

**Der Peptidwachstumsfaktor Phytosulphokin- α
steuert Wurzelwachstum und reproduktive
Prozesse in *Arabidopsis thaliana***

Dissertation

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

vorgelegt von
Anke Kutschmar
aus Berlin

Kiel 2007

Referentin: Prof. Dr. M. Sauter

Korreferent: Prof. Dr. D. Ober

Tag der mündlichen Prüfung:

10. Dezember 2007

Zum Druck genehmigt:

10. Dezember 2007

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Hamburg, Oktober 2007

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Kutschmar', with a stylized flourish at the end.

Anke Kutschmar

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	VII
1.1. Zusammenfassung	1
1.2. Summary	3
2. Einleitung	5
2.1. Phytosulphokin- α	5
2.2. Polypeptide als Signale in Pflanzen	8
2.3. PSK- α Rezeptoren sind Rezeptorkinasen mit Leuzin-reichen Wiederholungselementen („leucine-rich repeats“, LRR)	10
2.4. Entstehung und Wachstum von Wurzeln	12
2.5. Lateralwurzeln entwickeln sich aus Perizykelzellen	14
2.6. Entwicklung der weiblichen und männlichen Gametophyten	16
2.7. Vom maternalen und paternalen Gewebe ausgesendete Signale lenken den Pollenschlauch zur Mikropyle und sind für die Befruchtung wichtig	17
2.8. Zielsetzung der Arbeit	19
3. Material und Methoden	21
3.1. Pflanzenmaterial	21
3.2. Bakterienstämme und Vektoren	21
3.3. Chemikalien, molekularbiologische „Kits“ und Enzyme	21
3.4. Pentapeptide	22
3.5. Oligonukleotide	22
3.6. Molekulare Größenstandards	23
3.7. Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
3.8. Wachstumsexperimente an <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
3.9. <i>In vitro</i> Pollenkeimung von <i>Arabidopsis thaliana</i> Pollen	24
3.10. Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen	25
3.11. Bestimmung der Anzahl nicht entwickelter Samen pro Schote	25
3.12. Fixierung und Klärung von Ovula aus <i>Arabidopsis thaliana</i> Blüten	25
3.13. Anzucht von <i>Zea mays</i>	25
3.14. Auswertung der Wachstumsexperimente an <i>Zea mays</i>	26
3.15. Isolierung von DNA	26
3.15.1. Isolierung von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
3.15.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	26

Inhalt	V
3.16. Quantifizierung von Nukleinsäuren	27
3.17. Restriktion von DNA	27
3.18. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	27
3.19. Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
3.20. Aufreinigung von DNA-Fragmenten	28
3.21. Konstrukte für die Promotor-GUS Studien	28
3.22. Sequenzierung	29
3.23. Transformationen	29
3.23.1. Hitzeschocktransformation von <i>Escherichia coli</i>	29
3.23.2. Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
3.23.3. Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
3.24. GUS-Färbung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
3.25. Herstellung von Kunststoffschnitten von Pflanzengewebe	31
3.26. Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
3.27. Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	32
3.28. Datenbankrecherchen, Sequenzanalysen und Computerprogramme	32
4. Ergebnisse	34
4.1. Die PSK-Präproteingene und das PSK-Rezeptorgen <i>AtPSKR1</i> von <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
4.1.1. Die PSK-Präproteingene	34
4.1.2. <i>At2g02220</i> kodiert für einen PSK-Rezeptor in <i>Arabidopsis</i>	35
4.1.3. Identifizierung der <i>AtPSKR1</i> T-DNA Insertionsmutante <i>Atpskr1-T</i>	36
4.2. Die PSK-Präproteingene und <i>AtPSKR1</i> werden gewebespezifisch in <i>Arabidopsis</i> exprimiert	37
4.2.1. Generierung von Promotor-GUS Linien	37
4.2.2. Die PSK-Präproteingene und das PSK-Rezeptorgen <i>AtPSKR1</i> werden spezifisch im Spross exprimiert	38
4.2.3. Expressionen der PSK-Präproteingene und des PSK-Rezeptorgens <i>AtPSKR1</i> in Wurzeln	42
4.2.4. Die PSK-Präproteingene und <i>AtPSKR1</i> sind unterschiedlich stark in vegetativen und reproduktiven Geweben exprimiert	46
4.3. Einfluss von PSK-α auf das Wachstum von <i>Arabidopsis</i> und Mais	48
4.3.1. PSK- α fördert das Wurzelwachstum von <i>Arabidopsis</i>	48
4.3.2. PSK- α hat keinen Einfluss auf das Sprosswachstum von <i>Zea mays</i> Keimlingen	49
4.3.3. <i>Atpskr1-T</i> besitzt ein verringertes Spross- und Wurzelwachstum	50
4.3.4. Die Hauptwurzeln von <i>Atpskr1-T</i> sind kürzer als im WT	52

4.4. PSK-α beeinflusst die Entwicklung von Blütenorganen und somit die Reproduktion in Arabidopsis	55
4.4.1. Der Aufbau von <i>Atpskr1-T</i> Blüten ist gegenüber dem Wildtyp unverändert	55
4.4.2. Die Samenbildung in <i>Atpskr1-T</i> ist reduziert	58
4.4.3. <i>Atpskr1-T</i> Blüten weisen Defekte im paternalen und im maternalen Gewebe auf	61
4.4.4. WT Pollen sind keimungsfähiger als <i>Atpskr1-T</i> Pollen	64
4.4.5. <i>Atpskr1-T</i> besitzt mehr Mikrosporen mit verändertem Phänotyp	66
4.4.6. Gynoeceen von <i>Atpskr1-T</i> und WT Pflanzen sind morphologisch vergleichbar	68
4.4.7. Die Embryonalentwicklung in <i>Atpskr1-T</i> Samen ist nicht gestört	70
4.4.8. Die PSK-Präproteingene und das PSK-Rezeptorgen sind sowohl in Stamina als auch in Samenanlagen aktiv	72
5. Diskussion	77
5.1. PSK-α fördert das Wurzelwachstum	77
5.2. PSK-α ist möglicherweise in redundante Signalwege während der Leitgewebedifferenzierung involviert	81
5.3. AtPSKR1 ist nicht der einzige PSK-Rezeptor in Arabidopsis	83
5.4. PSK-α fördert das Wachstum der Filamente und spielt eine Rolle bei der Pollenentwicklung	84
5.5. PSK-α kontrolliert die Befruchtung von maternaler und paternaler Seite	90
6. Literatur	97

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäuren
<i>Atpskr1-T</i>	PSK-Rezeptor T-DNA Insertionsmutante
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BASTA	Glufosinat Ammonium
bp	Basenpaar
CDK	Zyclin abhängige Kinase
cDNA	komplementäre DNA
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cv	Kulturvarietät
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dsPSK	unsulfatiertes PSK
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
GUS	β-Glucuronidase
JA	Jasmonsäure
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LRR	Leuzin-reiche Wiederholungselemente („leucin-rich repeats“)
LRR-RK	LRR-Rezeptorkinase
MeJA	Methyljasmonat
mRNA	Boten-RNA
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MS	Medium nach Murashige und Skoog (1962)
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
oligo dT	Oligo-Desoxythymidintriphosphat
<i>O. sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>
p	Plasmid
PCR	Polymerasekettenreaktion
p.a.	pro analysis
PSK	Phytosulphokin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
RT	Raumtemperatur
SP	Signalpeptid
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA

Ti	Tumor induziert
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	unit
UTR	Untranslatierter Bereich
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indodyl- β -D-Glucuronid

Maßeinheiten wurden nach dem SI-System (Cordes, 1972) verwendet:

g	Gramm	ml	Milliliter
mg	Milligramm	μ l	Mikroliter
μ g	Mikrogramm		
ng	Nanogramm	M	molar
		mM	Millimolar
d	Tag(e)	μ M	Mikromolar
h	Stunde(n)		
min	Minute(n)		
s	Sekunde(n)		

Aminosäuren

A	Alanin	L	Leuzin
R	Arginin	K	Lysin
N	Asparagin	M	Methionin
D	Asparaginsäure	F	Phenylalanin
C	Cystein	P	Prolin
E	Glutamat	S	Serin
Q	Glutaminsäure	T	Threonin
G	Glycin	W	Tryptophan
H	Histidin	Y	Tyrosin
I	Isoleuzin	V	Valin

Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymidin

1.1. Zusammenfassung

Phytosulphokin- α (PSK- α) ist ein bisulfatiertes Pentapeptid mit der Sequenz Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr-Gln, welches als autokriner Wachstumsfaktor die Proliferation von Zellen in Zellkulturen niedriger Dichte stimuliert. Trotz einer weiten Verbreitung von PSK-Präproteingenen in Höheren Pflanzen sind kaum Funktionen des Pentapeptids *in planta* bekannt. In dieser Arbeit wurden sowohl physiologische als auch genetische Ansätze verfolgt, um mögliche Funktionen von PSK- α in Arabidopsis aufzuklären.

Arabidopsis besitzt fünf PSK-Präproteingene. Charakteristisch für die Präproteingene sind ein N-terminales Signalpeptid und ein C-terminales Signaturmotiv aus hoch konservierten Aminosäuren einschließlich der PSK-Sequenz. Die Perzeption des Pentapeptids in Arabidopsis erfolgt durch eine membranständige Rezeptorkinase, AtPSKR1, mit Leuzin-reichen Wiederholungselementen. Promotor-GUS Analysen der PSK-Präproteingene und von *AtPSKR1* zeigten spezifische und überlappende Expressionen in vegetativen und reproduktiven Geweben. Die Expressionsmuster in Wurzeln und in Blüten von Arabidopsis deuteten auf mögliche Funktionen von PSK- α in diesen Geweben hin.

PSK- α förderte konzentrationsabhängig das Wurzelwachstum von Arabidopsispflanzen. Die Pflanzen wiesen ein verstärktes Haupt- und Lateralwurzelwachstum auf. Die Lateralwurzel-dichte war jedoch nach PSK- α Behandlung nicht verändert. Keimlinge der PSK-Rezeptor T-DNA Insertionsmutante *Atpskr1-T* besaßen verkürzte Hauptwurzeln, jedoch keine verkürzten Lateralwurzeln. Die Ergebnisse wiesen auf eine Funktion von PSK- α bei der Regulation des Wurzelwachstums hin. Darüber hinaus wiesen Promotor-GUS Expressionen der PSK-Präproteingene und von *AtPSKR1* auf eine mögliche Funktion des Pentapeptids im Zentralzylinder hin.

Die PSK-Rezeptormutante wies keine anatomischen Unterschiede hinsichtlich des Blütenaufbaus aus vier Wirteln auf. Charakteristisch für *Atpskr1-T* Pflanzen war aber eine verminderte Samenbildung im Vergleich zu Wildtyppflanzen. Reziproke Kreuzungen zeigten, dass der Mutantenphänotyp auf maternale und paternale Effekte sowie auf asynchrones Wachstum der männlichen und weiblichen Blütenorgane nach Anthese zurückzuführen war. In *Atpskr1-T* Blüten war die Entwicklung des männlichen Gametophyten, des Pollens, gestört. Pollen der *Atpskr1-T* Mutante wiesen eine verminderte *in vitro* Pollenkeimungsrate und eine erhöhte Anzahl degenerierter Pollen auf. Dieser paternale Effekt hatte insgesamt jedoch nur einen geringen Einfluss auf die Samenbildung in *Atpskr1-T* Pflanzen. Maternale Effekte hatten den größten Einfluss auf die Samenentwicklung in *Atpskr1-T* Pflanzen. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, welche Prozesse in *Atpskr1-T* Gynoeceen gestört sind, da anatomische Unterschiede im Bau von Gynoeceen sowie Defekte während der Embryonalentwicklung nicht

erkennbar waren. Möglicherweise sind Signalprozesse während der Pollenkeimung und des Pollenschlauchwachstums im weiblichen Blütengewebe betroffen.

