Isoformen des Proteins mit distinkten N-Termini führen. Die Aminosäuresequenz der zwei Isoformen von CT2 wurde untersucht, um potenzielle posttranslationale Modifikationsmöglichkeiten zu finden, da diese für die Lokalisierung und auch für die Funktion des Proteins wichtig sein können [107]. Die Nutzung des ersten Startcodons der cDNA von CT2 resultiert im Vorhandensein von zwei Cysteinen, nämlich an Position 6 (C6) und Position 15 (C15; s. Abb. 6; s. Supplement

Abb. 33A). Diese Cysteine erlauben jeweils die co- oder posttranslationale *Palmitoylierung* des Proteins (s. Supplement Abb. 33B). Die Nutzung des zweiten Startcodons führt zu der Translation einer N-terminal verkürzten Isoform von CT2 (s. Abb. 5A; s. Supplement Abb. 33A). Diese enthält an Position 12 ein Glycin (G12), welches die posttranslationale *Myristoylierung* erlaubt. Zusätzlich ist C15 noch als mögliche Position der Palmitoylierung vorhanden (s. Abb. 6; s. Supplement Abb. 33C). Jede dieser posttranslationalen Modifikationen kann eine schwache Assoziation des Proteins mit der Plasmamembran (PM) bewirken. Eine doppelte Myristoylierung oder eine Myristoylierung kombiniert mit einer Palmitoylierung des Proteins verstärkt die Assoziation mit der PM [108]. Um den Einfluss der möglichen posttranslationalen Modifikationen auf die subzelluläre Lokalisierung von CT2 zu untersuchen, wurde die Lokalisierung der verschiedenen langen Varianten sowie von *substituierten Varianten*, die keine posttranslationale Modifikation zulassen, analysiert.

Es wurden verschiedene Substitutionskonstrukte von p35S::CT2-YFP hergestellt und anschließend in *N. benthamiana* untersucht. Als Basis für die durchgeführten Substitutionen und die folgenden Lokalisierungsstudien diente das Konstrukt pH2GW7 CT2-YFP_{intern} (s. Tab. 45). Das Translationsprodukt dieses Konstrukts enthält die Insertion des YFP an der gleichen Position wie das Translationsprodukt des in der Linie pCT2::CT2-YFP verwendeten genomischen Reporterkonstrukts, basiert allerdings auf der cDNA-Sequenz von CT2. Die Position der Insertion von YFP stellt die Funktionalität von CT2 sicher [vgl. 1, vgl. 58, vgl. 89]. Der verwendete 35S-Promoter gewährleistet die Expression in den verwendeten Tabakpflanzen. Das Konstrukt diente als Matrize für die im Folgenden erläuterten Substitutionskonstrukte, welche von Dr. Jantjeline Kluth (Universität Hamburg) mithilfe von *site directed mutagenesis* (SDM) hergestellt wurden. Um die Nutzung des zweiten Startcodons zu verhindern, wurde das Konstrukt p35S::CT2_{M11V}-YFP hergestellt, in welchem das Codon für Methionin an Position 11 durch ein Codon für Valin ersetzt wurde. Auf jenem basierend wurden Konstrukte hergestellt, die eine Substitution von Cystein durch Serin an Position 6 (p35S::CT2_{M11V/C6S}-YFP) und an Position 15 (p35S::CT2_{M11V/C15S}-YFP) und beide kombiniert (p35S::CT2_{M11V/C6S/C15S}-YFP) bewirken. Dies diente der Verhinderung der Palmitoylierung des Cysteins an der 6. bzw. 15. Position. Das p35S::CT2_{ΔM1}-YFP-Konstrukt wurde durch Deletion des ersten Startcodons hergestellt und spiegelt damit die N-terminal verkürzte Variante von CT2 wider. Darauf basierend wurden wiederum Konstrukte hergestellt, welche eine Substitution von Glycin durch Alanin an Position 12 (p35S::CT2_{ΔM1/G12A}-YFP) und von Cystein durch Serin an Position 15 (p35S::CT2_{ΔM1/C15S}-YFP) und beide kombiniert (p35S::CT2_{ΔM1/G12A/C15S}-YFP) enthalten. Dies diente der Verhinderung der posttranslationalen Myristoylierung bzw. Palmitoylierung der 12. bzw. 15. Aminosäure. Um die Lokalisierung der substituierten Varianten von CT2 zu untersuchen, wurden die Substitutionskonstrukte nach transienter Transformation von *N. benthamia-*

na-Blättern in diesen exprimiert und anschließend mithilfe des CLSM analysiert. Die Expression in Blättern von *N. benthamiana* hat den Vorteil, dass die zeitlichen Abläufe deutlich schneller sind als die der stabilen Transformation von *Z. mays*-Pflanzen. Das experimentelle Vorgehen der transienten Transformation ist insgesamt einfacher und damit weniger kostenintensiv als das der stabilen Transformation, die Ergebnisse ließen dennoch Rückschlüsse auf die Gegebenheiten in *Z. mays* zu.

Die Lokalisierung von CT2-YFP in *N. benthamiana* ähnelte der Lokalisierung von CT2 in **älteren Geweben**. CT2-YFP lokalisierte in *N. benthamiana* an der PM, im Nukleus und im Cytosol der Zellen (s. Abb. 7). Die Membranständigkeit wurde in Protoplasten besonders deutlich (s. Abb. 7). Aus der Lokalisierung lässt sich folgern, dass ein Teil der in einer Zelle enthaltenen CT2-Proteine vermutlich aufgrund der NLS in den Kern transportiert wurde und ein Teil, vermutlich aufgrund von posttranslationalen Modifikationen, mit der PM assoziiert war. Die Lokalisierung von CT2-YFP in epidermalen Zellen von Tabakblättern ist vergleichbar mit der Lokalisierung von CT2-YFP in älteren epidermalen Blattzellen von stabil mit pCT2::CT2-YFP transformierten *Z. mays*-Pflanzen. Dies könnte darin begründet liegen, dass es sich bei den transient transformierten Zellen ebenfalls um nicht mehr proliferierende Zellen handelte. Dies verdeutlichte auch, dass *N. benthamiana* als Modellsystem genutzt werden kann.

Die Lokalisierung der längeren Variante von CT2 entsprach der Lokalisierung von CT2 in **älteren Geweben**. CT2_{M11V}-YFP zeigte ebenfalls eine Lokalisierung an der PM, im Nukleus und im Cytosol (s. Abb. 7). Die Lokalisierung von CT2_{M11V}-YFP ähnelte somit ebenfalls der Lokalisierung von CT2-YFP in älteren Epidermiszellen von stabil transformierten *Z. mays*-Pflanzen. Das Signal der substituierten Varianten (p35S::CT2_{M11V/C6S}-YFP, p35S::CT2_{M11V/C6S}-YFP und p35S::CT2_{M11V/C6S/C15S}-YFP) zeigte die gleiche Lokalisierung, was darauf hindeutet dass die posttranslationale Palmitoylierung des Proteins für eine WT-ähnliche Lokalisierung in älteren Geweben nicht nötig ist.

Die Lokalisierung der kürzeren Variante von CT2 entsprach der Lokalisierung von CT2 in **meristematischen Geweben**. Im Gegensatz zu CT2_{M11V}-YFP war CT2_{ΔM1}-YFP ausschließlich an der PM zu erkennen (s. Abb. 7). Dies ähnelte damit der Lokalisierung von CT2-YFP im meristematischen Gewebe stabil transformierter *Z. mays*-Pflanzen (s. Abb. 4A). Die Verhinderung der posttranslationalen Modifikation (p35S::CT2_{ΔM1/G12A}-YFP, p35S::CT2_{ΔM1/C15S}-YFP und p35S::CT2_{ΔM1/G12A/C15S}-YFP) verhinderte die ausschließliche PM-Lokalisierung und führte zu einer Lokalisierung, die der nicht-substituierten Variante von CT2 (CT2-YFP) ähnelt (s. Abb. 7). Dies lässt darauf schließen, dass die Kombination beider posttranslationaler Modifikationen für eine stabile Verankerung an der PM nötig ist.

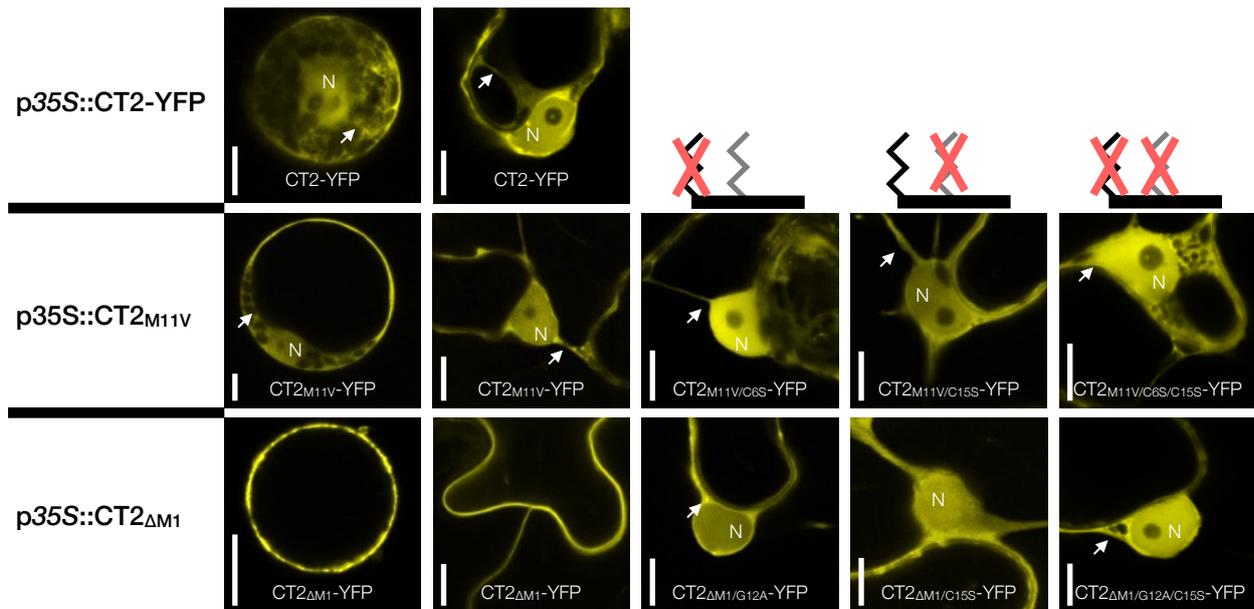


Abbildung 7: Unterschiedliche Startcodons und posttranslationale Modifikationen beeinflussen die Lokalisierung von CT2-YFP

Transient transformierte epidermale Blattzellen von *N. benthamiana* zeigen die Lokalisierung verschiedener Substitutionsvarianten von CT2-YFP. In mit p35S::CT2-YFP transformierten Zellen war ein Signal im Nukleus, im Cytosol und an der Zellperipherie zu sehen. Mit p35S::CT2_{M11V}-YFP transformierte Zellen zeigten ein Signal an der Zellperipherie, im Nukleus und im Cytosol, ebenso wie alle auf diesem Konstrukt basierenden Substitutionskonstrukte. In mit p35S::CT2_{ΔM1}-YFP transformierten Zellen war ein Signal an der Plasmamembran zu sehen, während mit den Substitutionskonstrukten p35S::CT2_{ΔM1}/G12A-YFP, p35S::CT2_{ΔM1}/C15S-YFP und p35S::CT2_{ΔM1}/G12A/C15S-YFP transformierte Zellen ein Signal an der Zellperipherie, im Nukleus und im Cytosol zeigten. Nukleus (N), Cytosol (→). Der Maßstabsbalken gibt 10 μm an.

Verschiedene Varianten von CT2 zeigten eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisierung. Ausgehend von der Lokalisierung liegt der Schluss nahe, dass in jungen meristematischen Geweben die Expression und posttranslationale Modifikation von CT2_{ΔM1} überwog. Die sichtbare Membranlokalisierung stimmte überein mit bereits veröffentlichten Resultaten [1] und erhärtet die These der Signalübertragung vom extrazellulären Raum in das Innere der Zelle. Im Allgemeinen ist diese Membranlokalisierung unabdingbar für die Übertragung des restriktiven CLAVATA-Signals [22]. In älteren differenzierten Geweben könnte einerseits die Expression von CT2_{M11V} oder beiden Isoformen (CT2_{ΔM1} und CT2_{M11V}) vorgelegen haben. Andererseits könnte die posttranslationale Modifikation der verkürzten Isoform verändert gewesen sein, sodass eine ausschließliche Lokalisierung an der Membran nicht möglich war. Dies würde eine zusätzliche Funktion zu der bereits beschriebenen CLAVATA-Signaltransduktion indizieren. Die Funktion der Kernlokalisierung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht, jedoch wurde die beobachtete Phragmoplast-Lokalisierung einer genaueren Betrachtung unterzogen.

CT2 interagiert nicht mit Mikrotubuli

Beeinflusst CT2 die Dynamik kortikaler Mikrotubuli? Die phänotypischen Charakteristika homozygoter CT2-LOF-Pflanzen beschränken sich nicht nur auf die generativen Organe. Auch die vegetativen Organe homozygoter CT2-LOF-Pflanzen zeigen signifikante Unterschiede zu WT-Pflanzen [1, 10]. Dazu gehören unter anderem die Blätter, welche kürzer und breiter als die Blätter von WT-Pflanzen sind. Dies ließ auf eine spezifische Rolle der $G\alpha$ -Untereinheit in der Zellproliferation des SAMs und der Blattprimordien schließen [33]. Auch die Zellelongation von CT2-LOF-Pflanzen zeigt Defizite gegenüber WT-Pflanzen [10, 33]. Allerdings ist bisher noch nicht bekannt auf welche Weise CT2 die Zellproliferation und -elongation beeinflusst und welche potenziellen Interaktionspartner dies unterstützen. Um der Beantwortung dieser Frage näherzukommen, wurde das Augenmerk auf diejenige subzelluläre Lokalisierung von CT2 gelegt, welche nicht erwartet wurde. CT2 zeigte in den durchgeführten Lokalisierungsstudien (s. Kapitel *Die gewebespezifische und subzelluläre Lokalisierung von CT2*) eine potenzielle Lokalisierung am Phragmoplasten einer sich teilenden Zelle (s. Abb. 4C). Der Phragmoplast besteht unter anderem aus Mikrotubuli [109]. Von kortikalen Mikrotubuli (*cortical microtubules*, cMTs) ist wiederum bekannt, dass diese sowohl die Zellproliferation als auch die Zellelongation beeinflussen [110]. Interessanterweise wurden bei einer *Immunpräzipitation/Massenspektrometrie*-Analyse (IP/MS) von Proteinextrakt aus jungen Kolben der funktionalen Reporterlinie von CT2 α - und β -Tubulin als potenzielle Interaktionspartner von CT2-YFP identifiziert (unveröffentlichte Daten, Peter Bommert). Aus tierischen Systemen ist bekannt, dass die $G\alpha$ -Untereinheit die Dynamik von Mikrotubuli und dadurch das Wachstum von Neuriten beeinflussen kann [34]. Um zu untersuchen wie CT2 in *Z. mays* die Zellproliferation und -elongation beeinflusst, wurde daher zunächst der potenzielle Einfluss von CT2 auf die Dynamik der cMTs analysiert.

Mithilfe einer Tubulin-Reporterlinie sollte die Orientierung der kortikalen Mikrotubuli in CT2-LOF-Pflanzen untersucht werden. Um den Einfluss von CT2 auf cMTs von *Z. mays*-Pflanzen analysieren zu können, wurde die Introgression des *ct2*-Ref.-Allels in die Reporterlinie *paTUB1::YFP- α -Tubulin1* [36] durchgeführt, in welcher eine (funktionale) translationale Fusion von α -Tubulin1 mit YFP unter Kontrolle des endogenen Promoters exprimiert wird. Mit der so erzeugten Linie war es möglich, die Orientierung der cMTs in WT- und CT2-LOF-Pflanzen zu untersuchen. Die Orientierung der cMTs lässt einen Rückschluss auf das Entwicklungsstadium der Zelle zu. Im Allgemeinen zeigen proliferierende Zellen eine *zufällige Orientierung* der cMTs. Expandierende Zellen besitzen, um die Streckung der Zellen zu ermöglichen, cMTs mit einer *transversalen Orientierung*. Damit werden die Seiten der Zellen stabilisiert und der Turgor führt zu einer Ausdehnung an den Spitzen und damit zu einem Streckungswachstum der Zelle. Ältere, reife Zellen besitzen cMTs einer *längsgerichteten oder schrägen Orientierung* um die Zelle

vollständig zu stabilisieren [111]. Um den Einfluss des CT2-LOF-Allels auf die Orientierung der cMTs zu untersuchen, wurden von WT- und CT2-LOF-Pflanzen epidermale Zellen verschiedener Zonen der Zellentwicklung von Internodien mittels CLSM analysiert. Eventuelle Unterschiede in der Orientierung der cMTs ließen einen Rückschluss auf Veränderungen der Zellteilung oder des Streckungswachstums zu. Ein Internodium einer *Z. mays*-Pflanze enthält verschiedene Zonen der Zellentwicklung. Basal, nah am interkalaren Meristem, befindet sich die Zone der Zellproliferation. Weiter zur Mitte des Internodiums befindet sich die Zone der Expansion. Zur Spitze des Internodiums hin befinden sich ältere, differenzierte Zellen [111].

Kortikale Mikrotubuli von Zellen der Internodien wiesen in CT2-LOF- und WT-Pflanzen eine ähnliche Orientierung auf. Die Analyse von proliferierenden und von expandierenden Zellen von Internodien zeigte, dass die cMTs in WT- und CT2-LOF-Pflanzen jeweils eine ähnliche Orientierung aufwiesen (s. Abb. 8). Die Zellen, welche sich nah am interkalaren Meristem befanden, wiesen eine zufällige Orientierung der kortikalen Mikrotubuli auf, expandierende Zellen zeigten dagegen in beiden Genotypen eine transversale Orientierung. Es wurde daraus geschlossen, dass die Orientierung der cMTs nicht grundlegend verändert ist. Nicht mehr proliferierende bzw. expandierende Zellen wurden nicht analysiert. Allerdings war eine Quantifizierung der Ausdehnung der einzelnen Zonen aufgrund der schlechten Zugänglichkeit des Gewebes, mikroskopischer Unwägbarkeiten und der damit fehlenden Vergleichbarkeit der Daten nicht möglich. Um diese Problematik zu umgehen, wurde das Blatt der Maispflanzen als Modell der Proliferation und Elongation von Zellen ausgewählt, da es, analog zu den Internodien, ebenfalls verschiedene Zonen mit jeweils unterschiedlichen Zellentwicklungsstadien aufweist [112].

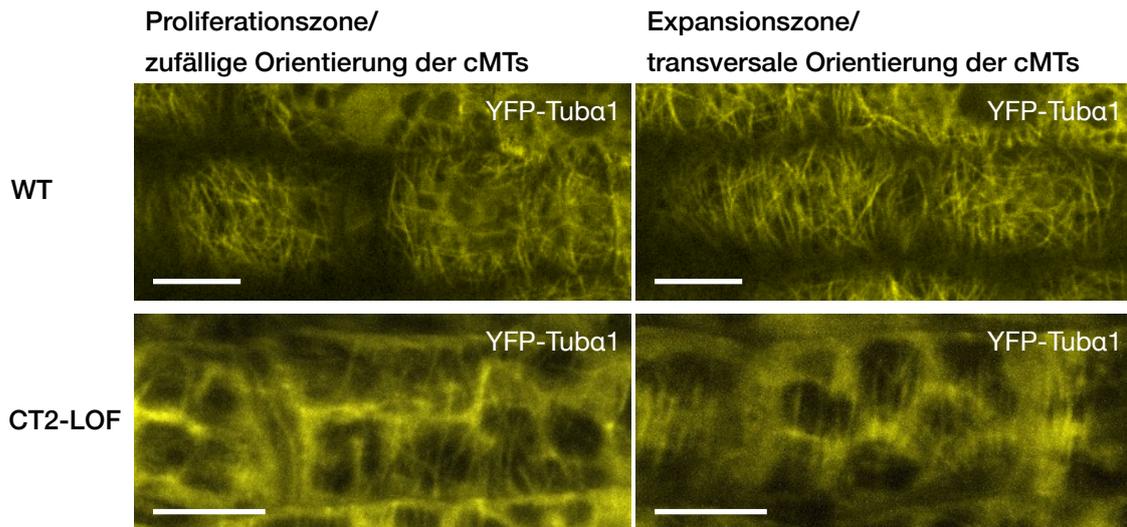


Abbildung 8: Zellen der Proliferations- und Expansionszone des interkalaren Meristems zeigten in WT- und CT2-LOF-Pflanzen die gleiche Orientierung von cMTs

Das *ct2*-Ref.-Allel wurde in die Reporterlinie *paTUB1::YFP- α -Tubulin1* eingekreuzt, um die Orientierung der cMTs untersuchen zu können. Die Analyse mittels konfokaler *Laser-Scanning*-Mikroskopie zeigte, dass Zellen der Proliferationszone in WT- und CT2-LOF-Pflanzen eine zufällige Orientierung der cMTs aufwiesen. Die cMTs der Expansionszonen beider Genotypen wiesen eine transversale Orientierung auf. Der Maßstabsbalken gibt 10 μ m an.

Epidermiszellen von Maisblättern können als Modell zur Untersuchung der Zellproliferation und -expansion dienen. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurden epidermale Blattzellen mittels CLSM analysiert (s. Abb. 9). Der Phänotyp von CT2-LOF-Pflanzen umfasst neben einer verminderten Gesamthöhe auch eine reduzierte Blattlänge [1, 113]. Es wurde bereits beschrieben, dass dies auf eine veränderte Zellproliferation und -expansion zurückzuführen ist [10, 33]. Auch das Maisblatt weist verschiedene Zonen der Zellentwicklung auf. Diese umfassen, ähnlich dem Internodium, ebenfalls die Zonen der Proliferation, der Expansion und von reifen Zellen und lassen sich unter anderem durch die Orientierung der cMTs charakterisieren [112, 114, 115].

Kortikale Mikrotubuli von WT- und CT2-LOF-Pflanzen wiesen in verschiedenen Zonen der Zellentwicklung keinen Unterschied in der Orientierung auf. Proliferierende Zellen von WT- und CT2-LOF-Pflanzen zeigten eine zufällige Orientierung der cMTs (s. Abb. 9). In der Expansionszone wiesen die Zellen von WT- und CT2-LOF-Pflanzen eine transversale Orientierung der cMTs auf, während reife Zellen beider Genotypen eine längsgerichtete bzw. schräge Orientierung der cMTs zeigten (s. Abb. 9). Die Orientierung der cMTs in Zellen verschiedener Blattzonen zeigte demnach keine Unterschiede, woraus geschlossen wurde, dass die Dynamik der cMTs von CT2-LOF-Pflanzen nicht grundlegend verändert war. Auffälligerweise waren in Zellen der Expansionszone von CT2-LOF-Pflanzen Bereiche zu sehen, die durch das Fehlen des YFP-Signals gekennzeichnet waren. Diese Bereiche stellten vermutlich die zweidimensio-

nale Projektion des durch annähernd kugelförmige Elemente verdrängten YFP-Signals dar. Diese kreis- bzw. kugelförmigen Elemente waren in den entsprechenden Zellen von WT-Pflanzen in dieser Anzahl und Ausdehnung nicht zu sehen und befanden sich, ebenso wie die untersuchten cMTs, in der Zellperipherie. Die Analyse der cMTs und der kugelförmigen Elemente wurden im Folgenden mithilfe der *Transmissionselektronenmikroskopie* (TEM) fortgesetzt.

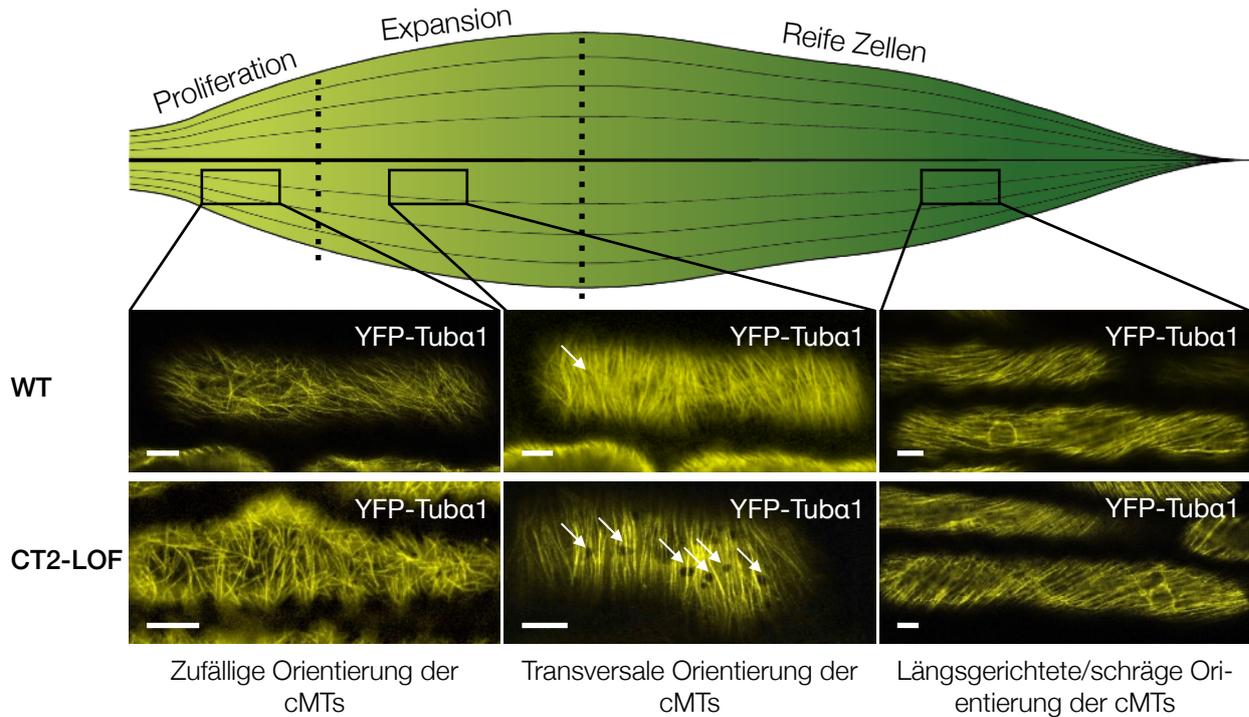


Abbildung 9: Die Orientierung der cMTs von WT- und CT2-LOF-Pflanzen wies in verschiedenen Blattzonen keinen Unterschied auf

Die cMTs von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im *paTUB1::YFP- α -Tubulin1*-Hintergrund wurden mittels konfokaler *Laser-Scanning*-Mikroskopie untersucht. Die cMTs von Zellen verschiedener Zonen der Zellentwicklung wiesen in den zwei Genotypen keinen Unterschied auf. Die Zellen der Proliferationszone zeigten eine zufällige Orientierung der cMTs, die der Expansionszone eine transversale. Reife Zellen zeigten eine längsgerichtete bzw. schräge Orientierung der cMTs. Auffälligerweise zeigten Zellen der Expansionszone der Blätter von CT2-LOF-Pflanzen runde Elemente in der Zellperipherie, die durch das Fehlen eines YFP-Signals gekennzeichnet waren (durch Pfeile markiert). Der Maßstabsbalken gibt 10 µm an.

Kortikale Mikrotubuli von CT2-LOF-Zellen wiesen keinen Unterschied zu denen von WT-Zellen auf. Um die cMTs der epidermalen Blattzellen der Expansionszone von WT- und CT2-LOF-Pflanzen gründlicher untersuchen zu können, wurde eine *Ultrastrukturanalyse* mittels TEM durchgeführt. Die Ultrastruktur bezeichnet die Architektur von Zellen bzw. deren Organellen, die nicht mit der konventionellen Lichtmikroskopie zu erfassen ist. Die durchgeführte TEM-Mikroskopie erreicht eine höhere Auflösung als die konfokale *Laser-Scanning*-Mikroskopie und lässt damit die Analyse der Ultrastruktur zu [116]. Die TEM-Längsaufnahmen der cMTs von

CT2-LOF-Zellen zeigten, dass diese keine Unregelmäßigkeiten im Vergleich zu jenen von WT-Zellen aufwiesen (s. Supplement Abb. 34A). Daher wurde mithilfe von Querschnittsaufnahmen der cMTs die Fläche des Querschnitts dieser quantifiziert (s. Abb. 10). Diese Quantifizierung zeigte, dass die cMTs der untersuchten Gewebe keinen signifikanten Unterschied in der Querschnittsfläche aufwiesen ($\varnothing_{WT}=524,8 \text{ nm}^2$; $n_{WT}=21$; $\varnothing_{ct2}=560,2 \text{ nm}^2$; $n_{ct2}=25$; $p_{cMTs}=0,0551$; s. Abb. 10C; s. Supplement Tab. 5). Bei der Analyse der Aufnahmen fielen jedoch wiederholt rundliche Elemente auf, die zwischen den cMTs lokalisiert zu sein schienen (s. Supplement Abb. 34B). Diese Elemente schienen denen mithilfe des CLS-Mikroskops beobachteten Elementen zu entsprechen (s. Abb. 9) und wurden mithilfe des TEM weiter untersucht (s. Abb. 11).

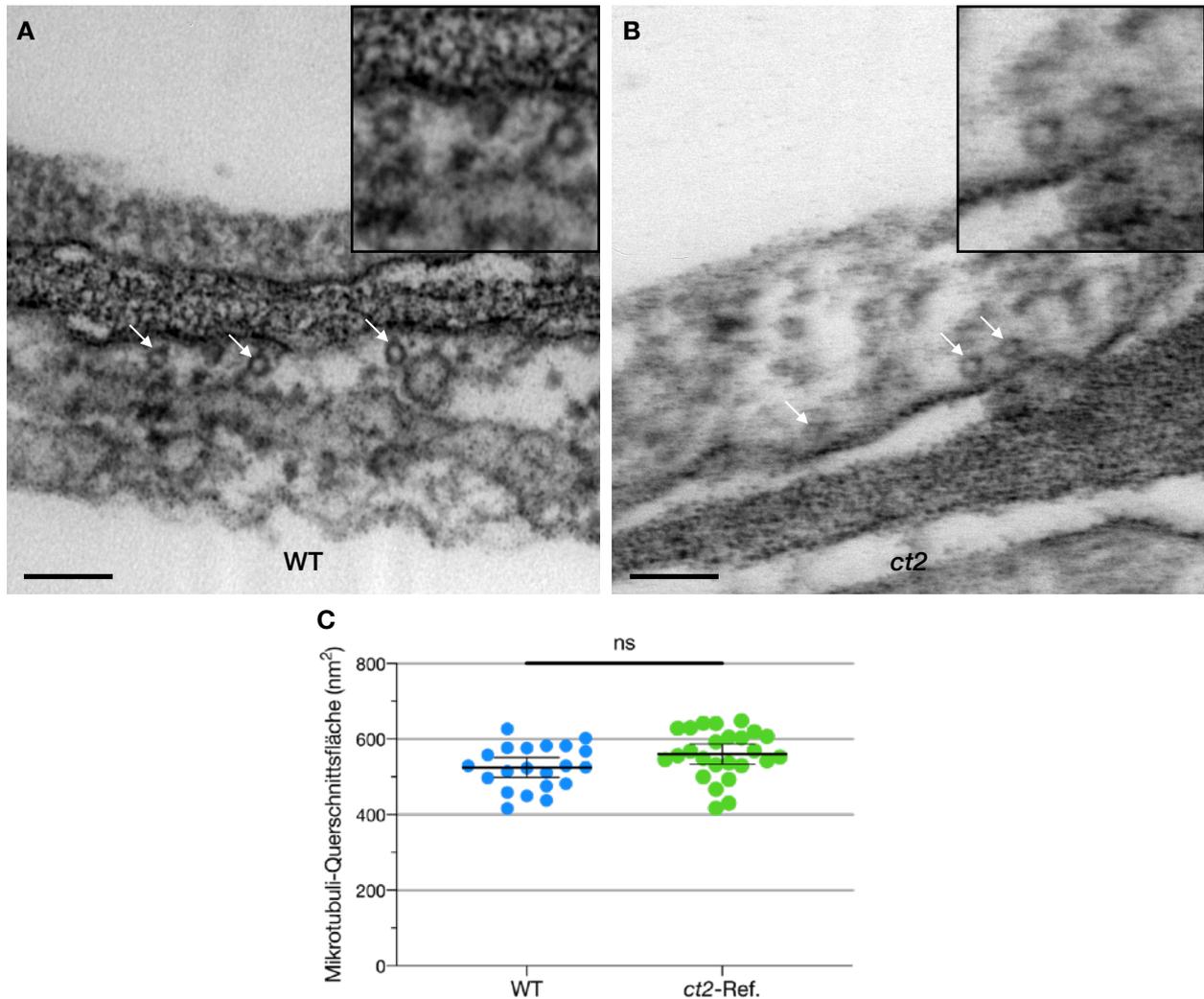


Abbildung 10: cMTs epidermaler Blattzellen der Expansionszone von CT2-LOF-Pflanzen zeigten keine Unterschiede zu denen von WT-Pflanzen

A TEM-Aufnahme der Zellperipherie von epidermalen Blattzellen der Expansionszone von WT-Pflanzen. Querschnitte der cMTs sind durch Pfeile markiert. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die cMTs im Detail. Der Maßstabsbalken zeigt 100 nm an. B TEM-Aufnahme der Zellperipherie von epidermalen Blattzellen der Expansionszone von CT2-LOF-Pflanzen. Querschnitte der cMTs sind durch Pfeile markiert. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die cMTs im Detail. Der Maßstabsbalken zeigt 100 nm an. C Streudiagramm der Quantifizierung der Querschnittsfläche der kortikalen Mikrotubuli von WT- und CT2-LOF-Zellen. $\bar{\varnothing}_{WT}=524,8 \text{ nm}^2$; $n_{WT}=21$; $\bar{\varnothing}_{ct2}=560,2 \text{ nm}^2$; $n_{ct2}=25$. Welch's t-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p_{cMTs}=0,0551$), die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an.

Zellen der Expansionszone von Blättern CT2-LOF-Pflanzen wiesen Evaginationen der PM auf. Die aufgrund dieser Beobachtung hergestellten Aufnahmen zeigten, dass es sich dabei um Elemente handelte, die zwischen der PM und der Zellwand von CT2-LOF-Zellen lokalisierten (s. Abb. 11B-D). Diese Elemente besaßen eine *Lipiddoppelschicht* (s. Abb. 11C) und stellten daher wahrscheinlich *Evaginationen der PM* in den *paramuralen Raum* dar (vgl. Abb. 11E). Die negative Krümmung von Lipidmembranen bis hin zur Formung von Evaginationen kann durch verschiedene Faktoren hervorgerufen werden. Dazu gehören *Phospholipide*, wel-

che bei Insertion in eine Lipidmembran die Krümmung dieser durch ihre inhärente Form beeinflussen können [117]. Im Speziellen *Phosphatidsäure* (*phosphatidic acid*; PA), welche ein Stoffwechselprodukt von *Phospholipasen* ist, kann die negative Krümmung von Lipidmembranen verursachen [117]. Phospholipasen sind als Interaktionspartner der G α -Untereinheit in *A. thaliana* bekannt, deren Aktivität durch diese beeinflusst werden kann [62]. Sofern die Formung der Evaginationen aus einem veränderten Phospholipid-Stoffwechsel resultierte, könnte dies ein Hinweis auf eine veränderte Regulation der Phospholipasen in CT2-LOF-Zellen sein. Dies ließe auf eine potenzielle Interaktion von CT2 mit Phospholipasen in WT-Zellen schließen. Die putative Interaktion von CT2 mit den Phospholipasen aus *Z. mays* wird im Kapitel *Phospholipasen beeinflussen die GTPase-Aktivität von CT2* beleuchtet.

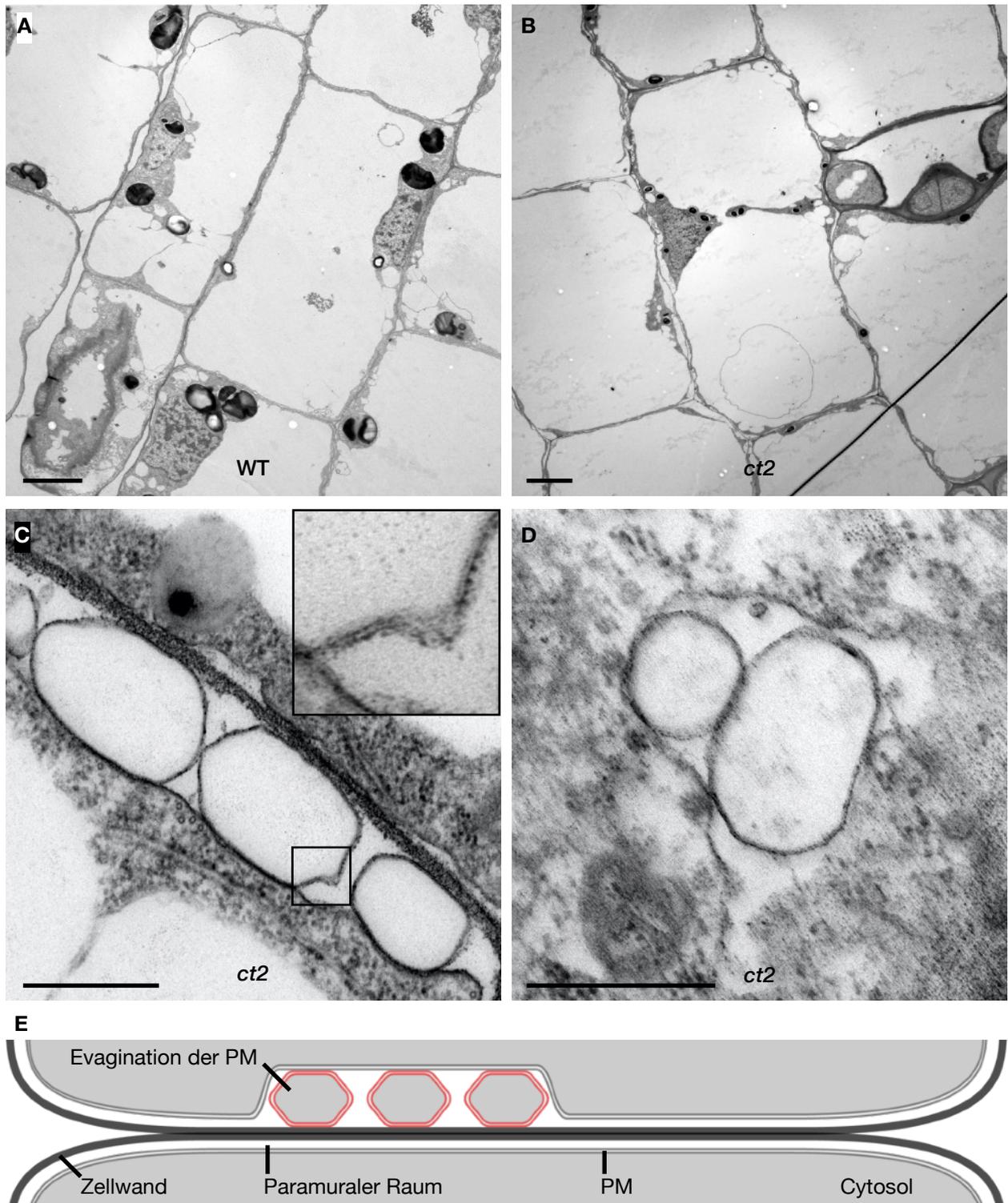


Abbildung 11: Zellen der Expansionszone von CT2-LOF-Blättern zeigten Evaginationen der PM

A Übersicht von expandierenden WT-Zellen. Die TEM-Aufnahmen zeigten keine Abschnürungen der Plasmamembran (PM). Der Maßstabsbalken zeigt 4 µm an. B Übersicht von expandierenden CT2-LOF-Zellen. Die TEM-Aufnahmen von expandierenden CT2-LOF-Zellen zeigten Abschnürungen der PM. Der Maßstabsbalken zeigt 4 µm an. C Detailaufnahme von Abschnürungen der PM von expandierenden CT2-LOF-Zellen. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die Lipiddoppelschicht. Der Maßstabsbalken zeigt 0,5 µm an. D Detailaufnahme von Abschnürungen der PM von expandierenden CT2-LOF-Zellen. Der Maßstabsbalken zeigt 0,5 µm an. E Schematische Darstellung der Zellperipherie von CT2-LOF-Zellen.

CT2 band *in vitro* nicht an Mikrotubuli. Um zu untersuchen ob CT2 *in vitro* direkt an *Mikrotubuli* (MTs) binden kann, wurden biochemische Versuche durchgeführt. Dafür wurde His₆-CT2 in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen (mithilfe des Vektors pPROEX CT2; zur Verfügung gestellt von Dr. Qingyu Wu; verwendet in [18]) heterolog exprimiert und mittels Affinitätschromatographie isoliert (s. Supplement Abb. 35). Die Funktionalität von CT2 wurde mithilfe eines GTPase-Aktivitäts-Assays überprüft (s. Kapitel *Phospholipasen beeinflussen die GTPase-Aktivität von CT2*). Anschließend wurde ein *Mikrotubuli-Bindungs-Assay* durchgeführt, um die Bindungsfähigkeit des funktionalen His₆-CT2 an Mikrotubuli *in vitro* zu überprüfen. Der Assay basiert auf der Eigenschaft der 5-10 µm langen Mikrotubuli bei einer Zentrifugation von 100.000x *g* mit allen gebundenen Proteinen zu sedimentieren. Alle mit den MTs assoziierten Proteine sedimentieren ebenfalls, nicht-assoziierte, lösliche Proteine verbleiben im Überstand. Das Bild der mit Coomassie gefärbten SDS-PAGE-Gele mit den Proben nach Durchführung des Assays (s. Abb. 12) zeigt, dass die MTs nach der Zentrifugation im Pellet zu finden waren, ebenso die an Mikrotubuli bindende und damit als Positivkontrolle dienende *Mikrotubuli-assoziiertes Protein-Fraktion* (MAPF). Im Gegensatz dazu assoziierte BSA (Negativ-Kontrolle) nicht mit den MTs und war daher nach der Zentrifugation in der löslichen Fraktion zu finden. Befanden sich keine MTs im Ansatz, waren die MAP-Fraktion und BSA nach der Zentrifugation in der löslichen Fraktion zu finden, was zeigte, dass die Sedimentation tatsächlich von der Bindung an die Mikrotubuli abhängig war. Ebenso war die Fraktion von His₆-CT2 (ca. 45,42 kDa; kalkuliert mit [118-120]) in Anwesenheit von GTP (CT2-GTP) nach der Zentrifugation in der löslichen Fraktion zu finden. Diese Löslichkeit ließ auf eine nicht aggregierende, hydrophile Konformation der einzelnen Proteine schließen, was als eine native Faltung dieser interpretiert wurde. Dieses lösliche funktionale His₆-CT2 befand sich auch in Anwesenheit von GTP und MTs nach der Zentrifugation in der löslichen Fraktion, was darauf schließen ließ, dass His₆-CT2 in aktiver Konformation *in vitro* nicht an MTs band. Auch in Anwesenheit von GDP zur Simulation der inaktiven Konformation assoziierte His₆-CT2 (CT2-GDP) nicht mit MTs (s. Supplement Abb. 36).

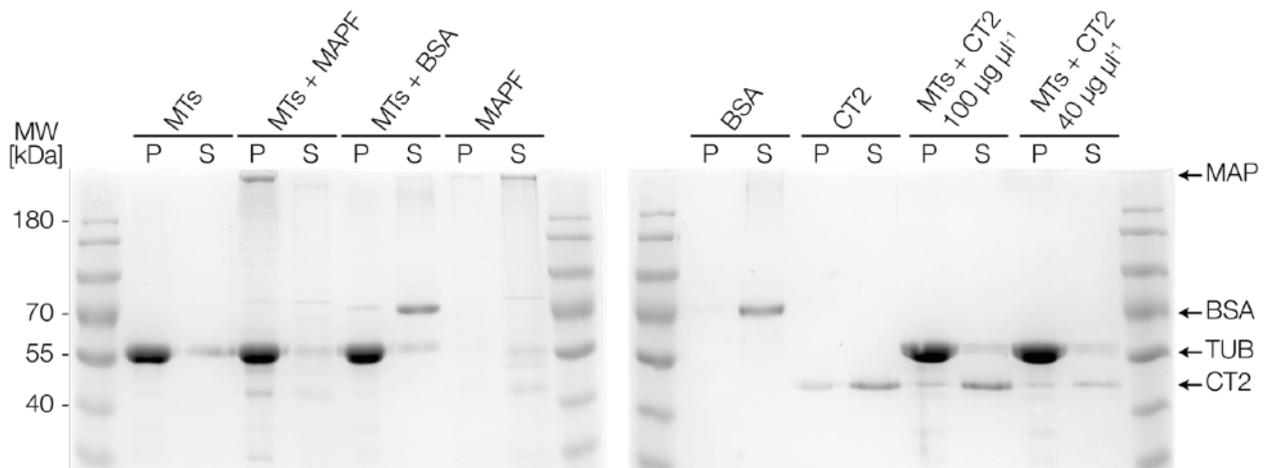


Abbildung 12: CT2-GTP band *in vitro* nicht an Mikrotubuli

Die mit *Coomassie* gefärbten SDS-PAGE-Gele zeigten die Pellet- und Überstand-Fractionen nach Durchführung des Mikrotubuli-Bindungs-Assays nach Angaben des Herstellers. MTs, Mikrotubuli; P, Pellet-Fraktion; S, Überstand-Fraktion. Die Position der Pfeile zeigen das erwartete apparente Molekulargewicht aller verwendeten Proteine. Mikrotubuli sedimentierten nach einer Zentrifugation mit 100.000x *g*. Eine MAP-Fraktion (MAPF) diente als Positivkontrolle und zeigte, dass an Mikrotubuli gebundene Proteine ebenfalls sedimentierten, während BSA als Negativkontrolle diente und zeigte, dass lösliche, nicht an Mikrotubuli gebundene Proteine während der Zentrifugation nicht sedimentierten. Vergleichbar mit der Negativkontrolle war der überwiegende Teil von His₆-CT2 (ca. 45,42 kDa) in der Überstand-Fraktion zu sehen. Die für den Versuch verwendeten Fraktionen von His₆-CT2 (100 µg ml⁻¹ und 40 µg ml⁻¹) enthielten 10 mM GTP um die aktive Konformation von CT2 zu simulieren.

Die Dynamik der cMTs schien in Blättern von CT2-LOF-Pflanzen nicht verändert zu sein, allerdings lassen die beobachteten Evaginationen den Schluss auf einen veränderten Phospholipid-Stoffwechsel zu. Es konnte gezeigt werden, dass CT2 *in vitro* nicht an Mikrotubuli band und die Dynamik der kortikalen Mikrotubuli in verschiedenen Zonen der Zellentwicklung nicht offensichtlich verändert war. Die Veränderungen der Zellproliferation und -elongation in CT2-LOF-Pflanzen konnten demnach nicht erklärt werden. Allerdings waren in CT2-LOF-Pflanzen Evaginationen der PM zu erkennen, die ein Hinweis auf einen veränderten Phospholipid-Stoffwechsel sein können. Dies ließe einen Rückschluss auf eine potenzielle Interaktion von CT2 mit Phospholipasen zu. Diese These wird im folgenden Kapitel behandelt.

Phospholipasen beeinflussen die GTPase-Aktivität von CT2

Interagieren Phospholipasen mit CT2? Der Phänotyp der reduzierten Elongation bestimmter Gewebe von CT2-LOF-Pflanzen konnte nicht durch eine direkte Interaktion von CT2 mit Mikrotubuli bzw. durch eine offensichtlich veränderte Dynamik der cMTs in CT2-LOF-Zellen erklärt werden. Allerdings ließen die beobachteten Evaginationen der PM von CT2-LOF-Zellen den Schluss auf einen möglicherweise veränderten Phospholipid-Stoffwechsel zu. *Phosphatidsäure*, welche ein Stoffwechselprodukt von Phospholipasen ist, kann die beobachteten negativen Krümmungen der PM hervorrufen [117]. Aus *A. thaliana* ist bekannt, dass die G α -Untereinheit die Aktivität der Phospholipasen negativ beeinflussen kann [62]. In einer G α -LOF-Mutante entfiel diese Hemmung mutmaßlich. Interessanterweise wurden bei einer IP/MS-Analyse von Proteinextrakt aus jungen, meristematischen Kolben der funktionalen Reporterlinie von CT2 die Peptide einer PHOSPHOLIPASE D α als potenzielle Interaktionspartner identifiziert [1]. Eine auf diese Evidenzen folgende Literaturrecherche zeigte, dass diese Klasse von Enzymen, sogenannte Phospholipasen D (PLDs), in anderen Pflanzenarten potenziell dazu in der Lage ist an die G α -Untereinheit von G Proteinen zu binden und deren GTPase-Aktivität zu beeinflussen [48, 62, 71]. In *A. thaliana* kann PHOSPHOLIPASE D α 1 (AtPLD α 1) als GAP die Terminierung des durch das G Protein-vermittelten Signals bewirken [121]. Eine Interaktion der G α -Untereinheit mit Phospholipasen in *Z. mays* könnte eine Erklärung für verschiedene phänotypische Eigenschaften von CT2-LOF-Pflanzen bieten. In diesem Kapitel wird daher zunächst die putative molekulare Interaktion von CT2 mit ausgewählten Phospholipasen D und darauf folgend der funktionale Einfluss der PLDs auf die Aktivität von CT2 untersucht.

Möglicherweise interagieren PLDs in *Z. mays* mit CT2 über das DRY-Motiv. Die Analyse von Sequenzierungsdaten zeigte, dass das Genom von *Z. mays* für 13 PLDs kodiert [72]. Diese Proteinfamilie katalysiert die Hydrolyse des in eukaryotischen Membranen am häufigsten vorkommenden Phospholipids *Phosphatidylcholin* (*phosphatidylcholine*; PC) zu PA und *Cholin* [63, 64]. Die unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften und die Expressionsmuster der PLDs spielen eine Rolle in der zeitlichen und räumlichen Regulation der Produktion von PA [122]. Als Signalmolekül (*second messenger*) übernimmt PA essentielle Funktionen unter anderem in der Entwicklung, des Wachstums, der Phytohormon-Signaltransduktion und der Stressreaktion von Pflanzen hat [123, 124]. So wurde gezeigt, dass in *A. thaliana* die Bindung von durch PLDs produziertem PA an den Transkriptionsfaktor WEREWOLF (AtWER) dessen nukleare Lokalisierung und damit die Bildung und Elongation von Wurzelhaaren ermöglicht [125]. Ebenso wurde gezeigt, dass PA in *A. thaliana* an REGULATOR OF G PROTEIN SIGNALING1 (AtRGS1) binden und so dessen GAP-Funktion inhibieren kann. Wird dies *in vivo* durch eine Substitution des Bindemotivs verhindert, zeigen die Pflanzen eine Hypersensitivität ge-

genüber Abscisinsäure (*abscisic acid*, ABA) und einen verringerten transpirativen Wasserverlust [121, 126]. Auch wird die Dephosphorylierung von AtPINOID1 (AtPIN1) durch die Bindung von PA an die Phosphatase AtPP2A unterstützt, was die Lokalisierung von AtPIN1 und damit den Auxin-Transport beeinflusst [127]. Der vesikuläre Transport, die Sekretion und Endozytose können ebenfalls durch PA beeinflusst werden [63]. In *A. thaliana* geschieht die Bindung an die G α -Untereinheit des G Proteins über das *DRY-Motiv*, welches homolog zu dem aus tierischen GPCRs bekannten DRY Motiv ist und aus den Aminosäuren Glutaminsäure (E), Lysin (K) und Phenylalanin (F) besteht [62]. Um zu überprüfen ob in den ZmPLD α s das DRY-Motiv enthalten ist, wurden die Aminosäuresequenzen der PLDs von *Z. mays* [61] mithilfe des Sequenzalignment-Werkzeugs MAFFT (*m*ultiple *a*lignment using *f*ast *f*ourier *t*ransform) [128] mit der Aminosäuresequenz von AtPLD α 1 verglichen. Die untersuchten PLDs enthalten das DRY-Motiv (s. Supplement Abb. 37) und sind somit potenziell dazu in der Lage mit der G α -Untereinheit zu interagieren. Das DRY-Motiv der PLD α s von *Z. mays* besteht aus den Aminosäuren Glutaminsäure (E), Arginin (R; in PLD α 5 Histidin [H]) und Phenylalanin (F) und ist damit homolog zu dem bereits charakterisierten G α -Bindemotiv aus tierischen GPCRs (z. B. Rhodopsin [*Gallus gallus*; Swiss-Prot Zugriffsnummer P2232]; s. Abb. 14A; [62, 129]). Das DRY-Motiv ist in der C-terminalen Hälfte der PLD α s lokalisiert (s. Abb. 14A). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die PLDs von *Z. mays* über das DRY-Motiv an CT2 binden und die GTPase-Aktivität positiv beeinflussen können.

ZmPLD α 1 und ZmPLD α 2 wurden aufgrund der phylogenetischen Nähe und der Expressionsmuster für die weitere Analyse ausgewählt. Um entscheiden zu können welche PLDs weiter analysiert werden sollen, wurden verschiedene *in silico*-Analysen durchgeführt. Zunächst wurde eine Phylogenie der Aminosäuresequenzen [61, 72] der ZmPLDs und AtPLD α 1 mithilfe von *NGPhylogeny.fr* [130] erstellt. Das Phylogramm zeigt, dass alle ZmPLD α s (ZmPLD α 1 bis ZmPLD α 8) gemeinsam mit AtPLD α 1 in einer monophyletischen Gruppe (Klade) gruppiert sind. Im Gegensatz dazu gruppieren ZmPLD β , ZmPLD δ 1 bis -3 in einer separaten Klade, ZmPLD ζ stellt die Außengruppe dar (s. Abb. 13). Aufgrund der phylogenetischen Nähe wurden mRNA-Sequenzierungsdaten von ZmPLD α 1 bis -8 von verschiedenen Geweben [32] analysiert um die Transkriptionslevel vergleichen zu können (s. Supplement Abb. 38). Es wurden Daten von denjenigen Geweben analysiert, die für die Entwicklung der vegetativen und generativen Merkmale der Pflanzen von Bedeutung sind und welche den in den vorhergehenden Kapiteln mikroskopisch untersuchten entsprechen. Die Auswertung der Daten zeigte, dass in allen Geweben, außer in Antheren, die Transkription der mRNA von ZmPLD α 1 und ZmPLD α 2 gegenüber den restlichen ZmPLDs überwiegt. In den Antheren werden überwiegend ZmPLD α 3 und -4 transkribiert. Die mRNA von ZmPLD α 5 zeigt ein geringeres Expressionslevel als ZmPLD α 1 und ZmPLD α 2 und wurde daher nicht berücksichtigt. Aufgrund der

phylogenetischen Nähe und des Expressionsmusters wurden ZmPLD α 1 und ZmPLD α 2 für die weitere Analyse ausgewählt.

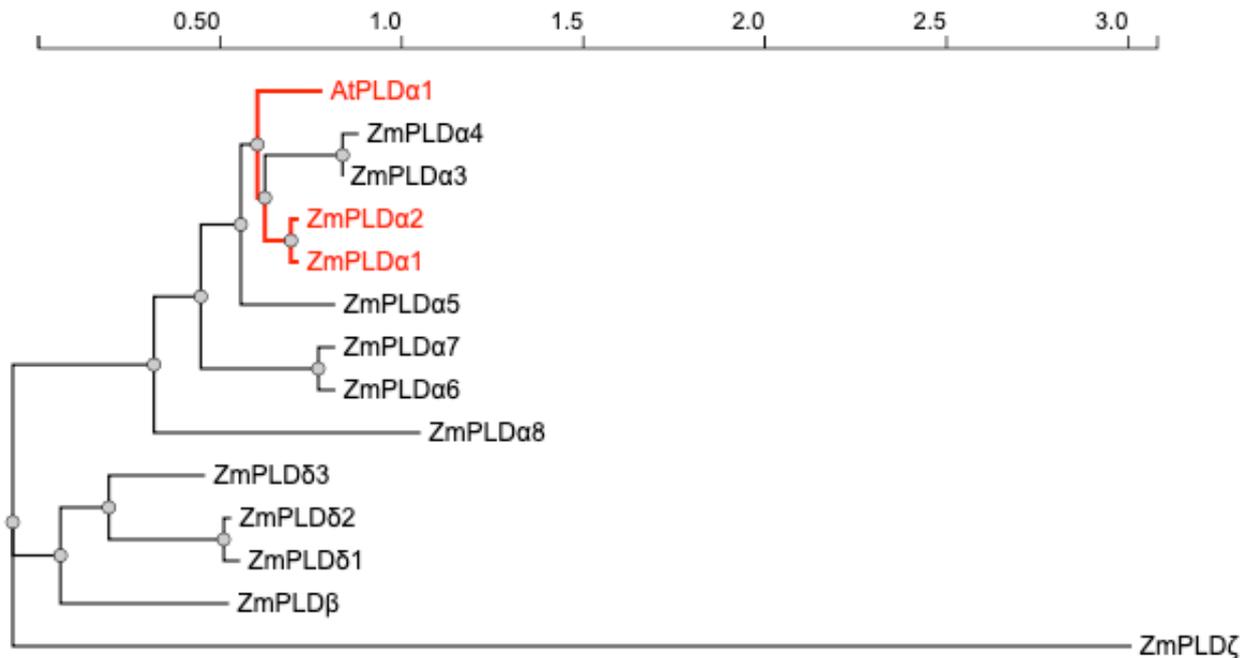


Abbildung 13: Phylogramm von AtPLD α 1 und der PLDs aus *Z. mays*

Die phylogenetische Analyse der Phospholipasen D von *Z. mays* zeigte, dass alle ZmPLD α s gemeinsam mit AtPLD α 1 (rot markiert) gruppierten. ZmPLD β , ZmPLD δ 1 bis -3 gruppierten in einer separaten Klade, ZmPLD ζ stellte die Außengruppe dar. Die engste Verwandtschaft zu AtPLD α 1 zeigten ZmPLD α 1 bis ZmPLD α 5. Die rot markierten ZmPLD α s wurden für die weitere Analyse ausgewählt. Der Maßstabsbalken stellt die Astlänge dar. Das Phylogramm wurde mithilfe von *NGPhylogeny.fr* [130] erstellt.

ZmPLD α 1 ist ein Homolog von AtPLD α 1 und eine Substitution des DRY-Motivs erhält mutmaßlich die Tertiärstruktur des Proteins. Die Aminosäuresequenz von ZmPLD α 1 entspricht zu 78,09 % der von AtPLD α 1 und ist damit dieser PLD α ähnlicher als ZmPLD α 2 (77,30 %). Die Analyse mithilfe des Programms *Phyre2* [131] zeigte, dass 95 % der Aminosäurereste von ZmPLD α 1 mit einer Zuverlässigkeit von über 90 % auf die von AtPLD α 1 modelliert werden konnten. Daher wurden weitere *in silico*-Analysen mit der Aminosäuresequenz von ZmPLD α 1 durchgeführt. Die Analyse dieser Sequenz mithilfe von *InterPro* [132] und *ProDom* [133] zeigte eine N-terminale C2-Domäne (s. Abb. 14A). Diese Domäne ist für die Bindung von Ca²⁺-Ionen bzw. Phospholipiden verantwortlich [129]. Des Weiteren wurde mithilfe von *ProDom* [133] eine PIP₂-Bindungsdomäne gefunden (s. Abb. 14A [129]). Mithilfe von *ScanProsite* [98] wurde das duplizierte HKD-Motiv gefunden, das für die enzymatische Aktivität verantwortlich ist [134]. Die Domänenstruktur von ZmPLD α 1 entspricht damit der bereits veröffentlichten Domänenstruktur AtPLD α 1 [135]. Des Weiteren wurde mithilfe von *SWISS-MODEL* [136-140] die Aminosäuresequenz von ZmPLD α 1 auf die bereits veröffentlichte Struktur von AtPLD α 1

[141] modelliert um eine mögliche 3D-Struktur des Proteins zu erhalten (GQME-Wert: 0,88; s. Abb. 14B). Die erhaltenen Daten indizieren, dass ZmPLD α 1 ein Homolog von AtPLD α 1 ist. Auf dieses Modell wurde mithilfe von *PyMOL* eine Sequenz von ZmPLD α 1 modelliert, in welcher die Aminosäuren ERF des DRY-Motivs zu GAA verändert wurden (s. Abb. 14C). Diese Substitution des DRY-Motivs wurde bereits von Gookin *et al.* verwendet [71] und wird im Folgenden Δ DRY genannt. Der Vergleich der Sekundärstrukturen dieses Modells mit der WT-Variante zeigte, dass nur die ungeordneten Regionen des Δ DRY-Modells eine potenziell veränderte Struktur aufweisen, nicht jedoch die Sekundärstrukturen und somit auch nicht die Tertiärstruktur (s. Abb. 14D). Dies impliziert, dass die substituierte Variante von ZmPLD α 1 wahrscheinlich funktional ist.

