

Physiologische Wirkungen von PSK- α und Analyse
des PSK-Signalweges in *Arabidopsis thaliana*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Nils Stührwohldt
aus Neumünster

Kiel
2011

Referent/in: Prof. Dr. Margret Sauter

Korreferent/in: Prof. Dr. Dietrich Ober

Tag der mündlichen Prüfung: 01.04.2011

Zum Druck genehmigt: 01.04.2011

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 1 |
| ZUSAMMENFASSUNG | 4 |
| SUMMARY | 5 |
| EINLEITUNG..... | 6 |
| Peptide regulieren das Wachstum, die Entwicklung und die Pathogenabwehr bei Pflanzen..... | 6 |
| Sulfatierte Peptide regulieren das Wachstum von Pflanzen..... | 9 |
| Struktur und Wirkungen von PSK- α | 12 |
| Die Perzeption pflanzlicher Peptide durch Rezeptorkinasen mit leuzinreichen Wiederholungssequenzen | 14 |
| ZIELSETZUNG..... | 20 |
| KAPITEL 1..... | 21 |
| In <i>Arabidopsis thaliana</i> fördert PSK- α das Wurzelwachstum über die LRR Rezeptorkinasen PSKR1 und PSKR2 | 21 |
| KAPITEL 2..... | 34 |
| Phytosulfokin- α spielt in <i>Arabidopsis thaliana</i> eine Rolle bei Verwundung und Befall durch Pathogene | 34 |
| KAPITEL 3..... | 45 |
| PSKR1 koordiniert das synchrone Wachstum des Fruchtknotens und der Staubblätter und trägt zur Pollenschlauchorientierung in <i>Arabidopsis thaliana</i> bei | 45 |
| KAPITEL 4..... | 78 |
| In <i>Arabidopsis thaliana</i> fördert Phytosulfokin- α das Hypokotylwachstum über PSKR1 | 78 |
| KAPITEL 5..... | 110 |
| PSI1 ist eine mögliche Komponente des PSK-Signalweges | 110 |
| Einleitung..... | 111 |
| Material und Methoden..... | 113 |
| Ergebnisse | 123 |
| Diskussion..... | 140 |
| Literatur | 147 |
| ABSCHLIESSENDE DISKUSSION UND AUSBLICK | 151 |
| LITERATUR | 159 |
| DANKSAGUNG..... | 168 |
| LEBENS LAUF | 169 |
| ERKLÄRUNG..... | 170 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--------|---|
| BAK1 | <i>BRI1-Associated Kinase 1</i> |
| BLAST | <i>Basic local alignment search tool</i> |
| bp | Basenpaare |
| BRI1 | <i>Brassinosteroid Insensitive 1</i> |
| cDNA | komplementäre DNA (<i>copy-DNA</i>) |
| CLE | <i>Clavata/Endosperm Surrounding Region</i> |
| CLSM | Konfokales Laser Scanning Mikroskop |
| CLV | Clavata |
| CPK | Calcium-abhängige Proteinkinase (<i>Calcium-dependent Related Protein Kinase</i>) |
| CRN | Coryne |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DUF | Domäne mit unbekannter Funktion (<i>Domain of Unknown Function</i>) |
| dwf4 | dwarf 4 |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EF-Tu | <i>Elongation Factor Tu Receptor</i> |
| et al. | et alii |
| FLS2 | <i>Flagellin Sensing 2</i> |
| GFP | Grün Fluoreszierendes Protein (<i>Green Fluorescent Protein</i>) |
| HSP90 | <i>Heat Shock Protein 90</i> |
| Kd | Dissoziationskonstante |
| kDA | Kilodalton |
| LB | Medium für die Anzucht von Bakterien (<i>Lysogeny Broth</i>) |
| LRR | Sequenz mit leuzinreichen Wiederholungssequenzen (<i>Leucine-Rich Repeat</i>) |
| MAPK | <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> |
| ML1 | <i>Meristem Layer 1</i> |
| mRNA | Boten RNA (<i>messenger RNA</i>) |
| MS | Nährmedium nach Murashige und Skoog |
| MTN | MTA (5'-Methylthioadenosin) Nukleosidase |
| NaCl | Natriumchlorid |

| | |
|----------------|---|
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NMT | N-Myristoyl Transferase |
| OD | optische Dichte |
| PAPS | 3'-Phosphoadenosin 5'-Phosphosulfat |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| Pfu | <i>Pyrococcus furiosus</i> |
| PLT | Plethora |
| PMI | <i>Plastid Movement Impaired</i> |
| POL | Poltergeist |
| PSI1 | <i>Phytosulfokine Insensitive 1</i> |
| PSKR1 | Phytosulfokin Rezeptor 1 |
| PSKR2 | Phytosulfokin Rezeptor 2 |
| PSK- α | Phytosulfokin- α |
| PSY1 | <i>Plant Peptide Containing Sulfated Tyrosine 1</i> |
| RALF | <i>Rapid Alkalinization Factor</i> |
| RGF | <i>Root Meristem Growth Factor</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RPK2 | <i>Receptor-like Protein Kinase 2</i> |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>) |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transkriptions-PCR |
| SBT | Subtilisin Serin Protease |
| SCL | <i>Scarecrow</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SHD | <i>Shepherd</i> |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| T-DNA | Transfer-DNA |
| T _m | Schmelztemperatur |
| TOAD2 | Toadstool2 |
| TPST | Tyrosylprotein Sulfotransferase |
| Tris | Tri(hydroxymethyl)-Aminomethan |
| Ubi | Ubiquitin |
| v/v | Volumen/Volumen (<i>volume per volume</i>) |
| w/v | Gewicht/Volumen (<i>weight per volume</i>) |
| WT | Wildtyp |

| | |
|-----|--|
| WUS | Wuschel |
| YFP | Grün Fluoreszierendes Protein (Yellow Fluorescent Protein) |

ZUSAMMENFASSUNG

Phytosulfokin- α (PSK- α) ist ein disulfatiertes Pentapeptid mit der Aminosäuresequenz Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr-Gln, welches als autokriner Wachstumsfaktor wirkt. Über physiologische und molekulargenetische Ansätze wurden in *Arabidopsis thaliana* Funktionen von PSK- α und eine mögliche Komponente des Signalweges identifiziert. PSK-Präproteine werden in *Arabidopsis* durch fünf Gene kodiert. Die Perzeption des Peptids erfolgt in *Arabidopsis* durch zwei Rezeptorkinasen mit Leuzinreichen Wiederholungssequenzen, PSKR1 und PSKR2. Spezifische Expressionen von PSK-Präproteingenen und *PSKR1* wurden in Wurzeln, Hypokotylen und reproduktiven Organen und nach Verwundung nachgewiesen. In diesen Geweben kann PSK- α wahrscheinlich synthetisiert und perzipiert werden. PSK- α förderte konzentrationsabhängig die Streckung der Zellen von Wurzeln und Hypokotylen von *Arabidopsis*-Keimlingen. Die Regulation des Wurzelwachstums durch PSK- α erfolgte über beide PSK-Rezeptoren, während das Hypokotylwachstum und die Expansion von Protoplasten, die aus dem etiolierten Hypokotyl isoliert wurden, nur über PSKR1 reguliert wurden. Analysen von T-DNA-Insertionslinien für *PSKR1* zeigten, dass PSK- α und PSKR1 während der Reproduktion die Pollenschlauchorientierung und das synchrone Wachstum von Staubblättern und Fruchtknoten regulieren. PSK- α ist außerdem in die Antwort auf Verwundung und Befall durch Pathogene involviert. Über bioinformatische Analysen wurden Gene identifiziert, die mit *PSKR1* und *PSKR2* koexprimiert sind. Koexprimierte Kandidatengene wurden an Hand von *Knockout* Linien auf eine mögliche Funktion bei der Regulation von Hypokotyl- und Wurzelwachstum durch PSK- α untersucht. PSI1 ist ein Protein mit unbekannter Funktion, das möglicherweise eine Komponente des PSK-Signalweges ist. *psi1-1* Keimlinge hatten kürzere Wurzeln und Hypokotyle und *pskr1-3/pskr2-1/psi1-1* Dreifachmutanten zeigten einen nicht-additiven Wachstumsphänotyp.

SUMMARY

Phytosulfokine- α (PSK- α) is the disulfated pentapeptide Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr-Gln, which acts as an autocrine growth factor. Physiological and genetic approaches were chosen to identify physiological functions of PSK- α and putative components of its signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. In *Arabidopsis*, PSK- α is encoded by five precursor genes and perceived by two leucine-rich repeat receptor kinases termed PSKR1 and PSKR2. Distinct and overlapping expression patterns of PSK precursor genes and of *PSKR1* were detected in roots, hypocotyls and reproductive tissues, and after wounding. These findings supported the idea that PSK- α is synthesized and perceived in these tissues. Root and hypocotyl growth were promoted by PSK- α in a dose-dependent manner and resulted in an increase in final cell size. While root growth was promoted by both PSK receptors, hypocotyl growth and expansion of protoplasts which were isolated from etiolated hypocotyls were promoted by PSK- α exclusively through PSKR1. Analysis of T-DNA insertion lines for *PSKR1* revealed that PSK signaling regulates pollen tube guidance and synchronized growth of stamen and carpel during reproduction. In addition, PSK signaling may play a role in response to wounding and infection with pathogens. Finally, co-expression analysis based on publicly available databases identified genes which are co-expressed with *PSKR1* and *PSKR2*. Hypocotyl and root lengths and responsiveness to PSK- α were studied in *knockout* lines of the co-expressed candidate genes. *psi1-1* seedlings had shorter roots and hypocotyls and *pskr1-3/pskr2-1/psi1-1* triple mutants showed a non-additive growth phenotype. PSI1 is a protein of unknown function, which may participate in PSK signaling.

EINLEITUNG

Peptide regulieren das Wachstum, die Entwicklung und die Pathogenabwehr bei Pflanzen

Biochemische und genetische Studien haben gezeigt, dass Peptide eine Rolle beim Wachstum und in der Entwicklung von Pflanzen spielen. Sie regulieren Kalluswachstum, Meristementwicklung, Wurzelwachstum, Selbstinkompatibilität und Organabscission und sind an der Regulation von Abwehrmechanismen gegen Pathogene und an der Antwort auf Verwundung beteiligt (Matsubayashi, 2011; Matsubayashi und Sakagami, 2006). CLAVATA3 (CLV3) gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die das Gleichgewicht zwischen dem Erhalt und der Differenzierung von Stammzellen im Sprossapikalmeristem von Arabidopsis regulieren. CLV3 kodiert für ein 96 Aminosäuren langes Peptid mit einem Signalpeptid (Fletcher et al., 1999; Torii, 2004). Das funktionale sekretierte CLV3 Peptid hat eine Länge von 78 Aminosäuren. CLV1 kodiert für eine rezeptorähnliche Serin/Threonin-Kinase, die aus einer extrazellulären Domäne mit leuzinreichen Wiederholungssequenzen, einer Transmembrandomäne und einer cytoplasmatischen Kinasedomäne besteht (Clark et al., 1997; Abbildung 2). CLV2 kodiert für ein Rezeptorprotein, welches CLV1 strukturell sehr ähnlich ist, jedoch eine kleinere intrazelluläre Domäne ohne Kinase-Funktion aufweist (Jeong et al., 1999). CLV1 und CLV2 bilden zusammen einen durch Disulfidbrücken stabilisierten, heterodimeren Rezeptorkomplex (Trotochaud et al., 1999), an den CLV3 extrazellulär bindet (Fletcher et al., 1999). Die Bindung von CLV3 an CLV1 wurde mit einer Dissoziationskonstante (K_d -Wert) von 17,5 nM über Liganden-Bindungsstudien und Photoaffinitäts-Markierung nachgewiesen (Ogawa et al., 2008). CORYNE (CRN) ist eine weitere rezeptorähnliche Kinase, die an der Perzeption von CLV3 beteiligt ist (Müller et al., 2008). CRN hat keine extrazelluläre Domäne. CRN und CLV2 interagieren über ihre Transmembrandomänen und bilden einen funktionalen Rezeptorkomplex (Müller et al., 2008). Eine schwache Interaktion zwischen CLV1 und CRN wurde von Bleckmann et al. (2010) nachgewiesen. *Receptor-like Protein Kinase 2* (RPK2), auch bekannt als TOADSTOOL 2 (TOAD2), bildet Homo-Oligomere und ist ebenfalls an der Übertragung des CLV3 Signals beteiligt. RPK2 ist nicht mit CLV1 oder CLV2 assoziiert und bildet einen dritten,

unabhängigen CLV3-Signalweg (Kinoshita et al., 2010). CLV3 wird von den Stammzellen des Apikalmeristems sekretiert und agiert als parakrines Signalmolekül, dessen Aktivität in einer Zellschicht ausreicht, um die Proliferation und Differenzierung der Zellen im gesamten Apikalmeristem zu kontrollieren (Fletcher et al., 1999). Nach der Bindung von CLV3 an einen Rezeptorkomplex kommt es zu einer Herunterregulierung der Expression von *WUSCHEL* (*WUS*; Schoof et al., 2000). Bei *WUS* handelt es sich um einen Homöodomänen-Transkriptionsfaktor, der die Proliferation und Differenzierung der Stammzellen unterstützt. Über einen rückgekoppelten Signalweg induziert *WUS* wiederum die Expression von *CLV3*, wodurch das Gleichgewicht der Stammzellen im Sprossmeristem reguliert wird (Brand et al., 2000). Die rückgekoppelte Regulation aktiviert einen Signaltransduktionsweg, der die *WUS* Expression negativ beeinflusst. *POLTERGEIST* (*POL*) ist ein negativer Regulator des CLV3 Signalweges (Yu et al., 2000). *POL* kodiert für eine Proteinphosphatase 2C, die die Expression von *WUS* induziert (Yu et al., 2000; Yu et al., 2003; Song und Clark, 2001; Song et al., 2006). *SHEPHERD* (*SHD*), ein HSP90 ähnliches Protein, reguliert das Falten des funktionellen CLV Rezeptorkomplexes (Ishiguro et al., 2002).

CLV3 gehört zur Gruppe der CLE Proteine (CLAVATA3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION (ESR)). Mit Ausnahme einiger verwandter Proteine in parasitären Würmern sind sie auf das Pflanzenreich beschränkt (Wang und Fiers, 2010). In *Arabidopsis* sind 32 CLE Proteine bekannt. CLE Proteine besitzen ein Signalpeptid und ein hochkonserviertes, 14 Aminosäuren langes CLE-Motiv am C-Terminus (Fiers et al., 2007). Einige der Proteine aus *Arabidopsis* sind an der Regulation der Proliferation und Differenzierung von Zellen beteiligt (Fiers et al., 2007). CLE Proteine spielen eine Rolle bei der Ausbildung und der Erhaltung des Wurzelapikalmeristems (Clark, 2001). Die Zugabe von CLV3, CLE19 und CLE40 führte in *Arabidopsis* auf Grund eines stark verkleinerten Wurzelmeristems zu einem stark verringerten Wurzelwachstum (Fiers et al., 2005). Die Behandlung von Keimlingen mit CLE14 und CLE20 verursachte eine starke, irreversible Reduktion der Zellteilungsrate. Die Zellstreckung im Wurzelapikalmeristem war nicht beeinflusst (Meng und Feldman, 2010).

Auch die CLV Rezeptoren regulieren Wachstum und Entwicklung. Sie tragen zum Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelldifferenzierung im

Sprossmeristem bei (Clark et al., 1996). Die CLV Rezeptoren CLV1 (Abbildung 2), CLV2, CRN und RPK2 sind essentielle Komponenten in der Regulation der Zellproliferation. CRN agiert zusammen mit CLV2 und parallel zu CLV1 (Müller et al., 2008). Die Blütenmeristeme von *clv1*, *clv2* und *clv3* Pflanzen sind bis zu zweimal so groß wie die des Wildtyps, weil sich die Zellen des Blütenmeristems weiter teilen anstatt sich zu differenzieren (Clark et al., 1996). *crn* Pflanzen zeigen vergleichbare Phänotypen wie *clv1*, *clv2* und *clv3*. Zusätzliche Organe in allen vier Wirteln der Blüte sind auf ein vergrößertes Meristem zurückzuführen, welches während der Blütenentwicklung gebildet wird (Müller et al., 2008). *rpk2* Pflanzen weisen einen vergleichbaren Phänotyp wie *clv* Pflanzen auf. Die Phänotypen von *clv1/rpk2* und *clv2/rpk2* Pflanzen sind additiv. Daraus wurde geschlossen, dass die Übertragung des CLV3 Signals über RPK2 einen unabhängigen Signalweg darstellt (Kinoshita et al., 2010).

In Tomate wurde eine Familie von Peptiden identifiziert, die an intrazellulären Signalprozessen bei der Antwort auf Verwundung beteiligt sind (Ryan und Pearce, 2003). Systemin wird von Pflanzen als systemische Antwort auf Verwundung an Verwundungsstellen sekretiert (Scheer und Ryan, 1999). Es wird mit Ausnahme von Wurzeln ubiquitär in der Pflanze gebildet (Ryan et al., 1992). Das Peptid ist 18 Aminosäuren lang und wird aus dem C-Terminus eines 200 Aminosäuren langen Präproteins, Prosystemin, proteolytisch prozessiert (McGurl et al., 1992; McGurl und Ryan, 1992). Prosystemin hat kein für sekretierte Peptide typisches Signalpeptid. Dies ließ vermuten, dass das Peptid nicht über den sekretorischen Weg synthetisiert und prozessiert wird (McGurl et al., 1992). Systemin induziert die Expression von Proteinaseinhibitoren in den Blättern von jungen Tomaten-Pflanzen (Pearce et al., 1991). Die Perzeption von Systemin findet über die LRR Rezeptorkinase SR160 statt (Scheer und Ryan, 2002). In der frühen Antwort auf Verwundung wird die MBP Kinase aktiviert, die zur MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) Familie der Proteinkinasen gehört (Stratmann et al., 2000). Phosphorylierung eines Tyrosins durch SR160 aktiviert die MBP Kinase (Meindl et al., 1998). Nach Verwundung aktiviert Systemin Gene, die für Enzyme kodieren, die in die Synthese von Jasmonsäure involviert sind (Ryan, 2000; Schilmiller und Howe, 2005). Jasmonsäure steuert verschiedene Prozesse der Abwehr von Pathogenen und der Wundantwort. Nach der Perzeption von Jasmonsäure kommt es zur Aktivierung von verschiedenen Verteidigungsmechanismen, die

mit einer starken Veränderung der Genexpression einhergehen (Pauwels et al., 2008). Salicylsäure inhibiert die Synthese von Proteinaseinhibitoren, die durch Systemin und Jasmonsäure induziert werden (Doares et al., 1995). In Tabak und Tomate wurden Systemin-ähnliche, 15 bis 20 Aminosäuren lange, glykosylierte und Hydroxyprolin-reiche Peptide, TobHypSys I und II (*Tobacco hydroxyproline-rich systemin*) und TomHypSys II und III (*Tomato hydroxyproline-rich systemin*), identifiziert, die ebenfalls aus Präproproteinen gebildet werden (Ryan und Pearce, 2003). Im Gegensatz zu Systemin tragen sie ein Signalpeptid (Ryan und Pearce, 2003).

Sulfatierte Peptide regulieren das Wachstum von Pflanzen

Das Arabidopsis-Genom enthält 979 Gene, die für putative, sekretierte Peptide kodieren (Matsubayashi, 2011). Es wurde nachgewiesen, dass posttranslationale Modifikationen wie Sulfatierung, Hydroxylierung und Arabinosylierung wichtig für die Funktion einiger dieser Peptide sind (Matsubayashi, 2011). Die Sulfatierung von Tyrosinen ist für die Funktion von verschiedenen pflanzlichen und tierischen Peptiden essentiell (Moore, 2003). Sekretierte Proteine und Membranproteine wie Vitellogenin II aus *Drosophila melanogaster* werden an Tyrosinen sulfatiert (Yang et al., 2000). Die O-Sulfatierung von Tyrosinen wird in Pflanzen und Tieren von Tyrosylprotein-Sulfotransferasen (TPST) katalysiert. Diese übertragen ein Sulfat von 3'-Phosphoadenosin 5'-Phosphosulfat (PAPS) auf die Phenolgruppe des Tyrosins (Moore, 2003; Moore, 2009). O-Sulfatierung von Tyrosinen ist in tierischen Organismen weit verbreitet (Huttner, 1984). In Säugetieren wird die O-Sulfatierung der Tyrosine von zwei strukturell ähnlichen Proteinen, TPST-1 und TPST-2, katalysiert (Beisswanger et al., 1998; Ouyang et al., 1998). TPSTs sind etwa 50 kDa große Typll-Transmembranproteine, die im *trans*-Golgi Netzwerk lokalisiert sind. Ihre katalytische Domäne ist zum Lumen orientiert (Baeuerle und Huttner, 1987). In Pflanzen ist für die Sulfatierung von Tyrosinen ein Aspartat N-terminal vom Tyrosin essentiell. Saure Aminosäuren in der Umgebung des Tyrosins erhöhen ebenfalls die Wahrscheinlichkeit einer Sulfatierung (Hanai et al., 2000). TPST Aktivität wurde in mikrosomalen Fraktionen von *Daucus carota* nachgewiesen (Hanai et al., 2000). Komori et al. (2009) identifizierten in *Arabidopsis thaliana* die erste pflanzliche TPST. Diese

zeigt weder Sequenzübereinstimmung noch strukturelle Ähnlichkeit zu tierischen TPSTs (Komori et al., 2009). Es handelt sich um ein Typl-Transmembranprotein, das im Golgi-Netzwerk lokalisiert ist. Die TPST aus Arabidopsis katalysiert die Sulfatierung bestimmter Tyrosine von RGFs (*Root Meristem Growth Factors*, Matsuzaki et al., 2010) und der Präproteine PSY1 (*Plant Peptide Containing Sulfated Tyrosine 1*, Amano et al., 2007) und Phytosulfokin (PSK) *in vitro* (Komori et al., 2009; Abbildung 1). TPST wird in Arabidopsis durch ein einzelnes Gen kodiert. *TPST* ist am stärksten im Wurzelapikalmeristem exprimiert (Komori et al., 2009). *Knockout* Pflanzen aus Arabidopsis ohne endogene TPST Aktivität sind zwergwüchsig. Sie haben eine reduzierte Anzahl an Blüten und Schoten, hellgrüne Blätter, ein kleineres Wurzelapikalmeristem und stark verkürzte Wurzeln (Komori et al., 2009). Die Wurzellänge konnte durch Zugabe von RGFs, PSY1 und die disulfatierte Form des PSK zu *tpst-1* Keimlingen vollständig komplementiert werden, was bedeutet, dass alle drei Arten von sulfatierten Peptiden essentiell für das Wachstum der Arabidopsis-Wurzel sind (Komori et al., 2009; Matsuzaki et al., 2010). PSY1 ist ein 18 Aminosäuren langes Glykopeptid, dessen Tyrosin sulfatiert wird (Amano et al., 2007; Abbildung 1). Fehlende *O*-Sulfatierung des Tyrosins und fehlende Glykosylierung führen zum vollständigen Ausschalten der Aktivität von PSY1. Ein nicht-glykosyliertes PSY1 Analogon hatte nur eine geringe Aktivität. PSY1 Analoga, die weder die L-Arabinose Reste noch ein Sulfat am Tyrosin enthielten, besaßen keine biologische Aktivität. *PSY1* wird ubiquitär in Arabidopsis exprimiert mit stärkster Expression im Sprossapikalmeristem und in der Streckungszone der Wurzel. Die *PSY1* Expression wird durch Verwundung induziert. Die Perzeption von PSY1 findet über eine LRR Rezeptorkinase, den PSY1 Rezeptor, statt. Proliferation und Expansion von Zellen werden durch PSY1 in nanomolaren Konzentrationen gefördert. Die Proliferation von Mesophyllzellen von *Asparagus officinalis* wurde durch PSY1 stark stimuliert. 100 nM PSY1 förderte außerdem das Wachstum von Arabidopsis-Wurzeln um 25% (Amano et al., 2007). Die Überexpression von PSY1 in Arabidopsis führte zu längeren Wurzeln und größeren Kotyledonen. Dieser Effekt war hauptsächlich auf größere Zellen zurückzuführen (Amano et al., 2007).

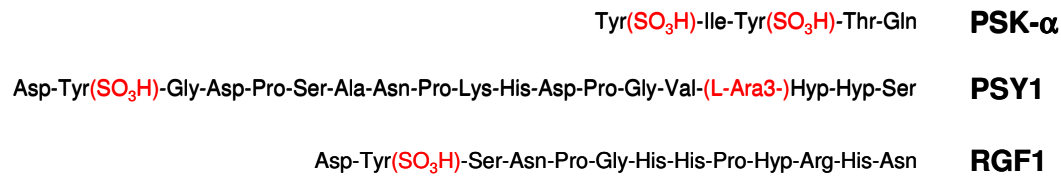
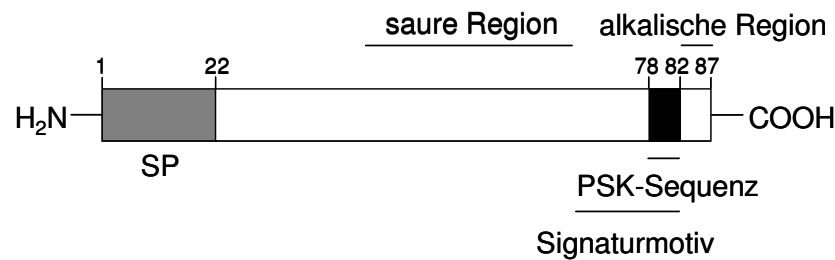
A**B**

Abbildung 1: Sulfatierte Peptide in Pflanzen. **A** Aminosäuresequenzen der sulfatierten Peptide PSK-α, PSY1 und RGF1 (in Anlehnung an Matsubayashi et al., 1996; Amano et al., 2007; Komori et al., 2009). RGF1 ist beispielhaft für RGFs ausgewählt worden. **B** Schematische Darstellung des PSK2 Präproteins aus Arabidopsis (in Anlehnung an Lorbiecke und Sauter, 2002). Das PSK2 Präproprotein hat eine Länge von 87 Aminosäuren. Am N-terminalen Ende trägt es ein 22 Aminosäuren langes, sekretorisches Signalpeptid (SP, grau), am C-terminalen Ende die PSK-Sequenz (schwarz). Etwa in der Mitte des Präproteins befindet sich eine Region mit vermehrt sauren Aminosäuren („saure Region“, Lorbiecke und Sauter, 2002). Am C-Terminus von PSK2 sind vermehrt alkalische Aminosäuren lokalisiert („alkalische Region“, Lorbiecke und Sauter, 2002). Die Region des Signaturmotivs Cx₍₄₋₉₎[E/D/Q]xCx₍₂₎RRx₍₃₋₄₎AH[T/L/V]DYIYTQ ist ebenfalls markiert.

Matsuzaki et al. (2010) identifizierten mit den RGFs weitere Peptide, die sulfatiert werden. Im Arabidopsis-Genom wurde nach Genen gesucht, deren Primärsequenzen 70 bis 110 Aminosäuren lang sind und die wenig Cysteine, ein Sekretionsignal und ein Asparagin-Tyrosin Motiv enthalten. Diese Eigenschaften können Hinweise auf Peptide sein, die posttranslational modifiziert werden können. *At5g60810* (*RGF1*) wurde in Arabidopsis überexprimiert und das gebildete Peptid (Abbildung 1A) über Massenspektrometrie identifiziert. Analysen von Mutanten, in denen mehrere RGF Gene ausgeschaltet wurden, zeigten, dass RGFs eine Gruppe von funktionell redundanten Peptiden sind (Matsuzaki et al., 2010; Abbildung 1A). In Arabidopsis wurden neun Gene identifiziert, die für RGFs kodieren. RGFs werden aus etwa 100 Aminosäuren langen Präproteinen gebildet. Die

funktionalen Peptide bestehen aus 13 Aminosäuren. Außer für RGF8 wurde für alle nachgewiesen, dass sie die meristematische Aktivität des Wurzelapikalmeristems fördern. Alle RGFs enthalten ein Tyrosin, welches sulfatiert wird. Die Peptide werden sekretiert und hauptsächlich im Bereich des ruhenden Zentrums der Wurzel und der innersten Schicht der zentralen Columella-Zellen exprimiert. Die biologische Aktivität von RGFs, die nicht sulfatiert sind, ist stark reduziert. RGFs sind an der Bildung der Stammzellnische des Wurzelapikalmeristems und der Proliferation von Zellen beteiligt. RGF1 aus Arabidopsis fördert die Länge der Wurzel und die Größe des Wurzelmeristems ab einer Konzentration von 0,1 nM. Arabidopsis-Wurzeln, die mit RGF1 angezogen wurden, hatten längere Wurzeln. RGFs sind essentiell für den Erhalt der Stammzellnische des Wurzelmeristems und die Proliferation von Zellen (Matsuzaki et al., 2010). RGFs regulieren das Wurzelwachstum, indem PLETHORA Transkriptionsfaktoren stabilisiert werden, die spezifisch im Wurzelmeristem exprimiert werden (Matsuzaki et al., 2010; Zhou et al., 2010).

Struktur und Wirkungen von PSK- α

PSK- α ist ein disulfatiertes Pentapeptid mit der Aminosäuresequenz Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr-Gln (Matsubayashi und Sakagami, 1996; Abbildung 1A). Es wurde zuerst aus Spargel Mesophyllzellen isoliert. PSK- α fungiert als autokrines Signalmolekül in Pflanzenzellen und stimuliert die Proliferation von Suspensionszellen, die in geringer Dichte wachsen (Matsubayashi und Sakagami, 1996). PSK- α ist wasserlöslich, hitzestabil und in nanomolaren Konzentrationen wirksam (Matsubayashi et al., 1996, 1997, 2002). Neben dem Pentapeptid wurde eine weitere, verkürzte Form des PSKs, PSK- β , aus konditioniertem Medium von Spargel Mesophyllzellen identifiziert (Matsubayashi et al., 1996). Das Tetrapeptid ist C-terminal verkürzt und hat die Aminosäuresequenz Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr. Analysen von PSK- α , PSK- β und weiterer Analoga ergaben, dass PSK- β 8% der mitogenen Aktivität von PSK- α aufwies. Für weitere Analoga wie [Ser4]PSK- α und [Val2]PSK- α wurde eine Aktivität von 2% beziehungsweise 4% von PSK- α nachgewiesen (Matsubayashi et al., 1996). Die Analyse weiterer Analoga zeigte, dass die Sulfatierung der Tyrosine essentiell für die mitotische Aktivität des Peptids ist. Fehlende Sulfatierungen am ersten oder zweiten Tyrosin führten zu einer

mitotischen Aktivität von 0,6% beziehungsweise 4%. Für das unsulfatierte Peptid wurde eine mitotische Aktivität von weniger als 0,1% nachgewiesen (Matsubayashi et al., 1996). PSK- α wurde auch aus konditioniertem Medium von Suspensionskulturen von *Oryza sativa* (Matsubayashi et al., 1997), *Zinnia elegans* (Matsubayashi et al., 1999) und *Daucus carota* (Hanai et al., 2000) isoliert.

PSK- α wird aus einem inaktiven, höhermolekularen Präproprotein gebildet. Dies erfordert posttranslationale Modifikation und schrittweise Prozessierung (Yang et al., 2000). Wie für PSY1 und RGFs ist auch für PSK- α die Sulfatierung der Tyrosine, welche durch die TPST katalysiert wird (Komori et al., 2009), essentiell für die biologische Aktivität. Yang et al. (1999) beschrieben die erste Primärsequenz eines PSK Präproproteins, OsPSK1. Es ist 89 Aminosäuren lang und besitzt ein hydrophobes Signalpeptid und die hochkonservierte PSK-Sequenz nahe dem C-Terminus (Yang et al., 1999). Weitere Gene, die für PSK Präproproteine kodieren, wurden von Lorbiecke und Sauter (2002) identifiziert. Aus ESTs, cDNAs und genomischen Sequenzen wurden unter anderem aus *Oryza sativa*, *Zea mays* und *Arabidopsis thaliana* Sequenzen von homologen Präproproteinen nachgewiesen. In *Arabidopsis* kodieren fünf paraloge Gene für PSK Präproproteine (Matsubayashi et al., 2006; Yang et al., 2001; Lorbiecke und Sauter, 2002). Die Subtilisin Serin Protease AtSBT1.1 katalysiert spezifisch die proteolytische Spaltung des Präproproteins PSK4 aus *Arabidopsis* (Srivastava et al., 2008). Für andere Präproproteine wurde die proteolytische Spaltung noch nicht verifiziert. Abbildung 1B zeigt die schematische Darstellung von PSK2 aus *Arabidopsis* (in Anlehnung an Lorbiecke und Sauter, 2002). PSK2 ist 87 Aminosäuren lang und weist ein 22 Aminosäuren langes Signalpeptid auf. PSK Präproproteine besitzen geringe Homologien auf Ebene der Primärsequenz, aber ähnliche Sekundärstrukturen (Lorbiecke und Sauter, 2002). Darüber hinaus sind Regionen aus vermehrt sauren und basischen Aminosäuren in der Mitte sowie am C-terminalen Ende für PSK Präproproteine charakteristisch (Abbildung 1B). Weitere konservierte Aminosäuren wurden im Bereich der PSK-Sequenz des Präproproteins identifiziert. Die Konsensussequenz $Cx_{(4-9)}[E/D/Q]xCx_{(2)}RRx_{(3-4)}AH[T/LA/]DYIYTQ$ wurde als Signaturmotiv bezeichnet. Dabei stellen die mit „x“ gekennzeichneten Aminosäuren variable Aminosäuren dar.

Neben der Proliferation von Suspensionszellen, die in niedriger Dichte wachsen, stimuliert PSK- α die Zellproliferation und die Bildung somatischer Embryonen in Zellkulturen von *Daucus carota* (Kobayashi et al., 1999; Hanai et al., 2000) und die *in vitro* Keimung von *Nicotiana tabacum* Pollen in Kulturen geringer Dichte (Chen et al., 2000). Die *in vitro* Pollenkeimung ist abhängig von der Dichte der Pollen (Pasonen und Käpylä, 1998) und der Pollenpopulationseffekt kann durch Zugabe von exogenem PSK- α gefördert werden (Chen et al., 2000). Des Weiteren fördert PSK- α die Bildung von Adventivwurzeln an Hypokotylen von *Cumunis sativus*. Nach Behandlung der Hypokotyle mit 1 μ M PSK- α war die Anzahl der Adventivwurzeln um das 2- bis 2,5-fache erhöht (Yamakawa et al., 1998).

Die Perzeption pflanzlicher Peptide durch Rezeptorkinasen mit leuzinreichen Wiederholungssequenzen

Die vollständige Sequenzierung des Arabidopsis-Genoms zeigte, dass mindestens 610 Gene für putative Rezeptorkinasen kodieren (Torii, 2004). Pflanzen nutzen Rezeptorkinasen, um interne und externe Signale weiterzugeben. Rezeptorkinasen regulieren eine Vielzahl an Entwicklungsprozessen und steuern Pathogenabwehr (Torii, 2004). Die unterschiedliche Struktur ihrer extrazellulären Domänen dient der Einteilung in unterschiedliche Klassen. Mit ungefähr 220 Mitgliedern stellen die Rezeptorkinasen mit leuzinreichen Wiederholungssequenzen (LRR Rezeptorkinasen) die größte Gruppe dar (Shiu und Bleecker, 2001; Yin et al., 2002). LRR Rezeptorkinasen bestehen aus einem Signalpeptid, einer extrazellulären LRR Domäne, einer Transmembrandomäne und einer cytoplasmatischen Proteinkinase-Domäne (Torii, 2004; Abbildung 2). In Arabidopsis variiert die Anzahl der LRRs zwischen 1 und 32. Viele LRRs werden von einer Inseldomäne unterbrochen (Shiu und Bleecker, 2001a). LR-Elemente können durch gepaarte Cysteine, die durch sechs Aminosäuren voneinander getrennt sind, flankiert sein (Torii, 2004). Rezeptorähnliche Proteine, denen die cytoplasmatische Kinasedomäne fehlt, werden Rezeptorproteine mit leuzinreichen Wiederholungssequenzen genannt (LRR Rezeptorproteine). Genetische Studien haben gezeigt, dass LRR Rezeptorproteine oftmals als Korezeptoren für LRR Rezeptorkinasen agieren

(Torii, 2004). Die gepaarten Cysteine können an der Heterodimerisierung zwischen Rezeptorkinase und Rezeptorprotein beteiligt sein (Trotochaud et al., 1999).

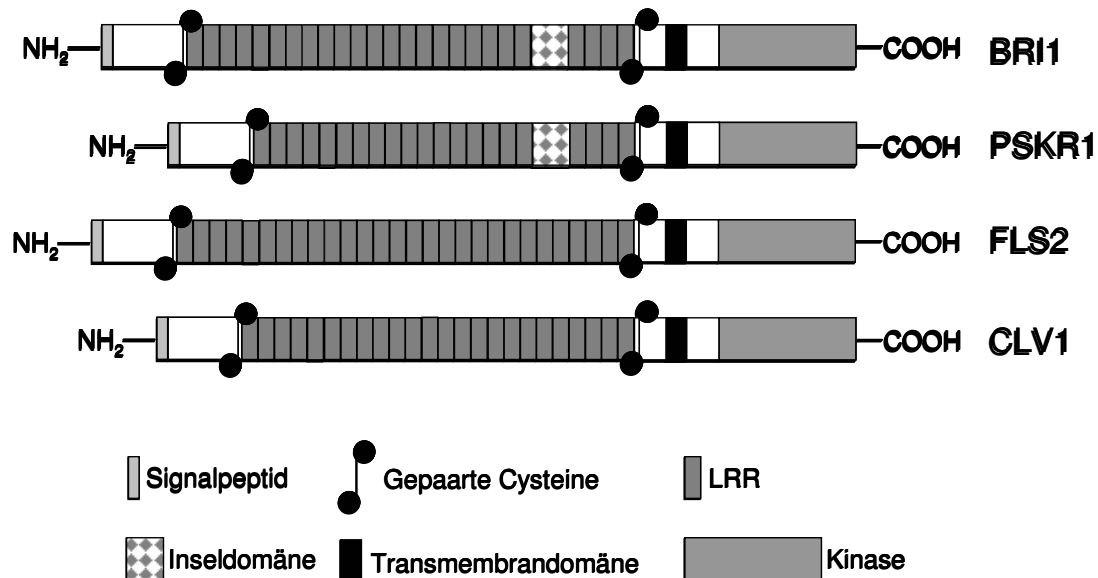


Abbildung 2: Rezeptorkinasen mit leuzinreichen Wiederholungssequenzen (LRR) aus Arabidopsis. Die Rezeptoren für Brassinosteroid (BRI1), PSK- α (PSKR1), Flagellin (FLS2) und CLAVATA (CLV1) sind LRR Rezeptorkinasen. Sie bestehen aus einem N-terminalen Signalpeptid, einem extrazellulären Bereich mit einer unterschiedlichen Anzahl von LRRs, die von gepaarten Cysteinen flankiert sind, einer Transmembrandomäne und einer cytoplasmatischen Kinasedomäne. PSKR1 und BRI1 bestehen aus 21 beziehungsweise 25 LRRs. Diese werden zwischen dem 17. und 18. beziehungsweise 21. und 22. LRR von einer Inseleldomäne unterbrochen. FLS2 und CLV1 haben 28 beziehungsweise 23 zusammenhängende LRRs.

PSK- α wird von LRR Rezeptorkinasen perzipiert. In der mikrosomalen Fraktion von Reiszellen wurden Proteine nachgewiesen, die $[^{35}\text{S}]\text{PSK-}\alpha$ und $[^3\text{H}]\text{-PSK-}\alpha$ binden (Matsubayashi et al., 1997; Matsubayashi und Sakagami, 1999). Matsubayashi und Sakagami (2000) identifizierten in angereicherten Vesikeln von Reis 120 kDa und 160 kDa große Glykoproteine mit einer hohen Affinität für $[^3\text{H}]\text{-PSK-}\alpha$. PSK- α wird in *Daucus carota* spezifisch von einer 120 kDa LRR Rezeptorkinase perzipiert (Matsubayashi et al., 2002). Außerdem wurde ein 150 kDa Bindeprotein nachgewiesen, das PSK- α weniger stark bindet. Beide weisen das gleiche Peptidrückrad auf und unterscheiden sich

wahrscheinlich in ihrer Glykosylierung (Matsubayashi et al., 2002). Überexpression der Rezeptorkinase in *Daucus carota* Zellen führte zu erhöhter Proliferation der Zellen nach Zugabe von PSK- α (Matsubayashi et al., 2002). Außerdem war die Anzahl der Bindungsstellen von Tritium-markiertem PSK- α erhöht. Daraus wurde geschlossen, dass PSK- α und PSKR1 als Liganden-Rezeptor-Paar wirken (Matsubayashi et al., 2002). Für DcPSKR1 wurde nachgewiesen, dass PSK- α an die 36 Aminosäuren lange Inseldomäne bindet (Shinohara et al., 2007). Matsubayashi et al. (2006) identifizierten in Arabidopsis ein PSK Rezeptorgen, das für eine 1008 Aminosäuren lange LRR Rezeptorkinase kodiert. Das PSKR1 Protein bindet spezifisch [3H]-PSK- α und ist homolog zu DcPSKR1 (Abbildung 2). Analysen der Bindungsaktivität von [3H]-PSK- α an PSKR1 in mikrosomalen Fraktionen von Arabidopsis-Zellen, die unter der Kontrolle des gen-eigenen Promotors *PSKR1* überexprimierten, zeigten, dass die Dissoziationskonstante von AtPSKR1 bei $7,7 \pm 0,9$ nM liegt (Matsubayashi et al., 2006). Der K_d -Wert ist mit dem von DcPSKR1 vergleichbar (Matsubayashi et al., 2002). PSKR1 gehört zur Subfamilie X der LRR Rezeptorkinasen, zu der auch BRI1 zählt (Shiu und Bleecker, 2001). Die Sequenzen der Inseldomänen von AtPSKR1 und DcPSKR1 sind hoch konserviert (Matsubayashi et al., 2006). Die phänotypischen Analysen der Insertionsmutante *pskr1-1* aus Arabidopsis zeigten, dass die Proliferation von *pskr1-1* Zellen, die mit 10 nM PSK- α behandelt wurden, im Vergleich zum Wildtyp reduziert war. Die Wurzeln von *pskr1-1* waren im Vergleich zum Wildtyp signifikant kürzer (Matsubayashi et al., 2006). Darüber hinaus setzte die Seneszenz von *pskr1-1* Pflanzen verfrüht bereits nach vier Wochen im Vergleich zu acht Wochen bei Wildtyp Pflanzen ein (Matsubayashi et al., 2006). Neben PSKR1 wurde eine weitere LRR Rezeptorkinase aus Arabidopsis identifiziert, die PSK- α perzipieren kann. AtPSKR2 ist 1036 Aminosäuren lang und hat 48,6% Sequenzidentität zu AtPSKR1 (Amano et al., 2007). [125I]-PSK bindet spezifisch an AtPSKR2, allerdings ist die Stärke der Bindung geringer im Vergleich zu PSKR1, wie über Photoaffinitäts-Markierung gezeigt wurde. Die T-DNA-Insertionslinie *pskr2-1* hat einen weniger starken Phänotyp im Vergleich zu *pskr1-1*. Die Länge der Wurzel ist nur gering reduziert (Amano et al., 2007).

Brassinosteroide werden an der Plasmamembran von der BRI1 (*Brassinosteroid Insensitive 1*) Rezeptorkinase perzipiert. Die extrazelluläre Domäne von BRI1 besteht aus 24 LRRs, die durch eine 70 Aminosäure lange

Inseldomäne zwischen der 21. und 22. Wiederholungssequenz unterbrochen werden (Li und Chory, 1997; Abbildung 2). Die Inseldomäne bindet direkt Brassinosteroid (Kobe und Kajava, 2001). Im nicht aktivierten Zustand liegt BRI1 als Homodimer vor. Die Bindung von Brassinosteroid an BRI1 führt zur Autophosphorylierung der cytoplasmatischen Kinasedomäne und zur Interaktion mit einer weiteren rezeptorähnlichen Kinase, BAK1 (*BRI1-Associated Kinase 1*). Der BRI1/BAK1 Kinasekomplex wird durch Transphosphorylierung aktiviert. Dies führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel BZR Transkriptionsfaktoren im Nukleus (Kim und Wang, 2010). Genetische Studien in Arabidopsis zeigten, dass Brassinosteroide in eine Vielzahl von Wachstums- und Entwicklungsprozessen involviert sind. Brassinosteroide regulieren Zellstreckung, Differenzierung des Leitgewebes, Resistenz gegenüber Pathogenen und Trockenheit und fördern die Seneszenz (Kim und Wang, 2010). Über die Analyse von Mutanten, die in der Synthese oder der Perzeption von Brassinosteroiden gestört sind, wurde eine große Anzahl von Genen identifiziert, die an der Brassinosteroidbiosynthese und der Signaltransduktion beteiligt sind (Kim und Wang, 2010). Diese Mutanten sind zwergwüchsig, haben dunkelgrüne Blätter, eine verzögerte Reproduktion und sind männlich steril. Diese fehlerhaften Entwicklungen sind hauptsächlich auf Defekte in der Zellexpansion zurückzuführen (Szekeres et al., 1996; Nakaya et al., 2002; Nakamura et al., 2006). Brassinosteroide fördern in geringen Konzentrationen unter 1 nM die Streckung der Wurzel. Konzentrationen, die höher als 1 nM sind, hemmen das Wurzelwachstum (Müssig et al., 2003). Darüber hinaus regulieren Brassinosteroide das Wachstum von Hypokotylen im Dunkeln. Die *in planta* Konzentrationen an Brassinosteroiden sind nicht limitierend und exogene Zugabe fördert deshalb das Wachstum der Hypokotyle nicht (Sasse et al., 1992). Mittlerweile wurde gezeigt, dass exogen applizierte Brassinosteroide das Wachstum von Hypokotylen im Licht fördert (Srivastava et al., 2009). Mutanten wie *bri1* und *bak1*, die Defekte in der Brassinosteroidbiosynthese oder -antwort aufweisen, haben verkürzte Hypokotyle und sind insensitiv beziehungsweise haben eine geringere Sensitivität gegenüber Brassinosteroiden (Kauschmann et al., 1996; Clouse et al., 1996; Li et al., 1996; Klahre et al., 1998; Schumacher et al., 1999). *dwf4* (*dwarf4*), das über eine T-DNA Mutagenese identifiziert wurde und einen zwergwüchsigen Phänotyp hat (Feldmann und Marks, 1987;

Azpiroz et al., 1998), besitzt ebenfalls kürzere Hypokotyle (Azpiroz et al., 1998). Die Phänotypen sind auf Defekte in der Zellstreckung zurückzuführen. Das Hypokotyl von Höheren Pflanzen setzt sich aus wenigen Zellschichten zusammen: Epidermis, Kortex, Endodermis und Leitgewebe. Savaldi-Goldstein et al. (2007) zeigten, dass Brassinosteroide über die Epidermis das Wachstum des Hypokotyls regulieren. Wurde BRI1 unter der Kontrolle des epidermisspezifischen Promotors ML1 (*Meristem Layer 1*) im *bri1* Hintergrund exprimiert, war der *bri1* Phänotyp aufgehoben und die Pflanzen entwickelten sich wie der Wildtyp (Savaldi-Goldstein et al., 2007).

Auch in der Antwort auf Pathogenbefall spielen Peptide eine Rolle, die von LRR Rezeptorkinasen perzipiert werden. Der *Drosophila melanogaster* Toll Rezeptor hat extrazelluläre Domänen, die denen pflanzlicher LRR Rezeptorkinasen ähneln (Diévert und Clark, 2004). Die Untersuchungen von Mutanten, die insensitive auf Flagellin reagierten, einem Peptid, das von Bakterien abgegeben wird, führten zur Entdeckung des FLS2 Rezeptors aus *Arabidopsis* (Gómez-Gómez et al., 1999; Gómez-Gómez und Boller, 2000; Abbildung 2). Sequenzanalysen zeigten, dass es sich hierbei um eine LRR Rezeptorkinase handelte (Gómez-Gómez und Boller, 2000). Die direkte Interaktion von Flagellin mit FLS2 wurde von Chinchilla et al. (2006) gezeigt. Mutationen sowohl in der LRR- als auch in der Kinasedomäne führten dazu, dass Flagellin nicht mehr perzipiert wurde (Gómez-Gómez et al., 2001). Die Kinase-assoziierte Proteinphosphatase KAPP ist ein negativer Regulator des FLS2 Signalweges (Gómez-Gómez et al., 1999). Darüber hinaus bindet der EFR Rezeptor (*Elongation Factor Tu Receptor*) den Elongationsfaktor EF-Tu (Zipfel et al., 2006). Nach Bindung von Flagellin an FLS2 und von EF-Tu an EFR wird eine Immunantwort ausgelöst, die zur Resistenz der Pflanzen gegen bakterielle Pathogene führt (Chinchilla et al., 2007). Auch BAK1 spielt eine Rolle in der Immunantwort, die durch Flagellin ausgelöst wird (Chinchilla et al., 2007; Heese et al., 2007). BAK1 wirkt als ein positiver Regulator des FLS2 Signalweges (Chinchilla et al., 2007; Heese et al., 2007). *bak1* Pflanzen weisen zwar eine normale Bindung von Flagellin auf, es wird allerdings keine frühe Immunantwort ausgelöst und sie zeigen eine reduzierte frühe, durch EF-Tu ausgelöste, Immunantwort (Chinchilla et al., 2007).

Peptide sind auf vielfältige Art und Weise in die Regulation des Wachstums und die Entwicklung von Pflanzen involviert. Physiologische und

molekulargenetische Ansätze helfen, um Wirkungen und die Regulationsmechanismen verstehen zu können. Die Analyse von *Knockout* Mutanten und die Suche nach bekannten Phänotypen können dabei Rückschlüsse auf mögliche Funktionen geben.

ZIELSETZUNG

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion des disulfatierten Pentapeptids PSK- α in *Arabidopsis thaliana* physiologisch und molekulargenetisch untersucht werden. Ein Ziel war es, über Expressionsanalysen von Präproprotein-Genen und PSK Rezeptorgenen zu klären, in welchen Geweben PSK- α synthetisiert und perzipiert werden kann. Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, die Regulation von Wurzel- und Hypokotylwachstum durch PSK- α zu analysieren. Phänotypische Analysen zeigten darüber hinaus, dass PSK Signalperzeption bei der Reproduktion eine Rolle spielt, da *pskr1* Pflanzen eine verringerte Fertilität aufwiesen. In dieser Arbeit sollten mögliche Ursachen untersucht werden. Schließlich sollte versucht werden, mögliche Signalkomponenten des PSK-Signalweges zu identifizieren. Koexprimierte Kandidatengene sollten an Hand von *Knockout* Linien auf eine mögliche Funktion bei der Regulation von Hypokotyl- und Wurzelwachstum durch PSK- α untersucht werden.

KAPITEL 1

In *Arabidopsis thaliana* fördert PSK- α das Wurzelwachstum über die LRR Rezeptorkinasen PSKR1 und PSKR2

Es wurde untersucht, ob das Wurzelwachstum von *Arabidopsis thaliana* über den PSK-Signalweg reguliert wird. Über Expressionsanalysen wurde gezeigt, dass PSK Präproprotein-Gene und *PSKR1* in der Wurzel differentiell exprimiert werden. Dies deutete darauf hin, dass PSK- α in diesen Geweben wahrscheinlich synthetisiert werden kann. In *Arabidopsis* Keimlingen wurde das Wurzelwachstum durch PSK- α dosisabhängig gefördert. Die optimale Konzentration lag bei 1 μ M PSK- α und führte zu einer um etwa 20% verlängerten Wurzel. Das Sprosswachstum hingegen wurde durch PSK- α nicht beeinflusst. Kinematische Analysen zeigten, dass das erhöhte Wurzelwachstum hauptsächlich auf längere Zellen zurückzuführen war. Neben der Hauptwurzel förderte PSK- α auch das Wachstum der Lateralwurzeln. Um zu untersuchen, über welchen PSK Rezeptor das Wurzelwachstum kontrolliert wird, wurden homozygote T-DNA-Insertionsmutanten für die PSK Rezeptorgene *PSKR1*, *pskr1-3*, und *PSKR2*, *pskr2-1*, sowie die Doppelmutante *pskr1-3/pskr2-1* analysiert. *pskr1-3* Keimlinge hatten um etwa ein Drittel kürzere Wurzeln als der Wildtyp. Über kinematische Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass dies hauptsächlich auf kürzere Zellen zurückging. PSK- α förderte das Wurzelwachstum in *pskr1-3* Keimlingen, allerdings geringer als im Wildtyp. *pskr2-1* Keimlinge hatten um 15% kleinere Wurzeln als der Wildtyp und PSK- α förderte das Wurzelwachstum um 9% im Vergleich zu 20% im Wildtyp. In der Doppelmutante förderte PSK- α das Wurzelwachstum nicht. Daraus kann gefolgert werden, dass Wurzelwachstum über beide PSK Rezeptoren reguliert wird.

Von den in diesem Kapitel vorgestellten Arbeiten wurden von mir die Versuche zur Bestimmung der Meristemgröße an $P_{CycB1;1}$:Gus Keimlingen und die Analysen der Wurzellängen an den *pskr1-3*, *pskr2-1* und *pskr1-3/pskr2-1* Linien durchgeführt.



PSK- α promotes root growth in Arabidopsis

Anke Kutschmar¹, Guillaume Rzewuski¹, Nils Stührwohldt¹, Gerrit T. S. Beemster^{2,3,4}, Dirk Inzé^{2,3} and Margret Sauter¹

¹Botanisches Institut, Universität Kiel, Am Botanischen Garten 1-9, 24118 Kiel, Germany; ²Department of Plant Systems Biology, Flanders Institute of Biotechnology, B-9052 Gent, Belgium; ³Department of Molecular Genetics, Gent University, B-9052 Gent, Belgium; ⁴Department of Biology, University of Antwerp, Antwerp, Belgium

Summary

Author for correspondence:

Margret Sauter

Tel: +49 431 880 4210

Fax: +49 431 880 4222

Email: msauter@bot.uni-kiel.de

Received: 12 August 2008

Accepted: 24 October 2008

New Phytologist (2009) **181**: 820–831

doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02710.x

Key words: Arabidopsis, cell elongation, PSK-alpha, PSK receptor, root growth.

- Phytosulfokine- α (PSK- α) is a disulfated pentapeptide described to act as a growth factor in suspension cells. In this study, the involvement of PSK signaling through the PSK receptor gene *AtPSKR1* in Arabidopsis root growth was assessed.
- Expression studies of PSK precursor genes and of *AtPSKR1* were performed in roots with RT-PCR and P:GUS analyses. Root elongation, lateral root formation, cell production and root cell elongation were analyzed in wild-type (wt) and in the receptor knockout mutant *Atpskr1-T* treated with or without synthetic PSK- α .
- Phytosulfokine and *AtPSKR1* genes are differentially expressed in roots. PSK- α induced root growth in a dose-dependent manner without affecting lateral root density. Kinematic analysis established that enhancement of root growth by PSK- α was mainly caused by an increase in cell size. In *Atpskr1-T*, the primary roots were shorter as a result of reduced mature cell size and a smaller root apical meristem composed of fewer cells than in wt.
- The results indicate that PSK- α signaling through *AtPSKR1* affects root elongation primarily via control of mature cell size. Root organogenesis, on the other hand, is not controlled by PSK- α .

Introduction

The rate at which plant roots grow is an adaptive trait. This is obvious in natural ecotypes which are adapted to different environmental conditions. Up to fourfold differences in primary root growth rates were observed when 18 ecotypes of *Arabidopsis thaliana* were compared (Beemster *et al.*, 2002). Direction and rate of root growth are also influenced by external factors, such as gravity, water and nutrients. The rate at which roots grow is determined by two parameters: cell production rate and mature cell length. The cell production rate in the meristem in turn depends on the number of meristematic cells and the average duration of a cell cycle. An increase in cell division rate can thus directly promote root growth. Accelerated root elongation rates during Arabidopsis development were shown to be almost exclusively the result of increased cell production in the meristem, with little change in cell expansion rates (Beemster & Baskin, 1998). In roots, cell division occurs in the apical meristem but also in pericycle cells that initiate formation of lateral roots, and in lateral root primordia. Cell growth, on the other hand, also occurs in

meristems and in the elongation zone proximal to the meristem (Beemster & Baskin, 1998).

Phytosulfokine- α (PSK- α) is an autocrine growth factor found in cell cultures from dicot and monocot plants where it promotes proliferation of cells kept at low density (Yang *et al.*, 2000). PSK- α is perceived by leucine-rich repeat (LRR) receptor kinases conserved in carrot (Matsubayashi *et al.*, 2002) and Arabidopsis (Matsubayashi *et al.*, 2006). In Arabidopsis, two PSK- α receptors were identified based on the homology towards the receptor from carrot. They were named *AtPSKR1* (encoded by At2g02220) and *AtPSKR2* (encoded by At5g53890). [³H]PSK- α binding activity was enhanced in microsomal fractions of Arabidopsis cells overexpressing *AtPSKR1* (Matsubayashi *et al.*, 2006) and a genetic approach confirmed the redundant role of *AtPSKR2* in PSK- α signaling (Amano *et al.*, 2007). Genes encoding PSK precursors appear to be ubiquitously expressed in higher plant organs (Yang *et al.*, 2001; Lorbiecke & Sauter, 2002; Matsubayashi *et al.*, 2006). However, detailed analysis in reproductive tissues of *Zea mays* L. revealed cell type-specific and gene-specific expression patterns for several members of the maize PSK precursor gene

family (Lorbiecke *et al.*, 2005). Some of the sites of PSK precursor gene expression identified *in planta* coincided with functions of PSK- α predicted from cell culture experiments. For instance, germination of pollen from *Nicotiana tabacum* L. kept at low density was promoted by PSK- α *in vitro* in a concentration-dependent manner (Chen *et al.*, 2000). It was coincidentally found in maize (Lorbiecke *et al.*, 2005) and Arabidopsis (A. Kutschmar & M. Sauter, unpublished) that pollen contains high amounts of PSK- α precursor mRNA. Since PSK- α was shown to act as a growth factor in tissue-cultured cells, the question arose as to whether it may play a growth regulatory role *in planta* as well. Matsubayashi *et al.* (2006) provided evidence that root elongation was enhanced in *AtPSK4* overexpressing Arabidopsis seedlings. Insertional knockout of the receptor gene *AtPSKR1*, on the other hand, led to reduced root elongation. In this study, the putative sites of PSK- α activity in roots were analyzed in detail by the use of promoter:Gus lines of the five PSK genes present in the Arabidopsis genome and of the *AtPSKR1* receptor gene. To specify the effect of PSK- α on root growth, a detailed analysis of main and lateral root elongation and of lateral root initiation was performed. Finally, cell elongation was compared in wt and *Atpskr1* mutant treated with or without PSK- α . Our findings indicate that PSK- α signaling through *AtPSKR1* regulates root growth mainly by controlling cell size.

Materials and Methods

Plant growth

Experiments were performed with *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Columbia (Col-0). Unless stated otherwise, plants were grown in a 1 : 1 sand : humus mixture that was frozen at -80°C for 2 d to avoid insect contamination and watered regularly with tap water. Before germination, seeds were stratified at 4°C in the dark for 2 d and then transferred to a growth chamber under long-day conditions.