In Arabidopsisblüten findet zwischen Anthese und Pollinierung ein verstärktes Wachstum der Filamente statt, um die Antheren für die Bestäubung auf Höhe des Stigmas zu bringen und so die Pollinierung zu erleichtern. In *Atpskr1-T* Blüten verhinderte asynchrones Wachstum der inneren Wirtel eine erfolgreiche Bestäubung. In *Atpskr1-T* Blüten sind bei Bestäubung die Antheren unterhalb des Stylus, wodurch eine Übertragung des Pollens auf das Stigma beeinträchtigt war. Der Phänotyp der *Atpskr1-T* Blüten zeigte eine Funktion von PSK- α bei der Regulation des Wachstums der Blütenorgane. Das Pentapeptid beeinflusst somit nicht nur das Wachstum von Wurzeln, sondern auch von Blütenorganen. In weiteren Untersuchungen muss geklärt werden, ob das Wachstum auf eine Funktion des Pentapeptids bei der Regulation von Zellteilung und/oder Zellstreckung zurückzuführen ist.

1.2. Summary

Phytosulphokine- α (PSK- α) is a disulfated pentapeptide of the sequence Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr-Gln that was shown to act as an autocrine growth factor in *in vitro* cultured cells kept at low density. The pentapeptide appears to be ubiquitous in higher plants. However, not much is known about the functions of PSK- α *in planta*. In this work physiological and genetic approaches were chosen for functional analysis of PSK- α in *Arabidopsis thaliana*.

PSK- α is encoded by five precursor genes in Arabidopsis. PSK preproprotein homologs exhibit an N-terminal secretory signal sequence and a C-terminal signature motif composed of conserved amino acids including the PSK sequence. In Arabidopsis PSK- α is perceived by a membrane spanning leucine-rich repeat receptor kinase termed AtPSKR1. Promoter-GUS analysis of PSK precursor genes and *AtPSKR1* showed distinct and overlapping expression patterns in vegetative and reproductive tissues pointing to activity of PSK- α in these tissues.

Exogenous application of PSK- α to Arabidopsis plants resulted in increased root mass in a dose-dependent manner. The pentapeptide promoted primary and lateral root growth. In contrast lateral root density was not changed. The PSK receptor knock out mutant *Atpskr1-T* exhibited reduced primary but not lateral root length. These results indicated a role of PSK signaling in root growth regulation. Additionally, promoter-GUS expression patterns of PSK precursor genes and *AtPSKR1* in roots revealed a possible function of PSK- α in vascularization.

The PSK receptor knock out mutant was not only impaired in root growth but also in reproductive success. *Atpskr1-T* plants exhibited reduced seed formation compared to wildtype plants. The *Atpskr1-T* phenotype was caused by maternal and paternal effects as well as asynchronous growth of male and female reproductive organs. Mutant analysis indicated disturbed PSK signaling during pollen development. *Atpskr1-T* plants showed more degenerated pollen and *in vitro* germination of *Atpskr1-T* pollen was significantly reduced compared to wildtype. However, this paternal effect had only a minor influence on seed formation. By contrast, maternal effects had a strong influence on seed formation in *Atpskr1-T* plants. *Atpskr1-T* pistils exhibited no morphological and anatomical differences. It therefore remains to be shown which processes are disturbed in female reproductive tissue. Disturbed signaling during pollen germination, pollen tube growth or pollen tube guidance could contribute to reduced seed formation in *Atpskr1-T* plants. Future research should clarify a possible role of PSK- α in these processes.

After anthesis, elongation of filaments, anther dehiscence and pollen release ensure pollination in Arabidopsis. During pollination, anthers reach the top of the stigma and pollen are transferred to stigmatic papilla cells. In *Atpskr1-T* plants pollination

was impaired by anthers which remained below the style at time of pollination due to uncoordinated elongation of male and female flower organs. The *Atpskr1-T* phenotype pointed to a function of PSK- α in growth regulation in reproductive organs. In conclusion, the pentapeptide is involved in growth regulation not only in roots but also in flowers. Further investigations have to be done to elucidate if PSK- α has a function in regulation of cell division or cell elongation or both.

2. Einleitung

2.1. Phytosulphokin- α

Die Proliferation von Pflanzenzellen in Zellkulturen ist stark von der anfänglichen Zelldichte abhängig (Matsubayashi *et al.*, 1996). Die mitogene Aktivität von Zellkulturen geringer Dichte wird durch konditioniertes Medium stimuliert, in dem Zellen zuvor gewachsen sind und ist nicht durch Zugabe von Pflanzenhormonen oder Nährstoffen zu erreichen (Matsubayashi *et al.*, 2006; Matsubayashi und Sakagami, 1996; Yang *et al.*, 2000). Die Stimulierung der Proliferation von Zellen niedriger Kulturdichte durch konditioniertes Medium ist auf ein chemisches Signal zurückzuführen, das von den Zellen selbst produziert und ins Medium sekretiert wird (Bellincampi und Morpurgo, 1987; Birnberg *et al.*, 1988).

Phytosulphokin- α (PSK- α), ein bisulfatiertes Pentapeptid mit der Sequenz Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr-Gln, wurde aus konditioniertem Medium von *Asparagus officinalis* Mesophyllzellen isoliert (Abbildung 1 A; Matsubayashi und Sakagami, 1996). Das Pentapeptid ist als primäres Signalmolekül an Signalprozessen von Zelle zu Zelle beteiligt (Matsubayashi *et al.*, 2006). PSK- α agiert als autokrines Signal in Zellkulturen und stimuliert die Proliferation von Zellen in Kulturen geringer Zelldichte (Matsubayashi und Sakagami, 1996). Das Pentapeptid ist wasserlöslich und in nanomolaren Konzentrationen wirksam (Matsubayashi *et al.*, 1997; 2002). PSK- α wurde aus konditioniertem Medium von Zellkulturen von Reis, Mais (Matsubayashi *et al.*, 1997), *Zinnia elegans* (Matsubayashi *et al.*, 1999) und *Daucus carota* (Hanai *et al.*, 2000) isoliert.

Neben dem bisulfatierten Pentapeptid wurde PSK- β , die C-terminal verkürzte Form von PSK- α , ein bisulfatiertes Tetrapeptid mit der Sequenz Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr, in konditioniertem Medium von *Asparagus officinalis* Mesophyllzellen nachgewiesen (Abbildung 1 A; Matsubayashi und Sakagami, 1996). PSK- β besitzt weniger als ein Zehntel der mitogenen Aktivität von PSK- α (Matsubayashi *et al.*, 1996). Vermutlich ist das bisulfatierte Tetrapeptid ein Abbauprodukt von PSK- α (Matsubayashi und Sakagami, 1996). Die Sulfatierung der beiden Tyrosine ist essentiell für die biologische Aktivität des Pentapeptids. Unsulfatiertes Pentapeptid besitzt <0,1% der Aktivität von PSK- α (Matsubayashi *et al.*, 1996). Das N-terminal, um das erste Tyrosin verkürzte monosulfatierte Tetrapeptid zeigt ebenfalls eine tausendfach reduzierte Aktivität gegenüber PSK- α (Matsubayashi *et al.*, 1996). So scheint das N-terminale bisulfatierte Tripeptid der aktive Kern von PSK- α zu sein (Yamakawa *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2000). Das Tripeptid besitzt ein Fünftel der mitogenen Aktivität von PSK- α (Matsubayashi *et al.*, 1996).

Neben seiner Funktion bei der Teilung von Zellen in Kulturen niedriger Dichte, ist das Pentapeptid in Differenzierungsprozesse involviert. Matsubayashi *et al.* (1999) zeigten, dass PSK- α eine Rolle bei der Differenzierung von *Zinnia elegans* Mesophyllzellen in Tracheenelemente spielt. In konzentrationsabhängiger Weise förderte das Pentapeptid die Bildung von Tracheen. Darüber hinaus ist PSK- α an Signalprozessen beteiligt, die zur Bildung somatischer Embryonen führen (Hanai *et al.*, 2000; Igasaki *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 1999). Chen *et al.* (2000) zeigten, dass das Pentapeptid in nanomolaren Konzentrationen die *in vitro* Keimung von *Nicotiana tabacum* Pollen in Kulturen geringer Dichte fördert. Exogenes PSK- α stimuliert die Pollenkeimung und trägt zum Pollenpopulationseffekt bei. Die *in vitro* Keimung von Pollen verschiedener Pflanzenspezies ist dichteabhängig (Pasonen und Käpylä, 1998). Brewbaker und Majumder (1961) bezeichneten dieses Phänomen als Pollenpopulationseffekt und machten Pollen-Pollen-Interaktionsprozesse dafür verantwortlich.

PSK- α spielt nicht nur bei Differenzierungsprozessen in Zellkulturen eine Rolle sondern auch in Pflanzengeweben. PSK- α unterstützt die Bildung von Adventivwurzeln von *Cucumis sativus* Hypokotylsegmenten (Yamakawa *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen gezeigt, dass PSK- α das Wurzelwachstum, aber nicht die Organogenese von Lateralwurzeln von Arabidopsis unterstützt. Exogenes PSK- α hatte keinen Einfluss auf die Lateralwurzeldichte von Arabidopsiskeimlingen.

Die Bildung von PSK- α erfolgt aus einem inaktiven, höher molekularen Präproprotein (PP-PSK) durch post-translationale Modifikation in sekretorischen Vesikeln und schrittweiser Prozessierung (Yang *et al.*, 2000). Die Struktur eines PP-PSK wurde zuerst von Reis von Yang *et al.* (1999) aufgeklärt und ist in Abbildung 1 B gezeigt. OsPSK hat eine Länge von 89 Aminosäuren und besitzt eine hydrophobe sekretorische N-terminale Signalpeptidsequenz und die hoch konservierte PSK-Sequenz nahe dem C-Terminus (Yang *et al.*, 1999). Lorbiecke und Sauter (2002) identifizierten PP-PSK kodierende Gene in verschiedenen Pflanzenarten. Die PSK-Präproteine besitzen geringe Homologien auf Aminosäuresequenzebene, 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 die PSK-Präproteine charakteristisch (Abbildung 1 B; Lorbiecke und Sauter, 2002). Die Autoren identifizierten weitere konservierte Aminosäuren in der Nähe der PSK-Sequenz der PP-PSK. Die Konsensussequenz $\mathbf{C}x_{(4-9)}[\mathbf{E/D/Q}]x\mathbf{C}x_{(2)}\mathbf{R}R\mathbf{x}_{(3-4)}\mathbf{A}H[\mathbf{T/L/V}]\mathbf{D}Y\mathbf{I}Y\mathbf{T}Q$ wurde als Signaturmotiv bezeichnet, wobei die dick gedruckten Buchstaben invariante Aminosäuren in der PSK-Präproproteinsequenz darstellen (Lorbiecke und Sauter, 2002).