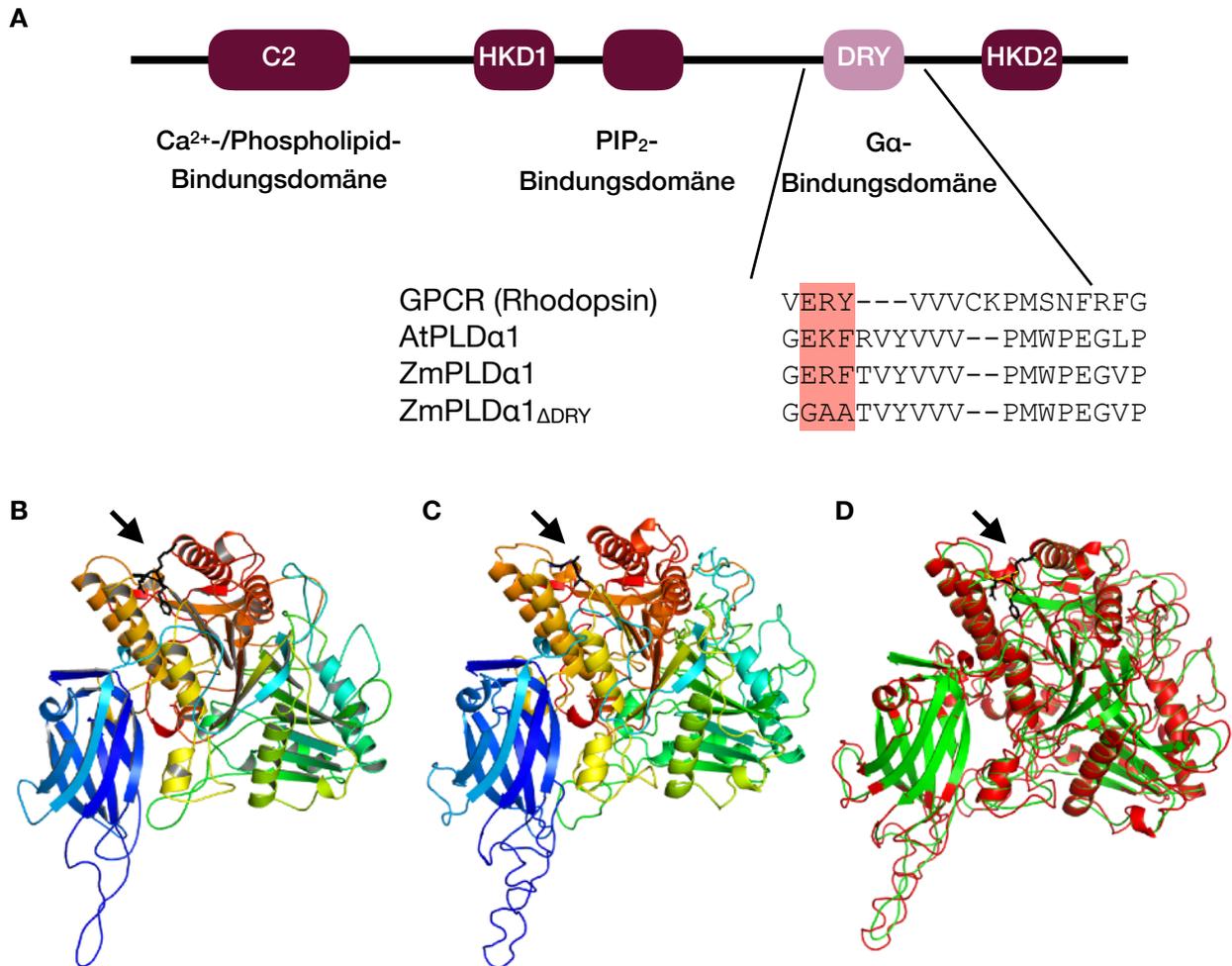


Abbildung 14: *In silico*-Analysen von ZmPLDα1 zeigten, dass das DRY-Motiv für die Bindung an Ga verantwortlich sein kann

A ZmPLDα1 besitzt eine konservierte Ga-Bindungsdomäne. Die *in silico*-Analyse der Aminosäuresequenz von ZmPLDα1 zeigte eine C2-Domäne [132, 133], eine PIP₂-Bindungsdomäne [133] und das duplizierte HKD-Motiv [98]. Das für die Bindung an die Ga-Untereinheit verantwortliche DRY-Motiv befindet sich im C-terminalen Teil der Sequenz. Die Domänenstruktur von ZmPLDα1 entspricht der Struktur von AtPLDα1. Die Analyse der Aminosäuresequenzen des DRY-Motivs (rot hinterlegt) verschiedener Organismen zeigte, dass das DRY Motiv von ZmPLDα1 und AtPLDα1 dem von Rhodopsin (*Gallus gallus*; Swiss-Prot Zugriffsnummer P2232) entspricht [62]. Außerdem ist die Aminosäuresequenz von ZmPLDα1_{ΔDRY} dargestellt, in welcher das die Aminosäuren ERF des DRY-Motivs zu GAA substituiert wurden. **B Das Modell der 3D-Struktur von ZmPLDα1.** Die Position des DRY-Motivs ist durch einen schwarzen Pfeil markiert, die Aminosäuren ERF sind als Stäbchenmodell dargestellt. **C Das Modell der 3D-Struktur von ZmPLDα1_{ΔDRY}.** Die Position des ehemaligen DRY-Motivs ist durch einen schwarzen Pfeil markiert, die Aminosäuren GAA sind als Stäbchenmodell dargestellt. **D Überlagerung der 3D-Strukturen von ZmPLDα1 (grün) und ZmPLDα1_{ΔDRY} (rot).** Die Überlagerung zeigt, dass die Substitution des DRY-Motivs zu GAA die Sekundärstrukturen nicht beeinflusst hat. Die Position des DRY-Motivs ist durch einen schwarzen Pfeil markiert, die Aminosäuren des Motivs sind als Stäbchenmodell dargestellt.

Um untersuchen zu können, ob das DRY-Motiv der PLDα die Bindung an die Gα-Untereinheit beeinflusst, wurde dieses substituiert. Veröffentlichte Daten zeigen, dass die Substitution des DRY-Motivs die Interaktion von AtPLDα1 mit der Gα-Untereinheit verhinderte [62, 71]. Um eine geeignete Negativ-Kontrolle verwenden zu können, wurden für die folgenden Experimente die Aminosäuren des DRY-Motivs (ERF) durch GAA substituiert. Dies geschah teilweise im Rahmen der Abschlussarbeit von Vasco Köhling (2018, [142]). Dafür wurde RNA aus ca. 2 cm langen Maiskolben gewonnen. Daraus wurde cDNA synthetisiert, welche als Matrize für die Amplifikation der offenen Leserasters (*open reading frames*, ORFs) ohne Stoppcodon von *PLDα1* und *PLDα2* genutzt wurde. Diese *kodierende Sequenz* (*coding sequence*, CDS) wurde mittels *Gateway*-Klonierung in den *Entry*-Vektor pDONR221 kloniert (s. Tab. 45). Mithilfe von *Site Directed Mutagenesis* wurden Konstrukte von *PLDα1* und *PLDα2* hergestellt, in welchen die für das DRY-Motiv kodierenden Basen zu denen für GAA geändert wurden (s. Tab. 45; [142]). Diese Konstrukte waren für die Translation der substituierten Proteine verantwortlich, die im Folgenden PLDα1_{ΔDRY} und PLDα2_{ΔDRY} genannt werden.

Die untersuchten PLDαs und deren substituierte Varianten lokalisierten im Cytosol und an der PM. Um zunächst die subzelluläre Lokalisierung zu analysieren, wurden die untersuchten Phospholipasen jeweils in binäre *Destination*-Vektoren (pABindmCherry; zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Rüdiger Simon, *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*; verwendet in [143]) subkloniert (s. Tab. 45). Die Konstrukte bewirken eine C-terminale translationale Fusion der Phospholipasen mit mCherry. Es wurde bereits veröffentlicht, dass die stabile Transformation C-terminaler Fusionskonstrukte den Phänotyp von *A. thaliana* PLDα1-Mutanten komplementiert und daher als funktional angesehen wird [144]. Nach der Überprüfung der Vektoren durch Sequenzierung wurden *A. tumefaciens* GV3101-Zellen mit jeweils einem der Konstrukte transformiert. Die so erzeugten *A. tumefaciens* GV3101 pABindmCherry PLDα-Stämme wurden für die transiente Transformation von *N. benthamiana*-Blättern genutzt. Mithilfe des CLSM wurde die subzelluläre Lokalisierung der untersuchten Phospholipasen in epidermalen Blattzellen analysiert. Die untersuchten PLDα-mCherry-Proteine und deren substituierte Varianten zeigten eine Lokalisierung im Cytosol und der Zellperipherie, nicht jedoch im Nukleus (s. Abb. 15). Die Lokalisierung in der Zellperipherie wird als Membranständigkeit interpretiert. Diese Lokalisierung stimmte mit der *in silico*-Analyse überein. Diese sagte eine Assoziation von ZmPLDα1 und ZmPLDα2 mit der Membran (Analyse mit *InterPro* [132]) bzw. eine cytosolische Lokalisierung vorher (Analyse mit *PredictProtein* [94]) vorher. Die Membranständigkeit kann durch *Sites*, die eine Myristoylierung erlauben (Analyse mit *PredictProtein* [94]), erklärt werden. In bereits veröffentlichten Studien zeigte AtPLDα1 die gleiche subzelluläre Lokalisierung [144]. Daraus wurde geschlossen, dass die Konstrukte für die folgenden mikroskopischen Experimente verwendet werden konnten.

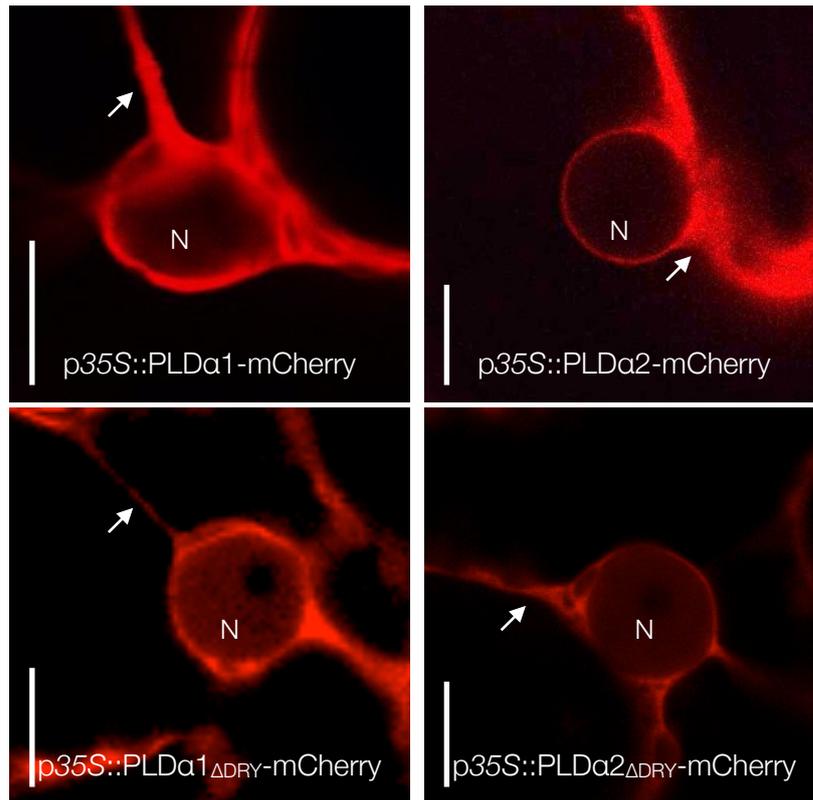


Abbildung 15: PLDαs und deren substituierte Varianten lokalisierten an der Membran und im Cytosol

Die zwei untersuchten PLDαs und deren substituierte Varianten zeigten eine Lokalisierung an der Membran und im Cytosol (→) der Zelle. Das schwache Signal im Nucleus (N) stellte ein Artefakt dar, das durch die perinukleäre Lokalisation hervorgerufen wurde. Der Maßstabsbalken zeigt 10 µm an.

Ein FRET AB-Assay wurde durchgeführt, um die putative Interaktion von CT2 mit den Phospholipasen zu untersuchen. Mithilfe bestimmter Mikroskopietechniken ist es möglich Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen [145]. Eine dieser Methoden nutzt den *E*rster-Resonanzenergieübertragung (FRET; [146]). FRET basiert auf der Tatsache, dass ein angeregtes Molekül (*Donor*) Energie auf ein anderes Molekül (*Akzeptor*) übertragen kann, wenn diese Moleküle sich in einer bestimmten räumlichen Nähe (bis 10 nm) zueinander befinden [147, 148]. Der mithilfe eines konfokalen CLSMs durchgeführte semi-*in vivo* FRET *acceptor bleaching*-Assay (FRET AB) nutzt dieses Phänomen und kann mithilfe von transient transformierten Zellen von *N. benthamiana*-Blättern durchgeführt werden. Für dieses Experiment wurde CT2 C-terminal mit GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP; Donor) translational fusioniert (CT2-GFP; pABindGFP CT2; zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Rüdiger Simon, *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*; verwendet in [143]; s. Tab. 45). Die erstellten mCherry-Konstrukte der PLDαs und deren substituierten Varianten sind für die Translation der Akzeptor-Proteine verantwortlich. Des Weiteren wurde CT2 mit GFP und mCherry translational fusioniert (CT2-GFP-mCherry; pABindFRET CT2; zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Rüdiger Simon, *Heinrich-Heine-Uni-*

versität Düsseldorf; verwendet in [143]). Befindet sich GFP in entsprechender Nähe zu mCherry, kann Energie des angeregten GFP auf mCherry übertragen werden. Wird der Akzeptor durch ein *Bleaching* zerstört, kann die Energie nicht mehr übertragen werden und die meßbare Emission des Donors nimmt zu. Die Emission des Donors vor dem *Bleaching* des Akzeptors wurde mit der Emission nach dem *Bleaching* verglichen und auf diese Weise konnte die *FRET-Effizienz* berechnet werden. Die FRET-Effizienz ließ einen Rückschluss auf den Abstand der Fluorophore zueinander zu. Der Unterschied der FRET-Effizienz bzw. des Abstandes der Proteine zueinander in Abhängigkeit des DRY-Motivs wurde in diesem Experiment zur Analyse der putativen Interaktion von CT2 mit den untersuchten PLDas genutzt.

Es war möglich intramolekulares FRET zu messen und den putativen Abstand der Fluorophore zueinander zu bestimmen. Die translationale Fusion von GFP mit mCherry stellt in einer Zelle einen der Zustände dar, die den geringstmöglichen Abstand der beiden Fluorophore zueinander erlauben. Die Zellen, welche CT2-GFP-mCherry exprimierten, zeigten in Bereichen der Zellperipherie eine intramolekulare FRET-Effizienz von $E_{\text{FRET(intra)}}=17,06\%$ ($n_{\text{intra}}=141$; s. Abb. 16). Das Ergebnis ist vergleichbar mit bereits veröffentlichten Daten des verwendeten Vektors [143]. Mithilfe der FRET-Effizienz und des Förster-Radius R_0 (in Å) der verwendeten Fluorophore ist es möglich den Abstand R (in Å) dieser zueinander zu berechnen (s. Formel 1). R_0 ist ein Parameter der von den photophysikalischen Eigenschaften der verwendeten Fluorophore abhängig ist. Diese beinhalten die Quantenausbeute ϕ des Donors, die Absorption des Akzeptors, ein Integral der sich überlappenden Spektren der Fluorophore und den Orientierungsfaktor κ [149]. Mithilfe von $R_0=52,88\text{ Å}$ [150] konnte der mittlere Abstand $R_{\text{intra}}=68,83\text{ Å}$ von GFP zu mCherry berechnet werden. Da GFP und mCherry ohne *Spacer* miteinander fusioniert wurden, war dieser berechnete Abstand höher als erwartet. Allerdings wird die FRET-Effizienz auch durch die Orientierung der Fluorophore zueinander beeinflusst [149], sodass der verwendete geringstmögliche Abstand nicht zwangsläufig die höchstmögliche FRET-Effizienz bewirkt. Dieses Ergebnis zeigte dennoch, dass mit dem gewählten Mikroskopie-Setup der FRET AB-Assay durchgeführt werden konnte.

$$R = R_0 \sqrt[6]{\frac{1}{E_{\text{FRET}}} - 1}$$

Formel 1: Der Abstand R (in Å) der verwendeten Fluorophore zueinander konnte mithilfe des Förster-Radius R_0 und der FRET-Effizienz E_{FRET} der Fluorophore berechnet werden [149]

Der Förster Radius von GFP und mCherry beträgt $R_0=52,88\text{ Å}$ [150], die FRET-Effizienz E_{FRET} ergibt sich aus dem Unterschied der Emission des Donors vor und nach dem *Bleaching* des Akzeptors.

Die FRET-Effizienz zwischen CT2-GFP und PLD α -mCherry war bei Vorhandensein des DRY-Motivs höher. Die folgenden Untersuchungen der putativen Protein-Protein-Interaktionen fanden an der Zellperipherie statt. Die Kombination von CT2-GFP mit PLD α 1-mCherry zeigte in diesem Assay eine FRET-Effizienz von $E_{\text{FRET(CT2/PLD}\alpha\text{1)}}=5,32\%$ ($n_{\text{CT2/PLD}\alpha\text{1}}=186$; s. Abb. 16). Das Ergebnis des Assays mit CT2-GFP/PLD α 1 Δ DRY-mCherry zeigte eine deutliche Reduktion der FRET-Effizienz auf $E_{\text{FRET(CT2/PLD}\alpha\text{1}\Delta\text{DRY)}}=0,60\%$ ($n_{\text{CT2/PLD}\alpha\text{1}\Delta\text{DRY}}=121$; s. Abb. 16). Der Unterschied ist signifikant ($p_{\text{PLD}\alpha\text{1}}<0,0001$; s. Supplement Tab. 6). In diese Datensätze flossen teilweise die von Vasco Köhling gewonnenen Daten [142] ein. Die Ergebnisse der mit den Kombinationen aus CT2-GFP und PLD α 2-mCherry bzw. mit PLD α 2 Δ DRY-mCherry durchgeführten Assays zeigten den gleichen Trend (s. Abb. 16). Das Fehlen des DRY-Motivs führte zu einer signifikanten ($p_{\text{PLD}\alpha\text{2}}<0,0001$; s. Supplement Tab. 6) Reduktion der FRET-Effizienz von $E_{\text{FRET(CT2/PLD}\alpha\text{2)}}=4,05\%$ ($n_{\text{CT2/PLD}\alpha\text{2}}=141$) auf $E_{\text{FRET(CT2/PLD}\alpha\text{2}\Delta\text{DRY)}}=1,05\%$ ($n_{\text{CT2/PLD}\alpha\text{2}\Delta\text{DRY}}=108$). Die getesteten Proteinkombinationen wiesen eine hohe Streuung der Datenpunkte auf, was durch die unterschiedlichen Zustände des Systems der lebenden Zelle und die damit verbundenen unterschiedlichen Abstände der Fluorophore zueinander erklärt wird. Auffällig ist auch das Vorhandensein von negativen FRET-Effizienzen im Falle aller untersuchten Kombinationen von CT2-GFP/PLD α -mCherry. Eine negative FRET-Effizienz deutet auf spontane Fluktuation hin [151]. Dies bedeutet, dass der Mittelwert der gemessenen Emission vor dem Bleaching höher war als die Emission nach dem Bleaching und kann durch Diffusion der Fluorophore hervorgerufen werden. Insgesamt lässt sich dennoch sagen, dass das Vorhandensein des DRY-Motivs in einer PLD α die messbare FRET-Effizienz in Bezug auf CT2-GFP jeweils signifikant erhöhte.

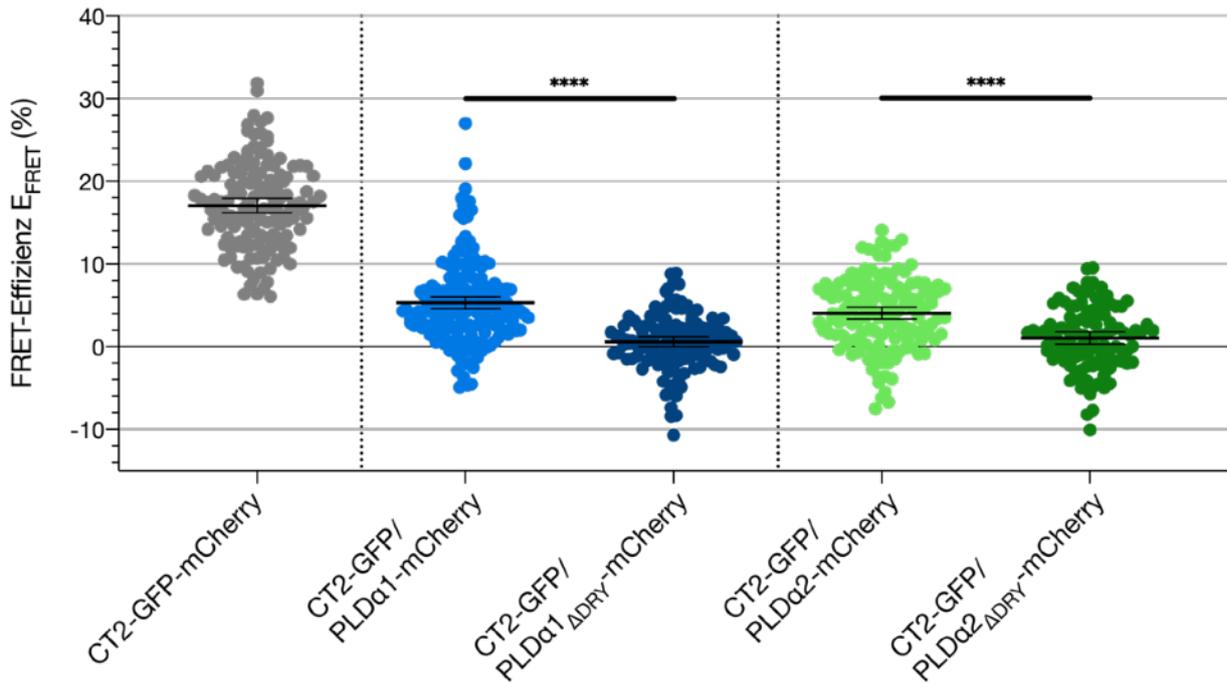


Abbildung 16: Streudiagramm der gemessenen FRET-Effizienzen verschiedener Proteinkombinationen

Der FRET AB-Assay wurde durchgeführt um die putative Interaktion zwischen CT2 und PLD α 1 bzw. PLD α 2 zu untersuchen. Alle gemessenen FRET-Effizienzen wurden für das Streudiagramm verwendet. Die Positivkontrolle CT2-GFP-mCherry zeigte eine FRET-Effizienz von $E_{\text{FRET(intra)}}=16,78$ % ($n_{\text{intra}}=141$). Die untersuchten Kombinationen von CT2-GFP/PLD α 1-mCherry und CT2-GFP/PLD α 2-mCherry zeigten FRET-Effizienzen von $E_{\text{FRET(CT2/PLD}\alpha\text{1)}}=5,32$ % ($n_{\text{CT2/PLD}\alpha\text{1}}=186$) und $E_{\text{FRET(CT2/PLD}\alpha\text{2)}}=4,05$ % ($n_{\text{CT2/PLD}\alpha\text{2}}=141$). Die Werte sind signifikant höher ($p_{\text{PLD}\alpha\text{1}}<0,0001$ und $p_{\text{PLD}\alpha\text{2}}<0,0001$) als die der jeweiligen Substitutionsvariante ($E_{\text{FRET(CT2/PLD}\alpha\text{1}\Delta\text{DRY)}}=0,60$ %; $E_{\text{FRET(CT2/PLD}\alpha\text{2}\Delta\text{DRY)}}=1,05$ %). Diese Ergebnisse wurden als Interaktion zwischen CT2 und den PLDas interpretiert. Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an.

Das DRY-Motiv ermöglichte eine geringere räumliche Distanz und damit eine Interaktion der PLDas mit CT2. Mithilfe der gemessenen FRET-Effizienzen und der oben genannten Formel 1 war es möglich die Distanz der Fluorophore zueinander (*range*, R) zu bestimmen. Der mittlere Abstand der Fluorophore von CT2-GFP/PLD α 1-mCherry zueinander betrug $R_{\text{PLD}\alpha\text{1}}=85,44$ Å, bei der Kombination von CT2-GFP/PLD α 1 Δ DRY-mCherry betrug der mittlere Abstand $R_{\text{PLD}\alpha\text{1}\Delta\text{DRY}}=123,93$ Å. Auch die Kombination CT2-GFP/PLD α 2-mCherry zeigte einen geringere räumliche Distanz als die entsprechende Substitutionsvariante ($R_{\text{PLD}\alpha\text{2}}=89,62$ Å; $R_{\text{PLD}\alpha\text{2}\Delta\text{DRY}}=112,81$ Å). Dies indiziert, dass eine geringere räumliche Distanz durch das Vorhandensein des DRY-Motivs bedingt wurde. Dies wurde als Indikation auf eine Interaktion zwischen CT2 und PLD α 1 bzw. PLD α 2 im Cytoplasma bzw. an der PM in Abhängigkeit des DRY-Motivs interpretiert. Im Verlauf der Arbeit wurde versucht dieses Ergebnis mit weiteren Versuchen zu verifizieren.

Zur unabhängigen Überprüfung der FRET AB-Ergebnisse wurde ein ratiometrischer BiFC-Assay durchgeführt. *Ratiometrische Bimolekulare Fluoreszenz Komplementations-Assays* (*ratiometric bimolecular fluorescence complementation-Assays*, rBiFC-Assays) dienen, wie auch der FRET AB-Assay, dazu, die räumliche Nähe und damit eine potenzielle Interaktion zweier Proteine zu untersuchen. Der rBiFC-Assay basiert auf der Tatsache, dass ein in zwei Teile gespaltenes YFP-Molekül bei geringer räumlicher Distanz rekonstituieren kann und damit die Fluoreszenzeigenschaften des Proteins wiederhergestellt werden. Für den Assay wurde die CDS (ohne Stoppcodon) von CT2, PLD α 1 und PLD α 2, sowie deren jeweilige DRY-Motiv-Substitutionsvarianten, in Kooperation mit Sabrina Walz [152], mithilfe der *Gateway*-Klonierung in den Vektor pBiFCt-2in1-CC ([153]; s. Tab. 45) subkloniert. Dabei wurde die CDS von CT2 jeweils mit der CDS einer PLD α bzw. deren Substitutionsvariante kombiniert. Die Subklonierung erzeugte ORFs, welche die translationale C-terminale Fusion der Proteins mit jeweils der N-terminalen bzw. C-terminalen Hälfte von YFP zur Folge hatten (s. Abb. 17A). Die erzeugten Vektoren (s. Tab. 45) wurden zur Überprüfung sequenziert und in *A. tumefaciens* GV3101 transformiert. Die erzeugten Stämme wurden für die transiente Transformation von *N. benthamiana*-Blättern genutzt, Stücke von diesen wurden für die Analyse mittels CLSM genutzt. Die Analysen wurden ebenfalls in Bereichen der Zellperipherie durchgeführt.

Die Integration und Expression der verwendeten Expressionskassetten wurde durch ein RFP-Signal bestätigt. In Abbildung 17B ist zu erkennen, dass die vier untersuchten Proteinkombinationen (CT2-nYFP und PLD α 1-cYFP, CT2-nYFP und PLD α 1 Δ DRY-cYFP, CT2-nYFP und PLD α 2-cYFP, CT2-nYFP und PLD α 2 Δ DRY-cYFP) jeweils ein RED FLUORESCENT PROTEIN (RFP) -Signal zeigten. Dies verdeutlichte, dass die Integration der Expressionskassette zwischen *left border* (LB) und *right border* (RB) in das Genom von *N. benthamiana* erfolgreich war, ebenso die Expression von RFP mithilfe des 35S-Promoters. Dies lässt darauf schließen, dass die Expression der flankierenden Bereiche, also der untersuchten Fusionsproteine, ebenfalls stattgefunden hat (vgl. Abb. 17A).

Der rBiFC-Assay bestätigte die Ergebnisse des FRET AB-Assays und unterstützte die These der Interaktion zwischen CT2 und PLD α s. Die Kombinationen von CT2-nYFP mit PLD α 1-cYFP bzw. mit PLD α 2-cYFP zeigten zusätzlich zu dem RFP-Signal ein YFP-Signal (s. Abb 17B). Dies ließ den Schluss zu, dass sich die Hälften des YFPs in räumlicher Nähe zueinander befanden und daher mutmaßlich miteinander interagierten. Dieses YFP-Signal war in den Bildern der substituierten Varianten nicht zu sehen (s. Abb. 17B). Die Quantifizierung bestätigte diese Ergebnisse (s. Abb. 17C). CT2-nYFP/PLD α 1-cYFP zeigte eine zum Signal von RFP relative Fluoreszenz von $F_{CT2/PLD\alpha1}=33,81\%$ ($n_{CT2/PLD\alpha1}=500$), während CT2-nYFP mit der substituierten Form von PLD α 1 ein relatives Fluoreszenzverhältnis von $F_{CT2/PLD\alpha1\Delta DRY}=2,01\%$

($n_{CT2/PLD\alpha1\Delta DRY}=500$) aufwies. Dieser Unterschied ist mit $p_{PLD\alpha1}<0,0001$ signifikant (s. Supplement Tab. 7). Der Unterschied von CT2-nYFP/PLD α 2-cYFP ($F_{CT2/PLD\alpha2}=36,50$ %; $n_{CT2/PLD\alpha2}=500$) zu CT2-nYFP/PLD α 2 Δ DRY-cYFP ($F_{CT2/PLD\alpha2\Delta DRY}=2,18$ %; $n_{CT2/PLD\alpha2\Delta DRY}=500$) ist ebenfalls signifikant ($p_{PLD\alpha2}<0,0001$; s. Supplement Tab. 7). In den Kombinationen mit den WT-Varianten der PLDas ist eine breite Streuung des Signals zu erkennen (7,46 % - 150,20 % bzw. 9,23 % - 172,20 %). Daraus wurde geschlossen, dass die räumliche Nähe der Proteine zueinander in unterschiedlichen Zellen und unterschiedlichen Bereichen einer Zelle variierte, ähnlich dem Ergebnis des FRET AB-Assays. Es ist außerdem zu erkennen, dass das YFP-Signal der Kombinationen von CT2-nYFP mit PLD α 1-cYFP bzw. mit PLD α 2-cYFP nicht nur an der Peripherie der Zellen, sondern auch im Cytoplasma lokalisierte (s. Abb. 17B). Im Nukleus der Zellen war kein Signal zu erkennen. Dies ist damit zu begründen, dass PLD α 1 und PLD α 2 keine Kernlokalisierung aufwiesen. Der Versuch unterstützte die These, dass CT2 mit den untersuchten PLDas im Cytosol und an der PM interagiert und dass diese Interaktion vom DRY-Motiv abhängig ist. Das Ergebnis ist vergleichbar mit bereits veröffentlichten Daten zu den Homologen aus *A. thaliana* [71]. Im Folgenden wurde der molekulare Effekt dieser Interaktion untersucht, um deren Bedeutung für die Pflanze aufzuklären.

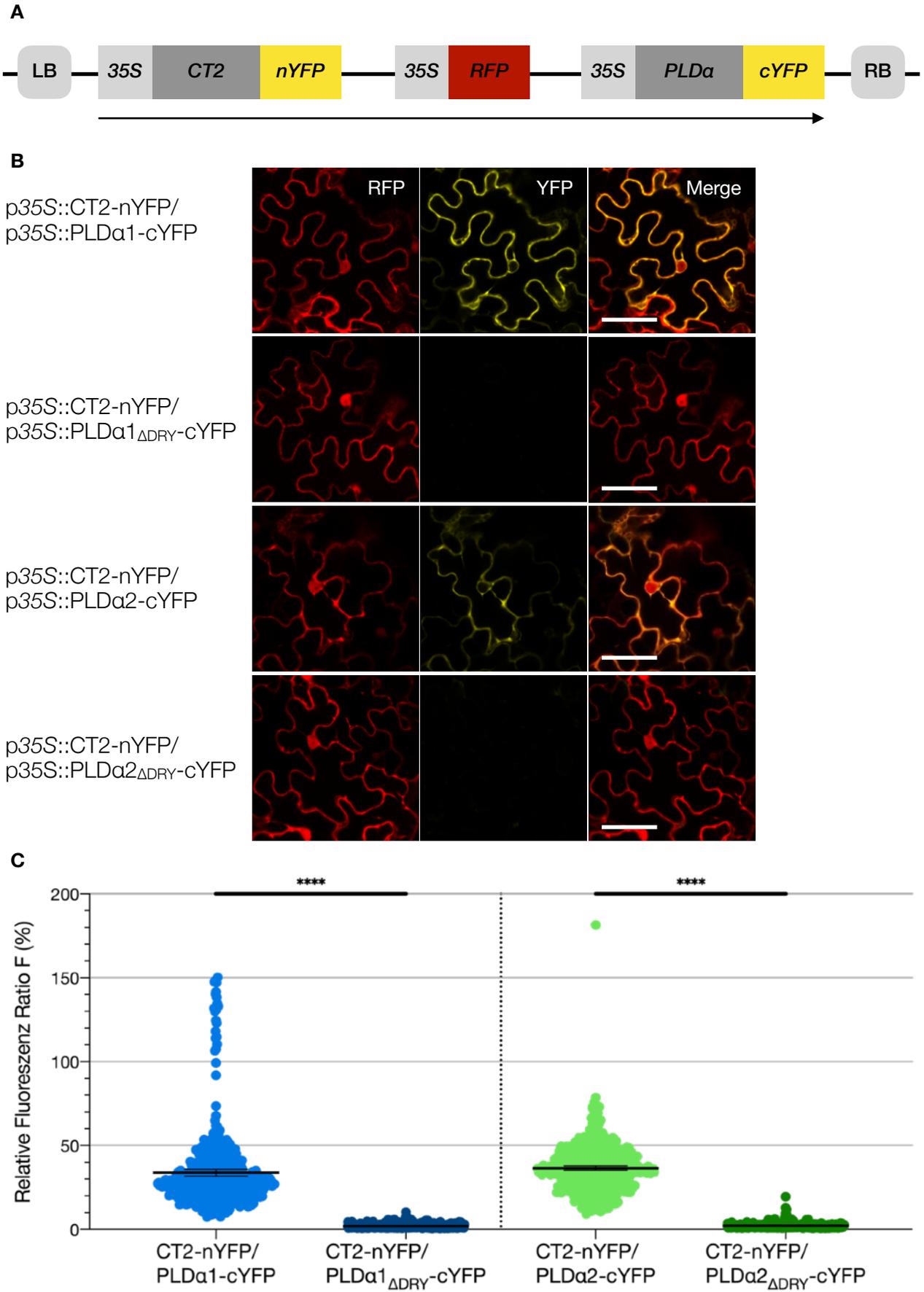


Abbildung 17: Der *rationetrische Bimolekulare Fluoreszenz Komplementations-Assay*

Abbildung 17: Der ratiometrische Bimolekulare Fluoreszenz Komplementations-Assay

Der *ratiometrische Bimolekulare Fluoreszenz Komplementations-Assay* wurde durchgeführt um die putative Interaktion zwischen CT2 und PLD α 1 bzw. PLD α 2 zu untersuchen. **A Schema der verwendeten Expressionskassette.** Zwischen Left Border (LB) und Right Border (RB) befinden sich die am 3'-Ende mit nYFP bzw. cYFP fusionierten CDS von CT2 bzw. der PLD α s unter Kontrolle des 35S-Promoters. Dazwischen befindet sich RFP, unter Kontrolle des 35S-Promoters. Der Pfeil gibt die Richtung der Transkription an. **B Aufnahmen von transient transformierten Epidermiszellen von *N. benthamiana*.** Es ist zu sehen, dass die Konstrukte ein Fluoreszenzsignal von RFP aufwiesen, die Integration in das Genom und die Expression also stattgefunden hatten. Zusätzlich zeigten die Kombination von CT2-nYFP mit PLD α 1-cYFP bzw. mit PLD α 2-cYFP ein YFP-Fluoreszenzsignal im Cytoplasma und an der PM, was als Interaktion der Proteine interpretiert wurde. Die Kombinationen von CT2-nYFP mit PLD α 1 Δ DRY-cYFP bzw. mit PLD α 2 Δ DRY-cYFP zeigten kein YFP-Fluoreszenzsignal, was unterstrich, dass die Interaktion vom DRY-Motiv der PLD α s abhängig war. Der Maßstabsbalken zeigt 50 μ m an. **C Ratiometrische Quantifizierung der gemessenen YFP-Signale.** Es ist zu sehen, dass die YFP-Signale im Vergleich zu dem Signal von RFP der Kombinationen von CT2-nYFP mit PLD α 1-cYFP ($F_{\text{PLD}\alpha 1}=33,81$ %; $n_{\text{PLD}\alpha 1}=500$) bzw. mit PLD α 2-cYFP ($F_{\text{PLD}\alpha 2}=36,50$ %; $n_{\text{PLD}\alpha 2}=500$) signifikant höher ($p_{\text{PLD}\alpha 1}<0,0001$; $p_{\text{PLD}\alpha 2}<0,0001$) waren als die der Kombinationen von CT2-nYFP mit PLD α 1 Δ DRY-cYFP ($F_{\text{PLD}\alpha 1\Delta\text{DRY}}=2,01$ %; $n_{\text{PLD}\alpha 1\Delta\text{DRY}}=500$) bzw. mit PLD α 2 Δ DRY-cYFP ($F_{\text{PLD}\alpha 2\Delta\text{DRY}}=2,18$ %; $n_{\text{PLD}\alpha 2\Delta\text{DRY}}=500$). Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an.

Um die biologische Signifikanz der Interaktion von CT2 mit den PLD α s zu erarbeiten, wurde ein *in vitro* GTPase-Assay durchgeführt. Bereits veröffentlichte Daten zeigen, dass AtPLD α 1 die GTPase-Aktivität von AtGPA1 erhöhte [62]. Um die biologische Signifikanz der Interaktion zwischen CT2 und den untersuchten PLD α s zu verstehen, wurde mittels eines GTPase-Assays überprüft, ob ZmPLD α 1 die GTPase-Aktivität von CT2 *in vitro* erhöhen kann. Dies würde zu verstehen helfen, wie die von CT2 vermittelte Signaltransduktion terminiert wird. Der GTPase-Assay basierte auf der Verschiebung des Absorptionsspektrums von MESG von 330 nm auf 360 nm in Anwesenheit von freiem Phosphat (P_i). Die Menge von P_i ließ einen Rückschluss auf die von CT2 umgesetzte Menge von GTP zu GDP + P_i zu. Für die Durchführung des Assays wurden His $_6$ -CT2 und PLD α 1-Strep (mithilfe des Vektors pASK-IBA3plus PLD α 1, Tab. 45) in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen heterolog exprimiert und mittels Affinitätschromatographie isoliert (s. Supplement Abb. 35, 39). In einem Zeitraum von 40 min wurde bei 25 °C mit jeweils einem zeitlichen Abstand von 30 sec die Absorption $A_{360\text{ nm}}$ gemessen. Um die Aktivität des heterolog produzierten His $_6$ -CT2 und damit dessen Funktionalität zu untersuchen, wurde die spontane Hydrolyse von GTP gemessen, sowie die Hydrolyse bei Vorhandensein von His $_6$ -CT2. Die gemessenen Werte konnten mithilfe der von Sabrina Walz [152] ermittelten Formel in die Menge des freien Phosphats P_i (in nmol) umgerechnet werden (s. Formel 2). Um den Einfluss von PLD α 1 auf die GTPase-Aktivität von CT2 zu untersuchen, wurde ebenfalls die Menge des freien Phosphats in der Anwesenheit von His $_6$ -CT2 und PLD α 1-Strep bestimmt.

$$P_i = \frac{A_{360nm}}{0,0078}$$

Formel 2: Die gemessenen Werte der Absorption bei 360 nm $A_{360\text{ nm}}$ konnten mithilfe dieser Formel in die Menge des freien Phosphats P_i (nmol) umgerechnet werden [152]

PLD α 1 erhöhte *in vitro* die GTPase-Aktivität von CT2. In Abbildung 18 sind die Werte des freien Phosphats P_i (in nmol) in Abhängigkeit der vergangenen Zeit (in min) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Menge des freien Phosphats in Anwesenheit von CT2 (im Vergleich zur spontanen Hydrolyse) schneller anstieg und dass nach 40 min ein um den Faktor 1,96 höherer Wert erreicht wurde. Dies zeigt, dass das isolierte His₆-CT2 eine katalytische Aktivität besaß. In Verbindung mit der Löslichkeit nach der Zentrifugation bei 100.000x *g* (s. Kapitel *CT2 interagiert nicht mit Mikrotubuli*) ließ dies auf eine native Faltung des Proteins schließen. Dies stimmt mit bereits veröffentlichten Daten über die Expression und Isolierung von CT2 überein [18]. Die Anwesenheit von PLD α 1-Strep steigerte die Zunahme und den innerhalb von 40 min erreichten Wert zusätzlich. Die Menge des insgesamt frei gewordenen P_i war bei Anwesenheit von PLD α 1-Strep zusätzlich um den Faktor 1,47 erhöht. Um die Daten weiter zu analysieren, wurde auf diese mithilfe von *PRISM* das Modell einer *Ein-Phasen-Assoziation* in Form von Formel 3 angewandt (s. Abb. 18, Tab. 1). Es wurde angenommen, dass das *Plateau P* für die Reaktionen gleich ist ($P=19,91$). Mithilfe dieser Formel ließ sich für die drei Reaktionen die *Ratenkonstante k* bestimmen. Die Ratenkonstante *k* ist ein Maß für die Geschwindigkeit einer Reaktion [154]. Die Ratenkonstante der spontanen Hydrolyse $k_{\text{Hyd.}}=0,009774$ war kleiner als die Ratenkonstante der Reaktion mit His₆-CT2 $k_{\text{CT2}}=0,02080$. Die Ratenkonstante der Reaktion mit His₆-CT2 und PLD α 1-Strep war wiederum erhöht auf $k_{\text{CT2/PLD}\alpha 1}=0,04345$. Dies führte zu dem Schluss, dass die Anwesenheit von PLD α 1 die GTPase-Aktivität von CT2 deutlich erhöhte und bestätigte die These, dass eine PLD α als GAP für CT2 wirken kann. PLD α s können daher für die Terminierung der G α -abhängigen Signaltransduktion in *Z. mays* verantwortlich sein.

$$y = y_0 + (P - y_0) * (1 - e^{-k*x})$$

Formel 3: Angewandte Formel der Ein-Phasen-Assoziation

Die Menge des freien Phosphats P_i ist abhängig von der vergangenen Zeit x (min). y₀ beschreibt dabei die Menge des freien Phosphats P_i zum Zeitpunkt 0, P das Plateau und k die Ratenkonstante.

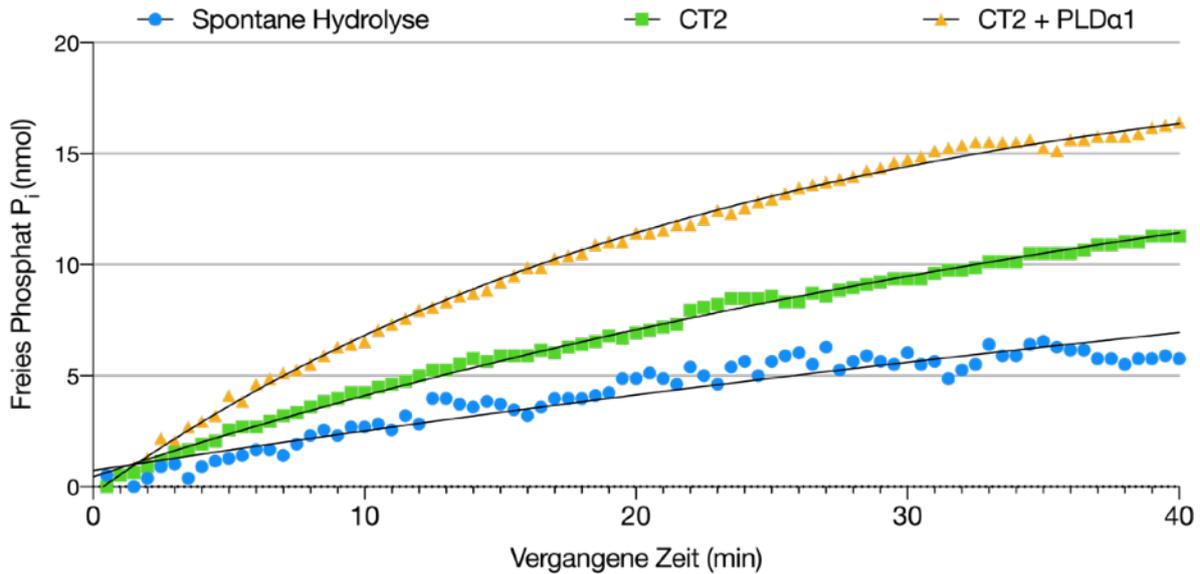


Abbildung 18: PLDα1 erhöhte *in vitro* die GTPase-Aktivität von CT2

Die Menge des freien Phosphats in verschiedenen Reaktionen wurde durch Messung der Absorption bei 360 nm bestimmt. Es ist zu erkennen, dass die Anwesenheit von His₆-CT2 die nach 40 min durch spontane Hydrolyse freigewordene Menge von P_i erhöhte. Die zusätzliche Anwesenheit von PLDα1-Strep erhöhte diese Menge wiederum um den Faktor 1,47. Die Daten zeigen, dass PLDα1 die GTPase-Aktivität von CT2 erhöhte.

Tabelle 1: Funktionen, welche die Menge des freien Phosphats P_i in Abhängigkeit der Zeit beschreiben

Reaktion	Funktion der Ein-Phasen-Assoziation	R ² -Wert
Spontane Hydrolyse	$y=0,7295+(19,91-0,7295)*(1-e^{-0,009774*x})$	0,8960
His ₆ -CT2	$y=0,4442+(19,91-0,4442)*(1-e^{-0,02080*x})$	0,9956
His ₆ -CT2/PLDα1-Strep	$y=-0,3198+(19,91+0,3198)*(1-e^{-0,04345*x})$	0,9979

Der PA-Gehalt von WT- und CT2-LOF-Pflanzen zeigte keine signifikanten Unterschiede. Mithilfe von verschiedenen Experimenten konnten *in vitro* und semi-*in vivo* Evidenzen für eine Interaktion von CT2 mit den untersuchten PLDAs gesammelt werden. Phospholipasen D sind *in planta* für die Produktion des *second messengers* PA mitverantwortlich [122]. Veröffentlichungen zeigen, dass die Gα-Untereinheit die Aktivität der PLDAs inhibieren kann [62]. In einer Gα-LOF-Mutante könnte ein erhöhter PA-Gehalt für phänotypische Veränderungen der Pflanze verantwortlich sein [155, 156]. Um zu überprüfen, ob die fehlende Inhibition in CT2-LOF-Pflan-

zen eine Erhöhung des PA-Gehalts bewirkte, wurde dieser in jeweils drei WT- und CT2-LOF-Pflanzen gemessen (vgl. Abb. 19). Die Proben wurden im Labor von Prof. Dr. Ingo Heilmann an der *Martin Luther Universität Halle-Wittenberg* in Halle (Saale) analysiert. Als interne Kontrolle wurde zusätzlich der *Phosphatidylethanolamin* (*phosphatidylethanolamine*, PE) -Gehalt der Pflanzen gemessen. Die erhaltenen Daten der Quantifizierung des Gesamtlipidextraktes zeigten, dass der gemessene PE-Gehalt von CT2-LOF-Pflanzen ($m_{PE(ct2)}=0,086 \mu\text{g PE}\cdot\text{ml}^{-1}$ Blattmaterial) sich nicht signifikant von demjenigen von WT-Pflanzen ($m_{PE(WT)}=0,089 \mu\text{g PE}\cdot\text{ml}^{-1}$ Blattmaterial) unterschied ($p_{PE}=0,8214$; s. Abb. 19B; s. Supplement Tab. 8). Dies lässt darauf schließen, dass eventuelle Unterschiede des PA-Gehalts nicht durch unterschiedliche Behandlungen der Pflanzen zustande kamen. Jedoch unterschied sich auch der PA-Gehalt von CT2-LOF-Pflanzen ($m_{PA(ct2)}=0,021 \mu\text{g PA}\cdot\text{ml}^{-1}$ Blattmaterial) sich nicht signifikant von jenem von WT-Pflanzen ($m_{PA(WT)}=0,025 \mu\text{g PA}\cdot\text{ml}^{-1}$ Blattmaterial; $p_{PA}=0,4000$; s. Abb. 19C; s. Supplement Tab. 9). Diese Daten lassen nicht den Schluss zu, dass das Fehlen von CT2 eine signifikante Veränderung des PA-Gehalts bewirkte. Daher wurde begonnen die putative Interaktion von CT2 mit den untersuchten PLDas mithilfe genetischer Methoden zu untersuchen.

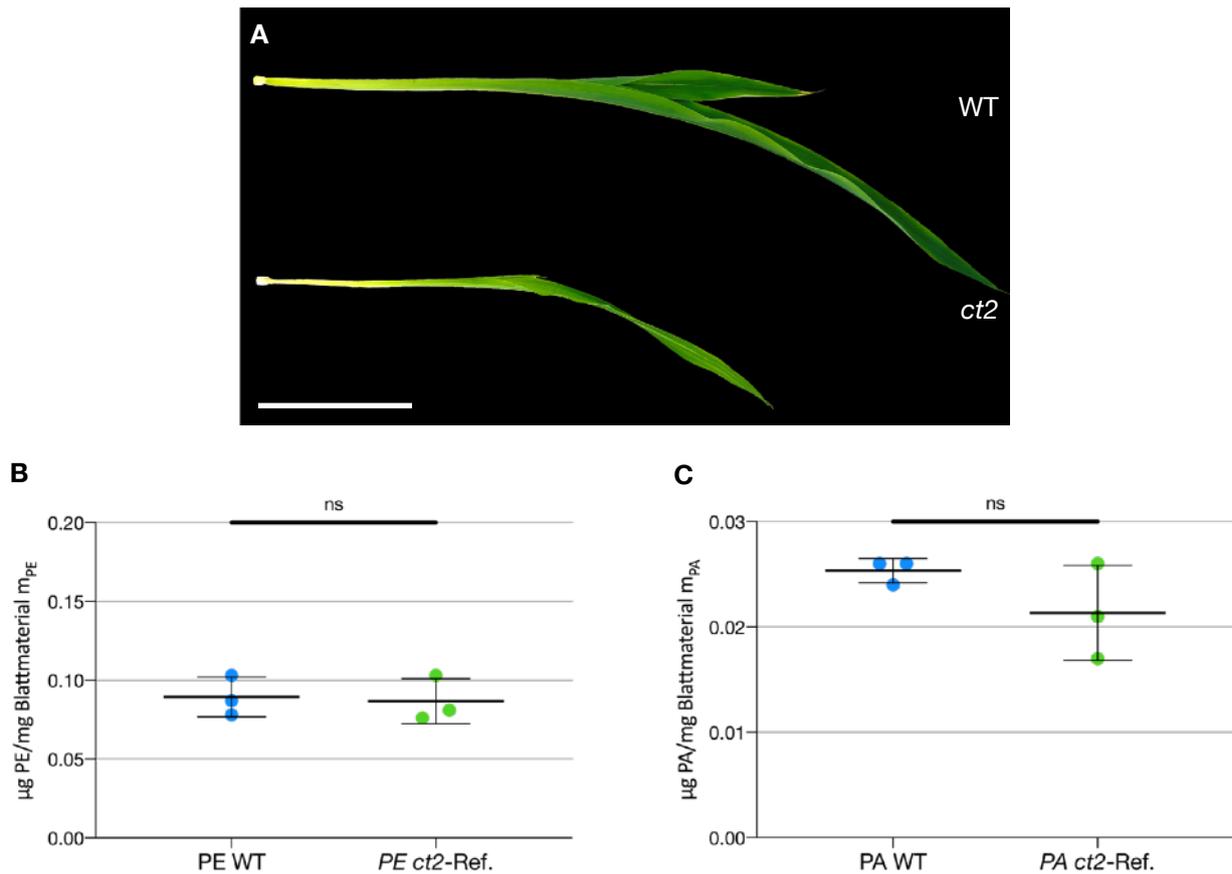


Abbildung 19: WT- und CT2-LOF-Pflanzen wiesen einen jeweils ähnlichen Gehalt verschiedener Phospholipide auf

A) Beispiel von Pflanzenmaterial, das für die Messung des Phosphatidsäuregehalts verwendet wurde. Der Maßstabsbalken entspricht 10 cm. B) Quantifizierung des PE-Gehalts von WT- und CT2-LOF-Pflanzen. Der PE-Gehalt von WT- ($m_{PE(WT)}=0,089 \mu\text{g PE}\cdot\text{ml}^{-1}$ Blattmaterial) und CT2-LOF-Pflanzen ($m_{PE(ct2)}=0,086 \mu\text{g PE}\cdot\text{ml}^{-1}$ Blattmaterial) unterschied sich nicht signifikant voneinander ($p_{PE}=0,8214$). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. C) Quantifizierung des PA-Gehalts von WT- und CT2-LOF-Pflanzen. Der PA-Gehalt von WT- ($m_{PA(WT)}=0,025 \mu\text{g PA}\cdot\text{ml}^{-1}$ Blattmaterial) und CT2-LOF-Pflanzen ($m_{PA(ct2)}=0,021 \mu\text{g PA}\cdot\text{ml}^{-1}$ Blattmaterial) unterschied sich nicht signifikant voneinander ($p_{PA}=0,4000$). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Zur Analyse des Einflusses der PLDas auf die gesamte Maispflanze wurden potenzielle *loss-of-function*-Mutanten der PLDas ausgewählt. Um den Einfluss der PLDas auf den Phänotyp von *Z. mays* und um die genetische Interaktion der PLDa1 und -a2 mit CT2 untersuchen zu können, wurden zunächst *Mutator*-Insertionslinien der *UniformMu*-Population [157] analysiert. Das erhaltene Saatgut für die untersuchten Gene enthielt jeweils eine heterozygote Insertion des *Mutator*-Transposons (s. Abb. 20B). Mithilfe der öffentlich zugänglichen Informationen der *Maize Genetics and Genomics Database* (MaizeGDB, [158]) wurden die Positionen der Insertion in das jeweilige Gen analysiert. Die verwendeten Linien enthalten die *Mutator*-Insertionen im Gen von PLDa1 am Anfang des zweiten Exons (s. Abb. 20B). Die *Mutator*-Insertion in PLDa2 befindet sich in der Promoterregion vor dem 5'-UTR (*untranslated region*, s.

Abb. 20B) was zu einer Änderung des Expressionslevels oder zu einer Verhinderung der Transkription führen kann [159, 160]. Die untersuchten Linien stellten damit jeweils einen Kandidaten für ein LOF-Allel dar.

Um Pflanzen für die weitere Bearbeitung zu bestimmen, wurde der Genotyp jener mittels PCR untersucht. Die vom *Stockcenter* erhaltenen Individuen (F0-Generation) wurden mittels Selbstbestäubung propagiert, sodass in der Folge die Allele dieser so erhaltenen Population (F1-Generation) untersucht werden konnten. Das Untersuchen der im Genom vorhandenen Allele der Gene mittels PCR geschah mithilfe von drei PCR-Reaktionen pro Gen (vgl. Abb. 20). Die Amplifikate der PCRs mit PLD-F/TIR6- und der PLD-R/TIR6-Primern (PLD-GT-F bzw. PLD-GT-R) zeigten das Vorhandensein des Mutator-Transposons im Gen an, während das Amplifikat der PLD-F/PLD-R-Primer das Wildtyp-Allel anzeigte (PLD-GT-WT, vgl. Abb. 20). Die für die weitere Untersuchung verwendeten Pflanzen zeigten kein Vorhandensein des WT-Allels in keinem der untersuchten Gene. Die Transkripte PLD-GT-F bzw. PLD-GT-R wurden in den Vektor pJET1.2/blunt subkloniert (s. Tab. 45) und anschließend sequenziert, um die Position der *Mutator*-Insertion genau zu bestimmen. Pflanzen, die homozygot für eine Insertion des *Mutator*-Transposons waren, wurden für die weitere Analyse ausgewählt. Die Pflanzen wurden einerseits für die weiteren Kreuzungen verwendet und andererseits wurde eine Transkriptanalyse durchgeführt.

Pflanzen der Insertions-Population von PLD α 1 zeigten kein Transkript, von PLD α 2 eine Reduktion des Transkriptlevels im Vergleich zu WT-Pflanzen. Die cDNA von für die *Mutator*-Insertion homozygoten Pflanzen und heterozygoten Pflanzen (entspricht WT) der jeweils gleichen Population wurde, um das Transkriptlevel der PLD α s zu bestimmen, mittels PCR analysiert. Dadurch sollte analysiert werden ob es sich um LOF-Allele handeln kann. Die verwendeten Primer (s. Tab. 35) wurden bereits für die Klonierung der PLD α s für die Interaktionsstudien verwendet und befinden sich jeweils im 5'- bzw. 3'-UTR. Als Kontrolle dienten Primer für die Amplifikation der cDNA von CT2 (s. Tab. 35), mit denen jeweils die Qualität der cDNA überprüft wurde. Abbildung 21A zeigt, dass die als Matrize verwendete cDNA von WT-Pflanzen sowohl die Amplifikation des Transkripts von CT2 als auch PLD α 1 zuließ, was als Vorhandensein der jeweiligen mRNA in der isolierten *total*-RNA interpretiert wurde. Die als Matrize verwendete cDNA der Pflanze mit der homozygoten *Mutator*-Insertion in *PLD α 1* wies ein Amplifikat mit den CT2-cDNA-Primern auf, nicht jedoch mit den PLD α 1-cDNA-Primern (s. Abb. 21A). Dies wurde als Nichtvorhandensein der mRNA in der isolierten *total*-RNA und damit der gesamten Pflanze interpretiert. Die homozygoten Nachkommen dieser Pflanze wurden fortan als LOF-Mutanten angesehen und als *plda1*-Pflanzen bezeichnet. Ein anderes Ergebnis zeigte die Untersuchung der *Mutator*-Insertion in *PLD α 2*. Die Analyse der cDNA dieser für die *Mutator*-

Insertion homozygoter Pflanze zeigte sowohl ein Amplifikat des Transkripts von CT2 als auch von PLD α 2 (s. Abb. 21B). Die weitere Analyse mittels semi-quantitativer PCR zeigte, dass die untersuchte cDNA ca. $\frac{1}{4}$ des WT-PCR-Amplifikats enthielt (s. Abb. 21C). Ob dieser partiell negativ regulierende Einfluss der *Mutator*-Insertion in PLD α 2 einen Einfluss auf das Proteinlevel hatte und damit ein *knock-down* (KD) darstellte, wurde nicht untersucht. Die Nachkommen dieser Pflanze wurden fortan als *plda2*-Pflanzen bezeichnet.