For growth experiments on sterile plates, Arabidopsis seeds were surface-sterilized for 10 min in 1 ml 0.1% (w/v) sodium hypochlorite, washed five times with autoclaved water and laid out under sterile conditions on square plates containing half-concentrated modified Murashige and Skoog-medium (Murashige & Skoog, 1962) supplemented with 1.5% sucrose and PSK- α , dsPSK- α , or a mixture of amino acids present in dsPSK at the concentrations indicated (1 μM of amino acid mixture contained 2 μM Tyr, 1 μM Ile, 1 μM Thr, and 1 μM Gln). The media were solidified with 0.8% agarose. Plants were grown under long-day conditions.

Atpskr1-T mutant analysis

The mutant line SALK_008585 of *A. thaliana* ecotype Columbia-0 was obtained from the NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, University of Nottingham,

Nottingham, UK). It carries a T-DNA insertion in the *AtPSKR1* gene At2g02220 and was therefore termed *Atpskr1-T* to distinguish it from the *Atpskr1-1* knockout mutant previously described in the ecotype *Landsberg erecta* (Matsubayashi *et al.*, 2006). Insertion of the T-DNA in At2g02220 was confirmed by PCR. Effective knockout of gene expression from At2g02220 in *Atpskr1-T* was tested through reverse transcription of mRNA using oligo-dT primers and subsequent PCR amplification using the *AtPSKR1*-specific forward primer 5'-GAGCGTTGCAATACAATCAG-3' and reverse primer 5'-CAGTACTTACATGCGTCTCGT-3'.

Growth measurements

Lengths of main and lateral roots were measured using a binocular (Olympus, Hamburg, Germany) and analyzed with Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). For *P_{CycB1::GUS}* plants, the number of lateral roots, Gus-expressing lateral root primordia and division active pericycle cells was determined and lateral root density was calculated per millimeter main root. Shoot and root fresh weights were measured with a precision balance (Sartorius, Göttingen, Germany).

Cell size measurements

Using the method described by Beemster *et al.* (2002), we established cell length profiles in the root tip of 5-d-old wt and *Atpskr1-T* seedlings. However, instead of using differential interference contrast microscopy, we used fluorescence microscopy to visualize cell outlines stained with FM4-64 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), a dye that specifically inserts into the plasma membrane. In our hands, FM4-64 proved to be more reliable than propidium iodide, which failed to stain cell walls in the apical root meristem in a reproducible manner. Pictures were taken with a TCS SP confocal laser scanning microscope (Leica, Bernsheim, Germany). Using the software LCS Lite (Leica), cell size was measured in cortical cell files that could be continuously followed from the QC up to a distance of at least 600 μm from the QC. In order to be able to average cell size as a function of its distance from the QC, each cell length profile was smoothed and interpolated by means of a kernel smoothing algorithm essentially as described by Beemster & Baskin (1998) but using the loqpoly function in the statistical package R (www.r-project.org).

Cloning of promoter:GUS vectors, transformation, and histochemical Gus detection

For expression analysis of PSK genes and of the PSK receptor gene *AtPSKR1* by promoter:Gus analysis, genomic fragments were amplified upstream of the start codon by PCR as follows. For *AtPSK1* (At1g13590), the forward primer 5'-CACCC-TATACTCCACCTCCCAAATTGA-3' and the reverse primer

5'-CAACACTTCACTTTTCGTCTTCA-3' amplified a fragment of 1121 bp. For *AtPSK2* (At2g22860), a 1229 bp genomic fragment was amplified with the forward primer 5'-CACCGACTGAGTTACGATTGAATCAC-3' and the reverse primer 5'-GACGGTTTTGGCTTCTTTGT-3'. For *AtPSK3* (At3g44735), a 1102 bp genomic fragment was amplified with the forward primer 5'-CACCTATAGC-ATTAAGGGACAGAAGTGG-3' and the reverse primer 5'-GTGAGAAGTTTGTGATAGACAGATAC-3'. For *AtPSK4* (At3g49780), a 1116 bp genomic fragment was amplified with the forward primer 5'-CACCGTGTAAAGAAGACTT-TACTAACCT-3' and the reverse primer 5'-AGCAGATGA-AGCCAGTTAGG-3'. For *AtPSK5* (At5g65870), a 1198 bp genomic fragment was amplified with the forward primer 5'-CACCTATGATATCACAGGTCTTTC-3' and the reverse primer 5'-GAAGAGGAAGTTATGAAATAGAGG-3', and for *AtPSKR1* (At2g02220) a 1363 bp genomic fragment was amplified with the forward primer 5'-CACCTCGTCTA-CAACTCACATACGTTACTACT-3' and the reverse primer 5'-CGATGAACACGCATTTCAAGAACAGAG-3'. The fragments were cloned into the vector pBGWFS7 (VIB, Gent, Belgium) in front of the β -glucuronidase coding sequence using the Gateway system (Invitrogen). Arabidopsis plants were transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. Selection of transformed plants was performed by spraying with 200 μ M BASTA (AgroEvo, Berlin, Germany). For each construct, several Gus-expressing lines were analyzed. Gus assays were performed as described (Vielle-Calzada *et al.*, 2000). Stained plant material was cleared in chloral hydrate (Yadegari *et al.* 1994) and observed under bright-field illumination using Leica DM LS (Leica) or Olympus BX41 (Olympus, Hamburg, Germany) microscopes. To obtain tissue sections, 14-d-old cleared plants were washed and dehydrated using an ethanol series at 30, 50, 70, 90 and 100% for 60 min each. Plants were embedded in Technovit 7100 according to the manufacturer's instructions (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany). Sections 10 μ m thick were cut with a Leica RM 2255 microtome and analyzed using a Leica DM LS microscope (Leica, Bensheim, Germany).

Reverse transcription-polymerase chain reaction

Total RNA was isolated from shoots and roots of 8-d-old seedlings and 14-d-old plants with Tri-Reagent following manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). A 5 μ g quantity of DNase-treated RNA (MBI Fermentas, Leon-Roth, Germany) was reverse-transcribed with oligo-dT primers (Invitrogen) and used for PCR amplification. *AtActinII* was amplified with gene-specific primers and used as a control. For PCR amplification of *AtPSK1*, *AtPSK2*, *AtPSK3*, *AtPSK4* and *AtPSK5* genes, cDNA from 0.5 μ g RNA was used; for amplification of *AtPSKR1* cDNA from 1 μ g RNA was used; and for amplification of *AtActinII*, cDNA from 0.05 μ g RNA was used. To be able to distinguish

between fragments derived from cDNA or genomic DNA, gene-specific oligonucleotides were positioned to include an intron, except for the intronless *AtPSKR1*. Genomic DNA was isolated and PSK precursor genes and *AtPSKR1* were amplified as an additional control. For *AtPSK1* (At1g13590), the forward primer 5'-ATG GCT TCA AGT GTT ATT TTA AGA G-3' and the reverse primer 5'-ATC TTG TGT ATA GAT GTA ATC GGT G-3' amplified a cDNA fragment of 203 bp and a genomic DNA fragment of 574 bp. For *AtPSK2* (At2g22860), the forward primer 5'-CAC CAT GGC AAA CGT CTC CGC-3' and the reverse primer 5'-TCA AGG ATG CTT CTT CTT CTG GGT-3' amplified a cDNA fragment of 262 bp and a genomic DNA fragment of 409 bp. For *AtPSK3* (At3g44735), the forward primer 5'-ATG AAG CAA ACC TTG TGC C-3' and the reverse primer 5'-TCAATG CTT ATG GTG CTG TG-3' amplified a cDNA fragment of 245 bp and a genomic DNA fragment of 728 bp. For *AtPSK4* (At3g49780), the forward primer 5'-CAC CAT GGC TCT TCT TTG CTC T-3' and the reverse primer 5'-TTA GGG CTT GTG ATT CTG AGT-3' amplified a cDNA fragment of 238 bp and a genomic DNA fragment of 502 bp. For *AtPSK5* (At5g65870), the forward primer 5'-ATG GTT AAG TTC ACA ACT TTC CTC-3' and the reverse primer 5'-TTA GGG ATT GTG GTT TTG AGT GTA-3' amplified a cDNA fragment of 231 bp and a genomic DNA fragment of 462 bp. For the intronless *AtPSKR1* (At2g02220), the forward primer 5'-GAG CGT TGC AAT ACA ATC AG-3' and the reverse primer 5'-CAG TAC TTA CAT GCG TCT CGT-3' amplified a fragment of 1142 bp. For *AtActinII*, the forward primer 5'-CAA AGA CCA GCT CTT CCA TCG-3' and the reverse primer 5'-CTG TGA ACG ATT CCT GGA CCT-3' amplified a cDNA fragment of 427 bp and a genomic DNA fragment of 513 bp. PCR was performed for 30 cycles. PCR fragments were separated on a 1% (w/v) agarose gel and stained with ethidium bromide.

Results

PSK gene expression in roots

In order to identify putative sites of PSK activity and to link PSK- α synthesis to its growth-promoting effect on roots, we performed expression studies of the five PSK genes that are expressed in Arabidopsis. All PSK precursor genes encode the same conserved pentapeptide backbone YIYTQ characteristic of PSK- α (Lorbiecke & Sauter, 2002). Semiquantitative RT-PCR analysis showed expression of all five genes in roots and in shoots (Fig. 1). However, *AtPSK1* and, to a minor degree, *AtPSK5* were expressed at higher levels in roots as compared with shoots. Transcript abundance of *AtPSK3* increased with age in shoots. To obtain a more detailed picture of PSK gene expression, promoter:GUS studies were performed (Fig. 2).

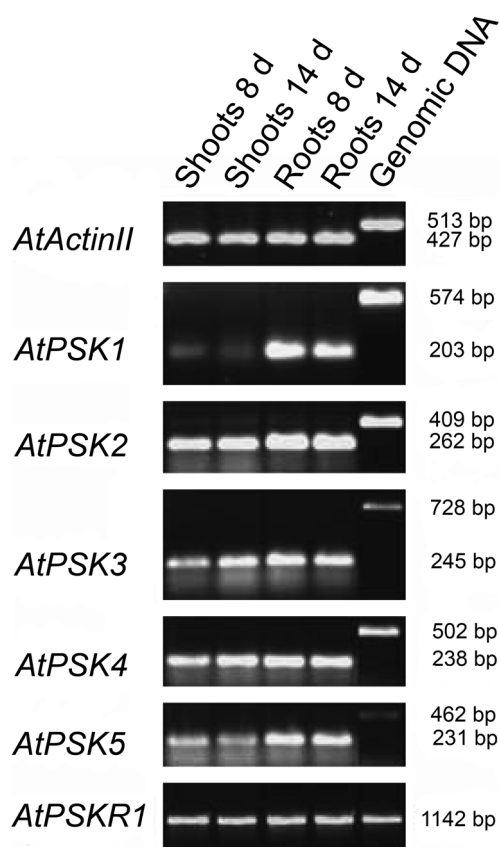


Fig. 1 Phytosulfokine (PSK) and PSK receptor genes are expressed in shoots and roots of Arabidopsis. Semiquantitative RT-PCR analyses were performed to study expression of *AtPSK1*, *AtPSK2*, *AtPSK3*, *AtPSK4*, *AtPSK5* and of *AtPSKR1* in shoots and roots of 8- and 14-d-old Arabidopsis plants. RT-PCR analysis of *AtActin11* was included as a control for RNA input, and PCR amplification of genomic DNA was performed as a control for genomic contamination.

Analysis of $P_{AtPSK1}::GUS$ plants indicated expression in lateral root primordia (Fig. 2B) and in growing lateral roots, including the growing region at the apex where Gus staining appeared in a somewhat patchy pattern (Fig. 2A,D). Cross-sections through lateral roots indicated that $P_{AtPSK1}::Gus$ was expressed in all cell layers with stronger expression in the epidermis (Fig. 2E). Promoters of *AtPSK2*, *AtPSK3*, *AtPSK4*, and *AtPSK5* were active in the central cylinder of main and lateral roots (Fig. 2). Cross-sections revealed that *AtPSK2* and *AtPSK3* expression was confined to the central cylinder excluding the endodermis (Fig. 2J,O). Gus activity driven by the promoters of *AtPSK4* and *AtPSK5* was detected in the central cylinder and in the endodermal cell layer (Fig. 2T,Y). Gus staining resulting from the activities of the *AtPSK2*, *AtPSK3* and *AtPSK4* promoters was detected at sites where lateral roots were connected to the central cylinder of the parent root, whereas lateral root primordia or young lateral roots were only weakly stained or not stained (Fig. 2G,L,R). With respect to the root tip, two types of expression patterns

were obvious. *AtPSK1* and *AtPSK3* showed promoter activity in the root tip (Fig. 2C,D,M,N) whereas the promoters of *AtPSK2*, *AtPSK4*, and *AtPSK5* were not active in the very root tips (Fig. 2H,I,R,S,W,X).

Taken together, all PSK genes are expressed in roots with differential and partly overlapping expression patterns. Promoters of *AtPSK2*, *AtPSK4* and *AtPSK5* displayed strongly overlapping activities in the central cylinder of the differentiated part of main and lateral roots and no activities in growing root tips. *AtPSK1* and *AtPSK3* were both expressed in root tips but displayed otherwise different cell-specific expression patterns. Promoters of *AtPSK2*, *AtPSK3* and *AtPSK4* were particularly active in the central cylinder of parent roots at sites where new lateral roots are formed.

Expression of the PSK- α receptor gene *AtPSKR1* in roots

The PSK- α receptor *AtPSKR1*, encoded by *At2g02220*, was identified in the Arabidopsis genome by sequence homology to the PSK receptor from carrot (Matsubayashi *et al.*, 2002). The function of *AtPSKR1* as a PSK- α receptor was confirmed by Matsubayashi *et al.* (2006). In order to compare sites of PSK- α synthesis with sites of PSK- α perception, and in order to specify the cells and tissues that can perceive, and thus respond to, PSK- α , we analyzed expression of the PSK- α receptor gene *AtPSKR1* in Arabidopsis seedlings. Semiquantitative RT-PCR studies indicated that *AtPSKR1* was expressed in shoots and roots at seemingly low levels (Fig. 1). *AtPSKR1* promoter-driven GUS activity was observed in the primary and lateral roots, including root primordia, but not in the hypocotyl (Fig. 2a,b). In the primary root and in lateral roots, activity was particularly high in the very root tip, possibly representing the root cap, but was present at lower levels throughout the growing and mature regions (Fig. 2c,d). Cross-sections revealed that the receptor gene was expressed in all cell layers of the root. Based on publicly available microarray data (Genevestigator at <https://www.genevestigator.ethz.ch>; Zimmermann *et al.*, 2004), the second PSK- α receptor *AtPSKR2* is expressed in the root tip. Together with the promoter:GUS data shown here, this indicates that PSK- α can potentially be perceived by all cells in the root tip.

PSK- α promotes root but not shoot growth of Arabidopsis plants

An *AtPSKR1* T-DNA insertion mutant was identified in the *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia and obtained from NASC. It was named *Atpskr1-T* to distinguish it from the Ds insertion mutant *pskr1-1* described previously in the ecotype Landsberg erecta (Matsubayashi *et al.*, 2006). The T-DNA was inserted 2337 bp downstream of the start codon of the intronless *AtPSKR1* gene (Fig. 3a) and led to loss of detectable *AtPSKR1* mRNA (Fig. 3b).

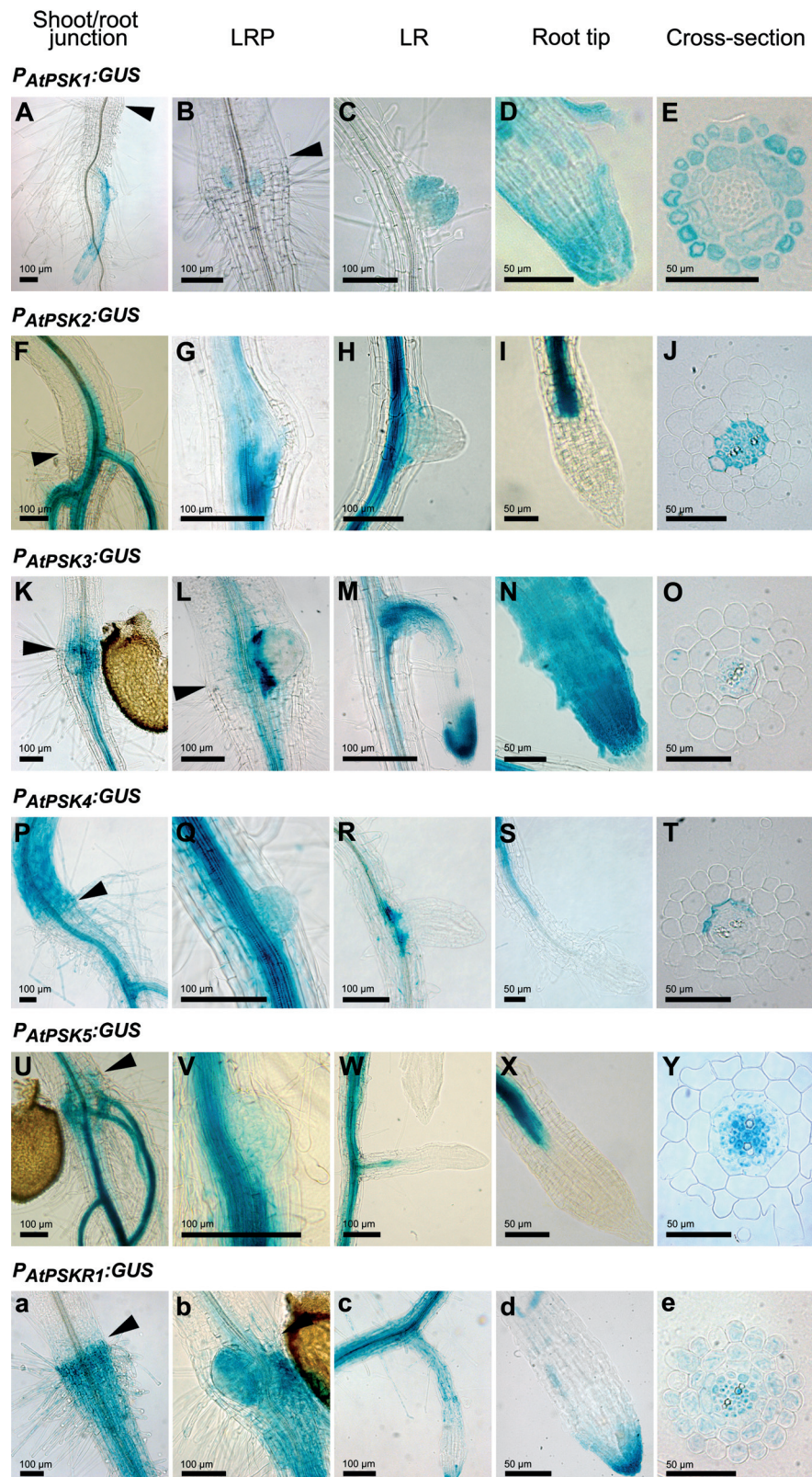


Fig. 2 Promoter:GUS analysis of phytoosulfokine (PSK) genes and of the PSK receptor gene *AtPSKR1* in *Arabidopsis thaliana*. β -Glucuronidase activity in promoter:Gus lines of *AtPSK1*, *AtPSK2*, *AtPSK3*, *AtPSK4*, *AtPSK5* and *AtPSKR1* was analyzed in roots at the shoot-to-root junction (A, F, K, P, U, a), in lateral root primordia (B, G, L, Q, V, b), lateral roots (C, H, M, R, W, c), root tips (D, I, N, S, X, d), and in root cross-sections (E, J, O, T, Y, e) of 14-d-old seedlings.

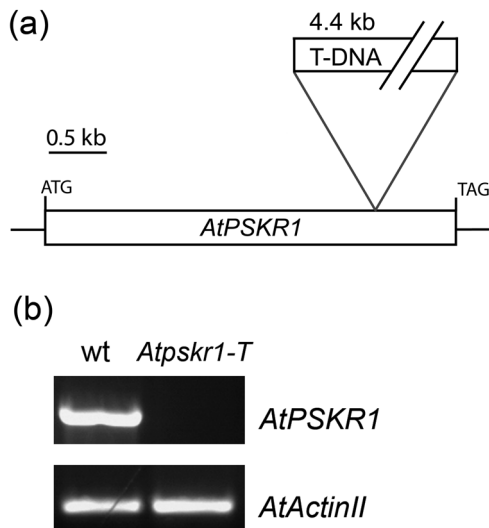


Fig. 3 The phytosulfokine (PSK) receptor T-DNA insertion mutant *Atpskr1-T* does not express *AtPSKR1*. (a) The mutant *Atpskr1-T* of *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0 has a T-DNA insertion 2337 bp downstream of the start codon of the *AtPSKR1* gene *At2g02220* which disrupts the intronless open reading frame. (b) RT-PCR analysis of *AtPSKR1* expression in *Arabidopsis* wt and *Atpskr1-T* mutant showed that *AtPSKR1* gene expression is knocked out in *Atpskr1-T*. mRNA of *AtActin11* was reverse-transcribed and amplified as a control. wt, wild-type.

Wild-type *Arabidopsis* plants were grown for 14 d in the presence of PSK- α at concentrations between 0.1 nM and 10 μ M, or without PSK- α . Shoot fresh weight was not affected by PSK- α treatment at any concentration in either wt or *Atpskr1-T* (Fig. 4a). In roots, a significant increase in fresh weight was observed at 10 nM and higher concentrations of PSK- α in the media (Fig. 4b). *Atpskr1-T* plants grown on MS medium for 14 d were smaller than wt, indicating that disrupted *AtPSKR1* signaling was limiting plant growth (Fig. 5a). Shoot fresh weight was reduced by *c.* 20% in *Atpskr1-T* plants compared with wt (Fig. 5b), while root mass was *c.* 40% lower (Fig. 5c). It is conceivable that shoot growth was delayed as a result of reduced root mass. When grown on PSK- α concentration between 100 nM and 10 μ M, plants displayed an approx. 20% elevated root fresh weight over control plants. Interestingly, root fresh weight was increased in the presence of PSK- α not only in wt but also in the *Atpskr1-T* mutant, which is compatible with the existence of a second receptor for PSK- α . In *Atpskr1-T*, some root growth was induced by the unsulfated PSK pentapeptide. In wt, treatment with the unsulfated control peptide also appeared to induce minor root growth, albeit the effect was not statistically significant (Fig. 5c). Treatment with a mixture of the amino acids composing PSK did not promote root growth. In summary, PSK- α induced root growth, and roots of *Atpskr1-T* produced *c.* 40% less root mass compared with wt, supporting the idea that PSK signaling influences root growth.

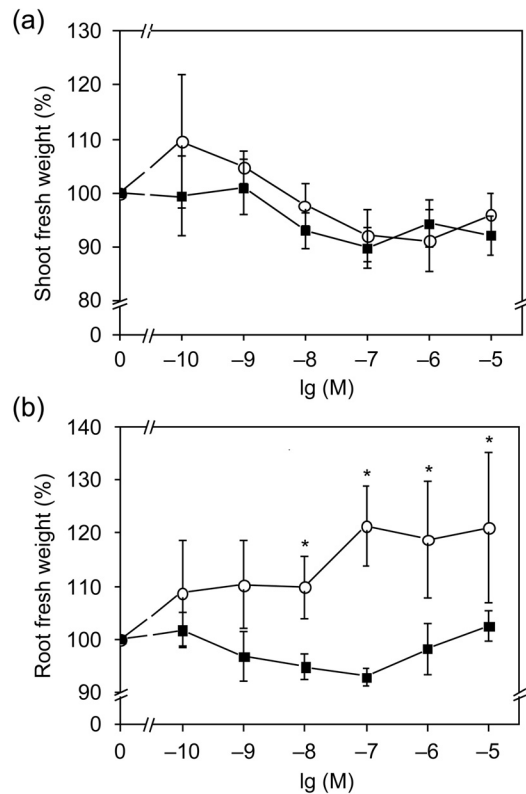


Fig. 4 Root and shoot fresh weights of phytosulfokine (PSK)-treated *Arabidopsis* plants. *Arabidopsis* plants were grown for 14 d on plates containing PSK- α (circles) or desulfated PSK (dsPSK; squares) at the concentrations indicated. Shoot (a) and root (b) fresh weights were determined and averages (\pm SE) were calculated as a percentage of control. Fresh weights were determined in three independent experiments with a total of 10–15 plants per treatment. Values that are significantly different from the control ($P < 0.05$) are marked with an asterisk.

PSK- α affects root length

Increased root fresh weight in the presence of PSK- α may result from increased lateral root formation or from longer roots, or from both. In order to distinguish between these possibilities, we analyzed both the number of lateral roots and root length in 7-d-old wt and *Atpskr1-T* mutant seedlings.

Growth of wt seedlings for 7 d on 1 μ M PSK- α resulted in an approx. 20% longer primary root (Fig. 6a,b). Primary roots of *Atpskr1-T* seedlings, on the other hand, were only approximately two-thirds the length of roots from wt seedlings (Fig. 6a,b). In the presence of 1 μ M PSK- α , the main root of receptor mutant seedlings elongated more than in untreated seedlings but did not reach the length of the main root of wt. These observations indicated that main root length was controlled by PSK- α acting, at least in part, through *AtPSKR1*. In *Arabidopsis*, two genes encoding PSK receptors were described (Amano *et al.*, 2007). Analysis of a T-DNA insertion mutant of the second receptor gene, *AtPSKR2* (Supporting information, Fig. S1a,b), showed that knockout of this

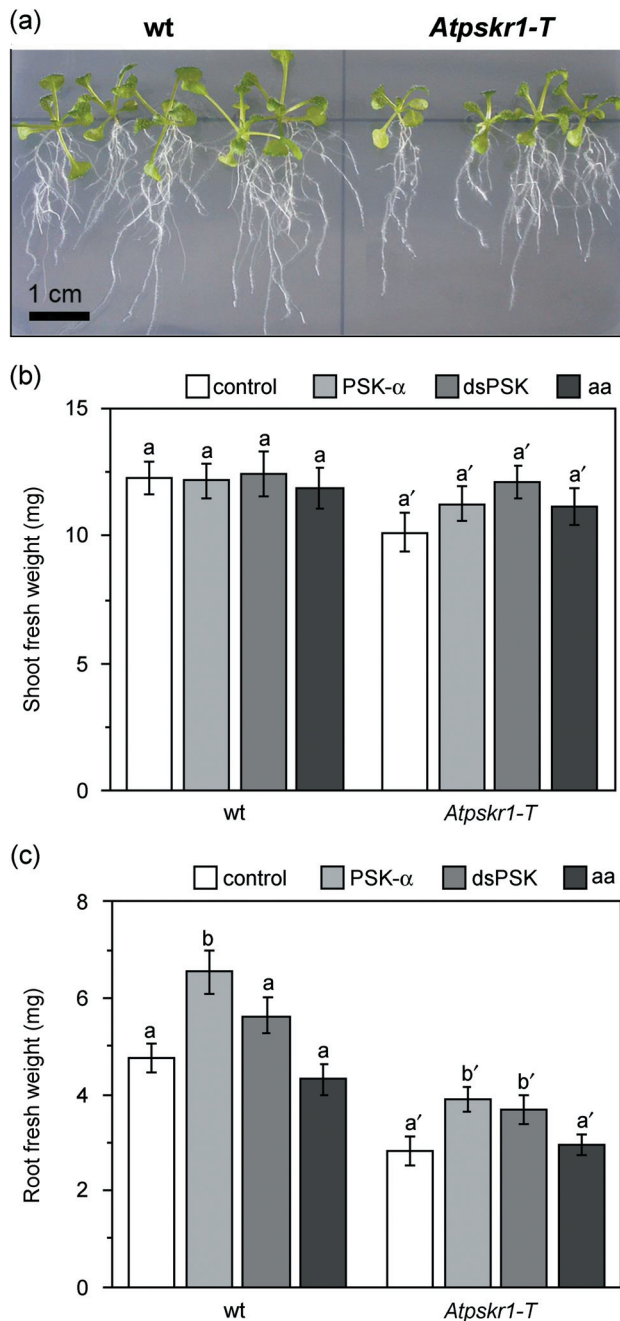


Fig. 5 Root growth is reduced in *Atpskr1-T*. (a) Arabidopsis wild-type (wt) and *Atpskr1-T* plants were grown for 14 d on plates. Average shoot (b) and root (c) fresh weights per plant were determined in wt and *Atpskr1-T* mutant plants grown on 1 μ M PSK- α , 1 μ M desulfated PSK (dsPSK), 1 μ M of each amino acid (aa) present in dsPSK or without effector (control), and shoot and root fresh weights were determined for each plant. Numbers are averages (\pm SE) from three independent experiments with a total of 12–20 plants per treatment. Different letters indicate statistically significant differences between treatments in one genotype ($P < 0.05$). Root fresh weights of wt and *Atpskr1-T* shown in (c) are statistically different with $P < 0.001$.

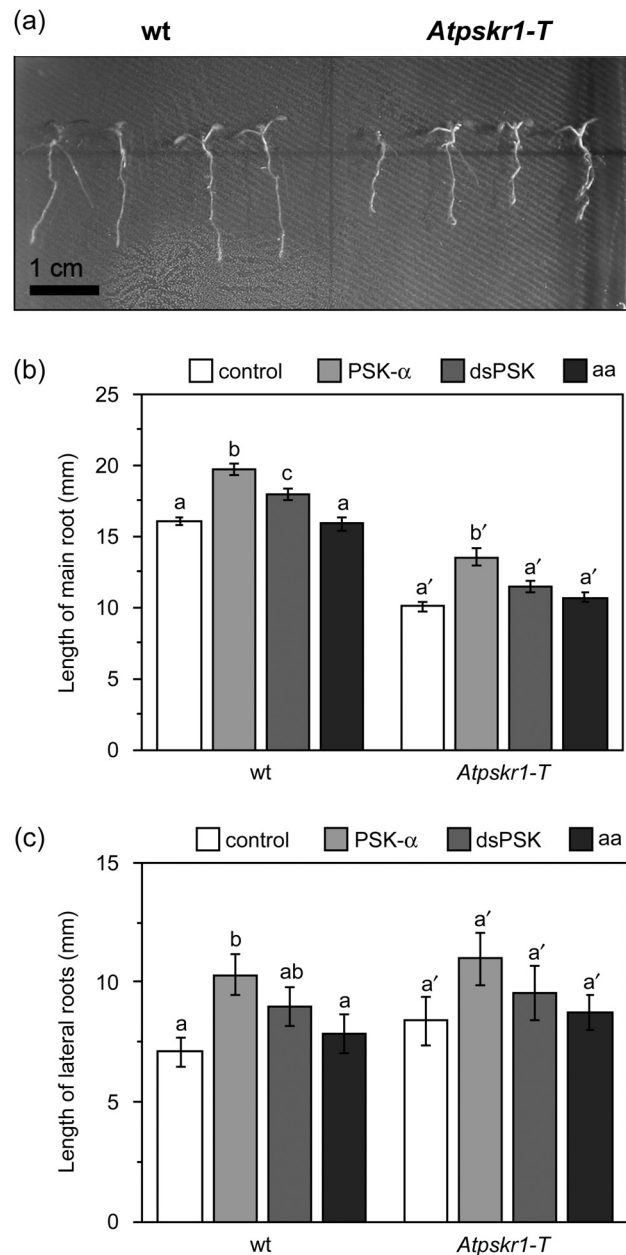


Fig. 6 Phytosulfokine- α (PSK- α) promotes root growth. (a) Arabidopsis wild-type (wt) and *Atpskr1-T* (*pskr1-T*) seedlings were grown for 7 d on plates without effector. (b) Arabidopsis wt and *Atpskr1-T* (*pskr1-T*) seedlings were grown for 7 d on plates containing 1 μ M PSK- α , 1 μ M desulfated PSK (dsPSK), 1 μ M of each amino acid (aa) present in dsPSK or without addition of an effector (control), and the length of the primary root and the total length of lateral roots (c) were determined for each seedling. Average numbers (\pm SE) per plant were obtained from three independent experiments with a total of 12–20 seedlings analyzed per treatment. Different letters within one genotype indicate statistically significant differences between treatments. Lengths of main roots in wt and *Atpskr1-T*, as shown in (b), are significantly ($P < 0.001$) different, while the lengths of lateral roots between genotypes, as shown in (c), do not differ.

receptor also reduced main root length (Fig. S1c). However, root growth was not as impaired in *Atpskr2* as it was in *Atpskr1-T*. As with *Atpskr1-T*, *Atpskr2* was still capable of responding to PSK- α with increased primary root growth. *Atpskr1-T/Atpskr2* plants in which both receptors were knocked out displayed the shortest roots. Furthermore, *Atpskr1-T/Atpskr2* plants were no longer capable of responding to PSK- α (Fig. S1c). The results support the conclusion that PSK signaling of root growth occurs mainly through AtPSKR1 and, to a lower extent, through AtPSKR2.

We further analyzed regulation of lateral root length by PSK (Fig. 6c). In wt seedlings, 1 μM PSK- α caused an approx. 45% increase in lateral root length. In *Atpskr1-T*, unlike main root length, lateral root length was not reduced compared with wt, indicating that AtPSKR1 plays different roles in the regulation of main and lateral roots. Treatment of *Atpskr1-T* seedlings with 1 μM PSK- α appeared to increase average lateral root length, but this difference was not statistically significant (Fig. 6c). Overall, the number of lateral roots appeared to be slightly lower in *Atpskr1-T* receptor knockout mutant seedlings than in wt (Fig. 7a). When seedlings were treated with 1 μM PSK- α for 7 d, the number of lateral roots per seedling increased by *c.* 27% in both wt and *Atpskr1-T* mutant as compared with controls, indicating once again that the *Atpskr1-T* mutant was capable of responding to PSK- α (Fig. 7a). Lateral root numbers were not significantly different when wt or *Atpskr1-T* plants were treated with 1 μM desulfated PSK or 1 μM amino acids as compared with either untreated plants or plants treated with PSK- α .

To test if the increase in root fresh weight in PSK- α -treated plants was a result of increased lateral root density, we used a $P_{CycB1;1}::Gus$ line which displays promoter activity of the mitotic *CycB1;1* gene in meristematic cells such as in root primordia or in the root apical meristem. This reporter line also offered the possibility to study early events of lateral root initiation since the *CycB1;1* promoter is active in pericycle cells from which lateral roots develop (Beeckman *et al.* 2001). We distinguished between lateral roots that had emerged from the parent root (Fig. 7b), lateral root initials present within the cortex (Fig. 7c) and cell division-primed, *CycB1;1*-expressing pericycle cells (Fig. 7d). $P_{CycB1;1}::Gus$ seedlings were grown for 7 d with 1 μM PSK- α , 1 μM desulfated PSK or without effector. The number of lateral roots, lateral root primordia or *CycB1;1* expressing pericycle cells per millimeter main root were not significantly altered by any treatment (Fig. 7e). Thus, the observed increase in root fresh weight in PSK-treated plants was not a result of increased lateral root density.

We conclude from our measurements that the PSK- α -dependent increase in root mass was the result of a longer main root with, overall, more lateral roots, which also grew longer in the presence of PSK- α . We further conclude that control of main, but not lateral, root length by PSK- α is mostly exerted through AtPSKR1 and only to a minor degree through an AtPSKR1-independent signaling pathway likely involving AtPSKR2.

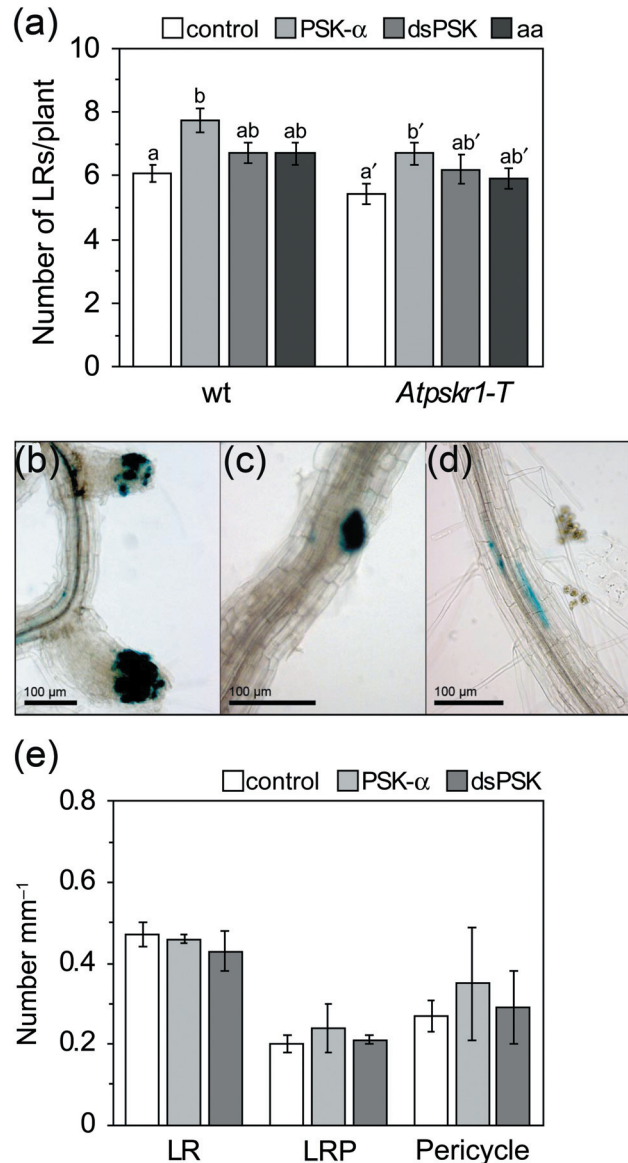


Fig. 7 Effect of phytosulfokine- α (PSK- α) on lateral root formation. (a) Treatment with PSK- α results in more lateral roots per plant. Arabidopsis wild-type (wt) and *Atpskr1-T* (*pskr1-T*) seedlings were grown for 7 d on plates containing 1 μM PSK- α , 1 μM desulfated PSK (dsPSK), 1 μM of each amino acid (aa) present in dsPSK or without addition of an effector (control), and the number of lateral roots was determined for each seedling. Numbers are averages (\pm SE) from three independent experiments with a total of 12–20 plants per treatment. $P_{CycB1;1}::Gus$ plants show staining of apical root meristems (b), lateral root primordia (c), and pericycle cells (d) that are primed to develop into lateral roots. (e) Treatment with PSK- α does not increase lateral root density. Average numbers of lateral roots (LR), lateral root primordia (LRP) and proliferation-primed pericycle regions (pericycle) were determined in 7-d-old wt Arabidopsis seedlings treated with 1 μM PSK- α , 1 μM desulfated PSK (dsPSK), or without effector (control). Numbers are averages (\pm SE) from three independent experiments with a total of 12–15 seedlings analyzed per treatment. No statistically significant differences were detected between treatments.

PSK- α signaling promotes root growth by increasing meristem and cell size

We next asked whether cell division activity in the root apical meristem or cell elongation in the elongation zone of the primary root were regulated through PSK- α . To that end, cell length profiles were obtained from the tips of primary roots and final cell lengths were measured in the cortex of wt and *Atpskr1-T* seedlings grown in the absence or presence of 1 μM PSK- α for 5 d. It was previously shown that the apical limit of the meristem is reached when cells grow above 40 μm (Beemster & Baskin, 1998). Based on averaged smoothed data calculated according to Beemster *et al.* (2002), we determined from root cell length profiles (Fig. 8) the number of cells in the apical meristem and the meristem size. By dividing root elongation rates by the average mature cell length, we also determined cell production rates (Table 1).

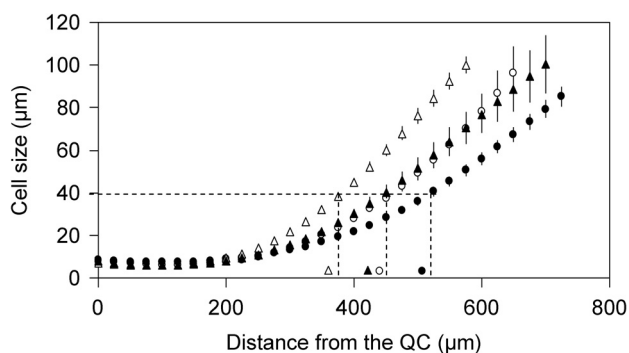


Fig. 8 Differences in cell length profiles associated with phytosulfokine (PSK) signaling. Cell length was measured in cortical files of primary roots of 5-d-old *Arabidopsis* seedlings up to a distance of 700 μm from the quiescent center (QC) in wild-type (wt, open circles), wt + PSK- α (closed circles), *Atpskr1-T* (open triangles) and *Atpskr1-T* + PSK- α (closed triangles). Results are averages (\pm SE) of interpolated values calculated from smoothed profiles of at least five roots, with two cortical cell files measured per root. The basal border of the meristem as shown on the x-axis was defined as the distance from the QC at which cells reach an average length of 40 μm .

In wt, treatment with PSK- α induced cells to elongate more (Fig. 8). Final cell length was on average 175 μm in wt, and increased significantly, by *c.* 15%, to 204 μm in the presence of 1 μM PSK- α (Table 1). The estimated size of the meristem also increased when wt seedlings were treated with PSK- α . This increase most likely resulted from increased cell size, because the number of cells in the meristem remained constant and the cell production rate decreased only slightly (Table 1). An increase in the size of the apical meristem in response to PSK- α was confirmed using an independent approach. The *P_{CycB1;1}:GUS* reporter line was used to determine the region in the root tip that showed meristematic activity as indicated by the G2/M phase-specific *CycB1;1* promoter (Fig. 9a). For comparison, the region of the root tip that expressed *AtPSKR1* is also shown. It clearly overlapped with, but was not confined to, the meristem. *P_{CycB1;1}:GUS* activity was observed over an approx. 10% longer distance in the root tip when seedlings were grown with PSK- α , a difference that was statistically significant (Fig. 9b).

In the *Atpskr1-T* mutant, the elongation rate was significantly lower than in wt (Student's *t*-test, $P < 0.0003$) as was the final average cell length (Table 1). It was 133 μm in *Atpskr1-T* as compared with 175 μm in wt, which corresponds to *c.* 24% shorter cells in the receptor mutant (Table 1; $P < 0.0001$). The average final cell length increased significantly in *Atpskr1-T* with PSK- α treatment, to 157 μm , but overall remained significantly smaller than in wt ($P = 0.0016$), indicating that redundant PSK- α signaling pathways did not fully compensate for the lack of *AtPSKR1* activity. The root apical meristem was on average smaller in *Atpskr1-T* than in wt ($P = 0.0006$), essentially because it contained fewer cells of similar size than in the wt (Table 1). In the presence of PSK- α , the meristem in *Atpskr1-T* became larger, as it did in wt; however, unlike in wt, the increase in meristem size was essentially the result of an increased number of cells ($P = 0.0039$).

Taken together, the results indicate that the promoting effect of PSK- α on root elongation in wt is essentially the consequence of a positive effect on cell elongation. In agreement

Table 1 Root elongation rate, mature cell size, cell production rate, meristem size, and number of cells per meristem were determined in primary roots of *Arabidopsis thaliana* wild-type (wt) and *Atpskr1-T* grown for 5 d in the presence or absence of 1 μM phytosulfokine- α (PSK)

| Genotype + treatment | Root elongation rate ($\mu\text{m h}^{-1} \pm \text{SE}$) | Mature cell length ($\mu\text{m} \pm \text{SE}$) | Cell production rate (cells h^{-1}) | Meristem size ($\mu\text{m} \pm \text{SE}$) | Cells per meristem ($\pm \text{SE}$) |
|------------------------|--|---|--|--|---|
| wt | 115 \pm 3 | 175 \pm 31 ^a | 0.6543 | 489 \pm 17 | 49 \pm 2 |
| wt + PSK | 120 \pm 7 | 204 \pm 43 ^b | 0.5894 | 521 \pm 12 | 46 \pm 2 |
| <i>Atpskr1-T</i> | 78 \pm 3 | 133 \pm 24 ^c | 0.5893 | 385 \pm 6 | 39 \pm 1 |
| <i>Atpskr1-T</i> + PSK | 87 \pm 5 | 157 \pm 34 ^d | 0.5506 | 460 \pm 19 | 45 \pm 1 |

Root elongation rates were calculated by dividing final root lengths by growth duration. The mature cortical cell length was measured at 5 mm from the root tip.

^{a-d}Averages significantly different from each other (with $P = 0.0016$ for the difference between a and d, and $P < 0.0001$ for all other pairs). Cell production rates were calculated by dividing the root elongation rate by the average cell size. Meristem size and number of cells per meristem were calculated from cell length profiles shown in Fig. 9, taking 40 μm as a threshold size for meristematic cells (Beemster *et al.*, 2002).

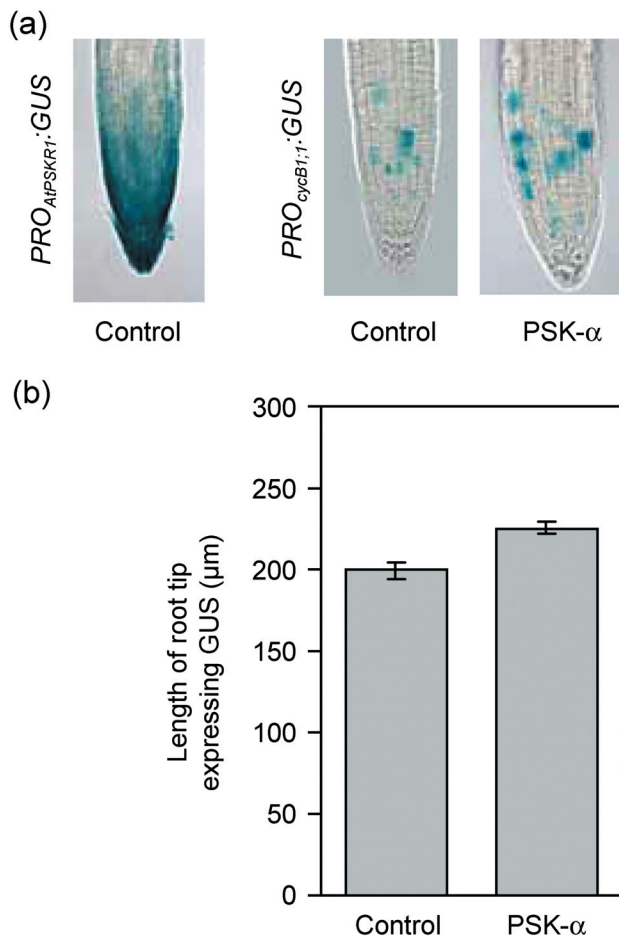


Fig. 9 Phytosulfokine- α (PSK- α) increases root meristem size. (a) $P_{AtPSKR1}:GUS$ expression (left) and $P_{CycB1;1}:GUS$ expression (right) in primary roots of 5-d-old Arabidopsis seedlings. $P_{CycB1;1}:Gus$ seedlings were grown without (control) or with 1 μ M PSK- α (PSK- α). (b) The length of the primary root meristems was estimated in plants of the $P_{CycB1;1}:GUS$ line treated without (control) or with 1 μ M PSK- α (PSK- α). Averages (\pm SE) were calculated from 46 to 49 roots and were significantly different based on a two-way Student's t -test ($P < 0.05$).

with this conclusion, the *Atpskr1-T* receptor mutant has a reduced final cell length. Nonetheless, a redundant receptor, likely AtPSKR2, provides responsiveness to PSK- α in *Atpskr1-T* such that final cell lengths are partially restored when seedlings are treated with PSK- α . PSK- α signaling in *Atpskr1-T* also promotes meristem size such that it is partially restored to wt size (Table 1). In summary, the results indicate that PSK- α signaling through AtPSKR1 regulates cell elongation.

Discussion

PSK- α can be synthesized and perceived in the root apex

Phytosulfokine- α is considered an autocrine factor (Yang *et al.*, 2000). Yet it is conceivable that this small, water-soluble

molecule moves or is transported over longer distances to act distal from its site of synthesis. Therefore, it was of interest to see to what extent gene expression of ligand and receptor overlap. Promoter:Gus analyses of *AtPSK2*, *AtPSK3*, *AtPSK4*, *AtPSK5* and of the PSK receptor gene *AtPSKR1* were shown previously for whole seedlings but cell- or tissue-specific expression patterns were not given (Matsubayashi *et al.*, 2006). Our detailed analysis indicated that each PSK gene had a specific expression pattern. Yet taking all patterns into account, it can be concluded that each root cell produces a PSK precursor mRNA.

In order to promote root growth rate, PSK- α must be active in the root apex. Activity in the meristem is required to accelerate the rate of cell division for a continuous supply of new cells. Acceleration of cell elongation contributes to enhanced growth but is not sufficient to promote long-term growth without production of new cells from the meristem. On the other hand, the final length that cells reach can determine root length. A change in final cell length is sufficient to alter root size. *AtPSK1* and *AtPSK3* were expressed throughout the root, including the apex of primary and lateral roots, and could thus directly contribute to synthesis of PSK- α not only in the cell division zone but also in the elongation zone of roots. Importantly, *AtPSK1* was expressed not only in the central cylinder but also in cortex and epidermal cells as revealed in cross-sections. It should also be noted that, at the base of the meristem, cells move rather quickly. The time it takes to cross the entire elongation zone is only *c.* 8 h (Beemster & Baskin, 1998). Hence, it is conceivable that the expression of both PSK precursors and receptors in the meristem will also result in active signaling in the elongation zone.

Thus, *AtPSK1* is expressed in all dividing and elongating cells and could provide active PSK- α in an autocrine fashion. The promoter of the PSK receptor *AtPSKR1* was also active throughout the root, including the root tip, supporting the idea that perception of locally synthesized PSK- α can occur in the growth zone of roots.

AtPSK2, *AtPSK4* and *AtPSK5* were specifically expressed in the central cylinder of roots where PSK-signaling may contribute to differentiation of vascular cells. Such a role was shown for *in vitro* cultured mesophyll cells from *Zinnia*. These were induced to differentiate into tracheal elements upon treatment with PSK- α in a dose-dependent manner (Matsubayashi *et al.*, 1999). The observed elevated expression of *AtPSK2*, *AtPSK3*, and *AtPSK4* at sites where a lateral root emerged from the main root may elevate PSK- α activity to participate in regulation of vascular development or proper connection of vasculatures between parent and lateral roots.

PSK- α promotes root growth in Arabidopsis

Treatment of Arabidopsis plants with PSK- α increased root biomass in a dose-dependent manner. The dose-response curve indicated a half-maximal root growth response at

c. 10 nM PSK- α . This value agreed well with the affinity of the Arabidopsis PSK receptor *AtPSKR1* to PSK- α determined in *in vitro* binding assays using microsomal membrane fractions in which the dissociation constant of PSK- α was estimated to be 7.7 nM (Matsubayashi *et al.*, 2006). In *Atpskr1-T* plants, root fresh weight was increased significantly not only when treated with PSK- α but also when treated with desulfated PSK (dsPSK) pentapeptide. On the other hand, treatment with equimolar amounts of the amino acids present in dsPSK did not show any growth-promoting effect. dsPSK was shown to weakly compete for PSK- α -binding to rice cells and to plasma membrane fractions from rice cells and could thus have weak PSK activity (Matsubayashi *et al.*, 1997; Matsubayashi & Sakagami, 1999). It is conceivable that application of a relatively high concentration of 1 μ M dsPSK was sufficient to trigger a weak PSK response.

Shoot growth was not stimulated in plants supplied with PSK- α . Leaf expansion proceeds two-dimensionally. It is controlled by mechanisms which balance cell size and cell number to maintain a given leaf size. In case of reduced cell production from the meristem, cells become larger to compensate for reduced cell number. If cells become larger, for example as a consequence of altered ploidy, the cell number is adapted. Unlike leaves, roots do not reciprocally compensate cell size through cell number (Ferjani *et al.*, 2007). Rather it seems that regulation of the cell production rate in the root apical meristem is independent of cell size control and that root growth rate is directed by the cell production rate in the root apical meristem (Beemster & Baskin, 1998; Chen *et al.*, 2003). It is possibly because of a lack of compensation in roots that a PSK- α effect on growth is only seen in roots. Longer roots were observed in Arabidopsis plants constitutively overexpressing the PSK precursor gene *AtPSK4* (Matsubayashi *et al.*, 2006), supporting the finding that availability of PSK- α was limiting root growth in wt plants. Unlike supply of PSK- α to growing roots, overexpression of the PSK receptor *AtPSKR1* did not promote root growth (Matsubayashi *et al.*, 2006), indicating that root growth was limited by the abundance of the ligand and not by the abundance of receptor protein. It should be interesting to learn under which circumstances plants increase or reduce synthesis of PSK- α to boost or limit root elongation. Auxin and ethylene also interact to alter root growth through regulation of cell expansion (Swarup *et al.*, 2007). It is conceivable that either hormone interacts with PSK- α production or PSK signaling.

PSK- α signaling through AtPSKR1 promotes cell elongation

Pharmacological studies and analysis of the PSK- α receptor mutant *Atpskr1-T* revealed a role for PSK signaling in root growth regulation. The cellular basis of PSK- α action was studied by measuring root cell length profiles. Mature cortex cells were shorter in *Atpskr1-T* than in wt, pointing to cell

expansion as a major target of PSK- α signaling through AtPSKR1. Furthermore, meristematic cells became larger in wt plants treated with PSK- α , resulting in an overall larger meristem. The size of the meristem in wt seedlings was estimated to be *c.* 490 μ m based on the previously published assumption that cells that leave the meristem have a size of 40 μ m (Beemster *et al.*, 2002). Based on the activity of the mitotic *CycB1;1* promoter, the length of the meristem was estimated at *c.* 200 μ m. *CycB1;1* expression is a marker for entry into mitosis, whereas kinematic data depend on new cell wall being visible microscopically (i.e. it is a much later event). Also, *CycB1;1* expression is a stochastic event which always underestimates the meristem. Despite the differing values of estimated total meristem size, the relative changes in meristem size that were measured in response to treatment with PSK- α were highly comparable when determined by either of the two methods. PSK- α increased meristem size. Based on cell size measurements, this increase was the result of increased average cell lengths. Thus it is concluded that PSK- α is a positive regulator of cell elongation growth that acts on meristematic as well as elongating cells, ultimately resulting in longer mature cells. The increase in main root length in the presence of PSK- α was *c.* 24%. Mature cell length was increased by *c.* 17% in the presence of PSK- α , indicating that cell elongation can account for the largest part of the growth-promoting effect of PSK- α observed in wt roots.

Knockout of AtPSKR2 slightly reduced root lengths, and knockout of both PSK receptor genes in the *Atpskr1-T/Atpskr2* double mutant resulted in somewhat shorter roots than in the *Atpskr1* single mutant, indicating that AtPSKR2 participates in root growth regulation. This conclusion is supported by the observation that *Atpskr1-T* knockout mutants were capable of responding to PSK- α with accelerated root growth even though wt root length was not completely restored. When *Atpskr1-T* plants were treated with PSK- α , the number of cells in the root apical meristem increased significantly, by *c.* 15%, resulting in an enlarged meristem. These results can be interpreted to mean that PSK signaling through AtPSKR2 affects cell proliferation rather than cell elongation. PSK- α signaling through AtPSKR1 and AtPSKR2 might thus initiate divergent signaling pathways, leading to the activation of different cellular processes, both of which contribute to enhanced root growth.

Acknowledgements

Support of this work by the Deutsche Forschungsgemeinschaft is gratefully acknowledged.

References

- Amano Y, Tsubouchi H, Shinohara H, Ogawa M, Matsubayashi Y. 2007. Tyrosine-sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 104: 18333–18338.

- Beekman T, Burssens S, Inzé D. 2001. The peri-cell-cycle in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 52: 403–411.
- Beemster GTS, Baskin T. 1998. Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 116: 1515–1526.
- Beemster GTS, De Vusser K, Tavernier ED, De Bock K, Inzé D. 2002. Variation in growth rate between Arabidopsis ecotypes is correlated with cell division and A-type cyclin-dependent kinase activity. *Plant Physiology* 129: 854–864.
- Chen J-G, Willard FS, Huang J, Liang J, Chasse SA, Jones AM, Siderovski DP. 2003. A seven-transmembrane RGS protein that modulates plant cell proliferation. *Science* 301: 1728–1731.
- Chen Y-F, Matsubayashi Y, Sakagami Y. 2000. Peptide growth factor phytosulfokine- α contributes to the pollen population effect. *Planta* 211: 752–755.
- Ferjani A, Horiguchi G, Yano S, Tsukaya H. 2007. Analysis of leaf development in fugu mutants of Arabidopsis reveals three compensation modes that modulate cell expansion in determinate organs. *Plant Physiology* 144: 988–999.
- Lorbiecke R, Sauter M. 2002. Comparative analysis of PSK peptide growth factor precursor homologs. *Plant Science* 163: 321–332.
- Lorbiecke R, Steffens M, Tomm JM, Scholten S, von Wiegen P, Kranz E, Wienand U, Sauter M. 2005. Phytosulphokine gene regulation during maize (*Zea mays* L.) reproduction. *Journal of Experimental Botany* 56: 1805–1819.
- Matsubayashi Y, Ogawa M, Kihara H, Niwa M, Sakagami Y. 2006. Disruption and overexpression of Arabidopsis phytosulfokine receptor gene affects cellular longevity and potential for growth. *Plant Physiology* 142: 45–53.
- Matsubayashi Y, Ogawa M, Morita A, Sakagami Y. 2002. An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine. *Science* 296: 1470–1472.
- Matsubayashi Y, Sakagami Y. 1999. Characterization of specific binding sites for a mitogenic sulfated peptide, phytosulfokine- α , in the plasma membrane fraction derived from *Oryza sativa* L.. *European Journal of Biochemistry* 262: 666–671.
- Matsubayashi Y, Takagi L, Omura N, Morita A, Sakagami Y. 1999. The endogenous sulfated pentapeptide phytosulfokine- α stimulates tracheary element differentiation of isolated mesophyll cells of zinnia. *Plant Physiology* 120: 1043–1048.
- Matsubayashi Y, Takagi L, Sakagami Y. 1997. Phytosulfokine- α , a sulfated pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells by means of specific high- and low-affinity binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94: 13357–13362.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologum Plantarum* 15: 473–497.
- Swarup R, Perry P, Hagenbeek D, Van Der Straeten D, Beemster GT, Sandberg G, Bhalerao R, Ljung K, Bennett MJ. 2007. Ethylene upregulates auxin biosynthesis in Arabidopsis seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *Plant Cell* 19: 2186–2196.
- Vielle-Calzada JP, Baskar R, Grossniklaus U. 2000. Delayed activation of the paternal genome during seed development. *Nature* 404: 91–94.
- Yadegari R, Paiva G, Laux T, Koltunow AM, Apuya N, Zimmerman JL, Fischer RL, Harada JJ, Goldberg RB. 1994. Cell differentiation and morphogenesis are uncoupled in Arabidopsis raspberry embryos. *Plant Cell* 6: 1713–1729.
- Yang H, Matsubayashi Y, Hagani H, Nakamura K, Sakagami Y. 2001. Diversity of Arabidopsis genes encoding precursors for phytosulfokine, a peptide growth factor. *Plant Physiology* 127: 842–851.
- Yang H, Matsubayashi Y, Hagani H, Sakagami Y. 2000. Phytosulfokine- α , a peptide growth factor found in higher plants: its structure, functions and receptors. *Plant and Cell Physiology* 41: 825–830.
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W. 2004. GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology* 136: 2621–2632.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Fig. S1 Comparison of primary root lengths in wt, *Atpskr1-T*, *Atpskr2*, and *Atpskr1-T/Atpskr2*.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.