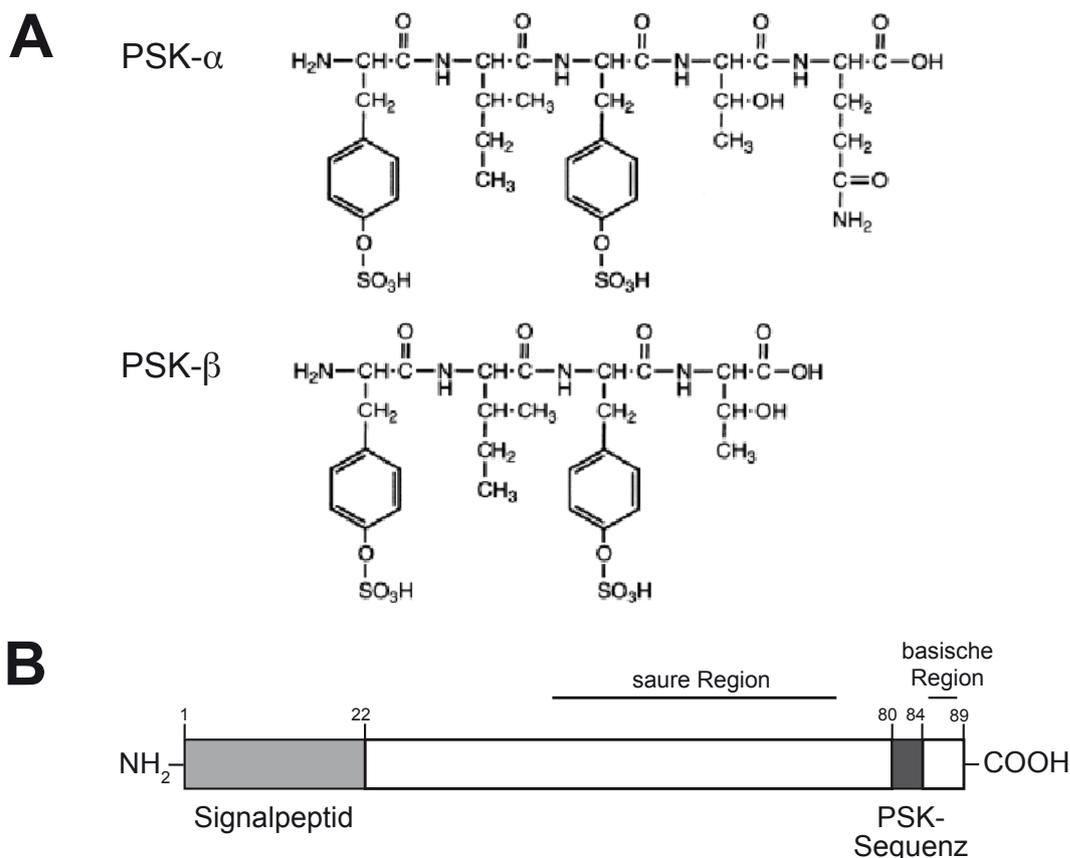


Abb. 1: Die Struktur von PSK- α , PSK- β und des PSK-Präproteins aus *Oryza sativa*. **A** Strukturformel des Pentapeptids PSK- α und des Tetrapeptids PSK- β . **B** Schematische Darstellung des PSK-Präproteins (PP-PSK) aus *Oryza sativa* nach Yang *et al.* (2000). Das PSK-Präproprotein aus Reis hat eine Länge von 89 Aminosäuren und besitzt eine hydrophobe N-terminale Signalpeptidsequenz (hellgrau) und die PSK-Sequenz (dunkelgrau) am C-terminalen Ende. In der Mitte von OsPSK befindet sich eine Region aus vermehrt sauren Aminosäuren („saure Region“, Lorbiecke und Sauter, 2002). Am C-Terminus des PP-PSK sind verstärkt basische Aminosäuren lokalisiert („baische Region“, Lorbiecke und Sauter, 2002).

Beide Tyrosine von PSK- α werden sulfatiert (Yang *et al.*, 1999). Matsubayashi und Sakagami (1996) zeigten, dass die O-Sulfatierung von Tyr¹ und Tyr² im Pentapeptid YIYTQ essentiell für die biologischen Aktivität von PSK- α ist. Durch die Sulfatierung wird das Pentapeptid stark hydrophil (Lorbiecke und Sauter, 2002). Die O-Sulfatierung von Tyrosinen ist eine weit verbreitete post-translationale Modifizierung von Proteinen in tierischen Eukaryonten (Huttner, 1982). Viele sekretierte Proteine und Membranproteine aus Säugetieren sind an Tyrosinresten sulfatiert (Yang *et al.*, 2000). Die O-Sulfatierung von Tyrosinen ist nicht nur wichtig für die biologische Aktivität von Proteinen (Jensen *et al.*, 1981) sondern auch für die proteolytische Prozessierung von biologisch aktiven Peptiden (Bundgaard *et al.*, 1995), den intrazellulären Transport von sekretorischen Proteinen (Hille *et al.*, 1984), die Halbwertszeit von Proteinen (Pauwels *et al.*, 1987). Die O-Sulfatierung von Tyrosinen spielt eine Rolle bei extrazellulären Protein-Protein

Interaktionen (Kehoe und Bertozzi, 2000).

Die Sulfatierung von Tyrosinen wird in Zellen von Säugetieren von Tyrosylprotein Sulfotransferasen (TPST) katalysiert (Lee und Huttner, 1983), welche im trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert sind (Baeuerle und Huttner, 1987). Hanai *et al.* (2000) wiesen *in vitro* mit synthetischem PP-PSK die katalytische Aktivität von pflanzlichen TPST in Zellkulturen verschiedener Pflanzenarten nach. Diese TPST Aktivität war überwiegend im Golgi-Apparat von *Asparagus officinalis* Mesophyllzellen lokalisiert. In Arabidopsis wurden 18 Sulfotransferasengene identifiziert (Klein und Papenbrock, 2004). Bisher ist noch unbekannt, durch welche Sulfotransferase PP-PSK sulfatiert wird und wie die Prozessierung von PSK- α erfolgt. PP-PSK weist Erkennungssequenzen für Endoproteasen auf, die Ähnlichkeiten mit denen in tierischen Organismen haben (Yang *et al.*, 1999). Vermutlich sind homologe endoproteolytische Enzyme in Pflanzen an der Prozessierung von PSK- α beteiligt (Yang *et al.*, 1999; 2000). Das sekretorische N-terminale Signalpeptid von PP-PSK, die O-Sulfatierung beider Tyrosine und letztlich das Vorkommen von PSK- α im Medium von Suspensionszellkulturen (Matsubayashi und Sakagami, 1996) weisen auf eine Sekretion des Pentapeptids in den Apoplasten hin. Das sekretierte, bisulphatierte und damit biologisch aktive Pentapeptid ist durch seine geringe Größe, die hohe Wasserlöslichkeit und mögliche längere Halbwertszeit im Gegensatz zum unsulphatierten Pentapeptid prädestiniert für extrazelluläre Signalprozesse.

2.2. Polypeptide als Signale in Pflanzen

Die CLAVATA-Gene regulieren das Gleichgewicht zwischen dem Erhalt und der Differenzierung von Stammzellen in Spross- und Blütenmeristemen von Arabidopsis. *CLAVATA3* (*CLV3*) kodiert für ein kleines Protein aus 96 Aminosäuren mit einem N-terminalen sekretorisches Signalpeptid (Torii, 2004). Das funktionale Peptid hat eine Länge von 78 Aminosäuren und eine Größe von 6 kDa und liegt extrazellulär vor (Fletcher *et al.*, 1999). *CLV3* wird von den Stammzellen an der Spitze der Meristeme sekretiert (Fletcher *et al.*, 1999). Das Peptid fungiert als Ligand des heterodimeren Rezeptorkomplex aus der Rezeptorkinase *CLAVATA1* (*CLV1*, Clark *et al.*, 1993) mit Leuzin-reichen Wiederholungselementen (LRR) und dem LRR-Rezeptorprotein *CLAVATA2* (*CLV2*, Jeong *et al.*, 1999; Torii, 2004). Die *CLAVATA*-Signalkette reprimiert über nachgeschaltete Gene die Expression des Homöodomänen-Transkriptionsfaktors *WUSCHEL* (*WUS*, Laux *et al.*, 1996), der die Proliferation und Differenzierung der Stammzellen unterstützt. Über einen rückgekoppelten Signalweg induziert *WUS* wiederum die Bildung von *CLV3*, wodurch das Stammzellschicksal in Spross- und Blütenmeristemen im Gleichgewicht gehalten wird (Brand *et al.*, 2000). *CLV3* agiert als

parakrines Signalmolekül (Torii, 2004), dessen Aktivität in einer Zellschicht ausreicht, um die Proliferation und Differenzierung der Zellen im gesamten Meristem zu kontrollieren (Fletcher *et al.*, 1999). CLV3 gehört zur CLE-Familie, welche nach CLV3 aus Arabidopsis und drei „Endosperm-surrounding region“ Proteinen (ESR) aus Mais benannt wurde (Cock und McCormick, 2001). CLE-Polypeptide sind kleine Proteine (<15 kDa) mit einem N-terminalen sekretorischen Signalpeptid und einem hoch konservierten 14 Aminosäuren langen CLE-Motiv am C-Terminus (Fiers *et al.*, 2007). In Arabidopsis wurden bisher 31 CLE-Gene identifiziert, unter denen einige Vertreter verschiedene Rollen bei der Differenzierung und der Proliferation von Zellen spielen (Fiers *et al.*, 2007).

In Solanaceae Arten wurde eine Familie von Peptiden identifiziert, die an intrazellulären Signalprozessen bei einer systemischen Wundantwort beteiligt sind (Ryan und Pearce, 2003). Systemin, das erste in Pflanzen entdeckte Signalpeptid, induziert die Synthese von Proteinaseinhibitoren in jungen Blättern von Tomate (Pearce *et al.*, 1991). In den Signalweg sind unter anderem der Systemin-Rezeptor SR160, eine Mitose-aktivierte Proteinkinase (MAPK) und das Phytohormon Jasmonsäure involviert (Stratmann *et al.*, 2000; Ryan und Pearce, 2003). Das Peptid hat eine Länge von 18 Aminosäuren und wird ähnlich wie PSK- α , aus einem höhermolekularen Präproprotein gebildet. Das 200 Aminosäuren lange Prosystemin weist repetitive Sequenzen und die eigentliche Systemin-Sequenz nahe dem C-Terminus auf, hat jedoch kein N-terminales Signalpeptid (McGurl *et al.*, 1992). Dies ließ vermuten, dass das Peptid nicht über den sekretorischen Weg synthetisiert und prozessiert wird (McGurl *et al.*, 1992). Prosystemin ist in Parenchymzellen des Leitgewebes lokalisiert (Ryan und Pearce, 2003). In Tabak und Tomate wurden Systemin ähnliche, 15 bis 20 Aminosäuren lange glykosylierte Signalpeptide „Tobacco hydroxyproline-rich systemin“ (TobHypSys) I und II sowie „Tomato hydroxyproline-rich systemin“ (TomHypSys) II und III identifiziert, die Hydroxyprolin-reich sind (Ryan und Pearce, 2003). Diese HypSys werden ebenfalls aus Präproproteinen gebildet, die jedoch im Gegensatz zu Prosystemin, eine Signalsequenz am N-Terminus sowie eine N- und C-terminale Systemin-Sequenz aufweisen (Ryan und Pearce, 2003). Die TobHypSys Peptide helfen bei der Bildung von Jasmonsäure, welche bei Wundantwort als systemisches Signal bis in die Wurzeln von Pflanzen transportiert wird (Ryan und Pearce, 2003).