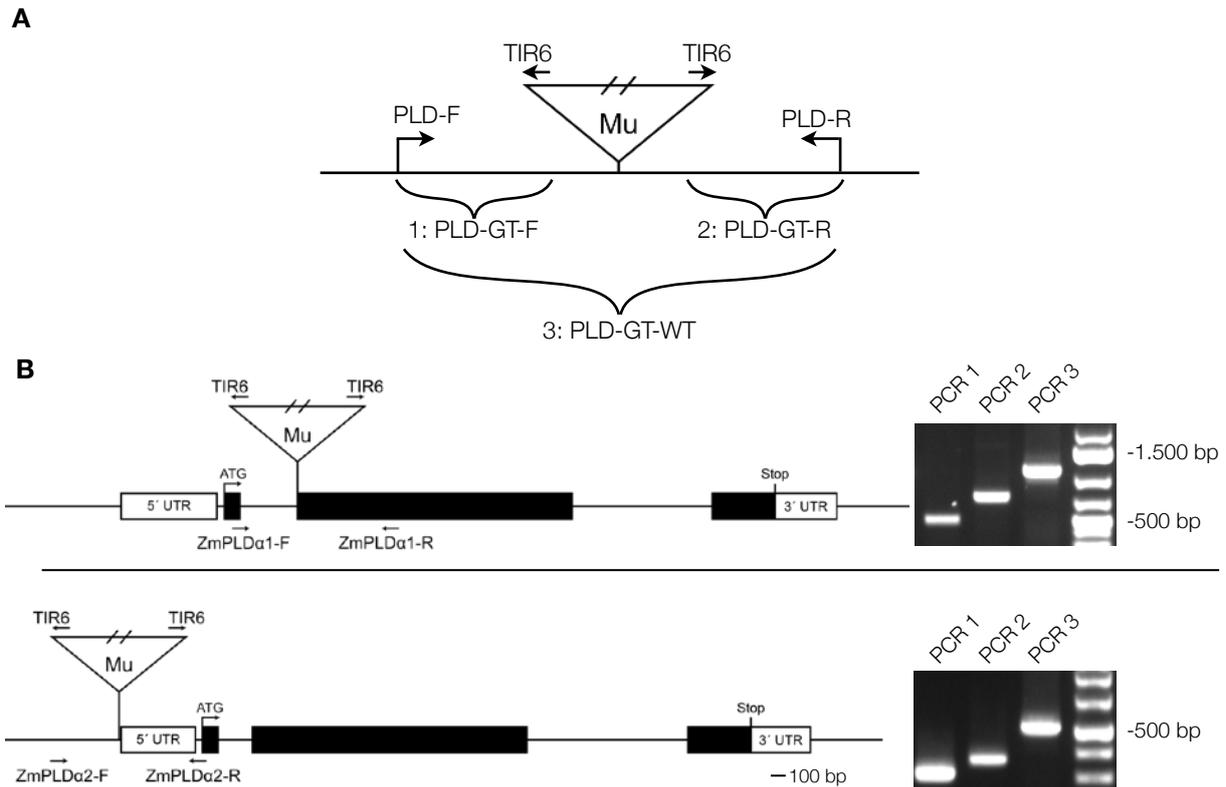


Abbildung 20: Die Bestimmung des Genotyps einer mutmaßlichen *Mutator*-Insertionsmutante

A Die für die Bestimmung des Genotyps einer PLD α -Mutante verwendete PCR-Strategie. Mithilfe von 3 PCRs konnte der Genotyp einer Pflanze bestimmt werden. Das Vorhandensein von Banden nach einer PCR mit der Primerkombination PLD-F/TIR6 (PCR 1: PLD-GT-F) und mit der Primerkombination PLD-R/TIR6 (PCR 2: PLD-GT-R) zeigte das Vorhandensein der *Mutator*-Insertion im entsprechenden Gen. Die PCR mit der Primerkombination PLD-F/PLD-R (PCR 3: PLD-GT-WT) wies das Wildtyp-Allel des Gens nach. **B** Die untersuchten ZmPLD α s sind heterozygot für die *Mutator*-Insertion. Die Insertion des *Mutator*-Transposons in das Gen von PLD α 1 befindet sich am Anfang des zweiten Exons. Die *Genotyping*-PCRs einer Pflanze zeigten jeweils ein Amplifikat, die Pflanze war demnach heterozygot für die Insertion. Die Insertion des *Mutator*-Transposons in das Gen von PLD α 2 befindet sich in der Promoterregion direkt vor dem 5'-UTR. Die *Genotyping*-PCRs einer Pflanze zeigten jeweils ein Amplifikat, die Pflanze war demnach heterozygot für die Insertion. Die relative Position des Start- (ATG-) und Stoppcodons sind markiert, die Position sowie die 5'-3'-Orientierung der verwendeten Primer sind durch Pfeile markiert. Der Maßstabsbalken gibt 100 bp an.

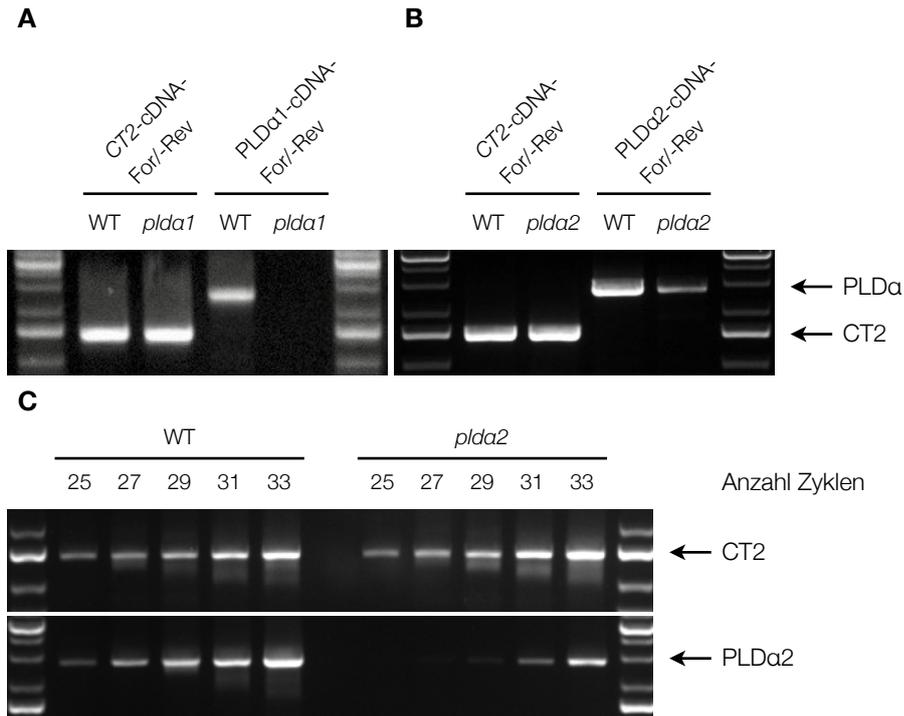


Abbildung 21: Die Transkriptanalyse der analysierten Pflanzen

A Transkriptanalyse von *PLDa1*. Die Analyse der WT-Pflanze zeigte ein Amplifikat des Transkripts für *PLDa1*, nicht jedoch die *plda1*-Pflanze. **B** Transkriptanalyse von *PLDa2*. Die Analyse der WT-Pflanze zeigte ein Amplifikat des Transkripts für *PLDa2*, die Analyse der *plda2*-Pflanze zeigte im Vergleich zum WT weniger Amplifikat. **C** Analyse des Transkripts von *PLDa2* einer einer potenziellen LOF-Mutante mittels semi-quantitativer PCR. Es ist zu erkennen, dass das untersuchte Gewebe der WT- und der *plda2*-Pflanze die ähnliche Menge des Amplifikats von *CT2* ergab, die verwendete Menge an Template war also ähnlich. Das Gewebe der untersuchten *plda2*-Pflanze ließ eine Amplifikation von *PLDa2* nach 29 Zyklen erkennen, in der WT-Pflanze war dies bereits nach 25 Zyklen möglich. Dies ließ auf eine geringere Menge an Template schließen.

Um Tripel-Mutanten zu erzeugen, wurde die Introgression der potenziellen LOF-Allele der PLDas in die Linie *ct2*-Ref. durchgeführt. Die analysierten, für die *Mutator*-Insertion jeweils homozygoten Pflanzen zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp. Dies wurde mit dem Vorhandensein der jeweils anderen PLDas, also einer genetischen Redundanz, erklärt. Um diese Redundanz zu vermeiden und um die genetische Interaktion der PLDas mit *CT2* analysieren zu können, wurde die Introgression der *PLDa1*-LOF-Allels und des *PLDa2*-Allels in die Linie *ct2*-Ref. [1] durchgeführt. Dafür wurde die analysierte *plda2*-Pflanze (F0-Generation) mit einer homozygoten *CT2*-LOF-Pflanze (F0-Generation) gekreuzt. Diese so erzeugte F1-Generation war heterozygot für die Insertion in jeweils beiden Genen. Die F1-Generation wurde mit einer homozygoten *plda1*-Pflanze gekreuzt, in der so erzeugten F2-Generation segregierten die Allele der drei Gene. Bei 4 möglichen verschiedenen Allel-Kombinationen betrug die Wahrscheinlichkeit, dass eine Pflanze alle drei Insertionen enthielt 25 %. Durch Selbstung einer für alle drei Gene heterozygoten Pflanze wurde die F3-Generation erzeugt. Die Wahrscheinlichkeit

einer Pflanze in der F3-Generation homozygot für die Insertion in den drei Genen zu sein betrug 1,6 % bei insgesamt 36 möglichen Allelkombinationen. Da diese Kombination nicht gefunden werden konnte, wurden weitere Kreuzungen durchgeführt. Es wurden Pflanzen der F3-Generation miteinander gekreuzt, von denen eine homozygot für die Insertion in ein oder zwei Genen und heterozygot für die Insertion im anderen Gen war, während der Genotyp der anderen Pflanze gegenteilig war. Die so erzeugten Populationen sollen für jedes Gen und Allel heterozygot/homozygot 1:1 segregieren. Diese Pflanzen wurden aufgrund der langen Generationszeit von *Z. mays* bis *dato* nicht phänotypisch analysiert, daher kann keine Aussage über eine genetische Interaktion der untersuchten Proteine getroffen werden.

Phospholipasen Das können in *Z. mays* als GAP wirken. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die durchgeführten Experimente Evidenzen für eine Interaktion von CT2 mit PLD α 1 und PLD α 2 erbrachten. Der durchgeführte FRET AB-Assay zeigte, dass CT2 und die zwei PLD α s *semi-in vivo* jeweils eine geringe räumliche Distanz zueinander aufwiesen. Ähnliches indizierte der durchgeführte rBiFC-Assay. Die räumliche Nähe zueinander wurde durch die Anwesenheit des DRY-Motivs bedingt und ließ auf eine Interaktion von CT2 mit jeweils einer PLD α schließen. Der durchgeführte GTPase-Assay zeigte, dass PLD α 1 *in vitro* die GTPase-Aktivität von CT2 positiv beeinflussen konnte. Die Aufklärung dieses funktionalen Einflusses warf ein Licht auf die Bedeutung der ZmPLD α s als GAP von CT2 und beantwortete die bisher offenstehende Frage nach der Terminierung des durch die G α -Untereinheit vermittelten Signals in *Z. mays*.

Die Rolle von CT2 in der Phytohormon-Signaltransduktion

Beeinflusst CT2 die Phytohormon-Signaltransduktion? Der Phänotyp von CT2-LOF-Pflanzen weist unter anderem Zwergwuchs, vergrößerte Meristeme und kürzere, breitere Blätter, die steiler in die Höhe ragen und von einem dunkleren Grün sind, auf [1]. Dieser Phänotyp konnte bisher nur partiell erklärt werden. Im Gegensatz zu der Veränderung der Meristeme, die durch eine tragende Rolle von CT2 in der CLAVATA-WUSCHEL-Signalübertragung erklärt werden konnte, wurden für das veränderte Größenwachstum oder die veränderte Entwicklung bzw. das veränderte Wachstum der Blätter bisher noch keine Erklärung gefunden. Andere Maismutanten zeigen ähnliche phänotypische Merkmale. Diese werden unter anderem durch Defizite in der Produktion oder der Perzeption von Phytohormonen hervorgerufen [161]. Es wurde bereits zuvor spekuliert ob G Proteine in der Signalübertragung von Phytohormonen mitwirken [162]. Daher wurde im Verlauf dieser Arbeit untersucht, ob CT2 eine Rolle in der Phytohormon-Signaltransduktion innehat.

Es wurden bisher keine Indikationen gefunden, dass CT2 in der Synthese oder der Signalübertragung von Gibberellinsäure und Brassinosteroiden mitwirkt. Phytohormone beeinflussen viele Aspekte der Entwicklung und des Wachstums von Pflanzen [163]. Von bestimmten Proteinen ist bereits bekannt, dass sie eine Rolle in der Phytohormon-Signaltransduktion spielen und dass das Fehlen jener eine Veränderung des Wachstums der Maispflanzen bewirkt, die dem Phänotyp von CT2-LOF-Pflanzen ähneln kann. Beispielsweise zeigen Pflanzen, die Defizite in der Produktion von *Gibberellinsäure* (*gibberellic acid*, GA) haben, meist einen Phänotyp von Zwergwuchs und Blätter, die ein dunkleres Grün aufweisen [164]. Auch Pflanzen, die Defizite in der Perzeption und der Transduktion des GA-Signals aufweisen, zeigen diese phänotypischen Merkmale [165]. Dies ähnelt dem Phänotyp von CT2-LOF-Pflanzen [1]. Es wurde jedoch gezeigt, dass CT2-LOF-Pflanzen keinen Unterschied zu WT-Pflanzen im Wachstum nach der externen Applikation von GA aufwiesen (unveröffentlichte Daten, Peter Bommert). Daraus wurde geschlossen, dass CT2 keine Rolle bei der Produktion oder der Signalperzeption bzw. -transduktion von GA spielt. Auch Pflanzen die Defizite in der Synthese oder der Signalübertragung von *Brassinosteroiden* (*brassinosteroids*, BR) aufweisen, können einen Phänotyp zeigen, der demjenigen von CT2-LOF-Pflanzen ähneln kann [166]. Jedoch zeigten CT2-LOF-Pflanzen keinen Unterschied zu WT-Pflanzen nach externer Applikation eines Brassinosteroids (*24-Epibrassinolid*) bzw. eines BR-Synthese-Inhibitors (*Propiconazol*) (unveröffentlichte Daten, Peter Bommert, Janna Varady). Daraus wurde geschlossen, dass CT2 keine Rolle in der Synthese oder der Signalübertragung von BR spielt. Um diese Erkenntnisse zu vervollständigen, sollte überprüft werden ob CT2 eine Rolle in der Signaltransduktion anderer Phytohormone innehat.

Für weitere Untersuchungen wurde zunächst das Augenmerk auf ABA gelegt. Zunächst wurden die Phytohormone, in deren Signalperzeption bzw. -transduktion die Rolle von CT2 überprüft werden sollte, eingegrenzt. Unter anderem wurde entschieden, die Reaktion von CT2-LOF-Pflanzen auf die Applikation von *Abscisinsäure* (*abscisic acid*, ABA) mit der Reaktion von WT-Pflanzen zu vergleichen, da bereits für *A. thaliana* gezeigt wurde, dass GPA1 an der ABA-Reaktion der Pflanzen beteiligt ist [167, 168]. Abscisinsäure ist ubiquitär in höheren Pflanzen und wurde ursprünglich als Stressphytohormon klassifiziert [169]. ABA ist ein wichtiger Bestandteil der physiologischen und molekularen Stressantwort von Pflanzen auf sich ändernde Bedingungen [170]. Dazu gehören Trockenheits-, Salz- und Kältestress [171]. Als Reaktion der Maispflanzen kann das ABA-Level in Blättern ansteigen und z. B. zu einer Schließung der Stomata führen [172, 173]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Interaktion von CT2 mit PLD α gezeigt (s. Kapitel *Phospholipasen beeinflussen die GTPase-Aktivität von CT2*). Für *A. thaliana* ist bereits bekannt, dass die ABA-Antwort der Stomata-Schließung durch das von AtPLD α 1 produzierte PA, welches die Protein-Phosphatase 2C (PP2C) ABA INSENSITIVE1 (AtABI1) inhibiert, vermittelt wird [174]. Eine Überexpression von PLD α 1 in Tabak führte zu einer höheren Sensitivität gegenüber ABA und verringerte den transpirativen Wasserverlust durch die Schließung der Stomata [175]. Es ist auch bekannt, dass die Bindung der G α -Untereinheit an AtPLD α 1 die katalytische Aktivität der PLD α hemmen kann [62]. In G α -Mutanten entfällt diese Hemmung mutmaßlich. Da CT2-LOF-Pflanzen eine höhere Trockenheitstoleranz als WT-Pflanzen zu haben schienen (unveröffentlichte Daten, Peter Bommert), wurde die Hypothese aufgestellt, dass CT2 eine Rolle in der ABA-Antwort innehat. Um zu untersuchen ob die Abwesenheit von CT2 einen Einfluss auf den Phänotyp von CT2-LOF-Pflanzen durch eine veränderte Phytohormon-Signaltransduktion hat, wurde der Unterschied des Einflusses von ABA auf WT- und CT2-LOF-Pflanzen untersucht.

WT- und CT2-LOF-Keimlinge reagierten ähnlich auf die Inkubation mit ABA. Eine 1:1 segregierende Population von WT- und CT2-LOF-Pflanzen wuchs mit den Wurzeln in einer hydroponischen Lösung. Ein Teil der Pflanzen wurde nicht mit ABA behandelt (-ABA), in die hydroponische Lösung der behandelten Pflanzen wurde an Tag 0 20 μ M ABA hinzugegeben (+ABA). Die Auswertung der täglichen Messung der Wurzellänge (s. Abb. 22) zeigte, dass das Wachstumsverhalten von WT- und CT2-LOF-Wurzeln ohne Zugabe von ABA keinen signifikanten Unterschied aufwies (s. Supplement Tab. 12). Auf die Zugabe von ABA folgte eine Hemmung des Wachstums der Wurzeln von WT- und CT2-LOF-Pflanzen. Der Unterschied ist unabhängig vom Genotyp jeweils signifikant zu der unbehandelten Population (s. Supplement Tab. 10, 11). Die Reaktion der Pflanzen auf die Applikation von ABA war ähnlich, das Wachstum der CT2-LOF-Wurzeln war etwas stärker gehemmt, jedoch nicht signifikant (s. Supplement Tab. 13). Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Reaktion der Wurzeln von CT2-

LOF-Pflanzen zu denen von WT-Pflanzen auf die Zugabe von ABA nachgewiesen werden, daher wurde geschlossen, dass CT2 keine Rolle in einer Perzeption von ABA oder in der Transduktion des Signals spielt. Die Hypothese wurde damit nicht belegt.

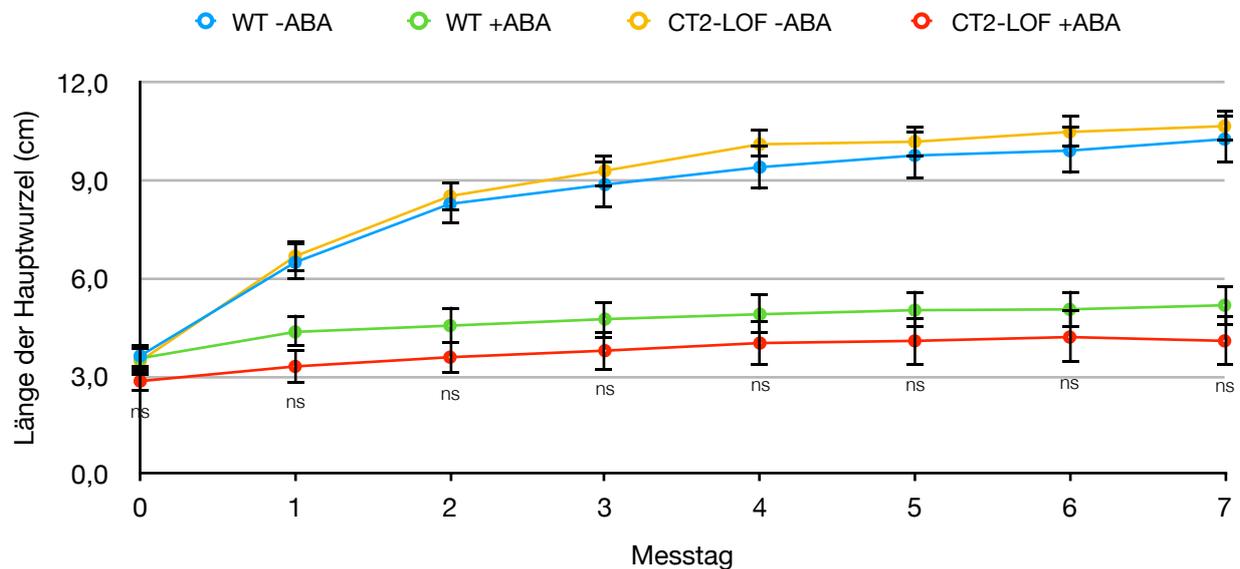


Abbildung 22: Der Einfluss von ABA auf die Länge der Hauptwurzel von WT- und CT2-LOF-Pflanzen

Es wurde täglich die Länge der Hauptwurzel von WT- und CT2-LOF-Pflanzen in einer hydroponischen Lösung nach (+ABA) oder ohne (-ABA) Zugabe von ABA gemessen. Das Wachstum der Wurzeln von WT- und CT2-LOF-Keimlingen war nach Zugabe von ABA (WT +ABA, CT2-LOF +ABA) im Vergleich zu den Wurzeln ohne ABA-Zugabe (WT -ABA, CT2-LOF -ABA) gehemmt. Die Reaktion der mit ABA behandelten Wurzeln von CT2-LOF-Keimlingen unterschied sich an keinem der Messtage signifikant von der Reaktion der Wurzeln von WT-Keimlingen. Die Fehlerbalken geben jeweils den Standardfehler an.

Des Weiteren wurde die Rolle von CT2 in der Auxin-Signaltransduktion überprüft. Da nicht gezeigt werden konnte, dass CT2 die Reaktion auf ABA-Zugabe beeinflusste, wurde als weiteres zu überprüfendes Phytohormon *Auxin* ausgewählt, in dessen Signalperzeption oder -transduktion die Rolle von CT2 untersucht werden sollte. Auch Pflanzen die Veränderungen des Auxin-Transports aufweisen, können phänotypische Eigenschaften haben, die denen von CT2-LOF-Pflanzen ähneln. Beispielsweise weist die *brachytic2*-Mutante (*br2*) ebenfalls einen Zwergwuchs auf [76, 176]. Außerdem wurde gezeigt, dass bei CT2-LOF-Pflanzen deutlich mehr Axillär-Kolben auswachsen [10], deren *Dormanz* in WT-Pflanzen unter anderem durch Auxin unterstützt wird [25]. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass CT2 in der Signalperzeption oder -transduktion von Auxin eine Rolle innehat. Um dies zu untersuchen, wurde der Einfluss externer Auxin-Applikation auf WT- und CT2-LOF-Gewebe analysiert.

WT- und CT2-LOF-Koleoptilensegmente reagierten ähnlich auf die Inkubation mit IAA. Um die Rolle CT2s in der Auxin-Signalperzeption oder -transduktion zu testen, wurde ausge-

nutzt, dass die Zugabe des Auxins *Indol-3-Essigsäure* (*indole-3-acetic acid*, IAA) das Streckungswachstum von einzelnen Zellen anregt und damit zum Wachstum des gesamten Segments führt [177-179]. Dadurch war es möglich das Wachstumsverhalten von Segmenten von Koleoptilen von WT- und CT2-LOF-Keimlingen (s. Abb. 23A) nach externer Applikation von IAA zu analysieren [180, 181]. Während des Versuchs wurden jeweils mehrere Koleoptilensegmente pro Genotyp und getesteter IAA-Konzentration in mit Luft begastem IAA-Wachstumspuffer inkubiert. Vor und nach der Zugabe von IAA wurde die Wachstumsrate gemessen. Die Auswertung der Daten (s. Supplement Abb. 40) zeigte eine jeweils ähnliche Wachstumsreaktion von CT2-LOF- und von WT-Koleoptilensegmenten nach Inkubation mit verschiedenen IAA-Konzentrationen. Es ist zu erkennen, dass sowohl WT- als auch CT2-LOF-Koleoptilensegmente eine Reaktion auf die IAA-Applikation in Abhängigkeit der verwendeten Konzentration zeigten (s. Supplement Abb. 40). Je höher die verwendete IAA-Konzentration war, desto stärker schien die Wachstumsreaktion der Koleoptilensegmente zu sein. Die Reaktion der CT2-LOF-Koleoptilensegmente schien insgesamt schwächer zu sein als die der WT-Koleoptilensegmente. Die Verzögerung (*lag-Phase*) nach welcher die Wachstumsreaktion einsetzt, schien bei CT2-LOF-Koleoptilensegmenten verlängert zu sein. Um die Wirkung in Abhängigkeit der Dosis zu analysieren, wurde die Steigung der Kurven nach Beginn der Wachstumsreaktion (s. Supplement Abb. 40) durch lineare Regression der einzelnen Messwerte in Form von Formel 4 beschrieben. Die erhaltenen Funktionen beschreiben die Wachstumsrate als Reaktion auf die jeweilige IAA-Konzentration in Abhängigkeit der Zeit (s. Tab. 2). Die Steigung m gibt dabei die maximale Wachstumsrate in $\mu\text{m/s/cm}$ an. Mithilfe der Werte der Steigung wurden die Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt (s. Abb. 23B/C). Es ist zu erkennen, dass die CT2-LOF-Kontrollgruppe ohne IAA-Zugabe ein geringeres basales Wachstum zeigte (s. Abb. 23B). Die Dosis-Wirkungs-Kurve zeigt außerdem, dass die maximale Wachstumsrate der verwendeten CT2-LOF-Koleoptilensegmente insgesamt geringer war. Die Normierung der Wachstumsrate auf den Wert der höchsten verwendeten Konzentration (s. Abb. 23C) zeigt jedoch, dass die relative Reaktion der verschiedenen Genotypen nahezu identisch war. Das Streckungswachstum von CT2-LOF-Koleoptilensegmenten war also insgesamt verringert, die Wachstumsreaktion auf die Zugabe von IAA war jedoch sehr ähnlich. Die Hypothese konnte mithilfe dieses Experiments nicht belegt werden, daher wurde daraus geschlossen, dass CT2 keinen Einfluss auf die IAA-Reaktion von *Z. mays* hat.

$$y = m * x + n$$

Formel 4: Form der Formel mithilfe welcher die Wachstumsrate beschrieben wurde

Tabelle 2: Formeln, welche die Wachstumsrate der Koleoptilensegmente in Abhängigkeit der Zeit beschreiben

IAA-Konzentration (M)	Formel für WT-Koleoptilensegmente	R ² -Wert	Formel für CT2-LOF-Koleoptilensegmente	R ² -Wert
0	$y=0,0015*x+0,023$	0,9445	$y=0,0003*x+0,0059$	0,8443
10^{-8}	$y=0,0014*x+0,0191$	0,9004	$y=0,0007*x+0,0071$	0,8909
10^{-7}	$y=0,0042*x+0,0011$	0,9736	$y=0,0018*x+0,0135$	0,7456
10^{-6}	$y=0,0058*x+0,0271$	0,9559	$y=0,0023*x+0,0005$	0,9460
10^{-5}	$y=0,007*x+0,0098$	0,9690	$y=0,0027*x+0,0026$	0,9310

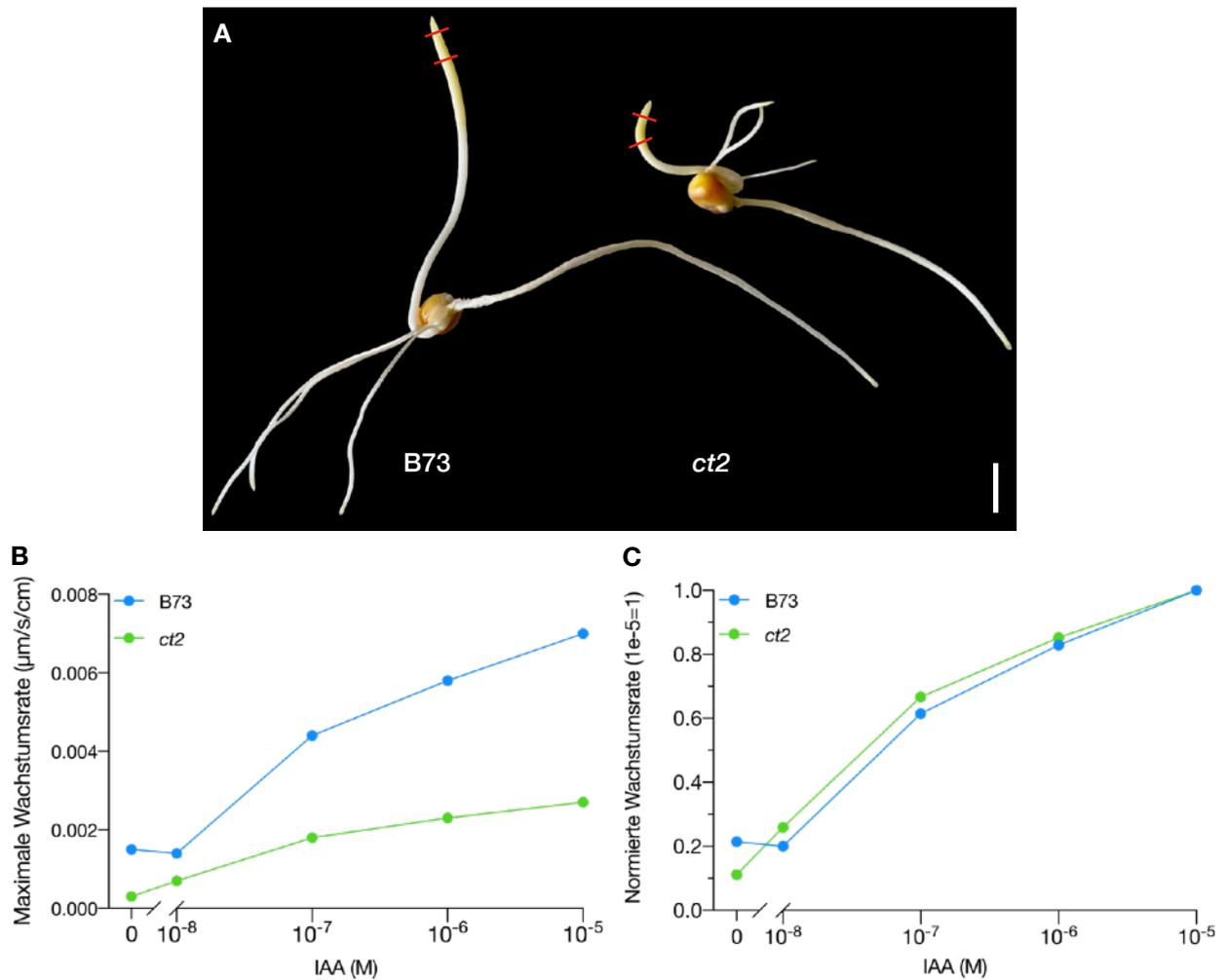


Abbildung 23: Analyse der Reaktion von WT- und CT2-LOF-Koleoptilensegmenten auf die Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von IAA

A WT- und CT2-LOF-Keimlinge. Von den ca. 72 h alten Keimlingen wurden die obersten 3 mm des Koleoptils entfernt. Das Segment der darauf folgenden 5 mm (rot markiert) wurde für das Experiment genutzt. Der Maßstabsbalken zeigt 1 cm an. B Dosis-Wirkungs-Kurve der Reaktion von Koleoptilensegmenten auf unterschiedliche Konzentrationen von IAA. Es ist zu erkennen, dass die Wachstumsrate von CT2-LOF-Koleoptilensegmenten eine geringere Wachstumsreaktion auf die Zugabe von IAA zeigte als die der verwendeten WT-Koleoptilensegmente. C Normierte Dosis-Wirkungs-Kurve der Reaktion von Koleoptilensegmenten auf unterschiedliche Konzentrationen von IAA. Es ist zu erkennen, dass die auf den Wert der Konzentration 10^{-5} normierte Wachstumsrate bei WT- und CT2-LOF-Koleoptilensegmenten sehr ähnlich war.

Es konnte nicht gezeigt werden, dass CT2-LOF-Pflanzen eine andere Reaktion auf die Zugabe von ABA und IAA zeigten als WT-Pflanzen. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente lassen nicht den Schluss zu, dass CT2 in der Perzeption oder Transduktion des ABA- oder IAA-Signals mitwirkt. Daher konnten die Defizite der Zellproliferation und -elongation von CT2-LOF-Pflanzen nicht erklärt werden.

Verlust des Fasziations-Phänotyps

Weist eine CT2-LOF-Mutante in einem anderen Haplotyp als B73 einen veränderten Phänotyp auf? Verschiedene *Z. mays*-Inzuchtlinien (*Haplotypen*) weisen *natürliche genetische Variationen* auf, die dazu führen können, dass bestimmte phänotypische Merkmale verschiedene Ausprägungen haben können [182]. Die Inzuchtlinie B73 besitzt z. B. größere vegetative und generative Meristeme als die Inzuchtlinie Mo17 [88]. Auch der Phänotyp einer Mutante kann in verschiedenen Haplotypen variieren [183]. Diese natürliche Variation wurde ausgenutzt, um natürliche *Modifier* des Phänotyps von CT2-LOF-Pflanzen zu finden.

Die Introgression des *ct2-Ref.-Allels* in die Inzuchtlinie Mo17 wurde durchgeführt. Um den Phänotyp von CT2-LOF-Pflanzen im Mo17-Hintergrund analysieren zu können, musste die Introgression des *ct2-Ref.-Allels* in diesen Haplotyp durchgeführt werden. Dafür wurden homozygote CT2-LOF-Pflanzen (B73, F0-Generation) mit WT-Pflanzen der Inzuchtlinie Mo17 (F0-Generation) gekreuzt. Um den Heterosis-Effekt [184] zu überwinden, wurde der Anteil des Genoms des Mo17-Haplotyps sukzessive erhöht. Dafür wurden Individuen der F1-Generation (*ct2-Ref.* [Mo17x1]) erneut mit WT-Pflanzen (Mo17) gekreuzt. Der Genotyp der Pflanzen dieser segregierenden F2-Population *ct2-Ref.* (Mo17x2) wurde mittels PCR bestimmt, um die entsprechenden Pflanzen für die weitere Introgression auswählen zu können. Dementsprechend wurde verfahren, bis *ct2-Ref.* viermal in Mo17 eingekreuzt wurde (*ct2-Ref.* [Mo17x4]), theoretisch entsprechen nun maximal 93,75 % des Genom demjenigen von Mo17. Pflanzen dieser Generation wurden durch Selbstung vermehrt, um eine segregierende Population zu erzeugen. Für das *ct2-Ref.-Allel* heterozygote Pflanzen wurden mit für das *ct2-Ref.-Allel* homozygoten Pflanzen gekreuzt, um eine heterozygot/homozygot 1:1 segregierende Population zu erzeugen. Mit dieser Population konnte der Phänotyp der Mutante direkt mit WT-Pflanzen verglichen werden. Der Phänotyp einer 1:1 segregierenden Population von *ct2-Ref.* im B73-Hintergrund (*ct2-Ref.* [B73x6]) wurde mit der erzeugten 1:1 segregierenden Population von *ct2-Ref.* (Mo17x4) verglichen, indem verschiedene vegetative und generative Organe analysiert wurden.

Das *ct2-Ref.-Allel* führte im B73- und Mo17-Hintergrund zu einer ähnlichen phänotypischen Änderung junger vegetativer Organe. Zunächst wurden die ersten drei Blätter der untersuchten Pflanzen vermessen. Diese Blätter von CT2-LOF-Pflanzen waren unabhängig vom jeweiligen genetischen Hintergrund jeweils signifikant kürzer als die von WT-Pflanzen (jeweils $p < 0,0001$; s. Abb. 24A; s. Supplement Tab. 14, 17, 20). Dieser Phänotyp wurde für den B73-Haplotyp bereits beschrieben [1, 10]. Die ersten drei Blätter von CT2-LOF-Pflanzen im B73-Hintergrund waren signifikant breiter als die Blätter von WT-Pflanzen (p_{B73} Erstes Blatt=0,0273; p_{B73} Zweites Blatt<0,0001; p_{B73} Drittes Blatt<0,0001; s. Abb. 24B; s. Supplement Tab. 15, 18, 21), auch dieser Phänotyp wurde im B73-Hintergrund bereits beschrieben [1, 10]. Dagegen war

das erste Blatt von *ct2*-Ref. (Mo17x4)-Pflanzen signifikant schmaler als das der entsprechenden WT-Pflanzen ($p_{\text{Mo17 Erstes Blatt}}=0,0355$), während das zweite und das dritte Blatt keine signifikant veränderte Breite aufwiesen ($p_{\text{Mo17 Zweites Blatt}}=0,1331$; $p_{\text{Mo17 Drittes Blatt}}=0,2482$; s. Abb. 24B; s. Supplement Tab. 15, 18, 21). Dies führte dennoch zu einer signifikant erhöhten *Ratio* von Blattbreite zu Blattlänge der einzelnen Blätter sowohl im B73- als auch im Mo17-Hintergrund (jeweils $p < 0,0001$; s. Abb. 24C; s. Supplement Tab. 16, 19, 22). Um zusätzlich die relative Veränderung der Blattlänge von Pflanzen der verschiedenen Haplotypen beziffern zu können, wurde jeweils der Mittelwert der Blattlängen von CT2-LOF-Pflanzen durch den entsprechenden Mittelwert von WT-Pflanzen dividiert (s. Abb. 25). Die Ermittlung dieser *Ratio* zeigte, dass die Länge des ersten Blattes von CT2-LOF-Pflanzen im B73-Hintergrund durchschnittlich um den Faktor 0,6627 verringert war. Die Länge von Blättern von CT2-LOF-Pflanzen betrug damit im Durchschnitt 66,27 % der Länge der Blätter von WT-Pflanzen. Die Länge des zweiten Blattes von CT2-LOF-Pflanzen betrug im Durchschnitt 68,81 %, während die Länge des dritten Blattes 70,15 % im Vergleich zu WT-Pflanzen betrug (im B73-Haplotyp). Im Mo17-Haplotyp betrug die Länge des ersten Blattes von CT2-LOF-Blättern durchschnittlich 62,04 % im Vergleich zu WT-Blättern, die Länge des zweiten Blattes 61,80 % und die des dritten Blattes 62,42 %. Dies zeigte, dass die durch das *ct2*-Ref.-Allel hervorgerufene Verringerung der Blattlänge im Mo17-Hintergrund etwas stärker ausgeprägt war als im B73-Hintergrund. Insgesamt zeigte die Analyse, dass der Einfluss des *ct2*-Ref.-Allels auf die Änderung des Phänotyps dieser jungen vegetativen Organe in den untersuchten Inzuchtlinien eine ähnliche Tendenz aufweist.

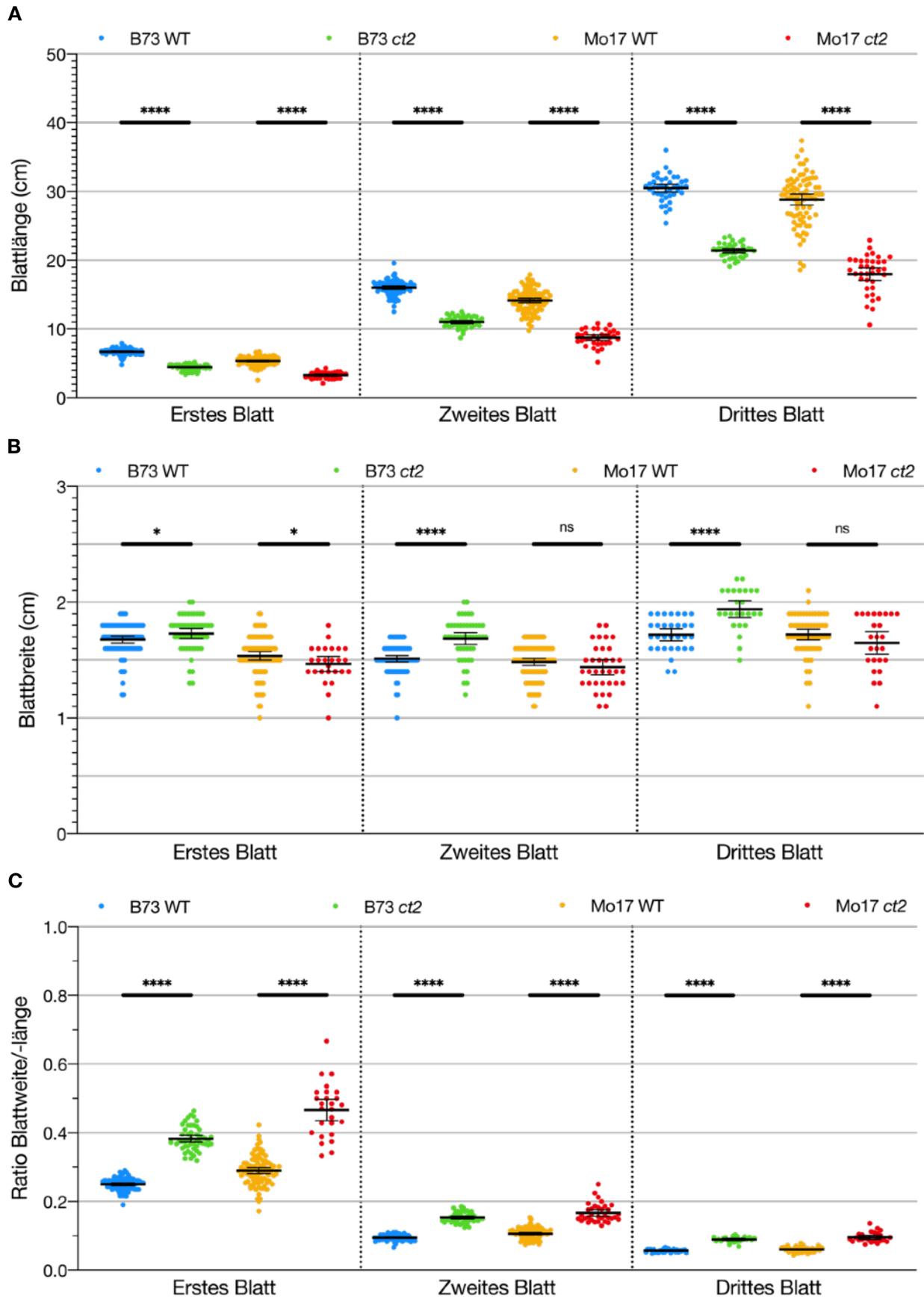


Abbildung 24: Der Einfluss des *ct2*-Ref.-Allels auf die Blätter von Pflanzen in verschiedenen genetischen Hintergründen

Abbildung 24: Der Einfluss des *ct2*-Ref.-Allels auf die Blätter von Pflanzen in verschiedenen genetischen Hintergründen

A Der Einfluss des *ct2*-Ref.-Allels auf die Blattlänge. Es ist zu erkennen, dass CT2-LOF-Pflanzen jeweils signifikant kürzere Blätter als WT-Pflanzen besaßen (jeweils $p < 0,0001$). Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an. **B** Der Einfluss des *ct2*-Ref.-Allels auf die Blattbreite. Es ist zu erkennen, dass CT2-LOF-Pflanzen im B73-Hintergrund jeweils breitere Blätter als WT-Pflanzen besaßen ($p_{B73 \text{ Breite 1. Blatt}} = 0,0273$; $p_{B73 \text{ Breite 2. Blatt}} < 0,0001$; $p_{B73 \text{ Breite 3. Blatt}} < 0,0001$). Im Mo17-Hintergrund dagegen war das erste Blatte von CT2-LOF-Pflanzen signifikant schmaler ($p_{Mo17 \text{ Breite 1. Blatt}} = 0,0355$), während die Breite des zweiten und dritten Blattes nicht signifikant verändert war ($p_{Mo17 \text{ Breite 2. Blatt}} = 0,1331$; $p_{Mo17 \text{ Breite 3. Blatt}} = 0,2482$). Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an. **C** Der Einfluss des *ct2*-Ref.-Allels auf die Ratio der Blattweite/Blattlänge. Es ist zu erkennen, dass bei CT2-LOF-Pflanzen das Verhältnis von Blattbreite zu Blattlänge jeweils signifikant größer war als bei WT-Pflanzen (jeweils $p < 0,0001$). Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an.

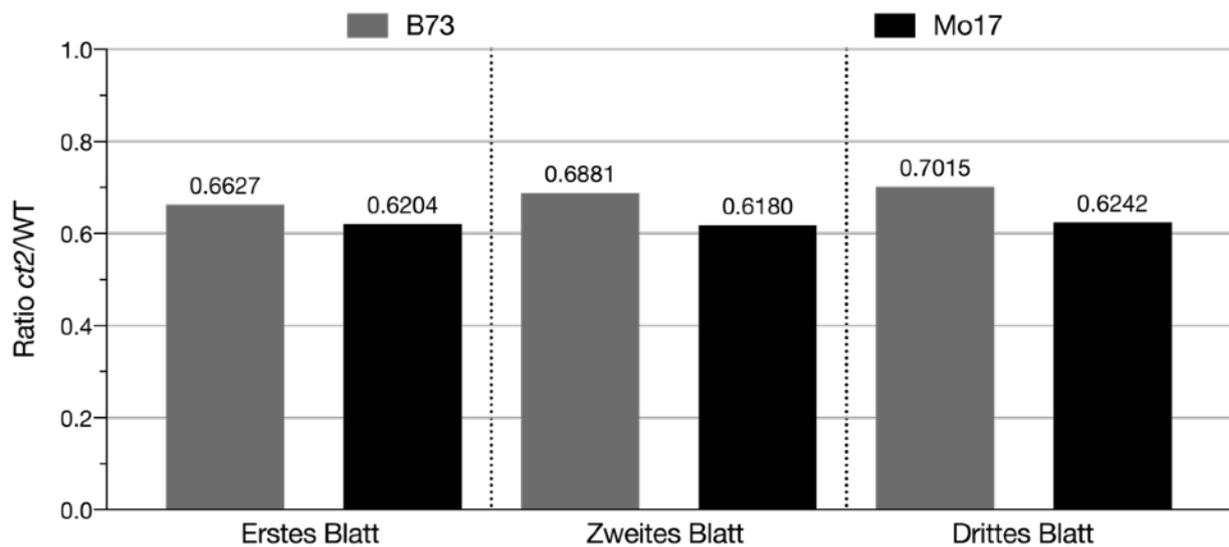


Abbildung 25: Die relative Verringerung von Blattlängen von CT2-LOF-Pflanzen im Vergleich zu denen des Wildtyps in verschiedenen genetischen Hintergründen

Die durch das *ct2*-Ref.-Allel hervorgerufene relative Veränderung der Länge der ersten drei Blätter von CT2-LOF-Pflanzen im Vergleich zu den entsprechenden Blättern von WT-Pflanzen in verschiedenen genetischen Hintergründen wurde miteinander verglichen. Dazu wurde der jeweilige Mittelwert von CT2-LOF-Pflanzen durch den entsprechenden Mittelwert von WT-Pflanzen dividiert. Dies zeigte, dass das *ct2*-Ref.-Allel eine etwas stärkere Verringerung der Länge der Blätter im Mo17-Haplotyp bewirkte. Die Länge des ersten Blattes von CT2-LOF-Pflanzen im B73-Hintergrund war durchschnittlich um den Faktor 0,6627 verkürzt (des zweiten bzw. dritten Blattes um den Faktor 0,6881 bzw. 0,7015). Dagegen war im Mo17-Hintergrund die Länge des ersten Blattes von CT2-LOF-Pflanzen durchschnittlich um den Faktor 0,6204 verkürzt (des zweiten bzw. dritten Blattes um den Faktor 0,6180 bzw. 0,6242).

Das *ct2-Ref.*-Allel führte im B73- und Mo17-Hintergrund zu einer ähnlichen Änderung des Phänotyps adulter Pflanzen. Um potenzielle Unterschiede des Phänotyps von CT2-LOF-Pflanzen in verschiedenen genetischen Hintergründen zu finden, wurden adulte Pflanzen des Stadiums R6 analysiert. Die Höhe von CT2-LOF-Pflanzen unterschied sich von WT-Pflanzen, wie bereits beschrieben [1, 10], im B73-Hintergrund signifikant ($\bar{\varnothing}_{B73\ WT}=333,3\text{ cm}$; $n_{B73\ WT}=18$; $\bar{\varnothing}_{B73\ ct2}=220,4\text{ cm}$; $n_{B73\ ct2}=10$; $p_{B73}<0,0001$; s. Abb. 26A/B; s. Supplement Tab. 23). Das Verhältnis der Höhe von CT2-LOF- zu WT-Pflanzen betrug 0,6613 (s. Abb. 27). Auch im Mo17-Hintergrund war der Unterschied der Höhe von CT2-LOF-Pflanzen ($\bar{\varnothing}_{Mo17\ ct2}=142,2\text{ cm}$; $n_{Mo17\ ct2}=17$) zu WT-Pflanzen ($\bar{\varnothing}_{Mo17\ WT}=266,3\text{ cm}$; $n_{Mo17\ WT}=20$) signifikant verändert ($p_{Mo17}<0,0001$; s. Abb. 26A/B; s. Supplement Tab. 23). Die Ratio der Höhe von CT2-LOF- zu WT-Pflanzen betrug 0,5339 (s. Abb. 27). Die Höhe von CT2-LOF-Pflanzen war damit, verglichen mit der Höhe der Pflanzen im B73-Hintergrund, stärker verringert. Des Weiteren wurde jeweils der Winkel des zweiten Blattes unterhalb des ersten Kolbens zum Stamm analysiert. Der Winkel dieses Blattes wurde ausgewählt, da der Winkel dieser, bei einem Vergleich zwischen den verschiedenen untersuchten genetischen Hintergründen, die größten Unterschiede zeigte [185]. Wie bereits für den B73-Hintergrund beschrieben [1], war der Winkel der untersuchten Blätter zum Stamm bei CT2-LOF-Pflanzen ($\bar{\varnothing}_{B73\ ct2}=43,33^\circ$; $n_{B73\ ct2}=22$) signifikant kleiner ($p_{B73}<0,0001$; s. Supplement Tab. 24) als der entsprechende Winkel bei WT-Pflanzen ($\bar{\varnothing}_{B73\ WT}=68,53^\circ$; $n_{B73\ WT}=19$; s. Abb. 26C). Dies bedeutet, dass die untersuchten Blätter von CT2-LOF-Pflanzen steiler in die Höhe ragten als die entsprechenden Blätter von WT-Pflanzen. Auch im Mo17-Hintergrund war ein signifikanter Unterschied ($p_{Mo17}<0,0001$; s. Supplement Tab. 24) des untersuchten Blattwinkels von WT- ($\bar{\varnothing}_{Mo17\ WT}=106,6^\circ$; $n_{Mo17\ WT}=20$) zu CT2-LOF-Pflanzen ($\bar{\varnothing}_{Mo17\ ct2}=50,55^\circ$; $n_{Mo17\ ct2}=17$) zu beobachten (s. Abb. 26C). Die untersuchten Blätter von CT2-LOF-Pflanzen ragten damit auch in diesem genetischen Hintergrund deutlich steiler in die Höhe als die Blätter von WT-Pflanzen. Diese Daten deuten darauf hin, dass die vegetativen Merkmale adulter Pflanzen durch das *ct2-Ref.*-Allel in den untersuchten Haplotypen auf ähnliche Weise beeinflusst werden. Ein weiterer Unterschied, der allerdings nicht quantitativ untersucht wurde, war die Verringerung der sichtbaren Läsionen auf den Blättern von CT2-LOF-Pflanzen im Mo17-Hintergrund (s. Supplement Abb. 41).

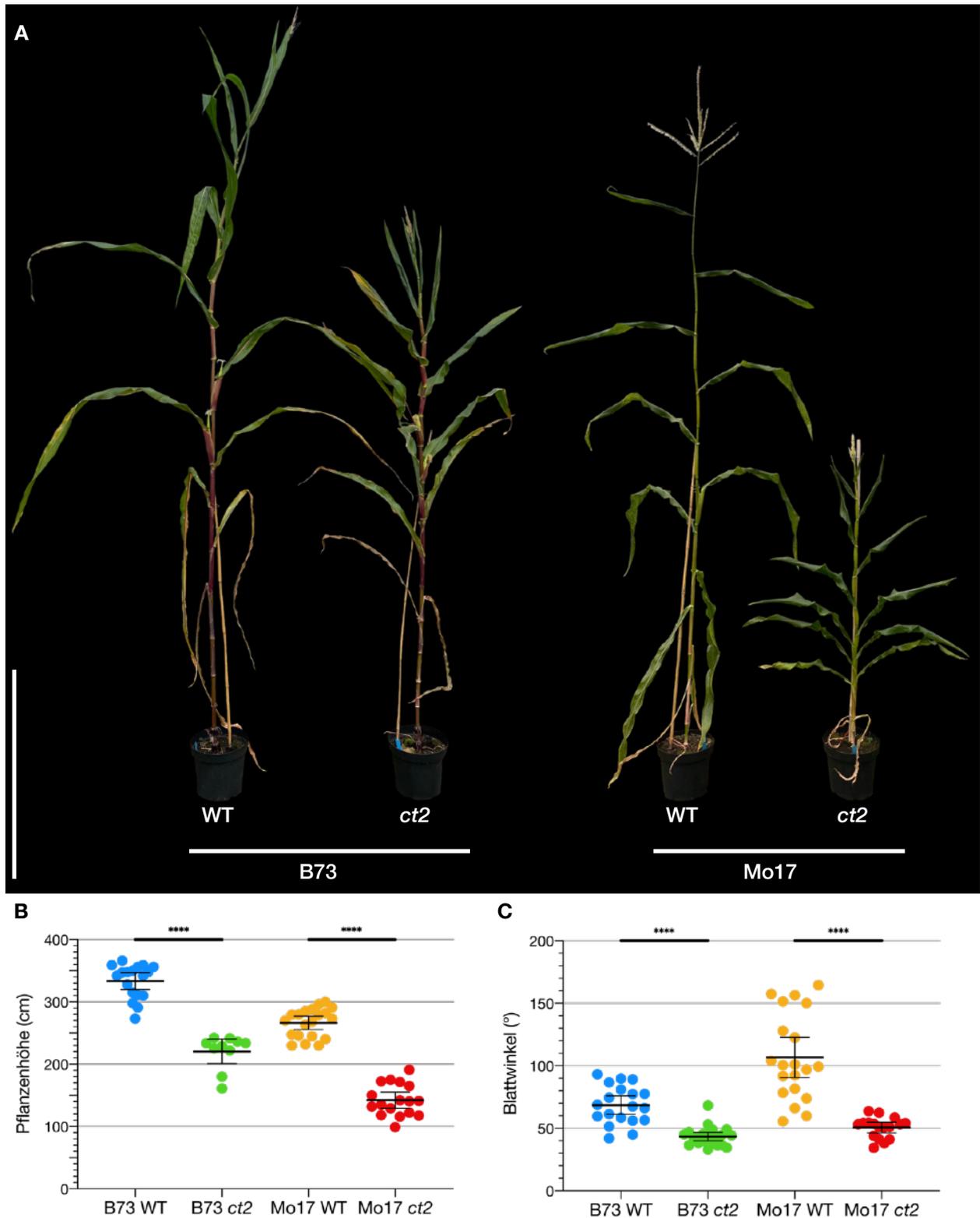


Abbildung 26: Der Einfluss des *ct2*-Ref.-Allels auf die verschiedene vegetative Merkmale von Pflanzen in verschiedenen genetischen Hintergründen

A WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund. Das *ct2*-Ref.-Allel bewirkte eine signifikante Änderung des Wachses der Pflanzen. Der Maßstabsbalken zeigt 1 m an. **B** Quantifizierung der Wuchshöhe von WT- und CT2-LOF-Pflanzen. Es ist zu erkennen, dass CT2-LOF-Pflanzen unabhängig vom genetischen Hintergrund signifikant kleiner waren als WT-Pflanzen (jeweils $p < 0,0001$). Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an. **C** Quantifizierung des Winkels des zweiten Blattes unterhalb des ersten Kolbens

zum Stamm. Es ist zu erkennen, dass CT2-LOF-Pflanzen unabhängig von genetischen Hintergrund einen kleineren Winkel (jeweils $p < 0,0001$) und damit steiler in die Höhe ragende Blätter aufwiesen. Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an.

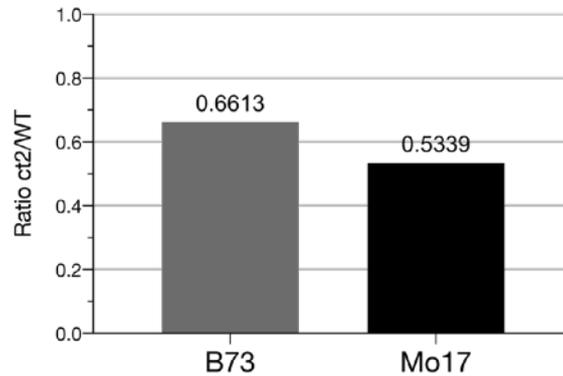


Abbildung 27: Das Verhältnis der Höhe von CT2-LOF- zu WT-Pflanzen in verschiedenen genetischen Hintergründen

Das Verhältnis der Höhe von CT2-LOF- zu WT-Pflanzen war im Mo17-Hintergrund (0,5339) geringer als im B73-Hintergrund (0,6613). Dies zeigt, dass der Verlust an Wuchshöhe im Mo17-Hintergrund stärker ausgeprägt war als im B73-Hintergrund.

Das *ct2*-Ref.-Allel bewirkte im B73- und im Mo17-Hintergrund jeweils eine ähnliche phänotypische Änderung der Internodien. Die Länge der einzelnen Internodien der Pflanzen beginnend mit dem ersten Internodium unterhalb des Pedunkulus (entspricht Internodium 1) wurde analysiert. Es ist zu erkennen, dass die insgesamt kleineren Mo17-Pflanzen signifikant weniger Internodien vom Pedunkulus bis zu der ersten Wurzel besaßen ($p < 0,0001$; s. Abb. 28A/B; s. Supplement Tab. 27). Unabhängig von ihrem genetischen Hintergrund besaßen CT2-LOF-Pflanzen signifikant mehr Internodien als WT-Pflanzen ($p_{B73} = 0,0003$; $p_{Mo17} = 0,0003$; s. Abb. 28C; s. Supplement Tab. 27). Die einzelnen Internodien von CT2-LOF-Pflanzen waren unabhängig vom genetischen Hintergrund jeweils signifikant kürzer als die Internodien von WT-Pflanzen (s. Abb. 28A/B; s. Supplement Tab. 25, 26). Dies lässt darauf schließen, dass bei CT2-LOF-Pflanzen die Streckung der einzelnen Internodien verringert war, was durch eine erhöhte Anzahl dieser kompensiert wurde. Die Ratio der Länge der Internodien von CT2-LOF- zu WT-Pflanzen (Mittelwerte der Länge der Internodien von CT2-LOF-Pflanzen dividiert durch Mittelwerte der Länge der Internodien von WT-Pflanzen) lag im Mittel bei $\bar{\theta}_{B73} = 0,641$ bzw. bei $\bar{\theta}_{Mo17} = 0,571$ und unterschied sich nicht signifikant von einander ($p_{Ratio\ Internodie} = 0,0746$; s. Abb. 28D; s. Supplement Tab. 28). Diese Daten deuten darauf hin, dass die vegetativen Merkmale adulter Pflanzen durch das *ct2*-Ref.-Allel in den untersuchten Haplotypen auf ähnliche Weise beeinflusst werden.