About New Phytologist

- *New Phytologist* is owned by a non-profit-making **charitable trust** dedicated to the promotion of plant science, facilitating projects from symposia to open access for our Tansley reviews. Complete information is available at www.newphytologist.org.
- Regular papers, Letters, Research reviews, Rapid reports and both Modelling/Theory and Methods papers are encouraged. We are committed to rapid processing, from online submission through to publication 'as-ready' via *Early View* – our average submission to decision time is just 29 days. Online-only colour is **free**, and essential print colour costs will be met if necessary. We also provide 25 offprints as well as a PDF for each article.
- For online summaries and ToC alerts, go to the website and click on 'Journal online'. You can take out a **personal subscription** to the journal for a fraction of the institutional price. Rates start at £139 in Europe/\$259 in the USA & Canada for the online edition (click on 'Subscribe' at the website).
- If you have any questions, do get in touch with Central Office (newphytol@lancaster.ac.uk; tel +44 1524 594691) or, for a local contact in North America, the US Office (newphytol@ornl.gov; tel +1 865 576 5261).

KAPITEL 2

Phytosulfokin- α spielt in *Arabidopsis thaliana* eine Rolle bei Verwundung und Befall durch Pathogene

Es sollte eine mögliche Rolle von PSK- α und der PSK Rezeptoren in Antwort auf Verwundung und Befall durch Pathogene in *Arabidopsis* untersucht werden. Promotor-GUS Analysen zeigten, dass die Behandlung von Blättern mit dem pilzlichen Elicitor E-Fol und den pathogenen Pilzen *Alternaria brassiciola* und *Sclerotinia sclerotiorum* zu einer Induktion der Expression von *PSK2* und *PSKR1* führte. Verwundung von Hypokotylen etiolierter Keimlinge und von Blättern führte zu einer erhöhten Expression von *PSK3*, *PSK5* und *PSKR1*. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass in *pskr1-3* und *pskr2-1* Pflanzen, den *Knockout* Mutanten für die PSK Rezeptorgene *PSKR1* und *PSKR2*, die Photosyntheseleistung nach Behandlung mit dem pilzlichen Elicitor E-Fol verringert war. Die verringerte Photosyntheseleistung war ein Hinweis auf eine geringere pflanzliche Resistenz gegen Pathogenbefall. Die erhöhte Expression von PSK Präproprotein-Genen und von *PSKR1* nach Verwundung und Befall durch Pathogene, sowie die geringere Resistenz von *pskr1-3* und *pskr2-1* Pflanzen gegen den Befall durch Pathogene zeigten, dass PSK- α eine Funktion bei der Abwehr von bestimmten pilzlichen Pathogenen und der Antwort auf Verwundung hat. Nach Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* bilden Pflanzen Tumore. Expression von PSK Präproprotein-Genen und von *PSKR1* wurde im Tumor nachgewiesen. Synthese und Perzeption von PSK- α finden im Tumor wahrscheinlich statt. Um zu untersuchen, ob die PSK Rezeptoren eine Rolle beim Wachstum der Tumore haben, wurde die Tumorbildung in *pskr1-3* und *pskr2-1* untersucht. *pskr1-3* Pflanzen entwickelten im Vergleich zum Wildtyp und zu *pskr2-1* kleinere Tumore. Zellgrößen der Tumore von *pskr1-3* waren nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Es kann geschlussfolgert werden, dass das Wachstum der Tumore hauptsächlich über *PSKR1* reguliert wird.

Die Analysen zur Expression von PSK Präproprotein-Genen und von *PSKR1* nach Verwundung wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit von mir angefertigt. Die weiteren Experimente wurden in Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Prof. Roitsch und Prof. Hedrich (Universität Würzburg) durchgeführt.

A role for PSK signaling in wounding and microbial interactions in *Arabidopsis*

Maaria Loivamäki^{a,†}, Nils Stührwohldt^{b,†}, Rosalia Deeken^{c,†}, Bianka Steffens^b, Thomas Roitsch^a, Rainer Hedrich^c and Margret Sauter^{b,*}

^aPharmaceutical Biology, Julius-von-Sachs-Institute for Biosciences, University of Würzburg, Julius-von-Sachs-Platz 2, 97082 Würzburg, Germany

^bPhysiologie und Entwicklungsbiologie der Pflanzen, Botanisches Institut, Universität Kiel, Am Botanischen Garten 5, 24118 Kiel, Germany

^cMolecular Plant Physiology and Biophysics, Julius-von-Sachs-Institute for Biosciences, University of Würzburg, Julius-von-Sachs-Platz 2, 97082 Würzburg, Germany

Correspondence

*Corresponding author,
e-mail: msauter@bot.uni-kiel.de

Received 23 February 2010;
revised 7 April 2010

doi:10.1111/j.1399-3054.2010.01371.x

PSK- α is a disulfated peptide that acts as a growth factor in plants. PSK- α is derived from preproteins which are encoded by five PSK precursor genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh and is perceived by leucine-rich repeat receptor kinases. *Arabidopsis* has two PSK receptor genes, *PSKR1* and *PSKR2*. Although ligand and receptor are well characterized, the biological functions of PSK signaling are not well understood. Using reporter lines and receptor knockout mutants of *Arabidopsis*, a role for PSK signaling in biotic interactions and in wounding was analyzed. Treatment of *Arabidopsis* leaves with the fungal elicitor E-Fol, or the fungal pathogens *Alternaria brassicicola* and *Sclerotinia sclerotiorum* resulted in induction of *PSK2* and *PSKR1* as shown by promoter:GUS analysis. Wounding of hypocotyls or leaves induced *PSK3:GUS*, *PSK5:GUS* and *PSKR1:GUS* expression indicating that PSK precursor genes are differentially regulated in response to specific stresses. The receptor knockout lines *pskr1-3* and *pskr2-1* showed significantly reduced photosynthesis in response to the fungal elicitor E-Fol which indicates that fungal defence is impaired. *pskr1-3* plants further showed reduced growth of crown galls after infection with *Agrobacterium tumefaciens*. A role for PSK signaling in *Agrobacterium tumefaciens* tumor growth was supported by the finding that PSK precursor genes and *PSKR1* are expressed in crown galls. Overall, the results indicate that PSK signaling may play a previously undescribed role in pathogen or herbivore interactions and is crucial for *Agrobacterium*-induced cell proliferation in crown gall formation.

Introduction

Peptide signaling is employed by plants to control and coordinate growth, development and adaptation to abiotic and biotic stresses. Some bacterial elicitors, also termed pathogen associated microbial patterns (PAMPs), are peptides that are released by the microbe. PAMPs

are perceived by plant leucine-rich repeat receptor-like kinases (LRK). The LRKs flagellin-sensitive 2 (FLS2) and elongation factor Tu receptor recognize bacterial flagellin4 and elongation factor Tu, respectively. After recognition, an immune response is initiated that results in resistance against the bacterial pathogen (Chinchilla et al. 2007). Not only bacteria but also plants produce

Abbreviations – FLS2, flagellin-sensitive 2; GUS, β -glucuronidase; LRK, leucine-rich repeat receptor-like kinase; PAMPs, pathogen-associated microbial patterns; PGA, polygalacturonic acid; PSII, photosystem II; PSK- α , phytosulfokine- α .

[†]These authors contributed equally to this work.

signaling peptides. The 18-amino acid peptide systemin is involved in resistance of tomato against herbivore attack (Torii 2004). PSY1 and phytosulfokine- α (PSK- α) are sulfated plant peptides that regulate plant growth. The 18-aa tyrosine-sulfated glycopeptide PSY1 promotes cell proliferation and expansion in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh at nanomolar concentrations (Amano et al. 2007). The disulfated pentapeptide PSK- α was identified as a growth factor that controls cell proliferation in low-density cell cultures of *Asparagus officinalis* L. and rice (*Oryza sativa* L.) (Matsubayashi and Sakagami 1996, Matsubayashi et al. 1997). PSK- α preproteins are encoded in *Arabidopsis* by five PSK genes (Lorbiecke and Sauter 2002, Yang et al. 2001). Proteolytic processing of the PSK preproprotein by a subtilisin serine protease was demonstrated for *Arabidopsis* PSK4 (Srivastava et al. 2008). The tyrosine sulfatation is catalyzed by a tyrosylprotein sulfotransferase (TPST; Komori et al. 2009). Abundance of active PSK- α hence depends not only on gene transcription and transcript translation but also on post-translational processing events. The processed active PSK- α is perceived in plant cells by plasma membrane localized LRKs (Matsubayashi et al. 2002). In *Arabidopsis*, two genes, designated *PSKR1* and *PSKR2*, encode PSK receptor proteins. The *pskr1-1* mutant of *Arabidopsis* shows reduced growth of callus from excised discs of mature leaves indicating that signaling through *PSKR1* is required for cell proliferation during regenerative processes (Matsubayashi et al. 2006). Reduced callus formation in *pskr1-1* was particularly obvious when callus was derived from mature leaves. PSK- α contributes not only to cell proliferation in vitro but also regulates root growth as shown in *Arabidopsis* (Matsubayashi et al. 2006, Kutschmar et al. 2009). Exogenous application of PSK- α resulted in enhanced root growth, whereas knockout of one or both receptor genes resulted in shorter roots. The growth effect was shown to be largely a result of reduced root cell length (Kutschmar et al. 2009).

Aside from growth regulation, additional functions of PSK signaling in plants are only starting to be unveiled. Induction of the PSK precursor gene *PSK4* in *Arabidopsis* was observed after excision of leaf discs at the rims indicating that PSK signaling may be involved in wound response signaling (Matsubayashi et al. 2006). This and the observation that *PSKR1* mutants appeared to be more susceptible to pathogens when plants were raised in the greenhouse indicated that PSK signaling may contribute to abiotic and/or biotic stress responses in *Arabidopsis*. We therefore set out to study expression of PSK and PSK receptor genes in response to wounding and after exposure to pathogenic and non-pathogenic microbes or elicitors. An involvement of PSK signaling in abiotic and

biotic stress responses was further analyzed in the PSK receptor mutants *pskr1-3*, *pskr2-1* and *pskr1-3/pskr2-1*.

Materials and methods

Plant material and GUS staining

Experiments were carried out using *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh ecotype Columbia-0. The *pskr1-3* (previously named *pskr1-T*), *pskr2-1*, and *pskr1-3/pskr2-1* T-DNA insertion lines were described previously (Amano et al. 2007, Kutschmar et al. 2009, Matsubayashi et al. 2006). Promoter:GUS constructs of *PSK1*, *PSK2*, *PSK3*, *PSK4*, *PSK5* and *PSKR1* were generated as described (Kutschmar et al. 2009). Several independent GUS expressing lines were analyzed according to the protocol of Vielle-Calzada et al. (2000) with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide (X-Gluc) as a substrate. Stained plant material was cleared in chloral hydrate (Yadegari et al. 1994) and observed under bright-field illumination using a Leica DM LS (Leica, Wetzlar, Germany) or Olympus BX41 (Olympus, Hamburg, Germany) microscope. To obtain tissue sections, 5-day-old cleared plants were washed and dehydrated in an ethanol series at 30, 50, 70, 90 and 100% for 60 min each. Plants were embedded in Technovit 7100 according to the manufacturers' instructions (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany). 25 μ m thick sections were cut with a Leica RM 2255 microtome and analyzed using a Leica DM LS microscope (Leica).

Infection with pathogens and elicitor treatment

For experiments with pathogens, wild-type and transgenic *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0 were cultivated at 22°C in short day (9 h light, 15 h dark) at a photosynthetic photon flux density (PPFD) of approximately 180 μ mol photons $m^{-2} s^{-1}$. Experiments were carried out on rosettes from 5- to 7-week-old plants. *Pseudomonas syringae* DC3000 and DC3000 rpm were cultured at 28°C either on LB agar plates or by shaking in Kings medium B. The medium contained 50 μ g ml^{-1} rifampicillin for both *Pseudomonas syringae* strains, and in addition, 5 μ g ml^{-1} tetracycline for the avirulent strain DC3000 rpm. For plant infection, *Pseudomonas syringae* were harvested by centrifuging. The cells were re-suspended in 10 mM $MgCl_2$ at an optical density (OD)₆₀₀ of 0.2, which corresponds to approximately 1×10^8 cell forming units (cfu) per ml. Plants were infected by infiltrating 30 μ l of a bacterial suspension with a 1 ml plastic syringe (without needle) through the stomata into the leaf tissue. The diameter of the inoculated leaf area was approximately 3 mm. Elicitor from

the fungus *Fusarium oxysporum* (E-Fol) was obtained as described by Link et al. (2002). 100 or 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of E-Fol, 0.01% polygalacturonic acid (PGA) or 0.01% chitosan were applied to a leaf using a syringe as described for bacteria. The fungal pathogen *Alternaria brassicicola* was cultivated in PD-medium (Difco™ Potato dextrose Broth, Becton Dickinson GmbH, Germany) in the dark at 22°C for 3 weeks. To obtain a fungal suspension, 5–10 ml of H₂O or PD-medium were applied to a fungus plate. The suspended spores were collected and the spore quantity was determined using a cell counting chamber and a microscope. For fungal treatments, two approaches were taken: either 10 μl of *Alternaria brassicicola* spore suspension in PD-medium (10^6 spores ml^{-1}) were applied to a leaf surface with a pipette or spores were diluted in H₂O (4×10^5 spores ml^{-1}) and applied with a syringe as described for bacteria and elicitors. Because of a low spore yield, *Sclerotinia sclerotiorum* was always applied by syringe in a concentration of 4- to 8×10^4 spores per ml. For histochemical GUS detection, the pathogen of interest was applied to both sides of the leaf's middle vein. Control leaves were treated the same way with either 10 mM MgCl₂ (for bacteria treatments) or H₂O (for all other treatments).

Crown gall induction with *Agrobacterium tumefaciens*

For crown gall development, *Arabidopsis* plants were cultivated under short day conditions (8 h light, 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ at 22°C; 16 h dark at 16°C). With the onset of flowering, tumors were induced at the base of a wounded inflorescence stalk of 2–5 cm in length by applying the nopaline-utilizing *Agrobacterium tumefaciens* strain C58 noc^c (nopaline catabolism construct number 584, Max Planck Institute for Plant Breeding, Cologne, Germany). Three to four weeks post-infection crown galls were separated from the inflorescence stalk with a scalpel using a binocular and the tumor weight was determined. Wounded but uninfected tumor-free inflorescence stalk segments of the same age served as reference tissue for comparison. For analysis of tumor morphology, tumors were embedded in Technovit 7100 (Heraeus Kulzer GmbH) according to the manufacturer's instructions and 5 μm cross sections were prepared. GUS staining was performed according to Gallagher (1992) with 200 μm cross sections and complete tumors which were still attached to the inflorescence stalk.

Wounding

For wounding experiments, seedlings were grown for five days in the dark or plants were grown for two

weeks under long-day conditions at 22°C and 70 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. For leaf wounding one of the two oldest leaves was cut on one side with a scissor without detaching it from the plant. After the times indicated, the two oldest leaves, of which one was wounded and the control which remained unwounded, were harvested and stained for GUS activity. Hypocotyls were wounded with a needle and left on media together with the unwounded controls. After 10 h, wounded and unwounded hypocotyls were stained for GUS activity as described above. GUS stained hypocotyls of *PSKR1:GUS* seedlings were embedded in Technovit 7100 (Heraeus Kulzer GmbH) and 25 μm cross sections were cut with a rotary microtome.

Chlorophyll fluorescence measurements by imaging PAM

The chlorophyll fluorescence measurements were performed as previously described by Bonfig et al. (2006). The kinetics were recorded and the areas of interest were marked on each leaf's control and treated sides. The maximum photosystem II (PSII) quantum yield was automatically averaged over the areas of interest by using the dark level fluorescence yield and the maximum fluorescence yield. The chlorophyll fluorescence measurements were performed 48, 72 and 96 h after the treatment with E-Fol, or *Alternaria brassicicola*.

Statistical analysis

Statistical analysis of chlorophyll fluorescence measurements and tumor weights were performed with Minitab software (Minitab Inc., State College Pennsylvania, PA). Comparison of means was analyzed for statistical significance with an ANOVA (Tukey test). Constant variance and normal distribution of data were verified before statistical analysis and the *P* value was set to *P* < 0.001 if one of the two conditions was not achieved. The *P* value for the Pearson product moment correlation is indicated in the figure legends.

Results

Fungal infection induces expression of *PSK2*, *PSK5* and *PSKR1* and alters photosynthetic performance in *PSK* receptor mutants

Promoter:GUS lines were employed to study promoter activities of *PSK1*, *PSK2*, *PSK3*, *PSK4*, *PSK5* and *PSKR1* in response to pathogen infection or elicitor treatment in *Arabidopsis* leaves (Fig. 1A, B). Rosette leaves of 5–7-week-old plants were injected with water as a

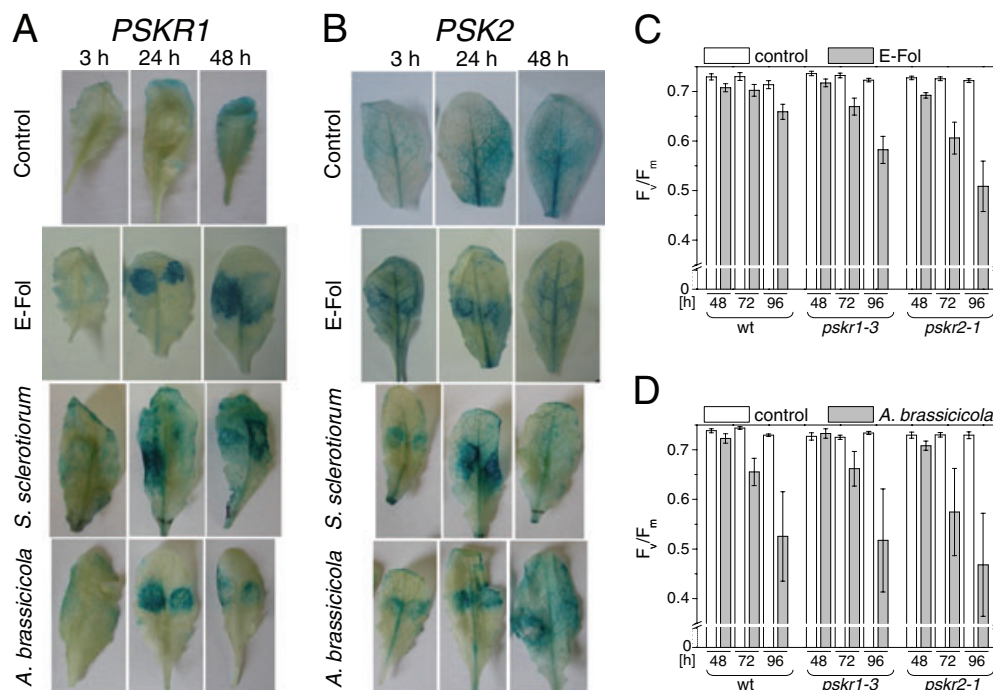


Fig. 1. Fungal infection affects PSK signaling. (A) Representative pictures of *PSKR1:GUS* and (B) *PSK2:GUS* leaves that were treated for 3, 24 or 48 h with H₂O as a control, E-Fol, *Sclerotinia sclerotiorum*, or *Alternaria brassicicola*. Maximum quantum yield (F_v/F_m) was determined (C) in E-Fol and (D) *Alternaria brassicicola* treated leaves of wt, *pskr1-3* and *pskr2-1* plants. Results are averages (\pm SE) from (C) 12–14, and (D) 8–10 measurements per treatment and genotype. Quantum yields of *pskr1-3* leaves treated for 96 h with E-Fol, and from *pskr2-1* leaves treated for 48 and 96 h with E-Fol were significantly different from wt at the same time point ($P < 0.001$, ANOVA, Tukey test).

control or with a bacterial suspension of either the virulent hemibiotrophic pathogen *Pseudomonas syringae* DC3000, or avirulent *Pseudomonas syringae* DC3000 rpm, with the fungal necrotrophic pathogens *Alternaria brassicicola* or *Sclerotinia sclerotiorum*, or with the fungal elicitor E-Fol. GUS staining was detected 3, 24 or 48 h after infection. Treatment with either virulent or avirulent *Pseudomonas* strains did not visibly enhance GUS activity in any of the six GUS lines. Treatment with the fungal elicitor E-Fol, or with *Sclerotinia sclerotiorum* and *Alternaria brassicicola* resulted in a local increase in *PSKR1:GUS* staining at the site of infection (Fig. 1A). *PSKR1:GUS* staining increased over time between 3 and 48 h post-inoculation. Of the five PSK genes, only *PSK2:GUS* was induced locally after infection with E-Fol, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Alternaria brassicicola* (Fig. 1B). *PSK5:GUS* expression was induced by infiltration with *Alternaria brassicicola* after 24 h (Supporting information Fig. S1). The fungal elicitor chitosan and the plant-derived elicitor PGA did not reproducibly induce *PSKR1:GUS* or any of the *PSK:GUS* activities.

In wt, *pskr1-3* and *pskr2-1* plants we next determined the maximum quantum yield of PSII which can be used as a physiological indicator of plant resistance to

pathogen infection (Aldea et al. 2006, Zou et al. 2005). The T-DNA insertion lines *pskr1-3* and *pskr2-1* were previously shown to have non-detectable transcript levels of the respective receptor genes *PSKR1* and *PSKR2* (Amano et al. 2007, Kutschmar et al. 2009). Photosynthetic performance was determined after treatment with E-Fol (Fig. 1C) or with *Alternaria brassicicola* (Fig. 1D). In water treated control leaves no effect on photosynthetic performance was observed in wt, *pskr1-3* or *pskr2-1* after 48, 72 or 96 h of treatment. Treatment with E-Fol led to decreased F_v/F_m ratios indicating a reduced photosynthetic performance in all genotypes. However, a faster and more severe decline in the quantum yield of PSII was observed in *pskr1-3* and *pskr2-1* plants than in wt (Fig. 1C). After 96 h, the F_v/F_m value of E-Fol treated wt plants was 92% of the corresponding control value, but was reduced to 81% in *pskr1-3* and to 70% in *pskr2-1* plants (Fig. 1C). In leaves treated with *Alternaria brassicicola*, photosynthetic performance also declined in wt, *pskr1-3* and *pskr2-1* (Fig. 1D). However, *Alternaria brassicicola* treatment did not lead to significant differences between the three genotypes at any time point. In plants that were treated with either of the *Pseudomonas syringae* strains no differences

in photosynthetic performance were detected. Moreover, the elicitors PGA or chitosan did not alter the photosynthetic performance over a two-week period after the treatment.

A role for PSK signaling in crown gall cell proliferation

A transcriptome study was performed to identify genes which are differentially expressed in 35-day-old tumors induced by *Agrobacterium tumefaciens* in *Arabidopsis* (Deeken et al. 2006). The PSK genes *PSK2* and *PSK5* were found to be downregulated and the PSK receptor gene *PSKR1* was significantly upregulated in tumors as compared with mock-inoculated *Arabidopsis* inflorescence stalks. Promoter:*GUS* lines of *PSK2*, *PSK5* and *PSKR1* were employed to localize sites of gene expression and thus putative sites of PSK signaling in crown galls. As controls, crown galls of *PSK1:GUS* and *PSK3:GUS* lines were included in the analysis. Crown galls were induced by infecting the base of a young inflorescence stalk with *Agrobacterium tumefaciens* strain C58. After three weeks, whole tumors and cross sections

of tumors were stained to visualize GUS activity (Fig. 2). Because it was difficult to infiltrate whole tumors completely with GUS-staining solution, even under vacuum, 200 μm slices of fresh tumor material were stained for visualizing GUS activity within tumors. *PSK1:GUS*, *PSK3:GUS* and *PSK5:GUS* were expressed in few cells at the tumor surface (Fig. 2A). *PSK2:GUS* activity was observed at the tumor surface, and more strongly in the xylem of the inflorescence stalk (Fig. 2A, B). *PSKR1:GUS* signals were detected at the tumor surface (Fig. 2A), and within the tumor, but not in the inflorescence stalk (Fig. 2B).

In order to study a function of PSK signaling in crown gall growth, weights of tumors growing on wt, *pskr1-3*, *pskr2-1* and on the double receptor knockout mutant *pskr1-3/pskr2-1* were determined (Fig. 2D). In *pskr1-3* and *pskr1-3/pskr2-1*, tumor growth was severely reduced reaching an average fresh weight of 2.7 mg as compared with 12.2 mg in wt. This finding indicated that PSK signaling might be important for crown gall development. Knockout of PSK receptor 2 had only a minor effect on tumor growth; tumors weighed 10.0 mg on average in *pskr2-1*. In the double mutant, tumor

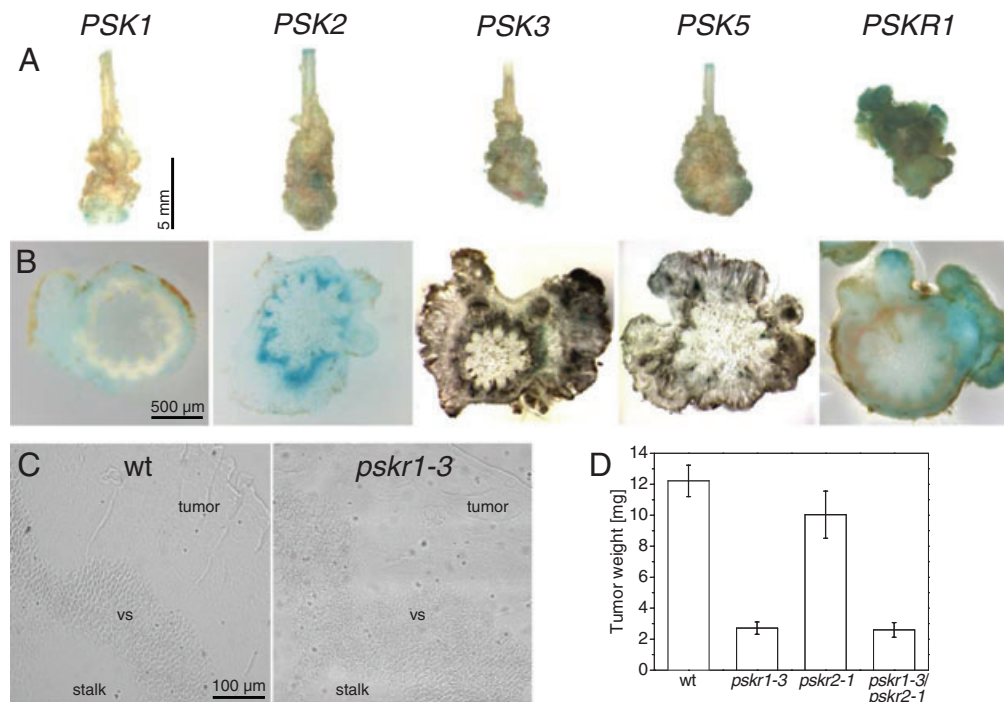


Fig. 2. PSK signaling is involved in crown gall growth. (A) GUS activity was analyzed in 3-week-old tumors grown on *PSK1:GUS*, *PSK2:GUS*, *PSK3:GUS* and *PSK5:GUS* plants. *PSKR1:GUS* activity was analyzed in 30-day-old tumors. (B) Cross section from tumors attached to the inflorescence stalk. (C) Cross sections of wt and *pskr1-3* inflorescence stalks with vascular tissue (vs) and surrounding tumor. (D) Crown galls were separated from the inflorescence stalk of wt, *pskr1-3*, *pskr2-1* and *pskr1-3/pskr2-1* plants and tumor weight was determined. Results are averages (\pm SE) from 43–95 tumors analyzed per genotype. Tumor weights of *pskr1-3* and *pskr1-3/pskr2-1* were significantly different from wt and *pskr2-1* ($P < 0.001$, ANOVA, Tukey test).

fresh weight was the same as in *pskr1-3* indicating that *Agrobacterium*-induced tumor growth was mainly regulated through *PSKR1*. Detailed analysis of 5 μm cross sections through wt and *pskr1-3* inflorescence stalks and tumors revealed no differences in vessel-like structures or tumor cell sizes (Fig. 2C).

Wounding induces expression of *PSK3*, *PSK5* and *PSKR1*

To study regulation of PSK genes and of *PSKR1* by wounding in *Arabidopsis*, young seedlings and

leaves of plants in the respective P:GUS lines were employed. Hypocotyls of 5-day-old etiolated seedlings were analyzed 10 h after wounding (Fig. 3A, Supporting information Fig. S2A). *PSK1*:GUS activity was neither detected in unwounded nor in wounded hypocotyls (Supporting information Fig. S2A). *PSK2*:GUS and *PSK4*:GUS were expressed in hypocotyls but were not wound-induced (Supporting information Fig. S2B, C). *PSK3*:GUS, *PSK5*:GUS and *PSKR1*:GUS lines showed increased blue staining at the site of wounding (Fig. 3A). Cross sections through *PSKR1*:GUS hypocotyls revealed

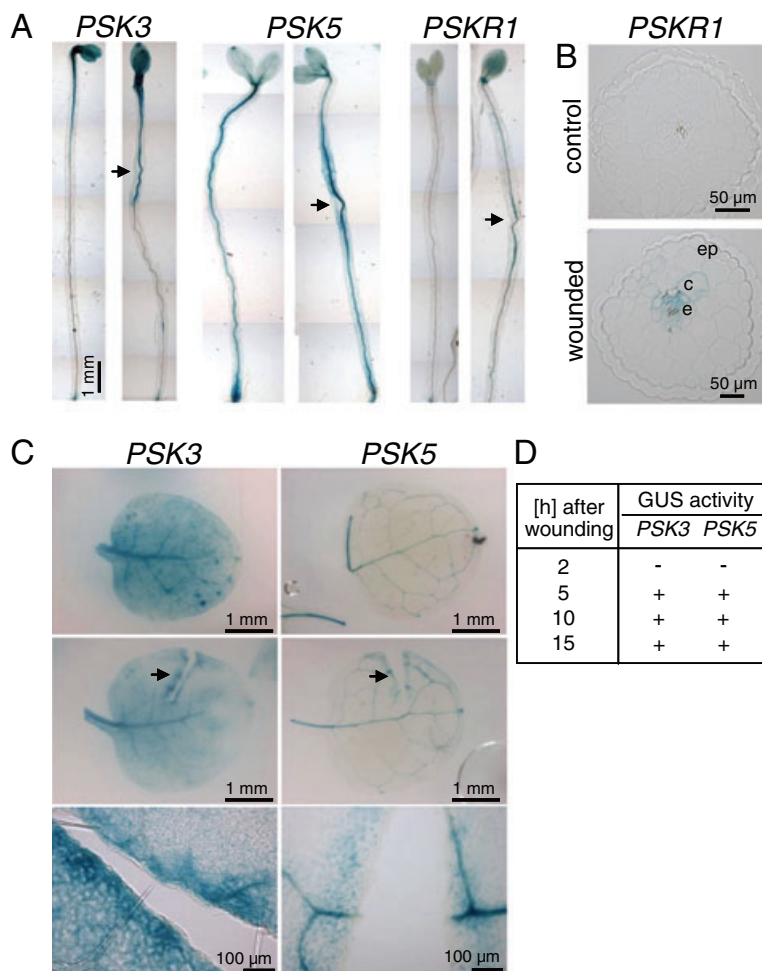


Fig. 3. *PSK3*, *PSK5* and *PSKR1* are wound-induced in hypocotyls and leaves. (A) GUS activity driven by the *PSK3*, *PSK5* and by the *PSKR1* promoters were analyzed in hypocotyls of 5-day-old etiolated seedlings. Unwounded hypocotyls are shown on the left as controls. Hypocotyls shown on the right were wounded with a needle (indicated with an arrow). Ten hours after wounding, hypocotyls were stained for GUS activity. (B) Cross sections through hypocotyls of *PSKR1*:GUS reveal no expression in the unwounded control, and expression in cells of the central cylinder, endodermis (e) and cortical cells (c) of wounded hypocotyls (ep = epidermis). (C) Promoter:GUS analysis of leaves from 2-week-old plants shows *PSK3*:GUS and *PSK5*:GUS expression in intact unwounded leaves (top), and after incision (the incision is indicated by an arrow). Leaves remained attached to the plant until staining for GUS activity 15 h after wounding. (D) Time course of GUS activity of 2-week-old *PSK3*:GUS and *PSK5*:GUS plants. Leaves remained attached to the plant until staining for GUS activity. Enhanced GUS staining over the unwounded control is indicated by + and was observed as early as 5 h after wounding in both lines.

wound-induced expression in cells of the central cylinder, endodermis and cortex (Fig. 3B).

GUS activity in leaves of 14-day-old plants was analyzed 15 h after wounding (Fig. 3C, Supporting information Fig. S2D–G). *PSK1:GUS* was neither expressed in unwounded nor in wounded leaves (Supporting information Fig. S2D). *PSK2:GUS* and *PSK4:GUS* activities were observed predominately in the vasculature, but staining was not enhanced in response to wounding (Supporting information Fig. S2E, F). *PSK3:GUS* was expressed throughout the leaf including the vasculature while *PSK5:GUS* expression was mainly seen in the vasculature (Fig. 3C). Both genes showed stronger expression at the sites of the incision. Enhanced GUS staining after wounding was observed in the vasculature and in mesophyll cells. Wound-induced *PSK3:GUS* expression was also observed at the site of injection in pathogenesis experiments irrespective of inoculation. A time course analysis showed that expression of *PSK3:GUS* and *PSK5:GUS* increased already between 2 and 5 h after wounding (Fig. 3D). *PSKR1:GUS* expression was not increased by wounding in leaves (Supporting information Fig. S2G).

Discussion

The results presented here indicate that PSK signaling might be involved in plant defense against mechanical wounding and defined fungal pathogens. Our findings indicate that *PSK2* and *PSKR1* are induced by fungal infection (Table 1). The fungal elicitor E-Fol and the two fungal species, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Alternaria brassicicola*, elevated the expression of *PSK2:GUS* and *PSKR1:GUS* as indicated by blue staining at the site of infection (Fig. 1A, B). *PSK5* driven GUS expression was specifically induced by *Alternaria brassicicola*. No induction of *PSK* or *PSKR1* gene promoter activities was observed when plants were treated with a virulent or an avirulent strain of *Pseudomonas syringae*, or with the plant-derived elicitor PGA. Only distinct *PSK* genes were upregulated after the fungal treatment, indicating that these genes may play a specific role in plant defense. A role for PSK signaling in plant immunity was supported by the finding that the photosynthetic performance of *Arabidopsis* plants was impaired in *PSK* receptor knockout mutants when the plants were exposed to the fungal elicitor E-Fol (Fig. 1C). Both, *pskr1-3* and *pskr2-1*, plants showed a more rapid and a more severe decline in photosynthetic performance as compared with wt when E-fol was applied to the leaves. When leaves were infected with *Alternaria brassicicola*, photosynthetic performance decreased strongly in wt and *PSK* receptor knockout

plants (Fig. 1D). These results indicate that PSK signaling provides some protection against elicitor-induced damage, but is not sufficient to efficiently protect plants against fungal infection. Nonetheless, these results provide evidence that *PSK* receptors may be involved in immune response signaling. *PSK* receptors are structurally very similar to the brassinosteroid receptor *BRI1* (brassinosteroid insensitive) and to the flagellin 2 receptor *FLS2* which recognizes microbial peptide signals as part of the plant immune defense. It is conceivable that *PSK* receptor signaling and *BRI1* or *FLS2* signaling share resemblance or are linked at the molecular level (Chinchilla et al. 2009).

The *PSK3* and *PSK5* genes and the *PSK* receptor gene *PSKR1* were specifically induced by mechanical wounding such as that which occurs during herbivory (Fig. 3, Supporting information Fig. S2). In hypocotyls, wounding with a needle resulted in induction of *PSK3:GUS*, *PSK5:GUS* and of *PSKR1:GUS* at and around the site of wounding. In leaves, induction of *PSK3:GUS* and *PSK5:GUS* was observed after wounding with scissors. These findings are in line with recently published results from *Zinnia elegans* L. which showed that transcript abundance of the *PSK* precursor gene *ZePSK1* increased within 24 h when leaves were cut into small pieces for the isolation of mesophyll protoplasts (Motose et al. 2009). A previous study showed that exogenously supplied *PSK- α* enhanced tracheid formation in a low-density *Zinnia* mesophyll cell culture in a dose-dependent manner leading the authors to conclude that *PSK- α* was responsible for tracheary element differentiation (Matsubayashi et al. 1999). However, based on the time course of *ZePSK1* gene induction, Motose et al. (2009) concluded that *PSK* signaling might play a role in the wound response in *Zinnia* rather than in trans-differentiation processes that eventually lead to tracheid development. In *Arabidopsis*, induction of *PSK3:GUS* and *PSK5:GUS* activities by wounding in leaves occurred with a lag phase of 2–5 h. GUS staining remained elevated until 15 h after wounding. Later time points were not analyzed. In a previous study by Matsubayashi and coworkers, *Arabidopsis* leaf discs were excised from 3-week-old *PSK4:GUS* plants, and increased GUS staining was observed at the edges of the discs 12 h after excision (Matsubayashi et al. 2006). In the work presented here, no increase in *PSK4:GUS* expression was observed after incision of leaves. This might result from different assay conditions. In the work described here, leaves remained attached to the plant during wounding, whereas leaf discs were excised from the plant and incubated in vitro. It is conceivable that the trigger for the observed *PSK4:GUS* induction in leaf discs was actually senescence rather than wounding. *PSK*

signaling through *PSKR1* was proposed to control senescence (Matsubayashi et al. 2006). The *pskr1-1* mutant displayed accelerated senescence, whereas a mutant overexpressing *PSKR1* showed delayed senescence in *Arabidopsis*.

In *Zinnia*, the pathogenesis-related gene *ZePR1* and the proteinase inhibitor genes *ZePI1* and *ZePI2* were repressed in the presence of PSK- α . Conversely, inhibition of PSK- α synthesis resulted in prolonged persistence of *ZePR1*, *ZePI1* and *ZePI2* transcripts during tracheid genesis indicating that PSK may act as a negative regulator of the wound response. It was hypothesized that downregulation of the general wound stress response may be required for the trans-differentiation of mesophyll cells into xylem elements in vitro (Motose et al. 2009). Triple knockout plants with insertional mutations in both PSK receptor genes, *PSKR1* and *PSKR2*, and in the *PSY1* receptor gene were not affected in xylem formation ruling out an essential role of PSK signaling in xylogenesis during normal plant development (Amano et al. 2007).

Plant tumors induced by *Agrobacterium tumefaciens* are referred to as crown galls. They develop upon transfer of bacterial DNA into the host and integration into its genome. The bacterial-encoded transferred oncogenes promote biosynthesis of the phytohormones auxin and cytokinin. These and other hormones were shown to influence development and growth of crown galls. In *Arabidopsis*, virulence of the infecting *Agrobacterium* is controlled by ethylene and salicylic acid. Vascular differentiation is induced and controlled by gradients of both hormones (Aloni et al. 2003, Scarpella et al. 2006). In addition, ethylene and auxin stimulate the formation of new vasculature in the growing tumor (Lee et al. 2009). Upon *Agrobacterium* infection, enhanced ethylene production was measured in *Arabidopsis* (Efetova et al. 2007), and growth of crown galls in tomato was shown to be dependent on functional ethylene signaling (Aloni et al. 1998). Furthermore, growth of crown galls depends on ABA signaling. In the *Arabidopsis* *abi1-1* and *abi2-1* mutants of ABA biosynthesis, tumor growth was reduced

to a similar degree as observed for *pskr1-3* (Efetova et al. 2007). In turn, the ABA hypersensitive *abi1-1R5* mutant displayed increased tumor growth. A described function for ABA in crown gall development is to induce the biosynthesis of a protective suberized periderm-like layer that regulates water flow into developing tumors. It was suggested that crosstalk between hormones balances pathogen defense by the host and tumor growth promoted by *Agrobacterium* (Lee et al. 2009). PSK signaling may shift this balance in favor of tumor growth. Additional work will be required to elucidate possible interactions of PSK and hormone signaling pathways.

Crown gall development and physiology are dependent on the activity of plant hormones. Within a crown gall, meristematic areas and vessel-like structures can be distinguished. During gall development, vessel-like structures differentiate de novo and connect to the vasculature of the host plant (Deeken et al. 2006, Ullrich and Aloni 2000). *Agrobacterium*-induced galls that developed on *pskr1-3* plants were significantly smaller than tumors that developed on wt plants (Fig. 2D). However, we did not observe an obvious difference in the formation of vessel-like structures supporting the conclusions by Motose et al. (2009) that PSK signaling does not contribute to vessel formation. In this study, we further observed severely smaller crown galls growing on *pskr1-3* plants. The cell sizes did not appear to be changed in *Agrobacterium*-induced galls growing on *pskr1-3* plants as compared with those growing on wild-type plants (Fig. 2C). This result is in line with the previous observation that PSK signaling through *PSKR1* supports proliferation of *Arabidopsis* callus cells in vitro (Matsubayashi et al. 2006). In contrast, *PSKR2* did not contribute significantly to cell proliferation in crown galls as *pskr2-1* tumors reached wt size and crown galls of the *pskr1-3/pskr2-1* double mutant were comparable in size to crown galls of *pskr1-1*. These results support a role of PSK signaling specifically through *PSKR1* in promoting proliferation of undifferentiated cells. In *Arabidopsis* plants, regulation of root growth by PSK- α is controlled

Table 1. *PSK* and *PSKR1* gene regulation in biotic and abiotic stress responses. Promoter:GUS lines of *PSK1*, *PSK2*, *PSK3*, *PSK4*, *PSK5* and *PSKR1* were employed to study gene expression in response to biotic stress and mechanical wounding. – indicates no induction, + indicates gene induction.

| Gene | Biotic interactions | | | | | | Wounding |
|--------------|---------------------------------|--------------------------------|-------|--|----------------------------------|---|----------|
| | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> | <i>Alternaria brassicicola</i> | E-Fol | a-virulent <i>Pseudomonas syringae</i> | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | | |
| <i>PSK1</i> | – | – | – | – | – | + | – |
| <i>PSK2</i> | + | + | – | – | – | + | – |
| <i>PSK3</i> | – | – | – | – | – | – | + |
| <i>PSK4</i> | – | – | – | – | – | – | – |
| <i>PSK5</i> | – | + | – | – | – | – | + |
| <i>PSKR1</i> | + | + | + | – | – | + | + |

mainly through regulation of cell size (Kutschmar et al. 2009). Thus, during growth of undifferentiated cells, PSK signaling appears to target mainly cell proliferation, whereas in organ growth PSK signaling appears to regulate mainly cell size.

Taken together, the results presented provide new insights into the biological functions of PSK signaling. PSK-dependent proliferation of undifferentiated plant cells is required for the promotion of crown gall growth by pathogenic *Agrobacterium tumefaciens*. Induction of PSK and PSK receptor genes after fungal infection further support a function of PSK signaling in the defense against pathogens.

Acknowledgments – This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

References

- Aldea M, Hamilton JG, Resti JP, Zangerl AR, Berenbaum MR, Frank TD, Delucia EH (2006) Comparison of photosynthetic damage from arthropod herbivory and pathogen infection in understory hardwood saplings. *Oecologia* 149: 221–232
- Aloni R, Schwalm K, Langhans M, Ullrich CI (2003) Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta* 216: 841–853
- Aloni R, Wolf A, Feigenbaum P, Avni A, Klee H (1998) The never ripe mutant provides evidence that tumor-induced ethylene controls the morphogenesis of *Agrobacterium tumefaciens*-induced crown gall on tomato stems. *Plant Physiol* 117: 841–849
- Amano Y, Tsubouchi H, Shinohara H, Ogawa M, Matsubayashi Y (2007) Tyrosine-sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 18333–18338
- Bonfig KB, Schreiber U, Gabler A, Roitsch T, Berger S (2006) Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta* 225: 1–12
- Chinchilla D, Shan L, He P, de Vries S, Kemmerling B (2009) One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends Plant Sci* 14: 535–541
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448: 497–500
- Deeken R, Engelmann JC, Efetova M, Czirjak T, Müller T, Kaiser WM, Tietz O, Kruschke M, Mueller MJ, Palme K, Dandekar T, Hedrich R (2006) An integrated view of gene expression and solute profiles of *Arabidopsis* tumors: a genome-wide approach. *Plant Cell* 18: 3617–3634
- Efetova M, Zeier J, Riederer M, Lee CW, Stingl N, Mueller M, Hartung W, Hedrich R, Deeken R (2007) A central role of abscisic acid in drought stress protection of *Agrobacterium*-induced tumors on *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 145: 853–862
- Gallagher SR (1992) Plant gene expression. GUS-protocols Using the GUS-gene as a Reporter of Gene Expression. Academic Press, San Diego, pp 25–43
- Komori R, Amano Y, Ogawa-Ohnishi M, Matsubayashi Y (2009) Identification of tyrosylprotein sulfotransferase in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 15067–15072
- Kutschmar A, Rzewuski G, Stührwohldt N, Beemster GT, Inzé D, Sauter M (2008) PSK- α promotes root growth in *Arabidopsis*. *New Phytol* 181: 820–831
- Lee CW, Efetova M, Engelmann JC, Kramell R, Wasternack C, Ludwig-Müller J, Hedrich R, Deeken R (2009) *Agrobacterium tumefaciens* promotes tumor induction by modulating pathogen defense in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21: 2948–2962
- Link V, Sinha AK, Vashista P, Hofmann MG, Proels RK, Ehness R, Roitsch T (2002) A heat-activated MAP kinase in tomato: a possible regulator of the heat stress response. *FEBS Lett* 531: 179–183
- Lorbiecke R, Sauter M (2002) Comparative analysis of PSK peptide growth factor precursor homologs. *Plant Sci* 163: 321–332
- Matsubayashi Y, Ogawa M, Kihara H, Niwa M, Sakagami Y (2006) Disruption and overexpression of *Arabidopsis* phytosulfokine receptor gene affects cellular longevity and potential for growth. *Plant Physiol* 142: 45–53
- Matsubayashi Y, Ogawa M, Morita A, Sakagami Y (2002) An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine. *Science* 296: 1470–1472
- Matsubayashi Y, Sakagami Y (1996) Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7623–7627
- Matsubayashi Y, Takagi L, Omura N, Morita A, Sakagami Y (1999) The endogenous sulfated pentapeptide phytosulfokine- α stimulates tracheary element differentiation of isolated mesophyll cells of zinnia. *Plant Physiol* 120: 1043–1048
- Matsubayashi Y, Takagi L, Sakagami Y (1997) Phytosulfokine- α , a sulfated pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells by means of specific high- and low-affinity binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13357–13362
- Motose H, Iwamoto K, Endo S, Demura T, Sakagami Y, Matsubayashi Y, Moore KL, Fukuda H (2009) Involvement of phytosulfokine in the attenuation of

- stress response during the transdifferentiation of Zinnia mesophyll cells into tracheary elements. *Plant Physiol* 150: 437–447
- Scarpella E, Marcos D, Friml J, Berleth T (2006) Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. *Genes Dev* 20: 1015–1027
- Srivastava R, Liu J-X, Howell SH (2008) Proteolytic processing of a precursor protein for a growth-promoting peptide by a subtilisin serine protease in *Arabidopsis*. *Plant J* 56: 219–227
- Torii KU (2004) Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. *Int Rev Cytol* 234: 1–46
- Ullrich CI, Aloni R (2000) Vascularization is a general requirement for plant and animal tumours. *J Exp Bot* 51: 1951–1960
- Vielle-Calzada JP, Baskar R, Grossniklaus U (2000) Delayed activation of the paternal genome during seed development. *Nature* 404: 91–94
- Yadegari R, Paiva G, Laux T, Koltunow AM, Apuya N, Zimmerman JL, Fischer RL, Harada JJ, Goldberg RB (1994) Cell differentiation and morphogenesis are uncoupled in *Arabidopsis* raspberry embryos. *Plant Cell* 6: 1713–1729
- Yang H, Matsubayashi Y, Hagani H, Nakamura K, Sakagami Y (2001) Diversity of *Arabidopsis* genes encoding precursors for phyto­sulfokine, a peptide growth factor. *Plant Physiol* 127: 842–851
- Zou J, Rodriguez-Zas S, Aldea M, Li M, Zhu J, Gonzalez DO, Vodkin LO, DeLucia E, Clough SJ (2005) Expression profiling soybean response to *Pseudomonas syringae* reveals new defense-related genes and rapid HR-specific downregulation of photosynthesis. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 1161–1174

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. *PSK5:GUS* expression was induced by infiltration with *Alternaria brassicicola*.

Fig. S2. *PSK1*, *PSK2* and *PSK4* are not wound-induced in hypocotyls and leaves, and *PSKR1* is not wound-induced in leaves.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

KAPITEL 3

PSKR1 koordiniert das synchrone Wachstum des Fruchtknotens und der Staubblätter und trägt zur Pollenschlauchorientierung in *Arabidopsis thaliana* bei

Es wurde analysiert, ob der PSK Rezeptor PSKR1 während der Blütenentwicklung von *Arabidopsis* eine Funktion hat. Über Expressionsanalysen wurden Transkripte und Aktivität der Promotoren von PSK Präproprotein-Genen und von *PSKR1* in Staubblättern, Fruchtknoten und Pollen nachgewiesen, was darauf hindeutete, dass Synthese und Perzeption von PSK- α in diesen Geweben wahrscheinlich stattfinden. In den ersten zehn Schoten der homozygoten *PSKR1 Knockout* Pflanzen, *pskr1-2* und *pskr1-3*, war die Samenbildung um 50% reduziert. Da Antheren, Fruchtknoten, Samenanlagen, Embryo und Samen morphologisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden waren, wurde untersucht, ob das Pollenschlauchwachstum verändert war. Da die Pollenschläuche in nicht befruchteten Samenanlagen von *pskr1-2* und *pskr1-3* nicht entlang des Funikulus wuchsen, scheint PSKR1 für die funikulare Pollenschlauchorientierung erforderlich zu sein. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Staubblätter und Fruchtknoten in *pskr1-3* asynchron wuchsen. Die Staubblätter waren im Blütenstadium 14, zum Zeitpunkt der Befruchtung, um 360 μm kürzer als der Fruchtknoten. Dies könnte die Bestäubung der Blüte erschweren und damit zur reduzierten Samenbildung beitragen. Durch Handbestäubung wurde die Befruchtungsrate von *pskr1-3* um 30% erhöht, was bedeutet, dass der Transfer des Pollens auf das Stigma limitierend für die Befruchtung war. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass PSKR1 zur Pollenschlauchorientierung beiträgt und das synchrone Wachstum von Fruchtknoten und Staubblättern koordiniert.

Die Arbeiten zu diesem Manuskript wurden während der Doktorarbeit von Anke Kutschmar begonnen und von mir weitergeführt. Hierzu habe ich die Analysen zur Samenbildung in *pskr1-2* sowie heterozygote Kreuzungen von *pskr1-3* mit Wildtyp durchgeführt und die Befruchtungsraten bestimmt. Des Weiteren wurden die Expressionsanalysen von PSK Präproprotein-Genen und von *PSKR1* in Pollen und die Analysen der Fruchtknoten und Staubblätter in *pskr1-3* von mir durchgeführt.

1 **Title of the article:**

2

3 **Signaling through the phytosulfokine receptor PSKR1 coordinates pistil**
4 **and stamen elongation and aides in funicular pollen tube guidance in**
5 ***Arabidopsis thaliana***

6

7

8

9 Anke Kutschmar^{1#}, Xiongbo Peng^{2#}, Nils Stührwohldt^{1#}, Mengxiang Sun², Margret Sauter^{1*}

10

11

12

13 ¹ Physiologie und Entwicklungsbiologie der Pflanzen, Botanisches Institut, Universität Kiel,
14 Am Botanischen Garten 5, 24118 Kiel, Germany

15 ² Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, College of Life Science, Wuhan
16 University, P. R. China

17

18

19 **Footnote:** This work has been supported the Deutsche Forschungsgemeinschaft and by the
20 National Basic Research Program of China (2007CB947600 to XP).

21

1 **Abstract**

2

3 Phytosulfokine- α (PSK- α) is a signaling peptide that is perceived by membrane-bound
4 leucine-rich repeat receptor kinases. In the homozygous allelic knock out lines *pskr1-2/pskr1-*
5 *2* and *pskr1-3/pskr1-3* of PSKR1, reduced seed formation by ~50% was observed. Anthers,
6 pistils and ovules did not display morphological abnormalities and ovules, embryos, and seeds
7 developed normally in *pskr1-3/pskr1-3*. Pollen tube growth through the transmitting tissue of
8 the style was not altered. However, no pollen tubes grew along the funiculus toward ovules
9 that had not been fertilized in *pskr1-2/pskr1-2* and *pskr1-3/pskr1-3*, indicating that PSK
10 signaling through PSKR1 may be required for funicular pollen tube guidance. In addition,
11 asynchronous elongation of stamen and carpel was observed in PSKR1 deficient flowers. This
12 resulted in stamen that were about 360 μm shorter than the pistil at time of pollination,
13 conceivably rendering pollen transfer physically difficult. Hand-pollination improved fertility
14 rates supporting the idea that pollen transfer to the stigma was limiting seed formation.
15 Promoter:GUS analysis showed expression of PSK precursor genes and of *PSKR1* in
16 filaments, carpels, and pollen indicating that these tissues were capable of synthesizing and/or
17 perceiving PSK- α . In summary, PSK- α signaling through PSKR1 contributes to pollen tube
18 guidance, and to synchronized elongation of anther and style.

19

20

1 **Introduction**

2

3

4 Peptide factors are important signaling components in plants. Their described functions
5 include defense signaling, meristem size and cell-cell recognition as mediated by systemin,
6 CLAVATA3 and SCR peptides (Boller, 2005; Matsubayashi, 2003; Matsubayashi et al.,
7 2001, Matsubayashi and Sakagami, 2006; Takayama and Isogai, 2003). Phytosulfokine- α
8 (PSK- α) is a pentapeptide of the sequence Tyr-Ile-Tyr-Thr-Gln that carries a sulfate group at
9 each of the two tyrosine side chains. PSK- α was first identified as a bioactive compound
10 responsible for the feeder effect (Matsubayashi and Sakagami, 1996). Plant cells kept in liquid
11 culture require a minimum density to undergo cell division. High cell density can be replaced
12 by conditioned medium taken from cultured cells. PSK- α was identified as the chemical
13 compound that exerts this feeder effect and was hence classified as a growth factor. In
14 *Arabidopsis thaliana*, root growth is promoted by PSK signaling through its receptors
15 (Matsubayashi et al., 2006). In roots, PSK-dependent growth was primarily supported by
16 enhanced cell elongation rather than cell division (Kutschmar et al., 2009).

17 PSK- α precursor genes were identified in monocot and dicot species and appear to be
18 ubiquitous in higher plants (Lorbiecke and Sauter, 2002; Yang et al., 2000). PSK- α is
19 processed from approximately 100 amino acid-long preproteins all of which have an ER
20 signal sequence that targets the product to the secretory pathway (Yang et al., 1999).
21 Perception of PSK- α is achieved through a plasma membrane-bound receptor protein
22 (Matsubayashi and Sakagami, 1999; 2000). A PSK receptor was first identified from carrot
23 and was shown to possess extracellular leucine rich repeats (LRR), separated by an island
24 domain, a single transmembrane region, and an intracellular Ser/Thr kinase domain
25 (Matsubayashi et al., 2002). Subsequently, two similarly structured LRR receptor kinases,
26 AtPSKR1 and AtPSKR2, were shown to act as PSK receptor in Arabidopsis (Matsubayashi et
27 al., 2006; Amano et al., 2007).

28 In callus derived from the Ds insertion mutant *pskr1-1*, specific binding of PSK- α was
29 significantly decreased. PSK signaling through AtPSKR1 was shown to promote callus
30 growth and to delay senescence (Matsubayashi et al., 2006). *AtPSKR1* appeared to be
31 expressed ubiquitously at low levels and PSK genes were shown to be expressed in vegetative
32 tissues but also in flowers (Matsubayashi et al., 2006) possibly indicating a role of PSK
33 signaling in reproduction.

1 Similar to the feeder effect observed in cultured plant cells, the pollen population
2 effect indicates that pollen kept *in vitro* at low density will not germinate but can be induced
3 to do so by addition of medium from a high-density pollen culture. In tobacco (*Nicotiana*
4 *tabacum* L.), addition of PSK- α to pollen cultured at low density promoted germination in a
5 dose-dependent manner (Chen et al., 2000). In maize (*Zea mays* L.), two PSK precursor genes
6 were shown to be specifically expressed in male and female gametophytes including male and
7 female gametes (Lorbiecke et al., 2005). This evidence supported the hypothesis that PSK- α
8 has a function in plant reproduction. To further elucidate such a role we analyzed reproductive
9 structures and reproductive success in the allelic Arabidopsis T-DNA insertion lines *pskr1-2*
10 and *pskr1-3* which lack transcripts of the PSK receptor *PSKR1*. We further specified
11 expression of PSK and PSKR1 genes in flowers of Arabidopsis. Our results indicate a role of
12 PSK peptide signaling in production and transfer of pollen, and in pollen tube guidance.

16 Results

18 Knock out of the PSK receptor gene *PSKR1* results in reduced seed formation in Arabidopsis

19
20 Arabidopsis plants of two allelic homozygous T-DNA insertion lines of the PSK receptor
21 gene *PSKR1*, *pskr1-2/pskr1-2* and *pskr1-3/pskr1-3*, were analyzed at the reproductive stage.
22 These lines were previously shown to have no detectable *PSKR1* transcripts (Matsubayashi et
23 al., 2006; Amano et al., 2007; Kutschmar et al., 2009). Phenotypic analysis revealed that
24 plants of both *pskr1/pskr1* lines had a larger number of small siliques than wild type (+/+).
25 This effect was strongest at the first siliques produced by the plants while flowers that
26 developed later showed a less severe phenotype (Fig. 1A). Formation of small siliques was a
27 result of reduced seed filling as shown for *pskr1-3/pskr1-3* (Fig. 1, B-D). To quantify this
28 reproductive effect, seed filling was analyzed in the first ten siliques of +/+, *pskr1-2/pskr1-2*,
29 and *pskr1-3/pskr1-3* plants (Fig. 1E and F; Table I). The percentage of siliques with a near
30 complete seed set (less than 10% undeveloped seeds) was significantly reduced by about 40%
31 in *pskr1-2/pskr1-2* and *pskr1-3/pskr1-3* as compared to +/+ plants. Conversely, the percentage
32 of undeveloped seeds was increased with a significantly higher frequency of >75%
33 undeveloped seeds in both *pskr1/pskr1* lines, and a significantly higher frequency of 10-25%
34 undeveloped seeds was observed in *pskr1-2/pskr1-2* as compared to +/+ (Fig. 1E and F;

1 student's *t*-test). Seeds that did develop were not phenotypically different in either
2 *pskr1/pskr1* line than in *+/+* (Fig. 1, B-D).