2.3. PSK- α Rezeptoren sind Rezeptorkinasen mit Leuzin-reichen Wiederholungselementen („leucine-rich repeats“, LRR)

Die entscheidende Rolle von Rezeptorkinasen ist die Erkennung von Liganden, die zur Aktivierung der Kinase und zur Transduktion von Signalen über nachgeschaltete Signalwege führt (Torii, 2004). Rezeptorkinasen mit Leuzin-reichen Wiederholungselementen (LRR-RK) stellen mit über 200 Mitgliedern die größte Gruppe von transmembranen rezeptorähnlichen Kinasen in Arabidopsis dar (Torii, 2004). LRR-Rezeptorkinasen regulieren eine Vielzahl von entwicklungsabhängigen und mit Pathogenabwehr in Verbindung stehenden Prozessen in Pflanzen (Torii, 2004). Die LRR-RK BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1) perzipiert Brassinosteroide (Abbildung 2; Li und Chory, 1997), die Wachstumsprozesse in Pflanzen regulieren (Torii, 2004). Die LRR-RK CLAVATA1 ist in die Kontrolle der Homöostase von Stammzellen im Sprossmeristem involviert (Abbildung 2; Clark *et al.*, 1997). Die Perzeption des bakteriellen Peptids Flagellin erfolgt durch die LRR-RK FLAGELLIN INSENSITIVE 2 (FLS2; Abbildung 2; Gómez-Gómez und Boller, 2000), wodurch eine nicht wirtsspezifische Pathogenantwort ausgelöst wird (Thordal-Christensen, 2003). Das Peptid Systemin bindet an die LRR-RK SYSTEMIN CELL-SURFACE RECEPTOR 160 (SR160) aus *Lycopersicon peruvianum*. SR160 weist eine starke Homologie zu BRI1 aus Arabidopsis auf (Scheer und Ryan, 2002). Systemin wird ebenfalls durch BRI1 aus Tomate (tBRI1) perzipiert (Scheer und Ryan, 2002; Montoya *et al.*, 2002).

LRR-RK besitzen ein N-terminales Signalpeptid, einen extrazellulären LRR-Bereich, eine einfache Transmembrandomäne und eine Kinasedomäne, welche häufig Substratspezifität für Serin/Threonin aufweist (Shiu und Bleecker, 2001). Die extrazelluläre LRR-Domäne besteht aus 1 und bis zu 32 LR-Elementen, welche tandemartig angeordnet sind (Torii, 2004). Das in Pflanzen vorkommende extrazelluläre LRR-Motif L--L--L--L--N-L-G-IP-- besitzt konservierte und nicht konservierte Aminosäuren, welche durch einen Buchstaben beziehungsweise durch einen Balken angegeben wurden (Jones und Jones, 1997). Die meisten LRR-RK in Pflanzen sind intronlos (Torii, 2004). An LRR binden Peptide (Kobe und Deisenhofer, 1994), Elizitoren (Yamaguchi *et al.*, 2006) und Signalmoleküle die Entwicklungsprozesse induzierende (Torii *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 1997). LRR-Motive bilden ein vielseitiges Gerüst für Protein-Protein Interaktionen (Kobe und Kajava, 2001). Einige LRR sind durch eine „Insel“ unterbrochen (Shiu und Bleecker, 2001). Die Inseldomäne von BRI1 trennt die LR-Elemente in einen N-terminalen und einen juxtamembranen Bereich und ist für die Ligandenbindung wichtig (Kinoshita *et al.*, 2005; Torii, 2004). Die duale Perzeption von BR und Systemin durch tBRI1 ist durch eine Bindung von BR an das Motiv aus vier LR-Elementen nahe der Transmembrandomäne und der Bindung von Systemin an die N-terminale LRR-Region möglich (Torii, 2004). Die LR-Elemente sind von gepaarten Cysteinen flankiert,

die durch sechs Aminosäuren voneinander (CX₆C) getrennt sind (Torii, 2004). Einige LRR-RK agieren als Dimere. Die gepaarten Cysteine sind an der Heterodimerisierung von CLV1 und dem LRR-Rezeptorprotein CLV2 beteiligt (Trotochaud *et al.*, 1999).

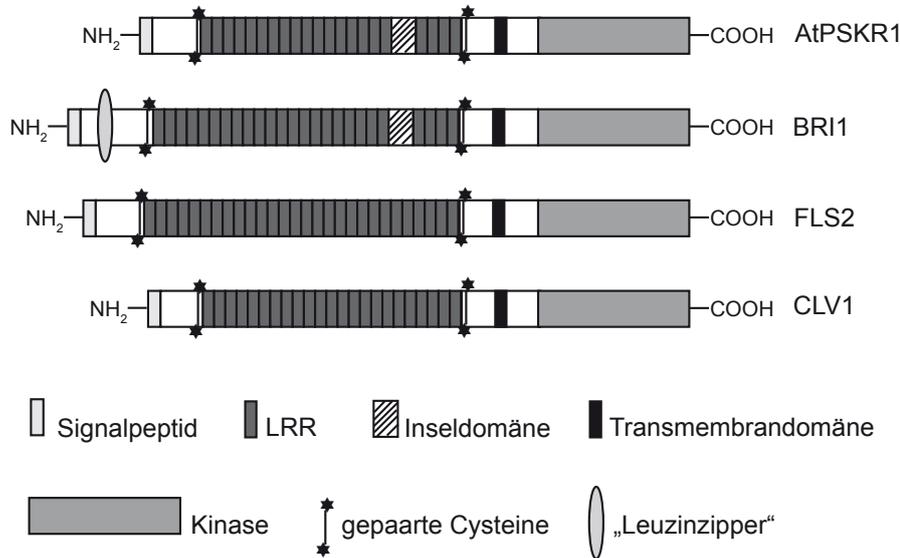


Abb. 2: Rezeptorkinasen mit Leuzin-reichen Wiederholungselementen (LRR-RK) aus Arabidopsis. Die Rezeptoren für PSK- α (AtPSKR1), Brassinosteroide (BRI1), Flagellin (FLS2) und CLAVATA3 (CLV1) sind LRR-RK. Diese besitzen ein N-terminales Signalpeptid, einen extrazellulären Bereich mit Tandemkopien von LR-Elementen unterschiedlicher Anzahl, welche von gepaarten Cysteinen flankiert sind, eine Transmembrandomäne und eine katalytische Kinasedomäne im zytoplasmatischen Bereich. Die 21 LRR von AtPSKR1 sind zwischen dem 17. und 18. LRR von einer Insel domäne unterbrochen. Die BRI1 Aminosäuresequenz besitzt nahe dem N-Terminus einen amphipatischen „Leuzinzipper“ und eine Insel domäne zwischen dem 21. und 22. LRR der insgesamt 25 LRR-Kopien. FLS2 und CLV1 weisen 28 beziehungsweise 23 zusammenhängende LRR-Tandemkopien auf.

Hoch und schwach affine PSK-Bindeproteine von [³⁵S]PSK- α und [³H]PSK- α wurden in der Plasmamembran und in subzellulären Fraktionen von Reis nachgewiesen (Matsubayashi *et al.*, 1997; 1999). Matsubayashi und Sakagami (2000) identifizierten in Plasmamembranen von Reis 120 kDa und 160 kDa Glykoproteine mit einer hohen Affinität für [³H]PSK- α . Eine 120 kDa membranständige LRR Rezeptorkinase ist spezifisch in die Perzeption von PSK- α in *Daucus carota* (DcPSKR1) involviert (Matsubayashi *et al.*, 2002). Neben dem 120 kDa PSK-Rezeptorprotein wurde ein schwächer gebildetes 150 kDa PSK-Bindeprotein in *Daucus carota* entdeckt (Matsubayashi *et al.*, 2002). Beide Proteine wiesen das gleiche Peptidrückgrat auf und unterscheiden sich wahrscheinlich in ihrer Glykosylierung (Matsubayashi *et al.*, 2002). Matsubayashi *et al.* (2006) identifizierten At2g02220 als ein PSK-Rezeptorgen in Arabidopsis. Das Protein AtPSKR1 bindet [³H]PSK- α spezifisch. At2g02220 kodiert für eine LRR-Rezeptorkinase von 1008 Aminosäuren, welche homolog zu DcPSKR1 ist. AtPSKR1 besitzt ein N-terminales Signalpeptid, einen extrazellulären Bereich mit 21 Tandemkopien von LR-Elementen (Abbildung 2; Matsubayashi *et al.*, 2006). Zwischen dem 17. und 18. LRR ist

eine 36 Aminosäuren umfassende Inseleldomäne lokalisiert (Abbildung 2; Matsubayashi *et al.*, 2006). Die Aminosäuresequenzen der Inseleldomäne von AtPSKR1 und DcPSKR1 sind stark konserviert (Matsubayashi *et al.*, 2006). Die LRR sind von gepaarten Cysteinen flankiert, was auf eine mögliche Dimerisierung von AtPSKR1 hindeutet. AtPSKR1 besitzt des Weiteren eine Transmembrandomäne und einen zytoplasmatischen Bereich, mit einer Serin/Threonin Kinase (Abbildung 2; Matsubayashi *et al.*, 2006). PSK- α bindet in Membranfraktionen aus Arabidopsis, ähnlich wie aus Reis und *Daucus carota*, an zwei Glykoproteine unterschiedlicher Größe (Matsubayashi *et al.*, 2006). Das Protein beider Glykoproteine wird durch *At2g02220* kodiert. Die beiden Bindeproteine entstehen vermutlich durch unterschiedliche post-translationale Modifikation (Matsubayashi *et al.*, 2006).

2.4. Entstehung und Wachstum von Wurzeln

Die postembryonale Architektur von höheren Pflanzen entsteht aus zwei Meristemen, dem Spross- und dem Wurzelapikalmeristem, die während der Embryogenese im Embryo gebildet werden (Dolan *et al.*, 1993). Das primäre Spross- und Wurzelapikalmeristem bringt die Zellen hervor, die sich teilen, um Spross beziehungsweise Wurzeln zu bilden (Beeckman *et al.*, 2001). Die Meristeme bilden während der postembryonalen Entwicklung die Wachstumspole der Pflanzen (Montiel *et al.*, 2004). Das primäre Wurzelapikalmeristem von Arabidopsis wird aus basalen und apikalen Zellreihen des sich entwickelnden Embryos gebildet (Montiel *et al.*, 2004). Nach der Keimung des Samens teilen sich die Initialzellen, welche das Meristem bilden, wodurch neue Zellen zu den existierenden Zellreihen hinzu kommen. Die meristematischen Zellen sind befähigt sich zu teilen und durchlaufen, gesteuert durch Cyclin-abhängige Kinasen, die aufeinander folgenden Phasen des Zellzyklus (S, G₂, M und G₁, Mironov *et al.*, 1999). Die Tochterzellen erreichen die Zellstreckungszone, in der kaum noch Teilung sondern vor allem Zellexpansion stattfindet. Der Längenzuwachs von Wurzeln beruht hauptsächlich auf Zellverlängerung im Bereich der Streckungszone der Wurzelspitze. In der Reifungszone differenzieren die Zellen aus (Montiel *et al.*, 2004). Die in dieser Zone erkennbaren Wurzelhaare sind ein Indikator für Zelldifferenzierung (Dolan *et al.*, 1993).