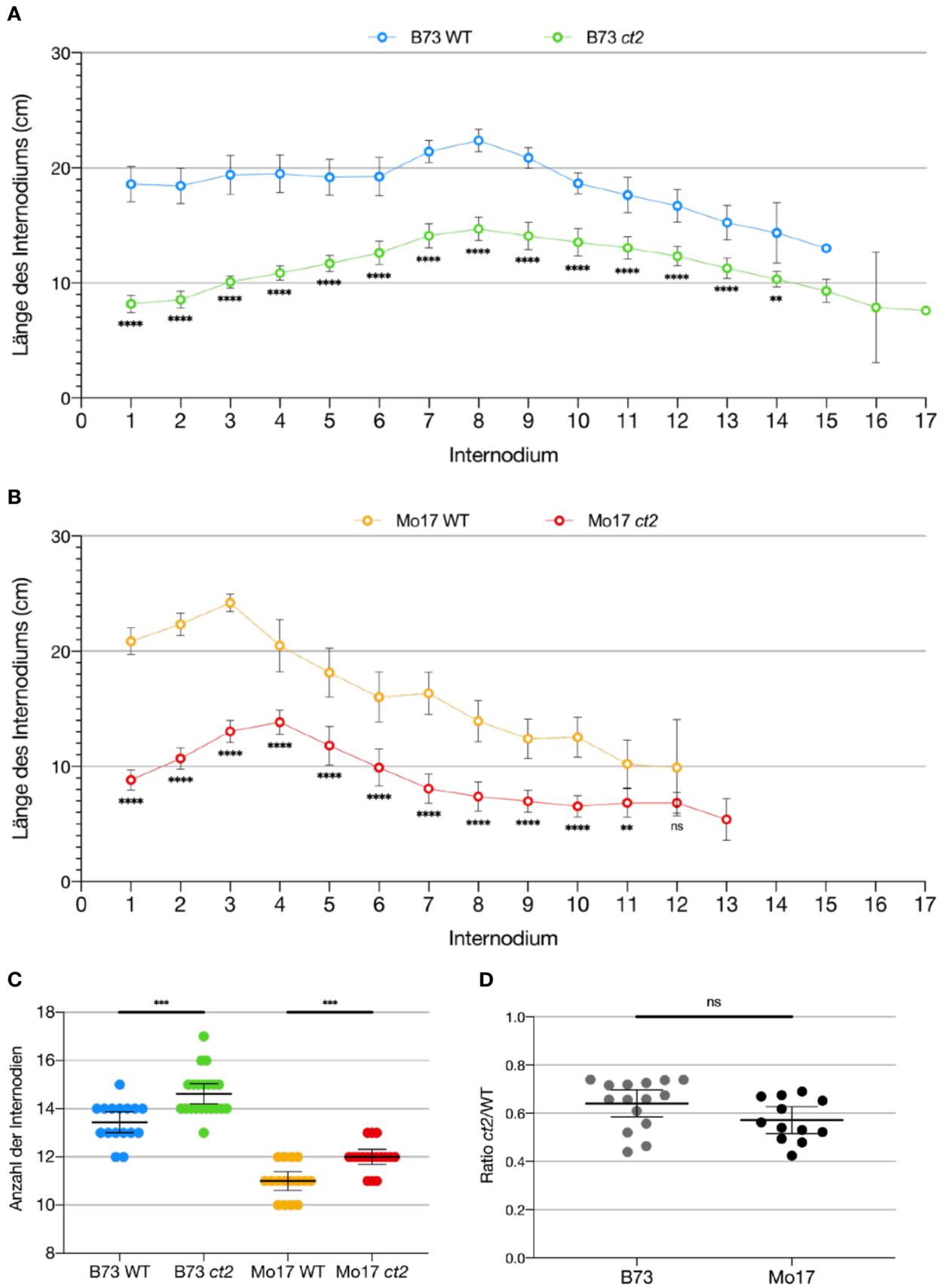


Abbildung 28: Der Einfluss des *ct2*-Ref.-Allels auf das Wachstum der Internodien von Pflanzen in verschiedenen genetischen Hintergründen

Abbildung 28: Der Einfluss des *ct2*-Ref.-Allels auf das Wachstum der Internodien von Pflanzen in verschiedenen genetischen Hintergründen

A Quantifizierung der Länge der einzelnen Internodien von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73-Hintergrund. Es ist zu erkennen, dass das *ct2*-Ref.-Allel eine jeweils signifikante Verkürzung der Internodien bewirkte. Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an. **B** Quantifizierung der Länge der einzelnen Internodien von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im Mo17-Hintergrund. Es ist zu erkennen, dass das *ct2*-Ref.-Allel jeweils eine Verkürzung der Internodien bewirkte, bis auf die Verkürzung des vorletzten Internodiums war dies jeweils signifikant. Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an. **C** Die Anzahl der Internodien von CT2-LOF-Pflanzen war gegenüber dem WT unabhängig vom genetischen Hintergrund jeweils signifikant erhöht ($p_{B73}=0,0003$; $p_{Mo17}=0,0003$). Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an. **D** Das Verhältnis der Länge der Internodien von CT2-LOF- zu WT-Pflanzen unterschied sich in den verschiedenen genetischen Hintergründen nicht signifikant voneinander ($\theta_{B73}=0,641$; $\theta_{Mo17}=0,571$; $p=0,0746$). Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an.

Das *ct2*-Ref.-Allel bewirkte im B73- und Mo17-Hintergrund eine ähnliche Veränderung des Phänotyps vegetativer Organe. Sowohl junge als auch adulte CT2-LOF-Pflanzen wiesen im Mo17-Hintergrund die gleichen Änderungen des Phänotyps auf wie bereits für den B73-Hintergrund beschrieben wurde [1, 10, 33]. Junge Blätter, adulte Pflanzen und deren einzelne Internodien von CT2-LOF-Pflanzen im Mo17-Hintergrund wiesen jeweils Verkürzungen verglichen mit WT-Pflanzen auf. Diese phänotypischen Merkmale lassen sich mit einer Veränderung der Zellproliferation und -expansion erklären [10, 33]. Die Ähnlichkeit der Änderungen in den verschiedenen genetischen Hintergründen lässt darauf schließen, dass keine natürlichen *Modifier* des *ct2*-Ref.-Allels in Mo17 eine Abweichung des Phänotyps verursachen. Um die Analyse zu vervollständigen, wurden die generativen Organe der Pflanzen untersucht.

Die männlichen Infloreszenzen von CT2-LOF-Pflanzen zeigten unabhängig vom genetischen Hintergrund eine ähnliche Änderung des Phänotyps. Verschiedene Merkmale der männlichen Infloreszenz wurden analysiert um die Änderung des Phänotyps generativer Organe zu untersuchen (s. Abb. 29). Die Ergebnisse für den B73-Hintergrund stimmten mit bereits veröffentlichten Daten überein [1]. Sowohl die Länge der gesamten männlichen Infloreszenzen als auch der zentralen Blütenstände waren bei CT2-LOF-Pflanzen unabhängig vom genetischen Hintergrund signifikant verkürzt (s. Abb. 29A/B/D; s. Supplement Tab. 29, 31). Die Anzahl der Rispenäste war im B73-Hintergrund bei CT2-LOF-Pflanzen mit im Durchschnitt 9,3 ($n_{B73\ ct2}=10$) signifikant höher als bei WT-Pflanzen ($\theta_{B73\ WT}=7,4$; $n_{B73\ WT}=18$; $p_{B73}=0,0033$ s. Abb. 29C; s. Supplement Tab. 30). Im Mo17-Hintergrund war der gleiche Trend zu erkennen, auch wenn der Unterschied nicht signifikant war ($\theta_{Mo17\ WT}=5,7$; $n_{Mo17\ WT}=20$; $\theta_{Mo17\ ct2}=6,8$; $n_{Mo17\ ct2}=17$; $p_{Mo17}=0,0588$; s. Abb. 29C; s. Supplement Tab. 30). Abbildung 29E zeigt, dass die Anzahl der Ährchen im untersuchten Segment des Blütenstandes im B73-Hintergrund bei CT2-LOF-Pflanzen ($\theta_{B73\ ct2}=116,0$; $n_{B73\ ct2}=10$) signifikant höher war als bei WT-Pflanzen ($\theta_{B73\ WT}=72,1$; $n_{B73\ WT}=18$; $p_{B73}<0,0001$; s. Supplement Tab. 32). Auch im Mo17-Hintergrund war

die Anzahl der Ährchen in diesem Segment bei CT2-LOF-Pflanzen ($\bar{x}_{M017\ ct2}=97,3$; $n_{M017\ ct2}=16$) signifikant höher als bei WT-Pflanzen ($\bar{x}_{M017\ WT}=44,1$; $n_{M017\ WT}=20$; $p_{M017}<0,0001$; s. Supplement Tab. 32). Diese Analyse lässt darauf schließen, dass das *ct2*-Ref.-Allel in beiden genetischen Hintergründen eine ähnliche Änderung des Phänotyps der männlichen generativen Organe bewirkt.

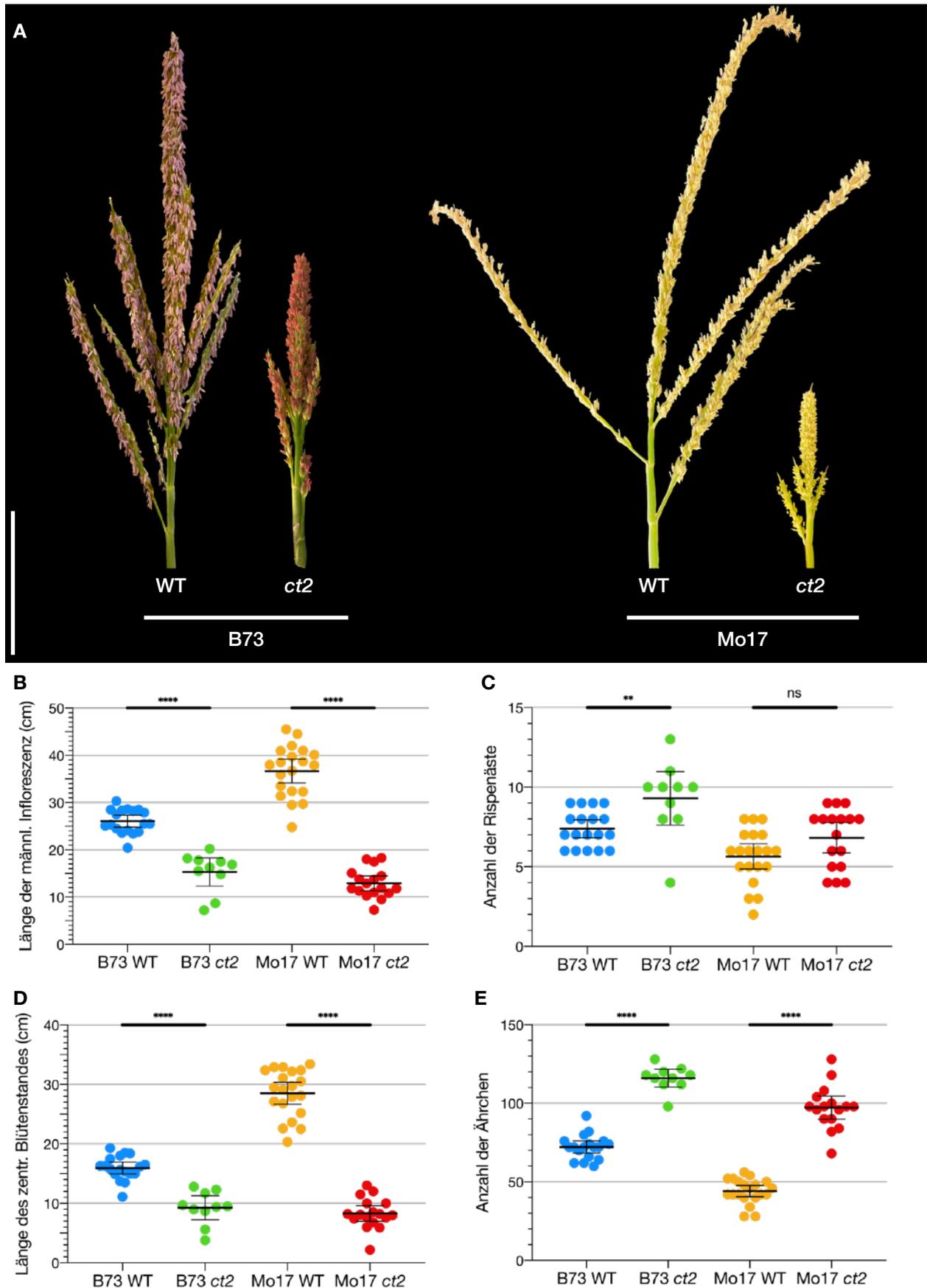


Abbildung 29: Der Einfluss des *ct2*-Ref.-Allels auf die männliche Infloreszenz von Pflanzen in verschiedenen genetischen Hintergründen

Abbildung 29: Der Einfluss des *ct2*-Ref.-Allels auf die männliche Infloreszenz von Pflanzen in verschiedenen genetischen Hintergründen

A Die männlichen Infloreszenzen von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund. Es ist zu erkennen, dass die Infloreszenzen von CT2-LOF-Pflanzen kürzer waren und eine höhere Dichte von Ährchen besaßen. Der Maßstabsbalken zeigt 10 cm an. **B** Quantifizierung der Länge der männlichen Infloreszenz von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund. CT2-LOF-Pflanzen besaßen signifikant verkürzte männlichen Infloreszenzen (jeweils $p < 0,0001$). Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an. **C** Quantifizierung der Anzahl der Rispenäste der männlichen Infloreszenz von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund. Das *ct2*-Ref.-Allel bewirkte im B73-Hintergrund eine signifikante Erhöhung der Anzahl der Rispenäste ($p_{B73} = 0,0033$), nicht jedoch im Mo17-Hintergrund ($p_{Mo17} = 0,0588$). Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an. **D** Quantifizierung der Länge des zentralen Blütenstandes der männlichen Infloreszenz von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund. Der zentrale Blütenstand war bei CT2-LOF-Pflanzen unabhängig vom genetischen Hintergrund jeweils signifikant verkürzt (jeweils $p < 0,0001$). Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an. **E** Quantifizierung der Ährchen von 5 cm des zentralen Blütenstandes der männlichen Infloreszenz von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund. Die Anzahl der Ährchen im analysierten Bereich war bei CT2-LOF-Pflanzen unabhängig vom genetischen Hintergrund jeweils signifikant erhöht (jeweils $p < 0,0001$). Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an.

CT2-LOF-Pflanzen zeigten im Mo17-Hintergrund eine deutliche Änderung des Phänotyps der weiblichen Infloreszenzen. Die Analyse der weiblichen generativen Organe der Pflanzen zeigte im B73-Hintergrund die bereits beschriebene Änderung des Phänotyps (s. Supplement Abb. 42) [1]. Die Kolben von CT2-LOF-Pflanzen wiesen eine massive Fasziation auf, einhergehend mit einer signifikanten Erhöhung der Körnerreihen ($\emptyset_{B73} WT = 8,1$; $n_{B73} WT = 11$; $\emptyset_{B73} ct2 = 10,5$; $n_{B73} ct2 = 11$; $p_{B73} < 0,0001$; s. Abb. 30D; s. Supplement Tab. 33). Die Anzahl der Körner pro Reihe war bei CT2-LOF-Pflanzen dagegen leicht, aber nicht signifikant erhöht ($\emptyset_{B73} WT = 33,6$; $n_{B73} WT = 10$; $\emptyset_{B73} ct2 = 38,6$; $n_{B73} ct2 = 11$; $p_{B73} = 0,1111$; s. Abb. 30E; s. Supplement Tab. 34). Im Mo17-Hintergrund ist auffällig, dass die Kolben keine Fasziation aufwiesen ($n_{Mo17} ct2 > 30$; s. Abb. 30A/C). Dass die Architektur der Kolben dennoch kongruent zum B73-Hintergrund verändert war, zeigt die erhöhte Anzahl der Körnerreihen ($\emptyset_{Mo17} WT = 4,5$; $n_{Mo17} WT = 13$; $\emptyset_{Mo17} ct2 = 6,0$; $n_{Mo17} ct2 = 12$; $p_{Mo17} < 0,0001$; s. Abb. 30D; s. Supplement Tab. 33). Außerdem war die Anzahl der Körner pro Reihe signifikant erhöht ($\emptyset_{Mo17} WT = 33,3$; $n_{Mo17} WT = 12$; $\emptyset_{Mo17} ct2 = 42,7$; $n_{Mo17} ct2 = 12$; $p_{Mo17} = 0,0012$; s. Abb. 30E; s. Supplement Tab. 34). Dies stellte einen spezifischen Unterschied des durch das *ct2*-Ref.-Allel ausgelösten Phänotyps dar und kann nur durch den unterschiedlichen genetischen Hintergrund erklärt werden. Diese Suppression des Fasziations-Phänotyps könnte auf einen natürlichen *Modifier* hindeuten, der eine andere Expression im Mo17-Haplotyp als im B73-Haplotyp aufweist. Dieser putative *Modifier* scheint eine Rolle in der Regulation des IM innezuhaben. Der Mo17- kann sich zum B73-Haplotyp in der An- bzw. Abwesenheit bzw. des Transkriptlevels des *Modifiers* unterscheiden.

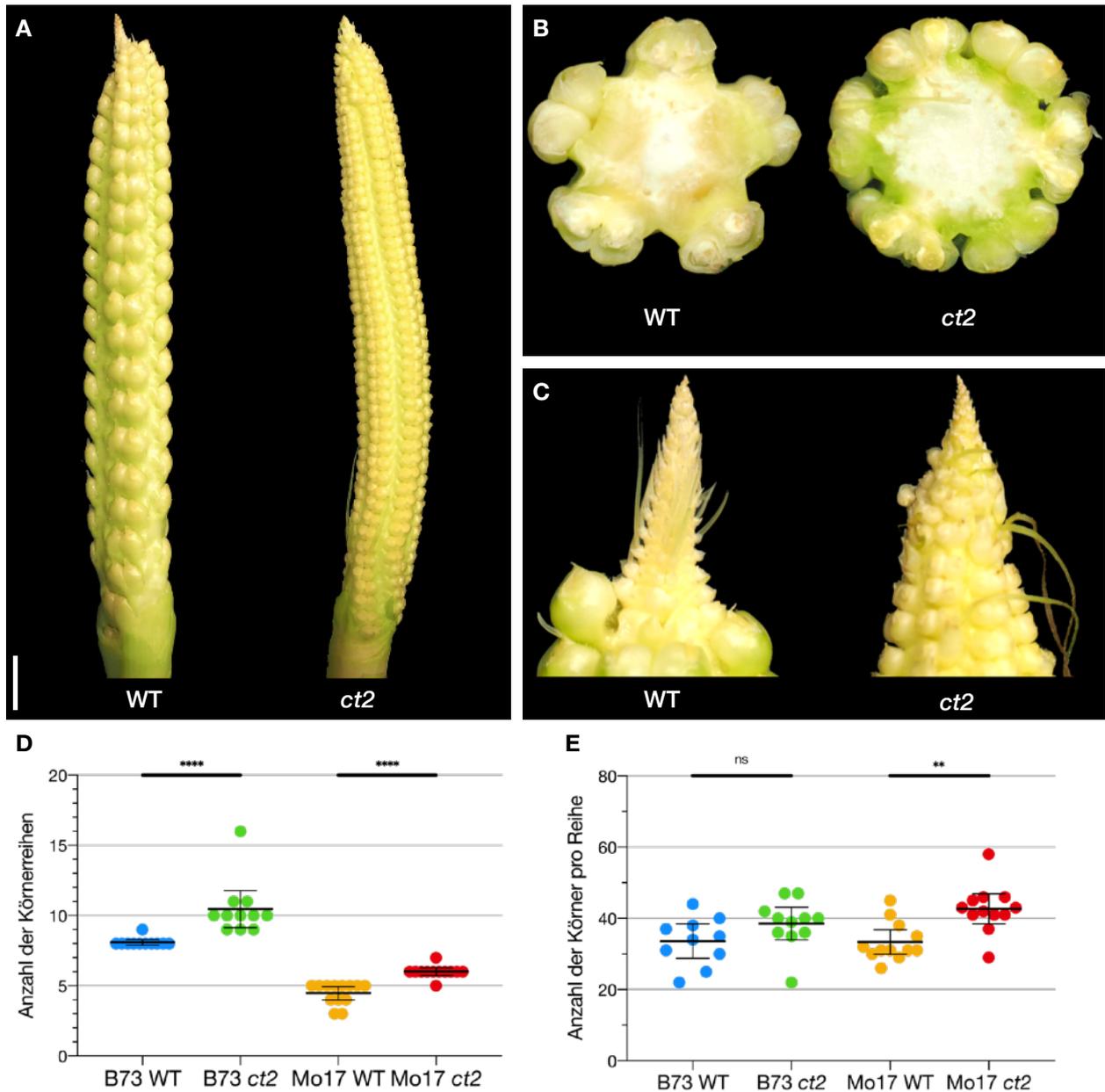


Abbildung 30: Der Einfluss des *ct2*-Ref.-Allels auf die weibliche Infloreszenz von Pflanzen im Mo17-Hintergrund

A Unbestäubte weibliche Infloreszenzen von WT- und CT2-LOF-Pflanzen. Die Kolben von CT2-LOF-Pflanzen zeigten phänotypische Unterschiede zu denen von WT-Pflanzen. Der Maßstabsbalken zeigt 1 cm an. B Die Kolben von CT2-LOF-Pflanzen zeigten eine erhöhte Anzahl an Körnerreihen im Vergleich zu den Kolben von WT-Pflanzen. C Die Kolben von CT2-LOF-Pflanzen zeigten keine Fasziation. D Quantifizierung der Anzahl der Körnerreihen von WT- und CT2-LOF-Pflanzen in verschiedenen genetischen Hintergründen. Das *ct2*-Ref.-Allel bewirkte unabhängig vom genetischen Hintergrund eine jeweils signifikante Erhöhung der Anzahl der Körnerreihen (jeweils $p < 0,0001$). Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an. E Quantifizierung der Anzahl der Körner pro Reihe von WT- und CT2-LOF-Pflanzen in verschiedenen genetischen Hintergründen. Im B73-Hintergrund war die Anzahl der Körner pro Reihe bei CT2-LOF-Pflanzen im Vergleich zu WT-Pflanzen nicht signifikant verändert ($p_{B73} = 0,1111$). Im Mo17-Hintergrund war die Anzahl der Körner pro Reihe bei CT2-LOF-Pflanzen signifikant höher als bei WT-Pflanzen ($p_{Mo17} = 0,0012$). Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an.

Diskussion

„**E**x uno plura“ (dt.: „Aus Einem vieles“) könnte den Vorgang beschreiben, bei dem das Untersuchen eines einzelnen Bausteins viele Information über verschiedene Prozesse eines komplexen Organismus erbringen kann. Im Laufe dieser Arbeit wurde genau dies getan, die kanonische G α -Untereinheit von *Z. mays*, COMPACT PLANT2 (CT2), wurde mithilfe unterschiedlicher Methoden analysiert, um Einblick in verschiedene Aspekte der Entwicklung einer Maispflanze zu gewinnen.

Ziel dieser Arbeit war es, das Protein CT2 mit Hinblick auf nicht-kanonische Funktionen und potenzielle Interaktionspartner zu untersuchen, um dessen Wirkungsweise außerhalb der CLAVATA-WUSCHEL-Signaltransduktion verstehen zu können. So konnten zu Beginn dieser Arbeit neue Erkenntnisse über die gewebespezifische und subzelluläre Lokalisierung von CT2 gewonnen werden, welche eine Rolle CT2s in der Dynamik von Mikrotubuli indizierten.

Mikroskopische und biochemische Analysen zeigten jedoch, dass weder in CT2-*loss-of-function* (LOF)-Mutanten die Dynamik oder die Struktur der cMTs offensichtlich verändert waren, noch dass CT2 *in vitro* mit MTs interagiert. Die stattdessen ausgemachten Evaginationen der PM indizierten einen veränderten Phospholipid-Stoffwechsel. Infolgedessen wurde die potenzielle Interaktion von CT2 mit PLDAs untersucht.

Die mikroskopische Analyse der putativen Interaktion von CT2 mit ausgewählten PLDAs erbrachte Evidenzen für eine Interaktion der PLDAs mit CT2 in Abhängigkeit des DRY-Motivs. Die biochemische Analyse indizierte zusätzlich, dass PLDAs die GTPase-Aktivität von CT2 positiv beeinflussen können. Die erwarteten Unterschiede des PA-Levels von CT2-LOF-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen konnten nicht festgestellt werden.

Es konnte ebenfalls nicht festgestellt werden, dass CT2-LOF-Pflanzen auf die Applikation von ABA oder IAA anders reagierten als WT-Pflanzen. Allerdings wurde gezeigt, dass der durch *ct2*-Ref.-Allel hervorgerufene Phänotyp im Mo17-Hintergrund partiell von dem bereits beschriebenen abwich, was auf eine Beeinflussung des *Plastochrons* hindeuten könnte.

Auf diesen Funden basierend soll die folgende Diskussion geführt werden.

Die gewebespezifische Lokalisierung von CT2 deutet auf distinkte Funktionen der jeweiligen Isoform hin. Die durchgeführten Lokalisierungsstudien der stabilen Reporterlinie von CT2 zeigten, dass unter dem endogenen Promoter exprimiertes CT2-YFP in verschiedenen Geweben von *Z. mays* eine jeweils spezifische Lokalisierung aufwies (s. Abb. 4). In jüngeren, meristematischen Geweben lag eine Lokalisierung an der Plasmamembran (PM) vor, während in älteren, differenzierten Geweben zusätzlich eine nukleäre und cytoplasmische Lokalisierung zu

erkennen war. Dies ist kongruent zu bereits veröffentlichten Daten, die Lokalisierung an der Membran wurde mit mikroskopischen und zusätzlich mit biochemischen Methoden nachgewiesen [1]. In den veröffentlichten Abbildungen ist ebenfalls die nukleäre und cytoplasmische Lokalisierung zu erkennen [1]. Die darauf folgende *in silico*-Analyse zeigte wiederum, dass CT2 zwei Startcodons enthält (entsprechen M₁ und M₁₁), deren jeweilige Nutzung als translationeller Start die Biosynthese zweier Isoformen von CT2 bewirkt, einer längeren und einer N-terminal verkürzten. Die für diese Arbeit durchgeführte Analyse von transient exprimierten CT2-YFP-Substitutionsvarianten zeigte, dass nur CT2_{ΔM1}-YFP ausschließlich an der PM lokalisierte, während CT2_{M11V}-YFP und sämtliche nicht-posttranslational modifizierbaren Substitutionsvarianten beider Isoformen eine zusätzliche Lokalisierung im Kern und im Cytosol aufwiesen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass in meristematischen Geweben die Expression von CT2_{ΔM1} überwiegt, während in differenzierten Geweben I.) zusätzlich bzw. ausschließlich die N-terminal verlängerte Isoform von CT2 exprimiert oder II.) CT2_{ΔM1} nicht bzw. nur teilweise posttranslational modifiziert wird. Unter der Prämisse, dass alle Lebewesen nach energetischer Optimierung streben [186], muss davon ausgegangen werden, dass die gewebespezifische Lokalisierung von CT2 die energetisch optimale Lösung einer für die Pflanze bestehenden Notwendigkeit darstellt. Isoform-spezifische Lokalisierungen sind bereits von anderen Proteinen von *Z. mays* bekannt. Dies dient z. B. der Determinierung der spezifischen Funktionen von verschiedenen Isoformen der 9-LIPOXYGENASE (9-LOX). Die unterschiedlichen Isoformen dieses Proteins haben distinkte Funktionen, deren Ausführung durch die spezifische Lokalisierung unterstützt wird [187]. Insofern kann man annehmen, dass die gewebespezifische Lokalisierung von CT2 auf distinkte Funktionen der jeweiligen Isoform hindeutet.

Eine gewebespezifische Lokalisierung kann durch verschiedene Ebenen der Regulation erreicht werden. Zunächst soll betrachtet werden, wie die gewebespezifische Lokalisierung von CT2 erreicht werden kann. Dies wäre auf verschiedenen Regulationsebenen möglich, zu nennen wären I.) die Ebene der Transkription, II.) die Ebene der Translation und III.) die Ebene der posttranslationalen Modifikation.

Es wäre möglich, eine gewebespezifische Lokalisierung durch Regulationsmechanismen der Transkription bzw. der Translation zu erreichen. Es ist bekannt, dass die transkriptionelle Nutzung unterschiedlicher Startcodons innerhalb eines *Open Reading Frames* (ORFs) unterschiedliche daraus entstehende Isoformen des Proteins zur Folge haben kann [188]. Ebenso ist bekannt, dass die Translation verschiedener Protein-Isoformen durch die spezifische Nutzung der verschiedenen AUG-Codons der mRNA erreicht werden kann. Dabei wird die translationelle Favorisierung bestimmter AUG-Codons durch den umgebenden Basenkontext bewirkt. Dies dient in Pflanzen der Feinabstimmung der Expression [189]. Im Fall von CT2

hieße dies konkret, dass bei der transkriptionellen und translationellen Nutzung des ersten Startcodons eine Isoform von CT2 entsteht, die, selbst bei vollständiger posttranslationaler Modifikation, im Nukleus, im Cytosol und an der Zellperipherie lokalisiert. Bei der Nutzung des zweiten Startcodons entsteht eine Isoform, die bei vollständiger posttranslationaler Modifikation nur an der PM lokalisiert. Diese beiden möglichen Regulationsmechanismen würden also eine gewebespezifische Lokalisierung der Isoformen von CT2 bewirken können. Zugleich würde dies eine für den Organismus energetisch vorteilhafte Form der Regulation darstellen.

Es wäre wahrscheinlich, dass eine gewebespezifische Lokalisierung durch Regulationsmechanismen der posttranslationalen Modifikation erreicht wird. Die subzelluläre Lokalisierung von CT2 kann auch durch die unterschiedlichen Möglichkeiten der N-terminalen Modifikation beeinflusst werden kann. Dieses Phänomen ist im Allgemeinen bereits von anderen eukaryotischen Proteinen bekannt und auch von G α -Untereinheiten im Speziellen weiß man, dass posttranslationale Modifikationen von Bedeutung für die Lokalisierung und damit für die Funktion sind [107, 190, 191]. Die G α -Untereinheit von *A. thaliana* (AtGPA1) benötigt eine Myristoylierung und eine Palmitoylierung des N-Terminus für die Lokalisierung an der PM [89, 192]. Die korrekte Lokalisierung von AtGPA1 ist mutmaßlich für die Bildung des Heterotrimer mit der β - und der γ -Untereinheit mitverantwortlich und daher von großer Wichtigkeit für die Funktion der Signaltransduktion [89, 193, 194]. Es wurde spekuliert, ob diese posttranslationalen Modifikationen eine zusätzliche Ebene der Regulation darstellen, die die Spezifität der G Protein-vermittelten Signaltransduktion erhöhen [89, 195]. Die in dieser Arbeit gefundenen Evidenzen deuten darauf hin, dass dies auch auf CT2 zutreffen kann. So wäre es möglich, dass in jedem Gewebe und jedem Zellentwicklungsstadium die N-terminal verkürzte Isoform von CT2 exprimiert wird, die gewebespezifisch myristoyliert bzw. palmitoyliert wird, was zu verschiedenen subzellulären Lokalisierungen führen würde (analog zu den nicht modifizierbaren Substitutionsvarianten). Die Palmitoylierung kann hierbei eine wichtige Ebene der Regulierung der Signaltransduktion von G Proteinen darstellen [196]. Die Palmitoylierung von Proteinen geschieht über die kovalente Verknüpfung Palmitinsäure (*Palmitat*, C16:0) mit Cysteinresten und ist reversibel [194]. Allerdings scheint die gewebespezifische Palmitoylierung nicht wahrscheinlich zu sein, da 28 von 38 bekannten PROTEIN S-ACYL TRANSFERASEN (PATs) von *Z. mays* ein hohes Transkriptionslevel in den jeweils untersuchten Entwicklungsstadien zeigten [197] und die Annahme, dass PATs nicht substratspezifisch sind, gemeinhin akzeptiert ist [194]. Allerdings könnte die Regulierung der Lokalisierung über das Entfernen der Palmitoylierung stattfinden. Von tierischen G α -Untereinheiten ist bereits bekannt, dass die Prozesse der Palmitoylierung und Depalmitoylierung zyklisch stattfinden [198, 199]. Die gewebespezifische Depalmitoylierung würde die ausschließliche PM-Lokalisierung verhindern und zu einer Lokalisierung führen, die derjenigen von CT2 $_{\Delta M1/C15S}$ -YFP entspräche. Auch die Myristoylierung, also die ko-

valente, irreversible Verknüpfung eines Proteins mit Myristinsäure (*Myristat*, C14:0), kann eine solche Ebene der Regulierung darstellen. Es ist bekannt, dass über 1,7 % des *A. thaliana*-Proteoms myristoyliert werden [200], dies ist also ein wichtiger pflanzlicher Regulation der subzellulären Lokalisierung und Funktion von Proteinen. Die Myristoylierung wird in Pflanzen durch die Enzyme *N-MYRISTOYLTRANSFERASE1* und *-2* (NMT1 und NMT2) katalysiert [200]. Der AtNMT1-Promoter zeigte in *A. thaliana* eine hohe transkriptionelle Aktivität sowohl in metabolisch aktiven Bereichen der vegetativen Organe, als auch in den Spitzen der Triebe und Wurzeln, während der AtNMT2-Promoter Meristem-spezifisch zu sein schien und eine hohe Aktivität in den generativen Organen zeigte [200]. Die LOF-Mutante von AtNMT1 zeigte nach der Keimung einen Entwicklungsstillstandsphänotyp, der mit der Fehlbildung des Sproßapikalmeristems (SAM) in Verbindung gebracht wurde. In Einklang mit der beobachteten gewebespezifischen Transkription des Gens zeigte die LOF-Mutante von AtNMT2 eine Verzögerung des Blühens, den Autoren zufolge indizierte dies eine Steuerung des Übergangs von vegetativem zu floralen Stadium der Blüten durch AtNMT2. Diese Analysen führten zu dem Schluss, dass die AtNMTs eine Substratspezifität aufweisen, die dazu führen kann, dass in verschiedenen Geweben jeweils verschiedene Proteine posttranslational modifiziert werden können. Sofern dies auch auf *Z. mays* zutrifft, kann dies dazu führen, dass CT2 in meristematischen Geweben myristoyliert wird, in differenzierten Geweben aber nicht. Diese fehlende Myristoylierung kann bereits dazu führen, dass das Protein nicht mehr ausschließlich an der PM lokalisiert, wie die mikroskopische Analyse von CT2_{ΔM1/G12A}-YFP zeigte. Diese beiden Möglichkeiten der posttranslationalen Modifikation stellen also für die Pflanze eine Möglichkeit der Regulation der subzellulären Lokalisierung von CT2 dar.

Um den Regulationsmechanismus der gewebespezifischen Lokalisierung von CT2 zu verstehen, sind weitere Analysen notwendig. Die Spekulationen um den Regulationsmechanismus der subzellulären Lokalisierung von CT2 könnten beendet werden, indem weitere Untersuchungen durchgeführt werden. So könnten die in verschiedenen Geweben verwendeten Startcodons auf der Ebene der RNA mittels *Ribosome Profiling* analysiert werden [201, 202]. Auf Proteinebene wäre dies mittels biochemischer Anreicherung der N-Termini und darauf folgender *Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung* (*liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, LC-MS-MS) möglich [203]. Eine genaue Analyse ob und wie CT2 in differenzierten Geweben posttranslational modifiziert wird, wäre mithilfe massenspektroskopischer (Tandem-MS) oder biochemischer Methoden (wie beschrieben von Zhao & Jensen, 2009) möglich [204, 205]. Die eleganteste Form der Analyse wäre aber die Komplementation von CT2-LOF-Pflanzen mit den substituierten Varianten von CT2. Dies würde zeigen, für welche Stadien der Entwicklung einer Maispflanze die jeweilige Isoform verantwortlich wäre. Auch wenn diese Art der Analyse bereits für andere Substitutionsvarianten von CT2

durchgeführt wurde [18], stellt die Transformation von insgesamt acht Substitutionskonstrukten jedoch eine beträchtliche zeitliche und auch finanzielle Herausforderung dar, sodass die Kosten-Nutzen-Relation abgeschätzt werden sollte. All die aufgeführten Untersuchungen ließen Rückschlüsse auf den Regulationsmechanismus der subzellulären Lokalisierung und damit mutmaßlich der Funktion von CT2 zu. Im Allgemeinen könnten so weitere Einblicke in den Mechanismus der Regulation distinkter Funktionen von Protein-Isoformen im Reich der Pflanzen gewonnen werden. Im Folgenden soll die Bedeutung der gewebespezifischen Lokalisierungen von CT2 eruiert werden.

Die ausschließliche Lokalisierung von CT2 an der Plasmamembran in meristematischen Zellen verdeutlicht dessen Wichtigkeit für die CLAVATA-Signaltransduktion. In meristematischen Zellen wies CT2-YFP eine Membranlokalisierung auf. Diese Lokalisierung konnte nur erreicht werden, indem die N-terminal verkürzte Isoform (CT2_{ΔM1}-YFP) sowohl myristoyliert als auch palmitoyliert werden konnte. Eine zweifache Palmitoylierung bzw. nur eine dieser Modifikationen schien nicht ausreichend für die Fixierung an der Membran zu sein. Um Proteine posttranslational zu modifizieren muss eine Zelle Energie aufwenden [90]. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die Zelle Proteine nur dann posttranslational modifiziert, wenn dies notwendig ist. Insofern indiziert diese gewebespezifische Lokalisierung von CT2, dass in meristematischen Geweben die Membranlokalisierung von Bedeutung ist. Dies ist in Einklang mit der bereits bekannten Funktion in der CLAVATA-Signalübertragung [1]. Es wurde gezeigt, dass CT2 mit ZmFEA2 interagieren kann, um das restriktive ZmCLE7-Signal zu transduzieren, das die Wuschel-Aktivität supprimiert und damit die Überproliferation der Stammzellnische verhindert [1, 21, 206]. Diese WUSCHEL-CLAVATA-Feedback-Loop ist essentiell für die Entwicklung des Sprosses der Maispflanze [28]. CT2 übernimmt eine tragende Rolle in der Signalübertragung des CLE-Signals (CLAVATA3-Ortholog) [1, 21], dies verdeutlicht die Wichtigkeit der Membran-assoziierten Isoform von CT2. Alle bisher untersuchten pflanzlichen Gα-Untereinheiten haben die Lokalisierung an der PM in meristematischen Geweben gemeinsam, diese wird daher als kanonisch angesehen. So wurde für die Gα-Untereinheit aus *A. thaliana* (GPA1) mittels immunhistochemischer Methoden in teilungsaktiven Zellen der Wurzelspitze von *A. thaliana* und mittels heterologer Expression von GPA1 in Protoplasten von *Vigna unguiculata* (L.) die Lokalisierung an der PM gezeigt [89, 162]. Auch für die Gα-Untereinheit von *O. sativa* wurde die Lokalisierung an der PM nachgewiesen [191]. Im Verlauf dieser Arbeit konnte also gezeigt werden, dass die, für die Entwicklung einer Maispflanze essentielle, Lokalisierung von CT2 nur dann erfüllt werden konnte, wenn die N-terminal verkürzte und vollständig translational modifizierte Isoform von CT2 vorlag. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit der posttranslationalen Modifikationen für die Entwicklung von *Z. mays*-Pflanzen.

Die nukleäre Lokalisierung von CT2-YFP in differenzierten Geweben indiziert **zusätzliche, nicht-kanonische und noch nicht bekannte Funktionen des Proteins**. In differenzierten Geweben wies CT2-YFP zusätzlich zu der PM-Assoziation eine Lokalisierung im Nukleus und im Cytosol der Zellen auf. Eine ähnliche Lokalisierung wiesen CT2_{M11V}-YFP und sämtliche nicht-posttranslational modifizierbaren Substitutionsvarianten beider Isoformen in den für diese Arbeit durchgeführten Lokalisierungsstudien auf. Die nukleäre Lokalisierung deutet auf einen aktiven Transport in den Kern hin, da CT2-YFP mit 75,7 kDa ein zu hohes Molekulargewicht aufweist, um passiv in den Kern zu diffundieren [207-209]. Ob jene Lokalisierung durch die *in silico* gefundene NLS bewirkt wird, muss noch experimentell belegt werden, z. B. unter Verwendung von Deletionskonstrukten. Ebenfalls eine nukleäre Lokalisierung zeigten die mittlerweile als *bona fide* G α -Untereinheiten etablierten EXTRA-LARGE G PROTEINS von *A. thaliana* (AtXLGs), es wurde über eine Funktion in der Regulation der Transkription spekuliert [210, 211]. Indikationen für die Richtigkeit dieser Spekulation wurden gefunden, indem *in vitro* gezeigt wurde, dass AtXLG2 mit dem nukleären Protein RELATED TO VERNALIZATION1 (AtRT-V1) interagieren und dessen Bindung an DNA verstärken konnte [212]. Interessanterweise schien die Lokalisierung der AtXLGs von dem jeweiligen Interaktionspartner abhängig zu sein [213]. In Bezug auf CT2 sind noch keine Interaktionspartner bekannt, die die nukleäre Lokalisierung unterstützen könnten. Eine Identifikation solcher wäre mittels einer IP/MS-Analyse mit der isolierten Fraktion der Nuklei des Blattgewebes der stabilen Reporterlinie möglich [214]. Bereits veröffentlichte Protokolle erlauben die Isolierung von Nuklei aus pflanzlichem Blattgewebe ohne Kontamination des endoplasmatischen Retikulums (ER) [215]. Die Analyse von möglichen interagierenden Proteinen könnte die offenstehende Frage beantworten, warum CT2 in differenzierten Geweben eine nukleäre Lokalisierung aufweist und neue, bisher nicht bekannte Interaktionspartner und Funktionen des Proteins aufzeigen.

In differenzierten Geweben könnte die cytoplasmische Lokalisierung von CT2 durch eine Interaktion mit ZmPLD α s unterstützt werden. In den durchgeführten Lokalisierungsstudien wies CT2-YFP in differenzierten Geweben eine cytoplasmische Lokalisierung auf. Über die Funktion dieses cytoplasmischen CT2 kann derzeit nur spekuliert werden. In tierischen Systemen wurde zwar über eine Translokation der aktivierten G α -Untereinheit in das Cytosol der Zelle spekuliert [216], in pflanzlichen Systemen konnte diese aber bisher nicht bestätigt werden. Für AtGPA1 aus *A. thaliana* ist die cytoplasmische Lokalisierung bekannt [31], wurde bisher jedoch nicht weiter untersucht. In Veröffentlichungen, welche die Lokalisierung von AtGPA1 thematisierten, wurde bereits über weitere Funktionen der G α -Untereinheit spekuliert, nämlich im Transport von Vesikeln oder in der Phytohormon-Signaltransduktion [162]. Auch mit den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten wurden Indikationen gefunden, die These einer zusätzlichen Funktion der G α -Untereinheit unterstützen. In Bezug auf CT2 gibt die im

Laufe dieser Arbeit untersuchte Interaktion mit PLD α 1 und - α 2 an der PM und im Cytosol (s. Kapitel *Phospholipasen beeinflussen die GTPase-Aktivität von CT2*) einen Hinweis auf eine mögliche Bedeutung. Sollte dies der Fall sein, könnte die cytoplasmische Lokalisierung durch die Interaktion mit den PLDAs mindestens unterstützt werden.

Die durchgeführten *semi-in vivo* Mikroskopieassays indizieren, dass CT2 an der PM mit ZmPLDAs interagieren kann und dass diese Interaktion vom DRY-Motiv der PLDAs abhängig ist. Ein Ziel dieser Arbeit war die putative Interaktion von CT2 mit ZmPLDAs zu untersuchen, um Interaktionspartner zu identifizieren und den mechanistischen Einfluss der *Phospholipasen Da* (*phospholipases Da*, ZmPLDAs) auf CT2 als *GTPase-aktivierende Proteine* (*GTPase accelerating proteins*, GAPs) zu untersuchen. Dies sollte helfen die Regulation bzw. die Termination der G Protein-vermittelten Signaltransduktion in *Z. mays* zu verstehen. Erste Indikationen einer potenziellen Interaktion dieser Proteine wurden von Bommert *et al.* gefunden, als bei IP/MS-Analysen Peptide einer ZmPLD α identifiziert wurden [1]. Für *A. thaliana* wurde publiziert, dass AtGPA1 und AtPLD α 1 interagieren und die Aktivität des jeweils anderen Proteins beeinflussen können [62, 71]. Die bei den cMT-Untersuchungen gefundenen Evaginationen der PM von CT2-LOF-Pflanzen (s. Kapitel *CT2 interagiert nicht mit Mikrotubuli*) könnten darauf hinweisen, dass sich eine ähnliche Situation in *Z. mays* darstellt. Daher wurde die putative Interaktion von CT2 mit PLD α 1 und - α 2 mithilfe verschiedener Techniken untersucht. Diese Untersuchungen wurden zunächst mithilfe des *Förster-Resonanzenergietransfer Akzeptor Bleaching* (*Förster resonance energy transfer acceptor bleaching*, FRET AB) und des *rationmetrischen Bimolekularen Fluoreszenz Komplementations* (*rationmetric bimolecular fluorescence complementation*, rBiFC) -Assays in der Peripherie der Zellen durchgeführt. Diese Mikroskopietechniken erlauben die Analyse einer möglicherweise bestehenden räumlichen Nähe der transient exprimierten Proteine. Für die durchgeführten Analysen wurden die cDNAs der untersuchten PLDAs mit derjenigen des Fluorophors *mCherry* vereinigt, was die transiente Expression von C-terminal *getaggten* Fusionsproteinen in *N. benthamiana* ermöglichte. Die C-terminale Fusion wurde gewählt, da bereits publiziert wurde, dass das C-terminale Fusionskonstrukt von AtPLD α 1 den durch die LOF-Mutation hervorgerufene phänotypische Veränderungen der Pflanzen komplementieren konnte [144]. Die mithilfe der hergestellten Konstrukte beobachtete Lokalisierung von ZmPLD α 1- und ZmPLD α 2-mCherry entsprach bereits veröffentlichten Daten zu AtPLD α 1-YFP [vgl. 144]. Des Weiteren indizierten bereits veröffentlichte Daten, dass die Substitution des DRY-Motivs von AtPLD α 1 zu der Verhinderung einer räumlichen Nähe, also mutmaßlich der Interaktion, mit der G α -Untereinheit führte [62, 71]. Aus diesem Grund wurden Substitutionsmutanten der untersuchten ZmPLDAs hergestellt und als Negativkontrolle verwendet (ZmPLD α 1 $_{\Delta$ DRY, ZmPLD α 2 $_{\Delta$ DRY). Diese zeigten die gleiche subzelluläre Lokalisierung wie die untersuchten nicht-substituierten Fusionsproteine (s. Abb. 15), es wurde

also von der Funktionalität der Proteine ausgegangen. Die Ergebnisse der im Laufe dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten, dass CT2 eine geringe räumliche Distanz zu PLD α 1 und PLD α 2 aufwies, was auf eine Interaktion schließen ließ. Diese räumliche Nähe bzw. Interaktion stand in Abhängigkeit des DRY-Motivs. Im Folgenden wird auf die Ergebnisse der Analysen der Interaktion von CT2 und PLD α 1 eingegangen. Es wird aber davon ausgegangen, dass sich die Schlussfolgerungen aufgrund der Sequenzhomologie auf alle anderen ZmPLDAs übertragen lassen.

Der durchgeführte FRET AB-Assay indizierte, dass ZmPLD α 1 eine geringere räumliche Distanz zu CT2 aufwies als die entsprechende Negativkontrolle. Der Mittelwert aller Messungen der FRET-Effizienz lag im Fall von CT2 und ZmPLD α 1 bei $E_{\text{FRET(CT2/PLD}\alpha\text{1)}}=5,32$ %. Dies entsprach einem kalkuliertem Abstand von $R_{\text{PLD}\alpha\text{1}}=85,44$ Å und deckt sich mit den Daten von Vasco Köhling [142]. Das verwendete Vektorsystem wurde bereits von Bleckmann *et al.* verwendet, um die putative Homodimerisierung verschiedener transient exprimierten LRR-RLKs von *A. thaliana* zu untersuchen [143]. Die veröffentlichten Werte sind mit bis zu 13,9 % deutlich höher. Tatsächlich wurde in jenen Experimenten als Schwellwert für eine geringe räumliche Distanz bzw. keine Interaktion eine FRET-Effizienz von 4,0 % definiert [143]. Der Mittelwert der für diese Arbeit gewonnenen Daten von CT2-GFP/PLD α 1-mCherry liegt nur knapp darüber. Trotzdem werden die gewonnenen Daten als Indikation für eine Interaktion angesehen, da sich einerseits die ermittelten Werte in einer Spanne von -4,90 % bis 27,03 % bewegten und andererseits der Mittelwert signifikant höher war als der Mittelwert der für CT2-GFP/PLD α 1 Δ DRY-mCherry gewonnenen Daten (Spanne $E_{\text{FRET(CT2/PLD}\alpha\text{1}\Delta\text{DRY)}}=-10,70$ % bis 8,92 %; $E_{\text{FRET(CT2/PLD}\alpha\text{1}\Delta\text{DRY)}}=0,60$ %, $p_{\text{PLD}\alpha\text{1}}<0,0001$; s. Supplement Tab. 6). Die Spanne bzw. Variation der FRET-Effizienz spiegelt die hohe Anzahl an denkbaren Abständen der Fluorophore und damit der untersuchten Proteine zueinander wider. Da es sich um ein dynamisches System in einer lebenden Zelle handelt, muss davon ausgegangen werden, dass CT2 und PLD α 1 alle Zustände zwischen „keine Interaktion“ und „Interaktion“ einnehmen können. Der errechnete Mittelwert gibt daher die Tendenz zu einer geringeren räumlichen Distanz als die verwendete Negativkontrolle wider. Dies wurde als grundsätzliche Tendenz zu einer Interaktion der untersuchten Proteine, abhängig vom Vorhandensein des DRY-Motivs, betrachtet.

Die Daten des rBiFC-Assays unterstützte die genannten Schlussfolgerungen und zeigte zusätzlich, dass eine Interaktion auch im Cytosol stattfinden kann. Um die mithilfe des FRET-AB-Assays gefundenen Indikationen zu überprüfen, wurde der rBiFC-Assay durchgeführt. Dieser erlaubt bei entsprechend geringer räumlicher Nähe die Rekonstitution eines in zwei Teile gespaltenen Fluorophors (YELLOW FLUORESCENT PROTEIN, YFP) und damit die Wiederherstellung der Fluoreszenzeigenschaften. Die Expressionskassette (s. Abb. 17A) des

benutzten Vektors [153] vermittelte neben der Expression der untersuchten Proteine, die Expression von RED FLUORESCENT PROTEIN (RFP). Der Vergleich der Werte der Emissionen beider Fluorophore erlaubte die ratiometrische Auswertung der Daten. So zeigte CT2-nYFP/PLD α 1-cYFP eine zum Signal von RFP relative Fluoreszenz von $F_{CT2/PLD\alpha1}=33,81$ %. Diese Daten wurden als Indikation einer Interaktion interpretiert, da die hier verwendete Negativkontrolle CT2-nYFP/PLD α 1 Δ DRY-cYFP durchschnittlich eine relative Fluoreszenz Ratio von $F_{CT2/PLD\alpha1\Delta DRY}=2,01$ % aufwies und der Unterschied signifikant war ($p_{PLD\alpha1}<0,0001$; s. Supplement Tab. 7). Außerdem reichte die Spanne der für CT2-nYFP/PLD α 1-cYFP gemessenen Werte von 7,46 % bis 150,22 %, während die Spanne von CT2-nYFP/PLD α 1 Δ DRY-cYFP von 0,56 % bis 10,40 % reichte. Ebenso wie bei dem durchgeführten FRET AB-Assay wird die Variation von CT2/PLD α 1 als Darstellung aller möglichen Zustände zwischen „Interaktion“ und „keine Interaktion“ interpretiert. Die mittels des rBiFC-Assays gewonnenen Daten ähneln den von Sabrina Walz (2020) gewonnenen Daten, auch diese indizierten eine vom DRY-Motiv der ZmPLD α s abhängige räumliche Nähe zu CT2 [152]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass mithilfe der durchgeführten Versuche Evidenzen für eine Interaktion der transient exprimierten Proteine von *Z. mays* gefunden werden konnten. Die Spannen der jeweils ermittelten Daten indizieren darüber hinaus, dass diese mutmaßliche Interaktion eine hohe Dynamik aufweist. Die Daten des für diese Arbeit durchgeführten rBiFC-Assays zeigten zusätzlich, dass die Interaktion von CT2 mit den ZmPLD α s auch im Cytosol stattfinden kann (s. Abb. 17B). Welchen funktionalen Einfluss die Anwesenheit von ZmPLD α s auf CT2 haben kann, soll im Folgenden behandelt werden.

Phospholipasen Das können die GTPase-Aktivität von CT2 erhöhen und damit wahrscheinlich *in planta* als GAP die Termination der durch die G α -Untereinheit vermittelten Signaltransduktion bewirken. Die G α -Untereinheit terminiert durch die inhärente GTPase-Aktivität die G Protein-vermittelte Signaltransduktion, indem GTP zu GDP und P_i hydrolysiert wird [39]. Pflanzliche G α -Untereinheiten weisen im Allgemeinen eine geringe GTPase-Aktivität auf. In Verbindung mit einer höheren Affinität zu GTP als zu GDP führt dies theoretisch zu einer permanenten Aktivierung des G Protein-Komplex [46, 56, 95]. Dies würde allerdings die Funktion der Signaltransduktion unterminieren. Diese These wird unterstützt durch die von Wu *et al.* publizierten Daten, die indizierten, dass die GTPase-Aktivität von CT2 einer engmaschigen Kontrolle unterliegen muss [18]. Der Phänotyp von CT2-LOF-Mutanten wurde nur partiell durch eine konstitutiv aktive Substitutionsvariante von CT2 komplementiert [18]. In Pflanzen kann die (offensichtlich wichtige) Termination der Signaltransduktion über die Beeinflussung der GTPase-Aktivität geschehen [57, 217]. Allerdings wurde in *Z. mays* bisher noch kein Interaktionspartner von CT2 identifiziert, der die GTPase-Funktion des Proteins beeinflussen konnte. Mit den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten wurde *in vitro* die Beeinflussung der

GTPase-Aktivität der G α -Untereinheit durch PLD α 1 gezeigt. Mit den durchgeführten GTPase-Assays ließ sich die in 40 min freigewordene Menge an P $_i$ quantifizieren. Die Anwesenheit von PLD α 1-Strep erhöhte die Menge des frei gewordenen P $_i$ innerhalb von 40 min um den Faktor 1,47 im Vergleich zu der Reaktion mit nur His $_6$ -CT2. Ebenso war die Ratenkonstante k , welche ein Maß für die Geschwindigkeit einer Reaktion ist [154], bei Anwesenheit von PLD α 1-Strep um den Faktor 2,09 erhöht ($k_{CT2}=0,02080$; $k_{CT2/PLD\alpha1}=0,04345$). Diese Daten indizieren, dass ZmPLD α 1 die GTPase-Aktivität von CT2 positiv beeinflussen konnte. Dies deckt sich mit den von Sabrina Walz gewonnenen Daten [152] und macht ZmPLD α 1 zu einem *GTPase Accelerating Protein* (GAP). Damit stellt ZmPLD α 1 den ersten beschriebenen GAP in *Z. mays* dar, was die bisher offenstehende Frage nach einer Regulation der G α -abhängigen Signaltransduktion beantwortet.

In unterschiedlichen Geweben könnte CT2 mit spezifischen ZmPLDAs interagieren. Da publizierte Daten zeigen, dass nicht nur die GTPase-Aktivität der G α -Untereinheit von PLD α beeinflusst wird, sondern auch *vice versa* [62], soll nun die Bedeutung der indizierten komplexen Interaktion eruiert werden. Die Analyse von mRNA-Sequenzierungsdaten [32] zeigte, dass die Transkriptionslevel der ZmPLDAs gewebespezifisch sind. In unterschiedlichen Geweben wiesen jeweils spezifische ZmPLDAs Transkriptionsmaxima auf. Chen *et al.* publizierten, dass die verschiedenen ZmPLDAs in verschiedenen Geweben eine jeweils spezifische Erhöhung des Transkriptionslevels als Reaktion auf abiotischen Stress aufwiesen. Beispielsweise erhöhte simulierter Trockenstress das Transkriptionslevel von PLD δ 2 und - δ 3 in den Wurzeln, während Salzstress zu einem erhöhten Transkriptionslevel von PLD α 6 und - α 7 führte [72]. Dies bekräftigte, dass die verschiedenen PLDAs distinkte Funktionen erfüllen [72, 122]. Phospholipasen D sind *in planta* für die Produktion des *Second Messengers Phosphatidsäure* (*phosphatidic acid*, PA) mitverantwortlich [122]. Es wurde gezeigt, dass PLDAs und PA in der Entwicklung, dem Wachstum und der Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress wirken können [64-66, 123, 124, 218]. Des Weiteren ist bekannt, dass die Anwesenheit der G α -Untereinheit die Aktivität einer PLD α hemmen kann [62]. Es ist auch bekannt, dass die PLD α 1-Aktivität in tierischen Systemen einer strengen Kontrolle unterliegt [219]. Der Nachweis der Beeinflussung der ZmPLD α -Aktivität durch CT2 steht noch aus. Sollte diese wechselseitige Beeinflussung jedoch auch in *Z. mays* geschehen, könnte dies eine auf eine Regulierung der PLD α -katalysierten Produktion von PA hindeuten. Die ubiquitär vorhandene G α -Untereinheit könnte also die pflanzliche Reaktion auf eine Vielzahl verschiedener Faktoren beeinflussen. Dies könnte einer der Gründe sein, weswegen CT2-LOF-Mutanten einen solch pleiotropen Phänotyp zeigen, ohne dass bisher andere als Meristem-spezifische Interaktionspartner und Pfade der Signaltransduktion charakterisiert wurden.

Lokale, subzelluläre PA-Maxima könnten die beobachteten Evaginationen hervorgerufen haben. Die These, nach der CT2 in der Kontrolle der PA-Synthese wirkt, wird durch die in CT2-LOF-Zellen beobachteten Evaginationen der PM unterstützt. Das Produkt der ZmPLD α s, PA, ist kegelförmig und dazu in der Lage die Krümmung von Membranen zu beeinflussen [220, 221]. Aus tierischen Systemen ist bekannt, dass durch PLD α 1 produziertes PA die Exozytose positiv beeinflusst [219]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass PLD α 2 (von *H. sapiens*) in die Biogenese von extrazellulären Vesikeln involviert ist [222]. In CT2-LOF-Pflanzen entfällt die mutmaßliche Hemmung der ZmPLD α s durch CT2. Daher wurde die These aufgestellt, dass die Ausbildung der beobachteten Evaginationen von CT2-LOF-Zellen in der Expansionszone von Blättern durch einen erhöhten PA-Gehalt bewirkt wurden (s. Kapitel *CT2 interagiert nicht mit Mikrotubuli*). Die Untersuchungen des PA-Gehalts von WT- und CT2-LOF-Pflanzen zeigten allerdings keine signifikanten Unterschiede im Sproß der untersuchten Pflanzen (s. Kapitel *Phospholipasen beeinflussen die GTPase-Aktivität von CT2*). Dies könnte darin begründet liegen, dass der PA-Gehalt von unterschiedlichen Stoffwechselwegen beeinflusst wird und die Erhöhung des PA-Gehalts als Reaktion auf exogene Reize nur transient ist [123, 223]. Der Umsatz von PA zu anderen Stoffwechselprodukten geschieht in Pflanzen mit hoher Geschwindigkeit, da eine Akkumulation des PAs zelluläre Reaktionen hervorruft [224]. Diese Dynamik und die verwendete Masse, also die hohe Anzahl an einzelnen Zellen, können der Grund für die ähnlichen PA-Werte sein. Aus pflanzlichen Systemen ist jedoch bekannt, dass PA keine homogene Verteilung in der Zelle aufweist, sondern in verschiedenen subzellulären Kompartimenten unterschiedliche Funktionen hat [124, 225]. Demnach könnten lokale Maxima bestanden und die beobachteten Evaginationen hervorgerufen haben. Es wäre möglich, diese potenziellen lokalen Maxima zu zeigen, indem mithilfe von PA-spezifischen Antikörpern und darauf folgender Immunogold-Färbung das PA markiert und mithilfe der TE- oder der Kryoelektronenmikroskopie sichtbar gemacht wird. Die Sichtbarmachung und eine Quantifizierung der potenziellen heterogenen Verteilung wäre ebenfalls mit FRET-Biosensoren möglich, wie bereits von Nishioka *et al.* (2010, [226]) demonstriert wurde. Auch wäre es möglich die beobachteten Evaginationen mithilfe bereits veröffentlichter Protokolle zu isolieren [227, 228]. Zunächst könnte eine Quantifizierung des Volumens stattfinden und daraufhin eine Quantifizierung des PA-Gehalts jener Evaginationen. Dies würde weitere Einblicke in die Natur der Evaginationen erlauben und ebenso in deren biologische Signifikanz. Möglicherweise wäre es aber auch angebracht die durchgeführten Untersuchungen zu wiederholen, um die Ergebnisse zu verifizieren.