3

4 Reduced fertility in *pskr1-3/pskr1-3* is linked to defects in the pistil

5

6 To gain more insight into the cause(s) of reduced seed formation, crosses were
7 performed between homozygous *+/+* and *pskr1-3/pskr1-3* plants by hand-pollination (Table
8 I). Hand-pollination of *+/+* stigma with *+/+* pollen was overall a bit less successful than self-
9 pollination in *+/+*. Hand-pollination of *pskr1-3/pskr1-3* stigma with *pskr1-3/pskr1-3* pollen
10 improved seed production over self-pollinated *pskr1-3/pskr1-3* plants, indicating that transfer
11 of pollen in self-pollinated *pskr1-3/pskr1-3* plants may be impeded (Table I). Hand-
12 pollination of *pskr1-3/pskr1-3* with *pskr1-3/pskr1-3* pollen improved reproductive success but
13 did not fully restore it to *+/+* levels pointing to additional factor(s) that were affected in the
14 receptor knock out line. Two additional, reciprocal crosses were made. Cross-fertilization of
15 *+/+* flowers with *pskr1-3/pskr1-3* pollen largely restored fertility over *pskr1-3/pskr1-3* x
16 *pskr1-3/pskr1-3* crosses with more siliques containing a higher percentage of developed seeds
17 (Table I). By contrast, cross-fertilization of *pskr1-3/pskr1-3* flowers with *+/+* pollen did not
18 restore the mutant phenotype indicating that reduced seed production was to a large part
19 attributable to the female parent.

20 To distinguish between a sporophytic effect and a gametophytic effect we next
21 performed reciprocal crosses between homozygous flowers and heterozygous pollen and
22 analyzed the average seed filling in the first ten siliques of each plant. When *+/+* flowers were
23 crossed to heterozygous *pskr1-3/+* pollen, fertilization success was as high as with *+/+* x *+/+*
24 crosses. With *pskr1-3/pskr1-3* flowers crossed to either *pskr1-3/pskr1-3* or *+/+* pollen the
25 relative frequency of seed formation in hand-pollinated flowers was 65.2% and 66.7%,
26 whereas heterozygous *+/pskr1-3* flowers crossed to *+/+* pollen resulted in 83.2% seed set
27 (Table I). This is in accord with a gametophytic transmission, for which a 1:1 segregation of
28 the phenotype is expected meaning that seed formation would be reduced by ~17%
29 (homozygous *pskr1-3/pskr1-3* plants have ~34% reduced seed formation). Finally,
30 heterozygous *pskr1-3/+* plants were allowed to self-fertilize. In case of a purely gametophytic
31 effect, a seed set of 75% would be expected as the seed set in selfed homozygous *pskr1-3/pskr1-3*
32 plants was 50.2%. The observed value of 61% was however somewhat lower (Table
33 I, self-pollination). Overall, the results support the view that the *pskr1-3/pskr1-3* phenotype is
34 by and large caused by defects in the pistil and in the female gametophyte. The segregation

1 ratios observed in hand-pollinated flowers were compatible with a female gametophytic
2 effect. However, the segregation ratios of self-pollinated flowers disagree with a purely
3 female gametophytic transmission. The involvement of the female sporophyte in reproduction
4 success is supported by the observation that hand-pollination partially restored reproductive
5 failure suggestive of impaired pollen transfer. A sporophytic defect was therefore predicted to
6 partially account for reduced fertility.

7

8 PSK genes are differentially expressed in Arabidopsis flowers

9

10 Reduced seed formation in *pskr1-3/pskr1-3* indicated a role for PSK signaling during
11 reproduction. Expression of the five Arabidopsis PSK genes and of *PSKR1* was analyzed
12 using RT-PCR (Fig. 2) and a promoter:GUS approach (Fig. 3). RT-PCR data showed that
13 PSK genes were expressed throughout the plant life cycle including the reproductive phase
14 with *PSK1* expression being particularly high in roots (Fig. 2). To obtain a more detailed
15 picture, promoter activities were analyzed in flowers at anthesis and in developing fruits (Fig.
16 3). No GUS staining was detected in flowers and siliques of P_{PSK1} :GUS plants (Fig. 3, A-E)
17 coincident with results obtained by RT-PCR that *PSK1* was expressed predominately in roots.
18 Promoter activity of *PSK2* was detected at the tip of filaments (Fig. 3H) and at the flower base
19 in the vasculature of the nectaries (Figure 3I). Furthermore, *PSK2* was active in mature pollen
20 (Fig. 3G and H) as also confirmed by RT-PCR (Fig. 4A). *PSK2* was neither expressed in
21 female reproductive structures nor in developing seeds (Fig.3, F, G and J). The blue staining
22 observed on the stigma and in the style in Fig. 4G resulted from stained pollen and stained
23 pollen tubes, respectively. P_{PSK2} :GUS activity in growing pollen tubes was also detected in *in*
24 *vitro* germinated pollen (Fig. 4B). RT-PCR analysis indicated that *PSK2* was the only PSK
25 gene expressed at detectable levels in mature pollen (Fig.4A). Promoter activity of *AtPSK3*
26 was neither detected in mature anthers nor in pollen (Fig. 3, K and M). At anthesis, GUS
27 staining was observed in filaments mainly at the tip, in the pistil and in the flower stalk with
28 particularly strong staining at the pedicel to pistil transition (Fig.3, K, L and N). Weak diffuse
29 staining was detected in developing siliques (Fig. 3O). *PSK4* was active in the pistil, stamen
30 and flower stalk at anthesis (Fig.3, P-S). Developing P_{PSK4} :GUS seeds were stained blue (Fig.
31 3T) indicating a role for PSK- α not only in fertilization but also during seed development.
32 P_{PSK5} -driven GUS staining was detected in the vasculature of filaments and style (Fig. 3, U, V
33 and X), but not in pollen (Figs. 3W and 5A). In fruits, P_{PSK5} :GUS activity was confined to the
34 vasculature and was particularly high in nectaries (Fig. 3Y). Taken together, PSK precursor

1 genes are expressed in the male gametophyte and in the pistil supporting a role of PSK- α in
2 reproductive processes.

3

4 *PSKR1* is active in flowers

5

6 Previously published RNA blot data (Matsubayashi et al., 2006) and RT-PCR studies (Fig. 2)
7 indicated that *PSKR1* was expressed at overall low levels. *PSKR1* was expressed in shoots,
8 roots and flowers, and at lower abundance in young siliques (Fig. 2). P_{PSKR1} :GUS expression
9 in stamen was confined to the vasculature and the upper end of the filament strongly
10 resembling the expression patterns of *PSK3*, *PSK4*, and *PSK5*. Pollen did not display
11 detectable GUS activity (Fig. 3b and c) In the pistil, P_{PSKR1} :GUS activity was localized to
12 ovules and possibly the transmitting tract (Fig. 3b and d) whereas no GUS staining was
13 detected during fruit development in seeds or siliques except for the nectary region coincident
14 with very low *PSKR1* transcript levels amplified by RT-PCR from siliques (Fig. 2).

15 In summary, PSK signaling components appear to be synthesized in flowers with high
16 tissue specificity implicating that PSK signaling plays a role in flower development and/or
17 function. *PSK2* was specifically expressed in pollen whereas *PSK3* and *PSK4* were active in
18 the gynoecium. The PSK receptor gene *PSKR1* was transcribed in filaments but not in anthers
19 and particularly not in mature pollen, but was active in female reproductive structures. These
20 results support a role for PSK signaling in plant reproduction. Neither PSK genes nor *PSKR1*
21 were active in the stigma indicating that PSK signaling is likely not required for cell-cell
22 recognition during pollen-stigma-interaction.

23

24

25 Pollen tube attraction is disturbed in *pskr1-2/pskr1-2* and *pskr1-3/pskr1-3*

26

27 To study a possibly effect of PSK signaling on anther morphology, *+/+* and *pskr1-*
28 *3/pskr1-3* flowers were compared at two different developmental stages (classified according
29 to Sanders et al., 1999). In *+/+*, at anther development stage 7, tetrads have developed and are
30 surrounded by the tapetum, middle layer, endothecium, and epidermis in pollen sacs
31 (Supplemental Fig. S1A). At anther development stage 10 microspores have developed, the
32 middle layer is degenerated and tapetum degeneration is initiated while the endothecium and
33 epidermis persist. The stomium is clearly visible on each theca at this stage (Supplemental
34 Fig. S1C). At either stage, anthers of *+/+* and *pskr1-3/pskr1-3* plants did not show

1 morphological differences (Supplemental Fig. S1) and differences in development were not
2 observed.

3 To test if the *in situ* growth of pollen tubes was affected in *pskr1* knock out plants, +/+
4 and *pskr1-3/pskr1-3* flowers were hand-pollinated and pollen tubes were visualized by
5 staining with aniline blue 10 h after pollination (Fig. 5A and B). Although it was not possible
6 to measure the lengths of all pollen tubes that grew in each pistil, a difference in overall
7 pollen tube elongation was not observed between the two genotypes. Pollen tubes eventually
8 grew down the whole length of the pistil which is in agreement with the observation that
9 undeveloped seeds were found throughout *pskr1-3/pskr1-3* and also *pskr1-2/pskr1-2* siliques
10 and not just at one end (Fig. 1), as would be expected if pollen tube growth were arrested
11 prematurely.

12 Since growth of pollen tubes through the style occurred at comparable rates in +/+ and
13 *pskr1-3/pskr1-3*, it was next analyzed if pollen tube orientation was affected. Pollen tubes
14 were stained *in situ* after fertilization had occurred (Fig. 5C and D). In cases where *pskr1-*
15 *3/pskr1-3* ovules had not been fertilized, pollen tubes had not grown from the transmitting
16 tract toward the funiculus of these unfertilized ovules (Table II). On the other hand, some
17 pollen tubes had grown past these unfertilized ovules, again supporting the observation that
18 pollen tube extension through the transmitting tract was not prematurely arrested. This
19 phenotype was confirmed in *pskr1-2/pskr1-2*. Loss of funicular pollen tube guidance was
20 observed in 35.8% of *pskr1-2* flowers and in 21.6% of *pskr1-3* flowers as compared to 1% in
21 +/+ (Table II). Loss of micropylar guidance or pollen tubes that failed to enter the micropyle
22 were observed in 1% or less of all ovules. The results indicate that a distinct phase in pollen
23 tube guidance, i.e. the exit of the pollen tube from the transmitting tissue and growth along the
24 funiculus toward the ovule involves PSK signaling through PSKR1. Reduced fertility in *pskr1*
25 thus appears to be in part caused by reduced pollen tube attraction to the ovule.

26

27 *pskr1-3/pskr1-3* stamen are shorter than the pistil at time of fertilization

28

29 Reduced fertility was at least in part explained by loss of funicular pollen tube guidance.
30 However, improved fertilization efficiency was observed with hand-pollination over self-
31 pollination in *pskr1-3/pskr1-3* indicating that an additional defect might exist. To identify
32 possible morphological changes in *pskr1-3/pskr1-3* flowers that may be responsible for this
33 defect, cross sections were made of *pskr1-3/pskr1-3* and +/+ flowers (Supplemental Fig. S2).
34 These indicated no abnormalities in *pskr1-3/pskr1-3*. Stigmatic cells (Supplemental Fig. S2B

1 and C), organ organization and tissues in the gynoecium (Supplemental Fig. S2D and E), at
2 the flower base (Supplemental Fig. S2F and G), and tissue organization of the flower stalk
3 (Supplemental Fig. S2H and I) were phenotypically normal in *pskr1-3/pskr1-3*. Wild type
4 morphology of *pskr1-3/pskr1-3* gynoeciae was also confirmed in longitudinal sections (data
5 not shown).

6 We then looked at the development of the female gametophyte in *+/+* and in *pskr1-*
7 *3/pskr1-3* (Fig. 6; Supplemental Fig. S3). Development of embryo sacs in *pskr1-3/pskr1-3*
8 flowers prior to pollination was phenotypically normal (Fig. 6A and B; Supplemental Fig.
9 S3A and B). 2 days after pollination, essentially all ovules in *+/+* flowers had expanded,
10 whereas in *pskr1-3/pskr1-3* flowers small ovules were observed. In expanded, fertilized
11 ovules of either *+/+* or *pskr1-3/pskr1-3*, embryo development was observed (Fig. 6C, D;
12 Supplemental Fig. S3E and F).

13 In order to test if PSK signaling can occur in ovules, promoter:GUS lines were
14 employed. *PSK1* and *PSK2* were not expressed in the gynoecium (Fig. 3, A-J). *PSK5* was
15 expressed in the vasculature and in a dotted pattern in the pistil (Fig. 3U, V and X). *PSK3*
16 (Fig. 7A) and *PSK4* (Fig. 7E) promoters were active in ovules prior to and post-fertilization.
17 The *PSK3*:GUS signal was detected throughout the ovule before (Fig. 7A) and 2 days after
18 (Fig. 7B) pollination, albeit with increasing intensity after fertilization. Expression of
19 *PSK4*:GUS was localized near the micropyle prior to fertilization (Fig. 7E) and expanded
20 throughout the ovule after pollination (Fig. 7, E-H). Expanded expression was detected as
21 early as 24 h after pollination (Fig. 7F). Elevated *PSK4*:GUS staining was detected in the
22 developing embryo two and three days after pollination (Fig. 7G and H), and in developing
23 seeds (Fig. 3T). Expression analysis of the receptor gene *PSKR1* revealed local promoter
24 activity at the chalazal pole of the ovule before and after fertilization (Fig. 7C and D). In
25 summary, *PSK3*, *PSK4* and *PSKR1* are expressed in distinct patterns in the ovule prior to
26 fertilization possibly resulting in local gradients of PSK- α or its receptor PSKR1. Since *PSK3*,
27 *PSK4* and *PSKR1* promoters were also active in ovules after fertilization had occurred and in
28 the case of *PSK4* also in seeds, a function of PSK signaling in ovule and or seed development
29 seems likely.

30 We next studied flower morphology at the time of pollination at flower development
31 stages 13 to 15 (Roeder and Yanofsky, 2006). Whorl organization, flower organ numbers, and
32 overall morphology of flower organs were normal in the PSKR1-deficient mutant. However,
33 differences in stamen and style lengths were observed between wild type and *pskr1-3/pskr1-3*.
34 In wild type, filaments elongate between stages 13 and 14 to place stamen above the stigma

1 when anthers open to release pollen. This favours successful transfer of pollen from the
2 mature anther to the stigma and hence efficient self-pollination (Fig. 8A). After pollination,
3 the pistil elongates to make room for the developing seeds. In *pskr1-3/pskr1-3* plants, growth
4 of the filament was not sufficiently enhanced at flower stage 14 to close the distance between
5 stigma and anthers. Even though pistil elongation was delayed or reduced as well in *pskr1-*
6 *3/pskr1-3*, anthers remained about 360 μm below the stigma at time of pollination (Fig. 8A
7 and B).

8
9

10 **Discussion**

11

12 PSKR1 signaling is required for funicular pollen tube guidance

13

14 The maternal effect on reproduction that was observed in *pskr1* could result from impaired
15 pollen tube growth, from disturbed pollen tube guidance, from failed communication between
16 male and female gametophytes during fertilization, or be caused after fertilization. *PSKR1*,
17 *PSK3* and *PSK4* were active in the style including the ovules prior to and after fertilization
18 with expression patterns that are compatible with either scenario. Successful pollination
19 requires many recognition events and signals that need to be spatially and temporally
20 regulated (Sauter, 2009). Pollen tube guidance can be divided into a sporophytic phase with
21 pollen germination on the stigma and growth through the transmitting tract, and a
22 gametophytic phase when pollen tubes grow along the funiculus toward the female
23 gametophyte.

24 Staining of pollen tubes *in situ* indicated that growth of pollen tubes through the
25 transmitting tract was not impaired in *pskr1-3/pskr1-3* flowers. Furthermore, the seeds that
26 did develop in the knockout mutants were randomly distributed throughout the siliques. If
27 pollen tube growth were restrained, seeds would be expected to preferentially develop in the
28 upper half of the siliques.

29 When pollen tubes were stained after fertilization had occurred, it became obvious that
30 unfertilized ovules had not attracted a pollen tube from the stylar tissue to grow along the
31 funiculus and into the micropyle. Those embryos and seeds that did develop in *pskr1-3/pskr1-*
32 *3* had wild type phenotypes. From these results it is proposed that PSK signaling through
33 PSKR1 contributes to funicular pollen tube guidance. Gametophytic pollen tube guidance
34 depends on signals emitted from the embryo sac (Hülkamp et al., 1995; Shimizu and Okada,

1 2000). In a screen for female gametophytic mutants, Shimizu and Okada (2000) identified two
2 mutants, *maal* and *maa3*, in which pollen tubes grew along the funiculus but failed to enter
3 the micropyle. Based on this observation, it was suggested that the female gametophyte emits
4 a funicular guidance signal that directs the pollen tube along the funiculus and a micropylar
5 guidance signal that redirects the tube toward the micropyle when it comes within a short
6 distance to it. Laser ablation experiments in *Torenia fournieri* provided strong evidence that
7 synergid cells are main sources for the emission of female gametophytic pollen tube
8 attractants (Higashiyama et al., 2001; Kasahara et al., 2005). Knockout of the sperm cell-
9 specific *HAP2 (Hapless2)/GCS1 (Generative Cell Specific1)* gene results in infertility. *hap2*
10 pollen tubes lose their orientation once they approach the ovule and fail to fertilize the female
11 gametophyte (Mori et al., 2006; von Besser et al., 2006). Thus, guidance signals are not only
12 emitted by the female gametophyte and perceived by the vegetative pollen tube cell. Sperm
13 cells are actively involved in proper pollen tube guidance.

14 Mutants revealed that gametophytic pollen tube guidance from the transmitting tract to
15 the ovule involves multiple signals which may have overlapping functions (Palanivelu and
16 Preuss, 2006). Diffusible chemoattractants are signaling candidates in this process. The genes
17 identified in screens as being involved in gametophytic pollen tube guidance have however
18 not provided clear clues as to what the actual signaling molecules are, that are exchanged
19 between the ovule or female gametophyte and the pollen tube or sperm cells to ensure
20 successful fertilization. It was proposed that the signal should be a small, diffusible molecule.
21 PSK- α is a low molecular weight, highly hydrophilic, secreted molecule that is well suited to
22 perform such a function. Pollen did not express *PSKR1* indicating that they are likely not
23 equipped to perceive PSK through this receptor. By contrast, the PSK precursor gene *PSK2*
24 was expressed in pollen and in germinated pollen tubes providing evidence that the pollen
25 emits the diffusible PSK peptide. In order to elicit a response through PSKR1, this signal
26 must be perceived by maternal tissues. In fact, P_{PSKR1} :GUS activity was detected in ovules. It
27 is therefore proposed that PSK, emitted by the growing pollen tube acts as funicular guidance
28 signal that is perceived by maternal tissues such as the ovule through PSKR1. Possibly, the
29 maternal tissue releases factors in response to PSK perception that help guide or support
30 pollen tube growth. In support of this model, we found that knock out of *PSKR1* in maternal
31 tissues caused a reduction in fertility due to inefficient funicular pollen tube guidance.

32 The observation that knock out of *PSKR1* did not abolish pollen tube attraction but
33 rather lowered the rate of successful funicular guidance, points to an accessory role for
34 PSKR1 signaling in funicular guidance. Since multiple chemotropic signals seem to direct

1 pollen tubes along their path to the embryo sac, it is conceivable that mutations in one signal
2 pathway do not abolish but rather reduce successful guidance. PSK signaling appears to
3 contribute specifically to the long distance gametophytic guidance when the male
4 gametophyte needs to be redirected from the transmitting tissue toward an ovule. Aberrant
5 pollen tube growth along the funiculus or around the micropyle was not observed suggesting
6 that short-range micropylar guidance is not mediated by PSK- α .

7
8
9 Self-fertilization depends on synchronized elongation of stamen and pistil

10
11 Fertility of *pskr1-3/pskr1-3* was partially restored by hand-pollination pointing to a physical
12 constraint in the self-fertilization of PSK receptor knock out flowers. Length measurements of
13 stamen and style at flower development stages 13 to 15 showed that anthers had not reached
14 the stigma when pollination occurred. Stamen remained shorter than the pistil during flower
15 development. At anthesis, between flower development stages 13 and 14, filaments elongate
16 to place the anthers at the height of the stigma which facilitates pollen transfer (Roeder and
17 Yanosfsky, 2006). After pollination, the fruit elongates to make room for the growing seeds,
18 while stamen degenerate. In *pskr1-3/pskr1-3*, the pistil was longer at time of pollination
19 whereas the stamen remained shorter than in wild type. The increase in pistil length did not
20 make up for the reduced stamen elongation resulting in a gap between anthers and stigma at
21 time of fertilization. It was previously described, that PSK signaling controls root elongation
22 mainly through regulation of cell elongation (Amano et al., 2007; Kutschmar et al., 2009). It
23 is well conceivable that a similar growth control mechanism exists in filament elongation.
24 Regulation of pistil and stamen lengths are used naturally by plants as one strategy to promote
25 self-(in-)compatibility. Stamen that are shorter than pistils are physically handicapped in
26 placing pollen on the stigma within the same flower, which is therefore favoured to receive
27 pollen from adjacent plants. This strategy is used to promote cross-fertilization in the self-
28 incompatible species *Lycopersicon peruvianum* (Gasser and Robinson-Beers, 1993). PSKR1
29 and PSK genes are expressed in filaments and analysis of the *pskr-31* mutant revealed that
30 coordinated elongation of stamen and pistil at anthesis is under control of PSK signaling. As a
31 result of PSK signaling, self-fertilization is favoured in wild type Arabidopsis. Altering this
32 signaling pathway, e. g. through exogenous factors that affect PSK gene or PSK receptor
33 expression or through mutations, may be a means to shift temporally or permanently from

1 self-pollination to cross-pollination. This mechanism could contribute to enhanced genetic
2 diversity.

3

4 **Conclusion**

5

6 *pskr1/pskr1* mutants have a reduced seed set. Our data provide evidence that PSKR1 is
7 involved, for one, in coordinated elongation of stamen and pistil at the crucial time when
8 pollination occurs. Without PSKR1, stamen do not reach the stigma resulting in a reduced rate
9 of self-fertilization possibly with implications for cross-pollination. PSKR1 is further involved
10 in pollen tube guidance with a clear correlation between loss of funicular pollen tube guidance
11 and ovule development in *pskr1/pskr1* mutants. Taken together, PSK signaling through
12 PSKR1 contributes to successful reproduction in Arabidopsis.

13

14

15 **Materials and Methods**

16

17 Plant growth

18

19 Experiments were performed with *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia (Col-0). Plants
20 were grown in a 1:1 sand-humus mixture that was frozen at -80°C for 2 days to avoid insect
21 contamination and watered regularly with tap water. Prior to germination, seeds were
22 stratified at 4°C in the dark for 2 days and then transferred to a growth chamber under long-
23 day (16 h light/8 h dark) conditions.

24

25

26 Length measurements

27

28 To analyze lengths of pistils and stamen at time of fertilization, flowers at developmental
29 stages 13 (anthesis), 14 (pollination) and 15 (style elongation) according to Roeder and
30 Yanofsky (2006) were arbitrarily selected from among the first ten flowers produced. Stamen
31 and pistils were cut off at the flower base under a camera-equipped microscope (Olympus)
32 and lengths were determined from photographs using an internal size standard. For analysis of
33 stamen length only the four longer stamen were considered.

34

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

pskr1 mutant analysis

The *pskr1-2* T-DNA insertion line Sail_673_H07 and the *pskr1-3* T-DNA insertion line SALK_008585 from *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia-0 were obtained from NASC (University of Nottingham, UK). The T-DNA is inserted 48 bp (*pskr1-2*), and 2337 bp (*pskr1-3*) downstream of the start codon of the intronless *PSKR1* gene and leads to loss of detectable *PSKR1* mRNA in the homozygous lines (Amano et al., 2007; Kutschmar et al., 2009). All experiments were carried out on homozygous lines unless specific crosses with heterozygotes were made as indicated. The female parent is always noted first. Seed formation after self-fertilization or hand-pollination was analyzed in the first 10 or 15 siliques formed as indicated in Table I. Pollen tube guidance, and pistil and stamen lengths were analyzed in the first 10 siliques formed.

Reverse transcription-polymerase chain reaction

Total RNA was isolated from shoots and roots of 8 day-old seedlings and 14 day-old plants, juvenile leaves, the first and second inflorescence (<10 mm), flowers of 22 day-old plants, and from stems, cauline leaves, mature leaves, siliques and roots of 36 day-old wild type Col-0 plants with Tri-Reagent following manufacturer instructions (Sigma-Aldrich). Five µg of DNase treated RNA (MBI Fermentas) were reverse transcribed with oligo dT primers (Invitrogen) and used for PCR amplification. *ACT2* was amplified with gene specific primers and used as a control. For PCR amplification of transcripts from *PSK1*, *PSK2*, *PSK3*, *PSK4*, *PSK5*, cDNA reverse transcribed from 0.5 µg RNA was used. For *PSKR1* transcripts cDNA from 1 µg RNA, and for *ACT2* transcripts cDNA from 0.05 µg RNA were used. To distinguish between fragments derived from cDNA and genomic DNA, gene specific oligonucleotides were positioned to include an intron, except for the intronless *PSKR1*. PCR was carried out as described previously (Kutschmar et al., 2009).

Cloning of promoter:GUS vectors, transformation and histochemical Gus detection

1 For expression analysis of PSK genes and of the PSK receptor gene *PSKR1* by
2 promoter:Gus analysis genomic fragments were amplified upstream of the start codon by PCR
3 as and cloned as described (Kutschmar et al., 2009). For each construct several GUS
4 expressing lines were analyzed. GUS assays were performed as described (Vielle-Calzada et
5 al. 2000). Stained plant material was cleared (Yadegari et al. 1994) and observed under
6 bright-field illumination using a Leica DM LS microscope (Leica Microsystems).

7 To obtain tissue sections, 14 day-old cleared plants were washed and dehydrated using
8 an ethanol series (30%, 50%, 70%, 90% and 100%) for 60 min at each step. Plants were
9 embedded in Technovit 7100 according to manufacturers' instructions (Heraeus Kulzer). Ten
10 µm-thick sections were cut with a Leica RM 2255 microtome and analyzed using a Leica DM
11 LS microscope. Images were taken with a Leica DC 300F camera and Leica IM 500 software
12 (Leica Microsystems) and processed using Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Inc.).

13 14 15 Histological analysis

16
17 *In vivo* grown pollen tubes were stained with aniline blue and photographed. To obtain tissue
18 sections, 14 day-old cleared flowers were washed and dehydrated using an ethanol series
19 (30%, 50%, 70%, 90% and 100%) for 60 min at each step. Flowers were embedded in
20 Technovit 7100 according to manufacturers instructions (Heraeus Kulzer). Ten µm thick
21 sections were cut with a Leica RM 2255 microtome and analyzed using a Leica DM LS
22 microscope. For analysis of inflorescences 5 to 6 week-old wild type and *pskr1-3* plants were
23 embedded and cross sections were made as described above. After staining with 0.05% (w/v)
24 toluidine blue sections were observed under bright-field optics using a Leica DM LS
25 microscope. Images were taken with a Leica DC 300F camera and Leica IM 500 software
26 (Leica Microsystems) and processed using Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Inc.).

27 For analysis of ovules before and after fertilization, flowers at development stages 12
28 to 14 (Roeder and Yanofsky, 2006) of wild type and *pskr1-3* were fixed over night in a 9:1
29 (v:v) ethanol/acetic acid mixture and subsequently washed with 90% and 70% ethanol. After
30 clearing of tissues as described (Yadegari et al., 1994) whole ovules were isolated and
31 analyzed with a microscope equipped with Normarski optics (Axiophot, Zeiss) under
32 differential interference contrast. Images were taken using a Olympus DP 71 camera and the
33 Olympus Cell^F software (Olympus).

1 **Statistics**

2

3 Data were statistically analyzed using the Mann-Whitney test (U test) supplied by the internet
4 programs <http://eatworms.swmed.edu/~leon/stats/utest.html> (Leon Avery, Southwestern
5 Medical Center, Dallas, TX USA) and <http://faculty.vassar.edu/lowry/utest.html> (Richard
6 Lowry, Vassar College, Poughkeepsie, NY USA), or by student's *t*-test as indicated in the
7 results section.

8

9

10 **Acknowledgement**

11

12 Authors would like to thank Timo Staffel for expert technical assistance, and Dr. Birgit
13 Kemmerling (Universität Tübingen, Germany) for supplying homozygous *pskr1-2/pskr1-2*
14 seeds.

15

1 **Literature cited**

2

3 **Amano Y, Tsubouchi H, Shinohara H, Ogawa M, Matsubayashi, Y** (2007) Tyrosine-
4 sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in Arabidopsis. Proc
5 Natl Acad Sci USA **104**: 18333-18338

6 **Boller T** (2005) Signalling in plant development and self/non-self perception. Curr Opin Cell
7 Biol **17**: 116-22

8 **Chen Y-F, Matsubayashi Y, Sakagami Y** (2000) Peptide growth factor phytosulfokine- α
9 contributes to the pollen population effect. Planta **211**: 752-755

10 **Gasser CS, Robinson-Beers K** (1993) Pistil development. Plant Cell **5**: 1231-1239

11 **Higashiyama T, Yabe S, Sasaki N, Nishimura Y, Miyagishima S, Kuroiwa H, Kuroiwa T**
12 (2001) Pollen tube attraction by the synergid cell. Science **293**: 1480-1483

13 **Hülkamp M, Schneitz K, Pruitt RE** (1995) Genetic evidence for a long-range signal that
14 directs pollen tube guidance in Arabidopsis. Plant Cell **7**, 57-64

15 **Kasahara RD, Portereiko MF, Sandaklie-Nikolova L, Rabiger DS, Drews, GN** (2005)
16 *MYB98* is required for pollen tube guidance and synergid cell differentiation in Arabidopsis.
17 Plant Cell **17**: 2981-2992

18 **Kutschmar A, Rzewuski G, Stührwohldt N, Beemster GST, Inzé D, Sauter M** (2009)
19 PSK- α promotes root growth in Arabidopsis. New Phytol **181**: 820-831

20 **Lorbiecke R, Steffens M, Tomm JM, Scholten S, von Wiegen P, Kranz E, Wienand U,**
21 **Sauter M** (2005) Phytosulphokine gene regulation during maize (*Zea mays* L.) reproduction.
22 J Exp Bot **56**: 1805-1819

23 **Lorbiecke R, Sauter M** (2002) Comparative analysis of PSK peptide growth factor precursor
24 homologs. Plant Sci **163**: 321-332

25 **Matsubayashi Y** (2003) Ligand-receptor pairs in plant peptide signaling. J Cell Sci **116**:
26 3863-3870

27 **Matsubayashi Y, Ogawa M, Morita A, Sakagami Y** (2002) An LRR receptor kinase
28 involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine. Science **296**: 1470-1472

29 **Matsubayashi Y, Ogawa M, Kihara H, Niwa M, Sakagami Y** (2006) Disruption and
30 overexpression of Arabidopsis phytosulfokine receptor gene affects cellular longevity and
31 potential for growth. Plant Physiol **142**: 45-53

32 **Matsubayashi Y, Sakagami Y** (1996) Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the
33 proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. Proc Natl Acad Sci USA
34 **93**: 7623-7627

- 1 **Matsubayashi Y, Sakagami Y** (1999) Characterization of specific binding sites for a
2 mitogenic sulfated peptide, phytosulfokine- α , in the plasma membrane fraction derived from
3 *Oryza sativa* L. Eur J Biochem **262**: 666-671
- 4 **Matsubayashi Y, Sakagami Y** (2000) 120- and 160-kDa receptors for endogenous mitogenic
5 peptide, phytosulfokine- α , in rice plasma membranes. J Biol Chem **275**: 15520-15525
- 6 **Matsubayashi Y, Sakagami Y** (2006) Peptide hormones in plants. Annu Rev Plant Biol **57**:
7 649-74
- 8 **Matsubayashi Y, Yang H, Sakagami Y** (2001) Peptide signals and their receptors in higher
9 plants. Trends Plant Sci **6**: 573-577
- 10 **Mori T, Kuroiwa H, Higashiyama T, Kuroiwa T** (2006) GENERATIVE CELL SPECIFIC
11 1 is essential for angiosperm fertilization. Nat Cell Biol **8**: 64-71
- 12 **Palanivelu R, Preuss D** (2006) Distinct short-range ovule signals attract or repel *Arabidopsis*
13 *thaliana* pollen tubes *in vitro*. BMC Plant Biol **6**: 7-16
- 14 **Roeder AHK, Yanofsky MF** (2006) Fruit development in Arabidopsis. The Arabidopsis
15 book. American Society of Plant Biologists
- 16 **Sanders PM, Bui AQ, Weterings K, McIntire KN, Hsu Y-C, Lee PY, Truong MT, Beals**
17 **TP, Goldberg RB** (1999) Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile
18 mutants. Sex Plant Reprod **11**: 297-322
- 19 **Sauter M** (2009) A guided tour: Pollen tube orientation in flowering plants. Chinese Sci Bull
20 **54**: 2376-2382
- 21 **Shimizu KK, Okada K** (2000) Attractive and repulsive interactions between female and
22 male gametophytes in Arabidopsis pollen tube guidance. Development **127**: 4511-4518
- 23 **Takayama S, Isogai A** (2003) Molecular mechanism of self-recognition in *Brassica* self-
24 incompatibility. J Exp Bot **54**: 149-156
- 25 **von Besser K, Frank AC, Johnson MA, Preuss D** (2006) Arabidopsis HAP2 (GCS1) is a
26 sperm-specific gene required for pollen tube guidance and fertilization. Development **133**:
27 4761-4769
- 28 **Yang H, Matsubayashi Y, Nakamura K, Sakagami Y** (1999) *Oryza sativa* PSK gene
29 encodes a precursor of phytosulfokine- α , a sulfated peptide growth factor found in plants.
30 Proc Natl Acad Sci USA **96**: 13560-13565
- 31 **Yang H, Matsubayashi Y, Hagani H, Nakamura K, Sakagami Y** (2000) Diversity of
32 Arabidopsis genes encoding precursors for phytosulfokine, a peptide growth factor. Plant
33 Physiol **127**: 842-851
- 34

1 **Figure legends**

2

3 **Figure 1: *pskr1-2/pskr1-2* and *pskr1-3/pskr1-3* plants produce fewer seeds.**

4 The first siliques produced by a representative **A**, wild type (+/+), **B**, *pskr1-2/pskr1-2*, and **C**,
5 *pskr1-3/pskr1-3* plant are shown from the oldest (to the left) to the youngest silique (to the
6 right). Siliques were cut open and seeds from **B**, +/+, and **C, D**, *pskr1-3/pskr1-3* are shown. **C**
7 shows one of the first three siliques formed. **D** shows a younger silique. Black stars indicate
8 undeveloped seeds. **E**, Siliques from +/+ and *pskr1-2/pskr1-2* plants or **F**, from +/+ and *pskr1-*
9 *3/pskr1-3* plants were classified in groups of less than 10%, 10-25%, 25-50%, 50-75%, and
10 more than 75% undeveloped seeds, and the percentage of siliques in each group was
11 calculated. Results are averages (\pm SE) of (**E**) 300 siliques and (**F**) 150 siliques analyzed per
12 genotype. Values at <10% and 75-100% are significantly different in both *pskr1* lines as
13 compared to +/+, as is the 10-25% value in *pskr1-2/pskr1-2* ($P < 0.001$, student's *t*-test).

14

15

16 **Figure 2: RT-PCR analysis of PSK precursor genes and *PSKR1* expression in**
17 **Arabidopsis.**

18 Expression of *PSK1*, *PSK2*, *PSK3*, *PSK4*, *PSK5*, and *PSKR1* was analyzed in vegetative and
19 reproductive tissues of Arabidopsis. Primers were selected such that the amplified products
20 from genomic DNA included an intron. The *PSKR1* gene is intronless as indicated by the
21 same-size band from cDNA and genomic DNA. As a control for RNA input, transcripts of the
22 actin gene *ACT2* were amplified.

23

24 **Figure 3: Promoter:GUS analyses of PSK precursor genes and *PSKR1* expression in**
25 **flowers.**

26 Promoter activities of **A-E**, *PSK1*, **F-J**, *PSK2*, **K-O**, *PSK3*, **P-T**, *PSK4*, **U-Y**, *PSK5*, and **a-e**,
27 *PSKR1* were analyzed in flowers at pollination (rows 1-4: flower development stage 14
28 according to Roeder and Yanofsky, 2006) and (last row) in siliques in the respective P:GUS
29 lines. The first row shows a flower with petals and sepals removed. The second row shows the
30 top of the carpel including the stigma. The third row shows an anther and the upper part of the
31 filament. Rows four and five show the pistil and fruit, respectively, at the pedicel to carpel
32 transition including nectaries. GUS staining patterns were confirmed in 4 to 11 independent
33 lines per genotype.

34

1 **Figure 4: *PSK2* is expressed in pollen.**

2 **A**, RT-PCR was performed on RNA isolated from mature pollen to detect transcripts of
3 *PSK1*, *PSK2*, *PSK3*, *PSK4*, *PSK5*, and *PSKR1*. The data confirmed the results obtained from
4 P:GUS analysis in that only *PSK2* was expressed at detectable levels. **B**, Pollen of P_{*PSK2*}:GUS
5 was allowed to germinate and then stained for GUS activity. Blue staining was detected in the
6 pollen and in the growing pollen tube.

7
8 **Figure 5: Pollen tube orientation is affected in *pskr1-3/pskr1-3*.**

9 Flowers from **A**, wild type (+/+) and **B**, *pskr1-3/pskr1-3* were pollinated and pollen tubes
10 were stained with aniline blue 10 hours after pollination. No obvious differences in pollen
11 tube germination or *in situ* growth rates were observed. **C**, +/+ and **D**, *pskr1-3/pskr1-3*
12 flowers were pollinated and pollen tubes in the ovaries were stained 2 days after pollination
13 when fertilization was completed. No pollen tubes had grown to *pskr1-3/pskr1-3* ovules that
14 had not been fertilized, i. e. had not expanded in size (white cross). Other pollen tubes had
15 grown past these unfertilized ovules.

16
17 **Figure 6: Female gametophyte development appears normal in *pskr1-3/pskr1-3*.**

18 Ovules from **A**, **C**, *pskr1-3/pskr1-3* and **B**, **D**, wild type (+/+) were isolated with female
19 gametophytes at stage FG6 (A, B), or 2 days after pollination (C, D). Embryo sacs in *pskr1-*
20 *3/pskr1-3* had the expected number of cells or nuclei. AC: apical cell, AN: antipodal cell
21 nucleus, EN: egg cell nucleus, CCN: central cell nuclei, SN: synergid nucleus.

22
23
24 **Figure 7: Two PSK precursor genes and *PSKR1* are expressed in ovules.**

25 **A**, **B**, P_{*PSK3*}:GUS ovules before (A) or 2 days after (B) pollination. **C**, **D**, P_{*PSR1*}:GUS ovules
26 before (C) or 2 days after (D) pollination. **E-H**, P_{*PSK4*}:GUS ovules before pollination (E), 1
27 day (F), 2 days (G), or 3 days (H) after pollination. Female gametophytes in (A,C,E) were at
28 stage FG7.

29
30 **Figure 8: Anthers of *pskr1-3/pskr1-3* flowers do not reach the stigma at time of**

31 **fertilization.** **A**, Flowers at flower development stages 13 (anthesis), 14 (pollination) and 15
32 (pistil elongation) according to Roeder and Yanosfky (2006) are shown from wild type (+/+) (top) and
33 *pskr1-3/pskr1-3* (bottom). Orange arrow tips point out the positions of stigma and
34 anthers. **B**, Pistil (top), and stamen (middle) lengths were measured from +/+ and *pskr1-*

1 *3/pskr1-3* flowers and the differences in length (bottom) were calculated at flower
2 development stages 13, 14 and 15 from the first 10 flowers formed. 15 to 20 flowers from 15
3 to 20 plants plants per stage and genotype were analyzed. For stamen analysis, only the four
4 longer of the six stamen were considered for analysis. While pistils were significantly longer
5 in *pskr1-3/pskr1-3* at stages 14 and 15, growth of stamen was significantly reduced at all
6 stages (student's *t*-test, $P < 0.001$). As a result of the altered growth of pistil and stamen,
7 anthers were placed about 360 μm below the stigma at time of fertilization (stage 14). This
8 result was confirmed in an experiment using flowers 1 to 3.

9

10

11

1 **TABLES**

2

3 **Table I:** Frequencies of seed formation from crosses between homozygous or heterozygous
 4 wild type (+/+) and *pskr1-3/pskr1-3* parents after self-pollination or hand-pollination. For
 5 each cross performed the frequency of the control cross between +/+ parents was set to 100%.
 6 n indicates the number of siliques analyzed; ¹indicates analysis of the 15 oldest siliques;
 7 ²indicates analysis of the 10 oldest siliques.

8

| | Female | Male | Frequency of developed seeds [%] | n |
|------------------|------------------------|------------------------|----------------------------------|-------------------|
| Self-pollination | +/+ | +/+ | 100 | 151 ¹ |
| | <i>pskr1-3/pskr1-3</i> | <i>pskr1-3/pskr1-3</i> | 50.2 | 148 ¹ |
| | <i>pskr1-3/+</i> | <i>pskr1-3/+</i> | 61.1 | 1071 ² |
| Hand-pollination | +/+ | +/+ | 100 | 138 ¹ |
| | <i>pskr1-3/pskr1-3</i> | <i>pskr1-3/pskr1-3</i> | 65.2 | 76 ¹ |
| | +/+ | <i>pskr1-3/pskr1-3</i> | 92.6 | 121 ¹ |
| | <i>pskr1-3/pskr1-3</i> | +/+ | 66.7 | 95 ¹ |
| | +/+ | <i>+/pskr1-3</i> | 102.6 | 32 ² |
| | <i>+/pskr1-3</i> | +/+ | 83.2 | 32 ² |

9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23

1 **Table II: Funicular pollen guidance is impaired in *pskr1-2/pskr1-2* and *pskr1-3/pskr1-3*.**

2 The percentage of ovules which were fertilized was determined and unfertilized ovules were
3 classified into three groups: loss of funicular guidance, loss of micropylar guidance, and
4 pollen tubes (PT) that entered the micropyle. Experiments were repeated three times with at
5 least 229 ovules analyzed for wild type (+/+), 206 ovules analyzed for *pskr1-2/pskr1-2*, and
6 209 ovules analyzed for *pskr1-3/pskr1-3* in each experiment.

7

| Genotype | Fertilized ovules (%) | Unfertilized ovules (%) | | |
|------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------|
| | | Loss of funicular guidance | Loss of micropylar guidance | PT enters micropyle |
| +/+ | 99.0 (± 0.2) | 1.0 (± 0.2) | 0 | 0 |
| <i>pskr1-2/pskr1-2</i> | 63.4 (± 3.2) | 35.8 (± 3.3) | 0 | 1.0 (± 0.2) |
| <i>pskr1-3/pskr1-3</i> | 77.1 (± 8.4) | 21.6 (± 9.1) | 0.6 (± 0.7) | 0.7 (± 0.2) |

8

Figure 1

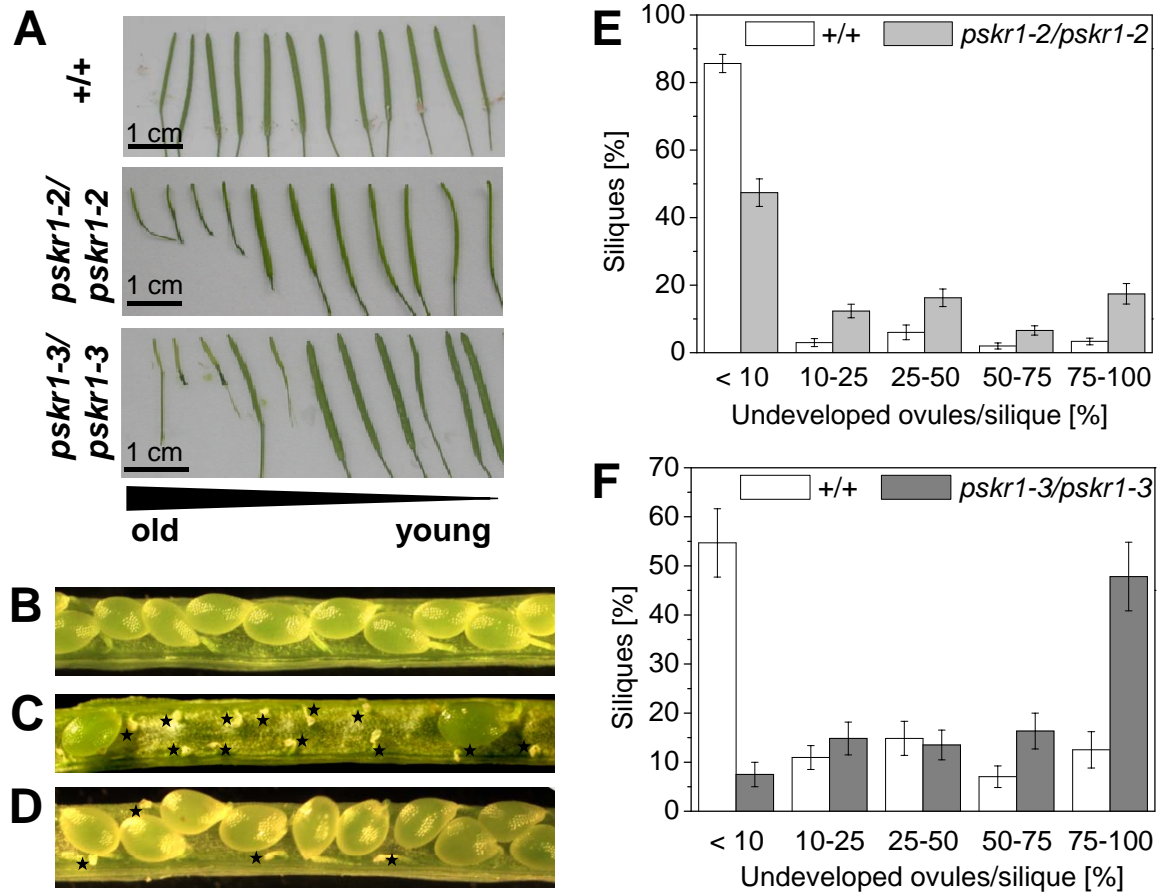


Figure 1: *pskr1-2/pskr1-2* and *pskr1-3/pskr1-3* plants produce fewer seeds.

The first siliques produced by a representative **A**, wild type (+/+), **B**, *pskr1-2/pskr1-2*, and **C**, *pskr1-3/pskr1-3* plant are shown from the oldest (to the left) to the youngest silique (to the right). Siliques were cut open and seeds from **B**, +/+, and **C**, **D**, *pskr1-3/pskr1-3* are shown. **C** shows one of the first three siliques formed. **D** shows a younger silique. Black stars indicate undeveloped seeds. **E**, Siliques from +/+ and *pskr1-2/pskr1-2* plants or **F**, from +/+ and *pskr1-3/pskr1-3* plants were classified in groups of less than 10%, 10-25%, 25-50%, 50-75%, and more than 75% undeveloped seeds, and the percentage of siliques in each group was calculated. Results are averages (\pm SE) of (**E**) 300 siliques and (**F**) 150 siliques analyzed per genotype. Values at <10% and 75-100% are significantly different in both *pskr1* lines as compared to +/+, as is the 10-25% value in *pskr1-2/pskr1-2* ($P < 0.001$, student's *t*-test).

Figure 2

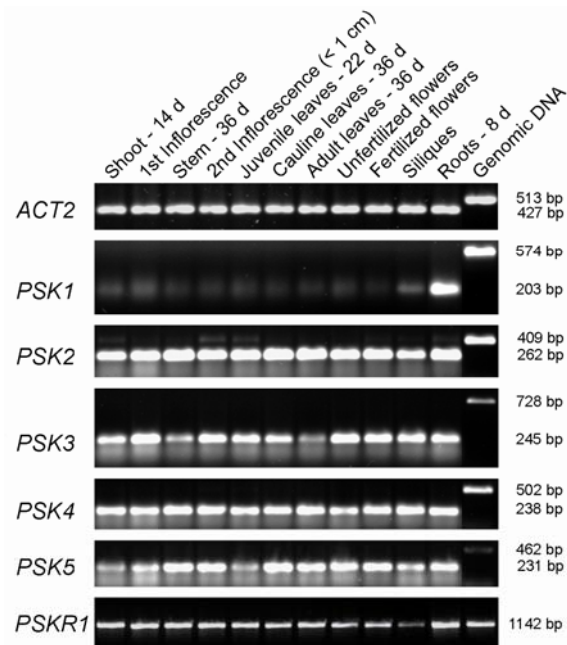


Figure 2: RT-PCR analysis of PSK precursor genes and *PSKR1* expression in Arabidopsis.

Expression of *PSK1*, *PSK2*, *PSK3*, *PSK4*, *PSK5*, and *PSKR1* was analyzed in vegetative and reproductive tissues of Arabidopsis. Primers were selected such that the amplified products from genomic DNA included an intron. The *PSKR1* gene is intronless as indicated by the same-size band from cDNA and genomic DNA. As a control for RNA input, transcripts of the actin gene *ACT2* were amplified.

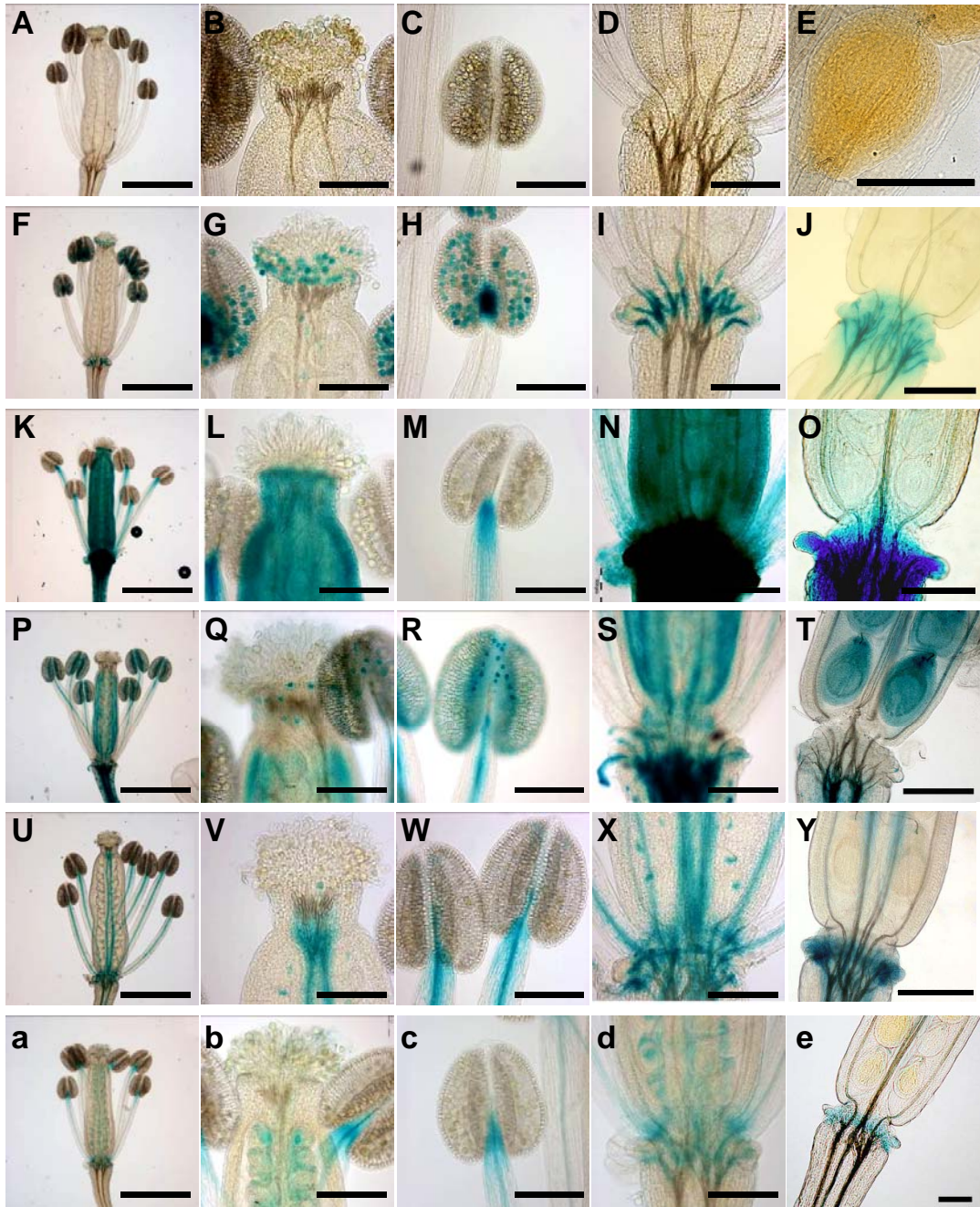


Figure 3: Promoter:GUS analyses of PSK precursor genes and *PSKR1* expression in flowers.

Promoter activities of **A-E**, *PSK1*, **F-J**, *PSK2*, **K-O**, *PSK3*, **P-T**, *PSK4*, **U-Y**, *PSK5*, and **a-e**, *PSKR1* were analyzed in flowers at pollination (rows 1-4: flower development stage 14 according to Roeder and Yanofsky, 2006) and (last row) in siliques in the respective P:GUS lines. The first row shows a flower with petals and sepals removed. The second row shows the top of the carpel including the stigma. The third row shows an anther and the upper part of the filament. Rows four and five show the pistil and fruit, respectively, at the pedicel to carpel transition including nectaries. GUS staining patterns were confirmed in 4 to 11 independent lines per genotype.

Figure 4

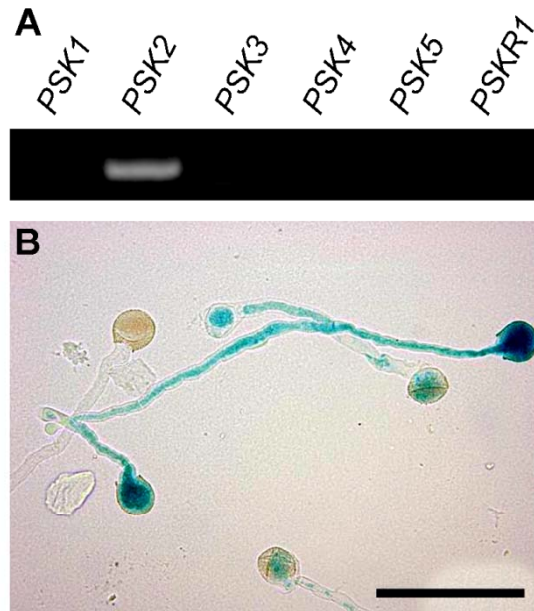


Figure 4: *PSK2* is expressed in pollen.

A, RT-PCR was performed on RNA isolated from mature pollen to detect transcripts of *PSK1*, *PSK2*, *PSK3*, *PSK4*, *PSK5*, and *PSKR1*. The data confirmed the results obtained from P:GUS analysis in that only *PSK2* was expressed at detectable levels. **B**, Pollen of P_{PSK2} :GUS was allowed to germinate and then stained for GUS activity. Blue staining was detected in the pollen and in the growing pollen tube.

Figure 5

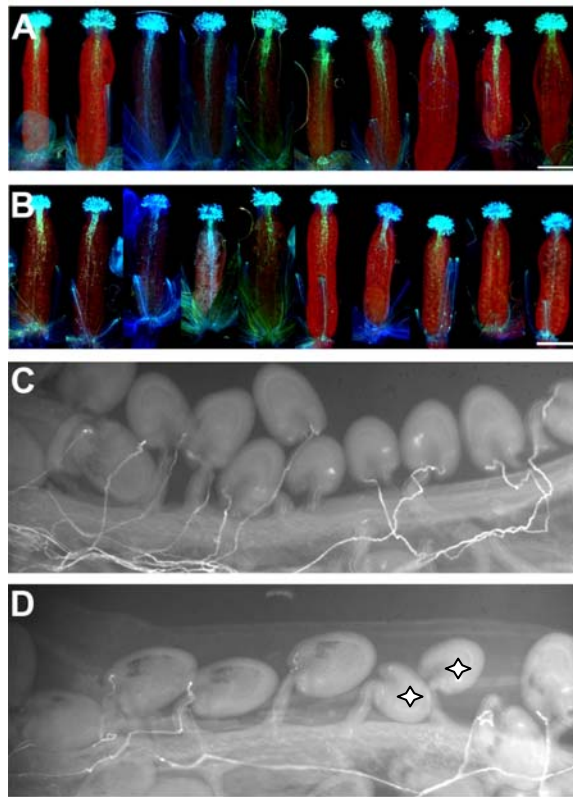


Figure 5: Pollen tube orientation is affected in *pskr1-3/pskr1-3*.

Flowers from **A**, wild type (+/+) and **B**, *pskr1-3/pskr1-3* were pollinated and pollen tubes were stained with aniline blue 10 hours after pollination. No obvious differences in pollen tube germination or *in situ* growth rates were observed. **C**, +/+ and **D**, *pskr1-3/pskr1-3* flowers were pollinated and pollen tubes in the ovaries were stained 2 days after pollination when fertilization was completed. No pollen tubes had grown to *pskr1-3/pskr1-3* ovules that had not been fertilized, i. e. had not expanded in size (white cross). Other pollen tubes had grown past these unfertilized ovules.

Figure 6

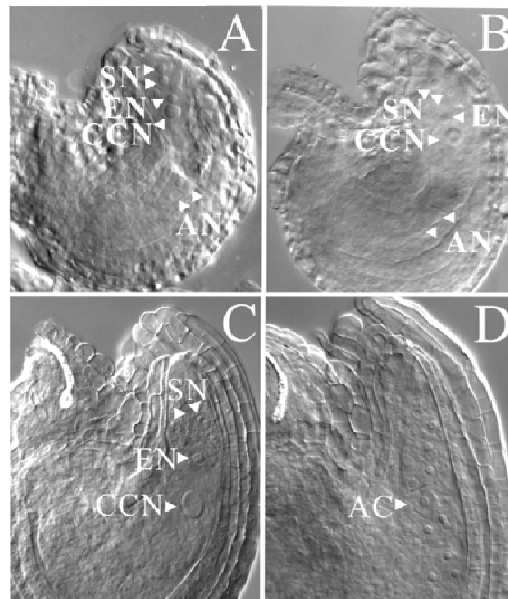


Figure 6: Female gametophyte development appears normal in *pskr1-3/pskr1-3*.

Ovules from **A, C**, *pskr1-3/pskr1-3* and **B, D**, wild type (+/+) were isolated with female gametophytes at stage FG6 (A, B), or 2 days after pollination (C, D). Embryo sacs in *pskr1-3/pskr1-3* had the expected number of cells or nuclei. AC: apical cell, AN: antipodal cell nucleus, EN: egg cell nucleus, CCN: central cell nuclei, SN: synergid nucleus.