Das primäre Wurzelapikalmeristem besteht aus dem ruhenden Zentrum, undifferenzierten, teilungsaktiven Initialzellen der Wurzelhaube, Epidermis, Kortex, Endodermis, Perizykel und Zentralzylinder, welche in konzentrischen Ringen mit einer definierten Anzahl von Zellen angeordnet sind (Abbildung 3; Montiel *et al.*, 2004; Dolan *et al.*, 1993). Das ruhende Zentrum besteht aus vier mitotisch inaktiven Zellen (Wang *et al.*, 2005), welche von der Hypophysis des Embryos abstammen, ebenso wie die

Columellainitialen (Dolan *et al.*, 1993). Das ruhende Zentrum inhibiert die Differenzierung der umliegenden Initialen und hält die Stammzellen durch nicht-zellautonome Signale in einem undifferenzierten Zustand (van den Berg *et al.*, 1997). In *Oryza sativa* Wurzelmeristemen kann der QUIESCENT CENTER-SPECIFIC HOMEBOX (QHB) Transkriptionsfaktor an der Stammzellhomöostase im Wurzelmeristem beteiligt sein (Kamiya *et al.*, 2003). In *Arabidopsis* ist der WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5 (WOX5) Transkriptionsfaktor an diesen Signalprozessen beteiligt (Sarkar *et al.*, 2007).

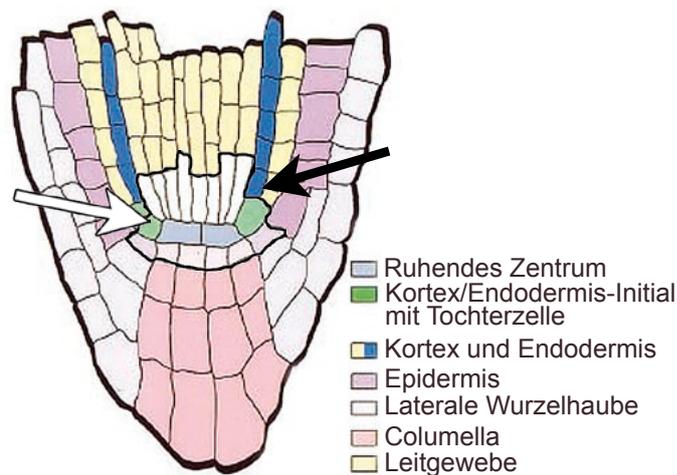


Abb. 3: Mittiger longitudinaler Schnitt durch eine *Arabidopsis thaliana* Wurzelspitze nach van den Berg *et al.* (1997). Die verschiedenen Zelltypen sind in der Legende angegeben. Das „Kernmeristem“ aus dem ruhenden Zentrum (hellblau) und den angrenzenden Initialzellen wurde umrandet. Aus den Stammzellen oberhalb (hellgelb) sowie unterhalb (hellrosa) des ruhenden Zentrums entstehen Leitgewebe beziehungsweise Columella. Epidermis und laterale Wurzelhaube gehen ebenso wie Kortex und Endodermis aus der gleichen Initialen hervor. Teilung der Kortex/Endodermis-Initialen und Entstehung einer Tochterzelle (weißer Pfeil). Die Tochterzelle teilt sich periklinal woraus Kortex und Endodermis entstehen (schwarzer Pfeil).

Aus den Stammzellen oberhalb und unterhalb des ruhenden Zentrums gehen Zentralzylinder und Perizykel beziehungsweise Columellazellen hervor (Abbildung 3; Montiel *et al.*, 2004). Kortex und Endodermis entstehen aus den gleichen Initialen, ebenso wie Epidermis und laterale Wurzelhaube (Abbildung 3; Montiel *et al.*, 2004). Bei der Teilung der Initialen entstehen eine neue Initialzelle und eine Tochterzelle. Die Tochterzellen teilen sich wiederum gewisse Male und differenzieren anschließend (Scheres *et al.*, 1994). Die Tochterzellen besitzen keinen Kontakt mehr zum ruhenden Zentrum und können von diesem ausgesendete inhibitorische Signale nicht mehr empfangen (van den Berg *et al.*, 1997). Kommunikationssignale der reifen Tochterzellen führen zur weiteren Differenzierung der unreifen Tochterzellen in den korrespondierenden Zelltyp (van den Berg *et al.*, 1997). An frühen Differenzierungsprozessen der Tochterzellen sind möglicherweise dem Polypeptid CLAVATA3 ähnliche CLE-Proteine beteiligt (Stahl und Simon, 2005).

2.5. Lateralwurzeln entwickeln sich aus Perizykelzellen

Lateralwurzeln gehen im Gegensatz zur Primärwurzel aus postembryonal gebildeten Meristemen hervor (Montiel *et al.*, 2004). Deren Bildung erfolgt *de novo* aus Perizykelzellen in der Elternwurzel (Beeckman *et al.*, 2001). Nur eine limitierte Anzahl von Perizykelzellen werden zu so genannten Gründerzellen, aus denen Seitenwurzeln entstehen (De Smet *et al.*, 2006). Die Initiation von Lateralwurzeln erfolgt in Arabidopsis aus Perizykelzellen an den Xylempolen. In *Daucus carota* erfolgt die Bildung hingegen an den Phloempolen (De Smet *et al.*, 2006). Die Hypothese, wonach Perizykelzellen erst dedifferenzieren müssen und anschließend wieder in den Zellzyklus eintreten, scheint eher für Lateralwurzeln zu gelten, die in der reifen Wurzel gebildet werden (Casimiro *et al.*, 2003). Regulär entstehen Lateralwurzeln in Arabidopsis im jungen apikalen Wurzelgewebe in einer Zone, die räumlich mit der Differenzierung des Leitgewebes zusammen fällt (Casimiro *et al.*, 2001; Dubrovsky *et al.*, 2000). In Arabidopsis besitzen Perizykelzellen an den Xylempolen die Fähigkeit zur Zellteilung. In den Zellen konnte die Expression einer Cyclin-abhängigen Kinase, *CDKA;1* und des Cyclins, *CycA2;1*, nachgewiesen werden (Beeckman *et al.*, 2001). Die Perizykelzellen verlassen damit den Zellzyklus nicht komplett, wie andere Zellschichten der Wurzel, sondern verbleiben in der G₂-Phase des Zellzyklus (Beeckman *et al.*, 2001). Die Initiation von Lateralwurzeln erfordert den Wiedereintritt der Gründerzellen in den Zellzyklus, wobei das Phytohormon Auxin eine dominante Rolle spielt (De Smet *et al.*, 2006). Signale, die zur Determinierung der Perizykelzellen in Gründerzellen beitragen, sind noch nicht bekannt (De Smet *et al.*, 2006).

Lateralwurzeln in Arabidopsis werden in zwei Gründerzellen in der gleichen Zellreihe des Perizykels an den Xylempolen initiiert (Casimiro *et al.*, 2003; De Smet *et al.*, 2006). Nach dem Modell von Casimiro *et al.* (2003) teilen sich beide Zellen asymmetrisch transversal, wodurch zwei kurze Zellen entstehen, die von zwei längeren Zellen flankiert werden (Abbildung 4 I). Die angrenzenden Zellen in den Perizykelreihen werden ebenfalls aktiviert und teilen sich gleichermaßen. An der Bildung des Lateralwurzelprimordiums sind mindestens drei Perizykelzellreihen und sechs Gründerzellen beteiligt. Die Tochterzellen teilen sich symmetrisch und asymmetrisch von der Mitte auf- und abwärts, wodurch maximal zehn kurze Zellen von gleicher Länge entstehen. Nach einer radialen Ausdehnung der Zellen teilen sich die mittleren kürzeren Zellen periklinal, wodurch ein Lateralwurzelprimordium aus inneren und äußeren Zellschichten entsteht (Abbildung 4 II). Weitere Teilungen der Zellen (Abbildung 4 III - VII) und Zellstreckung führen letztlich zum Hervortreten des Lateralwurzelprimordiums (Abbildung 4 VIII). Kurz nach dem Durchbruch der LR durch die Epidermis steigt die Zellzahl im Apex der Lateralwurzeln an.

Neben einer dominanten Rolle von Auxin beeinflussen weitere Phytohormone, wie Cytokinin und Abscisinsäure (ABA) sowie Nährstoffe, wie Nitrat, Phosphat und Zucker die Bildung von Lateralwurzeln. Erhöhte Cytokininkonzentrationen führen zu einem inhibierten Wurzelwachstum (Werner *et al.*, 2003). Mutanten mit geringem Cytokiningehalt, die Cytokinin Oxidase/Dehydrogenasegene überexprimieren, weisen ein vergrößertes Wurzelmeristem, die Bildung von Lateralwurzeln näher zum Wurzelmeristem und eine erhöhte Verzweigung der Wurzeln auf (Schmülling, 2002; Werner *et al.*, 2003).

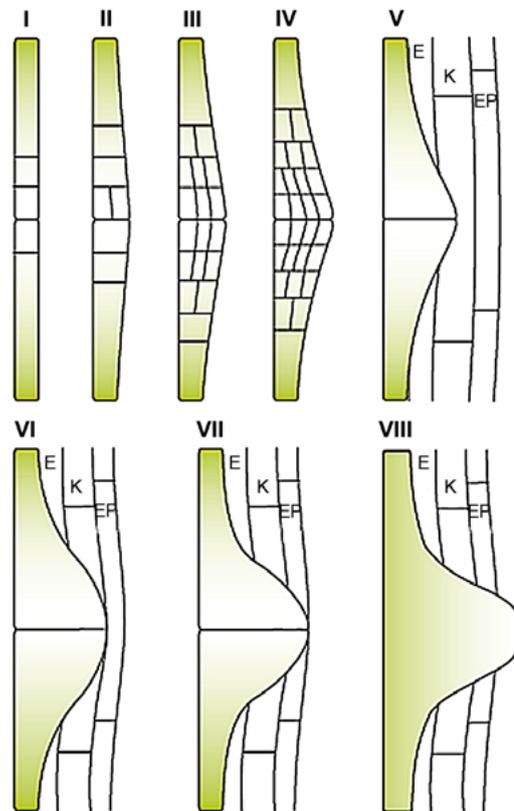


Abb. 4: Entwicklungsstadien der Lateralwurzelsbildung von Arabidopsis nach Casimiro *et al.* (2003). I Die Bildung eines Lateralwurzelsprimordiums erfolgt durch die transversal asymmetrische Teilung zweier in einer Reihe im Perizykel angrenzender Gründerzellen. Die Tochterzellen teilen sich asymmetrisch und symmetrisch. II Die mittleren kürzeren Zellen teilen sich periklinal, wodurch eine innere und eine äußere Zellschicht entsteht. III Die Zellen der äußere Zellschicht teilen sich periklinal, was zur Entstehung eines Lateralwurzelsprimordiums aus drei Zellschichten führt. IV Die Bildung der vierten Zellschicht erfolgt durch periklinale Teilungen der Zellen der inneren Zellschicht. Im V Entwicklungsstadium erreicht das Lateralwurzelsprimordium den Kortex und wächst in den folgenden Stadien VI - VIII durch die Epidermis aus der elterlichen Wurzel hinaus. E: Endodermis, K: Kortex und EP: Epidermis

Die Aktivierung der Lateralwurzelsmeristeme findet nach dem Durchbrechen des Lateralwurzelsprimordiums durch die elterlichen Wurzel statt (De Smet *et al.*, 2003). ABA verhindert das Auswachsen des Lateralwurzelsprimordiums durch eine Reduzierung der mitotischen Aktivität der meristematischen Zellen (De Smet *et al.*, 2003). Erhöhte

Nitratkonzentrationen inhibieren das Lateralwurzelswachstum in Arabidopsis (Zhang und Forde, 1998). Das Primärwurzelswachstum sowie die Lateralwurzeldichte sind jedoch nicht verändert (Zhang und Forde, 1998). Linkohr *et al.* (2002) zeigten, dass hohe Nitratkonzentrationen das Primärwurzelswachstum inhibieren, indessen stimulieren hohe Phosphatkonzentrationen das Wachstum von Hauptwurzeln. Hohe Phosphatkonzentrationen inhibieren das Lateralwurzelswachstum und führen zu einer geringeren Ausbildung von Lateralwurzeln (Williamson *et al.*, 2001).