Der Phänotyp der Tripel-LOF-Mutante sollte in zukünftigen Untersuchungen analysiert werden. Die Analyse der biologischen Signifikanz der Interaktion von CT2 mit ZmPLD α s sollte im Rahmen dieser Arbeit durch die Untersuchung der LOF-Mutanten der ZmPLD α s gesche-

hen. Diese Pflanzen wiesen jedoch keinen offensichtlich veränderten Phänotyp auf, was mit dem Vorhandensein der jeweils anderen ZmPLDAs erklärt wurde. ZmPLDAs scheinen redundant zu sein, zumindest indiziert dies die hohe Anzahl von *Z. mays*-Phospholipasen (vgl. Supplement Abb. 37). Dies deutet auf die Wichtigkeit dieser hin. Sollten die multiplen Gene für Phospholipasen durch Genduplikationen entstanden sein, könnten diese für die Maiszucht von Bedeutung sein [229]. Auch in *A. thaliana* zeigte die PLD α 1-LOF-Mutante einen WT-Phänotyp [230]. Daher wurde mit der Herstellung einer Tripel-LOF-Mutante (*ct2*, *plda1*, *plda2*) begonnen. Aus zeitlichen Gründen konnte die Analyse der Tripel-Mutanten-Generation nicht durchgeführt werden. Trotzdem kann über das potenzielle Ergebnis dieses Experiments spekuliert werden. Vermutlich wird schon die Doppel-LOF-Mutante von ZmPLD α 1 und ZmPLD α 2 und einen veränderten Phänotyp aufweisen, da diese PLDAs in den für die Entwicklung der Pflanze wichtigen Geweben das höchste Transkriptionslevel aufwiesen [vgl. Daten von 32]. Die Doppel-LOF-Mutante dürfte die Redundanz dieser Proteine umgehen, sofern in diesem Fall nicht das Transkriptionslevel von PLD α 2 ausreicht oder die Transkription anderer ZmPLDAs erhöht wird. Wenn die untersuchten ZmPLDAs im SAM von Maispflanzen eine wesentliche Möglichkeit der Regulation der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion darstellen, dann wäre es möglich, dass deren Doppel-LOF-Mutante (*plda1*, *plda2*) einen Phänotyp ähnlich der transgenen Linie mit der konstitutiv aktiven Form von CT2 aufweist. Dieses Konstrukt komplementierte den Phänotyp von CT2-LOF-Pflanzen nur partiell in Bezug auf die Höhe und die vergrößerten Meristeme der Pflanzen [18]. Da ZmPLDAs und das durch sie produzierte PA jedoch einen wichtigen Bestandteil der Entwicklung, des Wachstums, der Phytohormon-Signaltransduktion und der Stressreaktion von Pflanzen darstellen [123, 124], sollte eine LOF-Mutante weitere phänotypische Eigenarten aufweisen. In *A. thaliana* ähnelte der Hypokotyl-Phänotyp der GPA1/PLD α 1-LOF-Mutante demjenigen von *gpa1*-Pflanzen [230]. Diese Epistase wurde damit begründet, dass die Funktion der Signaltransduktion von GPA1 entfällt, AtPLD α 1 also *upstream* von AtGPA1 wirkt [230]. Es könnte demnach sein, dass auch in *Z. mays* der Phänotyp der Tripel-LOF-Mutante dem Phänotyp der CT2-LOF-Mutante gleicht. Das Fehlen von CT2 hat gravierende Auswirkungen auf den Phänotyp von Maispflanzen, daher könnte es nicht von Bedeutung sein, dass zusätzlich noch die Regulatoren von CT2 wegfallen. Der stark ausgeprägte Phänotyp des CT2-LOF-Allels würde also den potentiellen Phänotyp der PLD α -Allele maskieren. Da ZmPLDAs allerdings wichtige Funktionen in vielen Bereichen der Entwicklung der Maispflanze haben (s. o.), könnte es aber auch sein, dass der Phänotyp der Tripel-LOF-Mutante noch stärker ausgeprägt ist, bis hin zur Letalität. Solch ein additiver Phänotyp könnte allerdings auch gegen eine Interaktion *in planta* sprechen. Dies kann jedoch nur überprüft werden, indem zukünftig die für diese Arbeit erstellten Populationen analysiert werden.

ZmPLDAs erweitern das regulatorische Netzwerk der G Protein-vermittelten Signaltransduktion in *Z. mays*. Die dargestellten Ergebnisse rechtfertigen die Aussage, dass die untersuchte putative Interaktion von CT2 mit den ZmPLDAs neue Einblicke in die G Protein-vermittelte Signaltransduktion erbrachte. Obwohl keine Veränderung des PA-Levels in CT2-LOF-Pflanzen festgestellt wurde, konnte eine Interaktion von CT2 mit ZmPLDAs gezeigt werden. Im Laufe dieser Arbeit wurde mithilfe von zwei verschiedenen Methoden bestätigt, dass CT2 und die untersuchten Phospholipasen PLD α 1 und PLD α 2 eine geringe räumliche Distanz zueinander aufwiesen, wenn die Proteine transient in Tabakblättern exprimiert wurden. Diese geringe Distanz ließ auf eine Interaktion schließen, auch wenn die Daten eine gewisse Dynamik dieser Interaktion indizieren. Die durchgeführten *in vitro* GTPase-Assays zeigten außerdem, dass PLD α 1 dazu in der Lage war die GTPase-Aktivität von CT2 zu erhöhen. Dies indiziert, dass PLDAs *in planta* als GAP wirken und damit die Signaltransduktion der G α -Untereinheit terminieren können. Für *Z. mays* war bisher nicht bekannt, welche Proteine die G Protein-vermittelte Signaltransduktion terminieren können, obwohl dies essentiell für die Entwicklung der Pflanze ist [18]. Die untersuchten ZmPLDAs stellen einen potenziellen Regulator der G Protein-vermittelte Signaltransduktion dar. Die im Laufe dieser Arbeit generierten Daten indizierten, dass die Aktivität der ZmPLDAs durch CT2 supprimiert werden könnte, da in CT2-LOF-Pflanzen Evaginationen der PM zu sehen waren. Diese Beeinflussung der Aktivität durch die G α -Untereinheit ist bereits von *A. thaliana* bekannt [62], und indiziert die Komplexität der G Protein-vermittelten Signaltransduktion. Daher werden in Zukunft weitere Daten benötigt, um mehr über das Zusammenspiel dieser Proteine in der Entwicklung von *Z. mays* zu erfahren.

Es konnte nicht gezeigt werden, dass CT2 die Mikrotubuli von *Z. mays* beeinflusst. Zusätzlich zu der cytosolischen und nukleären Lokalisierung wies CT2 eine Lokalisierung am mutmaßlichen Phragmoplast einer sich teilenden Blattzelle auf (s. Abb. 4C). Diese Lokalisierung indiziert ebenfalls eine nicht-kanonische Funktion der G α -Untereinheit. Der Phragmoplast, der Vorläufer der Zellwandplatte, ist eine Struktur, die eine Zelle, welche sich in der Karyokinese befindet, in zwei Zellen teilt. Es wurde bereits in *A. thaliana*-Zellen gezeigt, dass die G α -Untereinheit an einer Struktur akkumulierte, die wahrscheinlich den naszierenden Phragmoplast darstellte [58, 231]. Der Phragmoplast besteht aus Actin-Filamenten, Membran-Kompartimenten und assoziierten Proteinen, sowie aus Mikrotubuli (MTs) [109]. In tierischen Systemen wurde bereits gezeigt, dass die G α -Untereinheit von G Proteinen direkt an Tubulin binden kann [34, 232], in pflanzlichen Systemen gibt es dafür bisher noch keine Evidenzen. In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass weder CT2-GTP noch CT2-GDP *in vitro* an MTs band (s. Kapitel *CT2 interagiert nicht mit Mikrotubuli*). Da die Daten jedoch eine Interaktion von CT2s mit ZmPLDs indizierten (s. Kapitel *Phospholipasen beeinflussen die GTPase-Aktivität von CT2*), welche wiederum in anderen Pflanzenarten an MTs binden und

auch mit dem Phragmoplasten in mitotisch aktiven Zellen co-lokalisierten [144, 233-235], liegt die Vermutung nahe, dass PLDAs die Rekrutierung von CT2 an MTs unterstützen können. Allerdings wurde im Rahmen der Abschlussarbeit von Sabrina Walz gezeigt, dass heterolog produziertes ZmPLDa1 *in vitro* nicht an MTs band [152]. Da auch die Untersuchungen der cMTs in verschiedenen *Z. mays* WT und CT2-LOF-Geweben jeweils keinen Unterschied zeigten, wurde daraus geschlossen, dass CT2 weder die Orientierung, noch die Assemblierung oder Deassemblierung von cMTs beeinflusst (s. Kapitel *CT2 interagiert nicht mit Mikrotubuli*). Somit konnte der Blattphänotyp von CT2-LOF-Pflanzen noch nicht abschließend erklärt werden.

Weitere Versuche sind nötig um die nicht-kanonische Funktion von CT2 weiter zu untersuchen. 2014 zeigten Urano *et al.*, dass die Zellteilung in CT2-LOF-Blättern auf das basale Minimum verringert ist. Es wurde vermutet, dass bei NaCl-Stress eine Reaktion der Pflanzen die Suppression der Zellproliferation durch Inhibition der G α -Signaltransduktion sein könnte [33]. Dies würde bedeuten, dass die G α -Signaltransduktion im Normalfall die Zellproliferation positiv beeinflusst, was wiederum den Phänotyp von CT2-LOF-Pflanzen erklären würde. Um dies weitergehend zu analysieren, könnte zunächst die beobachtete Co-Lokalisierung von CT2 und MTs mittels immunhistochemischen Methoden erneut untersucht werden [vgl. 236]. Um weitergehend zu untersuchen welche Proteine mit CT2 an der Förderung der Zellteilung beteiligt sind, könnten potenzielle cytosolische Interaktionspartner mittels *Co-Immunpräzipitation/Massenspektrometrie-Analyse* (Co-IP/MS) identifiziert werden. Um auch schwache bzw. transiente Interaktionen zu identifizieren, könnten im Vergleich zu vorhergehenden Analysen dieser Art die Proteine des Proteinextraktes kovalent vernetzt werden (*cross-linking immunoprecipitation-MS*, xIP-MS) [237]. Es könnten Blattprimordien, interkalare Meristeme oder die Wurzelspitze der stabilen Reporterlinie untersucht werden, um potenzielle, an der Zellproliferation beteiligte Interaktionspartner von CT2 zu identifizieren. Um genetische Interaktionen zu untersuchen, könnte auch eine Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung dieser Gewebe durchgeführt werden. So kann das Transkriptom von CT2-LOF-Pflanzen mit demjenigen von WT-Pflanzen zu verglichen werden. Diese Analysen könnten weiteren Einblick in die nicht-kanonische Funktion von CT2 gewähren.

Um weitere Einblicke in die Funktion von CT2 zu erhalten, wurde dessen Rolle in der ABA- und IAA-Signaltransduktion untersucht. Eine potenzielle nicht-kanonische Funktion von CT2 wurde im Verlauf dieser Arbeit untersucht, nämlich dessen Einfluss auf die Phytohormon-Signaltransduktion. Die Frage, ob G Proteine eine durch Änderung der äußeren Einflüsse induzierte Phytohormon-Reaktion vermitteln, wurde bereits vor über 20 Jahren gestellt [238]. Mittlerweile wurden bereits viele Daten zu *A. thaliana* veröffentlicht, die eine Rolle von AtGPA1 in der Phytohormon-Signaltransduktion indizieren [168, 239-242]. Auch sind CT2-LOF-Pflanzen

durch einen Phänotyp gekennzeichnet, der ähnlich zu Pflanzen ist, die Defizite in der Produktion oder der Perzeption von Phytohormonen aufweisen [vgl. 161]. So können Pflanzen die Defekte der Biosynthese oder Signaltransduktion von Auxinen, BRs, GAs und Strigolactonen tragen, einen Zwergwuchs-Phänotyp aufweisen, da die Stamm- bzw. Internodien-Elongation hauptsächlich durch diese Phytohormone kontrolliert wird [77, 243-247]. Des Weiteren wurde für *A. thaliana* gezeigt, dass der Interaktionspartner AtPLD α 1 und dessen Stoffwechselprodukt PA eine Rolle in der Phytohormon-Signaltransduktion innehaben [64, 248-250]. Aufgrund der Summe dieser Indizien wurde die Rolle von CT2 in der Phytohormon-Signaltransduktion untersucht. Um die Rolle von Proteinen in der Synthese oder der Perzeption bzw. der Transduktion von Phytohormonen zu untersuchen, besteht ein gemeinhin anerkanntes Experiment darin, sowohl WT-Pflanzen als auch Mutanten mit dem in Frage kommenden Phytohormon zu behandeln und die jeweilige Reaktion der Pflanzen zu quantifizieren [251]. Zeigen Mutante und WT unterschiedliche Reaktionen, kann man daraus schließen, dass das untersuchte Protein an der Reaktion auf die Applikation des Phytohormons beteiligt ist. Für bestimmte Phytohormone wurde diese Art von Versuch bereits durchgeführt. So konnte bisher in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass CT2-LOF-Mutanten ein, im Vergleich zu WT-Pflanzen, nicht verändertes Wachstum nach Applikation von *Gibberellinsäure* (*gibberellic acid*, GA) und eines Brassinosteroids (*24-Epibrassinolid*) bzw. eines BR-Synthese-Inhibitors (*Propiconazol*) aufwiesen (unveröffentlichte Daten, Dr. Peter Bommert, Janna Varady). Daraus wurde geschlossen, dass CT2 nicht an der Perzeption oder Transduktion von GA oder BR beteiligt ist. Daher wurde für diese Arbeit der Einfluss anderer Phytohormone auf das Wachstum von CT2-LOF-Pflanzen untersucht, nämlich von *Abscisinsäure* (*abscisic acid*, ABA) und des Auxins *Indol-3-Essigsäure* (*indole-3-acetic acid*, IAA).

Die Daten indizieren, dass die Dysfunktionalität von CT2 keinen Einfluss auf die Reaktion der Pflanzen auf die exogene Applikation von ABA hat. Das Phytohormon ABA ist eins der am häufigsten untersuchten Phytohormone mit Bezug zur G Protein-vermittelten Signaltransduktion [252]. Um den Einfluss von ABA auf das Wachstum von WT- und CT2-LOF-Pflanzen zu untersuchen, wurde eine 1:1 segregierende Population mit den Wurzeln in hydroponischer Lösung kultiviert. Eine Hälfte der Pflanzen wurde mit 20 μ M ABA behandelt, die andere Hälfte nicht. Um die Reaktion der Pflanzen quantifizieren zu können, wurde die Länge der Wurzeln täglich gemessen. Die erhaltenen Daten zeigten, dass die Hemmung des Wachstums von CT2-LOF-Wurzeln sich nicht signifikant von WT-Wurzeln unterschied. Beide Genotypen zeigten demnach eine vergleichbare Reaktion. Daraus wurde geschlossen, dass CT2 nicht in der Perzeption oder Transduktion einer durch ABA vermittelten Reaktion mitwirkte. Dieses Ergebnis wurde nicht erwartet, da für *A. thaliana* gezeigt wurde, dass AtGPA1 eine Rolle in der ABA-Signaltransduktion innehat. Es wurde publiziert, dass Ga-LOF-Mutanten während der

Samenkeimung hypersensitiv auf die Anwesenheit von ABA reagierten [82]. Im Gegensatz dazu wurde aber auch gezeigt, dass G α -LOF-Mutanten hyposensitiv auf die ABA-abhängige Inhibition der Öffnung der Stomata reagieren [167]. Die im Laufe dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse könnten einerseits durch das experimentelle Vorgehen oder mit den Unterschieden des G Protein-Komplex der verschiedenen Pflanzenarten begründet sein. Es wurde der Einfluss von 20 μ M ABA untersucht, dagegen postulierten Pandey *et al.*, dass die optimale Konzentration bei 1 μ M ABA läge [82]. Die verwendete ABA-Konzentration könnte also zu hoch gewesen sein. Aus diesem Grund sollten in zukünftigen Experimenten verschiedene ABA-Konzentrationen getestet werden, um Dosis-Wirkungs-Kurven erstellen zu können. Auch ist der G Protein-Komplex von *A. thaliana* teilweise aus anderen Proteinen aufgebaut als der von *Z. mays*. Für *A. thaliana* ist bekannt, dass auch AtAGB1 und AtGCR1 (G PROTEIN COUPLED RECEPTOR1 bzw. REGULATOR OF G PROTEIN SIGNALING1 [AtRGS1]) an der ABA-Signaltransduktion beteiligt sind [83, 253]. Zwar ist in *Z. mays* ein AtAGB1-Homolog vorhanden (ZmGB1 [254]), nicht jedoch ein Homolog von AtRGS1 [255]. Dies könnte bedeuten, dass die für *A. thaliana* (experimentell belegten) Thesen nicht zwangsläufig auch auf *Z. mays* bzw. Gräser im Allgemeinen zutreffen müssen. Untersuchungen von *O. sativa* zeigten, dass *RICE HETEROTRIMERIC G PROTEIN α SUBUNIT1* (*RGA1*) keine Veränderung der Transkription als Reaktion auf externes ABA zeigte [256], dies scheint die Andersartigkeit der G Protein-vermittelten Signaltransduktion der Gräser im Vergleich zum Modellorganismus *A. thaliana* zu unterstreichen. Nichtsdestotrotz bleibt die Frage offen, ob CT2 in der ABA-Signalperzeption oder -transduktion mitwirkt. Da der Semi-Zwergwuchs-Phänotyp von CT2-LOF-Pflanzen an Auxin-Mutanten erinnert [257], wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit untersucht, ob CT2 an der Perzeption oder Transduktion des IAA-Signals beteiligt ist.

Die bisher erhaltenen Daten indizieren, dass die Abwesenheit von CT2 keinen Einfluss auf die IAA-Reaktion der Pflanzen hat. CT2-LOF-Pflanzen weisen den Phänotyp des Semi-Zwergwuchses auf [1], was durch eine Verkürzung der einzelnen Internodien erklärt werden kann (s. Kapitel *Verlust des Fasziations-Phänotyps*). Es ist lange bekannt, dass dieses Merkmal mit Defiziten in der Produktion oder der Signaltransduktion von Auxinen zusammenhängen kann [75]. So weist beispielsweise die *brachytic2* (*br2*) -Mutante verkürzte Internodien auf, was auf erhöhte Auxin-Level in den interkalaren Meristemen dieser Pflanzen und damit auf eine verringerte Internodien-Elongation zurückgeführt wurde [76, 77]. Außerdem kann, aufgrund der signifikant häufiger auswachsenden Axilliar-Kolben von CT2-LOF-Pflanzen [10], eine Störung der *Dormanz* dieser vermutet werden. Die *Dormanz* von weiblichen Infloreszenzen wird in WT-Pflanzen unter anderem durch Auxin unterstützt [25]. Zur Beantwortung der Frage, ob CT2 in die Auxin-Signaltransduktion involviert ist, wurde der Einfluss des Auxins IAA auf das Wachstum von Koleoptilensegmenten von WT- und CT2-LOF-Keimlingen analysiert. Dazu

wurden WT und CT2-LOF-Koleoptilensegmente in einem Puffer mit verschiedenen Konzentrationen von IAA (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) bzw. ohne IAA inkubiert. Die Anwesenheit von IAA im umgebenden Medium induziert eine messbare Streckung von WT-Koleoptilensegmenten [181]. Sollte CT2 in die Auxin-Signaltransduktion involviert sein, würde sich das Wachstumsverhalten von von CT2-LOF- und WT-Koleoptilensegmenten nach der Zugabe von IAA voneinander unterscheiden [vgl. 258]. Die ermittelten Daten zeigten die Wachstumsraten (in $\mu\text{m/s/cm}$) in Abhängigkeit der Zeit (s. Supplement Abb. 40). Es war zu erkennen, dass CT2-LOF-Koleoptilensegmente eine geringere Wachstumsreaktion nach der IAA-Zugabe zeigten. Auch schien es, als träte die Reaktion verzögert ein. Um die Reaktionen miteinander vergleichen zu können, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt (s. Abb. 23). Dazu wurde die Steigung der Kurven nach Beginn der Wachstumsreaktion durch lineare Regression der einzelnen Messwerte in Form von Formel 4 beschrieben. Die dadurch erhaltenen Kurve zeigten, dass sich die maximale Wachstumsrate der verschiedenen Genotypen voneinander unterschied (s. Abb. 23B). Die maximale Wachstumsrate von CT2-LOF-Koleoptilensegmenten war deutlich verringert. Dies indiziert eine verringerte Wachstumsreaktion von CT2-LOF-Segmenten. Jedoch zeigte der auf das jeweilige Maximum (Steigung der Kurve der Reaktion 10^{-5} M IAA) normierte Wert, dass die relative Reaktion sehr ähnlich war (s. Abb. 23C). Diese Daten indizieren, dass das Streckungswachstum von CT2-LOF-Koleoptilensegmenten zwar insgesamt verringert, die Wachstumsreaktion auf die Zugabe von IAA jedoch sehr ähnlich war. Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, dass CT2 keinen Einfluss auf die IAA-Reaktion der Pflanzen hatte. Auch dieses Ergebnis wurde nicht erwartet, da eine Beteiligung des G Protein-Komplex aus *A. thaliana* an der Auxin-Antwort bereits gezeigt wurde [79]. Auch für die G α -Untereinheit aus *O. sativa* (OsRGA1) gewonnene Daten indizierten eine Beteiligung an der Auxin-Signaltransduktion in Koleoptilen [259, 260]. Die absolut verringerte Wachstumsreaktion von CT2-LOF-Koleoptilen kann bedeuten, dass die Zellen bereits in hohem Maße gestreckt sind und sich daher nur bedingt noch weiter strecken können. Bereits veröffentlichte Daten scheinen diese These zu bestätigen, da gezeigt wurde, dass Bereiche der Blattspreite von CT2-LOF-Pflanzen weniger, aber dafür längere Zellen besitzen [33]. Trotzdem indiziert die überhaupt vorhandene Reaktion von CT2-LOF-Koleoptilen, dass das durch IAA induzierte Streckungswachstum nicht von der Anwesenheit von CT2 abhängig ist. Um die Ergebnisse zu vervollständigen, könnte die gleiche Analyse des Streckungswachstums von WT- und CT2-LOF-Koleoptilen unter dem Einfluss von *Fusicoccin* durchgeführt werden. Dieses Terpenoid induziert ebenfalls das Streckungswachstum, indem es durch die Ansäuerung des Apoplasten eine Lockerung der Zellwand bewirkt und wurde bereits in vergleichbaren Analysen verwendet [261, 262]. Sollte die durch diese Analyse erhaltenen Daten ein ähnliches Ergebnis zeigen wie die mittels IAA erhaltenen Daten, würde dies die These von bereits nahezu maximal gestreckten Zellen in CT2-

LOF-Koleoptilen erhärten. Sollte das Ergebnis von den bereits erhaltenen Daten abweichen, würde dies eine Neubewertung dieser notwendig machen.

Die Rolle von CT2 im Phytohormonhaushalt von Maispflanzen sollte weiter analysiert werden, um eine Außenseiterrolle von CT2 ausschließen zu können. CT2 scheint entweder eine völlig andere Funktion zu haben als bisher untersuchte Gα-Untereinheiten oder die bisher durchgeführten Experimente sind nicht die richtigen, um die durch das Fehlen von CT2 hervorgerufenen Veränderungen im Phytohormonhaushalt der Pflanzen darzustellen. Für die Gα-Untereinheiten von *A. thaliana* und *O. sativa* indizierten bereits publizierte Daten eine Beteiligung der jeweiligen Proteine an der Reaktion auf Abscisinsäure [167, 256], Auxin [79, 260], Brassinosteroide [263, 264], Gibberellinsäuren [263, 264]. Allerdings indiziert keins der bisher durchgeführten Experimente eine Beteiligung CT2s an der Signaltransduktion dieser Phytohormone. Die Analyse des Transkriptom von CT2-LOF-Pflanzen könnte bei der Entscheidung helfen, ob die Rolle von CT2 in der Phytohormonantwort weiter untersucht werden sollte. Die Abwesenheit von CT2 würde nach bisherigem Verständnis das Fehlen einer Regulation des Gβγ-Komplexes bedeuten. Für den Gβγ-Komplex aus *A. thaliana* kann eine regulatorische Funktion in der Transkription vermutet werden, da z. B. AtAGB1 mit Transkriptionsfaktoren interagieren kann [265]. Dies könnte auch in Gα-LOF-Mutanten von *Z. mays* dazu führen, dass bestimmte Gene im Vergleich zu WT-Pflanzen differentiell transkribiert werden. Die Transkriptomanalyse von CT2-LOF-Pflanzen könnte Indizien liefern, ob bestimmte Gene, die für die Phytohormonantwort der Pflanzen wichtig sind, davon betroffen sind.

Nach Introgression in den Mo17-Haplotyp zeigten homozygote CT2-LOF-Pflanzen im Vergleich zu den entsprechenden Pflanzen im B73-Hintergrund einen veränderten Phänotyp. Auch die Introgression des *ct2*-Ref.-Allels in den Mo17-Haplotyp verfolgte das Ziel, Einblicke zu potenziell beeinflussten Pfaden der Signaltransduktion zu gewinnen. Sollte der Phänotyp von CT2-LOF-Pflanzen in einem anderen Haplotyp abweichen, könnten natürliche *Modifier* dieses Phänotyps isoliert werden. Diese könnten Ansatzpunkte darstellen, um weitere Signaltransduktionswege aufzuklären, an denen CT2 beteiligt ist. Dafür wurde das *ct2*-Ref.-Allel viermal in den Mo17-Haplotyp eingekreuzt. So konnte eine daraufhin erstellte heterozygot/homozygot 1:1 segregierende Population (*ct2*-Ref. [Mo17x4]) mit einer entsprechenden Population im B73-Hintergrund (*ct2*-Ref. [B73x6]) verglichen werden. Bei der Analyse der Pflanzen fiel auf, dass die weiblichen Infloreszenzen von adulten CT2-LOF-Pflanzen im Mo17-Hintergrund eine deutliche Änderung des Phänotyps zeigten. Die auffälligste Änderung war der Verlust des Fasziations-Phänotyps, aber die genauere Analyse zeigte auch eine Erhöhung der Anzahl der Körner pro Reihe im Vergleich zu CT2-LOF-Pflanzen im B73-Hintergrund. Die mögliche Bedeutung dieses veränderten Phänotyps soll nun eruiert werden.

Das *ct2*-Ref.-Allel führte zu einer vergleichbaren Veränderung des Phänotyps der untersuchten Haplotypen. Zunächst muss aber erwähnt werden, dass die durch das homozygote *ct2*-Ref.-Allel hervorgerufene Veränderung des Phänotyps der vegetativen Organe junger Pflanzen in den beiden untersuchten Haplotypen ähnlich war. Junge Pflanzen beider Haplotypen zeigten kürzere Blätter. Dieser Phänotyp wurde für den B73-Haplotyp bereits beschrieben [1, 10]. Die für diese Arbeit gewonnenen Daten zeigten, dass die Breite der ersten drei Blätter vergrößert (im B73-Hintergrund) bzw. nicht signifikant verändert war (im Mo17-Hintergrund). Das *ct2*-Ref.-Allel verringerte also die Ausdehnung des Blattes in der Längs- aber nicht in der Querachse. Dies würde in WT-Pflanzen eine Beteiligung von CT2 an der Ausdehnung der Längs- (proximo-distale Achse), nicht aber der Querachse (medio-laterale Achse) indizieren. Urano *et al.* zeigten, dass die reduzierte Blattlänge von CT2-LOF-Pflanzen (B73) sich auf eine reduzierte Zellteilung in der proximo-distalen Achse zurückführen ließ. Sie schlossen daraus, dass CT2 die Zellproliferation des SAM und der Blattprimordien positiv beeinflusst, nicht aber des Blattplatten-Meristems (*leaf plate meristem*) [33]. Interessanterweise führte die Verkürzung der ersten drei Blätter im B73-Hintergrund zu einem Verhältnis von CT2-LOF- zu WT-Blättern von 66,27 % bis 70,15 %. Im Mo17-Haplotyp betrug dieses Verhältnis 62,04 % bis 62,42 %, was bedeutet, dass die Verringerung der Blattlänge im Mo17-Hintergrund etwas stärker ausgeprägt war als im B73-Hintergrund. Dies könnte sich darauf zurückführen lassen, dass der Haplotyp Mo17 kleinere vegetative und generative Meristeme aufweist [88]. So könnte eine, durch das Fehlen von CT2 verursachte, verringerte Zellproliferation nicht durch die schiere Menge der Zellen kompensiert werden.

CT2 ist in die Immunantwort von Maispflanzen involviert. Die Betrachtung adulter CT2-LOF-Pflanzen des Mo17-Haplotyps zeigte das Fehlen der typischen Läsionen auf den Blättern. Bei diesen Läsionen von Mo17-Pflanzen handelt es sich um eine *Mimikry* von durch Krankheit oder Pathogenbefall hervorgerufene Flecken abgestorbener Zellen [266, 267]. Diese treten ohne offensichtlichen Grund wie Stress oder Verletzungen auf und werden durch eine hypersensitive Reaktion hervorgerufen, welche die Apoptose der Zellen auslöst [268]. Die Läsionen erhöhen die Resistenz gegenüber Pathogen-induzierten Krankheiten, das Auftreten jener kann durch eine Vielzahl von Stoffwechselwegen beeinflusst werden [267, 268]. Von G Proteinen ist im Allgemeinen bekannt, dass diese die Apoptose von Zellen und damit auch die pflanzliche Immunantwort beeinflussen können [269]. Im Speziellen wurde nicht nur gezeigt, dass in *A. thaliana* die G α -Untereinheit an der Immunantwort beteiligt ist, sondern auch, dass in *Z. mays* die Letalität der G β -LOF-Mutante durch eine Autoimmunreaktion hervorgerufen wurde [254, 270]. Vor diesem Hintergrund ist das Fehlen der Läsionen im Mo17-Haplotyp nicht verwunderlich, sondern indiziert ebenfalls die Beteiligung des G Protein Komplex an der Immunantwort. Dies wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter analysiert, die Indizien

würden aber die zukünftige Betrachtung von CT2 im Kontext der Immunantwort von Maispflanzen erlauben.

CT2 beeinflusst die Zellproliferation der interkalaren Meristeme. Die relative Höhe der untersuchten Pflanzen war durch das *ct2*-Ref.-Allel in B73 auf 66,13 % verringert, während die relative Höhe der CT2-LOF-Pflanzen in Mo17 53,29 % betrug. Da die Höhe einer Pflanze durch die Anzahl und die Länge der Internodien aus der sie besteht, bestimmt wird, wurden jene Faktoren analysiert. Die Analyse zeigte, dass die Länge der Internodien von CT2-LOF-Pflanzen (unabhängig vom genetischen Hintergrund) jeweils signifikant verkürzt war. Das Fehlen von CT2 scheint also die Elongation der Internodien zu beeinflussen. Das Wachstum eines Internodiums wird durch das interkalare Meristem an dessen Basis beeinflusst, indem dieses alle Zellen des Internodiums produziert [271]. Die interkalaren Meristeme werden, wie alle Sekundärmeristeme des Sprosses, durch das SAM initiiert. Die durch sie produzierten Zellen bestimmen die Elongation des Internodiums [111, 271, 272]. Die signifikant verringerte Länge der Internodien unterstützt also die These von Urano *et al.*, dass CT2 die Zellproliferation von Zellen des SAMs positiv beeinflusst [33]. Dass Auxin die Elongation der Internodien beeinflussen kann, ist lange bekannt [273]. Zhang *et al.* zeigten, dass ein Überschuss an Auxin die Internodienelongation inhibieren kann [77]. Die für diese Arbeit gewonnenen Daten ließen jedoch nicht den Schluss auf Beteiligung von CT2 an der Reaktion auf IAA zu. Da auch keine Veränderung der Dynamik der kortikalen Mikrotubuli gefunden werden konnte, sollte der mechanistische Einfluss von CT2 auf die Internodienelongation zukünftig weiter untersucht werden. Dies könnte weitere Einblicke in den Einfluss der G Protein-vermittelten Signaltransduktion auf die Entwicklung und das Wachstum von Mais bzw. Gräsern gewähren. Die Analyse zeigte außerdem, dass bei CT2-LOF-Pflanzen die Anzahl der Internodien unabhängig vom genetischen Hintergrund jeweils signifikant erhöht war. Scott & Campbell konnten 1969 den gleichen Effekt bei der *br2*-Mutante feststellen, aber nicht erklären [274]. Verbunden mit der verringerten Länge der einzelnen Internodien lässt dieses Phänomen darauf schließen, dass die Pflanzen die Beeinträchtigung des Höhenwachstums wahrnehmen können und dies durch eine erhöhte Produktion interkalärer Meristeme kompensiert werden kann. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Fehlen von CT2 eine Verringerung der Länge der einzelnen Internodien bewirkte, was zu einer Verringerung der Gesamthöhe der Pflanzen führte. Die Verkürzung der Internodien gegenüber WT-Pflanzen wird vermutlich durch den Wegfall der positiven Beeinflussung der Zellproliferation der vom SAM abstammenden Sekundärmeristeme in CT2-LOF-Pflanzen verursacht.

Der Phänotyp der weiblichen Blütenstände adulter CT2-LOF-Pflanzen unterschied sich zwischen den untersuchten Haplotypen. Die Analyse der adulten Pflanzen zeigte außerdem,

dass diese signifikante Unterschiede des Phänotyps der Infloreszenzen aufwiesen. Die weiblichen Infloreszenzen von CT2-LOF-Pflanzen zeigten im B73-Hintergrund eine starke Vergrößerung. Diese phänotypische Eigenschaft von CT2-LOF-Pflanzen (B73) ist bereits bekannt und führt unter anderem zu der *Fasziation* der Spitze der weiblichen Blütenstände [1]. Diese bandartige Verbreiterung der Spitze war in den 1920er Jahren regelmäßig in den Maisfeldern zu finden und wird durch eine Überproliferation des IM verursacht [275]. Bommert *et al.* zeigten den Zusammenhang dieser Überproliferation mit der Transduktion des CLAVATA-Signals in WT-Pflanzen durch CT2 [1]. Aus *A. thaliana* ist bekannt, dass in WT-Pflanzen das restriktive CLAVATA-Signal dazu führt, dass die Expression der WUS-Transkriptionsfaktoren supprimiert wird. Findet (wie in CT2-LOF-Pflanzen) keine Übertragung des CLAVATA-Signals statt, induziert WUS vermehrt die Erhaltung der Stammzellnische. Diese (in CT2-LOF-Pflanzen unkontrollierte) Proliferation der Stammzellen führt zu der erwähnten Vergrößerung der CT2-LOF-Kolben [22]. Diese Fasziation wurde bei den Kolben von CT2-LOF-Pflanzen im Mo17-Hintergrund nicht beobachtet ($n_{Mo17\ ct2} > 30$). Obwohl gewisse phänotypische Veränderungen von CT2-LOF-Pflanzen im Mo17-Hintergrund stärker ausgeprägt waren (s. o.), war dieser spezifische Phänotyp optisch dem WT ähnlich. Dass die untersuchten CT2-LOF-Pflanzen dennoch keinen WT-Kolben besaßen, war an der signifikant erhöhten Anzahl der Körnerreihen zu erkennen. Dies war eine Veränderung, die kongruent zu der Veränderung von CT2-LOF-Kolben im B73-Hintergrund war. Eine weitere Veränderung, die sich von durch das *ct2*-Ref.-Allel verursachten phänotypischen Veränderungen in B73 unterschied, war die Anzahl der Körner pro Reihe. Die, im Vergleich zu CT2-LOF-Pflanzen (B73), veränderten phänotypischen Eigenschaften der CT2-LOF-Pflanzen im Mo17-Haplotyp, lassen sich durch einen Mo17-spezifischen *Modifier* des CT2-LOF-Phänotyps erklären. Aufgrund der Änderungen des CT2-LOF-Phänotyps ist es möglich über die potenzielle Funktion dieses *Modifiers* zu spekulieren:

Die Daten indizieren, dass in CT2-LOF-Pflanzen des Mo17-Haplotyps das Plastochron verkürzt zu sein scheint. Die Entwicklung des Sproß einer Maispflanze geschieht über die Produktion von sich wiederholenden Einheiten, den *Phytomeren*. Jedes Phytomer besteht aus einem Nodium, einem Blatt, einem Achselmeristem und einem Internodium [25]. Aus dem Achselmeristem wird das Infloreszenzmeristem (*inflorescence meristem*, IM), welches sich zum weiblichen Blütenstand, also zum Kolben, entwickelt. Während der Entwicklung der weiblichen Infloreszenz produziert das IM an seinen Flanken (also lateral) eine Vielzahl von Ährenpaarmeristemen (*spikelet pair meristems*, SPMs). Die Teilung der SPMs führt zu der Bildung zweier Ährenmeristeme bzw. Blütenmeristeme (*spikelet meristem*, SM). Die SMs teilen sich erneut und bilden so ein oberes und ein unteres Blütenmeristem aus [276]. In den weiblichen Infloreszenzen wächst das obere, in männlichen Infloreszenzen wachsen beide Blütenmeristeme aus und produzieren die einzelnen Blütenorgane. Die erhöhte Anzahl an Körnerreihen in CT2-LOF-

Pflanzen lässt demnach auf eine eine vermehrte Produktion von SPMs schließen. Die SPMs der Infloreszenz entstehen in spiraler *Phyllotaxis* [277, 278]. Der zeitliche Abstand zwischen der Initiation der SPMs wird *Plastochron* genannt [279]. Der *Plastochron-Index* wurde 1957 von Erickson & Michelini [280] entwickelt und ist eine artifizielle Maßeinheit, die genutzt wird, um Wachstumszeiten von Pflanzenorganen miteinander vergleichen zu können [281]. Die im Laufe dieser Arbeit generierten Daten indizieren, dass in CT2-LOF-Pflanzen (Mo17x4) das Plastochron verkürzt zu sein schien, da im gleichen absoluten Zeitraum der Entwicklung der weiblichen Infloreszenz eine deutlich erhöhte Anzahl einzelner Blütenmeristeme (im Vergleich zu WT-Pflanzen) ausgebildet wurde. Die durch die fehlende Regulation der CLAVATA-Signaltransduktion in CT2-LOF-Pflanzen vermehrte Proliferation der Stammzellen führte im B73-Haplotyp zu einer Vergrößerung des IM. Im Mo17-Haplotyp schien allerdings zusätzlich ein verkürztes Plastochron das Überangebot der Stammzellen in eine höhere Anzahl an SPMs umwandeln zu können, was zu der erhöhten Anzahl an Körnerreihen und der Körner pro Reihe führte und eine Vergrößerung des IM verhinderte. Dieses Phänomen stellt eine durch den genetischen Hintergrund verursachte Veränderung des Phänotyps von CT2-LOF-Pflanzen dar.

Die Identifizierung des *Modifiers* des CT2-LOF-Phänotyps könnte neue Einblicke in die durch G Proteine beeinflussten Signalwege geben. Die Initiation der Primordien wird durch das IM kontrolliert. Es sind bereits Gene bzw. Proteine bekannt, die das Plastochron und so die Architektur der Infloreszenzen bzw. der gesamten Pflanze beeinflussen können. Beispielsweise wurde postuliert, dass *UNBRANCHED2* und *UNBRANCHED3* (*UB2* und *UB3*) die Rate kontrollieren können, mit welcher undifferenzierte Zellen die zentrale Zone des Meristems verlassen können um laterale Primordien zu initiieren. So wiesen die jeweiligen LOF-Mutanten ebenfalls eine erhöhte Anzahl an Körnern auf. In der Doppelmutante werden so viele laterale Primordien gebildet, dass das apikale IM nicht regenerieren kann und daher frühzeitig terminiert wird. Polymorphismen in diesen Genen wurden damit in Verbindung gebracht, für Ertragssteigerungen verantwortlich sein zu können [279]. Es ist ebenfalls bereits gezeigt worden, dass die Veränderung der Zeit der Zellproliferation durch die Überexpression von *PLASTOCHRON1* (*ZmPLA1*) bewirkt werden kann [282]. *PLA1* kodiert für ein Cytochrom P450 (*CYP78A1*), ein Enzym das als Oxidoreduktase Redoxreaktionen katalysiert [283]. Die Überexpression führte zu einer Verkürzung des Plastochrons, die sich insgesamt in einer erhöhten Anzahl an Körnern auswirkte [282]. In *A. thaliana* führte die Inaktivierung des *PLA1*-Orthologs *CYP78A5/KLUH* zu einer Erhöhung der Rate der Initiation von Blättern [284]. Die Komplexität der Regulation der durch das SAM initiierten Organe wurde durch Analysen von LOF-Mutanten von *O. sativa* deutlich. Auch in *O. sativa* modulierte *PLA1* die zeitliche Abfolge der Ausbildung von Organen negativ [285]. Einen zu *pla1* ähnlichen Phänotyp wies die LOF-Mutante von *OsPLA2* auf, obwohl das Gen für ein MEI2-like RNA-Bindeprotein kodiert. Die Doppelmutante

pla1-2, *pla2-1* wies einen additiven Phänotyp auf, worauf geschlossen wurde, dass die durch diese beiden Gene beeinflusste Signaltransduktion unabhängig voneinander sind [286]. In *Z. mays* ließe sich diese, ebenfalls sehr komplexe, Regulation weiter aufklären, wenn der Mo17-spezifische *Modifier* des CT2-LOF-Phänotyps identifiziert werden könnte. Um diesen *Modifier* identifizieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits mit dem Erstellen einer *Mapping*-Population begonnen. Homozygote CT2-LOF-Pflanzen des Mo17-Haplotyps wurden mit homozygoten CT2-LOF-Pflanzen des B73-Haplotyps gekreuzt. Diese Population muss geselbstet werden, um eine für das *ct2*-Ref.-Allel homozygote Population zu erstellen, die in Bezug auf den Fasziations-Phänotyp der Kolben segregiert. Mithilfe dieser *Mapping*-Population wäre es durch *map-based-cloning* [287] möglich, das Gen bzw. den *Locus* zu bestimmen, welcher für die Veränderung dieses spezifischen Details des Phänotyps, also dem Fehlen der IM-Vergrößerung, verantwortlich ist. Dies würde der Analyse einer weiteren durch CT2 beeinflussten Signaltransduktion dienlich sein. Da bereits bekannt ist und auch im Laufe dieser Arbeit gezeigt wurde, dass die Modulation des Plastochrons die Anzahl der Körner (also den Ertrag) beeinflusst [282], eröffnet die Analyse des *Modifiers* die Möglichkeit den Nutzen dessen für die Maiszucht zu untersuchen. Dies wurde bereits für andere, das Plastochron modulierende, genetische Variabilitäten von verschiedenen Haplotypen vorgeschlagen [288].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Analyse des Proteins viele Einblicke in die G Protein-vermittelte Signaltransduktion in *Z. mays* lieferte. Mehr noch als Erkenntnisse wurden neue Fragen aufgeworfen.

So konnte gezeigt werden, dass verschiedene Isoformen bzw. unterschiedlich posttranslational modifizierte Varianten von CT2 eine unterschiedliche Lokalisierung aufwiesen. Die Frage, welche Form der Regulation diese jeweils spezifische subzelluläre Lokalisierung hervorruft, kann aber nur mit weiteren Analysen beantwortet werden. Die Beantwortung der Frage nach dem Nutzen dieses Konzepts für die gesamte Pflanze und den dadurch eventuell bestehenden evolutionären Vorteil, wird vermutlich noch viel Zeit in Anspruch nehmen.

Es konnte ebenfalls nicht abschließend geklärt werden, inwiefern CT2 die Zellproliferation und -elongation beeinflusst, da weder CT2 *in vitro* mit Mikrotubuli interagierte, noch die Dynamik oder der Aufbau der cMTs offensichtlich verändert war. Interessanterweise konnte aber die Co-Lokalisierung von CT2 mit dem Phragmoplasten gezeigt werden, ein Detail das erneut eine nicht-kanonische Funktion von CT2 unterstreicht. Der Phänotyp der CT2-LOF-Pflanzen impliziert, dass es einen Unterschied geben *muss*, weitere Untersuchung sind aber nötig um diesen zu finden und aufzuklären. Statt einer Antwort auf die offene Frage der veränderten Wuchshöhe der Pflanzen, wurden allerdings Evaginationen der PM entdeckt. Die Fragen nach

dem Ursprung bzw. der biologischen Signifikanz konnten bisher aber nicht abschließend beantwortet werden.

Leider konnte auch nicht geklärt werden, ob bzw. auf wie CT2 die Phytohormon-Signaltransduktion beeinflusst. CT2-LOF-Pflanzen zeigten bisher nach Applikation von keinem der getesteten Phytohormone einen Unterschied der Reaktion im Vergleich zu WT-Pflanzen. Da allerdings alle anderen bisher untersuchten pflanzlichen G α -Untereinheiten eine Beteiligung an der Phytohormon-Signaltransduktion zeigten, ist davon auszugehen, dass nur noch nicht das richtige Experiment durchgeführt wurde, um die Beteiligung CT2s an jener zu offenzulegen.

Die bisher offenstehende Frage der Regulierung der G Protein-vermittelten Signaltransduktion konnte zumindest teilweise beantwortet werden. So konnte gezeigt werden, dass CT2 mit ZmPLD α s interagierten und dass diese die GTPase-Aktivität von CT2 beeinflussten. Diese Ergebnisse standen im Einklang zu den Experimenten von Abschlussarbeiten [vgl. 142, 152] und zu bereits publizierten Daten aus anderen Modellorganismen [vgl. 62]. Dadurch ist es angemessen ZmPLD α s als GAPs von CT2 in *Z. mays* zu charakterisieren. Jedoch sind auch in diesem Zusammenhang noch Fragen offen, beispielsweise nach einer gewebespezifischen Interaktion von CT2 mit distinkten ZmPLD α s. So sollte es möglich sein, mit auf dieser Grundlagen basierenden, nachfolgenden Analysen, weitere Erkenntnisse zu gewinnen, um die G Protein-vermittelten Signaltransduktion in *Z. mays* weiter aufzuklären.

Ein unerwarteter, aber nichtsdestotrotz interessanter Aspekt war die spezifische Veränderung eines Phänotyp-Details von CT2-LOF-Pflanzen in einem anderen genetischen Hintergrund als B73. Auf die Introgression des *ct2*-Ref.-Allels in den Mo17-Haplotyp folgte die Analyse verschiedener Organe der Pflanzen. Es zeigte sich, dass die von CT2-LOF-Pflanzen (B73) bekannte Vergrößerung der Infloreszenzmeristeme nicht mehr zutage trat, was durch das schnelle Entleeren des Stammzellpools aufgrund eines verkürzten Plastochrons begründet sein könnte. Diese indizierte Verkürzung des Plastochrons kann durch einen Mo17-spezifischen *Modifier* des CT2-LOF-Phänotyps begründet sein. Die mit der bereits vorbereiteten Population nachfolgende Identifikation dieses *Modifiers* könnte einen Beitrag zu der Aufklärung der Rolle CT2s an der Beeinflussung des Plastochrons leisten. Des Weiteren ist es möglich, dass der *Modifier* für eine Analyse bezüglich der Aufnahme in die Maiszucht interessant ist, da die beobachtete Erhöhung der Körnerzahl durchaus für Zuchtprogramme interessant ist.

Durch diese Arbeit zieht sich also, wie ein roter Faden, dass die Beantwortung einer Fragestellung spannende neue Fragen aufwirft. Dies zeigt, dass CT2 nach wie vor ein ergiebiges Forschungsthema darstellt. Trotz der Vielzahl der bereits veröffentlichten Publikationen über dieses Protein, ist die Zahl offener Fragen ähnlich derjenigen der durch das Fehlen des Proteins ausgelösten phänotypischen Veränderungen: gewaltig groß.

Verwendete Methoden

Die im Folgenden aufgeführten Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit angewandt. Alle eventuellen Modifikationen bereits veröffentlichter Protokolle wurden dokumentiert.

Pflanzenmaterial und Wachstumsbedingungen

Wachstumsbedingungen der verwendeten *Zea mays*-Pflanzen

Die verwendeten *Z. mays* (L.) Inzuchtlinien B73 und Mo17 wurden als Samen in einem Gewächshaus ausgebracht, indem mit einer Pikierhilfe stets gleich tiefe Löcher in das Substrat gestochen wurden. Nach 30 Tagen wurden die Pflanzen in große Töpfe überführt und mit 22 °C bis 24 °C kultiviert. Von 5.00 Uhr bis 21.00 Uhr wurden die Pflanzen zusätzlich mit mindestens 12 Natriumdampflampen à 400 W pro 30 m² beleuchtet. Um eine ungewollte Bestäubung der Pflanzen zu verhindern, wurden die Griffel der weiblichen Infloreszenzen mit Papiertüten umhüllt.

Die verwendete CT2-LOF-Mutante *compact plant2* (*ct2*) wurde von Bommert *et al.* (2013, [1]) als *ct2*-Ref. beschrieben. Wenn nicht anders angegeben wurden heterozygot/homozygot 1:1 segregierende Populationen von *ct2*-Ref. verwendet [1].

Transgene Reporterpflanzen wurde mithilfe von *Basta*® selektiert.

Oberflächensterilisierung von *Zea mays*-Samen

Um die Oberfläche der verwendeten *Z. mays*-Samen zu sterilisieren, wurden diese zuerst mit 13 % *Natriumhypochlorit*-Lösung (v/v) schüttelnd inkubiert und danach für 10 min mit autoklaviertem H₂O_{Dest.} gespült. Daraufhin wurden die Samen zweimal für jeweils 10 min mit 100 ml der Waschlösung (s. Tab. 37) schüttelnd inkubiert. Daraufhin wurden die Samen zweimal für jeweils 10 min mit autoklaviertem H₂O_{Dest.} gespült. Diese sterilen Samen wurden für die Experimente verwendet.

Phänotypisierung von *Zea mays*-Pflanzen

Die verwendeten Maissamen wurden wie beschrieben ausgebracht. Nach jeweils 7, 14 und 21 Tagen nach dem Ausbringen (*days after planting*, DAP) wurde die Länge der ersten Blattspreite von der Ligula bis zur Blattspitze vermessen. Zusätzlich wurde die Breite der Blattspreite an der breitesten Stelle gemessen.

Der Winkel des zweiten Blattes unterhalb des ersten Kolbens zum Stamm (α) wurde ca. 90 DAP gemessen. Die Pflanzen wurden auf der Höhe des entsprechenden Blattes seitlich foto-

grafiert. Die Fotos wurden verwendet um eine Linie a von der Blattachse (B) bis zur Blattspitze zu ziehen. Im rechten Winkel dazu wurde eine zweite Linie b bis zur Mittelrippe des Blattes gezogen. An der Position der Mittelrippe die von b gekreuzt wird (M) beginnend, wurde eine Linie c bis zu Position B gezogen. Der Winkel α zwischen c und dem Internodium des Blattes wurde mit dem Programm *FIJI* gemessen (s. Abb. 31).

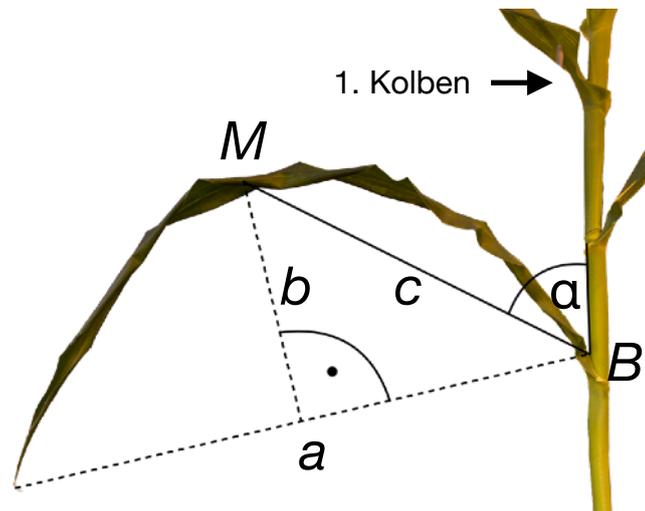


Abbildung 31: Schema der Bestimmung des Blattwinkels α

Eine Linie a wurde von der Blattachse (B) bis zur Blattspitze gezogen. Im rechten Winkel dazu wurde eine zweite Linie b bis zur Mittelrippe des Blattes gezogen. An der Position der Mittelrippe die von b gekreuzt wird (M) beginnend, wurde eine Linie c bis zu Position B gezogen. Der Winkel α zwischen c und dem Internodium des Blattes wurde gemessen.

Die Höhe der Pflanzen wurde ca. 90 DAP vom Substrat bis zur Spitze des zentralen Blütenstandes der männlichen Infloreszenz gemessen.

Ebenfalls ca. 90 DAP wurde die Länge der männlichen Infloreszenz von der untersten Verzweigung bis dessen zentraler Spitze gemessen. Zusätzlich wurde die Länge des zentralen Blütenstandes von der obersten Verzweigung bis zu dessen Spitze gemessen. Die Anzahl der Ährchen des zentralen Blütenstandes der männlichen Infloreszenz wurde analysiert, indem die obersten 2 cm des zentralen Blütenstandes abgetrennt wurden. Die Ährchen der darauf folgenden 5 cm wurden gezählt.

Die Höhe der Pflanzen wurde ca. 90 DAP vom Substrat bis zur Spitze des zentralen Blütenstandes der männlichen Infloreszenz gemessen.

Der jeweils erste Kolben der der Pflanzen wurde ca. 150 DAP analysiert, indem die Anzahl der Körnerreihen und die Körner pro Reihe bestimmt wurden.

Die Länge der einzelnen Internodien wurde ca. 150 DAP beginnend mit dem ersten Internodium unterhalb des männlichen Pedunkulus bis zum ersten Nodium mit Wurzeln vermessen (s. Abb. 32). Die Blätter des Stammes wurden entfernt und die Länge der einzelnen Internodien wurde vom oberen Austrittsort der Blattscheide bis zu dem darunter liegenden vermessen.

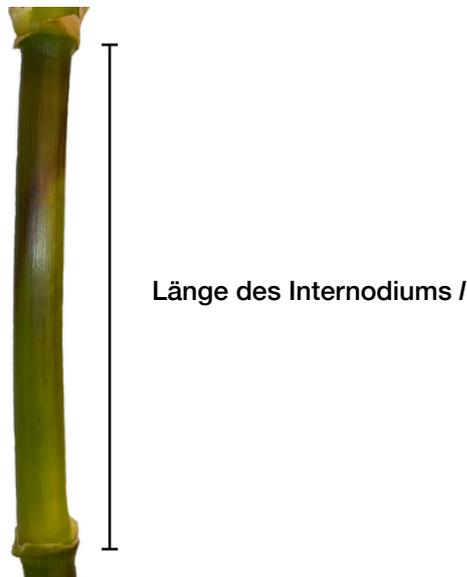


Abbildung 32: Schema der Vermessung der einzelnen Internodien von Maispflanzen

Die Länge der einzelnen Internodien der Pflanzen wurden 150 DAP vom oberen Austrittsort der Blattscheide bis zu dem darunterliegenden vermessen.

Kreuzung von *Z. mays*-Pflanzen

Um die verwendeten Maislinien zu propagieren und die benötigten Linien herzustellen, wurden *Z. mays*-Pflanzen ca. 50 DAP miteinander gekreuzt. Um dies vorzubereiten, wurden abends die Griffel der weiblichen Infloreszenzen mit einer Rasierklinge bis zu den Hüllblättern entfernt. Um den Pollen über Nacht zu sammeln, wurden die männlichen Infloreszenzen mit Papiertüten umhüllt. Um die weiblichen Infloreszenzen zu bestäuben, wurde am Morgen des folgenden Tages der Pollen aus der Tüte auf die nachgewachsenen Griffel gegeben. Die bestäubten Kolben wurden durch eine Papiertüte geschützt. Bei Bedarf wurde der Pollen von mehreren Pflanzen gesammelt und vor der Bestäubung der weiblichen Infloreszenz miteinander vermischt.

Messung der Reaktion von *Z. mays*-Keimlingen auf die externe Zugabe von Abscisinsäure

Um die Reaktion von *Z. mays*-Koleoptilen auf die Zugabe von *Abscisinsäure* (*abscisic acid*, ABA) zu messen, wurde eine segregierende Population von *ct2*-Ref.-Saatgut (B73) für ca. 16 h bei Raumtemperatur schüttelnd in Wasser inkubiert, um diese quellen zu lassen. Die gequol-

lenen Karyopse wurden für 72 h bei Raumtemperatur und Dunkelheit auf feuchtem *Whatman-Papier* inkubiert. Pro Versuchsgruppe wurden 24 Keimlinge bei 26 °C und einer Lichtperiode von 16 h weiter inkubiert. Dafür wurden 400 ml von ABA-Wachstumspuffer (s. Tab. 37) in Boxen gefüllt, während die Keimlinge so auf einem Gitter darüber positioniert waren, dass die Wurzeln in den Puffer hineinragten. Es wurde ABA bis zu einer Konzentration von 20 µM (in 1 ml Methanol gelöst) hinzugegeben. In die Kontrollgruppe wurde 1 ml Methanol hinzugegeben. Es wurde täglich die Wurzellänge aller Keimlinge vom Korn bis zur Wurzelspitze gemessen. Nach 7 Tagen wurde DNA aus den Keimlingen isoliert und jeweils der Genotyp mithilfe von PCR bestimmt.

Messung der Reaktion von *Z. mays*-Koleoptilesegmenten auf die Zugabe von *Indol-3-Essigsäure*

Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Hartwig Lüthen (*Universität Hamburg*) durchgeführt. Um die Reaktion von *Z. mays*-Koleoptilen auf die Zugabe von *Indol-3-Essigsäure* (*indole-3-acetic acid*, IAA) zu messen, wurden homozygote Samen von *ct2*-Ref. (B73) und WT (B73) für ca. 16 h bei Raumtemperatur schüttelnd in Wasser inkubiert, um diese quellen zu lassen. Die Samen wurden daraufhin für 72 h bei 26 °C, 70 % Luftfeuchtigkeit und Dunkelheit auf feuchtem *Whatman-Papier* inkubiert. Von den etiolierten Keimlingen wurden die ersten 3 mm der Spitze der Koleoptile entfernt. Die folgenden 5 mm wurden abgetrennt und das Keimblatt wurde entfernt. Der übriggebliebene, nicht geschabte Koleoptile-Zylinder wurde für die Messung verwendet. Wie von Karcz *et al.* (1999 [181]) und Fischer *et al.* (1993 [180]) beschrieben wurden jeweils 4 Koleoptile-Zylinder auf eine Edelstahlnadel aufgefädelt. Die Koleoptilen wurden vertikal in einem mit 5 ml IAA-Wachstumspuffer (s. Tab. 37) gefüllten und mit Luft begasten Röhrchen aufgerichtet. In diesem wurden die Koleoptilen bei 22 °C inkubiert während die Wachstumsrate wurde mit einem *Auxanometer* [289] alle 3 min gemessen wurde. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 60 min, in denen sich die Wachstumsrate stabilisierte, wurden verschiedene Konzentrationen von IAA (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) hinzugegeben. In die Kontrollgruppe wurde kein IAA hinzugegeben, der Versuch wurde pro Genotyp und IAA-Konzentration mindestens zweimal wiederholt. Die Wachstumsrate wurde für mindestens 4 h gemessen und wird in µm/s/cm angegeben. Die Steigung der Kurven nach Beginn der Wachstumsreaktion bis zum ersten Höhepunkt oder zum Beginn des Plateau wurde durch lineare Regression der Datenpunkte bestimmt und für die Dosis-Wirkungs-Analyse verwendet.

Messung des Phosphatidsäuregehalts von *Z. mays*-Pflanzen

Um den Gehalt von *Phosphatidsäure* (*phosphatidic acid*, PA) von *ct2*- und WT-Pflanzen (B73) zu bestimmen, wurden diese 21 DAP oberhalb der Wurzel abgetrennt. Die Blätter wur-

den beginnend mit dem Keimblatt entfernt bis das erste Blatt erreicht wurde dessen Blattscheide kürzer als 1 cm war (vgl. Abb. 23A). Die verbleibenden Blätter sowie das Gewebe der Internodien und des SAMs wurden in drei Gruppen zu jeweils fünf Pflanzen unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff mithilfe von Mörser und Pistill gemahlen. Das Pflanzenpulver wurde tiefgekühlt zur Analyse in das Labor von Prof. Dr. Ingo Heilmann an der *Martin Luther Universität Halle-Wittenberg* in Halle (Saale) geschickt.

Wachstumsbedingungen der verwendeten *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen

Je vier *Nicotiana benthamiana* (Domin) Samen wurden in einem Mix aus Sand und Blumenerde (2:1) in einem Gewächshaus bei 18 °C (nachts) - 22 °C (tagsüber), und 14 h Licht kultiviert. Nach 4 Wochen wurden die Pflanzen für die *Agrobacterium tumefaciens*-Infiltration verwendet.