Figure 7

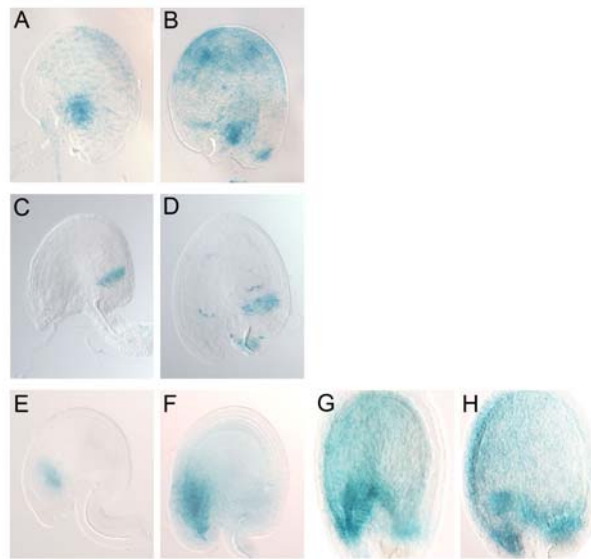


Figure 7: Two PSK precursor genes and *PSKR1* are expressed in ovules.

A, B, P_{PSK3} :GUS ovules before (A) or 2 days after (B) pollination. **C, D**, P_{PSRI} :GUS ovules before (C) or 2 days after (D) pollination. **E-H**, P_{PSK4} :GUS ovules before pollination (E), 1 day (F), 2 days (G), or 3 days (H) after pollination. Female gametophytes in (A,C,E) were at stage FG7.

Figure 8

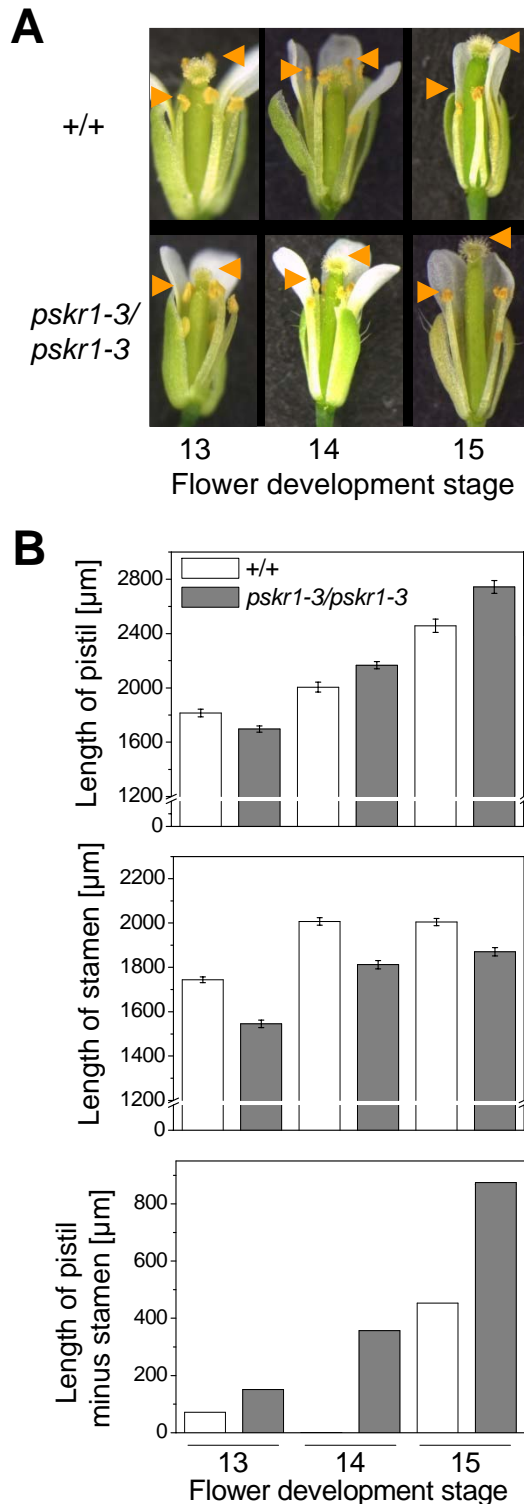


Figure 8: Anthers of *pskr1-3/pskr1-3* flowers do not reach the stigma at time of fertilization. **A**, Flowers at flower development stages 13 (anthesis), 14 (pollination) and 15 (pistil elongation) according to Roeder and Yanosfky (2006) are shown from wild type (+/+) (top) and *pskr1-3/pskr1-3* (bottom). Orange arrow tips point out the positions of stigma and anthers. **B**, Pistil (top), and stamen (middle) lengths were measured from +/+ and *pskr1-3/pskr1-3* flowers and the differences in length (bottom) were calculated at flower development stages 13, 14 and 15 from the first 10 flowers formed. 15 to 20 flowers from 15 to 20 plants plants per stage and genotype were analyzed. For stamen analysis, only the four longer of the six stamen were considered for analysis. While pistils were significantly longer in *pskr1-3/pskr1-3* at stages 14 and 15, growth of stamen was significantly reduced at all stages (student's *t*-test, $P < 0.001$). As a result of the altered growth of pistil and stamen, anthers were placed about 360 μm below the stigma at time of fertilization (stage 14). This result was confirmed in an experiment using flowers 1 to 3.

KAPITEL 4

In *Arabidopsis thaliana* fördert Phytosulfokin- α das Hypokotylwachstum über PSKR1

Es sollte untersucht werden, ob der PSK-Signalweg das Wachstum von *Arabidopsis* Hypokotylen steuert. PSK- α förderte das Wachstum der Hypokotyle weder im Wildtyp noch in den T-DNA-Insertionslinien *pskr1-2*, *pskr1-3* und *pskr2-1*. Es wurde vermutet, dass die Konzentration von PSK- α sättigend sein könnte. Eine Tyrosylprotein-Sulfotransferase (TPST) katalysiert die Sulfatierung der Tyrosine des Pentapeptids. Daher wurden *tpst* Keimlinge genutzt, die kein PSK- α synthetisieren können, um diese Hypothese zu überprüfen. Hypokotyle von *tpst* Keimlingen waren um 30% kürzer als die des Wildtyps. In *tpst* Keimlingen führte die Behandlung mit PSK- α zu einer signifikanten Förderung des Hypokotylwachstums ab einer Konzentration von 3 nM. Hypokotyle von *pskr1-2* und *pskr1-3* Keimlingen waren um 15% kleiner und die Zellen waren durchschnittlich kürzer als bei *pskr2-1* oder Wildtyp. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Hypokotylwachstum durch PSK- α über den Rezeptor PSKR1 gefördert wird. Protoplasten, die aus dem Hypokotyl von etiolierten Wildtyp und *pskr2-1* Keimlingen isoliert wurden, zeigten nach Zugabe von PSK- α eine dosisabhängige Volumenzunahme. Protoplasten von *pskr1-2* und *pskr1-3* Keimlingen reagierten dagegen nicht auf PSK- α . Die Volumenzunahme der Protoplasten war unabhängig von der plasmamembranständigen H⁺-ATPase, da Ortho-Vanadat, welches die H⁺-ATPase inhibiert, die PSK- α vermittelte Volumenzunahme nicht hemmte. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass PSK- α die Streckung der Zellen des Hypokotyls und die Volumenzunahme von Protoplasten über PSKR1, nicht aber über PSKR2 reguliert. Die Expansion der Protoplasten wird unabhängig von der plasmamembranständigen H⁺-ATPase reguliert.

Für das Manuskript habe ich die Hypokotyllängen der *pskr1-2*, *pskr1-3*, *pskr2-1* und *tpst* Keimlinge analysiert. Außerdem habe ich zusammen mit der kanadischen Austauschstudentin Amanda Johnson die Promotor:GUS Analysen der PSK Präproprotein-Gene und von *PSKR1* durchgeführt.

1 **Title:** Phytosulfokine- α controls hypocotyl length and cell expansion in
2 *Arabidopsis thaliana* through phytosulfokine receptor 1

3

4 Nils Stührwohldt*, Renate I. Dahlke*, Bianka Steffens, Amanda Johnson, Margret
5 Sauter

6

7 Entwicklungsbiologie und Physiologie der Pflanzen, Botanisches Institut, Universität
8 Kiel, Am Botanischen Garten 5, 24118 Kiel, Germany

9

10 * These authors contributed equally to this work.

11

12

13 **Corresponding author:** Margret Sauter
14 Entwicklungsbiologie und Physiologie der Pflanzen
15 Botanisches Institut
16 Universität Kiel
17 Am Botanischen Garten 5
18 24118 Kiel, Germany
19 Phone: +49-431-8804210
20 Fax: +49-431-8804222
21 E-mail: msauter@bot.uni-kiel.de

22 **ABSTRACT**

23

24 The disulfated peptide growth factor phytosulfokine- α (PSK- α) is perceived by LRR
25 receptor kinases. In this study, a role for PSK signaling through PSK receptor PSKR1
26 in *Arabidopsis thaliana* hypocotyl cell elongation is established. Hypocotyls of
27 etiolated *pskr1-2* and *pskr1-3* seedlings, but not of *pskr2-1* seedlings were shorter
28 than wt due to reduced cell elongation. Treatment with PSK- α did not promote
29 hypocotyl growth indicating that PSK levels were saturating. Tyrosylprotein
30 sulfotransferase (TPST) is responsible for sulfation and hence activation of the PSK
31 precursor. The *tpst-1* mutant displayed shorter hypocotyls with shorter cells than wt.
32 Treatment of *tpst-1* seedlings with PSK- α partially restored elongation growth in a
33 dose-dependent manner. Hypocotyl elongation was significantly induced in *tpst-1*
34 seedlings at nanomolar PSK- α concentrations. Cell expansion was studied in
35 hypocotyl protoplasts. WT and *pskr2-1* protoplasts expanded in the presence of PSK-
36 α in a dose-dependent manner. By contrast, *pskr1-2* and *pskr1-3* protoplasts were
37 unresponsive to PSK- α . Protoplast swelling in response to PSK- α was unaffected by
38 ortho-vanadate, which inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase supporting the view
39 that PSK- α acts via a mechanism that differs from acid growth. In maize (*Zea mays*
40 L.), coleoptile protoplast expansion was similarly induced by PSK- α in a dose-
41 dependent manner and was dependent on the presence of K⁺ in the media. In
42 conclusion, PSK- α signaling of hypocotyl elongation and protoplast expansion occurs
43 through PSKR1, likely involves K⁺ uptake, but does not require extracellular
44 acidification by the plasma membrane H⁺-ATPase.

45 INTRODUCTION

46
47 Phytosulfokine- α (PSK- α) is a disulfated pentapeptide of the sequence Tyr(SO₃H)-
48 Ile-Tyr(SO₃H)-Thr-Gln [1, 2]. It is encoded as a preproprotein by five genes in
49 *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) [3, 4]. Tyrosylprotein sulfotransferase (TPST) was
50 shown to catalyze sulfation of the PSK precursor protein which is required for peptide
51 activity [5]. The active PSK peptide is perceived by plasma membrane-localized
52 leucine-rich repeat (LRR) receptor kinases [6]. In *Arabidopsis thaliana*, two genes
53 encode for PSK receptors, *PSKR1* and *PSKR2*. PSK- α acts as an autocrine growth
54 factor that promotes proliferation of suspension-cultured cells kept at low density [7]
55 and of calli [8]. In *Arabidopsis* seedlings, PSK- α was shown to regulate root growth
56 [9, 10]. Analysis of *pskr1-3* (previously termed *pskr1-T*) and *pskr2-1* T-DNA insertion
57 lines indicated that root elongation was predominately controlled through PSKR1.
58 PSKR1 signaling altered root growth mainly by increasing cell size [10].

59 *Arabidopsis* hypocotyl elongation is under the control of several plant
60 hormones [11]. In etiolated seedlings, positive regulation is exerted by gibberellin and
61 brassinosteroid signaling, while ethylene strongly inhibits hypocotyl elongation. Auxin
62 appears to play a dual role by promoting both hypocotyl elongation and ethylene-
63 mediated inhibition of hypocotyl elongation. A role for PSK signaling in the regulation
64 of hypocotyl growth has not previously been described.

65 Growth of cells is an irreversible increase in cell volume and is achieved in
66 plants by an increase in cell wall extensibility, by the cells' osmotic potential that
67 manifests itself as turgor pressure, and through water uptake driven by an increase in
68 turgor pressure. The main solutes involved in osmoregulation are K⁺, sucrose, and
69 accompanying anions such as malate and chloride. K⁺ has a high membrane
70 permeability due to the presence of numerous K⁺ channels and transporters. In
71 *Arabidopsis*, the shaker-like K⁺ channel KAT1 and the K⁺ transporter KT2/KUP2 have
72 been implicated in cell elongation in the hypocotyl [12, 13]. The phytotoxin fusicoccin
73 (FC) causes plant cells to excrete protons by activating the plasma membrane (PM)
74 H⁺-ATPase and to thereby promote cell growth and protoplast expansion [14]. FC
75 stabilizes binding of a 14-3-3 protein to the C-terminus thus locking the H⁺-ATPase in
76 a permanently activated state [15]. H⁺ acts as counterion of K⁺. By stimulation of net
77 K⁺ uptake and inhibition of K⁺ outward rectifier channels, FC promotes a high turgor
78 pressure and hence cell expansion [16, 17].

79 In this study we identified a promotive effect of PSK- α signaling through
80 PSKR1 on hypocotyl cell length and consequently on hypocotyl length in
81 Arabidopsis. Analysis of protoplasts from the hypocotyl indicated that PSK signaling
82 controls osmotically-driven cell expansion indicating that PSK- α likely acts as an
83 osmoregulator.

86 RESULTS

88 PSK signaling through PSKR1 controls hypocotyl length in Arabidopsis

89
90 PSK- α was previously shown to control cell elongation in roots of Arabidopsis [10].
91 To analyze a possible function of PSK- α in shoot growth, Arabidopsis seedlings were
92 grown on media lacking PSK- α , or on media supplemented with PSK- α at
93 concentrations between 1 nM and 1 μ M. Hypocotyl lengths were measured after 5
94 days of treatment. No effect of PSK- α was observed on hypocotyl elongation in dark-
95 grown seedlings and in seedlings grown in a light/ dark cycle at 80 μ E (Figure 1A).
96 When seedlings were grown in a light/dark cycle at low light conditions (30 μ E)
97 enhanced hypocotyl elongation was observed after treatment with 10 nM PSK- α
98 indicating a general ability to respond to PSK- α . Other concentrations were not
99 effective indicating a narrow range of responsiveness at these conditions. We next
100 employed the Arabidopsis T-DNA insertion lines *pskr1-2*, *pskr1-3* and *pskr2-1* that
101 were shown to be deficient in transcripts of the respective PSK receptor genes
102 *PSKR1* and *PSKR2* [8, 10]. Hypocotyl lengths of etiolated wt and *pskr2-1* seedlings
103 did not differ (Figure 1B). By contrast, etiolated seedlings of the two allelic *pskr1*
104 lines, *pskr1-2* and *pskr1-3*, had significantly shorter hypocotyls than wt or *pskr2-1*
105 seedlings indicating that PSK signaling through PSKR1 has a positive impact on
106 seedling shoot elongation not only at low light but also in the dark. Taken together,
107 the data indicated that signaling through PSKR1 plays a role in the regulation of
108 hypocotyl elongation.

111 PSK signaling through PSKR1 promotes cell elongation

113 Arabidopsis hypocotyls possess about 20 epidermal cells from the base to the apical
114 hook with epidermal cells reaching a length of up to 1 mm in the dark [18]. To find out
115 if PSKR1 activity was required for cell elongation or for cell division, hypocotyl cell
116 lengths and numbers were determined in 5-day-old etiolated wt, *pskr1-2*, *pskr1-3*,
117 and *pskr2-1* seedlings (Figure 1C). The average number of cells was between 18
118 and 21 in the various genotypes. The differences in cell number were not statistically
119 significant (see Table S1, $P < 0.05$, ANOVA, Tukey test). Average cell lengths were
120 determined at each cell position starting at the base. The longest cells were found at
121 cell positions 11 to 13 in wt and reached a maximum length of about 1 mm. Cells at
122 positions 11 to 13 of *pskr1-2*, *pskr1-3*, and *pskr2-1* hypocotyls remained shorter
123 ($P < 0.05$, 2-sample *t*-test). Specifically, nearly all cells in *pskr1-3* hypocotyls were
124 significantly shorter than in wt (see Table S1, $P < 0.001$, 2-sample *t*-test). In *pskr1-2*,
125 cell sizes were reduced in the basal half of the hypocotyl but reached wt length in the
126 upper half. In *pskr2-1* seedlings, cells at cell positions 7 to 11 were shorter than wt,
127 but cells in the upper half of the hypocotyl were significantly longer (see Table S1,
128 $P < 0.001$, 2-sample *t*-test) resulting in a net wt-like hypocotyl length. These results
129 support the view that PSK signaling through PSKR1 contributes to hypocotyl cell
130 elongation. A minor effect of PSKR1 knock out on cell division activity cannot be
131 completely excluded although statistics do not support this.

132

133

134 **PSK and PSKR gene expression in the seedling shoot**

135

136 Since *pskr1-2* and *pskr1-3* seedlings had shorter hypocotyls than wt, expression of
137 *PSKR1* and of PSK genes was analyzed in the shoot of etiolated Arabidopsis
138 seedlings. To this end, promoter:GUS lines were employed [10]. In hypocotyls, GUS
139 activity was observed for *PSK2:GUS*, *PSK3:GUS*, *PSK4:GUS*, and *PSK5:GUS*
140 (Figure 2A). To look at cell-specific expression of PSK genes, cross sections at the
141 upper third of hypocotyls were made. Strongest GUS staining appeared in the
142 vascular cylinder of *PSK2:GUS*, *PSK3:GUS*, *PSK4:GUS*, and *PSK5:GUS* seedlings
143 (Figure 2B, c-j). Staining was also obvious in parenchymal cells of *PSK2:GUS*,
144 *PSK3:GUS*, and *PSK4:GUS* seedlings (Figure 2B, ceg) and was predominately
145 found in the upper half of the seedling. No GUS activity was observed in *PSK1:GUS*
146 and *PSKR1:GUS* hypocotyls (Figure 2B, abkl). A more sensitive method was

147 therefore chosen to detect *PSKR1* transcripts. RT-PCR amplification of *PSKR1* and
148 *PSKR2* mRNA was carried out separately for cotyledons and hypocotyl. Transcripts
149 were detected in both seedling parts (Figure 2C), an expression that was supported
150 by microarray data as summarized in the genevestigator database
151 (<https://www.genevestigator.com/>). Expression analysis revealed that PSK and
152 PSKR genes were active in the hypocotyl.

153
154

155 ***tpst-1* seedlings have shorter hypocotyls and respond to PSK- α in a dose-** 156 **dependent manner**

157

158 Hypocotyls expressed PSK precursor genes and hypocotyl elongation was not
159 promoted by exogenous PSK- α in etiolated wt seedlings. We therefore hypothesized
160 that PSK- α levels might be saturating in the hypocotyl. To test this hypothesis we
161 employed the *tpst-1* mutant which is deficient of active PSK- α due to its inability to
162 carry out tyrosine sulfation of the PSK peptide precursor. Hypocotyls of *tpst-1*
163 seedlings were 30% shorter than those of wt (Figure 3A, B). The number of cells
164 were not different in wt and *tpst-1*; instead cells were shorter (Figure 3D). *tpst-1*
165 seedlings responded to PSK- α with significantly enhanced hypocotyl elongation
166 (Figure 3B). This growth promoting effect was observed at 3 nM and higher
167 concentrations. Treatment with PSK- α did however not fully restore wt hypocotyl
168 length. Hypocotyls of *tpst-1* seedlings treated with 1 μ M PSK- α were still significantly
169 shorter than those of wt seedlings indicating that additional sulfated growth promoting
170 factor(s) are lacking. At the cell level, PSK- α promoted cell elongation and not cell
171 division (Figure 3E). Dose-dependent growth promotion was also observed for *tpst-1*
172 seedling roots which were significantly longer when exposed to as little as 0.3 nM
173 PSK- α (Figure 3C). Saturation of the growth promoting effect was achieved at 10 nM.
174 As was observed for hypocotyls, wt root length was not fully restored by PSK- α .

175

176

177 **PSK- α promotes protoplast expansion through PSKR1**

178

179 To study a regulatory role of PSK- α in cell expansion through osmotic adjustment,
180 protoplasts were isolated from hypocotyls of etiolated Arabidopsis seedlings.

181 Protoplast volume was calculated from the circumference that was determined for
182 each protoplast analyzed at each time point measured [19]. Protoplast sizes were
183 followed at 5 min intervals over a 30 min period prior to the addition of an effector to
184 make sure that the protoplasts were vital. After effector application, protoplast
185 volumes were determined for another 35 min (Figure 4). Protoplasts isolated from
186 etiolated wt hypocotyls were treated with PSK- α . Addition of 0.1 nM PSK- α resulted
187 in rapid protoplast expansion within few minutes that continued over the 35 min
188 period of observation. Treatment with 1 μ M PSK- α also caused protoplast swelling
189 with a slightly weaker response than at 0.1 nM PSK- α . Neither treatment with
190 unsulfated PSK peptide at 0.1 nM or 1 μ M nor with 100 nM of the sulfated control
191 peptide CCK8 affected protoplast volume indicating that the response was specific
192 for PSK- α (Figure 4A). To resolve the dose-dependent swelling response,
193 intermediary PSK- α concentrations and a lower concentration were applied (Figure
194 4B). Significant protoplast expansion was induced by as low as 0.01 nM PSK- α and
195 was elevated at all higher concentrations with a maximum response at 0.1 nM PSK-
196 α . Due to the short lag phase of the swelling response of less than 5 min (Figure 4A)
197 we hypothesized that swelling occurred independent of protein synthesis. To test this
198 hypothesis, protoplasts were pretreated with 50 μ M cycloheximide to inhibit protein
199 synthesis (Figure 4C). Treatment with cycloheximide affected neither lag phase nor
200 degree of protoplast swelling indicating that protoplast expansion in response to
201 PSK- α was mediated through post-translational events.

202 We next analyzed expansion of hypocotyl protoplasts from the PSK receptor
203 mutants *pskr1-2*, *pskr1-3*, and *pskr2-1*. Knock out of the PSKR2 receptor in *pskr2-1*
204 did not affect the responsiveness of protoplasts yielding a wild type response to
205 treatment with 1 nM PSK- α (Figure 4D). By contrast, PSKR1 deficient protoplasts
206 that were isolated from hypocotyls of the allelic lines *pskr1-2* and *pskr1-3* were not
207 responsive to 1 nM PSK- α (Figure 4D). A dose response analysis established that
208 *pskr1-3* protoplasts had lost their responsiveness to PSK- α supplied at
209 concentrations as high as 1 μ M (Figure 4B). This result indicated that PSK- α induced
210 protoplast expansion was mediated through PSKR1.

211

212

213 **PSK- α induced protoplast expansion is insensitive to ortho-vanadate**

214

215 In order to analyze if proton extrusion was required for PSK- α induced protoplast
216 expansion, the effectors fusicoccin (FC) and ortho-vanadate were used. FC activates
217 the plasma membrane (PM) H⁺-ATPase. WT hypocotyl protoplasts that were treated
218 with 1 μ M FC expanded rapidly (Figure 5A). This response was unaffected by
219 cycloheximide treatment as was expected from the known mode of action of FC
220 (Figure 4C). *pskr1-3* protoplasts that were treated with 1 μ M FC expanded with a
221 similar kinetic as observed for wt indicating that the capacity for osmoregulation
222 through enhanced proton pump activity was not impaired in *pskr1-3* (Figure 5C). This
223 result is compatible with the view that PSKR1 acts upstream or independent of the
224 PM H⁺-ATPase. We next analyzed protoplast expansion in the presence of ortho-
225 vanadate, an inhibitor of P-type ATPases including the PM H⁺-ATPase [20]. WT
226 protoplasts were preincubated with 0.5 mM ortho-vanadate for 1 h and subsequently
227 treated with or without 1 nM PSK- α . In the presence of ortho-vanadate alone,
228 protoplasts did not change in volume (Figure 5B). When treated with ortho-vanadate
229 and, in addition, with 1 nM PSK- α , protoplasts expanded with a similar kinetic and to
230 a comparable degree as with 1 nM PSK- α in the absence of ortho-vanadate (Figure
231 5A, B). As a control for ortho-vanadate activity, protoplasts that were pre-treated with
232 0.5 mM ortho-vanadate for 1 h were subsequently exposed to 1 μ M FC. Whereas in
233 the absence of ortho-vanadate, FC induced rapid protoplast swelling, no swelling
234 was observed in the presence of ortho-vanadate (Figure 5B). Instead, protoplasts
235 shrank transiently after FC application in the presence of ortho-vanadate but
236 recovered within 20 min to near control volume. Finally, we treated protoplasts with 1
237 μ M FC and 1 nM PSK- α at the same time. In the absence of ortho-vanadate,
238 protoplasts expanded similarly as protoplasts that were treated with either FC and
239 PSK- α alone possibly indicating that the swelling response achieved with either
240 effector was saturated (Figure 5A). When protoplasts were preincubated with 0.5 mM
241 ortho-vanadate and subsequently exposed to both, FC and PSK- α , protoplasts
242 displayed an intermediary response to that observed with either effector alone
243 (Figure 5B). In other words, PSK-induced protoplast swelling was partially reduced
244 when FC was applied at the same time; and the inhibitory effect of FC was partially
245 reversed with PSK- α .

246 Since protoplast expansion appeared to be independent of proton extrusion
247 we next studied pH changes in hypocotyls that were isolated from low-light grown
248 seedlings. When hypocotyls were treated with 10 nM PSK- α , elongation growth was

249 significantly promoted (Figure 1A). If this response involved acid growth, the apoplast
250 would be acidified and this acidification can be measured in the incubation medium
251 [21, 22]. During the equilibrium phase of the hypocotyls to the media, the pH in the
252 medium dropped until the acid equilibrium was reached. Addition of 10 nM PSK- α did
253 not result in further acidification. Rather a slight alkalization was observed as
254 compared to the untreated control (Figure 6A, B). As described below, protoplasts
255 from maize coleoptiles expand in response to PSK- α as do Arabidopsis protoplasts.
256 When maize coleoptiles were treated with 10 nM PSK- α , the medium neither acidified
257 as was observed for Arabidopsis hypocotyls; rather the pH slightly increased within 1
258 h. Our results thus indicate that PSK driven cell and protoplast expansion differs from
259 acid growth.

260

261

262 **PSK- α mediated protoplast expansion is dependent on exogenous K⁺**

263

264 When plant cells expand, K⁺ very often acts as osmotically active ion that is taken up
265 from the surrounding apoplast. The solution in which protoplasts were incubated
266 contained 10 mM K⁺. To investigate a possible role of potassium in PSK- α dependent
267 expansion, protoplasts were incubated in media containing less or no K⁺. However,
268 Arabidopsis protoplasts were not stable in solution lacking K⁺. We therefore used
269 protoplasts isolated from maize coleoptiles for these experiments. Coleoptiles are
270 known to grow exclusively through cell expansion. A dose-response analysis
271 performed on maize protoplasts showed swelling in response to PSK- α at
272 concentrations as low as 0.05 nM and up to 10 nM (Figure 7A). Higher
273 concentrations were not tested. As was observed for Arabidopsis protoplasts,
274 expansion occurred with a very short lag (Fig. 7B), and was maximal at 0.1 nM PSK-
275 α (Figures 4B & 7A). Treatment with 0.1 nM unsulfated control peptide did not induce
276 maize coleoptile protoplast swelling (data not shown). In order to test a requirement
277 of K⁺, maize protoplasts were subsequently incubated in media containing no K⁺, 1
278 mM K⁺, or 10 mM K⁺ (Figure 7B). At 1 mM K⁺, PSK- α induced protoplast swelling
279 was reduced by about 60% as compared to the expansion observed with 10 mM K⁺.
280 In the absence of K⁺, PSK- α did not induce significant protoplast swelling. Hence,
281 PSK- α induced water uptake into protoplasts was dependent on the availability of K⁺
282 in the media in a dose-dependent manner.

DISCUSSION

PSK- α acts as an autocrine growth factor that is produced in the secretory system, released into the apoplast, and perceived by plasma membrane-localized LRR receptor kinases. In Arabidopsis, two PSK receptor proteins, PSKR1 and PSKR2, perceive PSK- α [6, 9]. Several physiological responses to PSK- α have been observed, one of which is growth regulation. Suspension cells of Arabidopsis that were treated with PSK- α developed larger calli. Similarly, transgenic Arabidopsis cells overexpressing the PSK- α preproprotein gene *PSK4* developed larger calli as compared to wt, and transgenic cells lacking detectable levels of PSKR1 protein developed smaller calli [9]. *In planta* studies in Arabidopsis revealed that seedling roots were shorter in *pskr1-2* and *pskr1-3* than in wt indicating that root elongation was dependent on PSK signaling through PSKR1 [9, 10]. A minor effect of PSKR2 on root elongation was also observed.

The current study showed that not only roots but also hypocotyls were shorter in etiolated *pskr1-2* and *pskr1-3* seedlings. Knock out of PSKR2 was without effect on hypocotyl length indicating that the two receptor proteins have distinct functions. Exogenous supply of PSK- α did not induce growth in light-grown or etiolated seedlings. At low-light conditions a significant growth response was promoted by PSK- α , albeit only at a single concentration. Similar to the observation that, at most conditions tested, PSK- α did not promote hypocotyl growth, it was described that addition of brassinolide has no or only little effect on hypocotyl elongation whereas disruption of signaling or biosynthesis results in shorter hypocotyls [11]. Also, addition of gibberellin does not enhance hypocotyl growth. Loss of biosynthetic capacity in the gibberellin biosynthetic *ga1* or *ga20ox* mutants however resulted in shorter hypocotyls, indicating that endogenous gibberellin levels are saturating [23, 24]. The short hypocotyl phenotype of the *pskr1* knock out lines and the inefficiency of exogenous PSK- α to promote growth led us to hypothesize that hypocotyl elongation was controlled by PSK signaling and that PSK- α was present at saturating amounts in wt hypocotyls. The PSK preproprotein genes *PSK2*, *PSK3*, *PSK4*, and *PSK5* were found to be active in the hypocotyl as revealed in the respective promoter:GUS lines indicating that PSK- α was synthesized in this organ. Promoters of *PSK2*, *PSK3*, and *PSK4* were particularly active in the upper half of the hypocotyl where the strongest effect on cell elongation was observed [18].

317 To test the hypothesis that wt hypocotyls produce saturating levels of PSK- α
318 for growth promotion, we employed the *tpst-1* mutant. TPST catalyzes the transfer of
319 sulfate to the two tyrosyl side chains of PSK [5]. The *tpst-1* knock out line hence
320 lacks the ability to synthesize functional PSK- α . *tpst-1* seedlings displayed shorter
321 hypocotyls, a phenotype that was partially restored by the addition of PSK- α .
322 However, *tpst-1* hypocotyls remained shorter than wt hypocotyls even when
323 supplemented with high PSK- α concentrations supporting the view that one or more
324 additional sulfated peptides contribute to regulation of hypocotyl growth. Similar to
325 *pskr1* seedlings, *tpst-1* seedlings had a wt number of cells which were shorter than in
326 wt. Taken these data together it can be concluded that PSK signaling controls
327 hypocotyl cell elongation. *tpst-1* seedlings also had shorter roots as was reported
328 previously [5]. The wt root length was restored by the addition of PSK- α and of
329 another sulfated peptide PSY1, each supplied at 100 nM [25]. It is conceivable that
330 PSY1 is the sulfated peptide that participates in the regulation of hypocotyl growth. A
331 dose-response analysis on *tpst-1* seedlings showed that root elongation was
332 significantly promoted by as little as 0.3 nM PSK- α indicative of high affinity ligand
333 binding and was saturated at 10 nM PSK- α . In wt seedlings, root growth was
334 significantly enhanced at ≥ 10 nM PSK- α [10]. *tpst-1* seedlings thus appeared to be
335 more responsive to PSK- α than wt.

336 *PSKR1* was expressed at low levels in the hypocotyl. While no *PSKR1:GUS*
337 signal was detectable, *PSKR1* transcripts were amplified by RT-PCR. This is in
338 agreement with an earlier report showing overall low *PSKR1* expression in
339 Arabidopsis roots and shoots [9, 10]. Expression of PSK genes was strongest in the
340 central cylinder but low-level expression was also observed in other cell types. The
341 epidermis was discussed as being the growth-limiting cell layer [26]; future studies
342 should clarify if PSK signaling in the epidermis is required for growth promotion.

343 Reduced root length in *pskr1-2* and *pskr1-3* was largely caused by reduced
344 cell length rather than altered cell production providing evidence that PSK- α controls
345 cell growth [10]. Regulation of cell size through PSKR1 signaling was confirmed in
346 this study which shows that lengths of epidermal cells in the hypocotyl were shorter
347 in the *pskr1* and in the *tpst-1* knock out lines. Cell expansion requires that water is
348 taken up. Water uptake is driven by a difference in osmotic potential between the
349 protoplast and the apoplast and requires yielding of the cell wall that surrounds the
350 protoplast. To test the hypothesis that PSK- α signaling positively affects

351 osmoregulation, protoplasts were employed. Protoplasts lack a cell wall and are thus
352 suitable to measure osmotically driven expansion independent of changes in cell wall
353 properties. WT protoplasts expanded rapidly in response to PSK- α , but not when
354 incubated with unsulfated control peptide indicating that the response was specific.
355 An increase in protoplast volume was observed within a short lag phase of 2 to 5 min
356 after application of PSK- α and occurred independent of protein synthesis. As was
357 found for hypocotyl growth, protoplast expansion was mediated through the PSK
358 receptor PSKR1. *pskr1-3*, which lacks detectable *PSKR1* transcript or PSKR1 protein
359 levels [9, 10], was unresponsive to PSK- α over a wide concentration range between
360 0.01 nM and 1 μ M PSK- α . By contrast, protoplasts isolated from Arabidopsis
361 seedlings that lack the second PSK receptor, PSKR2, showed a wt response. In
362 suspension cells from rice, high-affinity binding of PSK- α to plasma membranes with
363 a K_D value of 1.4 nM and low-affinity binding with a K_D value of 27 nM was described
364 [27]. The binding affinity to Arabidopsis microsomes was determined with a K_D of 7.7
365 nM [9]. A maximal protoplast swelling response was induced at 0.1 nM PSK- α , and
366 root elongation was promoted at 0.3 nM PSK- α which is one order of magnitude
367 lower than the dissociation constant measured in Arabidopsis. This may indicate that
368 only few receptor proteins need to be activated in order to induce a response. On the
369 other hand, *in vivo* conditions of receptor-ligand binding may differ from those
370 provided in binding studies on isolated membrane vesicles. Brassinosteroids are
371 effective at similarly low concentrations as PSK- α [28]. Incidentally, the
372 brassinosteroid receptor BRI1 is an LRR receptor kinase that shares high sequence
373 and structural similarity with PSK receptors. For BRI1 and for the carrot PSK receptor
374 DcPSKR1 the respective ligands were shown to bind to the single island domain
375 located in the extracellular LRR region which appears to be particularly suited for
376 high-affinity ligand binding [29, 30].

377 Rapid protoplast swelling can depend on different mechanisms. Auxin-induced
378 growth and protoplasts expansion are dependent on the activation of the PM H⁺-
379 ATPase [19] and on K⁺ channels [31]. The PM H⁺-ATPase is constitutively activated
380 by FC [15]. Protoplasts isolated from *pskr1-3* hypocotyls were not impaired in FC-
381 induced swelling indicating that PSKR1 was not required for this response possibly
382 because it acts upstream or independent of the PM H⁺-ATPase. Inhibition of P-type
383 ATPases such as the PM H⁺-ATPase by ortho-vanadate did not inhibit protoplast
384 swelling in the presence of PSK- α indicating that PSKR1 mediated protoplast

385 expansion was independent of PM H⁺-ATPase activation a view that was supported
386 by *in vivo* pH measurements on hypocotyls. Medium pH did not acidify when
387 hypocotyls from low-light grown seedlings were treated with a growth promoting
388 concentration of PSK- α . For a comparison, treatment of maize coleoptiles with
389 indole-3-acetic acid caused a drop in pH of 0.2 units [22]. A requirement for K⁺ as an
390 osmolyte in PSK- α induced protoplast expansion was supported by the observation
391 that a reduction in K⁺ concentration resulted in reduced swelling of maize protoplasts
392 in a dose-dependent manner. It is possible that PSK- α exerts an effect on K⁺
393 transport in a direct or indirect manner through as yet unidentified signaling proteins.
394 Both, signaling proteins and targets of PSK signaling are present and likely
395 posttranslationally regulated in PSK responsive protoplasts.

396 A role for PSK signaling through PSKR1 in hypocotyl growth is supported by
397 the observations that *pskr1* and *tpst-1* seedlings displayed shorter hypocotyls and
398 shorter cells. Most notably, hypocotyl cell elongation of *tpst-1* seedlings was
399 promoted by PSK- α . Furthermore, PSK- α promoted rapid expansion of protoplasts
400 obtained from hypocotyls of wt and *pskr2-1*, but not of protoplasts obtained from
401 hypocotyls of *pskr1-2* or *pskr1-3*. PSK- α induced protoplast swelling was observed in
402 the monocot species maize as well as in the dicot species *Arabidopsis* indicating that
403 it is a conserved response in higher plants. While a requirement for PM H⁺-ATPase
404 activity was not observed, protoplast expansion induced by PSK- α depended on the
405 presence of K⁺ in the media, indicating that potassium uptake into protoplasts drives
406 water uptake. Regulation of potassium channel activity may thus be a target of PSK
407 signaling. Since the swelling response of protoplasts in response to PSK- α was
408 observed within few minutes and was independent of protein synthesis, regulation of
409 K⁺ or other channel activities likely occur at the protein level.

410

411

412 **MATERIALS AND METHODS**

413

414 **Plant material and growth measurements**

415

416 Experiments with *Arabidopsis thaliana* were performed on ecotype Columbia-0. The
417 *pskr1-2*, *pskr1-3* (previously named *pskr1-T*), and *pskr2-1* insertion lines and P:GUS
418 lines used in this study were described [8-10]. The *tpst-1* (*At1g08030*) T-DNA

419 insertion line SALK_009847 was obtained from the NASC (Nottingham Arabidopsis
420 Stock Centre, University of Nottingham, Nottingham, UK) and homozygous plants
421 were identified. Arabidopsis seeds were surface-sterilized for 5 min in 70% (v/v)
422 ethanol, washed twice with autoclaved water followed by 30 min in 1 ml 2% (w/v)
423 sodium hypochlorite, washed 5 times with autoclaved water and laid out under sterile
424 conditions on square plates. Seedlings were grown in the dark or in long-day
425 conditions at 22°C for 5 days at 30 μ E (low light) or 80 μ E on plates containing 1/2
426 strength Murashige-Skoog media [32] and 1.5% sucrose solidified with 0.38% gelrite
427 (Duchefa, Harlem, The Netherlands). The media were supplemented with or without
428 PSK- α (NeoMPS, Strasbourg, France) at the concentrations indicated. Epidermal cell
429 lengths were determined directly on hypocotyls using an Olympus microscope BX41
430 with ten-fold magnification and the image software Cell A (Olympus, Hamburg,
431 Germany). For protoplast experiments, seedlings of *Zea mays* (cv. Garant) were
432 grown in the dark at 26°C for 5 days [19].

433

434

435 **Molecular analysis and GUS staining**

436

437 P:GUS lines were generated and analyzed as described [10]. β -glucuronidase
438 activity was determined in shoots of 5-day-old etiolated Arabidopsis seedlings using
439 whole mounts. For cell-type specific analysis of GUS expression, hypocotyls were
440 embedded in Technovit 7100 according to manufacturers` instructions (Heraeus
441 Kulzer). 25 μ m thick sections were cut with a Leica RM 2255 microtome and
442 analyzed using a Leica DM LS microscope. Images were taken with a Leica DC 300F
443 camera and Leica IM 500 software (Leica Microsystems).

444 RT-PCR analysis of *PSKR1* expression in 5-day-old etiolated seedling shoots
445 was performed on total RNA reverse transcribed with an oligo dT primer. The cDNA
446 was amplified with primers specific for *Actin2* as a control, *PSKR1* or *PSKR2* as
447 described [10]. PCR amplification was performed for 38 cycles.

448

449

450 **Effector treatments and protoplast analysis**

451

452 Protoplasts were isolated from hypocotyls of 5-day-old etiolated Arabidopsis

453 seedlings or from coleoptiles of 5-day-old *Zea mays* seedlings. Protoplasts were
454 isolated by digesting the tissues with cellulase 'Onozuka' RS for Arabidopsis
455 protoplasts or with 'Onozuka' R-10 for maize protoplasts (Duchefa) and pectolyase
456 (Kikkoman Corporation) for 3 h and 3.5 h, respectively. Net volume changes of
457 protoplasts were analyzed as described [19]. Only vital protoplasts showing strong
458 cytoplasmic streaming were used for the experiments. Stock solutions of PSK- α ,
459 unsulfated PSK peptide (usPSK), fusicoccin (FC), ortho-vanadate, cycloheximide,
460 and cholecystinin octapeptide (CCK8) (Sigma Aldrich) were prepared in washing
461 solution or in washing solution without potassium (1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mM MES,
462 pH 6.5, adjusted with Bis-Tris) and diluted to the concentrations indicated. CCK8 was
463 used at 100 nM as described [25].

464

465

466 **pH measurements**

467

468 Five-day-old Arabidopsis seedlings were grown at 30 μE in a light/dark cycle, and 5-
469 day-old *Zea mays* seedlings were grown in the dark [19]. For Arabidopsis, hypocotyls
470 were excised. For maize, abraded coleoptile cylinders without 3 mm of the tip and a
471 length of 1 cm were used. pH measurements of 60 Arabidopsis hypocotyls per
472 experiment were performed in 350 μl buffer (1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mM KCl) and pH
473 measurement of 8 maize coleoptiles per experiment were performed in 1.25 ml buffer
474 using a Beckman pH meter (300 series). PSK- α was diluted in buffer adjusted to the
475 pH of the acid equilibrium and applied at the concentration indicated. The ΔpH was
476 calculated at the times indicated.

477

478

479 **Statistical analysis**

480

481 Statistical analysis of net volume change of protoplasts was performed with Minitab
482 (Minitab Inc.). For a comparison between treatments, values at $t=35$ min for
483 Arabidopsis and at $t=30$ min for maize were statistically analyzed. Comparison of
484 means was analyzed for statistical significance with an ANOVA (Tukey test) or a 2-
485 sample t -test. Constant variance and normal distribution of data were verified before
486 statistical analysis and the P value was set to $P<0.001$ if one of both conditions was

487 not achieved. The P value for the Pearson product moment correlation is indicated in
488 the figure legends.

489 **Supporting Information**

490

491 **Table S1. Cell lengths and cell numbers of wt, *pskr1-2*, *pskr1-3*, and *pskr2-1*.**

492

493

494

495 **ACKNOWLEDGEMENTS**

496

497 We gratefully acknowledge Dr. Birgit Kemmerling (Universität Tübingen, Germany)

498 for supplying homozygous *pskr1-2* seeds.

499 **REFERENCES**

500

- 501 1. Matsubayashi Y, Sakagami Y (1996) Phytosulfokine, sulfated peptides that induce
502 the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. Proc Natl
503 Acad Sci USA 93: 7623-7627.
- 504 2. Yang H, Matsubayashi Y, Hagani H, Sakagami Y (2000) Phytosulfokine- α , a
505 peptide growth factor found in higher plants: its structure, functions and
506 receptors. Plant Cell Physiol 41: 825-830.
- 507 3. Yang H, Matsubayashi Y, Hagani H, Nakamura K, Sakagami Y (2001) Diversity of
508 Arabidopsis genes encoding precursors for phytosulfokine, a peptide growth
509 factor. Plant Physiol 127: 842-851.
- 510 4. Lorbiecke R, Sauter M (2002) Comparative analysis of PSK peptide growth factor
511 precursor homologs. Plant Science 163: 321-332.
- 512 5. Komori R, Amano Y, Ogawa-Ohnishi M, Matsubayashi Y (2009) Identification of
513 tyrosylprotein sulfotransferase in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci USA 106:
514 14741-14752.
- 515 6. Matsubayashi Y, Ogawa M, Morita A, Sakagami Y (2002) An LRR receptor kinase
516 involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine. Science 296:
517 1470-1472.
- 518 7. Matsubayashi Y, Takagi L, Sakagami Y (1997) Phytosulfokine- α , a sulfated
519 pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells by means of specific high-
520 and low-affinity binding sites. Proc Natl Acad Sci USA 94: 13357-13362.
- 521 8. Amano Y, Tsubouchi H, Shinohara H, Ogawa M, Matsubayashi Y (2007) Tyrosine-
522 sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in
523 Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci USA 104: 18333-18338.
- 524 9. Matsubayashi Y, Ogawa M, Kihara H, Niwa M, Sakagami Y (2006) Disruption and
525 overexpression of Arabidopsis phytosulfokine receptor gene affects cellular
526 longevity and potential for growth. Plant Physiol 142: 45-53.
- 527 10. Kutschmar A, Rzewuski G, Stührwohldt N, Beemster GTS, Inzé D, et al. (2009)
528 PSK- α promotes root growth in Arabidopsis. New Phytol 181: 820-831.
- 529 11. Vandenbussche F, Verbelen J-P, Van Der Straeten D (2005) Of light and length:
530 regulation of hypocotyl growth in Arabidopsis. BioEssays 27: 275-284.
- 531 12. Elumalai RP, Nagpal P, Reed JW (2002) A mutation in the Arabidopsis

- 532 KT2/KUP2 potassium transporter gene affects shoot cell expansion. *Plant Cell*
533 14: 119-131.
- 534 13. Philippar K, Ivashikina N, Ache P, Christian M, Lüthen H, et al. (2004) Auxin
535 activates KAT1 and KAT2, two K⁺-channel genes expressed in seedlings of
536 *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 37: 815-827.
- 537 14. Marrè E (1979) Fusicoccin: a tool in plant physiology. *Annual Rev Plant Physiol*
538 30: 273-288.
- 539 15. Kanczewska J, Marco S, Vandermeeren C, Maudoux O, Rigaud J-L, Boutry M
540 (2005) Activation of the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation and
541 binding of 14-3-3 proteins converts a dimer into a hexamer. *Proc Natl Acad Sci*
542 USA 102: 11675-11680.
- 543 16. Client GM, Blatt MR (1989) Mechanisms of fusicoccin action: Evidence for
544 concerted modulations of secondary K⁺ transport in a higher-plant cell. *Planta*
545 178: 495-508.
- 546 17. van den Wijngaard PW, Sinnige MP, Roobeek I, Reumer A, Schoonheim PJ, et
547 al. (2005) Abscisic acid and 14-3-3 proteins control K channel activity in barley
548 embryonic root. *Plant J* 41: 43-55.
- 549 18. Gendreau E, Traas J, Desnos T, Grandjean O, Caboche M, et al. (1997) Cellular
550 basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 114: 295-305.
- 551 19. Steffens B, Lüthen H (2000) New methods to analyse auxin-induced growth II.
552 The swelling reaction of protoplasts: a model system for the analysis of signal
553 transduction? *Plant Growth Reg* 32: 115-122.
- 554 20. Dupont FM, Giorgi DL, Spanswick RM (1982) Characterization of a
555 protontranslocating ATPase in microsomal vesicles from corn roots. *Plant*
556 *Physiol* 70: 1694-1699.
- 557 21. Böttger M, Engvield KC, Soll H (1978) Growth of *Avena* coleoptiles and pH drop
558 of protoplast suspensions induced by chlorinated indoleacetic acids. *Planta* 140:
559 89-92.
- 560 22. Karcz W, Burdach Z (2002) A comparison of the effects of IAA and 4-Cl-IAA on
561 growth, proton secretion and membrane potential in maize coleoptile segments.
562 *J Exp Bot* 53: 1089-1098.
- 563 23. Cowling RJ, Harberd NP (1999) Gibberellins control *Arabidopsis* hypocotyl
564 growth via regulation of cellular elongation. *J Ex Bot* 50: 1351-1357.
- 565 24. Rieu I, Ruiz-Rivero O, Fernandez-Garcia N, Griffiths J, Powers SJ, et al. (2008)

- 566 The gibberellin biosynthetic genes *AtGA20ox1* and *AtGA20ox2* act, partially
567 redundantly, to promote growth and development throughout the Arabidopsis life
568 cycle. *Plant J* 53: 488-504.
- 569 25. Matsuzaki Y, Ogawa-Ohnishi M, Mori A, Matsubayashi Y (2010) Secreted
570 peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in Arabidopsis.
571 *Science* 329: 1065-1067.
- 572 26. Savaldi-Goldstein S, Chory J (2008) Growth coordination and the shoot
573 epidermis. *Curr Opin Plant Biol* 11: 42-48.
- 574 27. Matsubayashi Y, Sakagami Y (1999) Characterization of specific binding sites for
575 a mitogenic sulfated peptide, phytosulfokine- α , in the plasma membrane fraction
576 derived from *Oryza sativa* L. *Eur J Biochem* 262: 666-671.
- 577 28. Kim T-W, Lee SM, Joo S-H, Yun HS, Lee Y, et al. (2007) Elongation and
578 gravitropic response to Arabidopsis roots are regulated by brassinolide and IAA.
579 *Plant Cell Environ* 30: 679-689.
- 580 29. Kinoshita T, Cano-Delgado A, Seto H, Hiranuma S, Fujioka S, et al. (2005)
581 Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase
582 BRI1. *Nature* 433: 167-170.
- 583 30. Shinohara H, Ogawa M, Sakagami Y, Matsubayashi Y (2007) Identification of
584 ligand binding site of phytosulfokine by on-column photoaffinity labeling. *J Biol*
585 *Chem* 282: 124-131.
- 586 31. Cleland RE (1976) Rapid stimulation of K^+ - H^+ exchange by a plant growth
587 hormone. *Biophys Res Comm* 69: 333-338.
- 588 32. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays
589 with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

590 **FIGURE LEGENDS**

591

592 **Figure 1: *pskr1-2* and *pskr1-3* seedlings have shorter hypocotyls due to shorter**
593 **cells.**

594 (A) Arabidopsis seedlings were grown on media containing PSK- α at concentrations
595 between 1 nM and 1 μ M or without PSK- α for 5 days at long-day conditions with 80
596 μ E light or with 30 μ E light (low light), or in the dark. Results are averages (\pm SE) of a
597 minimum of >35 (dark and 80 μ E light) or >156 (low light) hypocotyls analyzed per
598 treatment in 3 independent experiments. No PSK- α -dependent growth response was
599 observed with seedlings grown in the dark or at normal light conditions (P <0.001,
600 ANOVA, Tukey test). Seedlings grown at low light conditions had longer hypocotyls
601 in the presence of 10 nM PSK- α (P <0.001, ANOVA, Tukey test). (B) Hypocotyls of
602 representative wt, *pskr1-2*, *pskr1-3*, and *pskr2-1* seedlings grown for 5 days in the
603 dark. Average (\pm SE) hypocotyl lengths determined in 3 independent biological
604 experiments. Letters indicate significantly different values ($n \geq 120$, P <0.001, ANOVA,
605 Tukey test). (C) Hypocotyl cell lengths of wt, *pskr1-2*, *pskr1-3*, and *pskr2-1* seedlings
606 were analyzed and plotted against the cell position. On top, a 5-day-old etiolated wt
607 seedling is shown and cell numbering is indicated from base to top. Results are
608 averages (\pm SE) of 10 hypocotyls analyzed per genotype. Cell numbers did not differ
609 significantly between genotypes (P <0.05, ANOVA, Tukey test; see also Supporting
610 Table S1).

611

612 **Figure 2: Expression analysis of PSK and PSK receptor genes in seedling**
613 **shoots.** (A) Promoter:GUS analysis of 5-day-old etiolated *PSK1:GUS*, *PSK2:GUS*,
614 *PSK3:GUS*, *PSK4:GUS*, *PSK5:GUS*, and *PSKR1:GUS* seedlings. (B) Cross sections
615 from hypocotyls indicate activity of *PSK1:GUS*, *PSK2:GUS*, *PSK3:GUS*, *PSK4:GUS*,
616 *PSK5:GUS*, and *PSKR1:GUS* in parenchyma and epidermal cells, and in the central
617 vascular cylinder of 5-day-old etiolated seedlings. (C) RT-PCR analysis of *PSKR1*
618 and *PSKR2* expression in cotyledons and hypocotyls of 5-day-old etiolated
619 Arabidopsis seedlings. *Actin2* cDNA was amplified as a control for RNA input.

620

621 **Figure 3: *tpst-1* seedlings have shorter hypocotyls and are responsive to PSK-**
622 **α .** (A) 5-day-old etiolated wt and *tpst-1* seedlings grown without PSK- α . (B) Hypocotyl
623 lengths of etiolated wt and *tpst-1* seedlings treated for 5 days with PSK- α at the

624 concentrations indicated. Asterisks indicate significantly different values to the
625 untreated control. Average (\pm SE) hypocotyl lengths were determined in 2
626 independent biological experiments with at least 40 seedlings analyzed per data
627 point ($P < 0.001$, 2-sample *t*-test). (C) Root lengths of etiolated wt and *tpst-1* seedlings
628 treated for 5 days with PSK- α at the concentrations indicated. Asterisks indicate
629 significantly different values to the untreated control. Averages (\pm SE) were
630 determined in 2 independent biological experiments ($n \geq 40$; $P < 0.001$, 2-sample *t*-test).
631 (D) Hypocotyl cell lengths of 5-day-old etiolated wt and *tpst-1* seedlings were plotted
632 against the cell position from base to top. Results are averages (\pm SE) of 10
633 hypocotyls analyzed per genotype. (E) Hypocotyl cell lengths of etiolated wt and *tpst-*
634 *1* seedlings that were treated with 1 μ M PSK- α for 5 days. Results are averages
635 (\pm SE) of 10 hypocotyls analyzed per genotype.

636

637 **Figure 4: Protoplasts from the Arabidopsis hypocotyl expand in response to**
638 **PSK- α .** Protoplasts were isolated from etiolated hypocotyls and their volume was
639 determined at 5 min intervals. After 30 min, at $t=0$ min, effectors were added and
640 protoplast volumes were recorded for another 35 min. (A) Addition of 0.1 nM or 1 μ M
641 PSK- α caused a rapid and continuous increase in protoplast volume whereas
642 unsulfated PSK peptide (usPSK) or 100 nM of the sulfated peptide CCK8 did not
643 ($n=3-5$, $P < 0.05$, 2-sample *t*-test). (B) Dose-response curve of protoplast expansion in
644 wt and *pskr1-3* at PSK- α concentrations between 0.01 nM and 1 μ M. The net volume
645 change was determined 30 min after addition of PSK- α . Results are averages (\pm SE)
646 of 3 to 7 protoplasts analyzed per treatment and genotype. Different letters indicate
647 significantly different values ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey test). (C) Protoplasts were
648 treated with 50 μ M cycloheximide (CHX), 50 μ M CHX + 1 μ M fusicoccin (FC), or 50
649 μ M CHX + 1 nM PSK- α . CHX did not inhibit protoplast expansion induced by FC or
650 PSK- α ($n=4-5$, $P < 0.05$, 2-sample *t*-test). (D) Protoplasts from wt, *pskr1-2*, *pskr1-3*,
651 and *pskr2-1* were treated with 1 nM PSK- α . Protoplasts from wt and *pskr2-1*, but not
652 from *pskr1-2* or *pskr1-3* seedlings expanded. Results are averages (\pm SE) of 3 to 7
653 protoplasts analyzed per treatment and genotype. Rates of net volume change of wt
654 and *pskr2-1* are not significantly different ($P < 0.05$, 2-sample *t*-test). Expansion of
655 *pskr1-2* or *pskr1-3* protoplasts is significantly different to wt and *pskr2-1* ($P < 0.05$, 2-
656 sample *t*-test).

657

658 **Figure 5: PSK- α induced protoplast swelling is not inhibited by ortho-vanadate.**
659 (A) Protoplasts from wt hypocotyls were left untreated (control), or were treated with
660 1 nM PSK- α , 1 μ M FC, or 1 nM PSK- α + 1 μ M FC at t=0. Results are averages (\pm SE)
661 from 4 to 8 protoplasts analyzed per genotype or treatment. Protoplast expansion
662 was not significantly different between effector treatments ($P < 0.05$, 2-sample t -test).
663 (B) WT protoplasts were pre-treated with 0.5 mM ortho-vanadate for 1 h. At t=0
664 min 1 nM PSK- α , 1 μ M FC, or 1 nM PSK- α + 1 μ M FC were added, or protoplasts
665 remained untreated (control). Results are averages (\pm SE) of 3 or 5 protoplasts
666 analyzed per treatment and genotype. (C) Protoplasts from *pskr1-3* hypocotyls were
667 treated with or without 1 μ M FC at t=0. Protoplasts showed a wt swelling response
668 (see A; $P < 0.05$, 2-sample t -test).

669
670 **Figure 6: PSK- α does not cause acidification.** (A) pH changes in media containing
671 Arabidopsis hypocotyls. At t=0 hypocotyls were treated with 10 nM PSK- α or
672 remained untreated (control). After hypocotyls were added, the pH of the buffer
673 dropped from pH 5.7 to pH 5.4 within 130 min due to the pH equilibration between
674 tissue and buffer. Subsequently, PSK- α was applied, or hypocotyls remained
675 untreated (arrow). (B) The Δ pH between control and PSK treated hypocotyls was
676 determined after 0, 30, 60, and 90 min. Results are averages of 5 (controls) or 6 (10
677 nM PSK- α) experiments with 60 hypocotyls each. The increase in pH was not
678 significant at any time point ($P < 0.001$, 2-sample t -test). In addition, pH changes were
679 determined in media containing 8 coleoptiles from etiolated maize seedlings (n=3;
680 n.d. - not determined).

681
682 **Figure 7: Maize protoplasts expand in a K⁺-dependent manner.** (A) Protoplasts
683 were isolated from maize coleoptiles and treated with PSK- α at concentrations
684 between 0.05 nM and 10 nM. The dose-response curve was highly similar to that
685 observed with Arabidopsis hypocotyl protoplasts with a maximal response at 0.1 nM
686 PSK- α . Results are averages (\pm SE) from 3 to 5 protoplasts analyzed per treatment.
687 Letters indicate significantly different values ($P < 0.001$, ANOVA, Tukey test). (B)
688 Maize coleoptile protoplasts were incubated in media containing varying
689 concentrations of K⁺. After addition of 0.1 nM PSK- α at t=0 min, protoplast swelling
690 was recorded for another 100 min. Maximal protoplast expansion was observed at 10
691 mM K⁺ whereas a weaker response was observed at 1 mM K⁺. Without K⁺ in the

692 media, protoplasts did not expand ($P < 0.001$, ANOVA, Tukey test).