2.6. Entwicklung der weiblichen und männlichen Gametophyten

Der Lebenszyklus von Pflanzen wechselt zwischen zwei Generationen, dem diploiden Sporophyten und dem haploiden Gametophyten. Der Sporophyt bringt sexuell differenzierte Sporen durch Meiosen hervor (Reiser und Fischer, 1993). Diese Sporen teilen sich mitotisch und entwickeln sich zu Gametophyten, welche Gameten bilden. Aus der Fusion der weiblichen und männlichen Gameten geht die nächste sporophytische Generation hervor (Huck *et al.*, 2003). Der männliche Gametophyt, der Pollen, wird in den Mikrosporangien der Antheren der Stamina gebildet (Abbildung 5 A, B).

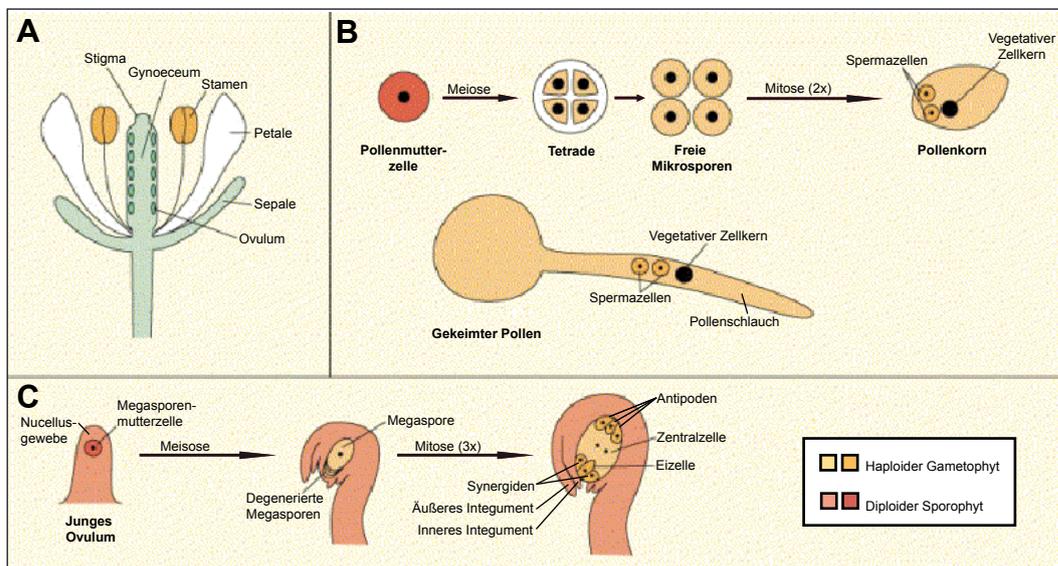


Abb. 5: Entwicklung des männlichen und weiblichen Gametophyten in Arabidopsis nach Goodrich, 1998. **A** Schematische Darstellung einer Arabidopsisblüte mit weiblichem (Gynoceum) und männlichen (Stamen) Reproduktionsorganen. **B** Entstehung des männlichen Gametophyten aus der Pollenmutterzelle. Durch Meiosen entstehen aus der Pollenmutterzelle vier haploide Mikrosporen, die Tetraden, die von einer Kallosewand umgeben sind. Aus einer Mikrospore gehen eine vegetative und eine generative Zelle hervor. Die mitotische Teilung der generativen Zelle erfolgt im keimendem Pollen mit auswachsendem Pollenschlauch, wodurch zwei Spermazellen entstehen (McCormick, 1993). **C** Der Embryosack entwickelt sich im Ovulum aus der Megasporenmutterzelle. Aus dieser gehen durch Meiosen vier haploide Megasporen hervor, wovon drei degenerieren. Nach mitotischen Teilungen enthält der weibliche Gametophyt sieben Zellen und acht Zellkerne.

Während des 9. Blütenentwicklungsstadiums (Smyth *et al.*, 1990) respektive im 5. Antherenentwicklungsstadium (Sanders *et al.*, 1999) entwickeln sich im Pollensack Sporen zu Pollenmutterzellen (Scott *et al.*, 2004). Durch Meiosen entstehen aus der Pollenmutterzelle vier haploide Mikrosporen, die von einer Kallosewand umgeben sind (Abbildung 5 B). Durch asymmetrische mitotische Teilung der einkernigen Mikrosporen entstehen eine vegetative und eine generative Zelle. In Arabidopsis erfolgt die zweite mitotische Teilung der generativen Zelle im keimendem Pollen mit auswachsendem Pollenschlauch, wodurch zwei Spermazellen entstehen (Abbildung 5 B; McCormick, 1993).

Der weibliche Gametophyt, der Embryosack, wird in Ovulen gebildet, die von der Plazenta der Ovarienwand abstammen (Abbildung 5 A; Reiser und Fischer, 1993). In Arabidopsis beginnt die Megasporogenese im 11. Blütenentwicklungsstadium (Abbildung 5 C; Robinson-Beers *et al.*, 1992; Smyth *et al.*, 1990). Aus der Megasporenmutterzelle, eingebettet im Nucellusgewebe des Ovulums, gehen durch Meiosen vier haploide Megasporen hervor, von denen drei degenerieren (Reiser und Fischer, 1993). Die Megagametogenese setzt im frühen 12. Blütenentwicklungsstadium ein (Robinson-Beers *et al.*, 1992; Smyth *et al.*, 1990). Aus der Megaspore entsteht nach drei mitotischen Teilungen, Kernwanderungen und Zytokinese der Embryosack (Reiser und Fischer, 1993). Dieser besteht in Arabidopsis aus einer Eizelle, flankiert von zwei Synergiden am mikropylaren Ende, drei Antipodenzellen am chalazalen Ende und einer Zentralzelle mit zwei polaren Zellkernen (Abbildung 5 C; Abbildung 6 A; Grossniklaus und Schneitz, 1998).

2.7. Vom maternalen und paternalen Gewebe ausgesendete Signale lenken den Pollenschlauch zur Mikropyle und sind für die Befruchtung wichtig

Durch Bestäubung gelangt der Pollen auf das Stigma des Gynoeceums, hydriert, keimt und bildet einen Pollenschlauch aus, in dem zwei Gameten in Richtung des Embryosacks transportiert werden (Abbildung 6 B; Huck *et al.*, 2003). Der Pollenschlauch wächst durch das Transmissionsgewebe des Stylus entlang des Funiculus in Richtung der Mikropyle (Abbildung 6 B, C; Yadegari und Drews, 2004). Eine der Synergidenzellen degeneriert, wodurch der Pollenschlauch in den Embryosack eindringen kann (Abbildung 6 C). Das Pollenschlauchwachstum stoppt, die Spitze des Pollenschlauchs bricht auf und die Gameten werden im Zytoplasma der degenerierten Synergide freigesetzt (Huck *et al.*, 2003; Sandaklie-Nikolova *et al.*, 2007). Doppelte Befruchtung findet statt: Eine Spermazelle befruchtet die Eizelle, woraus die diploide Zygote entsteht. Die Fusion der zweiten Spermazelle mit dem homodiploiden Kern der Zentralzelle führt zur Bildung des triploiden Endosperms (Drews und Yadegari, 2002, Russell, 1993).

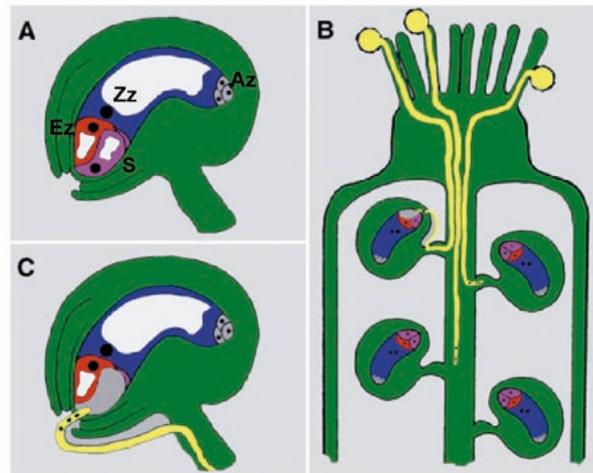


Abb. 6: Pollenschlauchwachstum zur Ovule im Gynoeceum von Arabidopsis aus Huck *et al.*, 2003. **A** Der weibliche Gametophyt ist vom Ovulum umschlossen. Der Embryosack besteht aus zwei Synergiden (S), der Eizelle (Ez), der Zentralzelle (Zz) und drei Antipodenzellen (Az). **B** Wachstum der Pollenschläuche mit Gameten durch das Übertragungsgewebe entlang der Funiculi in Richtung Mikropyle. **C** Pollenschlauch wächst durch degenerierte Synergide in den Embryosack.

Einige extrazelluläre Signale beeinflussen die Keimung des Pollens und das orientierte Wachstum der Pollenschläuche in Richtung der Samenanlagen (Johnson und Preuss, 2002). Lipide von Stigma und Pollen vermitteln die Hydrierung des Pollens (Preuss *et al.*, 1993). In die intrazelluläre Matrix des Übertragungsgewebes sekretierte Proteine und Zucker unterstützen das Wachstum des Pollenschlauchs (Cheung *et al.*, 1996). Die verstärkt im sporophytischen Gewebe des Ovulums von Arabidopsis exprimierte γ -Aminobuttersäure reguliert das Wachstum des Pollenschlauchs in Richtung der Samenanlage (Palanivelu *et al.*, 2003). Insbesondere vom Embryosack exprimierte Signale beeinflussen das Wachstum des Pollenschlauchs (Higashiyama, 2002; 2003; Palanivelu und Preuss, 2000). Mutanten mit defekter Embryosackentwicklung sind nicht in der Lage, Pollenschläuche in Richtung der Ovula zu lenken (Hülkamp *et al.*, 1995; Ray *et al.*, 1997; Shimizu und Okada, 2000). In der Arabidopsismutante *magatama*, die eine verzögerte Entwicklung des weiblichen Gametophyten zeigt, wachsen Pollenschläuche entlang der Funiculi, aber gelangen nicht zur Mikropyle (Shimizu und Okada, 2000). Vermutlich ist die Anziehung des Pollenschlauchs in mindestens zwei Phasen gegliedert: Von der Plazenta zum Funiculus und anschließend vom Funiculus zur Mikropyle (Shimizu und Okada, 2000). Die Synergidenzellen spielen eine wichtige Rolle bei der Anziehung des Pollenschlauches. Embryosäcke mit entfernten Synergiden waren nicht mehr fähig, den Pollenschlauch anzulocken (Higashiyama *et al.*, 2001). Huck *et al.*, 2003 zeigten in der Arabidopsismutante *feronia* (*fer*), dass fehlende Signalprozesse zwischen den Synergiden und dem Pollenschlauch zum Einwachsen des Pollenschlauchs in den Gametophyten, jedoch nicht zum Abstoppen des Wachstums des Pollenschlauchs und

zur Freisetzung der Gameten kommt. Kürzlich wurde von Escobar-Restrepo *et al.* (2007) gezeigt, dass *FER* für eine membranständige rezeptorähnliche Kinase kodiert. Diese wird in Synergiden gebildet und ist in die Kontrolle der Aufnahme des Pollenschlauchs in den Embryosack involviert. Für das orientierte Wachstum des Pollenschlauchs zum Ovulum sind ebenso im Pollen exprimierte Signale wichtig. Das von Besser *et al.* (2006) identifizierte HAP2 Protein in Spermazellen wird sowohl für das Wachstum des Pollenschlauchs zur Mikropyle als auch bei der Befruchtung benötigt.