Transiente Expression von Fusionsproteinen in *Nicotiana benthamiana*-Blättern

Um Fusionsproteine in *N. benthamiana*-Blättern transient zu exprimieren wurden diese mithilfe der *Agrobacterium tumefaciens*-Infiltration transformiert. Für die Infiltration von *N. benthamiana*-Blättern wurden 2 ml einer mit entsprechenden Vektoren transformierten *A. tumefaciens*-Kultur bei 4.000x *g* pelletiert und in 1 ml Infiltrationspuffer (s. Tab. 37) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension in 1 ml Infiltrationspuffer wurde die OD₆₀₀ in einem Volumen von 2 ml Infiltrationspuffer auf 0,6 eingestellt und für 3 h bei 28 °C und 120 rpm inkubiert. Je nach Bedarf wurden Kulturen von *A. tumefaciens*, welche mit verschiedenen Vektoren transformiert waren, im Verhältnis 1:1 gemischt. Diese Kultur wurde anschließend mit dem gleichen Volumen *A. tumefaciens* P19 gemischt und mit einer Spritze in die Unterseite der *N. benthamiana*-Blätter injiziert. Die infiltrierten Pflanzen wurden über Nacht mit einer durchsichtigen Plastikhaube abgedeckt und für insgesamt zwei Nächte bei oben genannten Bedingungen kultiviert.

Gewinnung von Protoplasten aus Blättern in *Nicotiana benthamiana*-Blättern

Für die Gewinnung von Protoplasten aus Blättern von *N. benthamiana* wurden infiltrierte Blattbereiche geerntet. Nachdem diese in einer Petrischale mit 4 ml Enzymlösung (s. Tab. 37) bedeckt wurden, wurden die Blattstücke mit einer Rasierklinge in möglichst kleine Stücke zerschnitten. Durch das Anlegen eines Unterdruckes für 3 min wurde das Gewebe infiltriert und danach über Nacht bei RT inkubiert. Daraufhin wurde die Petrischale für ca. 1 h sanft geschwenkt um die Zellen zu lösen. Die Zellsuspension wurde mithilfe einer Weitlochpipette durch einen Zellsieb gefiltert und in 10 ml Zellwaschpuffer (s. Tab. 37) aufgenommen. Die Zellen wurden für 3 min bei 48x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 2 ml Zellwaschpuffer resuspendiert. Die Zellen wurden mithilfe des CLSM analysiert.

Molekularbiologische Methoden

Isolation von genomischer DNA aus Pflanzengewebe

Für die Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen zur Bestimmung des Allels eines Gens wurde ca. 1 cm² des Gewebes in flüssigem Stickstoff gefroren und mechanisch zerkleinert. Zu dem Gewebe wurden 1.300 µl des DNA-Extraktionspuffers (s. Tab. 37) hinzugegeben und die Probe wurde auf Eis aufgetaut. Die Probe wurde mit 150 µl 10 % SDS (w/v) gemischt und anschließend bei 65 °C bei 300 rpm schüttelnd inkubiert. Es wurden 350 µl 5 M KOAc zu der Probe hinzugegeben, nach dem Mischen des Ansatzes wurde dieser für mindestens 5 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde anschließend für 6 min bei 4 °C und 20.000x *g* zentrifugiert. Durch Mischen von 700 µl des Überstandes mit 700 µl eiskaltem 2-Propanol und Inkubation für mindestens 1 h bei -20 °C wurde die genetische DNA gefällt. Durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 20.000x *g* wurde die DNA pelletiert, anschließend mit 500 µl 70 % EtOH (v/v) gewaschen und erneut für 1 min bei 4 °C und 20.000x *g* zentrifugiert. Die DNA wurde in 100 µl H₂O_{Dest.} bei 55 °C gelöst.

Für die Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen zur weiteren molekularen Bearbeitung wurde die DNA-Extraktion wie von Dellaporta *et al.* (1983, [290]) beschrieben durchgeführt.

Isolation von Vektor-DNA aus bakterieller Zellkultur

Die Isolierung von Vektoren aus *E. coli*-Übernachtskulturen fand mithilfe des Kits *Presto™ Mini Plasmid Kit* von *Geneaid Biotech Ltd.* nach den Anweisungen des Herstellers statt.

RNA-Extraktion aus Pflanzengewebe

Die Extraktion von RNA aus Pflanzengewebe wurde mithilfe von *peqGOLD TriFast™* von *WWR International GmbH* nach Herstellerangaben durchgeführt.

cDNA-Synthese aus einer RNA-Probe mittels *Reverser Transkription*

Mit maximal 5 µg *total RNA* und Oligo-d(T)₂₀-Primern wurde mit dem Kit *SuperScript™ IV Reverse Transcriptase* von *Thermo Fisher Scientific Inc.* die cDNA-Synthese nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen mithilfe der Polymerasekettenreaktion

Die *Polymerasekettenreaktion* (*polymerase chain reaction*, PCR; nach Kary Mullis *et al.* [291]) wurde verwendet um spezifische DNA Sequenzen zu vervielfältigen. Die PCR basiert auf der zyklischen Wiederholung der Denaturierung der DNA, dem Anlagern von Primern welche die zu amplifizierende Sequenz (Matrizen-DNA) flankieren und der 5'->3'-Elongation des Fol-

gestranges der DNA. Die PCR erlaubt die spezifische Vervielfältigung von DNA Sequenzen mindestens um den Faktor 10^6 [292]. Für verschiedene Zwecke wurden jeweils passende Polymerasen und PCR Programme nach den Anweisungen der Hersteller verwendet.

Molekulares Klonieren

Um spezifische DNA-Sequenzen für die weitere molekulare Bearbeitung zu amplifizieren, wurde eine PCR mithilfe des Kits *Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* von *Thermo Fisher Scientific Inc.* nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Inhalt eines PCR-Ansatzes ist in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3: Inhalt eines PCR-Ansatzes für das molekulare Klonieren

Bestandteil	Volumen für eine Reaktion (µl)
H ₂ O	11,8
<i>Phusion GC Puffer</i> (5 x)	4,0
DMSO	0,6
10 mM dNTPs	0,4
10 µM Vorwärtsprimer	1,0
10 µM Rückwärtsprimer	1,0
<i>Phusion DNA Polymerase</i>	0,2
Matrizen-DNA	1,0

Bestimmung des Allels eines Gens

Die Bestimmung des Allels eines Gens mittels PCR (*Genotyping*) fand mithilfe des Kits *DreamTaq Green PCR Master Mix* von *Thermo Fisher Scientific Inc.* nach Herstellerangaben statt. Die jeweils verwendeten Primer sind in Tabelle 35 aufgelistet. Die Primer für *ct2*-Ref. wurden von Bommert *et al.* (2013 [1]) beschrieben, die Primer für die verwendeten Uniform-Mu-Insertionslinien wurden mithilfe von *Primer3* [293] ausgewählt. Der Primer *TIR6* wurde von Settles *et al.* (2004 [294]) beschrieben. Der Inhalt eines Ansatzes ist in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: Inhalt eines PCR-Mastermix für die Bestimmung des Allels eines Gens

Bestandteil	Volumen für eine Reaktion (µl)
H ₂ O	3,0
<i>TAQ Mastermix</i> (2 x)	5,0
10 µM Vorwärtsprimer	1,0
10 µM Rückwärtsprimer	1,0
Matrizen-DNA	1,0

Agarose-Gelelektrophorese

Um zu überprüfen, ob in einer Probe DNA-Fragmente der erwarteten Länge enthalten waren, wurde die Gelelektrophorese durchgeführt, bei welcher eine Gleichstromspannung an ein Agarose-Gel angelegt wird. Dies hat zur Folge, dass sich die DNA der Probe aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste in Richtung der Anode bewegte. Je kürzer das Stück der DNA ist, desto schneller wanderte es durch das Gel. Dadurch wurde die DNA der Probe der Größe nach aufgetrennt, sodass man die Größe der vorhandenen DNA im Vergleich zum Längenstandard abschätzen konnte.

Die Proben wurden mit 5x DNA-Probenpuffer (s. Tab. 37) gemischt, an das mit $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Ethidiumbromid versetzte Agarose-Gel wurde eine Spannung von 100 V angelegt.

Spaltung von DNA-Fragmenten

Die analytische oder preparative Spaltung von DNA wurde jeweils mit geeigneten Enzymen nach Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt. Die gespaltene DNA wurde per Agarose-Gelelektrophorese analysiert und gegebenenfalls aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten um gespaltene Fragmente aufzureinigen.

Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mit *T4 DNA-Ligase* von *Thermo Fisher Scientific Inc.* zur Herstellung zirkulärer Vektor-DNA nach Anweisungen des Herstellers bei $16 \text{ }^\circ\text{C}$ ca. 16 h zur Ligation inkubiert. Der gesamte Ligationsansatz wurde für die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen verwendet.

Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Gespaltene DNA-Fragmente wurden bei Bedarf mit *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* von *Thermo Fisher Scientific Inc.* nach Anweisungen des Herstellers dephosphoryliert.

Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde mithilfe des Kits *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* von *MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG* nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Klonierung von DNA

Die Klonierung von DNA-Fragmenten in den Vektor pJET1.2/blunt (s. Tab 45) fand mithilfe des Kits *CloneJET PCR Cloning Kit* von *Thermo Fisher Scientific Inc.* nach Herstellerangaben statt.

Gateway-Klonierung

Die *Gateway*-Klonierung von Fragmenten in einen *Entry*- oder *Destination* Vektor fand mithilfe des *Gateway*[™] *BP Clonase*[™] *II Enzyme Mix* bzw. des *Gateway*[™] *LR Clonase*[™] *II Enzyme Mix* von *Thermo Fisher Scientific Inc.* jeweils nach Herstellerangaben statt.

Sequenzierung

Eine bestimmte Menge der aufgereinigten Proben wurde (gegebenenfalls mit den entsprechenden Primern) zur DNA-Sequenzierung (nach Sanger und Coulson) zu der Firma *Eurofins Genomics Germany GmbH* in Ebersberg geschickt.

Mikrobiologische Methoden

Wachstum bakterieller Zellkulturen

Die verwendeten *E. coli* ([Migula 1895] Castellani & Chalmers 1919)-Stämme wurden, soweit nicht anders angegeben, für 16 h bei 37 °C schüttelnd bei 150 rpm in LB-Medium (s. Tab. 39) unter Hinzugabe von geeigneten Antibiotika zur Selektion kultiviert. Die Zelldichte wurde durch Messung der OD₆₀₀ im Photospektrometer bestimmt.

Die verwendeten *A. tumefaciens*-Kulturen wurden für 16 h bei 28 °C schüttelnd bei 150 rpm in LB-Medium (s. Tab. 39) unter Hinzugabe von geeigneten Antibiotika zur Selektion kultiviert. Die Zelldichte wurde durch Messung der OD₆₀₀ im Photospektrometer bestimmt.

Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Nach Hinzugabe der Vektor-DNA wurden die chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden durch einen 1-minütigen thermalen Schock bei 42 °C transformiert und nachfolgend für 10 min auf Eis regeneriert. Die phänotypische Expression fand nach Hinzugabe von 500 µl LB-Medium für 1 h bei 37 °C schüttelnd bei 120 rpm statt. Die Zellen wurden auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und bei 37 °C für 16 h inkubiert.

Transformation elektrokompeter *A. tumefaciens*-Zellen

Nach Hinzugabe der Vektor-DNA (10 ng) wurden die elektrokompeteren *A. tumefaciens*-Zellen für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in eine vorgekühlte Elektroküvette gegeben und mit einer Spannung von 1440 V transformiert. Die phänotypische Expression fand nach Hinzugabe von 500 µl LB-Medium für 2 h bei 28 °C schüttelnd bei 450 rpm statt. Die Zellen wurden auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und bei 28 °C für 16 h inkubiert.

Proteinbiochemische Methoden

Proteinextraktion aus Pflanzengewebe

Das Pflanzengewebe wurde unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill gemahlen, das Pulver wurde mit $3,5 \text{ ml} \cdot (\text{1 g Gewebe})^{-1}$ Proteinextraktionspuffer (s. Tab. 37) resuspendiert. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert und regelmäßig mithilfe des *Vortex* gemischt. Die Probe wurde durch Zentrifugation für 10 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mit $4.000 \times g$ in cytosolisch-lösliche Fraktion und unlösliche Pellet-Fraktion aufgeteilt, die cytosolisch-lösliche Fraktion wurde durch *Miracloth* gefiltert. Um die Membran-Fraktion von der cytosolisch-löslichen Fraktion zu trennen wurde die Probe für 60 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und $100.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Das Pellet stellt die mikrosomale Fraktion dar, die in 1/10 des Extraktionsvolumens Proteinextraktionspuffer mit 1 % Triton X-100 (v/v) für 30 min inkubiert und regelmäßig mithilfe des *Vortex* gemischt. Die Extraktion wurde mit einer finalen Zentrifugation für 10 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und $4.000 \times g$ beendet, der Überstand wurde für weitere Experimente verwendet.

Heterologe Produktion von Proteinen in *E. coli* BL21 (DE3) und Isolation rekombinanter Proteine aus der cytosolisch-löslichen Fraktion von Zellysat

Die Produktion und Isolation von rekombinant produzierten His₆-CT2-Proteinen wurde mit Modifikationen nach Wu *et al.* (2018, [18]) durchgeführt.

500 ml der mit dem entsprechenden Expressionsvektor transformierten *E. coli* BL21 (DE3) Kultur wurde bis zu einer $\text{OD}_{600}=0,6$ in LB-Medium mit den benötigten Selektivantibiotika kultiviert. Um die Expression der Proteine zu initiieren, wurde die Kultur mit $0,5 \text{ mM}$ *Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid* (IPTG) versetzt und bei $16 \text{ }^\circ\text{C}$ und 150 rpm für weitere 18 h inkubiert. Die Zellen wurden bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mit $4.000 \times g$ pelletiert, mit 1/10 des Kulturvolumens 0,9 % NaCl (w/v) gewaschen und anschließend in 1/20 des Kulturvolumens Lysepuffer (s. Tab. 37) resuspendiert. Um die Zellen aufzuschließen, wurde *Lysozym* bis zu einer Konzentration von $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ zu der Zellsuspension hinzugegeben und diese anschließend für 30 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und regelmäßigem Schütteln inkubiert. Zusätzlich erfolgte eine Sonifikation mit mindestens 10 Wiederholungen von Impulsen mit 30 sec Länge und einer Frequenzbelegungsdauer sowie einer Amplitude von 50 % bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Zwischen den Impulsen wurde die Suspension für jeweils mindestens 30 sec mit Eis gekühlt. Die Probe wurde nach dem Zellaufschluss zunächst durch Zentrifugation für 30 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mit $12.000 \times g$ in cytosolisch-lösliche Fraktion und unlösliche Pellet-Fraktion aufgeteilt. Nativ gefaltete, funktionale rekombinante Proteine wurden aus der cytosolisch-löslichen Fraktion isoliert indem 1/1000 des Kulturvolumens von mit Lysepuffer equilibrierter *Ni-NTA Agarose* hinzugegeben und schüttelnd für 1 h bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert wurde.

Die an die *Ni-NTA Agarose* gebundenen Proteine wurden dreimal mit jeweils 1/250 des Volumens Waschpuffer (s. Tab. 37) gewaschen und anschließend dreimal mit jeweils 1/1000 des Kulturvolumens Elutionspuffer (s. Tab. 37) eluiert. Die Fraktionen der Elution wurden gepoolt in den entsprechenden Assaypuffer dialysiert, anschließend wurde die Konzentration mithilfe von SDS-PAGE oder des Photospektrometers bestimmt. Die rekombinanten Proteine wurden direkt für ein Experiment genutzt oder mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit 20 % *Glycerol* (v/v) bei -80 °C gelagert.

Die Produktion und Isolation von rekombinant produzierten PLD α 1-Strep-Proteinen wurde mit Modifikationen nach Zhao & Wang (2013, [129, 135]) durchgeführt.

500 ml der mit dem entsprechenden Expressionsvektor transformierten *E. coli* BL21 (DE3) Kulturen wurde bis zu einer OD₆₀₀=0,6 in LB-Medium mit den benötigten Selektivantibiotika kultiviert. Um die Expression der Proteine zu initiieren, wurde die Kultur mit 0,1 mg *Anhydrotetracyclin* (AHT) versetzt und bei 16 °C und 150 rpm für weitere 18 h inkubiert. Die Zellen wurden bei 4 °C mit 4.000x *g* pelletiert, mit 1/10 des Kulturvolumens 0,9 % NaCl (w/v) gewaschen und anschließend in 1/20 des Kulturvolumens PBS-Extraktionspuffer (s. Tab. 37) resuspendiert. Um die Zellen aufzuschließen, wurde Lysozym bis zu einer Konzentration von 0,5 mg*ml⁻¹ zu der Zellsuspension hinzugegeben und diese anschließend für 30 min bei 4 °C und regelmäßigem Schütteln inkubiert. Zusätzlich erfolgte eine Sonifikation mit mindestens 10 Wiederholungen von Impulsen mit 30 sec Länge und einer Frequenzbelegungsdauer sowie einer Amplitude von 50 % bei 4 °C. Zwischen den Impulsen wurde die Suspension für jeweils mindestens 30 sec mit Eis gekühlt. Die Probe wurde nach dem Zellaufschluss zunächst durch Zentrifugation für 30 min bei 4 °C mit 12.000x *g* in cytosolisch-lösliche Fraktion und unlösliche Pellet-Fraktion aufgeteilt. Nativ gefaltete, funktionale rekombinante Proteine wurden aus der cytosolisch-löslichen Fraktion isoliert indem 1/1000 des Kulturvolumens von mit PBS-Extraktionspuffer equilibrierter *Strep-Tactin*® *Sepharose*® 50% *Suspension* hinzugegeben und schüttelnd für 1 h bei 4 °C inkubiert wurde. Die gebundenen Proteine wurden dreimal mit jeweils 1/250 des Volumens PBS-Extraktionspuffer gewaschen und anschließend dreimal mit jeweils 1/1000 des Kulturvolumens *Strep-Tactin*® *Elution Buffer mit Desthiobiotin* eluiert. Die Fraktionen der Elution wurden gepoolt in den Dialysepuffer (s. Tab. 37) dialysiert, anschließend wurde die Konzentration mithilfe von SDS-PAGE oder des Photospektrometers bestimmt. Die rekombinanten Proteine wurden direkt für ein Experiment genutzt oder mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit 20 % *Glycerol* (v/v) bei -80 °C gelagert.

Dialyse von proteinhaltigen Lösungen

Die Dialyse von proteinhaltigen Lösungen wurde mithilfe der *Slide-A-Lyzer™ Dialysis Cassettes* nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden rotierend bei 4 °C für 16 h in den entsprechenden Puffer dialysiert.

Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht mittels SDS PAGE

Die Auftrennung von Proteinen nach apparentem Molekulargewicht zur nachfolgenden Analyse erfolgte mittels der diskontinuierlichen *Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese* (*sodium dodecyl sulfat-polyacrylamide-gel electrophoresis, SDS-PAGE*) nach Laemmli [295]. Dafür werden alle Proteine der Probe mithilfe von Hitze denaturiert, während das Detergenz *Natriumdodecylsulfat* (*sodium dodecyl sulfat, SDS*) den Proteinen eine negative Ladung proportional zu der Anzahl ihrer Aminosäuren verleiht. Die negativ geladenen, denaturierten Proteine können dann mittels einer diskontinuierlichen Gelelektrophorese in einem Polyacrylamid-Gel entsprechend ihres apparenten Molekulargewichts aufgetrennt werden. Es wurde ein angepasstes Protokoll von Sambrook & Russel (2006, [296]) verwendet:

Die Proben wurden mit einer entsprechenden Menge an SDS-Probenpuffer (5x; s. Tab. 37) versetzt und bei 95 °C und 300 rpm für 10 min denaturiert. Ein angemessenes Volumen der Proben wurde, ebenso wie 5 µl des Standards *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, (s. Tab. 36) in die Taschen des Polyacrylamid-Gels hineinpipettiert. Es wurde eine Spannung von 60 V an das sich in SDS-Laufpuffer (s. Tab. 37) befindende Polyacrylamid-Gel angelegt und sukzessiv auf 150 V erhöht. Das Polyacrylamid-Gel wurde für 10 min in H₂O_{Dest.} gewaschen und anschließend mit einer geeigneten Methode analysiert.

Analyse von proteinhaltigen Proben mittels Immunoblot

Die Analyse von proteinhaltigen Proben mittels Immunoblot erforderte zunächst die Übertragung der Proteine auf eine mit *Methanol* aktivierte *PVDF-Membran*. Dies geschah indem eine elektrische Spannung mit einer Stromstärke von 100 mA an die zwischen zwei *Whatman-Papieren* und zwei Schwämmen eingeklemmte und sich in Blottingpuffer (s. Tab. 37) befindende *PVDF-Membran* und das SDS-Gel angelegt wurde. Die negativ geladenen Proteine bewegen sich dabei von der Kathode zur Anode und binden an die *PVDF-Membran*.

Die mit Proteinen versehene *PVDF-Membran* wurde in TBST-Puffer (s. Tab. 37) gewaschen und daraufhin für 1 h bei Raumtemperatur in Blockingpuffer (s. Tab. 37) schüttelnd inkubiert. Nachfolgend wurde die *PVDF-Membran* in Blockingpuffer mit dem primären Antikörper (s. Tab. 43) für 1 h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die *PVDF-Membran* dreimal für jeweils 10 min in TBST-Puffer schüttelnd inkubiert um diese zu waschen. Daraufhin wurde die *PVDF-Membran* in Blockingpuffer mit dem sekundären Antikörper für 1 h und an-

schließlich dreimal für jeweils 10 min in TBST-Puffer schüttelnd inkubiert. Die Detektion erfolgte mithilfe des *Clarity™ Western ECL Substrate* mit dem *ChemiDoc Imaging System* nach den Angaben des Herstellers.

Analyse von proteinhaltigen Proben mittels *Coomassie*-Färbung

Die durch *SDS-PAGE* erhaltenen Gele wurden zweimal für je 10 min mit jeweils 50 ml H₂O_{bidest.} gewaschen und anschließend mit *PageBlue™ Protein Staining Solution* Lösung für mindestens 1 h zur Darstellung gefärbt. Danach wurden die Gele mindestens dreimal für je 10 min mit H₂O_{bidest.} entfärbt, wobei die Proteine ihre Färbung behielten. Anschließend wurden die Gele in der Dokumentationskammer fotografiert. Die apparenten Molekulargewichte der Proteine können anhand der verwendeten Protein-Leiter abgeschätzt werden.

In vitro GTPase-Aktivitäts-Assays

Die *in vitro* GTPase-Aktivitäts-Assays wurden mithilfe des Kits *EnzChek™ Phosphate Assay Kit* nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Assays wurden bei 25 °C in einer Quarzglasküvette durchgeführt. Es wurden jeweils 0,1 nmol rekombinant produziertes und isoliertes His₆-CT2 (~5 µg) und PLDα1-Strep (~10 µg) in GTPase-Assay-Puffer (s. Tab. 37) eingesetzt. Als Substrat wurde 10 µl von 0,2 mM GTP verwendet. Die Absorption wurde für 40 min alle 30 sec bei 360 nm mithilfe des Photospektrometers gemessen.

In vitro Mikrotubuli-Bindungs-Assay

Der Mikrotubuli-Bindungs-Assay wurde mithilfe des Kits *Microtubule Binding Protein Spin-Down Assay Biochem Kit* von *Cytoskeleton Inc.* nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Mikroskopische Methoden

Standbildaufnahmen

Mithilfe des des konfokalen *Laser-Scanning* Mikroskops *Zeiss LSM 880 AiryScan* wurden die Aufnahmen von Pflanzenzellen angefertigt, um die subzelluläre Lokalisierung von Proteinen und die Orientierung der cMTs zu analysieren. Dazu wurden die zu untersuchenden Gewebestücke präpariert, auf Objektträger übertragen, mit Wasser benetzt und mit einem Deckglas fixiert. YFP wurde mit dem 488 nm Laser angeregt und mit dem Meta-Kanal von 516 nm bis 578 nm detektiert, während mCherry mit 561 nm von der *DPSS561* Diode angeregt und mit dem Meta-Kanal von 586 bis 623 nm detektiert wurde.

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen

Zur Analyse der Ultrastruktur wurden von Frau Elke Woelken (Universität Hamburg) Bereiche der Expansionszone von WT- und CT2-LOF-Pflanzen nach Disch *et al.* (2016, [297]) präpariert. Am Transmissionselektronenmikroskop wurden Aufnahmen der epidermalen Zellen angefertigt. Es wurden pro biologischem Replikat mindestens zehn einzelne Zellen analysiert. Es wurden zwei biologische Replikate untersucht.

Förster Resonanz Energie Transfer-Assays

Die *Förster-Resonanzenergietransfer Akzeptor Bleaching* (*Förster resonance energy transfer acceptor bleaching*, FRET AB) -Assays wurden, um die räumliche Entfernung von transient exprimierten Proteinen zu untersuchen, mit Modifikationen wie von Bleckmann *et al.* (2010, [143]) beschrieben durchgeführt.

Mithilfe der *A. thumefaciens*-Infiltration transformierte *N. benthamiana*-Pflanzen wurden für 48 h bei oben genannten Bedingungen kultiviert. Die Expression der Fusionsproteine wurde durch das Einsprühen der Blattunterseite mit Induktionspuffer (s. Tab. 37) induziert. Nach 16 h wurden transformierte und induzierte Blattbereiche ausgeschnitten und analysiert. Die Epidermiszellen der analysierten Gewebestücke wurden mit dem 40x Wasser / NA 1.2-Objektiv des konfokalen *Laser-Scanning* Mikroskops *Zeiss LSM 880 AiryScan* untersucht. GFP in einer *region of interest* (ROI) an der Zellperipherie wurde mit dem 488 nm Laser angeregt und mit dem Meta-Kanal von 498 bis 525 nm detektiert. mCherry wurde mit 561 nm von der *DPSS561* Diode angeregt und mit dem Meta-Kanal von 586 bis 623 nm detektiert. Die Bildgröße war 512 * 512 Pixel mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 1,02 μ s pro Pixel. Es wurden mindestens 10 Detektions-Frames der ROI an der PM aufgenommen, um die Fluktuation der Intensität von GFP mitteln zu können. Daraufhin wurde für 100 Iterationen mit 100 % der Laserintensität der 561 Diode das *Bleaching* durchgeführt, dann wurden weitere fünf Detektions-Frames aufge-

nommen. E_{FRET} wurde ermittelt indem die Intensität der GFP-Emission (Median von mindestens 10 Frames) vor dem *Bleaching* des Akzeptors mCherry mit der Intensität nach dem *Bleaching* mit von Formel 5 verglichen wurde. Es wurden pro biologischem Replikat mindestens sieben einzelne Zellen analysiert, insgesamt wurden mindestens 10 Messungen durchgeführt. Es wurden mindestens drei biologische Replikate untersucht.

$$E_{FRET} = \frac{(GFP_{after} - GFP_{before})}{GFP_{after}} * 100$$

Formel 5: Gleichung zur Ermittlung der FRET-Effizienz E_{FRET} .

Die FRET-Effizienz E_{FRET} (%) wurde mithilfe der Intensität der GFP-Emission vor und nach dem Bleaching (GFP_{after} ; GFP_{before}) bestimmt. Nach [143].

Ratiometrische Bimolekulare Fluoreszenz Komplementations-Assays

Mithilfe des *ratiometrischen Bimolekularen Fluoreszenz Komplementations (ratiometric bimolecular fluorescence complementation, rBiFC)* -Assays ist es möglich, die räumliche Nähe von transient exprimierten Proteinen zu untersuchen. Mithilfe der *A. thumefaciens*-Infiltration transformierte *N. benthamiana*-Pflanzen wurden für 48 h bei oben genannten Bedingungen kultiviert. Die Epidermiszellen der analysierten Gewebestücke wurden mit dem 40x Wasser / NA 1.2-Objektiv des konfokalen *Laser-Scanning* Mikroskops Zeiss LSM 880 AiryScan untersucht. In Bereichen der Zellperipherie wurde YFP mit dem 488 nm Laser angeregt und mit dem Meta-Kanal von 507 bis 551 nm detektiert. Ebenfalls in der Zellperipherie wurde mCherry mit 561 nm von der DPSS561 Diode angeregt und mit dem Meta-Kanal von 568 bis 640 nm detektiert. Die Bildgröße war 1.024 * 1.024 Pixel. Mithilfe des Programms FIJI wurde von 25 Aufnahmen die Intensität von YFP und RFP in jeweils 20 ROI gemessen. Die Werte der Intensität wurden pro ROI mithilfe von Formel 6 direkt miteinander verglichen. Es wurden mindestens drei biologische Replikate untersucht, insgesamt wurden 25 Frames mit jeweils 20 Messungen an verschiedenen Zellen untersucht.

$$Ratio = \frac{E_{YFP}}{E_{RFP}} * 100$$

Formel 6: Gleichung zur Ermittlung der Relativen Fluoreszenz Ratio.

Die Relativen Fluoreszenz Ratio (%) wurde mithilfe der Intensität der GFP- und YFP-Emission (E_{YFP} ; E_{RFP}) bestimmt.

Computergestützte Methoden

Bildbearbeitung

Die Bearbeitung der verwendeten Fotos erfolgte mit dem Programm *Adobe Photoshop CS6*. Die Aussage der Bilder wurde nicht verändert, es wurden lediglich kosmetische Veränderungen durchgeführt. Abgebildete Bildtafeln wurden mit dem Programm *Adobe Illustrator CS6* erstellt.

Statistische Analysen

Um die Daten statistisch auswerten zu können wurden mit dem Programm *Prism 8 for MacOS* verschiedene Analysen durchgeführt. Um zu analysieren ob die einzelnen Datenpunkte eines Datensatzes eine Normalverteilung aufweisen, wurde bei einer Anzahl $n < 30$ ein Shapiro-Wilk Test, bei einer Anzahl von $n > 30$ ein *Kolmogorov-Smirnov Test* (mit *Dallal-Wilkinson-Lilliefors*) durchgeführt. Wiesen beide Datensätze eine Normalverteilung auf ($p > 0,05$) wurde ein parametrischer Signifikanztest durchgeführt um diese zu vergleichen (*Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur*). Wiesen einer oder beide Datensätze keine Normalverteilung auf ($p < 0,05$) wurde ein nichtparametrischer Signifikanztest durchgeführt (*Mann-Whitney Test*).

Datensätze die sich laut Signifikanztest mit Werten kleiner als $P = 0,05$ unterscheiden, werden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet, Werte kleiner als $P = 0,01$ mit zwei Sternchen (**), Werte kleiner als $P = 0,001$ mit drei Sternchen (***) und Werte kleiner als $P = 0,0001$ mit vier Sternchen (****).

Appendix

Supplement

Abbildungen

A

atg	tct	gtg	ctt	acc	tgc	gtg	att	gaa	agc	atg	ggc	tca	tcc	tgt	agc	aga	tcc	cat	tct
M	S	V	L	T	C	V	I	E	S	M	G	S	S	C	S	R	S	H	S
ttc	gac	gag	gct	gaa	gca	gct	gaa	aat	gca	aag	tct	gca	gac	att	gac	cgg	agg	att	ttg
F	D	E	A	E	A	A	E	N	A	K	S	A	D	I	D	R	R	I	L
caa	gaa	aca	aaa	gcc	gaa	caa	cac	atc	cac	aag	ctc	tta	ctt	ctc	ggt	gct	gga	gaa	tcg
Q	E	T	K	A	E	Q	H	I	H	K	L	L	L	L	G	A	G	E	S
ggg	aag	tct	aca	ata	ttt	aaa	caa	ata	aag	ctt	ctt	ttc	caa	act	ggc	ttt	gac	gag	gca
G	K	S	T	I	F	K	Q	I	K	L	L	F	Q	T	G	F	D	E	A
gag	ctt	agg	agc	tac	aca	tca	gtc	atc	cat	gct	aat	gtg	tat	cag	aca	att	aaa	ata	tta
E	L	R	S	Y	T	S	V	I	H	A	N	V	Y	Q	T	I	K	I	L
tat	yag	gga	gct	aaa	gag	tta	gcc	caa	gtg	gaa	cca	gat	tct	tca	aaa	yat	gtc	tta	tct
Y	E	G	A	K	E	L	A	Q	V	E	P	D	S	S	K	Y	V	L	S
cca	gat	aat	cag	gag	att	gga	gaa	aaa	cta	tca	gaa	att	ggt	gcc	aga	ttg	gaa	tac	cca
P	D	N	Q	E	I	G	E	K	L	S	E	I	G	A	R	L	E	Y	P
tcg	ttg	aac	aaa	gaa	cgT	gta	cag	gat	gta	aga	aaa	cta	tgg	caa	gat	cca	gcc	att	cag
S	L	N	K	E	R	V	Q	D	V	R	K	L	W	Q	D	P	A	I	Q
gaa	act	tat	tca	cgT	ggg	agt	att	ctg	caa	gtc	cca	gac	tgt	gca	cag	tac	ttc	atg	gaa
E	T	Y	S	R	G	S	I	L	Q	V	P	D	C	A	Q	Y	F	M	E
aat	ttg	gac	aaa	tta	tct	gaa	gaa	gat	tat	gta	ccg	aca	aag	gag	gat	gtg	ctt	cat	gca
N	L	D	K	L	S	E	E	D	Y	V	P	T	K	E	D	V	L	H	A
aga	gta	cgg	aca	aat	ggt	gtg	gta	gaa	act	cag	ttt	agc	cct	cta	gga	gag	agc	aaa	aga
R	V	R	T	N	G	V	V	E	T	Q	F	S	P	L	G	E	S	K	R
ggc	gga	gag	gtc	tat	agg	ctg	tac	gat	gta	gga	ggc	cag	aga	aac	gag	aga	agg	aaa	tgg
G	G	E	V	Y	R	L	Y	D	V	G	G	Q	R	N	E	R	R	K	W
atc	cat	ctt	ttc	gaa	ggt	gtt	aat	gct	gta	ata	ttc	tgt	gct	gcc	att	agc	gag	tat	gat
I	H	L	F	E	G	V	N	A	V	I	F	C	A	A	I	S	E	Y	D
cag	atg	tta	ttt	gag	gat	gag	aca	aag	aac	aga	atg	atg	gag	act	aaa	gaa	ctc	ttt	gat
Q	M	L	F	E	D	E	T	K	N	R	M	M	E	T	K	E	L	F	D
tgg	gtg	cta	aag	caa	aga	tgt	ttt	gag	aaa	acc	tca	ttc	atg	tta	ttt	ctt	aac	aaa	ttt
W	V	L	K	Q	R	C	F	E	K	T	S	F	M	L	F	L	N	K	F
gac	ata	ttt	gag	aga	aaa	ata	caa	aag	gtc	cct	tta	agc	gtg	tgc	gag	tgg	ttt	aaa	gat
D	I	F	E	R	K	I	Q	K	V	P	L	S	V	C	E	W	F	K	D
tac	cag	ccc	act	gca	cct	ggc	aaa	cag	gag	gtg	gaa	cac	gcc	tac	gag	ttt	gta	aaa	aag
Y	Q	P	T	A	P	G	K	Q	E	V	E	H	A	Y	E	F	V	K	K
aag	ttt	gag	gag	ctc	tac	ttc	caa	agc	agc	aag	cct	gac	cgT	gtc	gac	cgA	gtg	ttc	aag
K	F	E	E	L	Y	F	Q	S	S	K	P	D	R	V	D	R	V	F	K
atc	tac	aga	aca	aca	gcc	ctg	gat	cag	aaa	ctt	gta	aag	aag	aca	ttc	aag	ctg	atc	gac
I	Y	R	T	A	L	D	Q	K	L	V	K	K	T	F	K	L	I	D	
gag	agc	atg	agg	cgT	tcc	aga	gaa	gga	act	tga									
E	S	M	R	R	S	R	E	G	T	-									

B

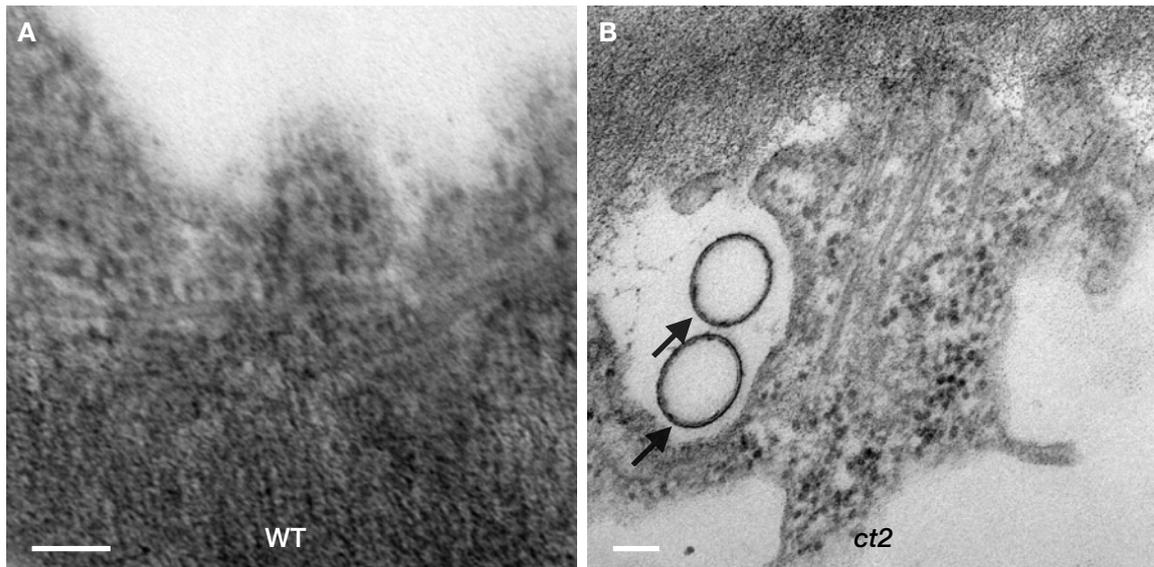
ID	Position	Peptide	Score	Cutoff
Unnamed	6	**MSVLT C VIESMGS	37.88	3.717
Unnamed	15	IESMGS S CRSHSPD	11.87	10.722

C

ID	Position	Peptide	Score	Cutoff	Type
CT2deltaM1	2	***** M GSSCSRSH	7.279	2.601	N-Myristoylation: MGXXXS/T
CT2deltaM1	5	*** M GSS S CRSHSPD	7.141	2.293	S-Palmitoylation: Cluster B

Abbildung 33: Die *in silico*-Analyse von CT2 zeigt die Anwesenheit verschiedener Startcodons sowie posttranslationaler Modifikations-Sites

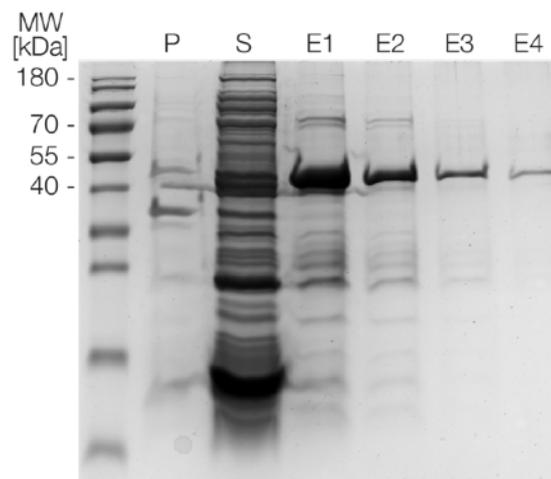
A Die cDNA von CT2 enthält zwei Startcodons. Die Nutzung dieser Codons kann zu zwei Isoformen des Proteins mit unterschiedlichen N-Termini führen. B Die Nutzung des ersten Startcodons führt zu einem posttranslational modifizierbaren Protein. Diese Isoform von CT2 erlaubt an Position 6 (Cystein) und an Position 15 (Cystein) eine posttranslationale Palmitoylierung [298]. C Die Nutzung des zweiten Startcodons



führt zu einem posttranslational modifizierbaren Protein. Diese Isoform von CT2 erlaubt eine Myristoylierung an Position 12 (Glycin) und eine Palmitoylierung an Position 15 (Cystein) [298, 299].

Abbildung 34: Längsaufnahmen der cMTs von WT- und CT2-LOF-Zellen mittels TEM zeigen keinen Unterschied

A TEM-Aufnahme der cMTs von Zellen der Expansionszone von WT-Pflanzen. Der Maßstabsbalken gibt 100 nm an. B TEM-Aufnahme der cMTs von Zellen der Expansionszone von CT2-LOF-Pflanzen. Durch



Pfeile markiert sind runde Elemente, die in Zellen von WT-Pflanzen nicht zu erkennen waren. Der Maßstabsbalken gibt 100 nm an.

Abbildung 35: His₆-CT2 lässt sich mithilfe von *E. coli* BL21 (DE3) heterolog produzieren und anschließend isolieren

Die mit *Coomassie* gefärbten SDS-PAGE-Gele zeigen die Pellet- und Überstand-Fractionen nach Aufschluss der Zellen und die Fractionen der Elution. His₆-CT2 (ca. 45,42 kDa; kalkuliert mit [118-120]) ist in der Überstand-Fraction zu erkennen. Nach der Isolation ist His₆-CT2 das Protein mit der größten Abundanz. P, Pellet-Fraction; S, Überstand-Fraction; E1-E4 Fractionen der Elution.

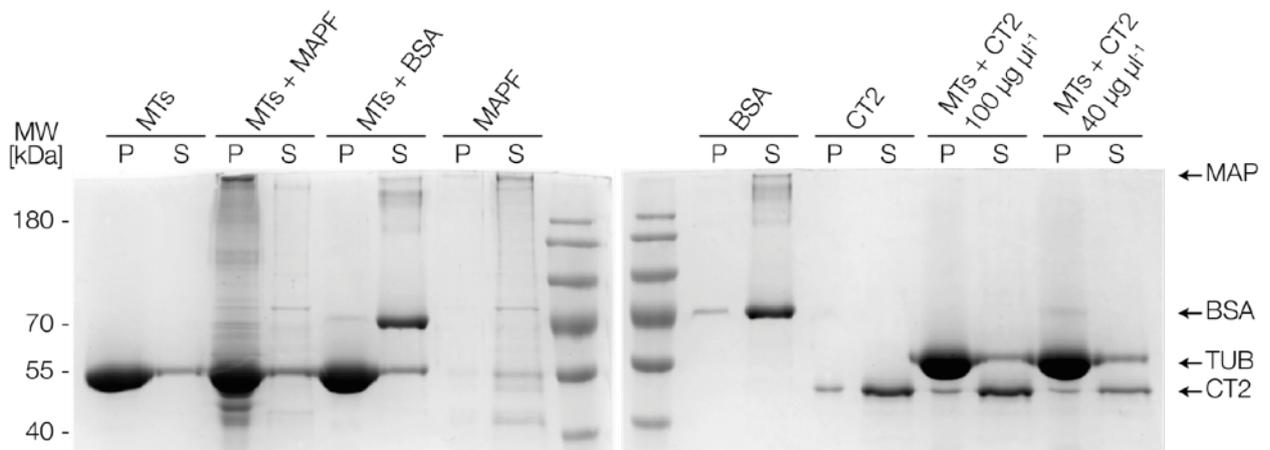


Abbildung 36: CT2-GDP bindet *in vitro* nicht an Mikrotubuli

Die mit *Coomassie* gefärbten SDS-PAGE-Gele zeigten die Pellet- und Überstand-Fractionen nach Durchführung des Mikrotubuli-Bindungs-Assays nach Angaben des Herstellers. MTs, Mikrotubuli; P, Pellet-Fraktion; S, Überstand-Fraktion. Die Position der Pfeile zeigen das erwartete apparente Molekulargewicht aller verwendeten Proteine. Mikrotubuli sedimentierten nach einer Zentrifugation mit 100.000x *g*. Eine MAP-Fraktion (MAPF) diente als Positivkontrolle und zeigte, dass an Mikrotubuli gebundene Proteine ebenfalls sedimentierten, während BSA als Negativkontrolle diente und zeigte, dass lösliche, nicht an Mikrotubuli gebundene Proteine während der Zentrifugation nicht sedimentierten. Vergleichbar mit der Negativkontrolle war der überwiegende Teil von His₆-CT2 (ca. 45,42 kDa; kalkuliert mit [118-120]) in der Überstand-Fraktion zu sehen. Die für den Versuch verwendeten Fraktionen von His₆-CT2 (100 µg ml⁻¹ und 40 µg ml⁻¹) enthielten 10 mM GDP um die inaktive Konformation von CT2 zu simulieren.

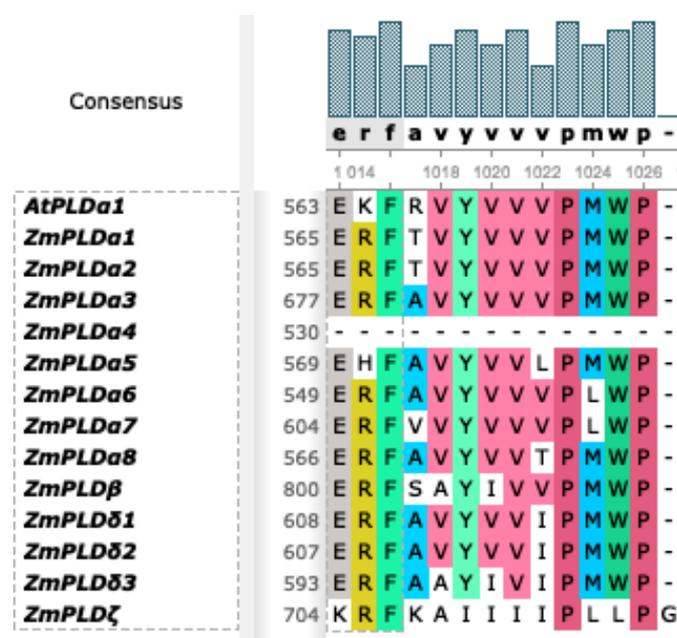


Abbildung 37: Die meisten der untersuchten PLDs von *Z. mays* enthalten das DRY Motiv

Ausschnitt des Alignments der Aminosäuresequenzen der PLDs aus *Z. mays* und AtPLDa1. Die meisten der analysierten PLDs enthalten das aus den Aminosäuren Glutaminsäure (E), Arginin (R; in PLDa5 Histidin [H]) und Phenylalanin (F) bestehende DRY-Motiv, das in anderen Organismen für die Bindung an die α -Untereinheit verantwortlich ist.

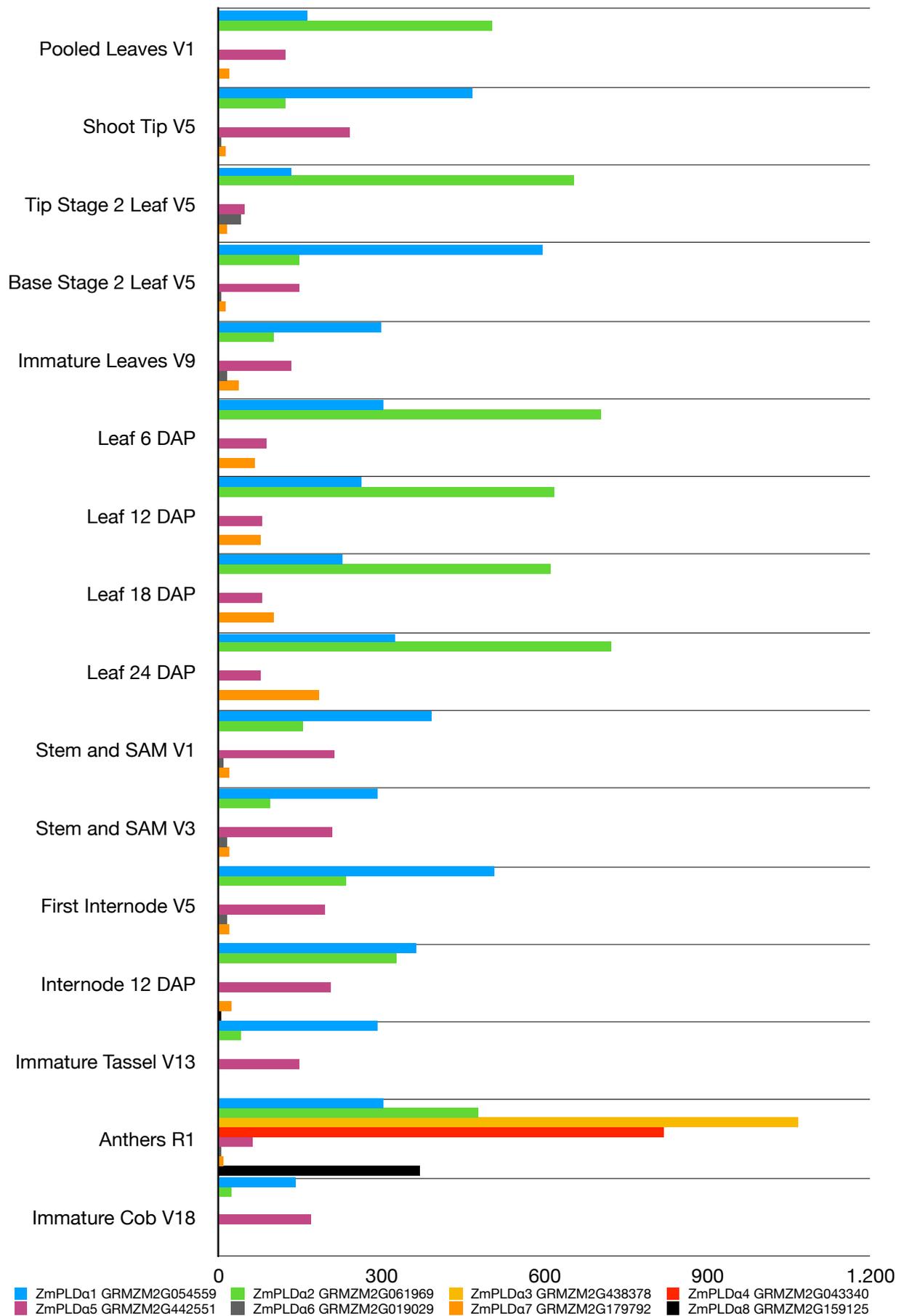


Abbildung 38: Abundanz der mRNA von ZmPLDAs in verschiedenen Geweben

Abbildung 38: Abundanz der mRNA von ZmPLDAs in verschiedenen Geweben

Die Analyse des von mRNA-Sequenzierungsdaten [32] verschiedener ZmPLDAs in verschiedenen Geweben zeigte, dass die Transkriptlevel von *ZmPLDa1* und *ZmPLDa2* in den für die Entwicklung der Maispflanze wichtigen Geweben jeweils die beiden höchsten darstellten.

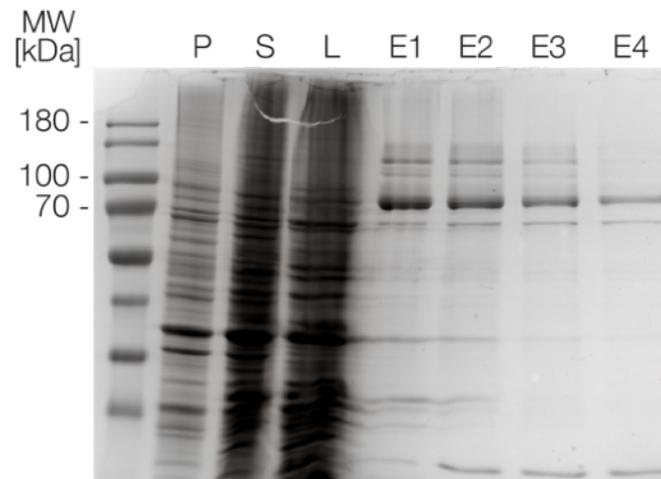


Abbildung 39: PLDa1-Strep lässt sich mithilfe von *E. coli* BL21 (DE3) heterolog produzieren und anschließend aus dem Überstand isolieren

Die mit *Coomassie* gefärbten SDS-PAGE-Gele zeigen die Pellet- und Überstand-Fractionen nach Aufschluss der Zellen und die Fractionen der Elution. PLDa1-Strep (ca. 103,13 kDa; kalkuliert mit [118-120]) ist in der Überstand-Fraktion zu erkennen. Nach der Isolation ist PLDa1-Strep das Protein mit der größten Abundanz. P, Pellet-Fraktion; S, Überstand-Fraktion; L Zelllysat E1-E4 Fractionen der Elution.

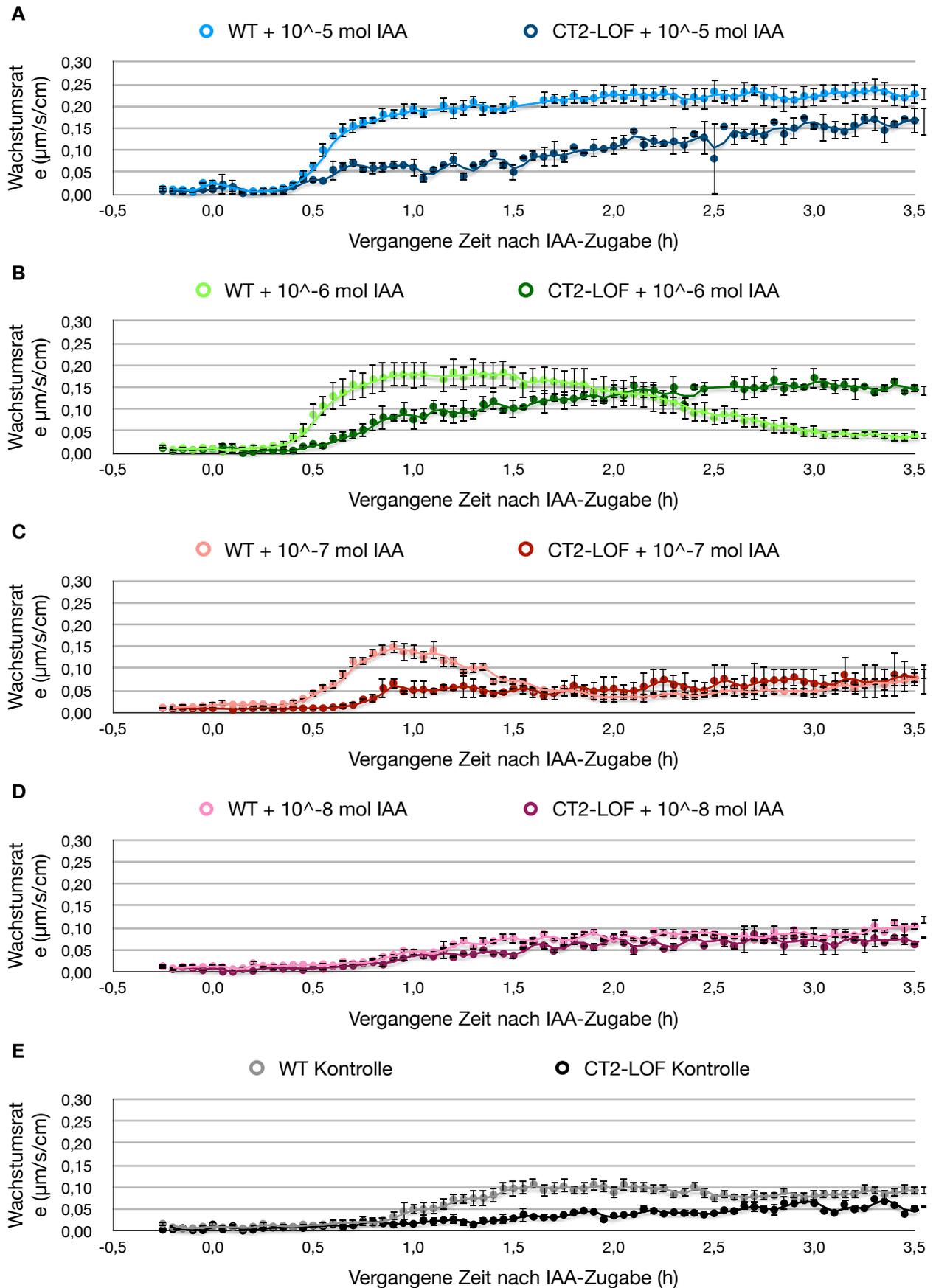


Abbildung 40: Änderung der Wachstumsrate von WT- und CT2-LOF-Koleoptilensegmenten nach IAA-Applikation

Abbildung 40: Änderung der Wachstumsrate von WT- und CT2-LOF-Koleoptilensegmenten nach externer IAA-Applikation

Um die Reaktion von WT- und CT2-LOF-Pflanzen auf die Applikation von Auxinen zu untersuchen, wurden Koleoptilensegmente beider Genotypen für jeweils 4 h mit verschiedenen IAA-Konzentrationen (A 10^{-5} , B 10^{-6} , C 10^{-7} , D 10^{-8} , E Kontrolle) inkubiert. Während dieser Zeit wurde alle 3 min die Länge der Segmente gemessen um die Wachstumsrate bestimmen zu können. Die Daten wurden als Wachstumsrate ($\mu\text{m/s/cm}$) in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass sowohl WT- als auch CT2-LOF-Pflanzen nach der Zugabe von IAA (Zeitpunkt 0) auf die IAA-Zugabe mit einer erhöhten Wachstumsrate reagierten, auch wenn diese Reaktion bei CT2-LOF-Pflanzen geringer ausgeprägt zu sein schien.

**Abbildung 41: Die Blätter von CT2-LOF-Pflanzen im Mo17-Hintergrund zeigten weniger Läsionen**

Bei der Analyse der adulten Mo17-Pflanzen fiel auf, dass die Blätter von CT2-LOF-Pflanzen deutlich weniger Läsionen aufwiesen. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht quantifiziert. Der Maßstabsbalken gibt 10 cm an.

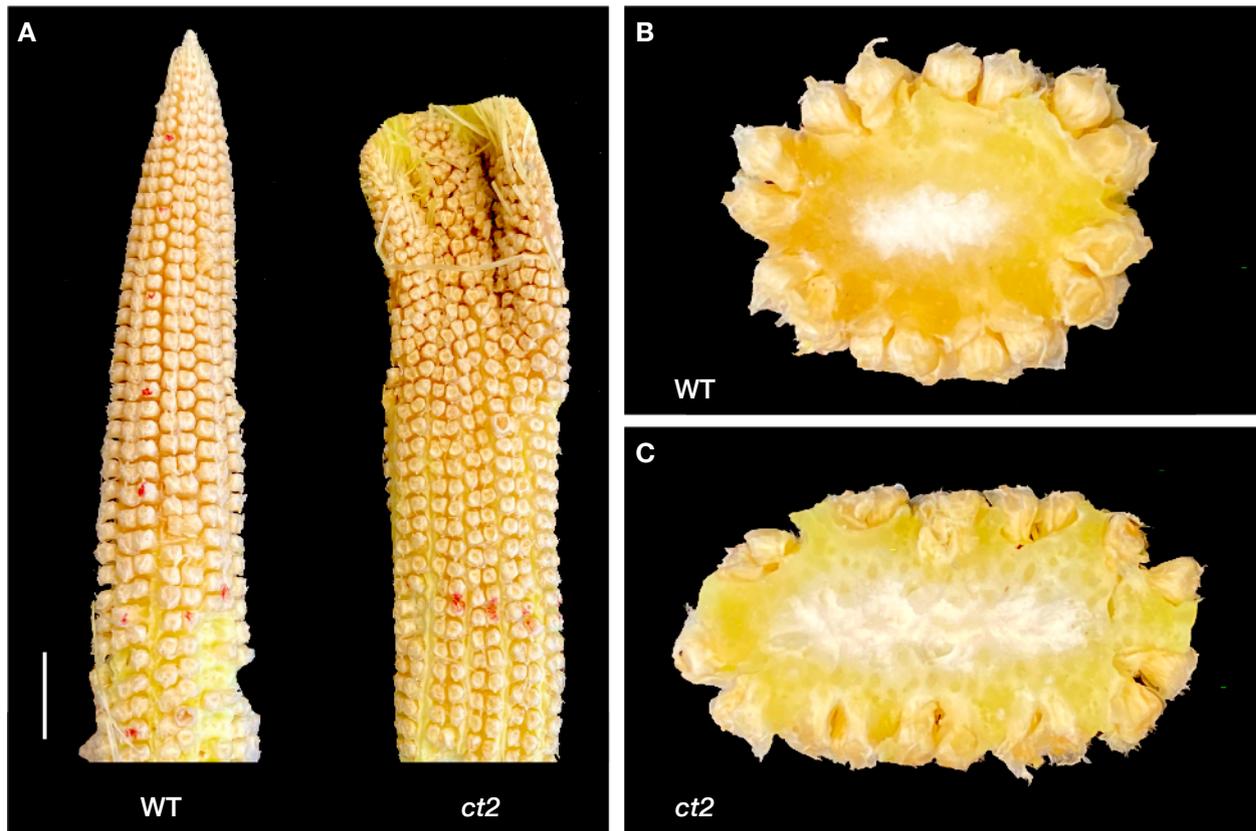


Abbildung 42: Der Kolben von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73-Hintergrund

A Unbestäubte Kolben von WT- und CT2-LOF-Pflanzen. Der Kolben von CT2-LOF-Pflanzen zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine massive Fasziation der Spitze. Die Anzahl der Körnerreihen ist signifikant erhöht, die Anzahl der Körner pro Reihe nicht. Der Maßstabsbalken gibt 1 cm an. B Querschnitt eines WT-Kolbens. Der WT-Kolben zeigt eine eher runde Form. C Querschnitt eines CT2-LOF-Kolbens. Die Fasziation führt zu einer Verbreiterung des Kolbens und zu einer Erhöhung der Anzahl der Körnerreihen.