Figure 1

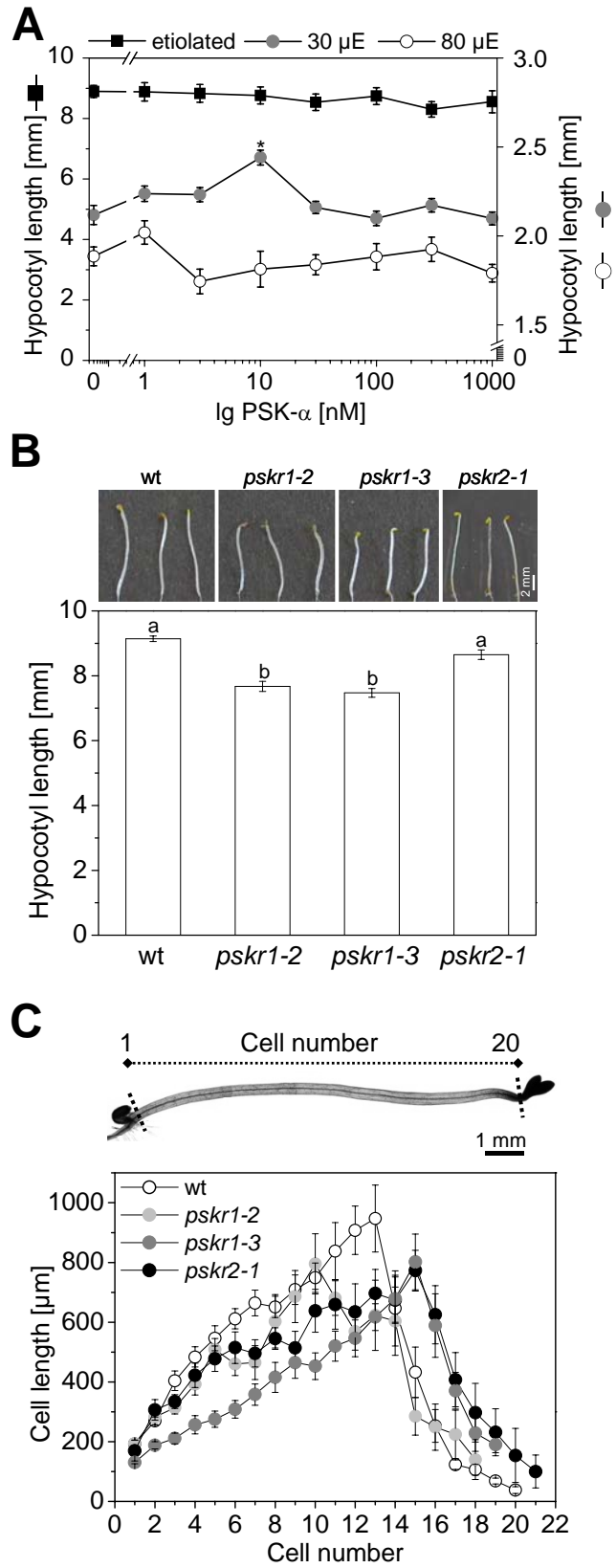


Figure 2

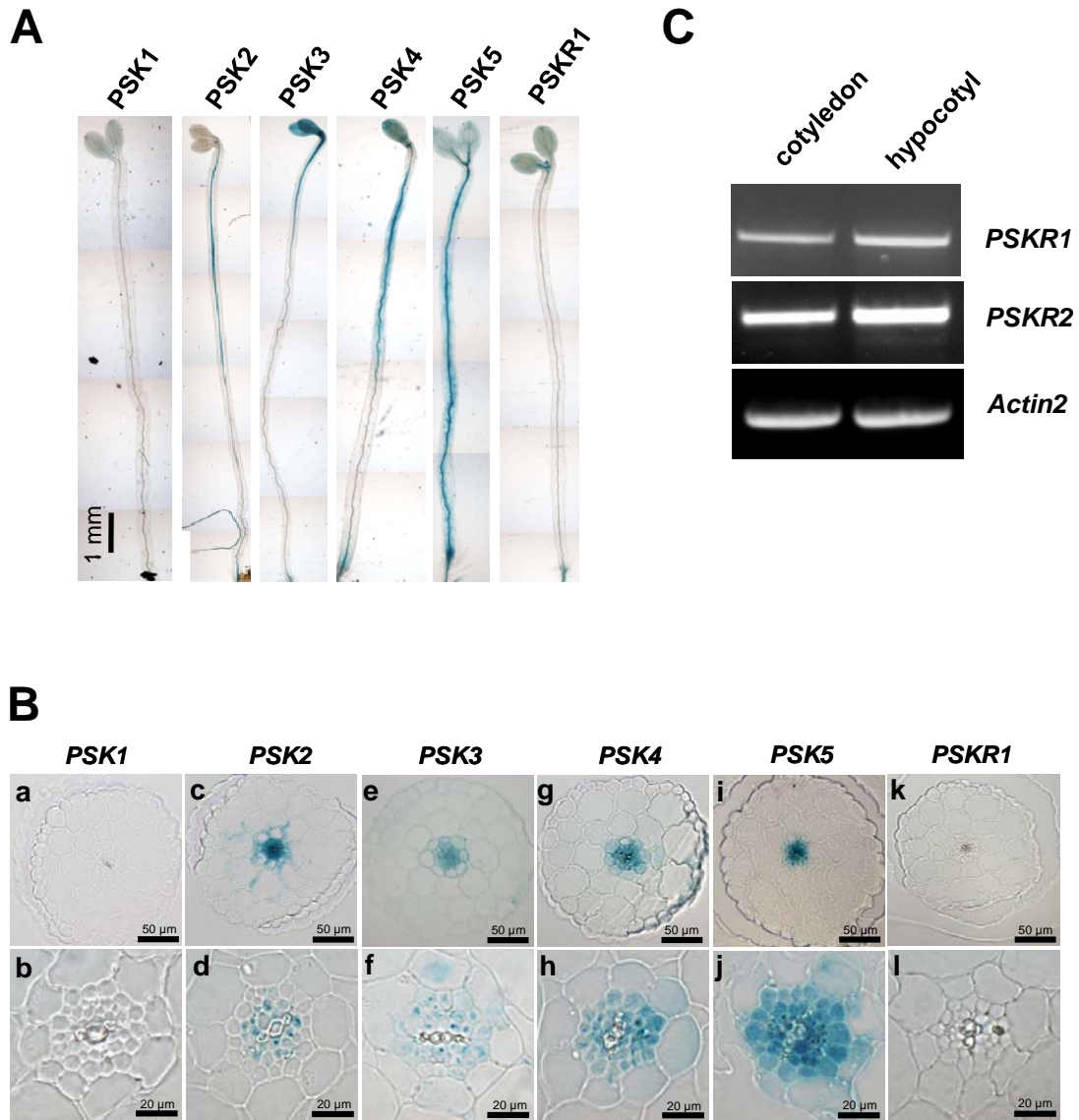


Figure 3

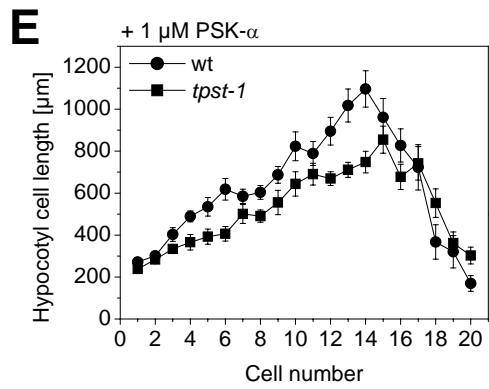
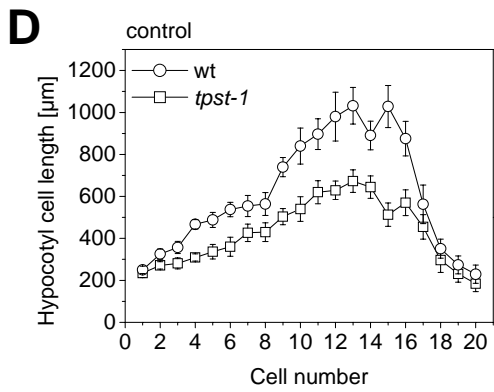
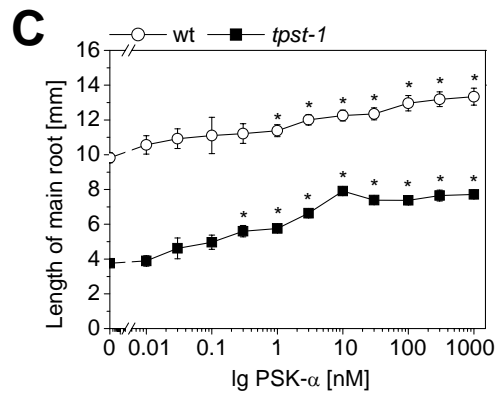
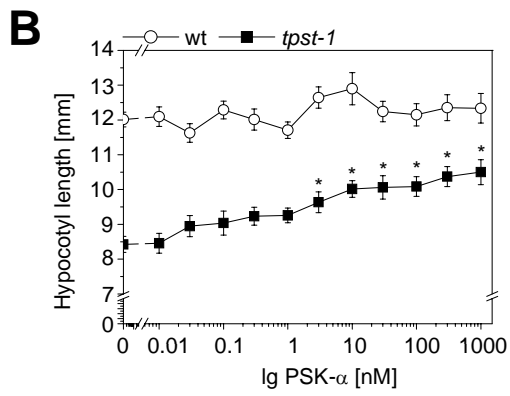
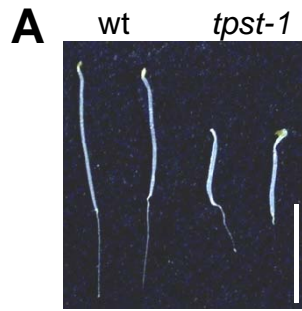


Figure 4

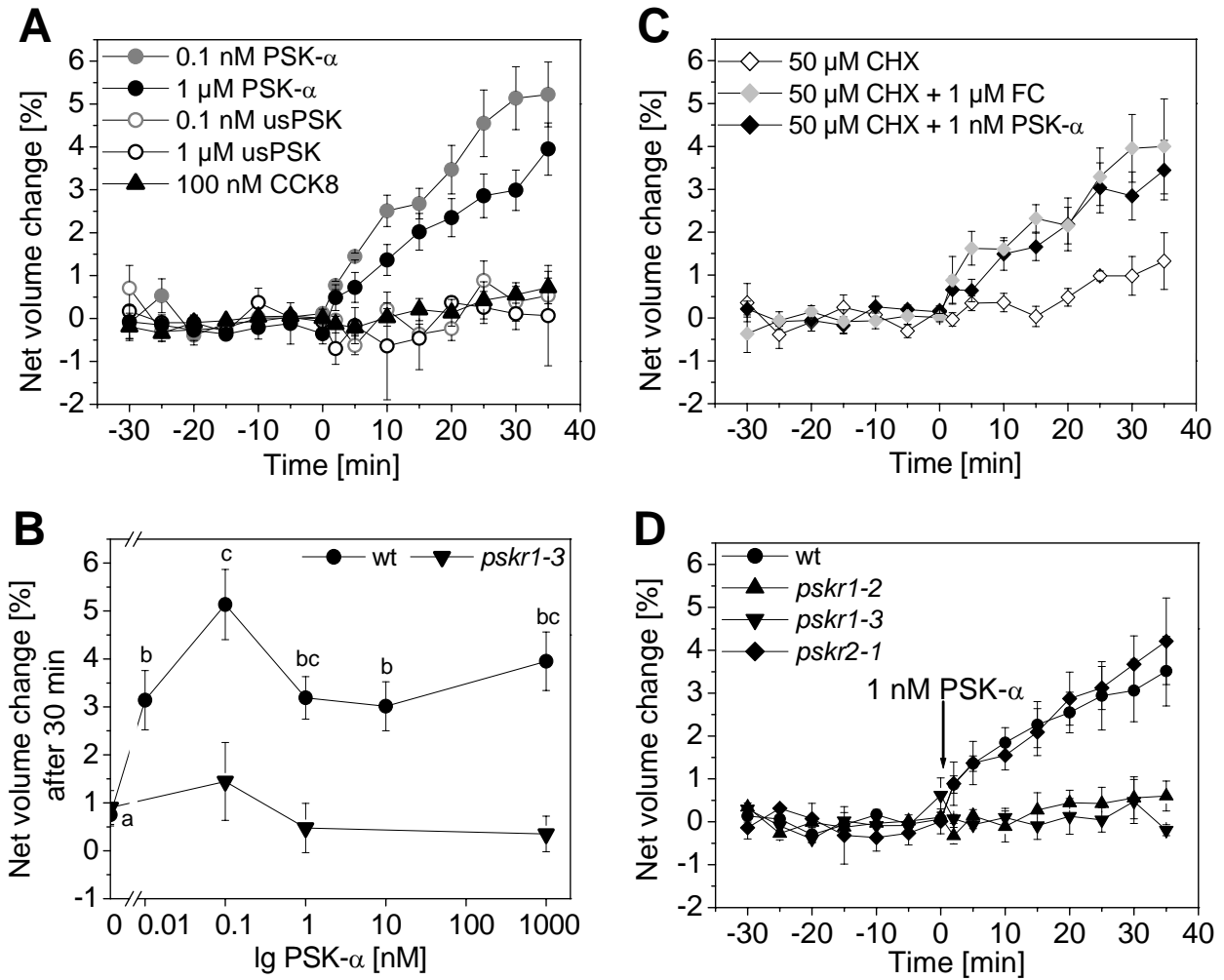


Figure 5

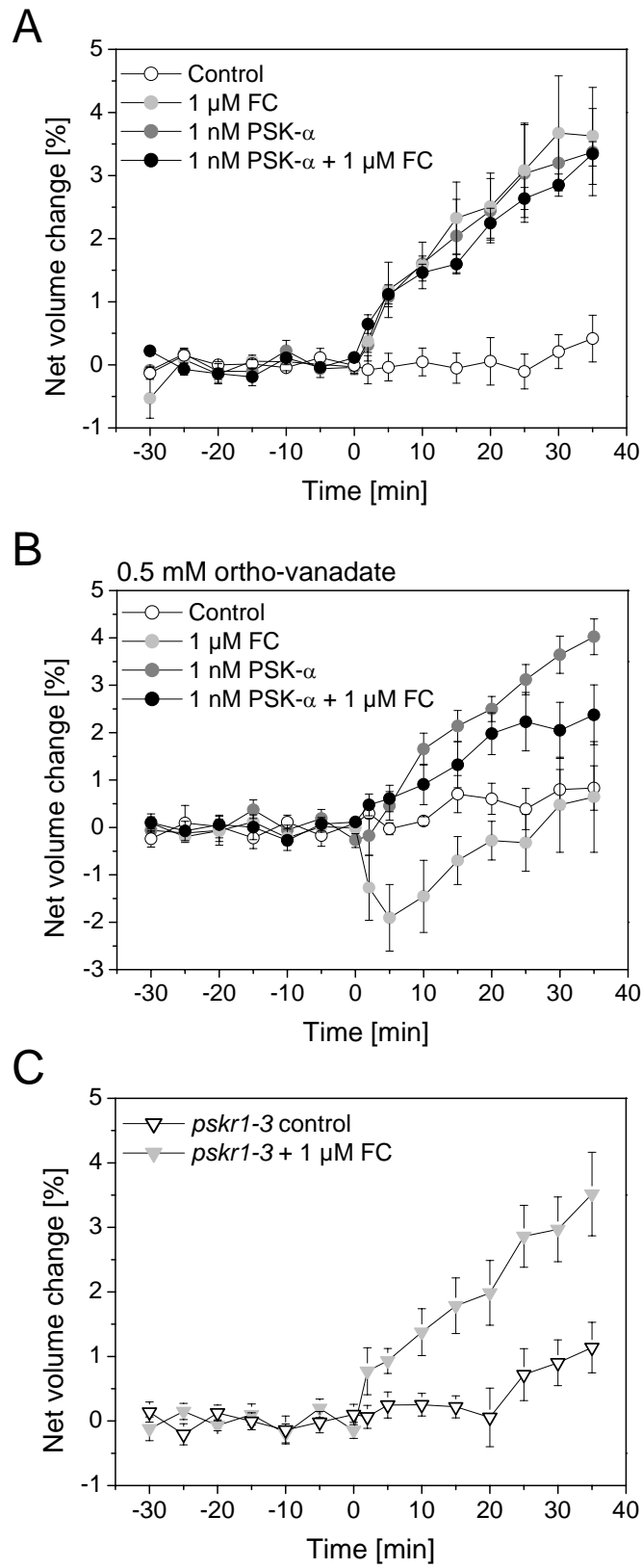
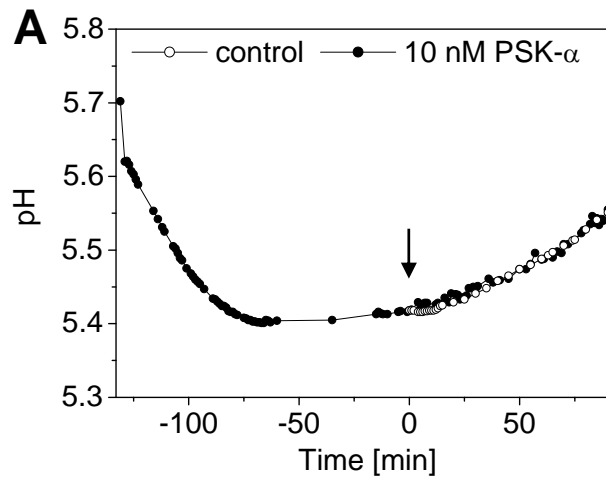


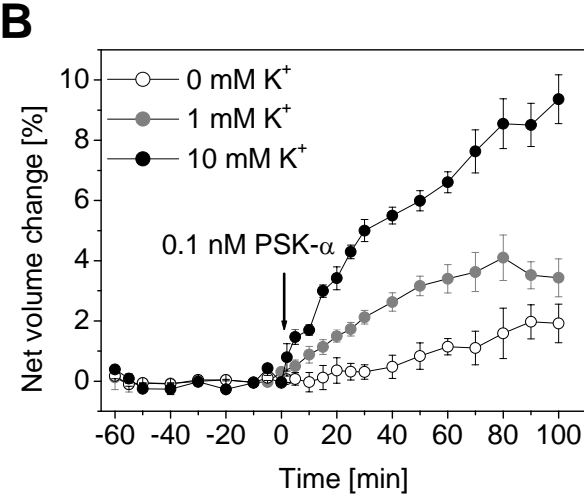
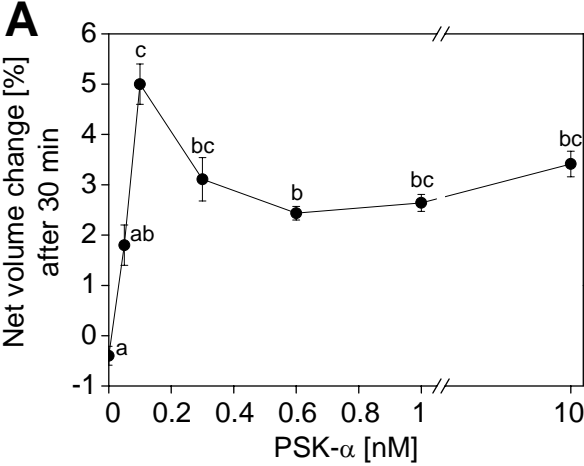
Figure 6



B

| Time [min] | Δ pH Arabidopsis | Δ pH maize |
|------------|-------------------------|-------------------|
| 0 | 0 | 0 |
| 30 | 0.008 | 0.08 |
| 60 | 0.007 | 0.15 |
| 90 | 0.014 | n.d. |

Figure 7



KAPITEL 5

PSI1 ist eine mögliche Komponente des PSK-Signalweges

Um Kandidaten zu identifizieren, die im PSK-Signalweg eine Rolle spielen könnten, wurden über die Datenbank CressExpress sieben Gene identifiziert, die mit den beiden PSK Rezeptoren *PSKR1* und *PSKR2* koexprimiert sind. Für sechs dieser sieben koexprimierten Gene wurden homozygote T-DNA-Insertionslinien charakterisiert. Das Wurzel- und Hypokotylwachstum sowie die Responsivität gegenüber PSK- α wurden an *Knockout* Keimlingen analysiert. Die *Knockout* Linie für *At1g34320* zeigte kürzere Hypokotyle und Wurzeln und eine verringerte Sensitivität gegenüber PSK- α . Das Gen *At1g34320* wurde *PSI1* (*Phytosulfokine Insensitive1*) genannt. Die biochemische Funktion von *PSI1* ist unbekannt. *PSI1* besitzt eine vorhergesagte N-terminale Myristoylierungsstelle. Die Myristoylierungsstelle von *PSI1* wurde mutiert und *PSI1ox_{G→A}* in den *psi1-1* Hintergrund transformiert. Der Wildtyp Phänotyp wurde sowohl durch *PSI1ox/psi1-1* als auch durch *PSI1ox_{G→A}/psi1-1* restauriert, was darauf hin deutet, dass die Myristoylierungsstelle nicht essentiell für die Funktion von *PSI1* ist. Über Lokalisationsstudien wurde *PSI1* im Cytoplasma lokalisiert. *PSI1* kommt sowohl in mono- als auch in dikotylen Pflanzen, jedoch nicht in tierischen Organismen oder Mikroorganismen vor. In *Arabidopsis* wurden zwei homologe Proteine gefunden, die eine Identität von 50,4% und 40% zu *PSI1* haben. Diese wurden *PSI2* (*At1g30755*) und *PSI3* (*At5g08660*) genannt.

Einleitung

Phytosulfokin- α , kurz PSK- α , ist ein disulfatiertes Pentapeptid mit der Aminosäuresequenz Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr-Gln (Matsubayashi und Sakagami, 1996; Yang et al., 2000). Fünf Gene kodieren in Arabidopsis für PSK-Präproteine (Yang et al., 2001; Lorbiecke und Sauter, 2002). Die Bildung von PSK- α aus dem Präproprotein erfolgt durch schrittweise Prozessierung (Yang et al., 2000). Die Sulfatierung der Tyrosine ist essentiell für die biologische Aktivität des PSK- α (Matsubayashi et al., 1996). In Arabidopsis wurde eine Tyrosylprotein-Sulfotransferase (TPST) identifiziert, die für die Sulfatierung der beiden Tyrosine des Pentapeptids verantwortlich ist (Komori et al., 2009). Die Subtilisin Serin-Protease AtSBT1.1 katalysiert spezifisch die proteolytische Spaltung des Präproteins PSK4 aus Arabidopsis (Srivastava et al., 2008). PSK- α wird von Rezeptorkinasen mit Leuzinreichen Wiederholungssequenzen (LRR Rezeptorkinasen) perzipiert, die an der Plasmamembran lokalisiert sind. In Arabidopsis kodieren zwei Gene für PSK-Rezeptoren, *PSKR1* und *PSKR2* (Matsubayashi et al., 2002; Amano et al., 2008). PSK- α wirkt als autokrines Wachstumssignal in Zellkulturen, das die Proliferation von Zellen stimuliert, die in geringer Dichte wachsen (Matsubayashi und Sakagami, 1996). In Keimlingen von Arabidopsis wurde gezeigt, dass PSK- α das Wurzelwachstum fördert (Matsubayashi et al., 2006; Kutschmar et al., 2009). Analysen der *pskr1-2*, *pskr1-3* und *pskr2-1* T-DNA-Insertionslinien ergaben, dass das Wurzelwachstum über PSKR1 und PSKR2 reguliert wird (Kutschmar et al., 2009). Das Wachstum der Hypokotyle wird ausschließlich über PSKR1 kontrolliert (Kapitel 4). PSK- α fördert Wurzel- und Hypokotylwachstum hauptsächlich über eine erhöhte Zelllänge (Kutschmar et al., 2009; Kapitel 4).

Bisher ist das Liganden-Rezeptor-Paar PSK- α /PSKR im Phytosulfokin-Signalweg bekannt. Mögliche weitere Komponenten eines Signalweges können über die Suche nach einem bekannten Phänotyp identifiziert werden. Diese Methode wurde beispielsweise für den CLV3-CLV1 Signalweg erfolgreich angewendet (Jun et al., 2008). Da allerdings teilweise Gene für Proteine mit redundanter Funktion kodieren und Multigen-Familien existieren, kann der Effekt der Mutation durch genetische Redundanz maskiert werden (Butenko et al., 2009).

Microarray-Datenbanken wie ArrayExpress, Genevestigator (Zimmermann et al., 2004) oder Koexpressions-Datenbanken sind hilfreich, um Hinweise auf überlappende Expressionsmuster zu bekommen. Mit Hilfe der Koexpressions-Datenbanken ATTED-II (Obayashi et al., 2008), CressExpress (Srinivasasainagendra et al., 2008) und GeneCat (Mutwil et al., 2008) können Gene identifiziert werden, die eine korrelierende Expression mit anderen Genen zeigen (Butenko et al., 2009). Es wurde gezeigt, dass die Expression von Genen, die mit der gleichen metabolischen Funktion assoziiert sind, Koexpressionsmuster aufweisen (Ihmels et al., 2003; Kharchenko et al., 2005). Allerdings bedeutet Koexpression nicht notwendigerweise, dass die Genprodukte ein und denselben Prozess regulieren (Stuart et al., 2003). Wenn Gene koexprimiert vorliegen, könnte dies aber bedeuten, dass diese Gene in ein und demselben Signal- oder Stoffwechselweg eine Funktion haben könnten.

Da bisher nur PSK- α und die PSK Rezeptoren im PSK-Signalweg bekannt sind, sollten über die Datenbank CressExpress Gene identifiziert werden, die mit den PSK Rezeptoren koexprimiert sind. Für diese Gene sollten homozygote T-DNA-Insertionslinien identifiziert werden. Das Wurzel- und Hypokotylwachstum sowie die Responsivität gegenüber PSK- α dieser *Knockout* Keimlinge sollte analysiert werden. Über diese Analysen sollten mögliche Komponenten des PSK-Signalweges identifiziert und in der Folge weiter charakterisiert werden.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial und Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Die Untersuchungen wurden an *Arabidopsis thaliana*, Ökotyp Columbia-0 durchgeführt. Neben Wildtyp-Samen wurden die in Tabelle 1 und Seite 114 aufgeführten Mutanten in die Analysen mit einbezogen. Die Mutanten wurden vom Salk-Institute (La Jolla, Kalifornien, USA) bezogen. Arabidopsis-Samen wurden auf einem 1:1 Sand-Humus Gemisch ausgebracht und für zwei Tage bei 4°C im Dunkeln stratifiziert. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte unter Langtagbedingungen bei 16 Stunden Licht mit $70 \mu\text{Mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei 22°C. Zur sterilen Anzucht wurden die Samen zunächst 30 Minuten in 2%-iger (w/v) Natrium-Hypochloritlösung oberflächensterilisiert, fünfmal in autoklaviertem Wasser gewaschen und anschließend auf Platten ausgelegt, die 0,5x MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962), 1,5% (w/v) Saccharose und 0,38% (w/v) Gelrite enthielten. Die Samen wurden ebenfalls stratifiziert und anschließend, wie oben beschrieben, unter Langtagbedingungen oder im Dunkeln bei 22°C angezogen. In einigen Versuchen wurde dem Medium $1 \mu\text{M}$ PSK- α (NeoMPS, Straßburg, Frankreich) zugesetzt.

Tabelle 1: Gene, die mit den PSK Rezeptoren *PSKR1* und *PSKR2* koexprimiert sind, wurden mit Hilfe des Programms CressExpress identifiziert. Neben den Genloki sind die T-DNA-Insertionslinien, die analysiert wurden, aufgeführt.

| Genlokus | T-DNA-Insertionslinie |
|------------------|---------------------------------------|
| <i>At3g26090</i> | CS6537 |
| <i>At5g64220</i> | N507027 |
| <i>At1g34320</i> | N521769 |
| <i>At5g65240</i> | N530801 |
| <i>At3g55270</i> | N613092 |
| <i>At4g30360</i> | N541923 |
| <i>At1g02890</i> | keine T-DNA-Insertionslinie verfügbar |

Identifizierung von Genen, die mit den PSK Rezeptoren *PSKR1* und *PSKR2* koexprimiert sind

Mit Hilfe der Datenbank CressExpress (Srinivasasainagendra et al., 2008) wurde nach Genen gesucht, die mit den PSK Rezeptoren *PSKR1* und *PSKR2* koexprimiert sind. Dabei wurden *Microarray*-Daten von Arabidopsis Keimlingen verwendet. Es wurde ein *cut-off value* von 0,15 für die Kolmogorov-Smirnov Qualitätskontrolle angenommen. Es wurden sieben koexprimierte Gene identifiziert. Für sechs von diesen waren T-DNA-Insertionsmutanten verfügbar (siehe Tabelle 1). Außerdem wurden zu At1g34320 zwei homologe Proteine aus dem Arabidopsis-Proteom identifiziert. Für diese wurden ebenfalls homozygote T-DNA-Insertionslinien charakterisiert (*At1g30755*, N666232 und *At5g08660*, N655691).

Kreuzungen

Die Blüten etwa sechs Wochen alter homozygoter *pskr1-3* und *pskr2-1* Pflanzen wurden emaskuliert und mit Pollen homozygoter *psi1-1* Pflanzen unter dem Binokular handbestäubt. Doppelt heterozygot getestete Pflanzen wurden bis zur Samenreife angezogen und aus der Folgegeneration (F₁) Pflanzen auf Reinerbigkeit über Genexpressionsanalysen getestet. Doppelt homozygote Pflanzen wurden für die Wachstumsmessungen verwendet. Außerdem wurden *pskr1-3/pskr2-1* Pflanzen mit *psi1-1* Pflanzen gekreuzt und eine Dreifachmutante *pskr1-3/pskr2-1/psi1-1* erzeugt.

Wachstumsmessungen

Fünf Tage alte Arabidopsis Keimlinge, die entweder im Langtag oder im Dunkeln angezogen wurden, wurden fotografiert und die Längen der Wurzeln und Hypokotyle mit Hilfe von Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) und eines internen Standards bestimmt.

Molekularbiologische Methoden

DNA aus Arabidopsis Pflanzen wurde nach dem Protokoll von Weigel und Glazebrook (2002) isoliert. Dazu wurde ein Arabidopsis-Blatt in 400 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris, pH 5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% (w/v) SDS) gemörsert und anschließend fünf Minuten bei 12000 x g zentrifugiert. 300 µl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 300

µl Isopropanol versetzt. Nach einer weiteren Zentrifugation von fünf Minuten bei 12000 x g wurde der Überstand verworfen und 500 µl 70%-iges (v/v) Ethanol hinzugegeben. Es wurde wiederum fünf Minuten bei 12000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl autoklaviertem Wasser resuspendiert. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die optische Dichte (OD) der Nukleinsäuren spektralphotometrisch bei 260 und 280 nm gemessen. Eine OD von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml RNA. Mit Hilfe des Absorptionsquotienten von 260 und 280 nm wurde die Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt. Diese sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

RNA wurde mit TRI-REAGENT™ nach Anweisung des Herstellers isoliert (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland). Arabidopsis-Blätter wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und zu dem Pulver 500 µl TRI-REAGENT™ gegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben mit 100 µl Chloroform versetzt, 15 Sekunden geschüttelt und drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 12000 x g. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit je 125 µl Isopropanol und Salzlösung (0,8 M Natriumcitrat, 1,2 M Natriumchlorid) versetzt. Die Lösung wurde gemischt, zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zehn Minuten bei 4°C und 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70%-igem (v/v) Ethanol versetzt. Es folgte eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 4°C und 7500 x g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl autoklaviertem Wasser resuspendiert und zehn Minuten bei 65°C inkubiert. Im Anschluss an die RNA-Isolierung wurde eine DNase-Behandlung durchgeführt. Dazu wurden 1 µl DNaseI und 1/10 Volumen DNaseI-spezifischer Puffer (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) hinzugegeben. Das Gemisch wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die RNA wurde mit Hilfe einer Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Es wurde ein Volumen Phenol/Chloroform im Verhältnis 1:1 hinzugegeben und eine Minute bei Raumtemperatur und 20000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Prozedur wurde mit Chloroform wiederholt. Die wässrige Phase wurde mit 2,5 Volumen 100%-igem (v/v) Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat

versetzt und die RNA über Nacht bei -20°C gefällt. Am nächsten Tag wurde das Gemisch bei $20000 \times g$ und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 70%-igem (v/v) Ethanol für 15 Minuten bei $20000 \times g$ und 4°C gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet, in $20 \mu\text{l}$ autoklaviertem Wasser gelöst und zehn Minuten bei 65°C inkubiert. Die Konzentration der RNA wurde wie oben beschrieben photometrisch bestimmt. 500 ng der RNA wurde mit Hilfe von Oligo-dT Oligonukleotiden (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) revers transkribiert. Dazu wurde die „Revert Aid™ M-MuLV Reverse Transkriptase“ (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet und die reverse Transkription nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion wurden spezifische DNA- oder cDNA-Sequenzen amplifiziert. Dabei wurde das folgende Standard-PCR-Programm verwendet:

PCR-Programm:

| | | | |
|--------------------------|----------------------|----------------|------------------|
| Initiale Denaturierung | 94°C | 5 min | |
| Denaturierung | 94°C | 45 s | |
| <i>Annealing</i> | T_m | 45 s bis 1 min | 28 bis 38 Zyklen |
| Elongation | 72°C | 45 s bis 4 min | |
| Abschließende Elongation | 72°C | 10 min | |

Die Anlagerungstemperatur (T_m) wurde entsprechend der angegebenen physikalischen Schmelztemperaturen der Oligonukleotide gewählt. Die *Taq*-Polymerase synthetisiert mit einer Geschwindigkeit von etwa 1000 Basen pro Minute. Die Zeit für die Elongation wurde nach dieser Richtgeschwindigkeit kalkuliert. Wurden fehlerfreie Fragmente für Klonierungen benötigt, wurde für die Amplifikation die *Pfu*-Polymerase verwendet, da diese Fehlerkorrekturaktivität besitzt. Die *Pfu*-Polymerase arbeitet langsamer mit etwa 500 Basen pro Minute und die Elongationszeit wurde dementsprechend verlängert.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide

| Name des Oligonukleotids | Sequenz (5' → 3') |
|--------------------------|-------------------------------------|
| At3g26090F1 | GCGAGTGGATGTGCTCTACA |
| At3g26090R1 | AACCGGGACTACTGCATCTG |
| At5g64220F1 | GGATAGTCGTCAAGCAAGTTC |
| At5g64220R1 | TCCATGCAATACCTCCAGATG |
| At1g34320F1 | TGGTCTTGCCTTGCAATTACG |
| At1g34320R1 | CATGGTGAAGAGTATCTATCC |
| At5g65240F1 | TGGAACCATCCAAGCCTAAG |
| At5g65240R1 | ACTTGAGACCAAGTACAAGG |
| At3g55270F1 | GGGTACAAATTGGTGAATCC |
| At3g55270R1 | TCTATTGTGCTGCTGAGTG |
| At4g30360F1 | CGATATGAGCAGTATAAGTGG |
| At4g30360R1 | GCAGAGAAATCAGGCTCCTCG |
| SalkLBb | GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT |
| At1g34320F2+Stopp | CACCATGGGTGGGCTTTGTTCAAG |
| At1g34320R2+Stopp | CACCATTCTGAAGCTTGTAG |
| At1g34320F3-Stopp | CGGGGTACCACCATGGGTGGGCTTTGTTCAAGG |
| At1g34320R3-Stopp | CCGCTCGAGTACAAGCTTCGAATGGTGTCCACGCG |
| At1g34320falseF4+Stopp | CACCATGGCTGGGCTTTGTTCAAG |
| At1g34320R4false+Stopp | CACCATTCTGAAGCTTGTAG |
| At1g34320F5false-Stopp | CGGGGTACCACCATGGCTGGGCTTTGTTCAAGG |
| At1g34320R5false-Stopp | CCGCTCGAGTACAAGCTTCGAATGGTGTCCACGCG |

Die für die Versuche verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die für diesen Teil der Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die Größe von DNA-Fragmenten wurde über Gelelektrophorese bestimmt. Abhängig von der Größe der erwarteten Fragmente wurden Agarose-Konzentrationen von 1% (w/v) bis 2% (w/v) gewählt. Als Laufpuffer diente 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer. DNA wurde durch Ethidiumbromid angefärbt und nach der Auftrennung unter UV-Licht betrachtet. Zur Größen- und Konzentrationsbestimmung diente die „Smart Ladder“ (Eurogentec, Seraing, Belgien). DNA wurde aus Agarose-Gelen mit Hilfe des „GeneJET™ Gel Extraction Kits“ der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) nach dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll aufgereinigt. Um Fehler in den DNA-Sequenzen auszuschließen und die Richtung der Insertion zu überprüfen, wurden die Fragmente in den

Eingangsvektoren (Tabelle 3) sequenziert (GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland).

Genetische Analyse von T-DNA-Insertionsmutanten

Jede der T-DNA-Insertionslinien wurde auf Reinerbigkeit getestet. Dazu wurde zum einen eine PCR mit zwei wildtypspezifischen Oligonukleotiden, zum anderen eine PCR mit einem wildtyp- und einem insertionspezifischen Oligonukleotid (SalkLBb) durchgeführt. In reinerbig getesteten Pflanzen wurde außerdem über RT-PCR getestet, ob die Insertion zum Ausschalten der Expression des betroffenen Gens führte. Für die PCR-gestützten Analysen wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Oligonukleotide verwendet.

Klonierungen und Transformationen

Transformationen wurden mit kompetenten *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens* durchgeführt. Dazu wurden Bakterien in 200 ml Medium angeimpft und bei 37°C bzw. 28°C zu einer OD von 0,5 bis 1 angezogen. Danach wurden die Kulturen kurz auf Eis gegeben und für fünf Minuten bei 3000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml 0,1 M Calciumchlorid resuspendiert. Die Bakterien wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Die für die Transformationen und Klonierungen verwendeten Vektoren sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Vektoren, ihre Verwendung und die für die Selektion verwendeten Antibiotika.

| Vektorbeschreibung | Verwendung | Antibiotikum |
|---------------------------------------|---|---------------|
| pENTR TM 1A Dual Selection | Grundvektor | Kanamycin |
| pENTR TM /D-Topo | Grundvektor | Kanamycin |
| pB7WG2,0 | <i>PSI1ox/psi1-1</i> <i>PSI1_G→_{AOX}/psi1-1</i> | Spectinomycin |
| pUGT1 | Ubi:PSI1-GFP | Spectinomycin |
| pARC428 | 35S:PSI1-YFP 35S:PSI1-YFP 35S:PSKR1-YFP | Ampicillin |

Die Klonierungen wurden mit transformationskompetenten *E. coli* DH5 α -Zellen durchgeführt. Die Transformation von *A. thaliana* erfolgte mit Hilfe des *A. tumefaciens* Stammes GV3101. *E. coli* Bakterien wurden bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. *A. tumefaciens* Bakterien wurden bei 28°C und 200 rpm angezogen. 200 μ l transformationskompetente DH5 α -Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurde 1 μ g des zu transformierenden Plasmids gegeben und die Bakterien wurden 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden. Anschließend wurden die Bakterien für eine Minute auf Eis gegeben. Es wurden 500 μ l LB-Medium (USB Corporations, Cleveland, OH USA) hinzugegeben und die Zellen für eine Stunde bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. Abschließend wurden die Bakterien auf Medien mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zu 200 μ l transformationskompetenten Agrobakterien wurde 1 μ g des zu transformierenden Plasmids gegeben. Die Bakterien wurden 30 Sekunden auf Eis gehalten und anschließend eine Minuten in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden sie bei 37°C aufgetaut und 500 μ l YEP-Medium (auf einen Liter 10 g Hefeextrakt, 10 g Pepton und 5 g NaCl, auf pH 7 eingestellt) wurde zu den Bakterien gegeben. Die Bakterien wurden drei Stunden bei 28°C und 200 rpm geschüttelt und danach auf den entsprechenden Selektionsmedien ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 28°C inkubiert.

Zur Isolierung von Plasmiden wurde 1 ml der Übernachtskulturen für zwei Minuten bei 20000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 μ l Lösung 1 (50 mM Glucose, 25 mM Tris, pH 8, 10 mM EDTA) resuspendiert, mit 200 μ l Lösung 2 (0,4 M NaOH, 2% (w/v) SDS) gemischt und anschließend fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 150 μ l Lösung 3 (3 M Natriumacetat, pH 4,8 bis 5) hinzugegeben und zehn Minuten bei 20000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,7 Volumen Isopropanol gemischt. Es wurde für zehn Minuten bei 20000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und 500 μ l 70%-iges (v/v) Ethanol hinzugegeben. Es folgte eine zehnminütige Zentrifugation bei 20000 x g und Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet und in 50 μ l autoklaviertem Wasser resuspendiert. In einigen Fällen wurden Plasmide außerdem mit Hilfe des „GeneJet™ Plasmid Miniprep Kits“ isoliert (Fermentas, St. Leon-Rot,

Deutschland). Isolierte Plasmide wurden mit Restriktionsenzymen geschnitten, um den korrekten Einbau der Fragmente zu überprüfen. Die verdauten Plasmide wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

Arabidopsis wurde nach der Methode von Clough und Bent (1998) mit *A. tumefaciens* transformiert. Dazu wurde eine *A. tumefaciens* Kultur bis zu einer Dichte von 0,5 bis 1 angezogen. Anschließend wurden der Kultur 5% (w/v) Saccharose und 0,03% (v/v) Silwet hinzugegeben. Die Blüten von etwa sechs Wochen alten Arabidopsis-Pflanzen wurden etwa zehn Sekunden in die Bakterienlösung getaucht, einen Tag in Tücher eingewickelt, die Pflanzen in die Klimakammer gestellt und bis zur Samenreife angezogen. Die geernteten Samen wurden auf Medien, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, bzw. mit 200 μ M Glufosinat Ammonium (Basta, AgrEvo, Berlin, Deutschland) selektiert.

Analyse der subzellulären Lokalisation von PSI1

Um die subzelluläre Lokalisation von PSI1 zu untersuchen, wurden PSI1-Fusionsproteinkonstrukte sowohl transient in Arabidopsis Mesophyllprotoplasten als auch stabil in Arabidopsis Pflanzen eingebracht. Für die transiente Transformation wurde ein Konstrukt mit einem gelb fluoreszierenden Protein (YFP), für die stabile Transformation ein Konstrukt mit einem grün fluoreszierenden Protein (GFP) verwendet. Die Konstrukte wurden 35S:PSI1-YFP und Ubi:PSI1-GFP genannt. Für die Oligonukleotidsynthese wurde an das 5' Ende des 5'→3' Oligonukleotids eine KpnI- und an das 5' Ende des 3'→5' Oligonukleotids eine XhoI-Schnittstelle angefügt. Die gesamte kodierende *PSI1*-Sequenz wurde mit den in Tabelle 2 aufgeführten Primern (At1g34320F3-Stopp, At1g34320R3-Stopp) über PCR amplifiziert, über Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und in den Eingangsvektor pENTRTM 1A Dual Selection kloniert. Für die Amplifikation der proteinkodierenden Sequenz wurde cDNA des Wildtyps als *template* eingesetzt. Das *PSI1*-Fragment wurde mit KpnI- und XhoI-Schnittstellen restringiert und über diese Schnittstellen in die Vektoren pUGT1 beziehungsweise pARC428 ligiert. Die Klonierungen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Das PSI1-Fusionsproteinkonstrukt Ubi:PSI1-GFP wurde stabil über Agrobakterien in Arabidopsis transformiert. Transformierte

Pflanzen wurden über Kanamycinresistenz selektiert. Fünf Tage alte Keimlinge wurden an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM; Leica, Wetzlar, Deutschland) analysiert. Dazu wurde das GFP bei 488 nm angeregt und die Fluoreszenz bei 530 nm detektiert.

Außerdem wurden Mesophyllprotoplasten transient mit dem PSI1-Fusionsproteinkonstrukt 35S:PSI1-YFP transformiert. Die Mesophyllprotoplasten wurden nach dem Protokoll von Chen et al. (2006) isoliert und über Nacht mit dem Konstrukt transformiert. Anschließend wurden sie am CLSM analysiert. Das YFP wurde bei 489 nm angeregt und die Fluoreszenz bei 509 nm gemessen.

Komplementierung von *psi1-1* durch PSI1

Es sollte untersucht werden, ob der Phänotyp der *psi1-1* T-DNA-Insertionslinie auf den *Knockout* von *PSI1* zurückzuführen ist. Da für *PSI1* keine zweite unabhängige T-DNA-Insertionslinie zur Verfügung stand, wurde ein Komplementierungskonstrukt in *psi1-1* Pflanzen eingebracht. Dazu wurde die kodierende Sequenz von *PSI1* mit Hilfe der genspezifischen Oligonukleotide At1g34320F2+Stopp und At1g34320R2+Stopp (Tabelle 2) über PCR aus cDNA des Wildtyps amplifiziert, aufgereinigt und in den Eingangsvektor pENTRTM/D-Topo ligiert. Über homologe Rekombination wurde das Konstrukt in den Überexpressionsvektor pB7WG2,0 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) kloniert, der zur Expression von PSI1 unter der Kontrolle des 35S-Promotors führt.

Um zu analysieren, ob die vorhergesagte N-terminale Myristoylierungsstelle wichtig für die Funktion von PSI1 ist, wurde sie so mutiert, dass ein Aminosäureaustausch von Glyzin zu Alanin erfolgte. Das *PSI1ox* und das *PSI1_{G→A}ox*-Konstrukt wurden über Agrobakterien in *psi1-1* Pflanzen transformiert. Wurzel- und Hypokotylwachstum von fünf Tage alten Keimlingen der F₁ Generation und ihre Sensitivität auf PSK- α wurden untersucht.

Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen der Ergebnisse erfolgten mit Hilfe der Minitab Software (Minitab Inc., State College Pennsylvania, USA). Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurde über eine ANOVA (Tukey Test) oder einen zweiseitigen t -Test analysiert. Vor der statistischen Analyse wurden die Werte auf ihre Normalverteilung und auf ihre Varianz getestet. Wenn eine der Bedingungen nicht erfüllt wurde, wurde eine Fehlerwahrscheinlichkeit (P -value) von $P < 0,001$, ansonsten von $P < 0,05$ angenommen. In den Abbildungen ist der Standardfehler (\pm SE) angegeben.

Datenbankrecherchen

Für Datenbankrecherchen zu Sequenzinformationen und T-DNA-Insertionsmutanten wurden die folgenden Institutionen und Datenbanken genutzt:

- The National Center of Biotechnology (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), sowie dessen Blast Server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)
- The Arabidopsis Information Resource (TAIR, <http://www.arabidopsis.org/>)
- The Institute for Genomic Research (TIGR, <http://www.tigr.org/>)
- The Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC, <http://arabidopsis.info/>)
- Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (SIGNAL, <http://signal.salk.edu/>)
- Co-expression analysis for Arabidopsis (CressExpress, <http://www.cressexpress.org/>)

Ergebnisse

Identifizierung von Genen, die mit den PSK Rezeptorgenen *PSKR1* und *PSKR2* koexprimiert sind

Gene, die mit derselben metabolischen Funktion assoziiert sind oder in ein und demselben Signalweg eine Rolle spielen, können Koexpressionsmuster aufweisen (Ihmels et al., 2003; Kharchenko et al., 2005). Die Datenbank CressExpress (Srinivasasainagendra et al., 2008) wurde genutzt, um nach Genen zu suchen, die mit den PSK Rezeptoren *PSKR1* und *PSKR2* koexprimiert sind. Dabei wurden *Microarray*-Daten von Arabidopsis-Keimlingen verwendet und ein *cut-off value* für die Kolmogorov-Smirnov Qualitätskontrolle von 0,15 und eine Grenze für die Koexpression von $\geq 0,36$ angenommen. Es wurden sieben Gene gefunden, die mit den Rezeptorgenen koexprimiert sind. Diese Gene kodieren für Proteine, die in der Signaltransduktion eine Rolle spielen könnten. Die identifizierten Gene sind zusammen mit ihren in der Literatur beschriebenen oder vorhergesagten Funktionen in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Gene, die mit den beiden PSK Rezeptorgenen *PSKR1* und *PSKR2* aus Arabidopsis koexprimiert sind. Die Gene wurden über Koexpressionsanalysen mit dem Programm CressExpress identifiziert. Zu jedem Gen ist neben dem Genlokus ein Name aufgeführt, der in der Literatur beschrieben ist oder der den Genen in dieser Arbeit gegeben wurde. Außerdem sind in der Literatur beschriebene (putative) Funktionen angegeben.

| Name | Genlokus | Beschriebene Funktion(en) und Merkmale | Literatur |
|---------------|------------------|---|----------------------|
| <i>RGS1</i> | <i>At3g26090</i> | <i>Regulator of G protein signaling 1</i> | Chen und Jones, 2004 |
| <i>TF</i> | <i>At5g64220</i> | Transkriptionsfaktor | Bouche et al., 2002 |
| <i>PSI1</i> | <i>At1g34320</i> | unbekannte Funktion | - |
| <i>RLK</i> | <i>At5g65240</i> | LRR ähnliche Rezeptorkinase | - |
| <i>MKP1</i> | <i>At3g55270</i> | <i>MAP Kinase 1</i> | Ulm et al., 2001 |
| <i>CNGC17</i> | <i>At4g30360</i> | <i>Cyclic nucleotide gated channel 17</i> | Reddy et al., 2002 |
| <i>ATPase</i> | <i>At1g02890</i> | ATPase Aktivität; Nukleotid Bindungsaktivität | - |

Analyse der T-DNA-Insertionsmutanten

Mögliche Komponenten eines Signalweges können zum Beispiel über die Suche nach einem bekannten Phänotyp identifiziert werden. Für die koexprimierten Gene standen T-DNA-Insertionsmutanten zur Verfügung, an denen untersucht werden sollte, ob sie einen Phänotyp wie *pskr1-2*, *pskr1-3* und *pskr2-1* haben. Für eines der Gene, *At1g02890*, war keine Mutante verfügbar. Daher wurde dieses Gen von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Die T-DNA-Insertionsmutanten wurden auf Reinerbigkeit getestet und sofern sie reinerbig waren, wurde über RT-PCR analysiert, ob die Insertion zum Ausschalten der Expression des entsprechenden Gens führte. Da für *At4g30360* zunächst keine reinerbigen Pflanzen identifiziert wurden, wurde hier direkt eine RT-PCR durchgeführt. Die Genschemata, die Lokalisation der Insertionen und die Genexpression in den Insertionslinien sind in Abbildung 1 dargestellt. Zur Kontrolle der cDNA-Synthese und zur Überprüfung eingesetzter RNA-Mengen für die reverse Transkription wurde aus der verwendeten cDNA *Actin2* amplifiziert (Laval et al., 2002; Vielle-Calzada, 1999). In allen T-DNA-Insertionslinien war über RT-PCR kein Transkript des entsprechenden Gens nachweisbar. Für phänotypische und funktionale Analysen wurden homozygote *Knockout* Linien verwendet.

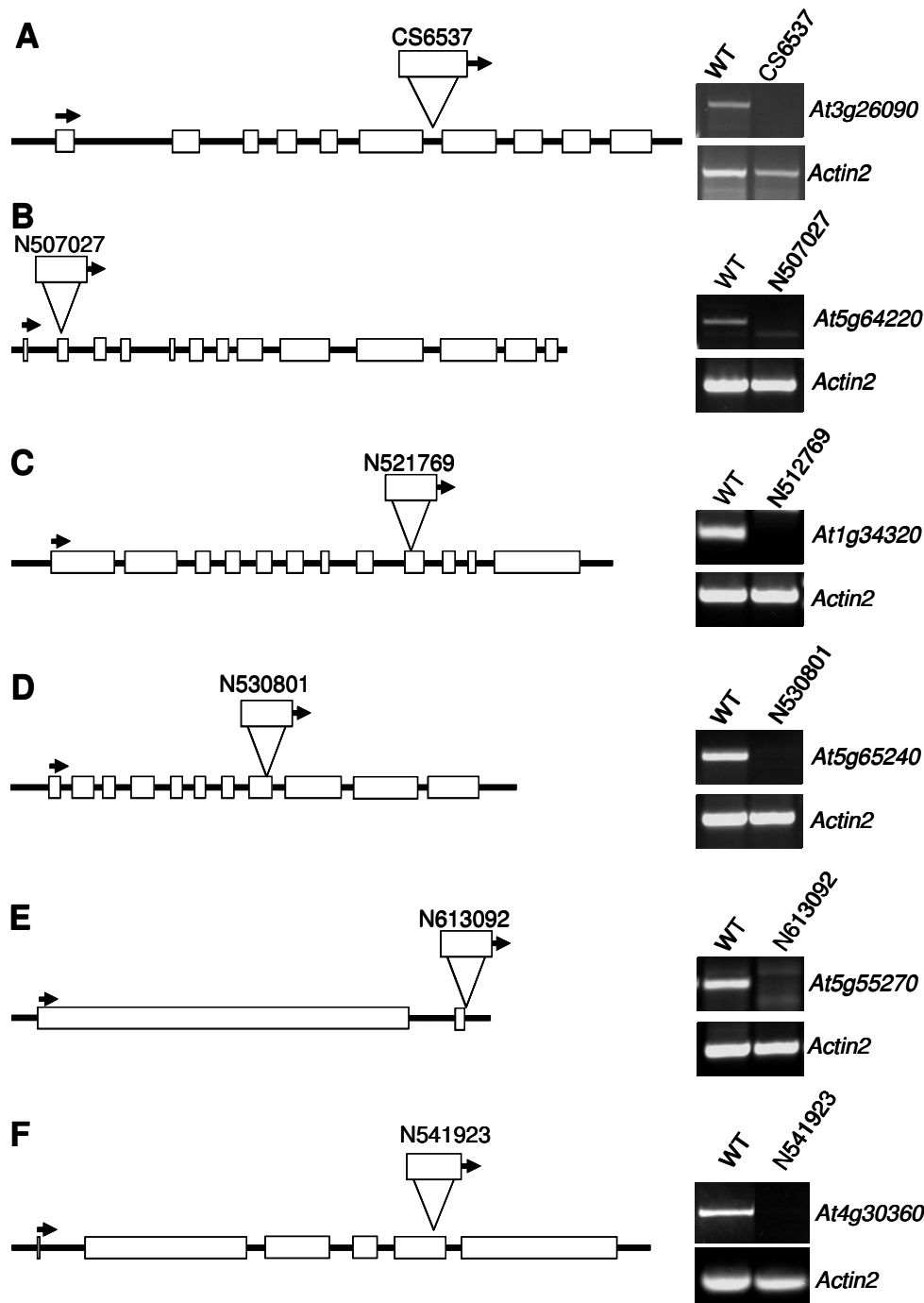


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Gene, die mit den PSK Rezeptorgenen *PSKR1* und *PSKR2* koexprimiert sind, und Lokalisation der T-DNA-Insertionen. In der Abbildung sind die Exons (weiße Kästen) und Introns (schwarze Striche) der Gene **A** *At3g26090* **B** *At5g64220* **C** *At1g34320* **D** *At5g65240* **E** *At5g55270* **F** *At4g30360* dargestellt. Am 5' Ende wird der Translationsstart durch einen Pfeil verdeutlicht. Die Lokalisation der T-DNA-Insertion ist für die angegebenen Linien schematisch kenntlich gemacht. Die Pfeile geben die Richtung der T-DNA-Insertion vor. Rechts vom Schema ist die relative Transkriptmenge von Wildtyp und T-DNA-Insertionslinie gezeigt. Über RT-PCR wurden die Transkripte mit genspezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. Als Kontrolle wurde jeweils *Actin2*-mRNA amplifiziert.

***psi1-1* Keimlinge haben kürzere Hypokotyle und Wurzeln**

Wurzel- und Hypokotylwachstum der *pskr1-2* und *pskr1-3* T-DNA-Insertionsmutanten waren signifikant reduziert (Matsubayashi et al., 2006; Kutschmar et al., 2009; Kapitel 4). Im Wildtyp förderte PSK- α das Wurzelwachstum von Keimlingen um 20%, während das Wachstum von *pskr1-3* Wurzeln nur um 10% gefördert wurde (Kutschmar et al., 2009). Mögliche Komponenten eines Signalweges können über die Suche nach einem bekannten Phänotyp identifiziert werden. Da die Gene, die mit den PSK Rezeptorgen koexprimiert sind, Komponenten des PSK Signalweges sein könnten, wurden die T-DNA-Insertionslinien der koexprimierten Gene auf *pskr1-3* ähnliche Phänotypen hin untersucht.

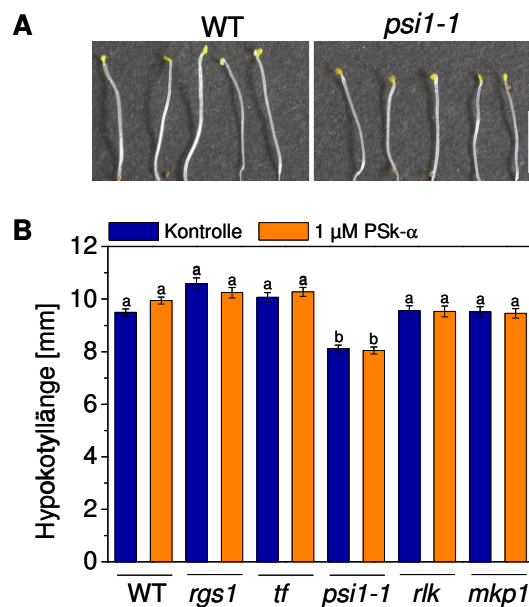


Abbildung 2: *psi1-1* Keimlinge haben kürzere Hypokotyle als der Wildtyp. Arabidopsis Keimlinge wurden für fünf Tage auf Platten ohne (blauer Balken) oder mit 1 μ M PSK- α (oranger Balken) im Dunkeln angezogen. **A** Wildtyp und *psi1-1* Hypokotyle sind im Vergleich zueinander dargestellt. Der Balken entspricht 5 mm. **B** Die Mittelwerte (\pm SE) der Hypokotyllängen von Wildtyp (WT), *rgs1*, *tf*, *psi1-1*, *rlk* und *mkp1* sind im Vergleich gezeigt. Hypokotyllängen [mm] wurden von $n \geq 99$ Keimlingen in drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Es wurde eine ANOVA (Tukey Test) durchgeführt ($P < 0,001$). Signifikant unterschiedliche Werte sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Die Hypokotyllängen von etiolierten Keimlingen wurden im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Dazu wurden Keimlinge für fünf Tage im Dunkeln angezogen. Die Hypokotyllängen wurden vom Hypokotylhaken bis zum

Wurzel/Hypokotyl-Übergang bestimmt (Abbildung 2). *psi1-1* Hypokotyle waren im Vergleich zum Wildtyp um 15% kürzer (Abbildung 2B). Alle anderen Mutanten wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede zum Wildtyp auf. Nach Zugabe von 1 μ M PSK- α war die Hypokotyllänge weder im Wildtyp noch in einer der untersuchten T-DNA-Insertionslinien verändert.

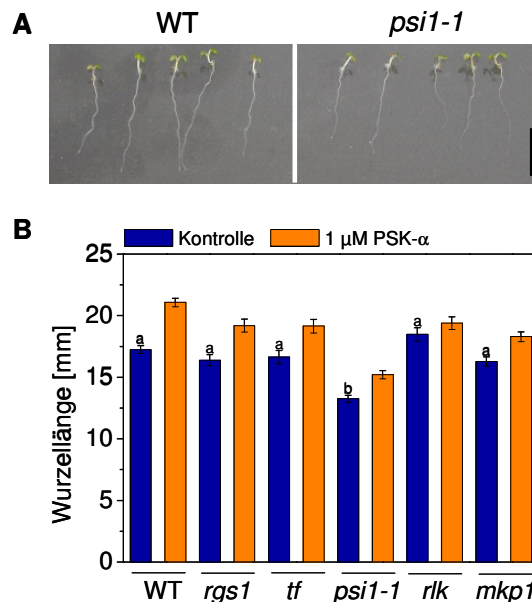


Abbildung 3: Wurzeln von *psi1-1* Keimlingen sind kürzer im Vergleich zum Wildtyp. Keimlinge von Arabidopsis wurden für fünf Tage auf Platten ohne (blauer Balken) oder mit 1 μ M PSK- α (oranger Balken) im Langtag angezogen. **A** Wildtyp und *psi1-1* Keimlinge sind im Vergleich gezeigt. Der Balken entspricht 1 cm. **B** Die Mittelwerte (\pm SE) der Wurzellängen von Wildtyp, *rgs1*, *tf*, *psi1-1*, *rlk* und *mkp1* sind im Vergleich dargestellt. Wurzellängen [mm] wurden von $n \geq 100$ Keimlingen in drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Es wurde eine ANOVA (Tukey Test) über die Kontrollen durchgeführt ($P < 0,001$). Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Buchstaben hervorgehoben. Außerdem wurde ein zweiseitiger *t*-Test ($P < 0,001$) innerhalb eines jeden Genotyps zwischen Kontrolle und Behandlung durchgeführt. Dabei gab es keine signifikanten Unterschiede bei *rlk*. Alle anderen zeigten signifikante Unterschiede.