In Blütenpflanzen wird durch die doppelte Befruchtung die Samenentwicklung initiiert. Diese bedingt hoch koordinierte Prozesse zwischen dem Embryo und dem Endosperm sowie der Samenschale, die aus maternalem sporophytischen Gewebe hervorgeht (Léon-Kloosterziel *et al.*, 1994; Windsor *et al.*, 2000) und dem Gynoeceum (Hennig *et al.*, 2004). Die molekularen Mechanismen, welche die reproduktive Entwicklung aktivieren und Interaktionen zwischen den verschiedenen Samengeweben steuern, sind noch unbekannt (Grossniklaus *et al.*, 2001). Viele Gene wurden in den letzten Jahren identifiziert, welche eine Rolle während der Reproduktion in Pflanzen spielen (Hennig *et al.*, 2004). Analysen des Transkriptoms von reproduktiven Organen zeigten eine verstärkte Expression von Genen, die für sekretorische Proteinen kleiner als 15 kDa kodieren. Diese könnten Funktionen bei Signalprozessen während der Reproduktion haben (Hennig *et al.*, 2004).

2.8. Zielsetzung der Arbeit

In vitro Studien zeigten, dass PSK- α als autokriner Faktor die Teilung von Zellen in Zellkulturen niedriger Dichte stimuliert (Matsubayashi und Sakagami, 1996). In Membranfraktionen von Zellkulturen wurde eine membranständige Rezeptorkinase mit Leuzin-reichen Wiederholungselementen identifiziert, an die [³H]PSK- α spezifisch bindet (Matsubayashi *et al.*, 2002; 2006). Lorbiecke und Sauter (2002) zeigten, dass PSK-Präproteingene ubiquitär in Höheren Pflanzen vorkommen. Jedoch sind bislang kaum Funktionen von PSK- α *in planta* beschrieben worden.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Aufklärung von Wirkungsorten und Wirkungen von PSK- α in *Arabidopsis thaliana*. Zu diesem Zweck sollten genetische Ansätze, Expressionsanalysen der PSK-Präproteingene und des PSK-Rezeptorgens (*AtPSKR1*) und physiologische Untersuchungen mit Effektoren in *Arabidopsis* durchgeführt werden.

Da PSK- α *in vitro* als Wachstumsfaktor agiert, sollte untersucht werden, ob auch *in planta* das Wachstum durch das Pentapeptid gesteuert wird. Die Applikation von exogenem PSK- α führte bei *Arabidopsis*-pflanzen zu einem verstärkten Wurzelwachstum,

jedoch zu keinem gesteigerten Sprosswachstum. Es sollte näher untersucht werden, ob das Pentapeptid das Wachstum der Haupt- und Lateralwurzelwachstum und/oder die Initiation von Lateralwurzeln beeinflusst. Zum einen sollten dazu Wurzellängenmessungen durchgeführt werden und die Anzahl von Lateralwurzeln der PSK-Rezeptor T-DNA Insertionsmutante *Atpskr1-T* und von Wildtyppflanzen bestimmt werden. Um zu klären, ob PSK- α die Bildung neuer Lateralwurzeln beeinflusst, sollte mit Hilfe von $P_{CycB1;1}:GUS$ Transformanten die Anzahl von Lateralwurzelprimordien nach exogener Applikation von PSK- α bestimmt werden. Die Pflanzen exprimieren β -Glucuronidase unter der Kontrolle des *CycB1;1*-Promotors. *CycB1;1* ist ein Marker für teilungsaktive Zellen (Beeckmann *et al.*, 2001).

In der Rezeptormutante sollte der Phänotyp auch während der reproduktiven Phase untersucht werden. Da in *Atpskr1-T* Pflanzen eine verminderte Samenbildung beobachtet wurde, sollten mögliche Faktoren untersucht werden, die zur Entstehung des Mutantenphänotyps führten. Zu diesem Zweck sollte die Morphologie von *Atpskr1-T* Blüten verschiedener Entwicklungsstadien untersucht werden. Da die Mutante eine erhöhte Zahl degenerierter Pollen aufwies, sollte ein Schwerpunkt der morphologischen Untersuchungen von Blüten die Entwicklung des männlichen Gametophyten in den Antheren sein. Um abschätzen zu können, inwieweit die Vitalität von reifen *Atpskr1-T* Pollen beeinträchtigt ist, sollten *in vitro* Pollenkeimungsversuche durchgeführt werden.

Da durch reziproke Kreuzungen von *Atpskr1-T* Mutante und Wildtyppflanzen gezeigt werden konnte, dass neben dem paternalen Effekt auch asynchrones Wachstum der inneren Wirtel, aber hauptsächlich maternale Einflüsse zur Ausbildung des Phänotyps beitragen, sollten nähere Untersuchungen der *Atpskr1-T* Samenanlagen erfolgen. Diese sollten über mögliche pre- und postembryonale Störungen der Samenentwicklung Aufschluss geben.

Die Expressionsanalysen der PSK-Präproteingene und von *AtPSKR1* sollten zur Aufklärung von Wirkungsorten und von Funktionen von PSK- α in Wurzeln und Blüten beitragen. Neben Transkriptanalysen wurden dazu Promotoraktivitätsstudien in vegetativen und reproduktiven Geweben von *Arabidopsis* durchgeführt.

3. Material und Methoden

3.1. Pflanzenmaterial

Arabidopsis thaliana Columbia 0 Samen wurden von GABI-KAT (Max-Planck Institut, Köln, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Samen der PSK Rezeptor T-DNA Insertionslinien SALK_008584 und SALK_008585 wurden vom NASC (University of Nottingham, Nottingham, UK) bezogen. Die Samen der P_{CycB1} :GUS Pflanzen wurden vom VIB (Vlaams Instituut voor Biotechnologie, Gent, Belgien) zur Verfügung gestellt. Die Karyopsen von *Zea mays* L., cv Alemao wurden von der Saaten Union (Hannover, Deutschland) bezogen.

3.2. Bakterienstämme und Vektoren

Klonierungen wurden mit kompetenten *Escherichia coli* DH5 α Zellen durchgeführt. Für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101::pMP90RK (Koncz und Shell, 1986) verwendet. Dieser enthält ein chromosomales Markergen für die Resistenz für Rifampicin und zwei Ti-Plasmide, wodurch die Resistenzen für Kanamycin und Gentamycin vermittelt werden. Die Anzucht der Bakterienstämme erfolgte mit den entsprechenden Antibiotika nach Sambrook und Russell (2001). Die verwendeten Vektoren sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Für die Arbeit verwendete Vektoren.

Vektor	Anbieter/Hersteller	Anwendung	Resistenz
pENTR/D-TOPO	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)	Klonierung von PCR Produkten in den pEntry-Vektor für das Gateway System	Kanamycin
pBWGFS7	Vlaams Instituut voor Biotechnologie Gent (Gent, Belgien)	Destinationsvektor für Promotor-GUS Studien	Bakterien: Spectinomycin Pflanzen: Glufosinat Ammonium

3.3. Chemikalien, molekularbiologische „Kits“ und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien, „Kits“ und Enzyme wurden von den Firmen Biomol (Hamburg, Deutschland), Roche (Mannheim, Deutschland), GE Healthcare (Freiburg, Deutschland), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Eurogentec (Seraing, Belgien), Invitrogen

(Karlsruhe, Deutschland), MBI-Fermentas (Leon-Roth, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), NEB (Ipswich, USA), Promega (Mannheim, Deutschland), Qiagen (Hilden, Deutschland), Roche (Mannheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Sigma (Taufkirchen, Deutschland), VWR (Darmstadt, Deutschland) in p.a. Qualität bezogen. Das zum Ansetzen der Lösungen verwendete Wasser stammte aus einer SG-Reinstwasseranlage (SG-Wasseraufbereitung und Regeneration GmbH, Hamburg, Deutschland) und wird im Folgenden als ddH₂O bezeichnet.

3.4. Pentapeptide

Das disulfatierte (PSK- α) und das unsulfatierte (dsPSK) Pentapeptid wurden von der Firma Biogenes (Berlin, Deutschland) hergestellt. Aus Gründen der Stabilität erfolgten der Transport und die Lagerung des disulfatierten Peptids bei -20°C in einem Wasser-Acetonitril/Essigsäure-Gemisch (95% : 5% [v/v]). Die PSK- α -Stammlösung hatte eine Molarität von 4,13 mM. Das unsulfatierte Pentapeptid lag lyophilisiert vor und wurde mit ddH₂O auf eine Molarität von 20 mM eingestellt und anschließend aliquotiert. Für Wachstumsexperimente wurden die Peptide entsprechend in ddH₂O verdünnt.

3.5. Oligonukleotide

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte von der Firma Sigma-Genosys (Darmstadt, Deutschland) und von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland), beziehungsweise waren im pENTR Directional TOPO Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) enthalten. Die für die Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Für die Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5' → 3')
M13-forward	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13-reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC
AtPSK1-F1	ATG GCT TCA AGT GTT ATT TTA AGA G
AtPSK1-R1	ATC TTG TGT ATA GAT GTA ATC GGT G
AtPSK1Prom-F1	CAC CAT CTC AGC GAT GGG GTA TCT CT
AtPSK1Prom-R1	CAA CAC TTC ACT TTT CGT CTT CA
AtPSK2-F1	CAC CAT GGC AAA CGT CTC CGC
AtPSK2-R1	TCA AGG ATG CTT CTT CTT CTG GGT
AtPSK2Prom-F1	CAC CAC GAC TGA GTT ACG ATT GAA TCA C

AtPSK2Prom-R1	GAC GGG TTT GGC TTC TTT GT
AtPSK3-F1	ATG AAG CAA ACC TTG TGC C
AtPSK3-R1	TCAATG CTT ATG GTG CTG TG
AtPSK3Prom-F1	CAC CCT ATA GCA TTA AGG GAC AGA AGT GG
AtPSK3Prom-R1	GTG AGA AGT TTG TGA TAG ACA GAT AC
AtPSK4-F1	CAC CAT GGC TCT TCT TTG CTC T
AtPSK4-R1	TTA GGG CTT GTG ATT CTG AGT
AtPSK4Prom-F1	CAC CGT GTA AGA AGA CTT TAC TAA CCT
AtPSK4Prom-R1	AGC AGA TGA AGC CAG TTA GG
AtPSK5-F2	ATG GTT AAG TTC ACA ACT TTC CTC
AtPSK5-R2	TTA GGG ATT GTG GTT TTG AGT GTA
AtPSK5Prom-F1	CAC CCT ATG ATA TCA CAG CTC TTT C
AtPSK5Prom-R2	GAA GAG GAA GTT ATG AAA TAG AGG
AtPSK6-F1	ATG GCA AAT CTC TCT ACT TTG ATC
AtPSK6-R1	GTA GAT ATA ATC AAG ATG AGC CGT C
AtPSKR1-F1	GAG CGT TGC AAT ACA ATC AG
AtPSKR1-R1	CAG TAC TTA CAT GCG TCT CGT
AtPSKR1Prom-F1	CAC CTC GTC TAC AAC TCA CAT ACG TTA CAC T
AtPSKR1Prom-R1	CGA TGA ACA CGC ATT TCA AGA ACA GAG
AtActinII-F1	CAA AGA CCA GCT CTT CCA TCG
AtActinII-R1	CTG TGA ACG ATT CCT GGA CCT
SALK_LBb1	ACC GCT TGC TGC AAC TCT C

3.6. Molekulare Größenstandards

Um die Größe und die Menge von DNA Fragmenten zu bestimmen, wurde für Agarosegelelektrophoresen der 10 kb Markers Smart Ladder (Eurogentec, Seraing, Belgien) oder der 1 kb Standard (MBI-Fermentas, Leon-Roth, Deutschland) verwendet.