Statistische Analysen

Tabelle 5: Ergebnisse der statistischen Analyse Querschnittsfläche der kortikalen Mikrotubuli

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{WT}=21$ $n_{ct2}=25$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT}=0,8146$ $p_{ct2}=0,1804$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{cMTs}=0,0551$

Tabelle 6: Ergebnisse der statistischen Analyse der FRET-Effizienz zwischen CT2-GFP und PLD α 1- bzw. PLD α 2-mCherry in Abhängigkeit des DRY Motivs

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{intra}=141$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{intra}>0,1000$	-	-
$n_{CT2/PLD\alpha1}=186$ $n_{CT2/PLD\alpha1\Delta DRY}=121$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{CT2/PLD\alpha1}<0,0001$ $p_{CT2/PLD\alpha1\Delta DRY}>0,1000$	Mann-Whitney-Test	$p_{PLD\alpha1}<0,0001$
$n_{CT2/PLD\alpha2}=141$ $n_{CT2/PLD\alpha2\Delta DRY}=108$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{CT2/PLD\alpha2}>0,1000$ $p_{CT2/PLD\alpha2\Delta DRY}>0,1000$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{PLD\alpha2}<0,0001$

Tabelle 7: Ergebnisse der statistischen Analyse des *rationometrischen Bimolekularen Fluoreszenz Komplementations-Assays*

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{PLD\alpha1}=500$ $n_{PLD\alpha1\Delta DRY}=500$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{PLD\alpha1}<0,0001$ $p_{PLD\alpha1\Delta DRY}<0,0001$	Mann-Whitney-Test	$p_{PLD\alpha1}<0,0001$
$n_{PLD\alpha2}=500$ $n_{PLD\alpha2\Delta DRY}=500$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{PLD\alpha2}=0,0064$ $p_{PLD\alpha2\Delta DRY}<0,0001$	Mann-Whitney-Test	$p_{PLD\alpha2}<0,0001$

Tabelle 8: Ergebnisse der statistischen Analyse des Vergleichs des PE-Gehalts von WT- und CT2-LOF-Pflanzen

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{WT}=3$ $n_{ct2}=3$	Kolmogorov-Smirnov Test	p_{WT} nicht zu errechnen $p_{ct2}=0,8776$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{PE}=0,8214$
$n_{PLD\alpha2}=500$ $n_{PLD\alpha2\Delta DRY}=500$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{PLD\alpha2}=0,0064$ $p_{PLD\alpha2\Delta DRY}<0,0001$	Mann-Whitney-Test	$p_{PLD\alpha2}<0,0001$

Tabelle 9 : Ergebnisse der statistischen Analyse des Vergleichs des PA-Gehalts von WT- und CT2-LOF-Pflanzen

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{WT}=3$ $n_{ct2}=3$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{WT}=0,6939$ $p_{ct2}=0,3341$	Mann-Whitney-Test	$p_{PA}=0,4000$

Tabelle 10: Ergebnisse der statistischen Analyse des Einfluss von ABA auf die Länge der Hauptwurzel von WT-Pflanzen

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{WT -ABA 0}=14$ $n_{WT +ABA 0}=12$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT -ABA 0}>0,5299$ $p_{WT +ABA 0}>0,5165$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{WT 0}=0,8037$
$n_{WT -ABA 1}=14$ $n_{WT +ABA 1}=12$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT -ABA 1}>0,9755$ $p_{WT +ABA 1}>0,0491$	Mann-Whitney-Test	$p_{WT 1}=0,0298$
$n_{WT -ABA 2}=14$ $n_{WT +ABA 2}=12$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT -ABA 2}>0,3391$ $p_{WT +ABA 2}>0,1396$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{WT 2}=0,0011$
$n_{WT -ABA 3}=14$ $n_{WT +ABA 3}=12$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT -ABA 3}>0,1275$ $p_{WT +ABA 3}>0,0625$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{WT 3}=0,0006$
$n_{WT -ABA 4}=14$ $n_{WT +ABA 4}=12$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT -ABA 4}>0,0339$ $p_{WT +ABA 4}>0,0656$	Mann-Whitney-Test	$p_{WT 4}=0,0002$
$n_{WT -ABA 5}=14$ $n_{WT +ABA 5}=12$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT -ABA 5}>0,0232$ $p_{WT +ABA 5}>0,1842$	Mann-Whitney-Test	$p_{WT 5}=0,0001$
$n_{WT -ABA 6}=14$ $n_{WT +ABA 6}=12$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT -ABA 6}>0,0339$ $p_{WT +ABA 6}>0,2924$	Mann-Whitney-Test	$p_{WT 6}=0,0001$
$n_{WT -ABA 7}=14$ $n_{WT +ABA 7}=12$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT -ABA 7}>0,0037$ $p_{WT +ABA 7}>0,1851$	Mann-Whitney-Test	$p_{WT 7}=0,0001$

Tabelle 11: Ergebnisse der statistischen Analyse des Einfluss von ABA auf die Länge der Hauptwurzel von CT2-LOF-Pflanzen

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{ct2-Ref. -ABA 0}=9$ $n_{ct2-Ref. +ABA 0}=6$	Shapiro-Wilk Test	$p_{ct2-Ref. -ABA 0}>0,0855$ $p_{ct2-Ref. +ABA 0}>0,3938$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{ct2-Ref. 0}=0,2963$
$n_{ct2-Ref. -ABA 1}=9$ $n_{ct2-Ref. +ABA 1}=6$	Shapiro-Wilk Test	$p_{ct2-Ref. -ABA 1}>0,2691$ $p_{ct2-Ref. +ABA 1}>0,3338$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{ct2-Ref. 1}=0,0004$
$n_{ct2-Ref. -ABA 2}=9$ $n_{ct2-Ref. +ABA 2}=6$	Shapiro-Wilk Test	$p_{ct2-Ref. -ABA 2}>0,4066$ $p_{ct2-Ref. +ABA 2}>0,2082$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{ct2-Ref. 2}<0,0001$
$n_{ct2-Ref. -ABA 3}=9$ $n_{ct2-Ref. +ABA 3}=6$	Shapiro-Wilk Test	$p_{ct2-Ref. -ABA 3}>0,7314$ $p_{ct2-Ref. +ABA 3}>0,2777$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{ct2-Ref. 3}<0,0001$
$n_{ct2-Ref. -ABA 4}=9$ $n_{ct2-Ref. +ABA 4}=6$	Shapiro-Wilk Test	$p_{ct2-Ref. -ABA 4}>0,6813$ $p_{ct2-Ref. +ABA 4}>0,2541$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{ct2-Ref. 4}<0,0001$

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{ct2-Ref. -ABA 5}=9$ $n_{ct2-Ref. +ABA 5}=6$	Shapiro-Wilk Test	$p_{ct2-Ref. -ABA 5}>0,2922$ $p_{ct2-Ref. +ABA 5}>0,1238$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{ct2-Ref. 5}<0,0001$
$n_{ct2-Ref. -ABA 6}=9$ $n_{ct2-Ref. +ABA 6}=6$	Shapiro-Wilk Test	$p_{ct2-Ref. -ABA 6}>0,5649$ $p_{ct2-Ref. +ABA 6}>0,0638$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{ct2-Ref. 6}=0,0001$
$n_{ct2-Ref. -ABA 7}=9$ $n_{ct2-Ref. +ABA 7}=6$	Shapiro-Wilk Test	$p_{ct2-Ref. -ABA 7}>0,6190$ $p_{ct2-Ref. +ABA 7}>0,0878$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{ct2-Ref. 7}<0,0001$

Tabelle 12: Ergebnisse der statistischen Analyse der Länge der Hauptwurzel von WT- und CT2-LOF-Pflanzen

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{WT -ABA 0}=14$ $n_{ct2-Ref. -ABA 0}=9$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT -ABA 0}>0,5299$ $p_{ct2-Ref. -ABA 0}>0,0855$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{-ABA 0}=0,9284$
$n_{WT -ABA 1}=14$ $n_{ct2-Ref. -ABA 1}=9$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT -ABA 1}>0,9755$ $p_{ct2-Ref. -ABA 1}>0,2691$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{-ABA 1}=0,4281$
$n_{WT -ABA 2}=14$ $n_{ct2-Ref. -ABA 2}=9$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT -ABA 2}>0,3391$ $p_{ct2-Ref. -ABA 2}>0,4066$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{-ABA 2}=0,3270$
$n_{WT -ABA 3}=14$ $n_{ct2-Ref. -ABA 3}=9$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT -ABA 3}>0,1275$ $p_{ct2-Ref. -ABA 3}>0,7314$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{-ABA 3}=0,2750$
$n_{WT -ABA 4}=14$ $n_{ct2-Ref. -ABA 4}=9$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT -ABA 4}>0,0339$ $p_{ct2-Ref. +ABA 4}>0,2541$	Mann-Whitney-Test	$p_{-ABA 4}=0,2297$
$n_{WT -ABA 5}=14$ $n_{ct2-Ref. -ABA 5}=9$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT -ABA 5}>0,0232$ $p_{ct2-Ref. -ABA 5}>0,2922$	Mann-Whitney-Test	$p_{-ABA 5}=0,5461$
$n_{WT -ABA 6}=14$ $n_{ct2-Ref. -ABA 6}=9$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT -ABA 6}>0,0339$ $p_{ct2-Ref. -ABA 6}>0,5649$	Mann-Whitney-Test	$p_{-ABA 6}=0,3430$
$n_{WT -ABA 7}=14$ $n_{ct2-Ref. -ABA 7}=9$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT -ABA 7}>0,0037$ $p_{ct2-Ref. -ABA 7}>0,6190$	Mann-Whitney-Test	$p_{-ABA 7}=0,5457$

Tabelle 13: Ergebnisse der statistischen Analyse des Einfluss von ABA auf die Länge der Hauptwurzel von WT- und CT2-LOF-Pflanzen

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{WT +ABA 0}=12$ $n_{ct2-Ref. +ABA 0}=6$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT +ABA 0}>0,5165$ $p_{ct2-Ref. +ABA 0}>0,3938$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{+ABA 0}=0,2072$
$n_{WT +ABA 1}=12$ $n_{ct2-Ref. +ABA 1}=6$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT +ABA 1}>0,0491$ $p_{ct2-Ref. +ABA 1}>0,3338$	Mann-Whitney-Test	$p_{+ABA 1}=0,2367$
$n_{WT +ABA 2}=12$ $n_{ct2-Ref. +ABA 2}=6$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT +ABA 2}>0,1396$ $p_{ct2-Ref. +ABA 2}>0,2082$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{+ABA 2}=0,2190$
$n_{WT +ABA 3}=12$ $n_{ct2-Ref. +ABA 3}=6$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT +ABA 3}>0,0625$ $p_{ct2-Ref. +ABA 3}>0,2777$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{+ABA 3}=0,2568$

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{WT+ABA\ 4}=12$ $n_{ct2-Ref.+ABA\ 4}=6$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT+ABA\ 4}>0,0656$ $p_{ct2-Ref.+ABA\ 4}>0,2541$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{+ABA\ 4}=0,3474$
$n_{WT+ABA\ 5}=12$ $n_{ct2-Ref.+ABA\ 5}=6$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT+ABA\ 5}>0,1842$ $p_{ct2-Ref.+ABA\ 5}>0,1238$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{+ABA\ 5}=0,3428$
$n_{WT+ABA\ 6}=12$ $n_{ct2-Ref.+ABA\ 6}=6$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT+ABA\ 6}>0,2924$ $p_{ct2-Ref.+ABA\ 6}>0,0638$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{+ABA\ 6}=0,4150$
$n_{WT+ABA\ 7}=12$ $n_{ct2-Ref.+ABA\ 7}=6$	Shapiro-Wilk Test	$p_{WT+ABA\ 7}>0,1851$ $p_{ct2-Ref.+ABA\ 7}>0,0878$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{+ABA\ 7}=0,2917$

Tabelle 14: Ergebnisse der statistischen Analyse der Länge des ersten Blattes von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{B73\ WT}=94$ $n_{B73\ ct2-Ref.}=73$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{B73\ WT}=0,0765$ $p_{B73\ ct2-Ref.}=0,0013$	Mann-Whitney-Test	$p_{B73\ Länge\ 1. Blatt}<0,0001$
$n_{Mo17\ WT}=112$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.}=38$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{Mo17\ WT}=0,0211$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.}=0,0596$	Mann-Whitney-Test	$p_{Mo17\ Länge\ 1. Blatt}<0,0001$

Tabelle 15: Ergebnisse der statistischen Analyse der Breite des ersten Blattes von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{B73\ WT}=81$ $n_{B73\ ct2-Ref.}=51$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{B73\ WT}<0,0001$ $p_{B73\ ct2-Ref.}=0,0002$	Mann-Whitney-Test	$p_{B73\ Breite\ 1. Blatt}=0,0273$
$n_{Mo17\ WT}=93$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.}=26$	Kolmogorov-Smirnov Test Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT}<0,0001$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.}=0,1031$	Mann-Whitney-Test	$p_{Mo17\ Breite\ 1. Blatt}=0,0355$

Tabelle 16: Ergebnisse der statistischen Analyse der Ratio des ersten Blattes von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{B73\ WT}=81$ $n_{B73\ ct2-Ref.}=51$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{B73\ WT}=0,0228$ $p_{B73\ ct2-Ref.}=0,0858$	Mann-Whitney-Test	$p_{B73\ Ratio\ 1. Blatt}<0,0001$
$n_{Mo17\ WT}=93$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.}=26$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{Mo17\ WT}>0,1000$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.}>0,1000$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{Mo17\ Ratio\ 1. Blatt}<0,0001$

Tabelle 17: Ergebnisse der statistischen Analyse der Länge des zweiten Blattes von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{B73\ WT}=81$ $n_{B73\ ct2-Ref.}=49$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{B73\ WT}=0,0589$ $p_{B73\ ct2-Ref.}>0,1000$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{B73\ Länge\ 2.}$ Blatt $<0,0001$
$n_{Mo17\ WT}=98$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.}=34$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{Mo17\ WT}>0,1000$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.}>0,1000$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{Mo17\ Länge\ 2.}$ Blatt $<0,0001$

Tabelle 18: Ergebnisse der statistischen Analyse der Breite des zweiten Blattes von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{B73\ WT}=81$ $n_{B73\ ct2-Ref.}=49$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{B73\ WT}<0,0001$ $p_{B73\ ct2-Ref.}<0,0001$	Mann-Whitney-Test	$p_{B73\ Breite\ 2.}$ Blatt $<0,0001$
$n_{Mo17\ WT}=98$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.}=34$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{Mo17\ WT}<0,0001$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.}=0,0944$	Mann-Whitney-Test	$p_{Mo17\ Breite\ 2.}$ Blatt $=0,1331$

Tabelle 19: Ergebnisse der statistischen Analyse der Ratio des zweiten Blattes von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{B73\ WT}=81$ $n_{B73\ ct2-Ref.}=49$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{B73\ WT}>0,1000$ $p_{B73\ ct2-Ref.}>0,1000$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{B73\ Ratio\ 2.}$ Blatt $<0,0001$
$n_{Mo17\ WT}=98$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.}=34$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{Mo17\ WT}>0,1000$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.}=0,0128$	Mann-Whitney-Test	$p_{Mo17\ Ratio\ 2.}$ Blatt $<0,0001$

Tabelle 20: Ergebnisse der statistischen Analyse der Länge des dritten Blattes von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{B73\ WT}=42$ $n_{B73\ ct2-Ref.}=40$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{B73\ WT}>0,1000$ $p_{B73\ ct2-Ref.}>0,1000$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{B73\ Länge\ 3.}$ Blatt $<0,0001$
$n_{Mo17\ WT}=81$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.}=36$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{Mo17\ WT}=0,0106$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.}=0,0353$	Mann-Whitney-Test	$p_{Mo17\ Länge\ 3.}$ Blatt $<0,0001$

Tabelle 21: Ergebnisse der statistischen Analyse der Breite des dritten Blattes von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{B73\ WT}=31$ $n_{B73\ ct2-Ref.}=25$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{B73\ WT}=0,0353$ $p_{B73\ ct2-Ref.}=0,0451$	Mann-Whitney-Test	$p_{B73\ Breite\ 3.}\text{Blatt}<0,0001$
$n_{Mo17\ WT}=61$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.}=25$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{Mo17\ WT}<0,0001$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.}=0,0389$	Mann-Whitney-Test	$p_{Mo17\ Breite\ 3.}\text{Blatt}=0,2482$

Tabelle 22: Ergebnisse der statistischen Analyse der Ratio des dritten Blattes von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{B73\ WT}=31$ $n_{B73\ ct2-Ref.}=25$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{B73\ WT}=0,0791$ $p_{B73\ ct2-Ref.}>0,1000$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{B73\ Ratio\ 3.}\text{Blatt}<0,0001$
$n_{Mo17\ WT}=61$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.}=25$	Kolmogorov-Smirnov Test	$p_{Mo17\ WT}>0,1000$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.}=0,0640$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{Mo17\ Ratio\ 3.}\text{Blatt}<0,0001$

Tabelle 23: Ergebnisse der statistischen Analyse der Höhe von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{B73\ WT}=18$ $n_{B73\ ct2-Ref.}=10$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT}=0,0431$ $p_{B73\ ct2-Ref.}=0,0030$	Mann-Whitney-Test	$p_{B73}<0,0001$
$n_{Mo17\ WT}=20$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.}=17$	Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT}=0,0981$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.}=0,6199$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{Mo17}<0,0001$

Tabelle 24: Ergebnisse der statistischen Analyse des Blattwinkels von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{B73\ WT}=19$ $n_{B73\ ct2-Ref.}=22$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT}=0,6541$ $p_{B73\ ct2-Ref.}=0,0081$	Mann-Whitney-Test	$p_{B73}<0,0001$
$n_{Mo17\ WT}=20$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.}=17$	Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT}=0,1277$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.}=0,2622$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{Mo17}<0,0001$

Tabelle 25: Ergebnisse der statistischen Analyse der Länge der Internodien von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73-Hintergrund

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{B73\ WT\ 1}=16$ $n_{B73\ ct2-Ref.\ 1}=16$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT\ 1}=0,5664$ $p_{B73\ ct2-Ref.\ 1}=0,6487$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{B73\ 1}<0,0001$
$n_{B73\ WT\ 2}=16$ $n_{B73\ ct2-Ref.\ 2}=19$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT\ 2}=0,2897$ $p_{B73\ ct2-Ref.\ 2}=0,2488$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{B73\ 2}<0,0001$
$n_{B73\ WT\ 3}=16$ $n_{B73\ ct2-Ref.\ 3}=21$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT\ 3}=0,1304$ $p_{B73\ ct2-Ref.\ 3}=0,3678$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{B73\ 3}<0,0001$
$n_{B73\ WT\ 4}=16$ $n_{B73\ ct2-Ref.\ 4}=21$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT\ 4}=0,0196$ $p_{B73\ ct2-Ref.\ 4}=0,5903$	Mann-Whitney-Test	$p_{B73\ 4}<0,0001$
$n_{B73\ WT\ 5}=16$ $n_{B73\ ct2-Ref.\ 5}=21$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT\ 5}=0,0017$ $p_{B73\ ct2-Ref.\ 5}=0,0910$	Mann-Whitney-Test	$p_{B73\ 5}<0,0001$
$n_{B73\ WT\ 6}=16$ $n_{B73\ ct2-Ref.\ 6}=21$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT\ 6}=0,1309$ $p_{B73\ ct2-Ref.\ 6}=0,0617$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{B73\ 6}<0,0001$
$n_{B73\ WT\ 7}=16$ $n_{B73\ ct2-Ref.\ 7}=21$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT\ 7}=0,3329$ $p_{B73\ ct2-Ref.\ 7}=0,2087$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{B73\ 7}<0,0001$
$n_{B73\ WT\ 8}=16$ $n_{B73\ ct2-Ref.\ 8}=21$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT\ 8}=0,0399$ $p_{B73\ ct2-Ref.\ 8}=0,0054$	Mann-Whitney-Test	$p_{B73\ 8}<0,0001$
$n_{B73\ WT\ 9}=16$ $n_{B73\ ct2-Ref.\ 9}=21$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT\ 9}=0,5968$ $p_{B73\ ct2-Ref.\ 9}=0,0001$	Mann-Whitney-Test	$p_{B73\ 9}<0,0001$
$n_{B73\ WT\ 10}=16$ $n_{B73\ ct2-Ref.\ 10}=21$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT\ 10}=0,0206$ $p_{B73\ ct2-Ref.\ 10}<0,0001$	Mann-Whitney-Test	$p_{B73\ 10}<0,0001$
$n_{B73\ WT\ 11}=16$ $n_{B73\ ct2-Ref.\ 11}=21$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT\ 11}=0,0089$ $p_{B73\ ct2-Ref.\ 11}<0,0001$	Mann-Whitney-Test	$p_{B73\ 11}<0,0001$
$n_{B73\ WT\ 12}=16$ $n_{B73\ ct2-Ref.\ 12}=21$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT\ 12}=0,0780$ $p_{B73\ ct2-Ref.\ 12}=0,0020$	Mann-Whitney-Test	$p_{B73\ 12}<0,0001$
$n_{B73\ WT\ 13}=14$ $n_{B73\ ct2-Ref.\ 13}=21$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT\ 13}=0,3645$ $p_{B73\ ct2-Ref.\ 13}=0,0063$	Mann-Whitney-Test	$p_{B73\ 13}<0,0001$
$n_{B73\ WT\ 14}=8$ $n_{B73\ ct2-Ref.\ 14}=20$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT\ 14}=0,8946$ $p_{B73\ ct2-Ref.\ 14}=0,3988$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{B73\ 14}=0,0076$

Tabelle 26: Ergebnisse der statistischen Analyse der Länge der Internodien von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im Mo17-Hintergrund

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{Mo17\ WT\ 1}=16$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.\ 1}=17$	Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT\ 1}=0,0048$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.\ 1}=0,0125$	Mann-Whitney-Test	$p_{Mo17\ 1}<0,0001$
$n_{Mo17\ WT\ 2}=16$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.\ 2}=17$	Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT\ 2}=0,6646$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.\ 2}=0,1166$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{Mo17\ 2}<0,0001$
$n_{Mo17\ WT\ 3}=16$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.\ 3}=17$	Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT\ 3}=0,3496$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.\ 3}=0,5385$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{Mo17\ 3}<0,0001$

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{Mo17\ WT\ 4}=16$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.\ 4}=17$	Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT\ 4}=0,0270$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.\ 4}=0,6187$	Mann-Whitney-Test	$p_{Mo17\ 4}<0,0001$
$n_{Mo17\ WT\ 5}=16$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.\ 5}=17$	Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT\ 5}=0,3039$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.\ 5}=0,2333$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{Mo17\ 5}<0,0001$
$n_{Mo17\ WT\ 6}=16$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.\ 6}=17$	Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT\ 6}=0,1865$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.\ 6}=0,1670$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{Mo17\ 6}<0,0001$
$n_{Mo17\ WT\ 7}=16$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.\ 7}=17$	Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT\ 7}=0,5364$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.\ 7}=0,3361$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{Mo17\ 7}<0,0001$
$n_{Mo17\ WT\ 8}=16$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.\ 8}=17$	Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT\ 8}=0,6209$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.\ 8}=0,0598$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{Mo17\ 8}<0,0001$
$n_{Mo17\ WT\ 9}=16$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.\ 9}=17$	Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT\ 9}=0,6738$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.\ 9}=0,8086$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{Mo17\ 9}<0,0001$
$n_{Mo17\ WT\ 10}=16$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.\ 10}=17$	Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT\ 10}=0,8532$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.\ 10}=0,0657$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{Mo17\ 10}<0,0001$
$n_{Mo17\ WT\ 11}=12$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.\ 11}=21$	Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT\ 11}=0,2466$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.\ 11}=0,1794$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{Mo17\ 11}=0,0071$
$n_{Mo17\ WT\ 12}=4$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.\ 12}=14$	Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT\ 12}=0,1305$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.\ 12}=0,0933$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{Mo17\ 12}=0,0965$

Tabelle 27: Ergebnisse der statistischen Analyse der Anzahl der Internodien von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{B73\ WT}=16$ $n_{B73\ ct2-Ref.}=21$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT}=0,0303$ $p_{B73\ ct2-Ref.}=0,0050$	Mann-Whitney-Test	$p_{B73}=0,0003$
$n_{Mo17\ WT}=16$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.}=17$	Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT}=0,0050$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.}=0,0009$	Mann-Whitney-Test	$p_{Mo17}=0,0003$
$n_{B73\ WT}=16$ $n_{Mo17\ WT}=16$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT}=0,0303$ $p_{Mo17\ WT}=0,0050$	Mann-Whitney-Test	$p_{WT}<0,0001$

Tabelle 28: Ergebnisse der statistischen Analyse des Verhältnisses der Internodien von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{B73}=15$ $n_{Mo17}=12$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT}=0,0246$ $p_{B73\ ct2-Ref.}=0,4533$	Mann-Whitney-Test	$p_{Ratio\ Internodien}=0,0746$

Tabelle 29: Ergebnisse der statistischen Analyse der Länge der männlichen Infloreszenz von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{B73\ WT}=18$ $n_{B73\ ct2-Ref.}=10$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT}=0,3185$ $p_{B73\ ct2-Ref.}=0,0497$	Mann-Whitney-Test	$p_{B73}<0,0001$
$n_{Mo17\ WT}=20$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.}=17$	Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT}=0,7571$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.}=0,5243$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{Mo17}<0,0001$

Tabelle 30: Ergebnisse der statistischen Analyse der Anzahl der Rispenäste der männlichen Infloreszenz von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{B73\ WT}=18$ $n_{B73\ ct2-Ref.}=10$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT}=0,0138$ $p_{B73\ ct2-Ref.}=0,2004$	Mann-Whitney-Test	$p_{B73}=0,0033$
$n_{Mo17\ WT}=20$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.}=17$	Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT}=0,1669$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.}=0,0155$	Mann-Whitney-Test	$p_{Mo17}=0,0588$

Tabelle 31: Ergebnisse der statistischen Analyse der Länge des zentralen Blütenstandes der männlichen Infloreszenz von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{B73\ WT}=18$ $n_{B73\ ct2-Ref.}=10$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT}=0,7056$ $p_{B73\ ct2-Ref.}=0,3299$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{B73}<0,0001$
$n_{Mo17\ WT}=20$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.}=17$	Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT}=0,1183$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.}=0,4149$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{B73}<0,0001$

Tabelle 32: Ergebnisse der statistischen Analyse der Anzahl der Ährchen von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{B73\ WT}=18$ $n_{B73\ ct2-Ref.}=10$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT}=0,2597$ $p_{B73\ ct2-Ref.}=0,2634$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{B73}<0,0001$
$n_{Mo17\ WT}=20$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.}=16$	Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT}=0,1825$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.}=0,5207$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{B73}<0,0001$

Tabelle 33: Ergebnisse der statistischen Analyse der Anzahl der Körnerreihen von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{B73\ WT}=11$ $n_{B73\ ct2-Ref.}=11$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT}<0,0001$ $p_{B73\ ct2-Ref.}=0,0001$	Mann-Whitney-Test	$p_{B73}<0,0001$
$n_{Mo17\ WT}=13$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.}=12$	Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT}=0,0006$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.}=0,0001$	Mann-Whitney-Test	$p_{B73}<0,0001$

Tabelle 34: Ergebnisse der statistischen Analyse der Anzahl der Körner pro Reihe von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund

Anzahl	Durchgeführte Normalverteilungsanalyse	Ergebnis Normalverteilungsanalyse	Durchgeführter Signifikanztest	Ergebnis Signifikanztest
$n_{B73\ WT}=10$ $n_{B73\ ct2-Ref.}=11$	Shapiro-Wilk Test	$p_{B73\ WT}=0,9615$ $p_{B73\ ct2-Ref.}=0,0694$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{B73}=0,1111$
$n_{Mo17\ WT}=12$ $n_{Mo17\ ct2-Ref.}=12$	Shapiro-Wilk Test	$p_{Mo17\ WT}=0,0996$ $p_{Mo17\ ct2-Ref.}=0,1163$	Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur	$p_{Mo17}=0,0012$

Verwendete Materialien

Verwendete Primer

Tabelle 35: Verwendete Primer

Primer Name	Sequenz (5'-3')
CT2 cDNA For	ACCGCTGCCTTTCTTCTACT
CT2 cDNA Rev	ACTTTCTGCTCCTCACACCA
CT2 GW -Stop Rev	CAAGAAAGCTGGGTTAGTTCCCTTCTCTGGAAC
CT2 GW For	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGTCTGTGCTTACCTGC
CT2 GW Rev	CAAGAAAGCTGGGTTCAGTTCCCTTCTCTGGAAC
CT2 Seq. For	CATCGTTGAACAAAGAACGTGT
CT2 Seq. Rev	GCATGAAGCACATCCTCCTT
ct2-Ref For	TGAGGAGCTCTACTTCCAAAGC
ct2-Ref Rev	TGGCTTATAACACCACATCCTC
PLDa1 cDNA For	TTGCTCTGCTCTCATCGTCTTC
PLDa1 cDNA Rev	CAGGGACACCAAGGTGAGGCCAGAAAGGA
PLDa1 Exon1 Rev	GCGGTGCGGGTTGGAGAGCGACT
PLDa1 GW For	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGGCTCAGATCTTGCTCCAC
PLDa1 GW Rev	CAAGAAAGCTGGGTTCATGTGGTGAGGATGG
PLDa1 SDM For	CACATTGGCACCACAACATAAACAGTGGCCGCCCCCCCAGCTT- CAATCTTGCTGACAATC
PLDa1 SDM Rev	GATTGTCAGCAAGATTGAAGCTGGGGGGCGGCCACTGTT- TATGTTGTGGTGCCAATGTG
PLDa1 Seq. 421 For	GGGGACAGCAAGATCCATGT
PLDa1 Seq. 921 For	CAACTGTGTTCTGTGCCCTC
PLDa1 Seq. 1417 For	GATGGTGGTGCTGCTTTTGG
PLDa1 Seq. 1886 For	GTGAGGTAAAGCAGGAGGGA
PLDa1 UMu Genotyping For	AGTCGCTCTCCAACCCGCACCGC
PLDa1 UMu Genotyping Rev	TAAGCACCCGGACACCTTCACTGGC
PLDa1/2 GW -Stop Rev	CAAGAAAGCTGGGTTCAGTTCCCTTCTCTGGAAC
PLDa2 cDNA For	CACGCTGCCCCGACTGGAACCG
PLDa2 cDNA Rev	CACTCAATAACTATAAAAACACTGCT
PLDa2 GW For	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGGCTCAGATCTTGCTCCA
PLDa2 GWE Rev	CAAGAAAGCTGGGTTCATGTGGTGAGGATGG
PLDa2 SDM For	GCACCACAACATAAACAGTGGCCGCCCCCCCAGCTTCAATCTTGCTG

Primer Name	Sequenz (5'-3')
PLDa2 SDM Rev	CAGCAAGATTGAGGCTGGGGGGCGGCCACTGTTTATGTTGTGGTGC
PLDa2 Seq. 422 For	GGGACAGCAAGATCCACGT
PLDa2 Seq. 916 For	GACGTCAACTGTGTCTCTGTG
PLDa2 Seq. 1406 For	TTAGATCCATTGACGGCGGT
PLDa2 Seq. 1890 For	GGTGAAGCAGGAGGGAGAAT
PLDa2 UMu Genotyping For	CCCAGTAGACCCGCCACTTCTCCCGT
PLDa2 UMu Genotyping Rev	AGCGTGCCGTGGAGCAAGATCTGAGC
UMu TIR6	AGAGAAGCCAACGCCAWCGCCTCYATTTTCGTC

Verwendete Chemikalien, Lösungen, Puffer, Medien, Kits und Verbrauchsgüter

Tabelle 36: Verwendete Kits und Verbrauchsgüter

Name	Hersteller
Basta®	Bayer CropScience
Bechergläser (0,025 l; 0,05 l; 0,1 l; 0,5 l; 1,0 l)	DWK Life Sciences GmbH
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories, Inc.
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Eppendorf Safe-Lock Tubes (2,0 ml)	Eppendorf AG
Erlenmeyer-Kolben ohne Schikane (50 ml, 100 ml, 0,5 l)	DWK Life Sciences GmbH
Faltenbeutel (170*70*350 mm)	HERA Papierverarbeitung GmbH & Co. KG
Faltenbeutel (50*30*200 mm)	HERA Papierverarbeitung GmbH & Co. KG
FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Thermo Fisher Scientific Inc.
Gateway™ BP Clonase™ II Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific Inc.
Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific Inc.
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc.
GFP-Trap Magnetic Agarose	ChromoTek GmbH
Glasflaschen (0,1 l; 0,25 l; 0,5 l; 1 l)	DWK Life Sciences GmbH
Injekt® Solo (2 ml)	B. Braun Melsungen AG
MICROFLEX® 93-833	ANSELL LTD.
Microtubule Binding Protein Spin-Down Assay Biochem Kit	CYTOSKELETON Inc.
Miracloth	Calbiochem, Merck Chemicals GmbH
Ni-NTA Agarose	QIAGEN GmbH

Name	Hersteller
<i>NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up</i>	<i>MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG</i>
<i>PageBlue™ Protein Staining Solution</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc.</i>
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc.</i>
<i>Parafilm® M</i>	<i>Bemis Company, Inc.</i>
<i>peqGOLD TriFast™</i>	<i>VWR International GmbH</i>
<i>Petrischalen</i>	<i>SARSTEDT AG & Co. KG</i>
<i>Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc.</i>
<i>Pipettenspitzen (10 -100 µl)</i>	<i>Greiner Bio-One GmbH</i>
<i>Pipettenspitzen (10 µl)</i>	<i>SARSTEDT AG & Co. KG</i>
<i>Pipettenspitzen (1000 µl)</i>	<i>SARSTEDT AG & Co. KG</i>
<i>Plant Genomic DNA Mini Kit (GP100)</i>	<i>Geneaid Biotech Ltd.</i>
<i>Presto™ Mini Plasmid Kit</i>	<i>Geneaid Biotech Ltd.</i>
<i>PVDF-Membran</i>	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
<i>Rasierklingen Wilkinson Sword Classic</i>	<i>Wilkinson Sword GmbH</i>
<i>Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)</i>	<i>SARSTEDT AG & Co. KG</i>
<i>SafeSeal micro tube (1,5 ml)</i>	<i>SARSTEDT AG & Co. KG</i>
<i>Slide-A-Lyzer™ Dialysis Cassettes</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc.</i>
<i>Strep-Tactin® Elution Buffer mit Desthiobiotin</i>	<i>IBA GmbH</i>
<i>Strep-Tactin® Sepharose® 50% Suspension</i>	<i>IBA GmbH</i>
<i>SuperScript™ IV Reverse Transcriptase</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc.</i>
<i>Zellsieb</i>	<i>Greiner Bio-One GmbH</i>

Tabelle 37: Verwendete Lösungen und Puffer

Name	Inhalt
<i>ABA-Wachstumspuffer</i>	<i>3 mM KCl 0,5 mM CaCl₂ 0,125 mM MgSO₄</i>
<i>APS-Lösung (10 %)</i>	<i>10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in H₂O_{bidest.}</i>
<i>Blockingpuffer</i>	<i>5 % (w/v) Milchpulver in TBST</i>
<i>Blottingpuffer (20x)</i>	<i>180 g^{*l}-1 Glycin 38 g^{*l}-1 TRIS</i>

Name	Inhalt
Dialysepuffer	500 mM NaCl 50 mM TRIS, pH 7,5 5 mM 2-Mercaptoethanol 10 mM MgCl ₂ 10 μM GDP 5 % Glycerol (v/v)
DNA-Extraktionspuffer	500 mM NaCl 100 mM TRIS, pH 8,0 50 mM EDTA
DNA-Probenpuffer (5x)	30 % Glycerol (v/v) 2,5 % Bromphenolblau (w/v)
Elutionspuffer	500 mM NaCl 50 mM TRIS, pH 7,5 300 mM Imidazol 5 mM 2-Mercaptoethanol 10 mM MgCl ₂ 10 μM GDP 5 % Glycerol (v/v) 1x cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail
Enzymlösung	10 mM MES 10 mM CaCl ₂ 1 mM KNO ₃ 1 mM MgSO ₄ 0,2 mM KH ₂ PO ₄ 10 g ^{*l} -1 Polyvinylpyrrolidon K25 10 g ^{*l} -1 Cellulase 2,4 g ^{*l} -1 Macerozym eingestellt auf 560 mOsmol ^{*l} -1 mit D-Mannitol und pH 5,7
GTPase-Assay-Puffer	10 mM TRIS, pH 7,5 10 mM MgCl ₂
IAA-Wachstumspuffer	10 mM KCl 10 mM CaCl ₂ pH-Wert 5,5
Induktionspuffer	20 μm β-Estradiol 0,1 % Tween 20 (v/v)
Infiltrationspuffer	42,5 ml 0,2 M NaH ₂ PO ₄ 7,5 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ 25 mM MgCl ₂ 100 μM Acetosyringon auf 100 ml mit H ₂ O _{bidest.} aufgefüllt

Name	Inhalt
Lysepuffer	150 mM NaCl 50 mM TRIS, pH 7,5 10 mM Imidazol 5 mM 2-Mercaptoethanol 1 mM MgCl ₂ 10 µM GDP 10 % Glycerol (v/v) 1x cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail
PBS-Extraktionspuffer (10x)	1,37 M NaCl 27 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ 18 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Proteinextraktionspuffer	150 mM NaCl 50 mM TRIS, pH 7,5 10 % Glycerol (v/v) 1x cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail
SDS-Laufpuffer (5x)	2,5 M Glycin 250 mM TRIS 1 % SDS (w/v)
SDS-Probenpuffer (5x)	200 mM TRIS, pH 6,8 4 g SDS 20 ml Glycerol 10 ml 2-Mercaptoethanol 0,1 g Bromphenolblau auf 50 ml mit H ₂ O _{bidest.} aufgefüllt
T4 DNA-Ligase Puffer (10x)	400 mM TRIS, pH 7,8 100 mM MgCl ₂ 100 mM DTT 5 mM ATP
TBST-Puffer	500 mM NaCl 50 mM TRIS, pH 7,4 0,05 % (v/v) Tween 20
Wachstumspuffer	10 mM KCl 1 mM CaCl ₂ pH 5,5
Waschlösung (Samensterilisierung)	70 % EtOH (v/v) 0,05 % Triton X-100 (v/v)

Name	Inhalt
Waschpuffer (Proteine)	500 mM NaCl 50 mM TRIS, pH 7,5 20 mM Imidazol 5 mM 2-Mercaptoethanol 1 mM MgCl ₂ 10 μM GDP 5 % Glycerol (v/v) 1x cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail
Zellwaschpuffer	150 mM NaCl 125 mM CaCl ₂ 5 mM KCl 1 g*l ⁻¹ D-Glucose eingestellt auf 560 mOsmol*l ⁻¹ mit D-Mannitol und pH 5,7

Tabelle 38: Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG
2-Propanol	VWR International GmbH
ABA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Acetosyringon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Acrylamid-Lösung (40 %)	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ammoniumperoxodisulfat	AppliChem GmbH
Anhydrotetracyclin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
ATP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
CaCl ₂	Merck KGaA
D-Glucose	DUCHEFA BIOCHEMIE B.V
D-Mannitol	DUCHEFA BIOCHEMIE B.V
DL-Dithiothreitol	AppliChem GmbH
EDTA	AMRESCO, Inc.
Ethanol	VWR International GmbH
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co. KG
GDP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glycerol	DUCHEFA BIOCHEMIE B.V
Glycin	DUCHEFA BIOCHEMIE B.V
GTP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Hefeextrakt	DUCHEFA BIOCHEMIE B.V
IAA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Imidazol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
IPTG	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
KCl	Merck KGaA
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA
KNO ₃	Merck KGaA
MES	AppliChem GmbH
Methanol	VWR International GmbH
MgCl ₂	AppliChem GmbH
MgSO ₄	AppliChem GmbH

Name	Hersteller
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG
Na ₂ HPO ₄	AppliChem GmbH
NaCl	DUCHEFA BIOCHEMIE B.V
NaH ₂ PO ₄	AppliChem GmbH
Natriumdodecylsulfat	AppliChem GmbH
Natriumhypochlorit-Lösung	AppliChem GmbH
Polyvinylpyrrolidon K25	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	VWR International GmbH
Triton X-100	AppliChem GmbH
Trypton	DUCHEFA BIOCHEMIE B.V
Tween 20	AppliChem GmbH
β-Estradiol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Tabelle 39: Verwendete Medien

Name	Inhalt (1 l)
LB-Agar (<i>lysogeny broth</i>) nach Miller	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 15 g Agar pH-Wert mit NaOH auf 7,5 eingestellt; auf 1 l mit H ₂ O _{bidest.} aufgefüllt und autoklaviert.
LB-Medium (<i>lysogeny broth</i>) nach Miller	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl pH-Wert mit NaOH auf 7,5 eingestellt; auf 1 l mit H ₂ O _{bidest.} aufgefüllt und autoklaviert.

Verwendete Antibiotika

Tabelle 40: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration	Hersteller
Ampenicilin	50 mg*ml ⁻¹	50 µg*ml ⁻¹	DUCHEFA BIOCHEMIE B.V
Chloramphenicol	30 mg*ml ⁻¹	30 µg*ml ⁻¹	AppliChem GmbH
Gentamycin	20 mg*ml ⁻¹	20 µg*ml ⁻¹	DUCHEFA BIOCHEMIE B.V
Kanamycin	50 mg*ml ⁻¹	50 µg*ml ⁻¹	DUCHEFA BIOCHEMIE B.V
Spectinomycin	50 mg*ml ⁻¹	50 µg*ml ⁻¹	DUCHEFA BIOCHEMIE B.V

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration	Hersteller
Streptomycin	100 mg*ml ⁻¹	100 µg*ml ⁻¹	DUCHEFA BIOCHEMIE B.V

Verwendete Enzyme

Tabelle 41: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Cellulase	DUCHEFA BIOCHEMIE B.V
Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Macerozym	DUCHEFA BIOCHEMIE B.V
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific Inc.

Verwendete Bakterienstämme

Tabelle 42: Verwendete bakterielle Stämme

Stamm	Genotyp
<i>A. tumefaciens</i> GV3101 MP90	n/a
<i>A. tumefaciens</i> P19	n/a
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS</i> λ DE3 = λ <i>sBamHI</i> Δ <i>EcoRI-B int::(lac::PlacUV5::T7 gene1)</i> <i>i21 Δnin5</i>
<i>E. coli</i> DH5α	F- φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (r ⁻ , m ^κ ⁺) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>
<i>E. coli</i> Top10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)</i> 7697 <i>galU galK λ- rpsL(Str^R) endA1 nupG</i>

Verwendete Antikörper

Tabelle 43: Verwendete Antikörper

Name	Hersteller	Wirt	Verdünnung
Anti-GFP	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>	Maus	1 : 10.000
Anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	<i>Thermo Fisher Scientific Inc.</i>	Hase	1 : 10.000
Anti-Mouse IgG (whole molecule)-Gold	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>	Ziege	1: 40
Anti-RFP monoclonal Antibody	<i>Thermo Fisher Scientific Inc.</i>	Maus	1 : 1.250
Penta-His Antibody	<i>QIAGEN GmbH</i>	Maus	1 : 10.000
StrepMAB-Classic, HRP conjugate	<i>IBA GmbH</i>	Maus	1 : 10.000

Verwendete Geräte

Tabelle 44: Verwendete Geräte

Art	Hersteller	Name
Dokumentation	Bio-Rad Laboratories, Inc.	<i>ChemiDoc Imaging System</i>
Heizblock	Eppendorf AG	<i>Thermomixer 5436</i>
Heizblock	Eppendorf AG	<i>ThermoMixer C</i>
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & CO. KG	<i>IKAMAG® RET</i>
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & CO. KG	<i>RCT basic</i>
Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH	<i>LSM 880 AiryScan</i>
PCR-Maschine	Analytik Jena AG	<i>Biometra T3000</i>
PCR-Maschine	Analytik Jena AG	<i>Biometra TAdvanced</i>
PCR-Maschine	Analytik Jena AG	<i>Biometra TProfessional</i>
Photospektrometer	Implen GmbH	<i>Nanophotometer</i>
Schüttler	Bender & Hobein GmbH	<i>Vortex Genie 2™</i>
Schüttler	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH	<i>Kreisschüttler 3015</i>
Zentrifuge	Eppendorf AG	<i>Centrifuge 5424</i>
Zentrifuge	Eppendorf AG	<i>Centrifuge 5424R</i>
Zentrifuge	Eppendorf AG	<i>Centrifuge MiniSpin® plus</i>

Verwendete Vektoren

Tabelle 45: Verwendete Vektoren

Name	Verwendet für	Referenz
pDONR221	Entry-Vektor	<i>Thermo Fisher Scientific Inc.</i>
pJET1.2/blunt	Klonierungs-Vektor	<i>Thermo Fisher Scientific Inc.</i>
pABindFRET CT2	FRET AB-Assay	Bleckmann <i>et al.</i> , 2010 [143]
pABindGFP CT2	FRET AB-Assay	Bleckmann <i>et al.</i> , 2010 [143]
pABindmCherry PLD α 1	FRET AB-Assay	Bleckmann <i>et al.</i> , 2010 [143]
pABindmCherry PLD α 1 Δ DRY	FRET AB-Assay	Bleckmann <i>et al.</i> , 2010 [143]
pABindmCherry PLD α 2	FRET AB-Assay	Bleckmann <i>et al.</i> , 2010 [143]
pABindmCherry PLD α 2 Δ DRY	FRET AB-Assay	Bleckmann <i>et al.</i> , 2010 [143]
pBiFCt-2in1-CC CT2/PLD α 1	rBiFC-Assay	Grefen & Blatt, 2012 [153]
pBiFCt-2in1-CC CT2/PLD α 1 Δ DRY	rBiFC-Assay	Grefen & Blatt, 2012 [153]
pBiFCt-2in1-CC CT2/PLD α 2	rBiFC-Assay	Grefen & Blatt, 2012 [153]
pBiFCt-2in1-CC CT2/PLD α 2 Δ DRY	rBiFC-Assay	Grefen & Blatt, 2012 [153]

Name	Verwendet für	Referenz
pH2GW7 CT2-YFP _{intern}	Lokalisierungsstudien	Karimi <i>et al.</i> , 2002 [300]
pH2GW7 CT2 _{M11V} -YFP _{intern}	Lokalisierungsstudien	Karimi <i>et al.</i> , 2002 [300]
pH2GW7 CT2 _{M11V/C6S} -YFP _{intern}	Lokalisierungsstudien	Karimi <i>et al.</i> , 2002 [300]
pH2GW7 CT2 _{M11V/C6S/C15S} -YFP _{intern}	Lokalisierungsstudien	Karimi <i>et al.</i> , 2002 [300]
pH2GW7 CT2 _{ΔM1} -YFP _{intern}	Lokalisierungsstudien	Karimi <i>et al.</i> , 2002 [300]
pH2GW7 CT2 _{ΔM1/G12A} -YFP _{intern}	Lokalisierungsstudien	Karimi <i>et al.</i> , 2002 [300]
pH2GW7 CT2 _{ΔM1/G12A/C15S} -YFP _{intern}	Lokalisierungsstudien	Karimi <i>et al.</i> , 2002 [300]
pASK-IBA3plus PLD α 1	GTPase-Assay	IBA GmbH
pPROEX CT2	Mikrotubie Mikrotubuli-Bindungs-Assays/GTPase-Assay	Wu <i>et al.</i> , 2018 [18]

Verwendete Programme

Tabelle 46: Verwendete Programme

Name	Version	Copyright
4Peaks	1.8	Alexander Griekspoor & Thomas Groothuis
Adobe Illustrator 2020	24.0.3	Adobe Systems Inc.
Adobe Photoshop 2020	21.0.3	Adobe Systems Inc.
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	Online	National Center for Biotechnology Information
EndNote X9	9.2 (14655)	Clarivate Analytics
Fiji	2.0.0-rc-54/1.51h (26f53fff1b)	https://imagej.net/
Image lab	5.2.1 (11)	Bio-Rad Laboratories Inc.
MaizeGDB	Online	https://www.maizegdb.org
NGPhylogeny.fr	Online	https://ngphylogeny.fr
Numbers	6.2.1 (6529)	Apple Inc.
Pages	8.2.1 (6529)	Apple Inc.
Phytozome v12.1	Online	DOE Joint Genome Institute
Primer3	Online	https://primer3.ut.ee
Prism 8 for MacOS	8.2.1 (279)	GraphPad Software, Inc
PyMOL	2.0.1	Schrödinger, Inc
SIB ExpASy Translate	Online	SIB ExpASy Bioinformatics Resources Portal
UGENE	1.21.0	NCIT UNIPRO, LLC
ZEISS ZEN	3.2	Carl Zeiss Microscopy GmbH

Herstellerverzeichnis

Tabelle 47: Herstellerverzeichnis

Name	Adresse
<i>Acros Organics B.V.B.A.</i>	Teil von: Thermo Fisher Scientific
<i>AMRESKO, Inc.</i>	Teil von: VWR International GmbH
<i>Analytik Jena AG</i>	Konrad-Zuse-Straße 1 07745 Jena Deutschland
<i>ANSELL LTD</i>	Riverside Business Park - Block J Blvrd International 55 1070 Brüssel Belgien
<i>AppliChem GmbH</i>	Ottoweg 4 64291 Darmstadt Deutschland
<i>B. Braun Melsungen AG</i>	Carl-Braun-Straße 1 34212 Melsungen, Hessen Germany
<i>Bayer Crop Science</i>	Bayer AG Crop Science Division Alfred-Nobel-Str. 50 40789 Monheim am Rhein, Germany
<i>Bemis Company, Inc.</i>	2200 Badger Avenue Oshkosh, Wisconsin 54904 USA
<i>Bender & Hobein GmbH</i>	John-Deere-Straße 5 76646 Bruchsal Deutschland
<i>Bio-Rad Laboratories, Inc.</i>	1000 Alfred Nobel Drive Hercules, California 94547 USA
<i>Calbiochem, Merck Chemicals GmbH</i>	Frankfurter Straße 250 64293 Darmstadt Deutschland
<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>	Schoemperlenstr. 1-5, 76185 Karlsruhe Deutschland
<i>Carl Zeiss Microscopy GmbH</i>	Carl-Zeiss-Promenade 10 07745 Jena Deutschland

Name	Adresse
<i>ChromoTek GmbH</i>	Am Klopferspitz 19 82152 Planegg-Martinsried Deutschland
<i>CYTOSKELETON Inc.</i>	1830 S. Acoma St. Denver, Colorado 80223 USA
<i>DUCHEFA BIOCHEMIE B.V</i>	A. Hofmanweg 71 2031 BH Haarlem Niederlande
<i>DWK Life Sciences GmbH</i>	Otto-Schott-Straße 21 97877 Wertheim/Main Deutschland
<i>Eppendorf AG</i>	Barkhausenweg 1 22339 Hamburg Deutschland
<i>Geneaid Biotech Ltd.</i>	#112 Sintai 5th Road Section 1 16th floor Shijr District New Taipei City 22180 Taiwan Taiwan
<i>GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH</i>	Schulze-Delitzsch-Straße 4 30938 Burgwedel Deutschland
<i>Greiner Bio-One GmbH</i>	Maybachstraße 2 72636 Frickenhausen Deutschland
<i>HERA Papierverarbeitung GmbH & Co. KG</i>	Tanusstraße 30 63667 Nidda Deutschland
<i>IBA GmbH</i>	Rudolf-Wissell-Str. 28 37079 Göttingen Deutschland
<i>IKA®-Werke GmbH & CO. KG</i>	Janke & Kunkel-Str. 10 79219 Staufen Deutschland
<i>Implen GmbH</i>	Schatzbogen 52 81829 München Germany

Name	Adresse
<i>MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG</i>	Neumann Neander Str. 6-8 52355 Düren Deutschland
<i>Merck KGaA</i>	Frankfurter Straße 250 64293 Darmstadt Deutschland
<i>QIAGEN GmbH</i>	QIAGEN Strasse 1 40724 Hilden Deutschland
<i>SARSTEDT AG & Co. KG</i>	Sarstedtstraße 1 51588 Nümbrecht Deutschland
<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>	Frankfurter Straße 250 64293 Darmstadt Deutschland
<i>Thermo Fisher Scientific Inc.</i>	168 Third Avenue Waltham, Massachusetts 02451 USA
<i>VWR International GmbH</i>	Hilpertstraße 20a 64295 Darmstadt Deutschland
<i>Wilkinson Sword GmbH</i>	Schützenstraße 110 42659 Solingen Deutschland

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 48: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
9-LOX	9- <u>L</u> IPOXYGENASE
ABA	<i>Ab</i> scisinsäure, engl. <i>ab</i> scisic <i>a</i> cid
Abb.	<u>A</u> bbildung
AGB1	<i>A. thaliana</i> <u>G</u> TP BINDING PROTEIN <u>B</u> ETA1
At	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.
AtRTV1	<u>R</u> ELATED <u>T</u> O <u>V</u> ERNALIZATION1
BAM	<u>B</u> ARELY <u>A</u> NY <u>M</u> ERISTEM
bp	<u>B</u> asenpaare, engl. <i>base pairs</i>
CDS	Kodierende Sequenz, engl. <i>coding sequence</i>
CLE	<u>C</u> LV3/ <u>E</u> MBRYO-SURROUNDING REGION
CLSM	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie, engl. <i>confocal laserscanning microscopy</i>
CLV3	<u>C</u> LAVATA3
cMTs	Kortikale Mikrotubuli, engl. <i>cortical microtubules</i>
CT2	<u>C</u> OMPACT PLANT2
CZ	Zentrale Zone, engl. <i>central zone</i>
DAP	Tage nach Ausbringen, engl. <i>days after planting</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure , engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i> (Migula 1895) Castellani & Chalmers 1919
ER	<u>E</u> ndoplasmatisches <u>R</u> etikulum
FCP1	<u>F</u> ON2-LIKE <u>C</u> LE <u>P</u> ROTEIN1
FEA3	<u>F</u> ASCIATED <u>E</u> AR3
FRET	<i>Förster-Resonanzenergie</i> transfer
GAP	<u>G</u> TPase- <u>a</u> ktivierendes <u>P</u> rotein, engl. <i>GTPase-accelerating protein</i>
GFP	<u>G</u> REEN <u>F</u> LUORESCENT <u>P</u> ROTEIN
GPA1	<u>G</u> UANINE NUCLEOTIDE-BINDING <u>P</u> ROTEIN <u>A</u> SUBUNIT1
GQME	<i>Global Model Quality Estimate</i>
IAA	Indol-3-essigsäure engl. <i>indole-3-acetic acid</i>
IM	<u>I</u> nfloreszenz <u>m</u> eristem, engl. <i>inflorescence meristem</i>
KD	<i>knock-down</i>
LOF	<i>loss-of-function</i>
MAFFT	<i>multiple alignment using fast fourier transform</i>

Abkürzung	Bedeutung
MaizeGDB	<i>Maize Genetics and Genomics Database</i>
MESG	<i>2-amino-6-mercapto-7-methylpurine riboside</i>
Mu	Mutator
MW	Molekulargewicht, engl. <i>molecular weight</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure, engl. <i>nickel-nitrilotriacetic acid</i>
NMT1	<u>N</u> - <u>M</u> YRISTOYL <u>T</u> RANSFERASE1
NMT2	<u>N</u> - <u>M</u> YRISTOYL <u>T</u> RANSFERASE2
ORF	Offenes Leseraster, engl. <i>open reading frame</i>
OZ	Organisierendes Zentrum, engl. <i>organizing center</i>
PA	Phosphatidsäure, engl. <i>phosphatidic acid</i>
PAT	<u>P</u> ROTEIN <u>S</u> - <u>A</u> CYL <u>T</u> RANSFERASEN
PC	Phosphatidylcholin, engl. <i>phosphatidylcholine</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PLD	Phospholipase D, engl. <i>phospholipase D</i>
PM	<u>P</u> lasma <u>m</u> embran
PZ	<u>P</u> eripheriezone, engl. <i>peripheral zone</i>
rBiFC	<i>Ratiometrische Bimolekulare Fluoreszenz Komplementation</i> , engl. <i>ratiometric bimolecular fluorescent complementation</i>
RFP	<u>R</u> ED <u>F</u> LUORESCENT <u>P</u> ROTEIN
RGA1	<u>R</u> ICE HETEROTRIMERIC <u>G</u> PROTEIN <u>A</u> SUBUNIT1
RGS1	<u>R</u> EGULATOR OF <u>G</u> PROTEIN <u>S</u> IGNALING1
ROI	Region des Interesses, engl. <i>region of interest</i>
SAM	<u>S</u> proß <u>a</u> pikal <u>m</u> eristem, engl. <i>shoot apical meristem</i>
SDM	<i>site directed mutagenesis</i>
Tab.	Tabelle
TEM	<u>T</u> ransmissionselektronen <u>m</u> ikroskopie
UTR	<u>U</u> n <u>t</u> ranslatierte <u>R</u> egion, engl. <i>untranslated region</i>
WT	<u>W</u> ild <u>t</u> yp
WUS	<u>W</u> US <u>C</u> HEL
XLG	<u>E</u> XTRA- <u>L</u> ARGE <u>G</u> PROTEIN
YFP	<u>Y</u> ELLOW <u>F</u> LUORESCENT <u>P</u> ROTEIN
Zm	<i>Zea mays</i> (L.)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phänotypische Merkmale von CT2-LOF-Pflanzen im Vergleich mit WT-Pflanzen..	5
Abbildung 2: Modell der WUSCHEL-CLAVATA3-Feedback-Loop in Sprossmeristemen	7
Abbildung 3: Das tierische Modell der durch den Komplex des G Protein vermittelten Signaltransduktion.....	10
Abbildung 4: CT2-YFP wies in verschiedenen Geweben von <i>Z. mays</i> eine jeweils unterschiedliche Lokalisierung auf	17
Abbildung 5: In silico Analyse von CT2	19
Abbildung 6: Die G α -Untereinheiten der Poaceae besitzen im Vergleich zu Familien der Eudicotyledonen einen verlängerten N-Terminus	20
Abbildung 7: Unterschiedliche Startcodons und posttranslationale Modifikationen beeinflussten die Lokalisierung von CT2-YFP	23
Abbildung 8: Zellen der Proliferations- und Expansionszone des interkalaren Meristems zeigten in WT- und CT2-LOF-Pflanzen die gleiche Orientierung von cMTs	26
Abbildung 9: Die Orientierung der cMTs von WT- und CT2-LOF-Pflanzen wies in verschiedenen Blattzonen keinen Unterschied auf	27
Abbildung 10: cMTs epidermaler Blattzellen der Expansionszone von CT2-LOF-Pflanzen zeigten keine Unterschiede zu denen von WT-Pflanzen	29
Abbildung 11: Zellen der Expansionszone von CT2-LOF-Blättern zeigten Evaginationen der PM.....	31
Abbildung 12: CT2-GTP band in vitro nicht an Mikrotubuli	33
Abbildung 13: Phylogramm von AtPLD α 1 und der PLDs aus <i>Z. mays</i>	36
Abbildung 14: In silico-Analysen von ZmPLD α 1 zeigten, dass das DRY-Motiv für die Bindung an G α verantwortlich sein kann	38
Abbildung 15: PLDs und deren substituierte Varianten lokalisierten an der Membran und im Cytosol	40
Abbildung 16: Streudiagramm der gemessenen FRET-Effizienzen verschiedener Protein-kombinationen	43
Abbildung 17: Der ratiometrische Bimolekulare Fluoreszenz Komplementations-Assay.....	46
Abbildung 18: PLD α 1 erhöhte in vitro die GTPase-Aktivität von CT2.....	49
Abbildung 19: WT- und CT2-LOF-Pflanzen wiesen einen jeweils ähnlichen Gehalt verschiedener Phospholipide auf	51
Abbildung 20: Die Bestimmung des Genotyps einer mutmaßlichen Mutator-Insertionsmutante..	53
Abbildung 21: Die Transkriptanalyse der analysierten Pflanzen.....	54
Abbildung 22: Der Einfluss von ABA auf die Länge der Hauptwurzel von WT- und CT2-LOF-Pflanzen.....	58

Abbildung 23: Analyse der Reaktion von WT- und CT2-LOF-Koleoptilensegmenten auf die Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von IAA	61
Abbildung 24: Der Einfluss des ct2-Ref.-Allels auf die Blätter von Pflanzen in verschiedenen genetischen Hintergründen	64
Abbildung 25: Die relative Verringerung von Blattlängen von CT2-LOF-Pflanzen im Vergleich zu denen des Wildtyps in verschiedenen genetischen Hintergründen.....	65
Abbildung 26: Der Einfluss des ct2-Ref.-Allels auf die verschiedene vegetative Merkmale von Pflanzen in verschiedenen genetischen Hintergründen	67
Abbildung 27: Das Verhältnis der Höhe von CT2-LOF- zu WT-Pflanzen in verschiedenen genetischen Hintergründen.....	68
Abbildung 28: Der Einfluss des ct2-Ref.-Allels auf das Wachstum der Internodien von Pflanzen in verschiedenen genetischen Hintergründen	69
Abbildung 29: Der Einfluss des ct2-Ref.-Allels auf die männliche Infloreszenz von Pflanzen in verschiedenen genetischen Hintergründen.....	72
Abbildung 30: Der Einfluss des ct2-Ref.-Allels auf die weibliche Infloreszenz von Pflanzen im Mo17-Hintergrund	74
Abbildung 31: Schema der Bestimmung des Blattwinkels α	100
Abbildung 32: Schema der Vermessung der einzelnen Internodien von Maispflanzen	101
Abbildung 33: Die in silico-Analyse von CT2 zeigt die Anwesenheit verschiedener Startcodons sowie posttranslationaler Modifikations-Sites	A
Abbildung 34: Längsaufnahmen der cMTS von WT- und CT2-LOF-Zellen mittels TEM zeigen keinen Unterschied	B
Abbildung 35: His6-CT2 lässt sich mithilfe von E. coli BL21 (DE3) heterolog produzieren und anschließend isolieren.....	B
Abbildung 36: CT2-GDP bindet in vitro nicht an Mikrotubuli	C
Abbildung 37: Die meisten der untersuchten PLDs von Z. mays enthalten das DRY Motiv	C
Abbildung 38: Abundanz der mRNA von ZmPLDAs in verschiedenen Geweben	D
Abbildung 39: PLD α 1-Strep lässt sich mithilfe von E. coli BL21 (DE3) heterolog produzieren und anschließend aus dem Überstand isolieren	E
Abbildung 40: Änderung der Wachstumsrate von WT- und CT2-LOF-Koleoptilensegmenten nach IAA-Applikation.....	F
Abbildung 41: Die Blätter von CT2-LOF-Pflanzen im Mo17-Hintergrund zeigten weniger Läsionen.....	G
Abbildung 42: Der Kolben von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73-Hintergrund.....	H

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Funktionen, welche die Menge des freien Phosphats Pi in Abhängigkeit der Zeit beschreiben	49
Tabelle 2: Formeln, welche die Wachstumsrate der Koleoptilensegmente in Abhängigkeit der Zeit beschreiben.....	60
Tabelle 3: Inhalt eines PCR-Ansatzes für das molekulare Klonieren	105
Tabelle 4: Inhalt eines PCR-Mastermix für die Bestimmung des Allels eines Gens	105
Tabelle 5: Ergebnisse der statistischen Analyse Querschnittsfläche der kortikalen Mikrotubuli ...I	
Tabelle 6: Ergebnisse der statistischen Analyse der FRET-Effizienz zwischen CT2-GFP und PLD α 1- bzw. PLD α 2-mCherry in Abhängigkeit des DRY Motivs	I
Tabelle 7: Ergebnisse der statistischen Analyse des ratiometrischen Bimolekularen Fluoreszenz Komplementations-Assays	I
Tabelle 8: Ergebnisse der statistischen Analyse des Vergleichs des PE-Gehalts von WT- und CT2-LOF-Pflanzen.....	I
Tabelle 9 : Ergebnisse der statistischen Analyse des Vergleichs des PA-Gehalts von WT- und CT2-LOF-Pflanzen.....	J
Tabelle 10: Ergebnisse der statistischen Analyse des Einfluss von ABA auf die Länge der Hauptwurzel von WT-Pflanzen	J
Tabelle 11: Ergebnisse der statistischen Analyse des Einfluss von ABA auf die Länge der Hauptwurzel von CT2-LOF-Pflanzen.....	J
Tabelle 12: Ergebnisse der statistischen Analyse der Länge der Hauptwurzel von WT- und CT2-LOF-Pflanzen	K
Tabelle 13: Ergebnisse der statistischen Analyse des Einfluss von ABA auf die Länge der Hauptwurzel von WT- und CT2-LOF-Pflanzen	K
Tabelle 14: Ergebnisse der statistischen Analyse der Länge des ersten Blattes von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund.....	L
Tabelle 15: Ergebnisse der statistischen Analyse der Breite des ersten Blattes von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund.....	L
Tabelle 16: Ergebnisse der statistischen Analyse der Ratio des ersten Blattes von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund.....	L
Tabelle 17: Ergebnisse der statistischen Analyse der Länge des zweiten Blattes von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund.....	M
Tabelle 18: Ergebnisse der statistischen Analyse der Breite des zweiten Blattes von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund.....	M
Tabelle 19: Ergebnisse der statistischen Analyse der Ratio des zweiten Blattes von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund.....	M
Tabelle 20: Ergebnisse der statistischen Analyse der Länge des dritten Blattes von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund.....	M

Tabelle 21: Ergebnisse der statistischen Analyse der Breite des dritten Blattes von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund	N
Tabelle 22: Ergebnisse der statistischen Analyse der Ratio des dritten Blattes von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund	N
Tabelle 23: Ergebnisse der statistischen Analyse der Höhe von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund.....	N
Tabelle 24: Ergebnisse der statistischen Analyse des Blattwinkels von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund	N
Tabelle 25: Ergebnisse der statistischen Analyse der Länge der Internodien von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73-Hintergrund	O
Tabelle 26: Ergebnisse der statistischen Analyse der Länge der Internodien von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im Mo17-Hintergrund.....	O
Tabelle 27: Ergebnisse der statistischen Analyse der Anzahl der Internodien von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund	P
Tabelle 28: Ergebnisse der statistischen Analyse des Verhältnisses der Internodien von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund	P
Tabelle 29: Ergebnisse der statistischen Analyse der Länge der männlichen Infloreszenz von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund	Q
Tabelle 30: Ergebnisse der statistischen Analyse der Anzahl der Rispenäste der männlichen Infloreszenz von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund	Q
Tabelle 31: Ergebnisse der statistischen Analyse der Länge des zentralen Blütenstandes der männlichen Infloreszenz von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund.....	Q
Tabelle 32: Ergebnisse der statistischen Analyse der Anzahl der Ährchen von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund.....	Q
Tabelle 33: Ergebnisse der statistischen Analyse der Anzahl der Körnerreihen von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund	Q
Tabelle 34: Ergebnisse der statistischen Analyse der Anzahl der Körner pro Reihe von WT- und CT2-LOF-Pflanzen im B73- und Mo17-Hintergrund	R
Tabelle 35: Verwendete Primer	S
Tabelle 36: Verwendete Kits und Verbrauchsgüter	T
Tabelle 37: Verwendete Lösungen und Puffer	U
Tabelle 38: Verwendete Chemikalien.....	Y
Tabelle 39: Verwendete Medien	Z
Tabelle 40: Verwendete Antibiotika	Z
Tabelle 41: Verwendete Enzyme.....	AA
Tabelle 42: Verwendete bakterielle Stämme	AA
Tabelle 43: Verwendete Antikörper	AA

Tabelle 44: Verwendete Geräte	BB
Tabelle 45: Verwendete Vektoren	BB
Tabelle 46: Verwendete Programme	DD
Tabelle 47: Herstellerverzeichnis	EE
Tabelle 48: Abkürzungsverzeichnis	HH

Posterpräsentationen

60th Annual Maize Genetics Conference 22-25 March 2018 Saint-Malo, France

59th Annual Maize Genetics Conference 9-12 March 2017 St. Louis, Missouri, USA

1st European Maize Meeting 18-20 May 2016, Hamburg, Germany

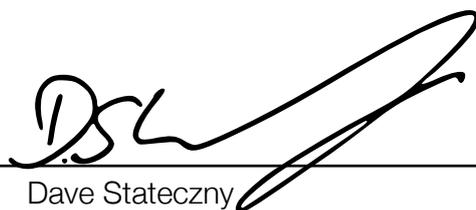
58th Annual Maize Genetics Conference 17-20 March 2016 Jacksonville, Florida, USA

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie nicht veröffentlicht worden ist, sowie dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Dr. P. Bommert betreut worden.