Darüber hinaus wurde das Wurzelwachstum und die Sensitivität der Wurzeln gegenüber PSK- α analysiert. Keimlinge wurden für fünf Tage im Langtag angezogen und die Wurzellängen der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp bestimmt (Abbildung 3). Wurzeln von *psi1-1* Keimlingen waren kürzer im Vergleich zum Wildtyp. Alle anderen Mutanten hatten keine signifikant veränderten Wurzellängen. In allen T-DNA-Insertionslinien außer *rlk* förderte

PSK- α das Wurzelwachstum. In *psi1-1* Keimlingen wurde das Wachstum der Wurzeln signifikant gefördert, der Effekt war aber prozentual geringer als im Wildtyp. *pit* Keimlinge wurden separat von den anderen *Knockout* Linien analysiert (Abbildung 4). Hypokotyl- und Wurzelwachstum der *pit* Keimlinge waren nicht verändert. Auch die Responsivität der Wurzeln gegenüber PSK- α war im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert (Abbildung 4).

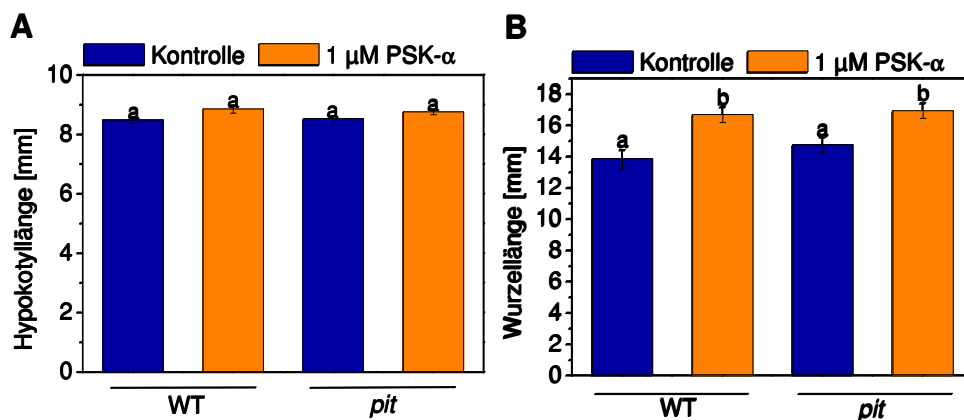


Abbildung 4: Hypokotyl- und Wurzellängen von fünf Tage alten *pit* Keimlingen. Arabidopsis-Keimlinge wurden für fünf Tage auf Platten ohne (blauer Balken) oder mit 1 μ M PSK- α (oranger Balken) im Dunkeln (**A**) oder im Langtag (**B**) angezogen. **A** Die Mittelwerte (\pm SE) der Hypokotyllängen und **B** Wurzellängen von Wildtyp und *pit* sind im Vergleich gezeigt. Hypokotyl- und Wurzellängen [mm] wurden von $n \geq 135$ beziehungsweise $n \geq 60$ Keimlingen in jeweils drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Es wurde eine ANOVA (Tukey Test) durchgeführt ($P < 0,001$). Signifikant unterschiedliche Werte sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Das Wurzel- und Hypokotylwachstum und die Sensitivität der Wurzeln der *psi1-1* Keimlinge gegenüber PSK- α waren reduziert. PSI1 wurde als ein Kandidat angesehen, der im PSK-Signalweg eine Funktion haben könnte. Obwohl PSK- α bei *rlk* Keimlingen das Wurzelwachstum nicht förderte, wurden weitere Analysen an *rlk* zunächst nicht durchgeführt.

PSI1 wird im Hypokotyl und in der Wurzel exprimiert

Hypokotyle und Wurzeln von *psi1-1* Keimlingen sind im Vergleich zum Wildtyp kürzer. Um zu überprüfen, ob *PSI1* in diesen Organen exprimiert wird, wurden Expressionsanalysen über semiquantitative RT-PCR durchgeführt (Abbildung

5). Neben *PSI1* wurde *PSKR1* amplifiziert. Die Expressionsanalyse zeigte, dass *PSI1* und *PSKR1* sowohl in Kotyledonen und Hypokotylen etiolierter Keimlinge als auch Sprossen und Wurzeln deetiolierter Keimlinge exprimiert werden (Abbildung 5).

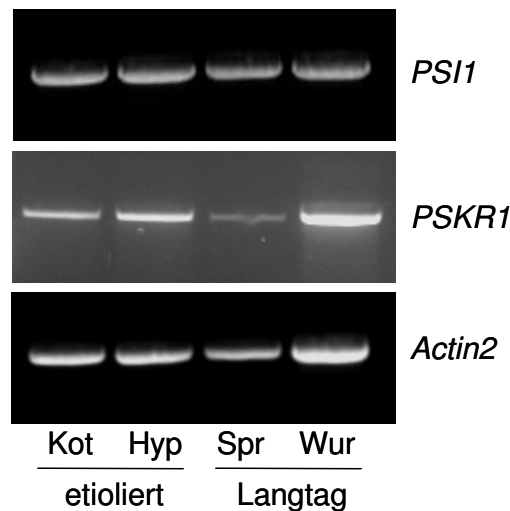


Abbildung 5: *PSI1* wird im Hypokotyl und in der Wurzel von *Arabidopsis* exprimiert. Semiquantitative RT-PCR Analysen wurden durchgeführt, um die Expression von *PSI1* und *PSKR1* in Kotyledonen (Kot), in Hypokotylen (Hyp), im Spross (Spr) und in Wurzeln (Wur) von Keimlingen, die für fünf Tage im Dunkeln oder im Langtag angezogen wurden, zu analysieren. Als Kontrolle der cDNA-Synthese und zur Überprüfung eingesetzten RNA-Mengen wurde *Actin2*-mRNA amplifiziert.

***PSI1* ist ein pflanzenspezifisches Protein**

psi1-1 Keimlinge hatten kürzere Hypokotyle und Wurzeln. Die Sensitivität gegenüber PSK- α war reduziert. *PSI1* könnte eine mögliche Komponente des PSK-Signalweges sein und sollte näher charakterisiert werden. Das Protein ist 657 Aminosäuren lang und besitzt eine vorhergesagte N-terminale Myristoylierungsstelle (Abbildung 6) und könnte an der Plasmamembran oder anderen Membranen lokalisiert sein. Das Glyzin an zweiter Aminosäurestelle ist essentiell für die Myristoylierung. Durch die Veresterung eines Myristats an das Glyzin kann das Protein an einer Membran wie der Plasmamembran verankert werden (Resh, 2004). Charakteristische Merkmale für eine mögliche Myristoylierung sind außerdem ein Cystein an vierter oder fünfter Aminosäureposition, ein Asparagin an vierter Aminosäurestelle, ein Serin an

Position sieben und beziehungsweise oder ein Prolin an Position neun (Boisson et al., 2003). Die Analyse der PSI1 Sequenz zeigte, dass PSI1 an Position zwei ein Glyzin und an Position fünf ein Cystein aufweist (Abbildung 6). Eine Myristoylierung und damit eine Lokalisation an Membranen wären damit zumindest möglich. Lokalisation an der Plasmamembran wurde beispielsweise für die Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase CPK3, die ebenfalls eine N-terminale Myristoylierungsstelle aufweist, gezeigt (Mehlmer et al., 2010). PSI1 weist außerdem eine DUF668 (*domain of unknown function 668*) auf. Über eine mögliche Funktion dieser Domäne gibt es keine Informationen. Über PSI1 liegen in den Datenbanken keine Informationen über mögliche biochemische Funktionen oder bereits in der Literatur beschriebene Domänen vor. An Hand von Datenbankrecherchen wurde nach homologen Proteinen aus anderen Spezies gesucht. Über eine BLASTp Suche wurden sowohl in mono- als auch in dikotylen Pflanzen PSI1 Homologe zu der Sequenz gefunden, die aus Arabidopsis identifiziert wurde (Abbildung 5). Bei der Ähnlichkeit wurde eine Grenze von 50% für die Sequenzübereinstimmung definiert. Die identifizierten Proteine aus *Ricinus communis*, *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa*, *Oryza sativa* und *Zea mays* weisen alle eine vorhergesagte N-terminale Myristoylierungsstelle auf. Die Sequenzen haben eine Identität zu PSI1 aus Arabidopsis zwischen 63,9% und 74%. Aus tierischen Organismen und Mikroorganismen wurden keine PSI1 Sequenzen identifiziert. PSI1 ist ein pflanzenspezifisches Protein. Aus dem Moos *Physcomitrella patens* wurde ein PSI1 homologes Protein in den Datenbanken gefunden. Diesem fehlt die vorhergesagte N-terminale Myristoylierungsstelle (Abbildung 6) und weist eine Identität von 40,2% zu PSI1 aus Arabidopsis auf. Außerdem hat PSI1 aus *Physcomitrella* einen verkürzten N-Terminus. Des Weiteren wurden zwei homologe Proteine aus dem Arabidopsis-Genom identifiziert. Diese weisen eine Identität von 40% und 50,4% zu PSI1 aus Arabidopsis auf.

put. Myristoylierungsstelle

AtPSI1 MGGLCSRSSVNNAPG---GTFAHVNGHHLNNDLNSHSGE--SGLKDDPSPVTEENV 54
 AtPSI2 MGGVCSVFKDDDKK---KLRSDDDKSRGFSGLKSMRRS----KTSDSYYSDNY 50
 AtPSI3 MGSFCSKSLGINFGEYS--GSSVADDGREP---DFGHSQPNGQTSIIVPMRQLMVKDV 55
 RcPSI1 MGGLCSRSSIVDNAPG---GFPPLNGHFN--GSSLVYQSRELK--INSNTTSPVVENV 53
 VvPSI1 MGGLCSRSSIVDNAPG---GSFPLANGHLSHSGSIVYQSRGLPPELTRNLTA SPIGGGM 56
 PtPSI1 MGGLCSRSSIVDNAPG---GFPQLNGHFSHGGLVYQITRELK--IDNNANPSPVENV 54
 OsPSI1 MGGGLCSKGSVVDKSPSDTTIGPDRVVRGHERGGAGVGVGKEERK-TVAREAAAKRIQEQ 59
 ZmPSI1 MGGFCSKGSVVDKSPSDTTIGPGREVDHR----LVVKEEKK-AVVGEEAAAKRMOEQ 54
 PpPSI1 ----- 0

AtPSI1 DDNKHTS-----ESFSPPIVSS--GSHPONIE-DGIPRLSRVLSCKSRSTKSRQAA- 102
 AtPSI2 GGSRRKS-----SKPDEVVFNFSGELGPMPLRNDST----- 82
 AtPSI3 KEQNOLK-----DVF SFRER-----EAEDNFYDGIPTYTMAPSCKIRSAKSTQTA- 100
 RcPSI1 E-NKQVR-----EPLSFPDG-----INPDDFN-EGIPHLR---NKSRSSTKSKO--- 92
 VvPSI1 D-NKQLR-----EPLSAPEMERVSYGVNPDID-DGIPRLSRALSCKSRSTKSKQVA- 106
 PtPSI1 D-NKQLR-----EPLSLPEVTVVQYEVNPDID-DGIPRLSRALSCKSGSTKSKQAA- 104
 OsPSI1 QQQRQQ-----PASVQEAPASRAPIDARELPWDGVPNLARLPSCKSGMGVAKASAA 110
 ZmPSI1 HQQQQQQQQPAAPPLVSVSQTAVPGATADNTAAPWDGVPNLARLPSCKSGMGVANK--- 111
 PpPSI1 ----- 0

AtPSI1 -----VAKVSEVSSLLGRAGTMGLKAVDVLDTLGSMTNLNLSGCFSSATV-KGNKI 155
 AtPSI2 -----KFMORNSFMGRAGVMGLEKAVEVLDLTLGSMTNLMNPSNAYLSGVTSSRCQKV 134
 AtPSI3 -----VSKVTEASKLLGKAG---LGRAKDVLDTLGSMTNLS-SGFTSGVAT-KGNEL 149
 RcPSI1 -----AKVSEVSSLLGRAGTVGLDKAVEVLDLTLGSMTNLNLSGFTSGVIT-KGNKI 144
 VvPSI1 -----VAKVSEVSSLLGRAGTAGLKAVEVLDLTLGSMTNLNLSGFTSGVIT-KGNKI 159
 PtPSI1 -----VAKVSEVSSLLGRAGTAGLKAVDVLDTLGSMTNLMNPSGFTSGVIT-KGDKI 157
 OsPSI1 KASGLLVLFVSEVSSLLGRAGTVGLKAVEVLDLTLGSMTNLMNINSGFSGTAT-KGNKI 169
 ZmPSI1 -----VSEVSSLLGRAGTAGLKAVEVLDLTLGSMTNLNLSGFTSGVIT-KGNKI 160
 PpPSI1 -----MSGKAVQVSEVLKAGATMGFC---ALDIFGTSVANLGAKGFIAGAVS-KGNKI 50

AtPSI1 SILSFEVANTIVKGANLHMHSLSKDSITHLKEVVLPSSEGVQNLISKDMDELLRTAAADKRE 215
 AtPSI2 TILAFEVANTIAKGAALQSLSEENLKFMKDMLHSEVKKLVSTDTTELQTLAASDKRE 194
 AtPSI3 GILAFEVANTIVKSSNLIESLSKRNIETHLKGITILYSEGVQNLVSNDEDELLRLVAADKRE 209
 RcPSI1 TILAFEVANTIVKGANLMOQSLSKENTKHLKEVVLPSSEGVQNLISRDDELLRTAAADKRE 204
 VvPSI1 TILAFEVANTIVKGSNLMQSLSKENTKHLKEVVLPSSEGVQNLISKDMDELLRTAAADKRE 219
 PtPSI1 TILAFEVANTIVKGANLMOQSLSEENIRHLKEVVLPSSEGVQNLISRDDELLRTAAADKRE 217
 OsPSI1 SILAFEVANTIVKGNLMRALSKESITKHLKEVVLHSEGVQNLISKDMDELLRTAAADKRE 229
 ZmPSI1 SILAFEVANTIVKGCNLMRALSKDSITKHLKEVVLHSEGVQNLISKDMDELLRTAAADKRE 220
 PpPSI1 GILSFEVANTIVKGNLQSLAEEDMKVLVEETLPSSEGVQNLVSTDENELMATAADKRN 110

AtPSI1 ELRIFSGEVVRFGNRCKDPQVHNLDRYFDRLGSEFTPKQKHLKQEAETIMHQMMSFVHFTA 275
 AtPSI2 ELDFSGEVVRFGNMCKDLQVHNLDRYFMKLDTENSOHKLKDDAEARMQELVTLARITIS 254
 AtPSI3 ELQVFSGEVVRFGNRSKDFQVHNLDRYFDRLSKELTPQRQLKEDAVLVVDQMLVQVTA 269
 RcPSI1 ELKVFSGEVVRFGNRCKDPQVHNLDRYFEKLGSELTPEKQKLEAEITVMKQMLNVLQVTA 264
 VvPSI1 ELKIFSGEVVRFGNRCKDPQVHNLDRYFEKLGSELTPEKQKLEAEITVMQQLMTLVQVTA 279
 PtPSI1 ELKVFSGEVVRFGNRCKDPQVHNLDRYFEKLGSELTPEMQLKDEAEITVMQQLNVLQVTA 277
 OsPSI1 ELKVFSTEVVRFGNRCKDPQVHNLDRYFDKFEASERTPQHHLKEEAEITVMQQLVTCVQVTA 289
 ZmPSI1 ELKVFSTEVVRFGNRCKDPQVHNLDRYFDKLTSEQTPQHHLKEEAEITVMQQLVTCVQVTA 280
 PpPSI1 ELKIYADEVVRFGNRCKDPVHRYDRYFDRLVKEMEIPRVEHEEADNIMETLMTLQNTA 170

AtPSI1 DLYHELHALDRFEQDYQRKIQEENPSTAQRGVGDILAILRTELKSQRKHVRNLKKSLSW 335
 AtPSI2 ELYHELQALDRFEQDYRKLAEVESLNLPRR--GEGIVILQNELKQKLVKSLQKKSLSW 312
 AtPSI3 ELYQELQVLYRLEKDYEQKRREENSANSSK--GDGLAILKTELKQQRKVVKSLKKSLSW 327
 RcPSI1 ELYHEMHALDRFEQDYRKLQEDDSSNGPQR--GDSLAILRAELKSQRKHVKSLLKKSLSW 322
 VvPSI1 ELYHEMHALDRFEQDYRKLQEDDSSNAAQRGVGDSLAILRAELKSQRKHVRSLLKKSLSW 339
 PtPSI1 ELYHEMHALDRFEQDYRKLQEDDKTNAQR--GDSLAILRAELKSQRKHVKSLLKKSLSW 335
 OsPSI1 ELYHEMHALDRFEQDYQRKQOEDGSSVHQR--GENLNILKQEVKSQRKHVKSLLKKSLSW 347
 ZmPSI1 ELYHEMHALDRFEQDYQRKQOEDGSSVVQR--GDNMHILKQEVKSQRKHVKSLLKKSLSW 338
 PpPSI1 DLYHELHALDRFRDILKRKQOEEESAVAPAR--GESIALLRSEVKSQRKHVEALKKSLSW 228

DUF668

AtPSI1 SRILEEVMEKLVIVHFLHLEIHEAFG--GADPKPANDPPINHKKLGSAAGLALHYANIIT 394
 AtPSI2 SONLAEIIEKLVIVSYIRQITVEVFG--NGLRDNEDGEQRERLGEAGLSLHYANIITQ 369
 AtPSI3 SRGFEVMEKLVIVHFLHLEIHNIFG--GADDQPSKKGAAEYDKRLGSAAGLALHYANIIV 386
 RcPSI1 SKILEEVMEKLVIVHFLHLEIHEAFG--SADGDRPVKGSISHKKLGSAAGLALHYANIIT 381
 VvPSI1 SKILEEVMEKLVIVHFLHLEIHDIFA--TADGDKPIKGSTNNHKKLGNAGLALHYANIIT 398
 PtPSI1 SKILEEVMEKLVIVHFLHLEIHEAFG--SAGKQSKQVSSSNHKKLGEAGLALHYANIIT 394
 OsPSI1 SKNLEEVMEKLVIVHFLHLEIHNIFG--RSDNEES-QEPTKRRNRLGSAAGLALHYANIIS 405
 ZmPSI1 SKNLEEVMEKLVIVHFLHLEIHNIFG--RSDSEES-QEPTKRRNRLGSAAGLALHYANIIS 396
 PpPSI1 SRNLEEVMEQLVDIANYLYOETQEKFGPYVFLKPEBEEKRNAGKLGPSAGLALHYANIIN 288

DUF668

| | | |
|--------|--|-----|
| AtPSI1 | QIDTLVSRSSITMPASTRDALYQGLPPSIKSAALRSRIQSFQVKEELTVPEIKAEMEKTLQW | 454 |
| AtPSI2 | QIDNLTASRPSLLPSNVRDITLYNALPATVKTALRPRLOTLDOBEELSVPEIKAEMEKSLQW | 429 |
| AtPSI3 | QIDTLVARASSITTSNARDSLYQSLPPGIKLALRSKIKSFNVDKELSVTQIKDEMERLTHW | 446 |
| RcPSI1 | QIDTLVSRSSSVPPNTRDALYQGLPPSIKSAALRCKLQSLHVKEELTVAQIKAEMEQLQW | 441 |
| VvPSI1 | QIDTLVSRSSSVPPNTRDALYQGLPPSIKSAALRNELQSFQVKEELTVPEIKAEMEKTLHW | 458 |
| PtPSI1 | QIDTLVSRSSSVPPNTRDALYQGLPPNPKSALRFKLLSFOVNEELTVSQAEMEKTLQW | 454 |
| OsPSI1 | QIDTLVSRSSSVPPNTRDALYQSLPPTVKSLSRSKNSFVNVNEEVTAAQIKAEMEKTLRW | 465 |
| ZmPSI1 | QIDTLVSRSSSVPPNTRDALYQSLPPTIKSLSRSKLSHFGVKEELTVSQAEMEKTLRW | 456 |
| PpPSI1 | QIDSLVLRPGSVPPNTRDNLVQGLPPAVKAGLRTRLCQHYRNKNELSLDEIKSELFKLLNW | 348 |
| | | |
| AtPSI1 | LVPVANTTTKAHHGFGVWGEWASSGSEANQ---RPAQGT-LLRIDTLHHDADKEKTEAYIL | 510 |
| AtPSI2 | LVPFAENTTTKAHQGFVWGEWANSRIEFGKKGKGENNGNPTRLQTLHHDADKPIVDSYVL | 489 |
| AtPSI3 | LVPVACNTTTKAHHGFGVWGEWANTGDDFTS---KPSGCD-LLRIETLYHASKREKTEYLH | 502 |
| RcPSI1 | LVPVIAANTTTKAHHGFGVWGEWANTGSEVNR---KPTGQTDLLRIETLHHDADKEKTEYIL | 498 |
| VvPSI1 | LVPVIAANTTTKAHHGFGVWGEWANTGSEVNR---KPAQGTDLRIETLHHDADKEKTEAYIL | 515 |
| PtPSI1 | LVPVIAANTTTKAHHGFGVWGEWANTGSEVNR---KPAQGTDLRIETLHHDADKEKTEYIL | 511 |
| OsPSI1 | LVPVIANNTTTKAHHGFGVWGEWANTGSEVNC---KPTGQMDLRIETLHHDADKEKTEYLH | 522 |
| ZmPSI1 | LVPVIAANTTTKAHHGFGVWGEWANTGSDVNC---KPNQIDLLRIETLHHDADKEKTEAYIL | 513 |
| PpPSI1 | LVAVASNTTTKAHHGFGVWGEWANAGSPADR---KALGCVETITLQTLHHDANQQVVDYIL | 405 |
| | | |
| AtPSI1 | DLVWVLLHHLVTOVRATTGYC-IRSPVKSPIRSPNQK--TIQLSSGSHNPSMGLPLLTIED | 567 |
| AtPSI2 | ELVWVLLHRLMKSSK--KRAHGVLQETNHVSPNNRTISNTQLS-LSPDFTYKNQLSIED | 546 |
| AtPSI3 | GQIITLWLOHLVTKAKSDARGCPRLSSIKSPLDITNOQLISEPLS-----VPIVDEE | 553 |
| RcPSI1 | DLVWVLLHHLVSOAR-ATNGG-IRSPVKSPIRSPNQK--TIQLS--THKPSSPLPMLTIED | 552 |
| VvPSI1 | ELVWVLLHHLVSOVRTINGG-IRSPVKSPIRSPNQK--SIQLS--THKPNSSPMLTIED | 570 |
| PtPSI1 | ELVWVLLHHLVSOVR-AGNG--SRSPVKSPIRSPNEK--TIQLS--TQKPNSSPMLTIED | 564 |
| OsPSI1 | ELVAVLHHLISRSK--SANG-ERSPKSPVRSPTQRGHTIITLSP-NKASSNSPMLTQED | 578 |
| ZmPSI1 | ELVITLHHLISLSK--TANG-ERSPKSPVRSPTQRGASITLSP-NKNSNSPMLTQED | 569 |
| PpPSI1 | ELVVGHLHLVSRAR---NSKNINNGDPSQSPCNINFTEGLLY-PTPAGVIRPELSQED | 461 |
| | | |
| AtPSI1 | QEMLRDVSK---RRKTPGISKSQEFETV-AKARLCKHHRLSKSSSHSPMMGEMMKNKD | 622 |
| AtPSI2 | RLLLDRVQS---IRFGPNLSKSQELVGLKKNKKGFKIWLRSRSTGNS----- | 590 |
| AtPSI3 | QKMLQEASK---RKRTPCVSKSQDFDS--EYSRARKCDPLSKSSEVFRGV---RRSKS | 603 |
| RcPSI1 | QEMLRDVSK---RKTPGISKSQEFDT--AKTRLSKHHRLSKSSSHSPMT---ETKRD | 602 |
| VvPSI1 | QEMLRDVSK---RKTPGISKSQEFDT--AKTRLSKHHRLSKSSSHSPTS---ETKKE | 620 |
| PtPSI1 | QEMLRDVSK---RKTPGISKSQEFDT--AKTRLSKHHRLSKSSSHSPMG---ETRKD | 614 |
| OsPSI1 | QDMLRDVKY---RKFIPGISKSQEFET---KSRHRSKQSRLSKSNSHSPSS---GNMKE | 627 |
| ZmPSI1 | QDMLRDVKY---RKFIPGISKSQEFDT---KERHNSKQSRLSKSNSHSPSS---GNRKE | 618 |
| PpPSI1 | KDMLRELSGWTQRKIIPGLSRSQEFDNS-KAASNKEFLKLNKSSSHSVSS----KHELE | 516 |
| | | |
| AtPSI1 | TFSTRRPSSVPEIDF-DIDRMKALDVIDRVDITIRSL----- | 657 |
| AtPSI2 | -----PKVQLSDKNSSSDLVDLDGLDFAFQ----- | 615 |
| AtPSI3 | AAVKRYSSGFPLLDF-AIDKEKVLVDVIDRVDVPRDYKALLKEGSLSF | 649 |
| RcPSI1 | PFPIRRPSSVPEIDF-DIDRTKALDVIDRVDITIRSL----- | 637 |
| VvPSI1 | LFSIRRPSSVPEIDF-DIDRTKALDVIDRVDITIRSI----- | 655 |
| PtPSI1 | PFPIRRPSSVPEVMEF-DIDRTKALDVIDRVDITIRSF----- | 649 |
| OsPSI1 | LLSIRR--MLPVIDF-EIDRTKAMDVIDRVDNLKSTVRT----- | 663 |
| ZmPSI1 | TLSSIRR--LIPVIDF-EIDRTKALDVIDRVDLIRVQ----- | 651 |
| PpPSI1 | APLYKPRNRITKPLGH-NIHRLEDEKVTIG-PGPLOS----- | 549 |

Abbildung 6: Sequenzvergleiche von PSI1, PSI2 und PSI3 aus Arabidopsis mit potentiellen PSI1 Proteinen aus anderen mono- und dikotylen Pflanzen und aus dem Moos *Physcomitrella patens*. Identische Aminosäuren sind schwarz, Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften grau unterlegt. Als Grenze für die Übereinstimmung wurden 50% angenommen. Rote Striche markieren die Sequenz der vorhergesagten Myristoylierungsstellen und die Sequenzen der DUF668. Die Myristoylierungsstelle wurde nach Nagasaki et al. (2008) markiert. At *Arabidopsis thaliana* (NP_174692.1, NP_564362.1, NP_680154.2), Rc *Ricinus communis* (XP_002534019.1), Vv *Vitis vinifera* (XP_002266039.1), Pt *Populus trichocarpa* (XP_002327227.1), Os *Oryza sativa* (EEC71888.1), Zm *Zea mays* (ACR35631.1), Pp *Physcomitrella patens* (XP_001762417.1).

PSI1 ist im Cytoplasma lokalisiert

PSI1 besitzt eine vorhergesagte N-terminale Myristoylierungsstelle. Myristoylierung ist eine post-translationale Modifikation am Glyzin an der zweiten Aminosäurestelle, was zur Verankerung des Proteins an einer Membran wie der Plasmamembran führen kann (Resh, 2004). Es sollte untersucht werden, ob die vorhergesagte Myristoylierungsstelle essentiell für die Lokalisation und die Funktion von PSI1 ist. Dafür wurde PSI1 unter der Kontrolle eines 35S-Promotors C-terminal an ein Fusionsprotein gekoppelt und das Konstrukt 35S:PSI1-YFP transient in Mesophyllprotoplasten transformiert (Abbildung 7).

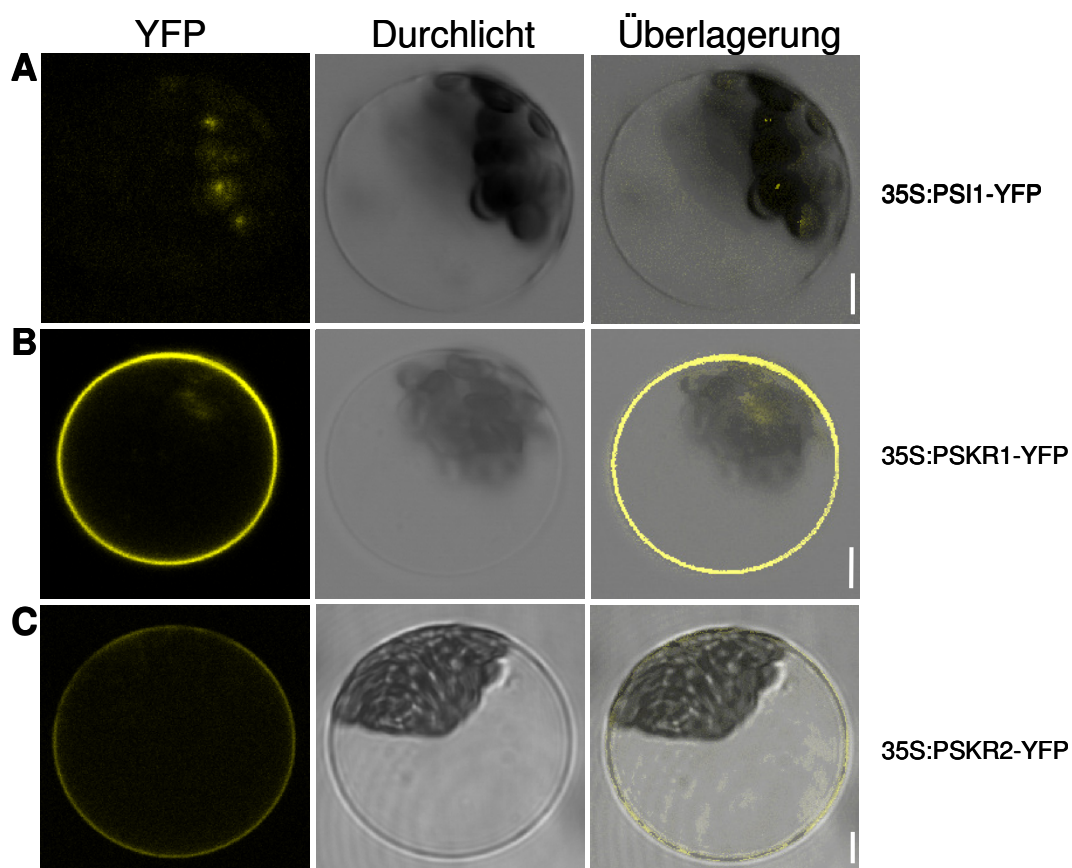


Abbildung 7: PSI1 ist im Cytoplasma lokalisiert. Um PSI1, PSKR1 und PSKR2 subzellulär lokalisieren zu können, wurden Mesophyllprotoplasten aus Arabidopsis transient transformiert. Subzelluläre Lokalisation von **A** PSI1 über 35S:PSI1-YFP **B** PSKR1 über 35S:PSKR1-YFP und **C** PSKR2 über 35S:PSKR2-YFP. Die Bilder wurden am CLSM aus 4 bis 10 Einzelbildern zusammengesetzt. Die Balken entsprechen 5 µm.

Die Ergebnisse zeigten eine subzelluläre Lokalisation von PSI1 im Cytoplasma. Die transient mit PSI1 transformierten Protoplasten wurden außerdem für 20 bis 60 Minuten mit PSK- α inkubiert. Es wurde keine Veränderung der Lokalisation von PSI1 beobachtet (Daten nicht gezeigt). Es war kein Signal an der Plasmamembran detektierbar. PSI1 wurde außerdem unter der Kontrolle eines Ubiquitin Promotors C-terminal an ein Fusionsprotein gekoppelt und das Konstrukt Ubi:PSI1-GFP stabil in Pflanzen exprimiert. Es wurden drei Linien selektiert, die resistent gegen das Antibiotikum Kanamycin waren. Keine der Linien zeigte ein spezifisches GFP-Signal, so dass über die Analyse der Ubi:PSI1-GFP Pflanzen keine weiteren Rückschlüsse auf die subzelluläre Lokalisation von PSI1 gezogen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der LRR Rezeptorkinasen PSKR1 und PSKR2 über transiente Expression von 35S:PSKR1-YFP und 35S:PSKR2-YFP in Mesophyllprotoplasten zeigte Lokalisation hauptsächlich an der Plasmamembran (Abbildung 7B, C).

Die Myristoylierungsstelle ist nicht essentiell für die Funktion von PSI1

Aus der Mutantenkollektion des Salk-*Institute* (La Jolla, Kalifornien, USA) stand keine zweite T-DNA-Insertionslinie für *PSI1* zur Verfügung. *psi1-1* wurde deshalb mit einem *PSI1ox* Konstrukt komplementiert. Dazu wurde *PSI1ox* unter der Kontrolle des 35S-Promotors in den *psi1-1* Hintergrund transformiert. Außerdem sollte die Funktion der vorhergesagten N-terminalen Myristoylierungsstelle von PSI1 untersucht werden. Dazu wurde ein Aminosäureaustausch am ersten Glyzin vorgenommen und dieses durch Alanin ersetzt, da das Glyzin an zweiter Aminosäureposition essentiell für die Myristoylierung von Proteinen ist. Das *PSI1ox_{G→A}* Konstrukt wurde ebenfalls in den *psi1-1* Hintergrund transformiert. Die komplementierten Linien wurden *PSI1ox/psi1-1* und *PSI1ox_{G→A}/psi1-1* genannt und die Expression von Wildtyp-beziehungsweise mutierten PSI1-Sequenzen über RT-PCR nachgewiesen (Abbildung 8A). Es wurde in den *PSI1ox/psi1-1* und *PSI1ox_{G→A}/psi1-1* Linien keine Überexpression von *PSI1* nachgewiesen, obwohl *PSI1* und *PSI1_{G→A}* unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors im *psi1-1* Hintergrund überexprimiert wurden (Abbildung 8A).

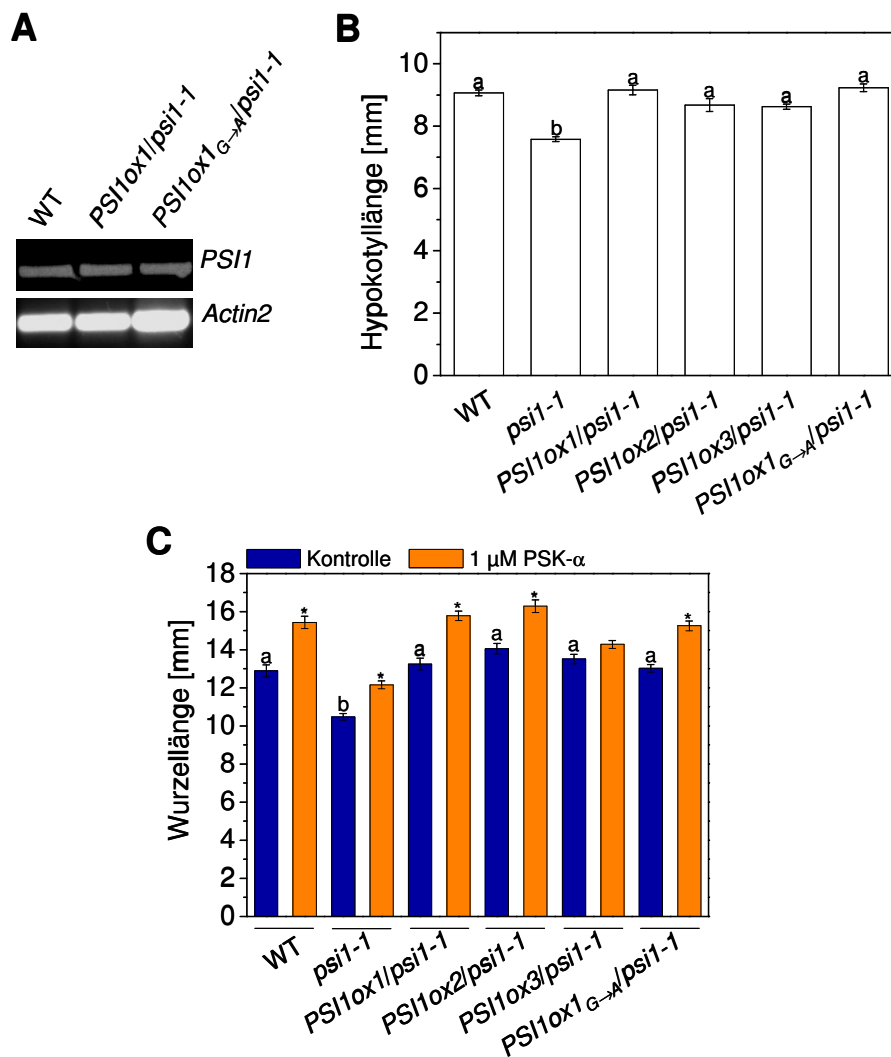


Abbildung 8: Hypokotyle und Wurzeln von Keimlingen der komplementierten Linien *PSI1ox/psi1-1* und *PSI1ox_{G→A}/psi1-1* sind so lang wie die des Wildtyps. Arabidopsis-Keimlinge wurden für fünf Tage auf Platten ohne (blauer Balken) oder mit (oranger Balken) 1 µM PSK-α im Dunkeln (**B**) beziehungsweise im Langtag (**C**) angezogen. **A** *PSI1* Transkripte sind sowohl in *PSI1ox1/psi1-1* als auch in *PSI1ox1_{G→A}/psi1-1* nachweisbar. mRNA von Wildtyp, *PSI1ox1-3x/psi1-1* und *PSI1ox_{G→A}/psi1-1* wurde revers transkribiert und *PSI1* mit genspezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. Als Kontrolle wurde *Actin2*-mRNA amplifiziert. Es sind im Vergleich die **B** Mittelwerte (±SE) der Hypokotyllängen und der **C** Mittelwerte (±SE) der Wurzellängen von Wildtyp (WT), *PSI1ox1-3/psi1-1* und *PSI1_{G→A}ox1/psi1-1* gezeigt. Hypokotyllängen [mm] wurden von n ≥ 198 Keimlingen und Wurzellängen von n ≥ 75 Keimlingen in drei unabhängigen Experimenten bestimmt. **B, C** Es wurde jeweils eine ANOVA (Tukey Test) durchgeführt (P<0,001). Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Buchstaben kenntlich gemacht. **C** Zwischen Kontrolle und Behandlung wurde ein zweiseitiger t-Test (P<0,001) durchgeführt und signifikant unterschiedliche Werte innerhalb der Genotypen durch Sternchen gekennzeichnet.

Um zu untersuchen, ob das reduzierte Hypokotyl- und Wurzelwachstum der *psi1-1* Keimlinge durch Überexpression von *PSI1* beziehungsweise *PSI1_{G→A}* restauriert werden kann, wurden *PSI1ox/psi1-1* und *PSI1ox1_{G→A}/psi1-1* Keimlinge hinsichtlich ihres Hypokotyl- und Wurzelwachstums im Vergleich zum Wildtyp analysiert (Abbildungen 8B, C). Das Hypokotyl- und Wurzelwachstum von drei unabhängigen *PSI1ox/psi1-1* Linien konnte durch Überexpression von *PSI1* zum Wildtyp Phänotyp restauriert werden, da die Hypokotyl- und Wurzellängen im Vergleich zum Wildtyp statistisch nicht signifikant unterschiedlich waren. Auch die Responsivität der *PSI1ox1/psi1-1* und *PSI1ox2/psi1-1* Wurzeln gegenüber PSK- α konnte zu Wildtyp-Niveau restauriert werden. In *PSI1ox3/psi1-1* war der PSK-Effekt mit 6% im Vergleich zu 20% im Wildtyp geringer. Analysen von *PSI1ox1_{G→A}/psi1-1* Keimlingen zeigten, dass auch durch *PSI1_{G→A}* die Hypokotyl- und Wurzellängen zum Wildtyp-Phänotyp restauriert werden konnten. PSK- α förderte das Wurzelwachstum in *PSI1ox1_{G→A}/psi1-1* um 17% im Vergleich zu 20% im Wildtyp (Abbildung 8B, C). Obwohl die Myristoylierungsstelle mutiert war, verhielten sich *PSI1ox1_{G→A}/psi1-1* Keimlinge wie der Wildtyp.

PSI1 könnte eine Komponente des PSK-Signalweges sein

Die T-DNA-Insertionsmutanten für die PSK Rezeptorgene *PSKR1*, *pskr1-3*, und für *PSI1*, *psi1-1*, zeigten ähnliche Phänotypen. Keimlinge hatten kürzere Hypokotyle und Wurzeln. Wurzeln waren weniger responsiv gegenüber PSK- α . Um zu untersuchen, ob *PSKR1*, *PSKR2* und *PSI1* in ein und demselben Signalweg eine Rolle spielen, wurde *pskr1-3* beziehungsweise *pskr2-1* mit *psi1-1* gekreuzt. Außerdem wurde eine Dreifachmutante *pskr1-3/pskr2-1/psi1-1* erzeugt. Doppelt beziehungsweise dreifach heterozygot getestete Pflanzen wurden bis zur Samenreife angezogen und aus den Folgegenerationen wurden reinerbige Pflanzen selektiert. Anschließend wurde über RT-PCR der *Knockout* der entsprechenden Gene nachgewiesen (Abbildung 9A). Das Wurzelwachstum der Keimlinge und ihre Responsivität gegenüber PSK- α wurden analysiert (Abbildung 9B). *pskr1-3* und *pskr2-1* Keimlinge hatten um 41% beziehungsweise 8,4% kürzere Wurzeln als der Wildtyp, während das Wachstum der *psi1-1* Wurzeln um 18% reduziert war. Wurzeln von *pskr1-3/psi1-1* Keimlingen waren um 35% kürzer als die des Wildtyps. Die

Wurzellänge von *pskr1-3/psi1-1* wurde durch PSK- α signifikant gefördert. Die Effekte des *Knockouts* beider Gene waren nicht additiv. Es handelte sich um einen teilweise intermediären Phänotyp. *pskr2-1/psi1-1* Wurzeln waren um 21,4% kürzer und das Wurzelwachstum wurde durch PSK- α signifikant gefördert. Es handelte sich ebenfalls nicht um einen additiven Phänotyp. Das Wachstum der *pskr1-3/pskr2-1/psi1-1* Dreifachmutante war um 22% reduziert und wurde durch PSK- α wie in der *pskr1-3/pskr2-1* Doppelmutante nicht signifikant gefördert. Es handelt sich wie bei der Doppelmutante *pskr1-3/pskr2-1/psi1-1* um einen teilweise intermediären Phänotyp.

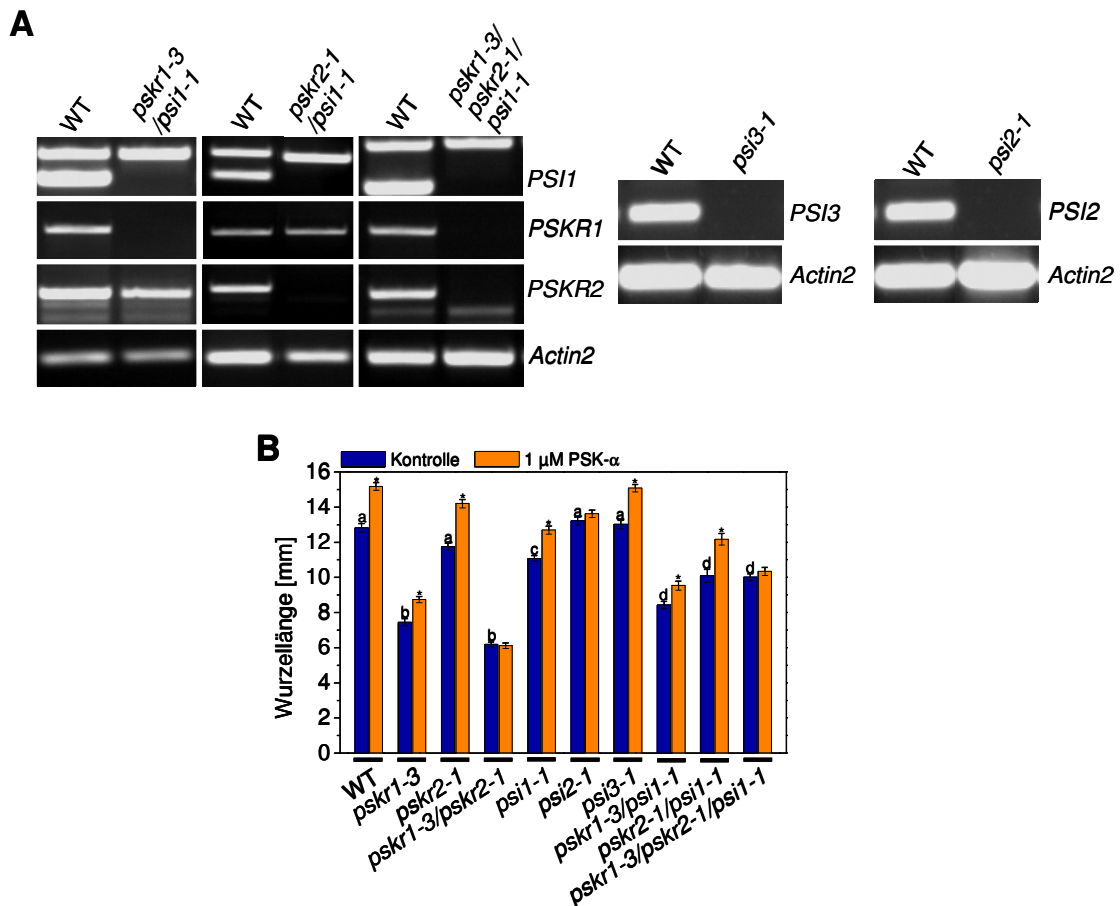


Abbildung 9: Wurzeln von *pskr1-3/psi1-1*, *pskr2-1/psi1-1* und *pskr1-3/pskr2-1/psi1-1* Keimlingen sind kürzer im Vergleich zum Wildtyp. Arabidopsis-Keimlinge wurden für fünf Tage auf Platten ohne (blauer Balken) oder mit (oranger Balken) 1 μ M PSK- α im Langtag angezogen. **A** Die mRNA aller Genotypen wurde revers transkribiert und *PSI1*, *PSI2*, *PSI3*, *PSKR1* und *PSKR2* mit genspezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. In den Mutanten waren die entsprechenden Transkripte nicht detektierbar. Als Kontrolle wurde *Actin2*-mRNA amplifiziert. Es sind die **B** Mittelwerte (\pm SE) der Wurzellängen von Wildtyp (WT) und *pskr1-3*, *pskr2-1*, *pskr1-3/pskr2-1*, *psi1-1*, *psi2-1*, *psi3-1*, *pskr1-3/psi1-1*, *pskr2-1/psi1-1* und *pskr1-3/pskr2-1/psi1-1* gezeigt. Es wurden Wurzellängen [mm] von $n \geq 43$ Keimlingen in jeweils drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Es wurde eine ANOVA (Tukey Test) durchgeführt ($P < 0,001$). Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Buchstaben kenntlich gemacht. Innerhalb der Genotypen wurde ein zweiseitiger *t*-Test ($P < 0,001$) zwischen Kontrolle und Behandlung durchgeführt und signifikant unterschiedliche Werte durch Sternchen markiert.

In Arabidopsis gibt es zwei homologe Proteine zu PSI1

Die Analysen haben gezeigt, dass *psi1-1* Keimlinge kürzere Wurzeln und Hypokotyle im Vergleich zum Wildtyp hatten und die Responsivität der Wurzeln gegenüber PSK- α verringert war. Da die Sensitivität gegenüber PSK- α nicht vollständig ausgeschaltet war, könnten homologe Proteine eine redundante Funktion im PSK-Signalweg haben. Daher wurde ein BLASTp durchgeführt, um zu untersuchen, ob PSI1-Homologe im Arabidopsis-Genom vorkommen. Es wurden zwei homologe Proteine identifiziert. *At1g30755* und *At5g08660* wiesen eine Identität von 40% beziehungsweise 50,4% auf. Für die weitere Vorgehensweise wurde *At1g30755* im Folgenden *PSI2* und *At5g08660* *PSI3* genannt. In Abbildung 6 sind Sequenzvergleiche von PSI1 mit PSI2 und PSI3 gezeigt. PSI2 und PSI3 haben untereinander eine Identität von 34% und besitzen wie PSI1 eine vorhergesagte N-terminale Myristoylierungsstelle. Um zu untersuchen, ob PSI2 und PSI3 ebenfalls eine Rolle im PSK-Signalweg spielen könnten, wurden *Knockout* Linien für *PSI2* und *PSI3* identifiziert (Abbildung 9) und das Wurzelwachstum und die Responsivität der Wurzeln gegenüber PSK- α bestimmt. *psi3-1* Wurzeln verhielten sich wie die des Wildtyps. Länge und Sensitivität der Wurzeln gegenüber PSK- α waren nicht verändert. Die Wurzellänge von *psi2-1* Keimlingen war im Vergleich zum Wildtyp nicht reduziert, aber die Wurzeln reagierten nicht auf PSK- α . Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis darauf sein, dass PSI2 möglicherweise eine Rolle im PSK-Signalweg spielt.

Diskussion

PSI1 könnte eine Komponente des PSK-Signalweges sein

Im Vergleich zu tierischen Organismen ist in Pflanzen wenig über die Signalwege bekannt, über die Peptide wirken. Systemin wurde als das erste pflanzliche Peptid erst 1991 beschrieben (Pearce et al., 1991). Viele Signalmoleküle in Säugetieren wie Neurotransmitter, Hormone und Wachstumsfaktoren sind Peptide, die eine Vielzahl von zellulären Prozessen regulieren (Butenko et al., 2009). In Pflanzen induziert das disulfatierte Pentapeptid PSK- α die Proliferation von Suspensionszellen, die in geringer Dichte wachsen (Matsubayashi et al., 2006). PSK- α reguliert *in planta* die Streckung der Zellen von Wurzeln und Hypokotylen (Kapitel 1; Kapitel 4). Das Wachstum der Wurzel wird in *Arabidopsis thaliana* über die beiden bekannten PSK Rezeptoren, PSKR1 und PSKR2, reguliert (Amano et al., 2007; Kapitel 1). Über PSKR1 wird das Hypokotylwachstum kontrolliert (Kapitel 4). Neben dem Liganden-Rezeptor-Paar PSK- α /PSKR sind keine weiteren Komponenten des PSK-Signalweges bekannt.

Die Analyse von Mutationen ist einer der effektivsten Wege, um die Funktion von Genen zu untersuchen. Über *loss-of-function* und *gain-of-function* Techniken konnten einige Proteine identifiziert werden, die miteinander interagieren oder in ein und demselben Signalweg eine Rolle spielen (Kuromori et al., 2009). Durch einen Ansatz, bei dem nach zwergwüchsigen Pflanzen gesucht wurde, wurde das Liganden-Rezeptor-Paar CLV3/CLV1 identifiziert (Jun et al., 2008). In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Datenbank CressExpress (Srinivasasainagendra et al., 2008) nach Genen gesucht, die mit den PSK Rezeptorgenen *PSKR1* und *PSKR2* koexprimiert sind. Durch die Analysen wurden sieben Gene identifiziert, die für Proteine kodieren, die in die Signaltransduktion involviert sein könnten. Es wurden *Knockout* Linien für diese Gene auf Wurzel- und Hypokotylphänotypen hin untersucht. *psi1-1* Keimlinge wiesen einen ähnlichen Phänotyp wie die *PSKR1* T-DNA-Insertionslinie *pskr1-3* auf. *psi1-1* Hypokotyle und Wurzeln waren kürzer und die Responsivität der *psi1-1* Wurzeln gegenüber PSK- α war leicht reduziert. Die Wurzeln waren nur um 14% im Vergleich zu 20% im Wildtyp länger. Der Phänotyp konnte durch die Komplementation mit *PSI1* im *psi1-1* Hintergrund vollständig restauriert werden,

da Hypokotyle und Wurzeln genauso lang wie die des Wildtyps waren. Der Phänotyp von *psi1-1* war damit auf den *Knockout* von *PSI1* zurückzuführen. *PSI1* Transkripte wurden wie auch *PSKR1* Transkripte im Hypokotyl und in Wurzeln von Keimlingen nachgewiesen, wie es durch die Koexpressionsdaten vorhergesagt wurde. *PSI1* könnte damit eine mögliche Komponente des PSK-Signalweges sein. *PSI1* wurde deshalb etwas näher charakterisiert.

Das Hypokotyl- und Wurzelwachstum von Arabidopsis Keimlingen hängt nicht von einer N-terminalen Myristoylierung von PSI1 ab

PSI1 ist ein Protein mit unbekannter Funktion. Das Protein weist neben einer vorhergesagten N-terminalen Myristoylierungsstelle eine DUF668-Domäne (*domain of unknown function 668*) auf. Die Responsivität von *psi1-1* Wurzeln gegenüber PSK- α war leicht reduziert, aber nicht vollständig ausgeschaltet. Es wurde vermutet, dass homologe Proteine mit redundanter Funktion in Arabidopsis existieren. Über eine BLASTp Suche wurden die homologen Proteine *PSI2* und *PSI3* mit einer Identität von 40% beziehungsweise 50,4% identifiziert. Diese könnten möglicherweise zusammen mit *PSI1* am PSK-Signalweg beteiligt sein.

Die zwei Mitglieder der *MIR159* (*MicroRNA 159*) Familie, *miR159a* und *miR159b*, regulieren eine Familie der GAMYB-ähnlichen Transkriptionsfaktoren mit sieben Mitgliedern (Allen et al., 2007). Während die Einzelmutanten *mir159a* und *mir159b* keinen Phänotyp zeigen, hat die Doppelmutante *mir159ab* pleiotrope morphologische Defekte. Dies ist ein Hinweis darauf, dass *MIR159a* und *MIR159b* funktionell redundante Proteine sind (Allen et al., 2007). Die MTA (5'-Methylthioadenosin) Nukleosidase ist ein Enzym des Yang-Zyklus und wird in Arabidopsis durch zwei Gene, *MTN1* und *MTN2*, kodiert (Bürstenbinder et al., 2010). *MTN1* macht ungefähr 80% der MTN-Aktivität aus. *mtn1* Mutanten haben ein reduziertes Wachstum, während *mtn2* Pflanzen keinen Phänotyp zeigen. Die Doppelmutante *mtn1-1/mtn2-1* ist steril (Bürstenbinder et al., 2010). *PLT1*, *PLT2* und *PLT3* (*Plethora*) kodieren für Transkriptionsfaktoren mit einer AP2-Domäne. Während von den Einzelmutanten nur *plt3* leicht verkürzte Wurzeln im Vergleich zum Wildtyp aufweist, hat die Doppelmutante *plt1plt2* stark verkürzte Wurzeln und die Dreifachmutante *plt1plt2plt3* gar keine Wurzeln (Aida et al., 2004; Galinha et al., 2007). Da die PSK-Antwort in *psi1-1* Wurzeln

nur leicht reduziert, aber nicht ausgeschaltet war, wurde vermutet, dass PSI2 und PSI3 redundante Funktionen haben könnten. Um dies untersuchen zu können, wurden *Knockout* Mutanten für *PSI2* und *PSI3*, *psi2-1* und *psi3-1*, identifiziert und analysiert. Bei beiden Linien war die Wurzellänge nicht verändert. Die Sensitivität der *psi3-1* Wurzeln gegenüber PSK- α war im Vergleich zum Wildtyp nicht reduziert. *psi2-1* Wurzeln hingegen reagierten nicht auf PSK- α . Die PSK-Antwort war vollständig ausgeschaltet, woraus geschlossen werden kann, dass PSI2 eine Rolle im PSK-Signalweg spielen könnte. Obwohl die Sensitivität der *psi3-1* Wurzeln nicht verändert war, könnte auch PSI3 eine Funktion im PSK-Signalweg haben, falls die Aktivität von PSI2 im Vergleich zu PSI1 und PSI3 geringer ist, wie es auch für MTN2 im Vergleich zu MTN1 der Fall ist (Bürstenbinder et al., 2010). Um eine mögliche Redundanz der PSI Proteine zu untersuchen, müssten Doppelmutanten und eine Dreifachmutante generiert und analysiert werden. Dazu müssten *psi1-1*, *psi2-1* und *psi3-1* miteinander gekreuzt werden. Doppelt homozygote *psi1-1/psi2-1* Pflanzen sind schwierig zu identifizieren, da *PSI1* und *PSI2* beide auf Chromosom 1 lokalisiert sind. Von daher müsste eines der Gene über andere Methoden wie RNA-Interferenz (RNAi) ausgeschaltet oder herunterreguliert werden (Chuang und Meyerowitz, 2000).

Das Protein PMI1 (*Plastid Movement Impaired1*) ist ein pflanzen-spezifisches Protein mit unbekannter Funktion, das in Angiospermen konserviert vorliegt (DeBlasio et al., 2005). Es könnte in die Calcium-vermittelte Signaltransduktion involviert sein. In tierischen Organismen wurden keine PMI1 Homologe identifiziert. Neben den PSI1-Homologen aus *Arabidopsis* wurden weitere PSI1-Homologe aus Höheren Pflanzen identifiziert, die neben vorhergesagten Myristoylierungstellen auch die DUF668-Domäne aufweisen. *PSI1* Gene wurden in *Arabidopsis thaliana*, *Ricinus communis*, *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa*, *Oryza sativa* und *Zea mays* gefunden. Die Proteine weisen eine Identität von bis zu 74% zu PSI1 aus *Arabidopsis* auf. Der Proteinsequenz aus *Physcomitrella patens* fehlt die vorhergesagte N-terminale Myristoylierungsstelle. In tierischen Organismen und Mikroorganismen wurde keine PSI1 ähnlichen Proteine gefunden. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei PSI1 um ein pflanzenspezifisches Protein handelt.