Rheda-Wiedenbrück, 4. Februar 2021

Ort, Datum



Dave Stateczny

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie der Universität Hamburg unter Anleitung von Dr. rer. nat. Peter Bommert durchgeführt. Ihm möchte ich besonders für die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft danken. Das Gelernte wird mich mein ganzes Leben lang begleiten.

Mein Dank geht auch an Prof. Dr. rer. nat. Arp Schnittger für die Möglichkeit der Promotion in dieser Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Elke Woelken für die Hilfe bei der Ultrastrukturanalyse und die vielen fruchtbaren Diskussionen. Mein Dank für solche Diskussionen und die Unterstützung bei Experimenten geht auch an Dr. rer. nat. Hartwig Lüthen.

Dagmar Stang, Maren Röper, Marion Klötzl und Maren Winnacker danke ich herzlich für ihre uneigennützig Unterstützung bei vielfältigen größeren und kleineren Arbeiten.

Herzlich gedankt sei auch Dr. rer. nat. Jantjeline Kluth, ihr Beistand und Wissen halfen oft in Momenten größter Verzweiflung und machten so diese Arbeit erst möglich. Danke für alles!

Ein herzlicher Dank geht auch an meine Eltern Karina & Miro sowie meine Schwester Jasmin, danke für eure Unterstützung!

Ich danke auch Frau Jara Oppenheimer herzlich, mit niemandem sonst hätte ich in der Zeit dieser Arbeit lieber zusammenarbeiten wollen. Danke für diese Zeit, deine Hilfe und deine Ideen!

Frau Helene Jahn danke ich herzlichst für die Korrektur dieser Arbeit. Danke für deine fachliche Unterstützung, sie hat dieser Arbeit zu ihrer endgültigen Form verholfen. Danke für dein weitreichendes persönliches Engagement! Ich hoffe, dass ich mich einst revanchieren kann.

Bibliografie

Nach *EndNote*, nicht korrigiert.

1. Bommert, P., et al., The maize Galpha gene COMPACT PLANT2 functions in CLAVATA signalling to control shoot meristem size. *Nature*, 2013. **502**(7472): p. 555-8.
2. Matsuoka, Y., et al., A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. **99**(9): p. 6080-6084.
3. Troyer, A.F., Adaptedness and Heterosis in Corn and Mule Hybrids. *Crop Science*, 2006. **46**(2): p. 528-543.
4. Hake, S. and J. Ross-Ibarra, Genetic, evolutionary and plant breeding insights from the domestication of maize. *eLife*, 2015. **4**: p. e05861.
5. Schnable, P.S., et al., The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science*, 2009. **326**(5956): p. 1112-5.
6. Food and N. Agriculture Organization of the United, *FAOSTAT statistical database*. 1997, [Rome] : FAO, c1997-.
7. Doebley, J.F., B.S. Gaut, and B.D. Smith, *The Molecular Genetics of Crop Domestication*. *Cell*, 2006. **127**(7): p. 1309-1321.
8. Gyenes-Hegyí, Z., I. Pók, and L. Kizmus, Plant height and height of the main ear in maize (*Zea mays* L.) at different locations and different plant densities. *Acta Agronomica Hungarica*, 2002. **50**: p. 75-84.
9. Evenson, R.E. and D. Gollin, Assessing the Impact of the Green Revolution, 1960 to 2000. *Science*, 2003. **300**(5620): p. 758-762.
10. Urano, D., D. Jackson, and A.M. Jones, A G protein alpha null mutation confers prolificacy potential in maize. *Journal of experimental botany*, 2015. **66**(15): p. 4511-4515.
11. Je, B.I., et al., Signaling from maize organ primordia via FASCIATED EAR3 regulates stem cell proliferation and yield traits. *Nature genetics*, 2016. **48**(7): p. 785.
12. Incognito, S.J.P., G.Á. Maddonni, and C.G. López, Genetic control of maize plant architecture traits under contrasting plant densities. *Euphytica*, 2020. **216**(2): p. 20.
13. Hall, A.E., Breeding for Heat Tolerance, in *Plant Breeding Reviews*. 1992. p. 129-168.
14. VijayaVenkataRaman, S., S. Iniyán, and R. Goic, A review of climate change, mitigation and adaptation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2012. **16**(1): p. 878-897.
15. Lamaoui, M., et al., Heat and Drought Stresses in Crops and Approaches for Their Mitigation. *Frontiers in Chemistry*, 2018. **6**(26).
16. Dadshani, S., et al., Multi-dimensional evaluation of response to salt stress in wheat. *PLOS ONE*, 2019. **14**(9): p. e0222659.
17. Nations, U., *World Population Prospects 2019: Highlights*. 2019.
18. Wu, Q., et al., Role of heterotrimeric Ga proteins in maize development and enhancement of agronomic traits. *PLOS Genetics*, 2018. **14**(4): p. e1007374.
19. NELSON, O.E. and A.J. OHLROGGE, Differential Responses to Population Pressures by Normal and Dwarf Lines of Maize. *Science*, 1957. **125**(3259): p. 1200-1200.
20. Veit, B., et al., Maize Floral Development: New Genes and Old Mutants. *The Plant cell*, 1993. **5**(10): p. 1205-1215.

21. Je, B.I., et al., The CLAVATA receptor FASCIATED EAR2 responds to distinct CLE peptides by signaling through two downstream effectors. *eLife*, 2018. **7**: p. e35673.
22. Wu, Q., F. Xu, and D. Jackson, All together now, a magical mystery tour of the maize shoot meristem. *Current Opinion in Plant Biology*, 2018. **45**: p. 26-35.
23. Fontanet, P. and C.M. Vicent, *Maize embryogenesis*. *Methods Mol Biol*, 2008. **427**: p. 17-29.
24. Darwin, C. and F. Darwin, *The power of movement in plants*. 2009: p. 1-592.
25. Pautler, M., et al., Grass Meristems I: Shoot Apical Meristem Maintenance, Axillary Meristem Determinacy and the Floral Transition. *Plant and Cell Physiology*, 2013. **54**(3): p. 302-312.
26. Fletcher, J.C., The CLV-WUS Stem Cell Signaling Pathway: A Roadmap to Crop Yield Optimization. *Plants (Basel, Switzerland)*, 2018. **7**(4): p. 87.
27. Huijser, P. and M. Schmid, The control of developmental phase transitions in plants. *Development*, 2011. **138**(19): p. 4117-4129.
28. Somssich, M., et al., CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem. *Development*, 2016. **143**(18): p. 3238-3248.
29. Laux, T., et al., The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*, 1996. **122**(1): p. 87-96.
30. Ma, H., M.F. Yanofsky, and E.M. Meyerowitz, Molecular cloning and characterization of GPA1, a G protein alpha subunit gene from *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990. **87**(10): p. 3821-3825.
31. Berardini, T.Z., et al., The arabidopsis information resource: Making and mining the “gold standard” annotated reference plant genome. *genesis*, 2015. **53**(8): p. 474-485.
32. Stelpflug, S.C., et al., An Expanded Maize Gene Expression Atlas based on RNA Sequencing and its Use to Explore Root Development. *The Plant Genome*, 2016. **9**(1).
33. Urano, D., A. Colaneri, and A.M. Jones, Ga modulates salt-induced cellular senescence and cell division in rice and maize. *Journal of Experimental Botany*, 2014. **65**(22): p. 6553-6561.
34. Yu, J.-Z., et al., Cytosolic Gas Acts as an Intracellular Messenger to Increase Microtubule Dynamics and Promote Neurite Outgrowth. *Journal of Biological Chemistry*, 2009. **284**(16): p. 10462-10472.
35. Sieberer, B.J., et al., Cell proliferation, cell shape, and microtubule and cellulose microfibril organization of tobacco BY-2 cells are not altered by exposure to near weightlessness in space. *Planta*, 2009. **230**(6): p. 1129-1140.
36. Mohanty, A., et al., Advancing cell biology and functional genomics in maize using fluorescent protein-tagged lines. *Plant physiology*, 2009. **149**(2): p. 601-605.
37. Lefkowitz, R.J., Alfred Goodman Gilman (1941–2015). *Nature*, 2016. **529**(7586): p. 284-284.
38. NobelPrize.org, The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1994. Nobel Media AB 2020, 1994.
39. Trusov, Y. and J.R. Botella, Plant G-Proteins Come of Age: Breaking the Bond with Animal Models. *Frontiers in chemistry*, 2016. **4**: p. 24-24.
40. McCudden, C.R., et al., *G-protein signaling: back to the future*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005. **62**(5): p. 551-577.

41. Matúš, D. and S. Prömel, G Proteins and GPCRs in *C. elegans* Development: A Story of Mutual Infidelity. *Journal of Developmental Biology*, 2018. **6**(4): p. 28.
42. Dohlman, H.G., *G Proteins and Pheromone Signaling*. *Annual Review of Physiology*, 2002. **64**(1): p. 129-152.
43. Buck, L.B., The Molecular Architecture of Odor and Pheromone Sensing in Mammals. *Cell*, 2000. **100**(6): p. 611-618.
44. Margolskee, R.F., Molecular Mechanisms of Bitter and Sweet Taste Transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(1): p. 1-4.
45. Shichida, Y. and T. Matsuyama, *Evolution of opsins and phototransduction*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 2009. **364**(1531): p. 2881-2895.
46. Stateczny, D., J. Oppenheimer, and P. Bommert, G protein signaling in plants: minus times minus equals plus. *Curr Opin Plant Biol*, 2016. **34**: p. 127-135.
47. Shalaeva, D.N., M.Y. Galperin, and A.Y. Mulikidjanian, Eukaryotic G protein-coupled receptors as descendants of prokaryotic sodium-translocating rhodopsins. *Biology direct*, 2015. **10**: p. 63-63.
48. Hamm, H.E., *The Many Faces of G Protein Signaling*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(2): p. 669-672.
49. Trzaskowski, B., et al., Action of molecular switches in GPCRs--theoretical and experimental studies. *Current medicinal chemistry*, 2012. **19**(8): p. 1090-1109.
50. Alewijnse, A.E., et al., The Effect of Mutations in the DRY Motif on the Constitutive Activity and Structural Instability of the Histamine H2Receptor. *Molecular pharmacology*, 2000. **57**(5): p. 890-898.
51. Scheer, A., et al., Mutational Analysis of the Highly Conserved Arginine within the Glu/Asp-Arg-Tyr Motif of the α_{1b} -Adrenergic Receptor: Effects on Receptor Isomerization and Activation. *Molecular Pharmacology*, 2000. **57**(2): p. 219-231.
52. Hanlon, C.D. and D.J. Andrew, Outside-in signaling – a brief review of GPCR signaling with a focus on the *Drosophila* GPCR family. *Journal of Cell Science*, 2015. **128**(19): p. 3533-3542.
53. Bos, J.L., H. Rehmann, and A. Wittinghofer, GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell*, 2007. **129**(5): p. 865-877.
54. Urano, D. and A.M. Jones, "Round up the usual suspects": a comment on nonexistent plant G protein-coupled receptors. *Plant physiology*, 2013. **161**(3): p. 1097-1102.
55. Taddese, B., et al., Do plants contain g protein-coupled receptors? *Plant physiology*, 2014. **164**(1): p. 287-307.
56. Johnston, C.A., et al., GTPase acceleration as the rate-limiting step in Arabidopsis G protein-coupled sugar signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. **104**(44): p. 17317-17322.
57. Urano, D. and A.M. Jones, Heterotrimeric G protein-coupled signaling in plants. *Annual review of plant biology*, 2014. **65**: p. 365-384.
58. Chen, J.G., et al., A seven-transmembrane RGS protein that modulates plant cell proliferation. *Science*, 2003. **301**(5640): p. 1728-31.

59. Liang, X., et al., Ligand-triggered de-repression of Arabidopsis heterotrimeric G proteins coupled to immune receptor kinases. *Cell research*, 2018. **28**(5): p. 529-543.
60. Hackenberg, D., et al., Gα and regulator of G-protein signaling (RGS) protein pairs maintain functional compatibility and conserved interaction interfaces throughout evolution despite frequent loss of RGS proteins in plants. *New Phytologist*, 2016. **216**.
61. Jiao, Y., et al., Improved maize reference genome with single-molecule technologies. *Nature*, 2017. **546**(7659): p. 524-527.
62. Zhao, J. and X. Wang, Arabidopsis Phospholipase Dα1 Interacts with the Heterotrimeric G-protein α-Subunit through a Motif Analogous to the DRY Motif in G-protein-coupled Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(3): p. 1794-1800.
63. Jenkins, G.M. and M.A. Frohman, *Phospholipase D: a lipid centric review*. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2005. **62**(19): p. 2305-2316.
64. Wang, X., et al., Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog Lipid Res*, 2006. **45**(3): p. 250-78.
65. Wang, X., Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant physiology*, 2005. **139**(2): p. 566-573.
66. Bargmann, B.O. and T. Munnik, The role of phospholipase D in plant stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, 2006. **9**(5): p. 515-22.
67. Zhao, J., Phospholipase D and phosphatidic acid in plant defence response: from protein-protein and lipid-protein interactions to hormone signalling. *Journal of experimental botany*, 2015. **66**(7): p. 1721-1736.
68. Takáč, T., D. Novák, and J. Šamaj, Recent Advances in the Cellular and Developmental Biology of Phospholipases in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 2019. **10**(362).
69. Zhang, Q., et al., Phosphatidic Acid Regulates Microtubule Organization by Interacting with MAP65-1 in Response to Salt Stress in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2012. **24**(11): p. 4555-4576.
70. Favre, N., et al., The DRY Motif as a Molecular Switch of the Human Oxytocin Receptor. *Biochemistry*, 2005. **44**(30): p. 9990-10008.
71. Gookin, T.E. and S.M. Assmann, Significant reduction of BiFC non-specific assembly facilitates in planta assessment of heterotrimeric G-protein interactors. *Plant J*, 2014. **80**(3): p. 553-67.
72. Chen, L., et al., Phospholipase D family and its expression in response to abiotic stress in maize. *Plant Growth Regulation*, 2017. **81**(2): p. 197-207.
73. Hedden, P., The genes of the Green Revolution. *Trends in Genetics*, 2003. **19**(1): p. 5-9.
74. Salamini, F., Hormones and the Green Revolution. *Science*, 2003. **302**(5642): p. 71-72.
75. Overbeek, J.V., AUXIN PRODUCTION IN SEEDLINGS OF DWARF MAIZE. *Plant physiology*, 1938. **13**(3): p. 587-598.
76. Multani, D.S., et al., Loss of an MDR Transporter in Compact Stalks of Maize *br2* and Sorghum *dw3* Mutants. *Science*, 2003. **302**(5642): p. 81-84.
77. Zhang, X., et al., Maize *brachytic2 (br2)* suppresses the elongation of lower internodes for excessive auxin accumulation in the intercalary meristem region. *BMC Plant Biology*, 2019. **19**(1): p. 589.

78. Wang, L. and K. Chong, *Auxin, Brassinosteroids, and G-Protein Signaling*, in *Integrated G Proteins Signaling in Plants*, S. Yalovsky, F. Baluška, and A. Jones, Editors. 2010, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 135-154.
79. Ullah, H., et al., The beta-subunit of the Arabidopsis G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes. *The Plant cell*, 2003. **15**(2): p. 393-409.
80. Subramaniam, G., et al., Type B Heterotrimeric G Protein γ -Subunit Regulates Auxin and ABA Signaling in Tomato. *Plant physiology*, 2016. **170**(2): p. 1117-1134.
81. Dong, Z., et al., The regulatory landscape of a core maize domestication module controlling bud dormancy and growth repression. *Nature Communications*, 2019. **10**(1): p. 3810.
82. Pandey, S., et al., G-Protein Complex Mutants Are Hypersensitive to Abscisic Acid Regulation of Germination and Postgermination Development. *Plant Physiology*, 2006. **141**(1): p. 243-256.
83. Pandey, S. and S.M. Assmann, The Arabidopsis putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein α subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 2004. **16**(6): p. 1616-1632.
84. Yu, J., et al., Genetic Design and Statistical Power of Nested Association Mapping in Maize. *Genetics*, 2008. **178**(1): p. 539-551.
85. Gage, J.L., et al., Ten Years of the Maize Nested Association Mapping Population: Impact, Limitations, and Future Directions. *The Plant Cell*, 2020. **32**(7): p. 2083-2093.
86. Tran, Q.H., et al., Mapping-by-Sequencing via MutMap Identifies a Mutation in ZmCLE7 Underlying Fasciation in a Newly Developed EMS Mutant Population in an Elite Tropical Maize Inbred. *Genes*, 2020. **11**(3): p. 281.
87. Khangura, R.S., et al., A Very Oil Yellow1 Modifier of the Oil Yellow1-N1989 Allele Uncovers a Cryptic Phenotypic Impact of Cis-regulatory Variation in Maize. *G3 (Bethesda, Md.)*, 2019. **9**(2): p. 375-390.
88. Thompson, A.M., et al., Genetic Control of Maize Shoot Apical Meristem Architecture. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 2014. **4**(7): p. 1327-1337.
89. Adjobo-Hermans, M.J.W., J. Goedhart, and T.W.J. Gadella, Plant G protein heterotrimers require dual lipidation motifs of $G\alpha$ and $G\gamma$ and do not dissociate upon activation. *Journal of Cell Science*, 2006. **119**(24): p. 5087-5097.
90. Friso, G. and K.J. van Wijk, Posttranslational Protein Modifications in Plant Metabolism. *Plant Physiology*, 2015. **169**(3): p. 1469-1487.
91. Altschul, S.F., et al., Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 1990. **215**(3): p. 403-10.
92. Jones, J.C., et al., The crystal structure of a self-activating G protein alpha subunit reveals its distinct mechanism of signal initiation. *Science signaling*, 2011. **4**(159): p. ra8-ra8.
93. Bigelow, H.R., et al., Predicting transmembrane beta-barrels in proteomes. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(8): p. 2566-77.
94. Rost, B., G. Yachdav, and J. Liu, *The PredictProtein server*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(Web Server issue): p. W321-6.
95. Urano, D., et al., Heterotrimeric G protein signalling in the plant kingdom. *Open Biol*, 2013. **3**(3): p. 120186.

96. Jones, A.M. and S.M. Assmann, Plants: the latest model system for G-protein research. *EMBO reports*, 2004. **5**(6): p. 572-578.
97. Marchler-Bauer, A. and S.H. Bryant, CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(Web Server issue): p. W327-31.
98. de Castro, E., et al., ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(Web Server issue): p. W362-5.
99. Marchler-Bauer, A., et al., CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(Database issue): p. D225-9.
100. Marchler-Bauer, A., et al., CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(Database issue): p. D222-6.
101. Marchler-Bauer, A., et al., CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res*, 2017. **45**(D1): p. D200-d203.
102. Temple, B.R. and A.M. Jones, The plant heterotrimeric G-protein complex. *Annu Rev Plant Biol*, 2007. **58**: p. 249-66.
103. Pandey, A., M. Sharma, and G.K. Pandey, Small and Large G Proteins in Biotic and Abiotic Stress Responses in Plants, in *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants: Functional Genomics Perspectives, Volume 1*, G.K. Pandey, Editor. 2015, Springer New York: New York, NY. p. 231-270.
104. Kosugi, S., et al., Design of peptide inhibitors for the importin alpha/beta nuclear import pathway by activity-based profiling. *Chem Biol*, 2008. **15**(9): p. 940-9.
105. Kosugi, S., et al., Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J Biol Chem*, 2009. **284**(1): p. 478-85.
106. Kosugi, S., et al., Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(25): p. 10171-6.
107. Resh, M.D., Regulation of cellular signalling by fatty acid acylation and prenylation of signal transduction proteins. *Cellular signalling*, 1996. **8**(6): p. 403-412.
108. Farazi, T.A., G. Waksman, and J.I. Gordon, The Biology and Enzymology of ProteinN-Myristoylation. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(43): p. 39501-39504.
109. Smertenko, A., et al., Phragmoplast microtubule dynamics – a game of zones. *Journal of Cell Science*, 2018. **131**(2): p. jcs203331.
110. Oda, Y., Cortical microtubule rearrangements and cell wall patterning. *Frontiers in plant science*, 2015. **6**: p. 236-236.
111. Nemoto, K., et al., Dynamics of cortical microtubules in developing maize internodes. *New Phytologist*, 2004. **162**(1): p. 95-103.
112. Avramova, V., K. Sprangers, and G.T.S. Beemster, The Maize Leaf: Another Perspective on Growth Regulation. *Trends in Plant Science*, 2015. **20**(12): p. 787-797.
113. Urano, D., et al., Plant Morphology of Heterotrimeric G Protein Mutants. *Plant and Cell Physiology*, 2016. **57**(3): p. 437-445.

114. Cleary, A.L. and L. Smith, The Tangled1 Gene Is Required for Spatial Control of Cytoskeletal Arrays Associated with Cell Division during Maize Leaf Development. *The Plant cell*, 1998. **10**: p. 1875-88.
115. Hashimoto, T., *Microtubules in plants*. The arabidopsis book, 2015. **13**: p. e0179-e0179.
116. Wang, Y.-N., et al., Microscopic Characterization of FO/PRO Membranes – A Comparative Study of CLSM, TEM and SEM. *Environmental Science & Technology*, 2012. **46**(18): p. 9995-10003.
117. Zhukovsky, M.A., et al., Phosphatidic acid in membrane rearrangements. *FEBS Letters*, 2019. **593**(17): p. 2428-2451.
118. Bjellqvist, B., et al., The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis*, 1993. **14**(10): p. 1023-31.
119. Bjellqvist, B., et al., Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis*, 1994. **15**(3-4): p. 529-39.
120. Walker, J.M., *The proteomics protocols handbook*. 2005: Springer.
121. Roy Choudhury, S. and S. Pandey, Phosphatidic acid binding inhibits RGS1 activity to affect specific signaling pathways in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 2017. **90**(3): p. 466-477.
122. Li, M., Y. Hong, and X. Wang, Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1791**(9): p. 927-35.
123. Testerink, C. and T. Munnik, Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends in Plant Science*, 2005. **10**(8): p. 368-375.
124. Yao, H.-Y. and H.-W. Xue, Phosphatidic acid plays key roles regulating plant development and stress responses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018. **60**(9): p. 851-863.
125. Yao, H., et al., Phosphatidic Acid Interacts with a MYB Transcription Factor and Regulates Its Nuclear Localization and Function in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2013. **25**(12): p. 5030-5042.
126. Mishra, G., et al., A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in Arabidopsis. *Science*, 2006. **312**(5771): p. 264-6.
127. Gao, H.B., Y.J. Chu, and H.W. Xue, Phosphatidic acid (PA) binds PP2AA1 to regulate PP2A activity and PIN1 polar localization. *Mol Plant*, 2013. **6**(5): p. 1692-702.
128. Yachdav, G., et al., MSAViewer: interactive JavaScript visualization of multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, 2016. **32**(22): p. 3501-3503.
129. Running, M.P., *G Protein-coupled Receptor Signaling in Plants*. 2013: Springer.
130. Lemoine, F., et al., NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists. *Nucleic Acids Research*, 2019. **47**(W1): p. W260-W265.
131. Kelley, L.A., et al., The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 2015. **10**(6): p. 845-858.
132. Jones, P., et al., InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 2014. **30**(9): p. 1236-40.
133. Servant, F., et al., ProDom: automated clustering of homologous domains. *Brief Bioinform*, 2002. **3**(3): p. 246-51.

134. McDermott, M., M.J.O. Wakelam, and A.J. Morris, *Phospholipase D*. *Biochemistry and Cell Biology*, 2004. **82**(1): p. 225-253.
135. Zhao, J. and X. Wang, Biochemical Analysis of the Interaction Between Phospholipase D α 1 and GTP-Binding Protein α -Subunit from *Arabidopsis thaliana*, in *G Protein-Coupled Receptor Signaling in Plants: Methods and Protocols*, M.P. Running, Editor. 2013, Humana Press: Totowa, NJ. p. 21-35.
136. Guex, N., M.C. Peitsch, and T. Schwede, Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *ELECTROPHORESIS*, 2009. **30**(S1): p. S162-S173.
137. Bienert, S., et al., The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. *Nucleic Acids Research*, 2016. **45**(D1): p. D313-D319.
138. Bertoni, M., et al., Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 10480.
139. Waterhouse, A., et al., SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 2018. **46**(W1): p. W296-W303.
140. Studer, G., et al., QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*, 2019. **36**(6): p. 1765-1771.
141. Li, J., et al., Crystal structure of plant PLD α 1 reveals catalytic and regulatory mechanisms of eukaryotic phospholipase D. *Cell Research*, 2020. **30**(1): p. 61-69.
142. Köhling, V., Transient interaction analysis of the *Zea mays* L. CT2 and PLD α 1 proteins in *Nicotiana benthamiana* L. Universität Hamburg, 2018.
143. Bleckmann, A., et al., Stem Cell Signaling in *Arabidopsis* Requires CRN to Localize CLV2 to the Plasma Membrane. *Plant Physiology*, 2010. **152**(1): p. 166-176.
144. Novák, D., et al., Gene Expression Pattern and Protein Localization of *Arabidopsis* Phospholipase D Alpha 1 Revealed by Advanced Light-Sheet and Super-Resolution Microscopy. *Frontiers in plant science*, 2018. **9**: p. 371-371.
145. Cui, Y., et al., Techniques for detecting protein-protein interactions in living cells: principles, limitations, and recent progress. *Science China Life Sciences*, 2019. **62**(5): p. 619-632.
146. Truong, K. and M. Ikura, The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo. *Curr Opin Struct Biol*, 2001. **11**(5): p. 573-8.
147. Förster, T., Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 1948. **437**(1-2): p. 55-75.
148. Stryer, L., Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem*, 1978. **47**: p. 819-46.
149. Müller, S.M., et al., Quantification of Förster resonance energy transfer by monitoring sensitized emission in living plant cells. *Frontiers in plant science*, 2013. **4**: p. 413-413.
150. Lambert, T.J., FPbase: a community-editable fluorescent protein database. *Nature Methods*, 2019. **16**(4): p. 277-278.
151. Bodnár A., V.G., Tóth K., Jenei A., Mátyus L., Damjanovich S., Non-Random Patterns of Membrane Proteins and Their Roles in Transmembrane Signaling. *Springer Series in Biophysics*, vol 8., 2005. **Biophysical Aspects of Transmembrane Signaling.**: p. 71-95.

152. Walz, S., Analysis of the interaction between Zea mays Ga subunit and Phospholipase Da, in Universität Hamburg. 2020.
153. Grefen, C. and M.R. Blatt, A 2in1 cloning system enables ratiometric bimolecular fluorescence complementation (rBiFC). *BioTechniques*, 2012. **53**(5): p. 311-314.
154. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 4th ed. 2002, New York: Garland Science. xxxiv, 1548 p.
155. Hong, Y., S. Zheng, and X. Wang, Dual functions of phospholipase Dalpha1 in plant response to drought. *Mol Plant*, 2008. **1**(2): p. 262-9.
156. Wang, P., et al., Phosphatidic Acid Directly Regulates PINOID-Dependent Phosphorylation and Activation of the PIN-FORMED2 Auxin Efflux Transporter in Response to Salt Stress. *The Plant Cell*, 2019. **31**(1): p. 250-271.
157. McCarty, D.R., et al., Steady-state transposon mutagenesis in inbred maize. *The Plant Journal*, 2005. **44**(1): p. 52-61.
158. Portwood, J.L., II, et al., MaizeGDB 2018: the maize multi-genome genetics and genomics database. *Nucleic Acids Research*, 2018. **47**(D1): p. D1146-D1154.
159. Kawakami, K., D.A. Largaespada, and Z. Ivics, Transposons As Tools for Functional Genomics in Vertebrate Models. *Trends in genetics : TIG*, 2017. **33**(11): p. 784-801.
160. Dubin, M.J., O. Mittelsten Scheid, and C. Becker, *Transposons: a blessing curse*. *Curr Opin Plant Biol*, 2018. **42**: p. 23-29.
161. Reid, J.B. and S.H. Howell, *Hormone Mutants and Plant Development*, in *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, P.J. Davies, Editor. 1995, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 448-485.
162. Weiss, C.A., et al., The G protein α subunit (GPa1) is associated with the ER and the plasma membrane in meristematic cells of Arabidopsis and cauliflower. *FEBS Letters*, 1997. **407**(3): p. 361-367.
163. Santner, A. and M. Estelle, Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. *Nature*, 2009. **459**(7250): p. 1071-1078.
164. Thomas, S.G. and T.-p. Sun, Update on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short. *Plant physiology*, 2004. **135**(2): p. 668-676.
165. Davière, J.-M. and P. Achard, *Gibberellin signaling in plants*. *Development*, 2013. **140**(6): p. 1147-1151.
166. Kir, G., et al., RNA Interference Knockdown of BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 in Maize Reveals Novel Functions for Brassinosteroid Signaling in Controlling Plant Architecture. *Plant Physiology*, 2015. **169**(1): p. 826-839.
167. Wang, X.-Q., et al., G Protein Regulation of Ion Channels and Abscisic Acid Signaling in Arabidopsis Guard Cells. *Science*, 2001. **292**(5524): p. 2070-2072.
168. Chakraborty, N., et al., GCR1 and GPA1 coupling regulates nitrate, cell wall, immunity and light responses in Arabidopsis. *Scientific Reports*, 2019. **9**(1): p. 5838.
169. J A D Zeevaart, a. and R.A. Creelman, *Metabolism and Physiology of Abscisic Acid*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1988. **39**(1): p. 439-473.
170. Giraudat, J., *Abscisic acid signaling*. *Current Opinion in Cell Biology*, 1995. **7**(2): p. 232-238.

171. Millborrow, B.V., The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 2001. **52**(359): p. 1145-1164.
172. Rodriguez, J. and W. Davies, The Effects of Temperature and ABA on Stomata of *Zea mays* L. *Journal of Experimental Botany*, 1982. **33**(5): p. 977-987.
173. Kim, T.-H., et al., Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annual review of plant biology*, 2010. **61**: p. 561-591.
174. Zhang, W., et al., Phospholipase Dα1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(25): p. 9508-9513.
175. Sang, Y., et al., Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase Dα. *The Plant Journal*, 2001. **28**(2): p. 135-144.
176. Knöller, A., et al., Brachytic2/ZmABCB1 functions in IAA export from intercalary meristems. *Journal of experimental botany*, 2010. **61**: p. 3689-96.
177. Rayle, D.L. and R. Cleland, Enhancement of Wall Loosening and Elongation by Acid Solutions. *Plant Physiology*, 1970. **46**(2): p. 250-253.
178. Rayle, D.L. and R.E. Cleland, The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, 1992. **99**(4): p. 1271-1274.
179. Majda, M. and S. Robert, *The Role of Auxin in Cell Wall Expansion*. *International journal of molecular sciences*, 2018. **19**(4): p. 951.
180. Fischer, C., et al., Initial transient growth inhibition in maize coleoptiles following auxin application. *Journal of Plant Physiology*, 1993. **141**(1): p. 88-92.
181. Karcz, W., H. Lüthen, and M. Böttger, Effect of IAA and 4-Cl-IAA on growth rate in maize coleoptile segments. *Acta Physiologiae Plantarum*, 1999. **21**(2): p. 133-139.
182. Gustin, J.L., et al., Ovary abortion is prevalent in diverse maize inbred lines and is under genetic control. *Scientific Reports*, 2018. **8**(1): p. 13032.
183. Buescher, E.M., et al., Natural Variation at *sympathy for the ligule* Controls Penetrance of the Semidominant *Liguleless narrow-R* Mutation in *Zea mays*. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 2014. **4**(12): p. 2297-2306.
184. Springer, N.M. and R.M. Stupar, Allelic variation and heterosis in maize: how do two halves make more than a whole? *Genome Res*, 2007. **17**(3): p. 264-75.
185. Dziejewicz, M.J., X. Li, and J. Yu, Dissection of Leaf Angle Variation in Maize through Genetic Mapping and Meta-Analysis. *The Plant Genome*, 2019. **12**(1).
186. Johnson, A.T., Teaching the principle of biological optimization. *Journal of biological engineering*, 2013. **7**(1): p. 6-6.
187. Tolley, J.P., et al., Isoform-specific subcellular localization of *Zea mays* lipoxygenases and oxo-phytodienoate reductase 2. *Plant Gene*, 2018. **13**: p. 36-41.
188. Kochetov, A.V., Alternative translation start sites and hidden coding potential of eukaryotic mRNAs. *Bioessays*, 2008. **30**(7): p. 683-91.
189. Lukaszewicz, M., et al., In vivo evaluation of the context sequence of the translation initiation codon in plants. *Plant Sci*, 2000. **154**(1): p. 89-98.

190. Small, I., et al., Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Mol Biol*, 1998. **38**(1-2): p. 265-77.
191. Kato, C., et al., Characterization of heterotrimeric G protein complexes in rice plasma membrane. *The Plant Journal*, 2004. **38**(2): p. 320-331.
192. Boisson, B., C. Giglione, and T. Meinel, Unexpected Protein Families Including Cell Defense Components Feature in the N-Myristoylome of a Higher Eukaryote. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(44): p. 43418-43429.
193. Hemsley, P.A., Protein S-acylation in plants (Review). *Molecular Membrane Biology*, 2009. **26**(1-2): p. 114-125.
194. Li, Y. and B. Qi, Progress toward understanding protein S-acylation: prospective in plants. *Frontiers in plant science*, 2017. **8**: p. 346.
195. Anderson, D.J. and J.R. Botella, Expression analysis and subcellular localization of the *Arabidopsis thaliana* G-protein β -subunit AGB1. *Plant Cell Reports*, 2007. **26**(9): p. 1469-1480.
196. Linder, M.E., et al., Lipid modifications of G proteins: alpha subunits are palmitoylated. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993. **90**(8): p. 3675-3679.
197. Yuan, X., et al., Putative DHHC-Cysteine-Rich Domain S-Acyltransferase in Plants. *PLOS ONE*, 2013. **8**(10): p. e75985.
198. Mumby, S.M., C. Kleuss, and A.G. Gilman, *Receptor regulation of G-protein palmitoylation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994. **91**(7): p. 2800-2804.
199. Wedegaertner, P.B. and H.R. Bourne, *Activation and depalmitoylation of Gsa*. *Cell*, 1994. **77**(7): p. 1063-1070.
200. Pierre, M., et al., N-Myristoylation Regulates the SnRK1 Pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2007. **19**(9): p. 2804-2821.
201. Fritsch, C., et al., Genome-wide search for novel human uORFs and N-terminal protein extensions using ribosomal footprinting. *Genome Research*, 2012. **22**(11): p. 2208-2218.
202. Lee, S., et al., Global mapping of translation initiation sites in mammalian cells at single-nucleotide resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012. **109**(37): p. E2424-E2432.
203. Yeom, J., et al., Comprehensive analysis of human protein N-termini enables assessment of various protein forms. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 6599.
204. Zhao, Y. and O.N. Jensen, Modification-specific proteomics: strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. *Proteomics*, 2009. **9**(20): p. 4632-4641.
205. Mnatsakanyan, R., et al., Detecting post-translational modification signatures as potential biomarkers in clinical mass spectrometry. *Expert Review of Proteomics*, 2018. **15**(6): p. 515-535.
206. Chongloi, G.L., S. Prakash, and U. Vijayraghavan, Regulation of meristem maintenance and organ identity during rice reproductive development. *Journal of Experimental Botany*, 2019. **70**(6): p. 1719-1736.
207. Raikhel, N., Nuclear targeting in plants. *Plant physiology*, 1992. **100**(4): p. 1627-1632.
208. G.R., H., *Nuclear Import of Plant Proteins*. *Nuclear Import and Export in Plants and Animals*, 2005.

209. Wang, R. and M.G. Brattain, The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa. *FEBS letters*, 2007. **581**(17): p. 3164-3170.
210. Ding, L., S. Pandey, and S.M. Assmann, Arabidopsis extra-large G proteins (XLGs) regulate root morphogenesis. *The Plant Journal*, 2008. **53**(2): p. 248-263.
211. Maruta, N., et al., Membrane-Localized Extra-Large G Proteins and G $\beta\gamma$ of the Heterotrimeric G Proteins Form Functional Complexes Engaged in Plant Immunity in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 2015. **167**(3): p. 1004-1016.
212. Heo, J.B., S. Sung, and S.M. Assmann, Ca²⁺-dependent GTPase, Extra-large G Protein 2 (XLG2), Promotes Activation of DNA-binding Protein Related to Vernalization 1 (RTV1), Leading to Activation of Floral Integrator Genes and Early Flowering in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 2012. **287**(11): p. 8242-8253.
213. Liang, Y., Y. Gao, and A.M. Jones, Extra Large G-Protein Interactome Reveals Multiple Stress Response Function and Partner-Dependent XLG Subcellular Localization. *Frontiers in plant science*, 2017. **8**: p. 1015-1015.
214. Gumber, H.K., et al., Identification and characterization of genes encoding the nuclear envelope LINC complex in the monocot species *Zea mays*. *Journal of Cell Science*, 2019. **132**(3): p. jcs221390.
215. Sikorskaite, S., et al., Protocol: Optimised methodology for isolation of nuclei from leaves of species in the Solanaceae and Rosaceae families. *Plant Methods*, 2013. **9**(1): p. 31.
216. Koelle, M.R., Heterotrimeric G Protein Signaling: Getting inside the Cell. *Cell*, 2006. **126**(1): p. 25-27.
217. Assmann, S.M., Heterotrimeric and unconventional GTP binding proteins in plant cell signaling. *The Plant cell*, 2002. **14 Suppl**(Suppl): p. S355-S373.
218. Xue H, C.X., Li G., Involvement of phospholipid signaling in plant growth and hormone effects. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007. **10**(5): p. 483-489.
219. Zeniou-Meyer, M., et al., Phospholipase D1 Production of Phosphatidic Acid at the Plasma Membrane Promotes Exocytosis of Large Dense-core Granules at a Late Stage. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. **282**(30): p. 21746-21757.
220. McMahon, H.T. and E. Boucrot, *Membrane curvature at a glance*. *Journal of Cell Science*, 2015. **128**(6): p. 1065-1070.
221. Tanguy, E., et al., Phosphatidic Acid: From Pleiotropic Functions to Neuronal Pathology. *Frontiers in cellular neuroscience*, 2019. **13**: p. 2-2.
222. Egea-Jimenez, A.L. and P. Zimmermann, Phospholipase D and phosphatidic acid in the biogenesis and cargo loading of extracellular vesicles. *Journal of Lipid Research*, 2018. **59**(9): p. 1554-1560.
223. Wang, X., et al., *Phosphatidic Acid as Lipid Messenger and Growth Regulators in Plants*, in *Phospholipases in Plant Signaling*, X. Wang, Editor. 2014, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 69-92.
224. Testerink, C. and T. Munnik, Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *Journal of Experimental Botany*, 2011. **62**(7): p. 2349-2361.
225. Dubots, E., et al., Role of phosphatidic acid in plant galactolipid synthesis. *Biochimie*, 2012. **94**(1): p. 86-93.

226. Nishioka, T., et al., Heterogeneity of phosphatidic acid levels and distribution at the plasma membrane in living cells as visualized by a Foerster resonance energy transfer (FRET) biosensor. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. **285**(46): p. 35979-35987.
227. Stanly, C., et al., Isolation of Exosome-Like Vesicles from Plants by Ultracentrifugation on Sucrose/Deuterium Oxide (D₂O) Density Cushions. *Methods Mol Biol*, 2016. **1459**: p. 259-69.
228. Rutter, B., K. Rutter, and R. Innes, Isolation and Quantification of Plant Extracellular Vesicles. *BIO-PROTOCOL*, 2017. **7**.
229. Emrich, S.J., et al., Nearly Identical Paralogs: Implications for Maize (*Zea mays* L.) Genome Evolution. *Genetics*, 2007. **175**(1): p. 429-439.
230. Roy Choudhury, S. and S. Pandey, The role of PLD α 1 in providing specificity to signal-response coupling by heterotrimeric G-protein components in Arabidopsis. *Plant J*, 2016. **86**(1): p. 50-61.
231. Chen, J.-G., Y. Gao, and A.M. Jones, Differential roles of Arabidopsis heterotrimeric G-protein subunits in modulating cell division in roots. *Plant Physiology*, 2006. **141**(3): p. 887-897.
232. Schappi, J.M., A. Krbanjevic, and M.M. Rasenick, Tubulin, actin and heterotrimeric G proteins: coordination of signaling and structure. *Biochimica et biophysica acta*, 2014. **1838**(2): p. 674-681.
233. Gardiner, J.C., et al., A 90-kD phospholipase D from tobacco binds to microtubules and the plasma membrane. *The Plant cell*, 2001. **13**(9): p. 2143-2158.
234. Dhonukshe, P., et al., Phospholipase d activation correlates with microtubule reorganization in living plant cells. *The Plant cell*, 2003. **15**(11): p. 2666-2679.
235. Andreeva, Z., et al., Phospholipase D family interactions with the cytoskeleton: Isoform delta promotes plasma membrane anchoring of cortical microtubules. *Functional Plant Biology*, 2009. **36**: p. 600-612.
236. Nan, Q., J. Mendoza, and M. Facette, Double Labeling of Microtubules and Actin Filaments in Maize Leaf Division Zone. *Bio-protocol*, 2019. **9**(12): p. e3262.
237. Pertl-Obermeyer, H. and G. Obermeyer, *In Vivo Cross-Linking to Analyze Transient Protein-Protein Interactions*, in *Plant Proteomics: Methods and Protocols*, J.V. Jorin-Novo, et al., Editors. 2020, Springer US: New York, NY. p. 273-287.
238. Hooley, R., Plant hormone perception and action: a role for G-protein signal transduction? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1998. **353**(1374): p. 1425-30.
239. Assmann, S.M., Plant G Proteins, Phytohormones, and Plasticity: Three Questions and a Speculation. *Science's STKE*, 2004. **2004**(264): p. re20-re20.
240. Chen, Y., et al., The Regulator of G-Protein Signaling Proteins Involved in Sugar and Abscisic Acid Signaling in Arabidopsis Seed Germination. *Plant Physiology*, 2006. **140**(1): p. 302-310.
241. Okamoto, H., et al., The α -subunit of the heterotrimeric G-protein affects jasmonate responses in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, 2009. **60**(7): p. 1991-2003.
242. Jin, X., et al., Abscisic acid-responsive guard cell metabolomes of Arabidopsis wild-type and gpa1 G-protein mutants. *Plant Cell*, 2013. **25**(12): p. 4789-811.
243. Evans, M.M. and R.S. Poethig, Gibberellins promote vegetative phase change and reproductive maturity in maize. *Plant physiology*, 1995. **108**(2): p. 475-487.

244. Peng, J., et al., 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature*, 1999. **400**(6741): p. 256-261.
245. Lin, H., et al., DWARF27, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *The Plant Cell*, 2009. **21**(5): p. 1512-1525.
246. Wang, Z.-Y., et al., Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis. *Annual review of genetics*, 2012. **46**: p. 701-724.
247. Guo, H., et al., Mechanisms and networks for brassinosteroid regulated gene expression. *Current opinion in plant biology*, 2013. **16**(5): p. 545-553.
248. Xue, H., X. Chen, and G. Li, Involvement of phospholipid signaling in plant growth and hormone effects. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007. **10**(5): p. 483-489.
249. Zhang, Y., et al., Phospholipase D α 1 and Phosphatidic Acid Regulate NADPH Oxidase Activity and Production of Reactive Oxygen Species in ABA-Mediated Stomatal Closure in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2009. **21**(8): p. 2357-2377.
250. Hong, Y., et al., Plant phospholipases D and C and their diverse functions in stress responses. *Progress in Lipid Research*, 2016. **62**: p. 55-74.
251. Kende, H., Hormone Response Mutants. A Plethora of Surprises. *Plant Physiology*, 2001. **125**(1): p. 81-84.
252. Jangam, A.P., R.R. Pathak, and N. Raghuram, Microarray Analysis of Rice d1 (RGA1) Mutant Reveals the Potential Role of G-Protein Alpha Subunit in Regulating Multiple Abiotic Stresses Such as Drought, Salinity, Heat, and Cold. *Frontiers in plant science*, 2016. **7**: p. 11-11.
253. Xu, D.B., et al., A G-protein β subunit, AGB1, negatively regulates the ABA response and drought tolerance by down-regulating AtMPK6-related pathway in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 2015. **10**(1): p. e0116385.
254. Wu, Q., et al., The maize heterotrimeric G protein β subunit controls shoot meristem development and immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020. **117**(3): p. 1799-1805.
255. Urano, D., et al., G Protein Activation without a GEF in the Plant Kingdom. *PLOS Genetics*, 2012. **8**(6): p. e1002756.
256. Yadav, D.K., D. Shukla, and N. Tuteja, Rice heterotrimeric G-protein alpha subunit (RGA1): In silico analysis of the gene and promoter and its upregulation under abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013. **63**: p. 262-271.
257. Cassani, E., et al., Characterization of the first dominant dwarf maize mutant carrying a single amino acid insertion in the VHYNP domain of the dwarf8 gene. *Molecular Breeding*, 2009. **24**(4): p. 375.
258. Steffens, B., et al., The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1. *The Plant Journal*, 2001. **27**(6): p. 591-599.
259. Zaina, S., R. Reggiani, and A. Bertani, Preliminary Evidence for Involvement of GTP-Binding Protein(s) in Auxin Signal Transduction in Rice (*Oryza sativa* L.) Coleoptile. *Journal of Plant Physiology*, 1990. **136**(6): p. 653-658.
260. Ding, L., et al., Heterotrimeric G-Protein-Coupled Signaling in Higher Plants. *Annual Plant Reviews online*, 2018: p. 30-63.
261. Jahn, T., et al., Reinvestigation of auxin and fusicoccin stimulation of the plasma-membrane H⁺-ATPase activity. *Planta*, 1996. **199**(3): p. 359-365.

262. Tode, K. and H. Lüthen, Fusicoccin- and IAA-induced elongation growth share the same pattern of K⁺ dependence. *Journal of Experimental Botany*, 2001. **52**(355): p. 251-255.
263. Ullah, H., et al., Role of a Heterotrimeric G Protein in Regulation of Arabidopsis Seed Germination. *Plant Physiology*, 2002. **129**(2): p. 897-907.
264. Ferrero-Serrano, Á. and S.M. Assmann, The α -subunit of the rice heterotrimeric G protein, RGA1, regulates drought tolerance during the vegetative phase in the dwarf rice mutant d1. *Journal of Experimental Botany*, 2016. **67**(11): p. 3433-3443.
265. Klopffleisch, K., et al., Arabidopsis G-protein interactome reveals connections to cell wall carbohydrates and morphogenesis. *Molecular Systems Biology*, 2011. **7**(1): p. 532.
266. Neuffer, M.G. and O.H. Calvert, Dominant disease lesion mimics in maize. *Journal of Heredity*, 1975. **66**(5): p. 265-270.
267. Johal, G.S., Disease lesion mimic mutants of maize. Online. APSnet Features. doi, 2007. **10**.
268. Olukolu, B.A., et al., The Genetics of Leaf Flecking in Maize and Its Relationship to Plant Defense and Disease Resistance. *Plant Physiology*, 2016. **172**(3): p. 1787-1803.
269. Zhang, H., et al., The role of G-proteins in plant immunity. *Plant signaling & behavior*, 2012. **7**(10): p. 1284-1288.
270. Xue, J., et al., BAK1-mediated phosphorylation of canonical G protein alpha during flagellin signaling in Arabidopsis. *J Integr Plant Biol*, 2020. **62**(5): p. 690-701.
271. Morrison, T.A., J.R. Kessler, and D.R. Buxton, *Maize Internode Elongation Patterns*. *Crop Science*, 1994. **34**(4): p. cropsoci1994.0011183X003400040040x.
272. Evans, L.S. and R.K. Perez, Diversity of cell lengths in intercalary meristem regions of grasses: location of the proliferative cell population. *Canadian Journal of Botany*, 2004. **82**(1): p. 115-122.
273. Gallavotti, A., The role of auxin in shaping shoot architecture. *Journal of experimental botany*, 2013. **64**(9): p. 2593-2608.
274. Scott, G.E. and C.M. Campbell, Internode Length in Normal and Brachytic-2 Maize Inbreds and Single Crosses1. *Crop Science*, 1969. **9**(3): p. cropsoci1969.0011183X000900030012x.
275. White, O.E., *Fasciation*. *The Botanical Review*, 1948. **14**(6): p. 319-358.
276. Bommert, P. Isolation und Analyse der Mutation thick tassel dwarf1 aus Zea mays. 2003.
277. Kellogg, E., et al., Early inflorescence development in the grasses (Poaceae). *Frontiers in Plant Science*, 2013. **4**(250).
278. Bartlett, M.E. and B. Thompson, Meristem identity and phyllotaxis in inflorescence development. *Frontiers in Plant Science*, 2014. **5**(508).
279. Chuck, G.S., et al., Maize SBP-box transcription factors unbranched2 and unbranched3 affect yield traits by regulating the rate of lateral primordia initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014. **111**(52): p. 18775-18780.
280. Erickson, R.O. and F.J. Michelini, *The Plastochron Index*. *American Journal of Botany*, 1957. **44**(4): p. 297-305.
281. Meicenheimer, R.D., The plastochron index: still useful after nearly six decades. *Am J Bot*, 2014. **101**(11): p. 1821-35.
282. Sun, X., et al., Altered expression of maize PLASTOCHRON1 enhances biomass and seed yield by extending cell division duration. *Nature Communications*, 2017. **8**(1): p. 14752.

283. Guengerich, F.P., Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 1991. **266**(16): p. 10019-10022.
284. Wang, J.-W., et al., Dual effects of miR156-targeted SPL genes and CYP78A5/KLUH on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 2008. **20**(5): p. 1231-1243.
285. Miyoshi, K., et al., PLASTOCHRON1, a timekeeper of leaf initiation in rice, encodes cytochrome P450. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004. **101**(3): p. 875-880.
286. Kawakatsu, T., et al., PLASTOCHRON2 Regulates Leaf Initiation and Maturation in Rice. *The Plant Cell*, 2006. **18**(3): p. 612-625.
287. Singh, A., et al., Map-Based Cloning and its Application in Cloning Plant Disease Resistance Genes. 2016. **5**.
288. Padilla, J.M. and M.E. Otegui, Co-ordination between leaf initiation and leaf appearance in field-grown maize (*Zea mays*): genotypic differences in response of rates to temperature. *Annals of botany*, 2005. **96**(6): p. 997-1007.
289. Lüthen, H.a.B., M., A high tech low cost auxanometer for high resolution determination of elongation rates in six simultaneous experimental setups. *Mitt. Inst. Allg. Bot. Hamburg*, 1991. **24**.
290. Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks, *A plant DNA miniprep: Version II*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1983. **1**(4): p. 19-21.
291. Mullis, K., et al., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
292. Saiki, R., et al., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988. **239**(4839): p. 487-491.
293. Koressaar, T. and M. Remm, Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 2007. **23**(10): p. 1289-1291.
294. Settles, A.M., S. Latshaw, and D.R. McCarty, Molecular analysis of high-copy insertion sites in maize. *Nucleic acids research*, 2004. **32**(6): p. e54-e54.
295. Laemmli, U.K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
296. Sambrook, J. and D.W. Russell, *SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006. **2006**(4): p. pdb.prot4540.
297. Disch, E.-M., et al., Membrane-associated ubiquitin ligase SAUL1 suppresses temperature- and humidity-dependent autoimmunity in *Arabidopsis*. *Molecular plant-microbe interactions*, 2016. **29**(1): p. 69-80.
298. Ren, J., et al., CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, 2008. **21**(11): p. 639-644.
299. Xie, Y., et al., GPS-Lipid: a robust tool for the prediction of multiple lipid modification sites. *Scientific reports*, 2016. **6**: p. 28249-28249.
300. Karimi, M., D. Inzé, and A. Depicker, GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 2002. **7**(5): p. 193-195.