N-terminale Myristoylierung ist eine irreversible post-translationale Modifikation (Boisson et al., 2003). Dabei wird eine gesättigte C:14 Fettsäure an

das erste N-terminale Glyzin verestert. Die Modifikation führt zur Verankerung des Proteins an der Plasmamembran oder an anderen Membranen und ist für einige pflanzliche Proteine beschrieben. Die N-terminale Myristoylierung ist essentiell für die Membranbindung von Thioredoxin h9 (Meng et al., 2010) und für die Calcium-abhängigen Proteinkinasen CPK3, CPK6, CPK9 und CPK13 (Benetka et al., 2008). Für CPK6, CPK9 und CPK13 wurde *in vitro* nachgewiesen, dass sie Substrate für die N-terminale Myristoylierung durch die N-Myristoyl Transferase (NMT) sind (Benetka et al., 2008). Die Mutation der Myristoylierungsstelle führt zu einer veränderten Lokalisation der Proteine. Wird das N-terminale Glyzin durch Alanin ersetzt, sind die Proteine im Cytoplasma oder im Kern lokalisiert (Benetka et al., 2008; Mehlmer et al., 2010). Die Funktion der vorhergesagten N-terminalen Myristoylierungsstelle von PSI1 aus Arabidopsis wurde analysiert. Dafür wurde die Myristoylierungsstelle mutiert und das erste Glyzin durch Alanin ersetzt. Das *PSI1_{G→A}*OX Konstrukt wurde in den *psi1-1* Hintergrund transformiert. Der *psi1-1* Phänotyp wurde durch *PSI1_{G→A}*OX im *psi1-1* Hintergrund restauriert. Die Ergebnisse zeigten, dass damit die vorhergesagte Myristoylierungsstelle nicht essentiell für die Funktion von PSI1 ist, da das Wachstum der Hypokotyle und Wurzeln mit dem mutierten PSI1 Protein zu Wildtyp-Längen komplementiert werden konnten. Ob PSI1 tatsächlich myristoyliert wird, könnte enzymatisch untersucht werden, indem PSI1 als Substrat für die NMT eingesetzt wird (Benetka et al., 2008). Dies könnte auch für die PSI1 homologen Proteine aus Arabidopsis und anderen pflanzlichen Spezies analysiert werden.

Wird *PSK4* aus Arabidopsis konstitutiv überexprimiert, sind die Wurzeln länger. Auch extern appliziertes PSK- α fördert das Wurzelwachstum (Matsubayashi et al., 2006; Kutschmar et al., 2009). Überexpression von *PSKR1* führt nicht zu einem verstärkten Wurzelwachstum von Arabidopsis Keimlingen (Matsubayashi et al., 2006). *PSKR1* ist nicht limitierend für den PSK-Signalweg. *PSI1* und *PSI1_{G→A}* wurden im *psi1-1* Hintergrund unter der Kontrolle eines 35S-Promotors exprimiert. Sowohl *PSI1* als auch *PSI1_{G→A}* wurden im Vergleich zum Wildtyp vergleichbar stark exprimiert. Die Expression war nicht erhöht, wie es bei Überexpression unter einem konstitutiven Promotor zu erwarten wäre. Dies könnte zum einen daran liegen, dass im *psi1-1* Hintergrund, in dem *PSI1* Expression ausgeschaltet ist, *PSI1* zwar exprimiert wird, dies aber nicht zur Überexpression führt. Zum anderen könnte

Überexpression von *PSI1* letal sein, wie es auch für die konstitutive Überexpression des RNA-bindenden Proteins UBA2 gezeigt wurde (Kim et al., 2008). Ob Überexpression von *PSI1* embryoletal ist, könnte geklärt werden, indem *PSI1* im Wildtyp-Hintergrund überexprimiert wird. Außerdem könnten Analysen von *PSI1* Überexpressionslinien im Wildtyp-Hintergrund zeigen, ob *PSI1* limitierend für das Wurzelwachstum von *Arabidopsis* ist.

Um *PSI1* subzellulär lokalisieren zu können, wurden Lokalisationsstudien durchgeführt. Die transiente Transformation von Mesophyllprotoplasten mit 35S:*PSI1*-YFP zeigte, dass *PSI1* im Cytoplasma lokalisiert ist. Auch die PSK-Behandlung von Protoplasten, die mit 35S:*PSI1*-YFP transformiert wurden, führte nicht zu einer veränderten subzellulären Lokalisation des Proteins. Da die Plastiden der Protoplasten während der Isolierung und der Transformation sedimentieren, ist nicht genau zu erkennen, wo im Cytoplasma *PSI1* lokalisiert ist. CRK1 (*Calcium-dependent Related Protein Kinase1*) aus Tomate wird N-terminal myristoyliert und ist an der Plasmamembran lokalisiert. Wurden kritische Aminosäuren wie Glyzin und Cystein mutiert, führte dies zu einer cytoplasmatischen Lokalisation des Proteins (Leclercq et al., 2005). Um die subzelluläre Lokalisation von *PSI1* *in vivo* untersuchen zu können, wurden Pflanzen stabil mit einem Ubi:*PSI1*-GFP Konstrukt transformiert. Es wurden drei resistente Linien selektiert, in denen allerdings keine Fluoreszenz detektiert wurde. Dies könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass *PSI1*, das an GFP gekoppelt ist, nicht gebildet wird. Zum anderen könnte *PSI1* wenn es C-terminal an das fluoreszierende Protein gekoppelt ist, falsch prozessiert und in der Folge abgebaut werden. *PSI1* könnte auch durch die Fusion mit GFP falsch modifiziert werden.

Die LRR Rezeptorkinasen RPK2, CLV1 und CLV2 regulieren zusammen die Übertragung des CLV3 Signals. *rpk2* Pflanzen weisen einen vergleichbaren Phänotyp wie *clv* Pflanzen auf. Die Phänotypen von *clv1/rpk2* und *clv2/rpk2* Pflanzen sind additiv, das bedeutet, dass die Phänotypen der Einzelmutanten in den Doppelmutanten verstärkt werden. Daraus wurde geschlossen, dass die Übertragung des CLV3 Signals über RPK2 einen unabhängigen Signalweg darstellt (Kinoshita et al., 2010). *pskr1-3* und *pskr2-1* Pflanzen wurden mit *psi1-1* Pflanzen gekreuzt und doppelt homozygote *pskr1-3/psi1-1* und *pskr2-1/psi1-1* Keimlinge wurden analysiert. Darüber hinaus wurde die Dreifachmutante *pskr1-3/pskr2-1/psi1-1* in die Untersuchungen mit einbezogen. *pskr1-3* und *pskr2-1*

Keimlinge hatten um 41% beziehungsweise 8,4% kürzere Wurzeln als der Wildtyp. Die Länge der *psi1-1* Wurzeln war um 18% reduziert. Wurzeln von *pskr1-3/psi1-1* Keimlingen waren um 35% kürzer als die des Wildtyps. Die Effekte des *Knockouts* beider Gene waren nicht additiv, da in diesem Fall noch kürzere Wurzeln als bei *pskr1-3* erwartet werden würden. Es handelte sich um einen teilweise intermediären Phänotyp. Die Reduktion der Wurzellänge lag zwischen der Reduktion der Einzelmutanten. Allerdings lässt sich dies nicht abschließend beurteilen, da die Unterschiede teilweise zu gering waren. Die Wurzellänge von *pskr1-3/psi1-1* wurde durch PSK- α signifikant gefördert, was bedeutet, dass die verringerten Sensitivitäten von *pskr1-3* und *psi1-1* nicht additiv waren. *pskr2-1/psi1-1* Wurzeln waren um 21,4% kürzer und das Wurzelwachstum wurde durch PSK- α signifikant gefördert. Es handelte sich ebenfalls nicht um einen additiven Phänotyp. Das Wachstum der *pskr1-3/pskr2-1/psi1-1* Dreifachmutante war um 22% reduziert und wurde durch PSK- α wie in der *pskr1-3/pskr2-1* Doppelmutante nicht signifikant gefördert. Es handelt sich wie bei der Doppelmutante *pskr1-3/psi1-1* um einen teilweise intermediären Phänotyp. Da in keiner der Doppel- oder Dreifachmutanten additive Effekte vorlagen und die Phänotypen teilweise intermediär waren, kann daraus geschlossen werden, dass PSI1 und die PSK Rezeptoren die gleichen Prozesse beeinflussen könnten, die Wachstum regulieren. Da allerdings die Sensitivität der Wurzeln der *psi1-1* Keimlinge gegenüber PSK- α nur leicht reduziert war, könnte PSI1 einen Signalweg unabhängig von PSK- α beeinflussen. Dies lässt sich nicht abschließend beurteilen. Um zu untersuchen, ob PSI1 im PSK-Signalweg eine Rolle spielt, könnten *psi1-1* mit *tpst-1* Pflanzen gekreuzt werden. Sollte die Sensitivität von Wurzeln und Hypokotylen der *psi1-1/tpst-1* Doppelmutante im Vergleich zu *tpst-1* reduziert sein, so wäre dies ein weiterer Hinweis darauf, dass PSI1 im PSK-Signalweg eine Rolle spielt. Allerdings müssten alternative Methoden zum Ausschalten eines der Gene angewandt werden, da beide Gene auf Chromosom 1 lokalisiert sind. Die teilweise intermediären Phänotypen von *pskr1-3/psi1-1* und *pskr1-3/pskr2-1/psi1-1* könnten auch darauf zurückzuführen sein, dass PSI1 ein negativer Regulator des PSK-Signalweges ist.

Über Ko-Immunopräzipitation und *Yeast-Two-Hybrid* könnte analysiert werden, mit welchen Proteinen PSI1 interagiert und ob diese möglicherweise an der Übertragung des PSK-Signals beteiligt sind. Eine gezielte Analyse der

Interaktion von PSI1 mit PSKR1 und beziehungsweise oder mit PSKR2 könnte damit ebenfalls durchgeführt werden, allerdings ist diese auf Grund der unterschiedlichen subzellulären Lokalisation unwahrscheinlich.

Literatur

Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh YS, Amasino R, Scheres B (2004) The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell* 19:109-120

Allen RS, Li J, Stahle MI, Dubroué A, Gubler F, Millar AA (2007) Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target genes of the Arabidopsis miR159 family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16371-16376

Amano Y, Tsubouchi H, Shinohara H, Ogawa M, Matsubayashi Y (2007) Tyrosine-sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18333-18338

Benetka W, Mehlmer N, Maurer-Stroh S, Sammer M, Koranda M, Neumüller R, Betschinger J, Knoblich JA, Teige M, Eisenhaber F (2008) Experimental testing of predicted myristoylation targets involved in asymmetric cell division and calcium-dependent signalling. *Cell Cycle* 7:3709-3719

Boisson B, Giglione C, Meinel T (2003) Unexpected protein families including cell defense components feature in the N-myristoylome of a higher eukaryote. *J Biol Chem* 278:43418-43429

Bouché N, Scharlat A, Snedden W, Bouchez D, Fromm H (2001) A novel family of calmodulin-binding transcription activators in multicellular organisms. *J Biol Chem* 277:21851-21861

Bürstenbinder K, Waduwara I, Schoor S, Moffatt BA, Wirtz M, Minocha SC, Oppermann Y, Bouchereau A, Hell R, Sauter M (2010) Inhibition of 5'-methylthioadenosine metabolism in the Yang cycle alters polyamine levels, and impairs seedling growth and reproduction in Arabidopsis. *Plant J* 62:977-988

Butenko MA, Vie AK, Brembu T, Aalen RB, Bones AM (2009) Plant peptides in signalling: looking for new partners. *Trends Plant Sci* 14:255-263

Chen JG, Jones AM (2004) AtRGS1 function in *Arabidopsis thaliana*. *Methods Enzymol* 389:338-350

Chuang CF, Meyerowitz EM (2000) Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4985-4990

Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735-743

DeBlasio SL, Luesse DL, Hangarter RP (2005) A plant-specific protein essential for blue-light-induced chloroplast movements. *Plant Physiol* 139:101-114

Galinha C, Hofhuis H, Luijten M, Willemsen V, Blilou I, Heidstra R, Scheres B (2007) PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature* 449:1053-1057

Ihmels J, Levy R, Barkai N (2003) Principles of transcriptional control in the metabolic network of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* 22:86-92

Jun JH, Fiume E, Fletcher JC (2008) The CLE family of plant polypeptide signaling molecules. *Cell Mol Life Sci* 65:743-755

Kharchenko P, Church GM, Vitkup D (2005) Expression dynamics of a cellular metabolic network. *Mol Syst Biol* 1:2005-2016

Kim CY, Bove J, Assmann SM (2008) Overexpression of wound-responsive RNA-binding proteins induces leaf senescence and hypersensitive-like cell death. *New Phytol* 180:57-70

Kinoshita A, Betsuyaku S, Osakabe Y, Mizuno S, Nagawa S, Stahl Y, Simon R, Yamaguchi-Shinozaki K, Fukuda H, Sawa S (2010) RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in Arabidopsis. *Development* 137:3911-3920

Komori R, Amano Y, Ogawa-Ohnishi M, Matsubayashi Y (2009) Identification of tyrosylprotein sulfotransferase in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:15067-15072

Kuromori T, Takahashi S, Kondou Y, Shinozaki K, Matsui M (2009) Phenome analysis in plant species using loss-of-function and gain-of-function mutants. *Plant Cell Physiol* 50:1215-1231

Kutschmar A, Rzewuski G, Stührwohldt N, Beemster GT, Inzè D, Sauter M (2009) PSK- α promotes root growth in Arabidopsis. *New Phytol* 81:820-831

Laval V, Koroleva OA, Murphy E, Lu C, Milner JJ, Hooks MA, Tomos AD (2002) Distribution of actin gene isoforms in the Arabidopsis leaf measured in microsamples from intact individual cells. *Planta* 215:287-292

Leclercq J, Ranty B, Sanchez-Ballesta MT, Li Z, Jones B, Jauneau A, Pech JC, Latché A, Ranjeva R, Bouzayen M (2005) Molecular and biochemical characterization of LeCRK1, a ripening-associated tomato CDPK-related kinase. *J Exp Bot* 56:25-35

Lorbiecke R, Sauter M (2002) Comparative analysis of PSK peptide growth factor precursor homologs. *Plant Sci* 163:321-332

Matsubayashi Y, Hanai H, Hara O, Sakagami Y (1996) Active fragments and analogs of the plant growth factor, phytosulfokine: structure-activity relationships. *Biochem Biophys Res Commun* 225:209-214

Matsubayashi Y, Ogawa M, Kihara H, Niwa M, Sakagami Y (2006) Disruption and overexpression of Arabidopsis phytosulfokine receptor gene affects cellular longevity and potential for growth. *Plant Physiol* 142:45-53

Matsubayashi Y, Ogawa M, Morita A, Sakagami Y (2002) An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine. *Science* 296:1470-1472

Matsubayashi Y, Sakagami Y (1996) Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7623-7627

Mehlmer N, Wurzinger B, Stael S, Hofmann-Rodrigues D, Csaszar E, Pfister B, Bayer R, Teige M (2010) The Ca(2+)-dependent protein kinase CPK3 is required for MAPK-independent salt-stress acclimation in *Arabidopsis*. *Plant J* DOI: 10.1111/j.1365-3113.2010.04257.x

Meng L, Wong JH, Feldman LJ, Lemaux PG, Buchanan BB (2010) A membrane-associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:3900-3905

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497

Mutwil M, Obro J, Willats WG, Persson S (2008) GeneCAT- novel webtools that combine BLAST and co-expression analyses. *Nucleic Acids Res* 36:320-326

Obayashi T, Hayashi S, Saeki M, Ohta H, Kinoshita K (2008) ATTED-II provides coexpressed gene networks for *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* 37:987-991

Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253:895-897

Reddy VS, Ali GS, Reddy AS (2002) Genes encoding calmodulin-binding proteins in the *Arabidopsis* genome. *J Biol Chem* 277:9840-9852

Resh MD (2004) Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. *Subcell Biochem* 37:217-232

Srinivasasainagendra V, Page GP, Mehta T, Coulibaly I, Loraine AE (2008) CressExpress: a tool for large-scale mining of expression data from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 147:1004-1016

Srivastava R, Liu JX, Howell SH (2008) Proteolytic processing of a precursor protein for a growth-promoting peptide by a subtilisin serine protease in *Arabidopsis*. *Plant J* 56:219-227

Stuart JM, Segal E, Koller D, Kim SK (2003) A gene-coexpression network for global discovery of conserved genetic modules. *Science* 302:249-255

Ulm R, Revenkova E, di Sansebastiano GP, Bechtold N, Paszkowski J (2001) Mitogen-activated protein kinase phosphatase is required for genotoxic stress relief in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 15:699-709

Vielle-Calzada JP, Thomas J, Spillane C, Coluccio A, Hoepfner MA, Grossniklaus U (1999) Maintenance of genomic imprinting at the Arabidopsis *medea* locus requires zygotic DDM1 activity. *Genes Dev* 13:2971-2982

Weigel D, Glazebrook J (2002) *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Yang H, Matsubayashi Y, Hanai H, Nakamura K, Sakagami Y (2000a) Molecular cloning and characterization of *OsPSK*, a gene encoding a precursor for phytosulfokine- α , required for rice cell proliferation. *Plant Mol Biol* 44:635-647

Yang H, Matsubayashi Y, Hanai H, Sakagami Y (2000b) Phytosulfokine- α , a peptide growth factor found in higher plants: its structure, functions, precursor and receptors. *Plant Cell Physiol* 41:825-830

Yang H, Matsubayashi Y, Nakamura K, Sakagami Y (2001) Diversity of Arabidopsis genes encoding precursors for phytosulfokine, a peptide growth factor. *Plant Physiol* 127:842-851

Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004) Genevestigator. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* 136:2621-263

ABSCHLIESSENDE DISKUSSION UND AUSBLICK

Pflanzen verwenden Peptide als Signale, um Wachstum, Entwicklung und Anpassungen an abiotischen und biotischen Stress zu kontrollieren und zu koordinieren. Das 18 Aminosäuren lange Peptid Systemin ist in die Resistenz von Tomate gegen Pathogene involviert (Torii, 2004). PSY1, RGFs und PSK- α sind sulfatierte Peptide, die pflanzliches Wachstum regulieren. Das Glykopeptid PSY1 fördert die Zellproliferation und -streckung in nanomolaren Konzentrationen (Amano et al., 2007). Das disulfatierte Pentapeptid PSK- α wurde als ein Wachstumsfaktor in Pflanzen identifiziert, der die Proliferation von Spargelzellen fördert, die in geringer Dichte wachsen (Matsubayashi et al., 1996). PSK Präproteine werden in Arabidopsis von fünf Genen kodiert (Lorbiecke und Sauter, 2002; Yang et al., 2001). Expression von PSK Präproteinen wurde ubiquitär in Wurzeln, Hypokotylen, reproduktiven Organen und nach Verwundung in der Pflanze nachgewiesen. Daraus wurde geschlossen, dass PSK- α in diesen Geweben synthetisiert werden kann (Kapitel 1 bis 4). Die proteolytische Spaltung des PSK Präproteins durch eine Subtilisin Serin Protease wurde für PSK4 aus Arabidopsis durch Srivastava et al. (2008) gezeigt. Die Sulfatierung der Tyrosine wird durch eine Tyrosylprotein Sulfotransferase (TPST) katalysiert (Komori et al., 2009). Das prozessierte, aktive PSK- α wird von LRR Rezeptorkinasen perzipiert, die an der Plasmamembran lokalisiert sind (Matsubayashi et al., 2002). In Arabidopsis kodieren zwei Gene, *PSKR1* und *PSKR2*, für PSK Rezeptorproteine (Matsubayashi et al., 2006; Amano et al., 2007). Transkripte und Aktivität der Promotoren wurden für die PSK Rezeptoren in allen untersuchten Geweben nachgewiesen. Es kann hier nicht nur die Synthese sondern auch die Perzeption des Pentapeptids stattfinden (Kapitel 1 bis 4). Ob und wie PSK- α in Pflanzen transportiert wird, ist unklar.

In der *Knockout* Linie *pskr1-1* war das Wachstum von Kallusgewebe, das aus abgeschnittenen Blättern gewonnen wurde, reduziert. Dies war ein Hinweis darauf, dass PSKR1 während regenerativer Prozesse für die Zellproliferation benötigt wird (Matsubayashi et al., 2006). In Kapitel 2 dieser Arbeit wurden Ergebnisse gezeigt, die darauf hinweisen, dass das PSK-Signal in Abwehrmechanismen der Pflanze gegen mechanische Verwundung und bestimmte pilzliche Pathogene involviert ist (Loivamäki et al., 2010). Promotor-

GUS Analysen zeigten eine erhöhte Aktivität der Promotoren von *PSK2*, *PSK3* und *PSK5* und *PSKR1* nach Behandlung mit pathogenen Pilzen oder Verwundung von Hypokotylen etiolierter Keimlinge und von Blättern. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass in *pskr1-3* und *pskr2-1* Pflanzen die Photosyntheseleistung nach Behandlung mit dem pilzlichen Elicitor E-Fol verringert war. Die verringerte Photosyntheseleistung war ein Hinweis auf eine geringere pflanzliche Resistenz gegen Befall durch Pathogene. Die Ergebnisse zeigen, dass PSK Rezeptoren in die Immunantwort involviert sein könnten. Die PSK Rezeptoren sind den LRR Rezeptorkinasen BRI1 und FLS2 strukturell ähnlich. Es ist denkbar, dass der PSK-Signalweg Ähnlichkeiten mit denen aufweist, die über FLS2 und BRI1 reguliert werden, oder dass die beiden Signalwege miteinander verbunden sind (Chinchilla et al., 2009).

In dieser Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass PSK- α einige Wachstumsprozesse beeinflusst. Dabei wird sowohl die Zellproliferation als auch die Zellstreckung beeinflusst. Motose et al. (2009) zeigten, dass in *Zinnia elegans* die Expression von *ZePSK1* nach 24 Stunden erhöht war, nachdem Blätter für die Isolierung von Mesophyllprotoplasten in kleine Stücke geschnitten wurden. Exogen appliziertes PSK- α führte in nanomolaren Konzentrationen zu einer erhöhten Bildung von Tracheen in *Zinnia*-Zellkulturen, die in geringer Dichte wuchsen (Motose et al., 2009). Daraus kann geschlossen werden, dass PSK- α die Proliferation von undifferenzierten Zellen fördert, wie es auch schon von Matsubayashi et al. (1996) gezeigt wurde.

Nach Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* bilden Pflanzen Tumore. Um zu untersuchen, ob die PSK Rezeptoren eine Rolle beim Wachstum der Tumore haben, wurde die Tumorbildung in *pskr1-3*, *pskr2-1* und *pskr1-3/pskr2-1* im Vergleich zum Wildtyp untersucht (Loivamäki et al., 2010). *pskr1-3* Pflanzen entwickelten im Vergleich zum Wildtyp und zu *pskr2-1* kleinere Tumore. Zellgrößen der Tumore von *pskr1-3* waren nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Es wurde geschlussfolgert, dass die Proliferation der Zellen in den Tumoren hauptsächlich über PSKR1 reguliert wird. Die Tumorbildung ist ein weiterer Prozess, bei dem die Proliferation von undifferenzierten Zellen beeinflusst wird.

Neben der Proliferation von Zellen fördert PSK- α Prozesse, bei denen das Wachstum über eine erhöhte Zellstreckung gefördert wird. PSK- α reguliert Hypokotyl- und Wurzelwachstum (Kapitel 1 und 4) und das synchrone

Wachstum der Staubblätter und der Fruchtknoten (Kapitel 3). In den ersten zehn Schoten der *pskr1-2* und *pskr1-3* Pflanzen war die Samenbildung um 50% reduziert. Dieser Phänotyp war teilweise darauf zurückzuführen, dass Staubblätter und Fruchtknoten, deren Zellen sich in dieser Phase nur noch strecken und nicht mehr teilen, in *pskr1-3* asynchron wuchsen. Die Staubblätter waren im Blütenstadium 14, zum Zeitpunkt der Befruchtung, um 360 μm kürzer als der Fruchtknoten. Dies könnte die Bestäubung der Blüte erschweren und damit zur reduzierten Samenbildung beitragen. Durch Handbestäubung wurde die Befruchtungsrate von *pskr1-3* um 30% erhöht, was bedeutet, dass der Transfer des Pollens auf das Stigma limitierend für die Befruchtung war. Die Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass PSKR1 wichtig für die Fertilität der Pflanze ist. Ob auch das Fehlen von aktivem PSK- α zu einer verringerten Fertilität führt, kann an *tpst-1* Pflanzen untersucht werden, die selbst kein PSK- α synthetisieren können. Durch diese Analysen ließe sich klären, ob PSK- α das Wachstum von Staubblättern und Fruchtknoten beeinflusst.

Sowohl in Wurzeln als auch Hypokotylen reguliert PSK- α Wachstum über eine erhöhte Zellstreckung. *pskr1-3*, *pskr2-1* und *pskr1-3/pskr2-1* Keimlinge hatten kürzere Wurzeln im Vergleich zum Wildtyp und die Responsivität der Wurzeln der Einzelmutanten gegenüber PSK- α war reduziert (Kutschmar et al., 2009). In der Doppelmutante förderte PSK- α das Wurzelwachstum nicht. Daraus kann gefolgert werden, dass Wurzelwachstum über beide PSK Rezeptoren reguliert wird. Kinematische Analysen zeigten, dass das erhöhte Wurzelwachstum hauptsächlich auf längere Zellen zurückzuführen war. Außerdem könnte die Interaktion von PSK- α mit anderen Phytohormonen durch genetische und physiologische Analysen analysiert werden. Zhou et al. (2010) zeigten, dass die Regulation des Wurzelwachstums durch Cytokinine in Interaktion mit Auxin reguliert wird. *Knockout* Mutanten wurden unter anderem mit Auxin komplementiert. Grundsätzlich könnte untersucht werden, ob andere Hormone und PSK- α eventuell auf Ebene von speziellen Signalkomponenten wie Transkriptionsfaktoren interagieren. Das pflanzliche Hormon Gibberellinsäure spielt eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle des Ausmaßes von Zellteilung und der Richtung und des Ausmaßes der Zellstreckung (Achard et al., 2009; Ubeda-Tomás et al., 2008). Der Transkriptionsfaktor SCL3 (*Scarecrow-Like 3*), der zur Familie der GRAS-Proteine gehört, wirkt als ein positiver Regulator des durch Gibberellinsäure vermittelten Wurzelwachstums

(Heo et al., 2011). Die Sensitivität von *scf3* Keimlingen gegenüber PSK- α könnte analysiert und eine mögliche Rolle von SCL3 oder weiteren *Scarecrow* Transkriptionsfaktoren im PSK-Signalweg untersucht werden. Darüber hinaus wäre es interessant zu untersuchen, ob Brassinosteroide und PSK- α miteinander interagieren. Die Perzeption von Brassinosteroiden erfolgt über den heterodimeren Rezeptorkomplex BRI1-BAK1 (Kim und Wang, 2010). Bei BRI1 und BAK1 handelt es sich wie bei den PSK Rezeptoren um LRR Rezeptorkinasen. Um zu analysieren, ob die beiden Signalwege sich überschneiden, könnte das Wurzelwachstum von *bri1*, *bak1*, *pskr1* und *pskr2* *Knockout* Keimlingen nach Zugabe von PSK- α und beziehungsweise oder Brassinosteroiden untersucht werden. Sollten *bri1* und *pskr1* insensitiv auf PSK- α beziehungsweise Brassinosteroide reagieren, so wäre dies ein Hinweis auf eine mögliche Überschneidung der beiden Signalwege. Darüber hinaus könnten die Mutanten miteinander gekreuzt werden, um eine Überschneidung der Signalwege zu untersuchen.

Hypokotyle von *pskr1* Keimlingen waren kürzer als die des Wildtyps. Exogen appliziertes PSK- α förderte nicht das Hypokotylwachstum. Von daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Konzentration an PSK- α im Hypokotyl gesättigt ist. Ähnlich wie PSK- α haben auch Brassinosteroide nur einen geringen Effekt auf das Wachstum des Hypokotyls (Srivastava et al., 2009). *Knockout* von Signal- oder Biosynthesegenen des Brassinosteroid-Signalweges führte zu kürzeren Hypokotylen (Vandenbussche et al., 2005). Auch Gibberellinsäure fördert nicht das Hypokotylwachstum, während *ga1* und *ga20ox* Keimlinge, die keine Gibberellinsäure synthetisieren können, kürzere Hypokotyle haben. Die ist ein Hinweis darauf, dass die endogene Konzentration an Gibberellinsäure bereits gesättigt ist (Cowling und Harberd, 1999; Rieu et al., 2008). In *tpst-1* Keimlingen wird das Hypokotylwachstum durch PSK- α dosisabhängig ab einer Konzentration von 3 nM PSK- α signifikant über eine erhöhte Zellstreckung gefördert (Kapitel 3). Wie auch in der Wurzel reguliert PSK- α das Wachstum auch im Hypokotyl über eine erhöhte Zellstreckung. Die Epidermiszellen des Hypokotyls von *ga1* Keimlingen sind durchschnittlich halb so lang wie die des Wildtyps. Auch Gibberellinsäure reguliert das Hypokotylwachstum über eine erhöhte Zellstreckung (Cowling und Harberd, 1999). Die Epidermis wird als die wachstumslimitierende Schicht des

Hypokotyls diskutiert (Savaldi-Goldstein und Chory, 2008). Hypokotyle von *bri1* und *bak1* sind im Vergleich zum Wildtyp verkürzt. Das Hypokotyl von Höheren Pflanzen setzt sich aus wenigen Zellschichten zusammen: Epidermis, Kortex, Endodermis und Leitgewebe. Savaldi-Goldstein et al. (2007) zeigten, dass Brassinosteroide über die Epidermis das Wachstum des Hypokotyls regulieren. Wurde BRI1 unter der Kontrolle des epidermisspezifischen Promotors ML1 (*Meristem Layer 1*) im *bri1* Hintergrund exprimiert, war der *bri1* Phänotyp aufgehoben und die Pflanzen entwickelten sich wie der Wildtyp (Savaldi-Goldstein et al., 2007). Ob der PSK-Signalweg in der Epidermis für das Wachstum verantwortlich ist, könnten zukünftige Studien zeigen, indem *PSKR1* unter der Kontrolle eines Epidermis-spezifischen Promotors im *pskr1* Hintergrund exprimiert wird. RALFs (*Rapid Alkalinization Factors*) sind weitere Peptidwachstumsfaktoren, die Alkalinisierung induzieren und das Wurzelwachstum von Arabidopsis-Keimlingen inhibieren (Pearce et al., 2001). RALF23 aus Arabidopsis wird durch Brassinosteroid-Behandlung herunterreguliert und Überexpression von RALF23 inhibiert die Streckung des Arabidopsis-Hypokotyls durch Brassinosteroide (Srivastava et al., 2009). Wie für die Wurzel könnte durch die Behandlung von *bri1*, *bak1*, *pskr1* und *pskr2* *Knockout* Keimlingen mit PSK- α und beziehungsweise oder Brassinosteroiden analysiert werden, ob PSK- α und Brassinosteroide zusammen wirken. Außerdem könnten darüber hinaus Untersuchungen zeigen, ob Überexpression von RALF23 auch die Streckung des Arabidopsis Hypokotyls im *tpst-1* Hintergrund inhibiert.

Neben Wachstumsprozessen in Wurzeln und Hypokotylen beeinflusst PSK- α auch die Pollenschlauchorientierung. Da die Pollenschläuche in nicht-befruchteten Samenanlagen von *pskr1-2* und *pskr1-3* nicht entlang des Funikulus wuchsen, scheint PSKR1 für die funikulare Pollenschlauchorientierung erforderlich zu sein (Kapitel 3). Analysen von *tpst-1* Pflanzen, die kein aktives PSK- α synthetisieren können, könnten hinsichtlich ihrer Pollenschlauchorientierung untersucht werden. Sollten diese in ihrer Orientierung gestört sind, so wäre PSK- α oder andere sulfatierte Peptide limitierend für die Pollenschlauchorientierung. Um zu untersuchen, ob es sich um eine gametophytische Wirkung handelt und ob PSK- α im Pollen oder im Embryosack perzipiert werden muss, könnte PSKR1 unter der Kontrolle eines Embryosack-spezifischen beziehungsweise eines Pollen-spezifischen

Promotors in *pskr1* Pflanzen exprimiert werden und untersucht werden, unter der Kontrolle welchen Promotors *pskr1* Pflanzen zum Wildtyp-Phänotyp komplementiert werden können. Damit ließe sich klären, wo PSKR1 wirkt.

Wie das PSK-Signal übertragen wird, ist bisher nicht bekannt, außer dass PSK- α von LRR Rezeptorkinasen perzipiert wird. Über Koexpressionsanalysen wurden Gene identifiziert, die mit den PSK Rezeptorgenen koexprimiert sind. Über die Suche nach bekannten Phänotypen wurde mit PSI1 ein Protein identifiziert, welches im PSK-Signalweg eine Rolle spielen könnte. Wie auch *pskr1-3* Keimlinge hatten *psi1-1* Keimlinge kürzere Hypokotyle und Wurzeln und die Sensitivität der Wurzeln gegenüber PSK- α war reduziert. Um zu untersuchen, ob PSI1 und die beiden PSK Rezeptoren gemeinsam in einem Signalweg wirken, wurden die Mutanten miteinander gekreuzt und das Wurzelwachstum und die Sensitivität gegenüber PSK- α analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Effekte des *Knockouts* mehrerer Gene nicht additiv waren. Die Phänotypen waren teilweise intermediär. Da in keiner der Doppel- oder Dreifachmutanten additive Effekte vorlagen, kann daraus geschlossen werden, dass PSI1 und die PSK Rezeptoren die gleichen Prozesse beeinflussen könnten, die Wachstum regulieren. Da allerdings die Sensitivität der Wurzeln der *psi1-1* Keimlinge gegenüber PSK- α nur leicht reduziert war, könnte es auch sein, dass PSI1 einen Signalweg unabhängig von PSK- α beeinflusst. Dies lässt sich nicht abschließend beurteilen. Die funktionale Analyse der vorhergesagten N-terminalen Myristoylierungsstelle ergab, dass die Myristoylierung nicht essentiell für die Funktion von PSI1 ist. Der *psi1-1* Phänotyp konnte sowohl durch ein *PS1ox*-Konstrukte als auch durch ein *PS1ox_A→G*-Konstrukt zum Wildtyp-Phänotyp komplementiert werden. Analysen der subzellulären Lokalisation ergaben, dass PSI1 cytoplasmatisch ist und nicht an der Plasmamembran verankert ist, was zum einen bedeutet, dass das Protein vermutlich nicht myristoyliert wird und zum anderen, dass PSKR1 und PSI1 vermutlich nicht direkt miteinander interagieren. Datenbankrecherchen ergaben, dass es im Arabidopsis-Genom mit PSI2 und PSI3 zwei homologe Proteine zu PSI1 gibt. *Knockout* der Gene führte bei *psi2-1* und *psi3-1* nicht zu einer veränderten Wurzellänge. Die Sensitivität der *psi3-1* Wurzeln gegenüber PSK- α war im Vergleich zum Wildtyp nicht reduziert. *psi2-1* Wurzeln hingegen reagierten nicht auf PSK- α . Die PSK-Antwort war vollständig ausgeschaltet, woraus geschlossen werden kann, dass PSI2 eine Rolle im PSK-Signalweg

spielen könnte. Obwohl die Sensitivität der *psi3-1* Wurzeln nicht verändert war, könnte auch PSI3 eine Funktion im PSK-Signalweg haben, falls die Aktivität von PSI2 im Vergleich zu PSI1 und PSI3 geringer ist. Da alle drei PSI Proteine an der Regulation des PSK-Signalweges beteiligt sein könnten, müssten Doppelmutanten und eine Dreifachmutante hergestellt und analysiert werden, um eine mögliche Redundanz der PSI Proteine zu untersuchen. Dazu müssten *psi1-1*, *psi2-1* und *psi3-1* miteinander gekreuzt werden. Doppelt homozygote *psi1-1/psi2-1* Pflanzen sind schwierig zu identifizieren, da *PSI1* und *PSI2* beide auf Chromosom 1 lokalisiert sind. Von daher müsste eines der Gene über andere Methoden wie RNA-Interferenz ausgeschaltet oder herunterreguliert werden (Chuang und Meyerowitz, 2000). Doppel- und Dreifachmutanten könnten klären, ob *Knockout* mehrerer oder aller *PSI* Gene zu einem vollständigen Ausschalten der PSK-Antwort führt und ob die Effekte additiv oder synergistisch sind. Sollten die Effekte additiv sein und wäre die PSK-Antwort vollständig ausgeschaltet, hätten die PSI Proteine redundante Funktion im PSK-Signalweg. Um zu untersuchen, ob der *Knockout* von *PSI1* dazu führt, dass die Responsivität von *psi1-1/tpst1-1* Hypokotylen gegenüber PSK- α im Vergleich zu *tpst-1* reduziert ist, könnte *psi1-1* mit *tpst1-1* gekreuzt werden. Diese Analysen könnte die Frage klären, ob PSI1 im PSK-Signalweg eine Rolle spielt. Doppelt homozygote Kreuzungen von *psi1-1* mit *tpst-1* sind allerdings schwer zu erzeugen, da beide Gene nah beieinander auf Chromosom 1 liegen. Von daher müsste eines der Gene über alternative Methoden ausgeschaltet oder herunterreguliert werden.

Über Ko-Immunopräzipitation und *Yeast-Two-Hybrid* könnte analysiert werden, mit welchen Proteinen PSKR1, PSKR2 und PSI1 interagieren. Eine gezielte Analyse der Interaktion von PSI1 mit PSKR1 und beziehungsweise oder mit PSKR2 könnte damit ebenfalls durchgeführt werden, allerdings ist diese auf Grund der unterschiedlichen subzellulären Lokalisation unwahrscheinlich. Um weitere Komponenten des PSK-Signalweges zu identifizieren, könnten PSKR1, PSKR2 und die PSI-Proteine unter der Kontrolle ihrer endogenen Promotoren an Fusionsproteine gekoppelt werden und über Ko-Immunopräzipitation mögliche Interaktionspartner gefunden werden. BRI1 und BAK1 bilden heterodimere Rezeptorkomplexe (Li et al., 2002; Nam und Li, 2002). Um spezifische Aminosäuren zu untersuchen, die für das Ausbilden des funktionalen Rezeptorkomplexes und die Aktivierung der BAK1 Kinase-Aktivität

wichtig sind, wurden verschiedenen Versionen von *BAK1* in Pflanzen und Hefe exprimiert (Yun et al., 2009). Austausch von bestimmten Leuzinen zu Glutamin führten zu einem Verlust der Bindung von BRI1 an BAK1 und Austausch von Threonin zu Alanin zu einer fehlenden BAK1 Kinase-Aktivität (Yun et al., 2009). Ob und mit welchen LRR Rezeptorkinasen PSKR1 Homo- oder Heterodimere bildet, ist bisher nicht bekannt. Hetero- und Homodimerisierung von PSKR1 könnte über verschiedene Ansätze mit und ohne Aminosäuresaustausch über *Yeast-Two-Hybrid* und Ko-Immunopräzipitation analysiert werden. Ebenso könnte versucht werden, über *Yeast-Two-Hybrid* Interaktionspartner von verschiedenen PSKR1 Proteinen mit mutierten Aminosäuren zu detektieren. *Microarrays* könnten helfen, Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die an der Regulation des PSK-Signalweges beteiligt sind. Gene, die nach PSK-Behandlung gewebespezifisch hoch- oder herunterreguliert werden, könnten auf eine mögliche Funktion im PSK-Signalweg über *Knockout* Mutanten untersucht werden.

LITERATUR

Achard P, Gusti A, Cheminant S, Alioua M, Dhondt S, Coppens F, Beemster GT, Genschik P (2009) Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 19:1188-1193

Amano Y, Tsubouchi H, Shinohara H, Ogawa M, Matsubayashi Y (2007) Tyrosine-sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18333-18338

Azpiroz R, Wu Y, LoCascio JC, Feldmann KA (1998) An *Arabidopsis* brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. *Plant Cell* 10:219-230

Baeuerle PA, Huttner WB (1987) Tyrosine sulfation is a trans-Golgi-specific protein modification. *J Cell Biol* 105:2655-2664

Beisswanger R, Corbeil D, Vannier C, Thiele C, Dohrmann U, Kellner R, Ashman K, Niehrs C, Huttner WB (1998) Existence of distinct tyrosylprotein sulfotransferase genes: molecular characterization of tyrosylprotein sulfotransferase-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11134-11139

Bleckmann A, Weidtkamp-Peters S, Seidel CA, Simon R (2010) Stem cell signaling in *Arabidopsis* requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane. *Plant Physiol* 152:166-176

Brand U, Fletcher JC, Hobe M, Meyerowitz EM, Simon R (2000) Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* 289:617-619

Chen YF, Matsubayashi Y, Sakagami Y (2000) Peptide growth factor phytosulfokine- α contributes to the pollen population effect. *Planta* 211:752-755

Chinchilla D, Bauer Z, Regenass M, Boller T, Felix G (2006) The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* 18:465-476

Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448:497-500

Chuang CF, Meyerowitz EM (2000) Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4985-4990

Clark SE (2001) Cell signalling at the shoot meristem. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:276-284

Clark SE, Jacobsen SE, Levin JZ, Meyerowitz EM (1996) The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* 122:1567-1575

Clark SE, Williams RW, Meyerowitz EM (1997) The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* 89:575-585

Clouse SD, Langford M, McMorris TC (1996) A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol* 111:671-678

Cowling RJ, Harberd NP (1999) Gibberellins control *Arabidopsis* hypocotyl growth via regulation of cellular elongation. *J Exp Bot* 1351-1357

Diévert A, Clark SE (2004) LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development* 131:251-261

Doares SH, Narvaez-Vasquez J, Conconi A, Ryan CA (1995) Salicylic Acid Inhibits Synthesis of Proteinase Inhibitors in Tomato Leaves Induced by Systemin and Jasmonic Acid. *Plant Physiol* 108:1741-1746

Feldmann KA, Marks MD (1987) *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach. *Mol Gen Genet* 208:1-9

Fiers M, Golemiec E, Xu J, van der Geest L, Heidstra R, Stiekema W, Liu CM (2005) The 14-amino acid CLV3, CLE19, and CLE40 peptides trigger consumption of the root meristem in *Arabidopsis* through a *CLAVATA2*-dependent pathway. *Plant Cell* 17:2542-2453

Fiers M, Ku KL, Liu CM (2007) CLE peptide ligands and their roles in establishing meristems. *Curr Opin Plant Biol* 10:39-43

Fletcher JC, Brand U, Running MP, Simon R, Meyerowitz EM (1999) Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* 283:1911-1914

Gómez-Gómez L, Bauer Z, Boller T (2001) Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13:1155-1163

Gómez-Gómez L, Boller T (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 5:1003-1011

Gómez-Gómez L, Felix G, Boller T (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 18:277-284

Hanai H, Matsuno T, Yamamoto M, Matsubayashi Y, Kobayashi T, Kamada H, Sakagami Y (2000) A secreted peptide growth factor, phytosulfokine, acting as

- a stimulatory factor of carrot somatic embryo formation. *Plant Cell Physiol* 41:27-32
- Hanai H, Nakayama D, Yang H, Matsubayashi Y, Hirota Y, Sakagami Y (2000) Existence of a plant tyrosylprotein sulfotransferase: novel plant enzyme catalyzing tyrosine O-sulfation of preprophytosulfokine variants *in vitro*. *FEBS Lett* 470:97-101
- Heese A, Hann DR, Gimenez-Ibanez S, Jones AM, He K, Li J, Schroeder JI, Peck SC, Rathjen JP (2007) The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:12217-12222
- Heo JO, Chang KS, Kim IA, Lee MH, Lee SA, Song SK, Lee MM, Lim J (2011) Funneling of gibberellin signaling by the GRAS transcription regulator SCARECROW-LIKE 3 in the Arabidopsis root. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:2166-2171
- Huttner WB (1984) Determination and occurrence of tyrosine O-sulfate in proteins. *Methods Enzymol* 107:200-223
- Ishiguro S, Watanabe Y, Ito N, Nonaka H, Takeda N, Sakai T, Kanaya H, Okada K (2002) SHEPHERD is the Arabidopsis GRP94 responsible for the formation of functional CLAVATA proteins. *EMBO J* 21:898-908
- Jeong S, Trotochaud AE, Clark SE (1999) The Arabidopsis *CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *Plant Cell* 11:1925-1934
- Kauschmann A, Jessop A, Koncz C, Szekeres M, Willmitzer L, Altmann T (1996) Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. *Plant J* 9:701-713
- Kim TW, Wang ZY (2010) Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annu Rev Plant Biol* 61:681-704
- Kinoshita A, Betsuyaku S, Osakabe Y, Mizuno S, Nagawa S, Stahl Y, Simon R, Yamaguchi-Shinozaki K, Fukuda H, Sawa S (2010) RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in Arabidopsis. *Development* 137:3911-3920
- Klahre U, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Yokota T, Nomura T, Yoshida S, Chua NH (1998) The Arabidopsis *DIMINUTO/DWARF1* gene encodes a protein involved in steroid synthesis. *Plant Cell* 10:1677-1690
- Kobayashi T, Eun C-H, Hanai H, Matsubayashi Y, Sakagami Y, Kamada H (1999) Phytosulphokine- α , a peptidyl plant growth factor, stimulates somatic embryogenesis in carrot. *J Exp Bot* 336:1123-1128
- Kobe B, Kajava AV (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 11:725-732

- Komori R, Amano Y, Ogawa-Ohnishi M, Matsubayashi Y (2009) Identification of tyrosylprotein sulfotransferase in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci USA 106:15067-15072
- Kutschmar A, Rzewuski G, Stührwohldt N, Beemster GT, Inzé D, Sauter M (2009) PSK- α promotes root growth in Arabidopsis. New Phytol 181: 820-831
- Li J, Chory J (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. Cell 90:929-938
- Li J, Nagpal P, Vitart V, McMorris TC, Chory J (1996) A role for brassinosteroids in light-dependent development of Arabidopsis. Science 272:398-401
- Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC (2002) BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. Cell 110:213-222
- Loivamäki M, Stührwohldt N, Deeken R, Steffens B, Roitsch T, Hedrich R, Sauter M (2010) A role for PSK signaling in wounding and microbial interactions in Arabidopsis. Physiol Plant 139:348-357
- Lorbiecke R, Sauter M (2002) Comparative analysis of PSK peptide growth factor precursor homologs. Plant Sci 163:321-332
- Matsubayashi Y (2011) Post-translational modifications in secreted Peptide hormones in plants. Plant Cell Physiol 52:5-13
- Matsubayashi Y, Hanai H, Hara O, Sakagami Y (1996) Active fragments and analogs of the plant growth factor, phytosulfokine: structure-activity relationships. Biochem Biophys Res Commun 225:209-214
- Matsubayashi Y, Ogawa M, Kihara H, Niwa M, Sakagami Y (2006) Disruption and overexpression of Arabidopsis phytosulfokine receptor gene affects cellular longevity and potential for growth. Plant Physiol 142:45-53
- Matsubayashi Y, Ogawa M, Morita A, Sakagami Y (2002) An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine. Science 296:1470-1472
- Matsubayashi Y, Sakagami Y (1996) Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. Proc Natl Acad Sci USA 93:7623-7627
- Matsubayashi Y, Sakagami Y (1999) Characterization of specific binding sites for a mitogenic sulfated peptide, phytosulfokine- α , in the plasma-membrane fraction derived from *Oryza sativa* L. Eur J Biochem 262:666-671
- Matsubayashi Y, Sakagami Y (2000) 120- and 160-kDa receptors for endogenous mitogenic peptide, phytosulfokine- α , in rice plasma membranes. J Biol Chem 275:15520-15525

- Matsubayashi Y, Sakagami Y (2006) Peptide hormones in plants. *Annu Rev Plant Biol* 57:649-674
- Matsubayashi Y, Takagi L, Omura N, Morita A, Sakagami Y (1999) The endogenous sulfated pentapeptide phytosulfokine- α stimulates tracheary element differentiation of isolated mesophyll cells of zinnia. *Plant Physiol* 120:1043-1048
- Matsubayashi Y, Takagi L, Sakagami Y (1997) Phytosulfokine- α , a sulfated pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells by means of specific high- and low-affinity binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13357-13362
- Matsuzaki Y, Ogawa-Ohnishi M, Mori A, Matsubayashi Y (2010) Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in Arabidopsis. *Science* 329:1065-1067
- McGurl B, Pearce G, Orozco-Cardenas M, Ryan CA (1992) Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science* 255:1570-1573
- McGurl B, Ryan CA (1992) The organization of the prosystemin gene. *Plant Mol Biol* 20:405-409
- Meindl T, Boller T, Felix G (1998) The plant wound hormone systemin binds with the N-terminal part to its receptor but needs the C-terminal part to activate it. *Plant Cell* 10:1561-1570
- Meng L, Feldman LJ (2010) CLE14/CLE20 peptides may interact with CLAVATA2/CORYNE receptor-like kinases to irreversibly inhibit cell division in the root meristem of Arabidopsis. *Planta* 232:1061-1074
- Moore KL (2003) The biology and enzymology of protein tyrosine O-sulfation. *J Biol Chem* 278:24243-24246
- Moore L (2009) Protein tyrosine sulfation: A critical posttranslation modification in plants and animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:14741-14742
- Motose H, Iwamoto K, Endo S, Demura T, Sakagami Y, Matsubayashi Y, Moore KL, Fukuda H (2009) Involvement of phytosulfokine in the attenuation of stress response during the transdifferentiation of zinnia mesophyll cells into tracheary elements. *Plant Physiol* 150:437-447
- Müller R, Bleckmann A, Simon R (2008) The receptor kinase CORYNE of Arabidopsis transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1. *Plant Cell* 20:934-946
- Müssig C, Shin GH, Altmann T (2003) Brassinosteroids promote root growth in Arabidopsis. *Plant Physiol* 133:1261-1271
- Nakamura A, Nakajima N, Goda H, Shimada Y, Hayashi K, Nozaki H, Asami T, Yoshida S, Fujioka S (2006) Arabidopsis Aux/IAA genes are involved in

- brassinosteroid-mediated growth responses in a manner dependent on organ type. *Plant J* 45:193-205
- Nakaya M, Tsukaya H, Murakami N, Kato M (2002) Brassinosteroids control the proliferation of leaf cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 43:239-244
- Nam KH, Li J (2002) BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* 110:203-212
- Ogawa M, Shinohara H, Sakagami Y, Matsubayashi Y (2008) Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science* 319:294
- Ouyang Y, Lane WS, Moore KL (1998) Tyrosylprotein sulfotransferase: purification and molecular cloning of an enzyme that catalyzes tyrosine O-sulfation, a common posttranslational modification of eukaryotic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2896-2901
- Pasonen HL, Käpylä M (1998) Pollen–pollen interactions in *Betula pendula* *in vitro*. *New Phytol* 138:481–487
- Pauwels L, Morreel K, De Witte E, Lammertyn F, Van Montagu M, Boerjan W, Inzé D, Goossens A (2008) Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured Arabidopsis cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:1380-1385
- Pearce G, Moura DS, Stratmann J, Ryan CA (2001) RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12843-12847
- Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253:895-897
- Rieu I, Eriksson S, Powers SJ, Gong F, Griffiths J, Woolley L, Benlloch R, Nilsson O, Thomas SG, Hedden P, Phillips AL (2008) Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 20:2420-2436
- Ryan C, Stevens TH, Schlesinger MJ (1992) Inhibitory effects of HSP70 chaperones on nascent polypeptides. *Protein Sci* 1:980-985
- Ryan CA (2000) The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta* 1477:112-121
- Ryan CA, Pearce G (2003) Systemins: a functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in Solanaceae species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2:14577-14580
- Sasse JM, Yokota T, Taylor PE, Griffiths PG, Porter QN, Cameron DW (1992) Brassinolide-induced elongation. *In* C Karssen, L van Loon, D Vreugdenhil, eds, *Progress in Plant Growth Regulation*. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, pp 319-325

- Savaldi-Goldstein S, Chory J (2008) Growth coordination and the shoot epidermis. *Curr Opin Plant Biol* 11:42-48
- Savaldi-Goldstein S, Peto C, Chory J (2007) The epidermis both drives and restricts plant shoot growth. *Nature* 446:199-202
- Scheer JM, Ryan CA (1999) A 160-kD systemin receptor on the surface of *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells. *Plant Cell* 11:1525-1536
- Scheer JM, Ryan CA Jr (2002) The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:9585-9590
- Schillmiller AL, Howe GA (2005) Systemic signaling in the wound response. *Curr Opin Plant Biol* 8:369-377
- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KF, Jürgens G, Laux T (2000) The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* 100:635-644
- Schumacher K, Vafeados D, McCarthy M, Sze H, Wilkins T, Chory J (1999) The Arabidopsis *det3* mutant reveals a central role for the vacuolar H(+)-ATPase in plant growth and development. *Genes Dev* 13:3259-3270
- Shinohara H, Ogawa M, Sakagami Y, Matsubayashi Y (2007) Identification of ligand binding site of phytosulfokine receptor by on-column photoaffinity labeling. *J Biol Chem* 282:124-131
- Shiu SH, Bleecker AB (2001) Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10763-10768
- Song SK, Clark SE (2005) POL and related phosphatases are dosage-sensitive regulators of meristem and organ development in Arabidopsis. *Dev Biol* 285:272-284
- Song SK, Lee MM, Clark SE (2006) POL and PLL1 phosphatases are CLAVATA1 signaling intermediates required for Arabidopsis shoot and floral stem cells. *Development* 133:4691-4698
- Srivastava R, Liu JX, Guo H, Yin Y, Howell SH (2009) Regulation and processing of a plant peptide hormone, AtRALF23, in Arabidopsis. *Plant J* 59:930-939
- Srivastava R, Liu JX, Howell SH (2008) Proteolytic processing of a precursor protein for a growth-promoting peptide by a subtilisin serine protease in Arabidopsis. *Plant J* 56:219-227

Stratmann J, Scheer J, Ryan CA (2000) Suramin inhibits initiation of defense signaling by systemin, chitosan, and a beta-glucan elicitor in suspension-cultured *Lycopersicon peruvianum* cells. Proc Natl Acad Sci USA 97:8862-8867

Szekeres M, Németh K, Koncz-Kálmán Z, Mathur J, Kauschmann A, Altmann T, Rédei GP, Nagy F, Schell J, Koncz C (1996) Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in Arabidopsis. Cell 85:171-182

Torii KU (2004) Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. Int Rev Cytol 234:1-46

Torii KU, Mitsukawa N, Oosumi T, Matsuura Y, Yokoyama R, Whittier RF, Komeda Y (1996) The Arabidopsis *ERECTA* gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. Plant Cell 8:735-746

Trotochaud AE, Hao T, Wu G, Yang Z, Clark SE (1999) The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein. Plant Cell 11:393-406

Ubeda-Tomás S, Swarup R, Coates J, Swarup K, Laplaze L, Beemster GT, Hedden P, Bhalerao R, Bennett MJ (2008) Root growth in Arabidopsis requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. Nat Cell Biol 10:625-628

Vandenbussche F, Verbelen JP, Van Der Straeten D (2005) Of light and length: regulation of hypocotyl growth in Arabidopsis. Bioessays 27:275-284

Wang G, Fiers M (2010) CLE peptide signaling during plant development. Protoplasma 240:33-43

Yamakawa S, Sakuta C, Matsubayashi Y, Sakagami Y, Kamada H (1998) The promotive effects of a peptidyl plant growth factor, phytosulfokine- α , on the formation of adventitious roots and expression of a gene for a root-specific cystatin in cucumber hypocotyls. J Plant Res 111:453-458

Yang H, Matsubayashi Y, Hanai H, Sakagami Y (2000) Phytosulfokine-alpha, a peptide growth factor found in higher plants: its structure, functions, precursor and receptors. Plant Cell Physiol 41:825-830

Yang H, Matsubayashi Y, Nakamura K, Sakagami Y (1999) *Oryza sativa* PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine-alpha, a sulfated peptide growth factor found in plants. Proc Natl Acad Sci USA 96:13560-13565

Yang H, Matsubayashi Y, Nakamura K, Sakagami Y (2001) Diversity of Arabidopsis genes encoding precursors for phytosulfokine, a peptide growth factor. Plant Physiol 127:842-851

Yin Y, Wu D, Chory J (2002) Plant receptor kinases: systemin receptor identified. Proc Natl Acad Sci USA 99:9090-9092

Yu LP, Miller AK, Clark SE (2003) *POLTERGEIST* encodes a protein phosphatase 2C that regulates CLAVATA pathways controlling stem cell identity at Arabidopsis shoot and flower meristems. *Curr Biol* 13:179-188

Yu LP, Simon EJ, Trotochaud AE, Clark SE (2000) POLTERGEIST functions to regulate meristem development downstream of the CLAVATA loci. *Development* 127:1661-1670

Yun HS, Bae YH, Lee YJ, Chang SC, Kim SK, Li J, Nam KH (2009) Analysis of phosphorylation of the BRI1/BAK1 complex in arabidopsis reveals amino acid residues critical for receptor formation and activation of BR signaling. *Mol Cells* 27:183-190

Zhou W, Wei L, Xu J, Zhai Q, Jiang H, Chen R, Chen Q, Sun J, Chu J, Zhu L, Liu CM, Li C (2010) Arabidopsis Tyrosylprotein sulfotransferase acts in the auxin/PLETHORA pathway in regulating postembryonic maintenance of the root stem cell niche. *Plant Cell* 22:3692-3709

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, Felix G (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell* 125:749-760

DANKSAGUNG

Zunächst einmal danke ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Margret Sauter ganz herzlich für die große Unterstützung, das mir entgegengebrachte Vertrauen, die konstruktive Kritik sowie die Diskussionen während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit.

Des Weiteren danke ich dem PSK-Team um Dr. Bianka Steffens, Dr. Renate Dahlke und Jens Hartmann für die gute, kollegiale Zusammenarbeit. Außerdem gilt mein besonderer Dank unserem Technischen Assistenten Timo Staffel, da er mir immer mit Rat zur Seite stand und vor allem bei methodischen Problemen immer zur Lösung der Probleme beitrug. Auch bei allen meinen Laborkollegen der Arbeitsgruppe möchte ich mich ganz herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Schließlich danke ich meiner Familie und meiner Freundin Jana Brouwer für die entgegengebrachte, jederzeit liebevolle Unterstützung.

Danke.

LEBENS LAUF

Nils Stührwohldt

Persönliche Daten

| | |
|---------------------|------------|
| Geburtstag | 04.07.1982 |
| Geburtsort | Neumünster |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |

Schulbildung

| | |
|-------------------|----------------------------------|
| 08/1993 – 06/2001 | Immanuel-Kant-Schule, Neumünster |
| 23.06.2001 | Abschluss Abitur |

Hochschulausbildung

| | |
|-------------------|--|
| 10/2002 - 04/2007 | Biologiestudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit Zellbiologie als Hauptfach und Mikrobiologie sowie Biochemie als Nebenfächer |
| 06/2006 – 04/2007 | Diplomarbeit mit dem Titel „Molekulare Analysen von putativen Lipocalinrezeptoren in <i>Oryza sativa</i> L. und <i>Arabidopsis thaliana</i> “ an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Abteilung für Entwicklungsbiologie und Physiologie der Pflanzen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Sauter |
| 07.06.2007 | Abschluss Diplom-Biologe |
| seit 05/2007 | Promotionsstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit Zellbiologie als Hauptfach |

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Physiologische Wirkungen von PSK- α und Analyse des PSK-Signalweges in *Arabidopsis thaliana*“ selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Teile der Arbeit sind in folgenden Publikationen enthalten:

Kutschmar A, Rzewuski G, Stührwohldt N, Beemster GT, Inzé D, Sauter M (2009) PSK-alpha promotes root growth in Arabidopsis. *New Phytol* 181: 820-831

Loivamäki M, Stührwohldt N, Deeken R, Steffens B, Roitsch T, Hedrich R, Sauter M (2010) A role for PSK signaling in wounding and microbial interactions in Arabidopsis. *Physiol Plant* 139:348-357

Kiel, den

Nils Stührwohldt