3.7. Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Um eine gleichmäßige Keimung der Samen zu erreichen, wurden sie für 48 h bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und anschließend in einer Klimakammer unter Langtagbedingungen mit einem Tag/Nachtrhythmus von 16 h Licht (100 μ Einstein/m²s) und 8 h Dunkelheit bei 22°C gekeimt und angezogen.

Die Anzucht erfolgte auf Erde mit einer Mischung aus Humus:Sand von 2:1. Die Erde wurde zuvor für 2 d bei -80°C eingefroren, um Schädlinge abzutöten. Die Keimlinge wurden in den ersten zwei Wochen mit einer klaren Plastikhaube abgedeckt. Die Bewässerung erfolgte mit Leitungswasser.

Für Wachstumsexperimente wurden Arabidopsispflanzen unter sterilen Bedingungen in quadratischen Petrischalen (Greiner, Kremsmünster, Österreich) auf 30 ml Murashige und Skoog Medium (1962) 0,5 x MS; 1,5% [w/v] Saccharose; 0,8% [w/v] Agarose; pH 5,8 angezogen. Gemäß den experimentellen Vorgaben wurden vor dem Gießen der Platten dem abgekühlten MS-Medium Phytohormone, Peptide oder Aminosäuren (Duchefa, Haarlem, Niederlande) in den entsprechenden Konzentrationen zugesetzt. Für diese Versuche wurden die Samen mit 1 ml 0,1% [v/v] Natriumhypochloridlösung für 10 min sterilisiert und anschließend 5 x mit je 1 ml ddH₂O gewaschen. Die Verteilung der Samen auf die Platten erfolgte mit einer Pipette und sterilen Spitzen. Die Platten wurden mit Nescofilm (Bando Chemical Ind., Kobe, Japan) verschlossen, wie beschrieben im Dunkeln inkubiert und anschließend aufrecht in die Klimakammer gestellt, um ein Wurzelwachstum auf der Mediumoberfläche zu erzielen.

3.8. Wachstumsexperimente an *Arabidopsis thaliana*

Auf MS-Medium mit entsprechenden Konzentrationen des jeweiligen Peptids oder der einzelnen Aminosäuren angezogene 7 d alte Keimlinge (3.7.) wurden zwischen Deckgläsern an einem Binokular (Olympus, Hamburg, Deutschland) mit einer Digitalkamera (Nikon, Tokyo, Japan) fotografiert. Die Anzahl der Lateralwurzeln und der Lateralwurzelprimordien sowie β -Glucuronidase exprimierende Zellen des Perizykels von *P_{CycB1}:GUS* Pflanzen wurden bestimmt. Die GUS-Färbung des Pflanzenmaterials erfolgte wie unter 3.25 beschrieben. Wurzellängen wurde mit dem Computerprogramm Image J (National Institutes of Health, Bethesda, USA) ausgemessen.

Die Bestimmung des Frischgewichts wurde an 14 d alten Pflanzen durchgeführt. Vorsichtig wurden die Pflanzen vom MS-Medium abgelöst und Agarosereste behutsam entfernt. Mit Hilfe einer Feinwaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland) wurden separat das Spross- und das Wurzelgewicht ermittelt.

3.9. *In vitro* Pollenkeimung von *Arabidopsis thaliana* Pollen

Aus Blüten des 13. Entwicklungsstadiums (Roeder und Yanofsky, 2006) wurden Stamina mit Antheren nach Dehiszenz mit einer Pinzette isoliert. Der Pollen wurde auf Pollenkeimungsmedium nach Fan *et al.*, 2001 (5 mM MES, pH 5,8; 1 mM KCl; 10 mM CaCl₂; 0,8 mM MgSO₄; 1,5 mM Borsäure; 1 % [v/v] Agar; 3,65% [w/v] Sorbitol; 10 μ g/ml Myoinositol; 16,6% [w/v] Saccharose; für 2 min bei 100°C sterilisiert) vorsichtig verteilt und für 24 h bei 26°C im Dunkeln inkubiert. Die Pollen wurden unter einem

Binokular fotografiert und die Pollenkeimungsrate pro Blüte am Computer mit Hilfe des Computerprogramms Image J ermittelt.

3.10. Kreuzung von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Aus Blüten (Entwicklungsstadium 13, Roeder und Yanofsky, 2006) der ersten Infloreszenz, 3 bis 4 Wochen alter Pflanzen, wurden die Stamina mit einer Pinzette vorsichtig entfernt, um Selbstbestäubung zu vermeiden. Für 10 d wurden die Blüten täglich mit Pollen von gleichaltrigen Spenderpflanzen von Hand am Binokular (Olympus, Hamburg, Deutschland) bestäubt und am Blütenstiel markiert. Nach weiteren 7 d Anzucht erfolgte die Bestimmung der Anzahl nicht entwickelter Samen pro Schote.

3.11. Bestimmung der Anzahl nicht entwickelter Samen pro Schote

Die Schoten der ersten Infloreszenz wurden entlang des Repulums geöffnet und die Valven zur Seite geklappt, so dass die Samenanlage gut sichtbar war. Anschließend wurde die Anzahl nicht entwickelter Samen pro Schote bestimmt.

3.12. Fixierung und Klärung von Ovula aus *Arabidopsis thaliana* Blüten

Die Fixierung und Klärung von Blüten wurde nach dem Protokoll von Yadegari *et al.*, 1994 durchgeführt. Blüten (Entwicklungsstadien 12 bis 14, Roeder und Yanofsky, 2006) und Schoten wurden in einem Gemisch aus Ethanol:Essigsäure (9:1 [v/v]) über Nacht fixiert, anschließend mit 90% [v/v] Ethanol und 70% [v/v] Ethanol gewaschen und in einer Lösung aus Chloralhydrat:Glycerin:ddH₂O (8:1:2 [w:v:v]) geklärt. Die Ovula und Samen wurden aus den Gynoeceen beziehungsweise den Schoten isoliert und an einem Mikroskop im Differentialinterferenzkontrast (Axiophot, Zeiss, Göttingen, Deutschland) fotografiert (Olympus DP71 Kamera, Hamburg, Deutschland).

3.13. Anzucht von *Zea mays*

Um eine gleichmäßige Keimung zu erzielen, wurden die Karyopsen über Nacht in ddH₂O quellen gelassen. Die Anzucht erfolgte für 5 d in der Klimakammer unter Langtagbedingungen mit einem Tag/Nachtrhythmus von 16 h Licht (150 μ Einstein/m²s) bei 27°C und 8 h Dunkelheit bei 18°C in lichtdicht abgedeckten Pflanzschalen auf

feuchten Filterpapierlagen.

Für die Wachstumsversuche wurden die Karyopsen mit 50 ml 0,1% [w/v] Natriumhypochloridlösung für 10 min sterilisiert und 5 x mit je 50 ml ddH₂O gewaschen. Die anschließende Quellung der Karyopsen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Je sieben gequollene Maissamen wurden mit einem Spatel auf Filterpapier mit 8 ml 0,5 x MS-Salze, pH 5,8 in Weckgläsern (Weck, Wehr, Deutschland) gleichmäßig verteilt. Nach 5 d Anzucht bei Dunkelheit wurden die Maiskeimlinge für 2 d im Licht unter Langtagbedingungen, wie oben beschrieben, inkubiert. Die Quellung der Karyopsen und die Anzucht der Maiskeimlinge erfolgte unter Zugabe des jeweiligen Peptids oder der Aminosäuren in den entsprechenden Konzentrationen.

3.14. Auswertung der Wachstumsexperimente an *Zea mays*

Der Spross von 7 d alten Maiskeimlingen (cv Alemao) wurde basal, kurz oberhalb der Karyopse abgeschnitten. Mit einem Lineal wurden die Koleoptillänge ab dem Mesokotylende und die Primärblattlänge gemessen. Anschließend wurde das Sprossgewicht an einer Feinwaage bestimmt.

3.15. Isolierung von DNA

3.15.1. Isolierung von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Die Extraktion genomischer DNA wurde mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) nach dem Protokoll von Saghai-Marooof *et al.* (1984) durchgeführt. Für die DNA-Isolierung wurde frisches Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren oder bei -80°C aufbewahrte Gewebeproben verwendet. Das Pflanzengewebe wurde mit flüssigem Stickstoff zu feinem Puder gemörsert. Für 50 mg Pflanzenmaterial wurden 1,25 ml CTAB-Puffer (200 mM Tris, pH 8; 20 mM EDTA, pH 8; 1,4 M NaCl; 1,5% [w/v] CTAB; 0,2% [v/v] β-Mercaptoethanol) verwendet. Die getrocknete DNA wurde in 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 resuspendiert und bei 8°C aufbewahrt. Die genomische DNA wurde für PCR Amplifikationen eingesetzt.

3.15.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde die Methode der „Alkalischen Lyse“ nach Birnboim und Doly (1979) angewendet. Für die Gewinnung aufgereinigter kleiner Mengen Plasmid-DNA wurden der Plasmid Miniprep-Kit (GE Healthcare, Freiburg)

verwendet. Größere Mengen wurden mit dem HiSpeed Midiprep-Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) gewonnen. Die Plasmid-DNA wurde für Klonierungen, Sequenzierungen, PCR und für Restriktionen mit Endonukleasen eingesetzt.

3.16. Quantifizierung von Nukleinsäuren

DNA- und RNA-Konzentration wurden photometrisch bestimmt. Die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm erfolgte mit einem Spektralphotometer (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland oder „NanoDrop“, Wilmington, USA), wobei das Lösungsmittel als Referenz diente. Nach Sambrook und Russell (2001) wurde vorausgesetzt, dass die Extinktion von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml und einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht.

Für Klonierungen wurde die Konzentration linearisierter Plasmid-DNA, aufgereinigter DNA-Fragmente und PCR-Produkte durch gelelektrophoretische Auftrennung anhand eines mitgeführten Größen- und Gewichtsstandards abgeschätzt.

3.17. Restriktion von DNA

Für die Restriktion von Plasmid-DNA wurden Endonukleasen verschiedener Hersteller gemäß deren Angaben (3.3.) eingesetzt.

3.18. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur größenabhängigen Auftrennung von DNA-Fragmenten diente die ein-dimensionale Agarosegelelektrophorese. Die DNA wurde mit $\frac{1}{10}$ Volumen Ladepuffer (50% [v/v] Glycerin; 0,005% [w/v] Bromphenolblau) versetzt und je nach Fragmentgröße in 0,8 bis 1,2%igen [w/v] Agarosegelen mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid in 1x TAE-Puffer (Sambrook und Russell, 2001) aufgetrennt. Zur Größen- und Mengenbestimmung wurden 2,5 µl Smart-Ladder (Eurogentec, Seraing, Belgien) eingesetzt.

3.19. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten, ausgehend von genomischer DNA oder cDNA (3.15.1., 3.27.), erfolgte in einem Thermoblock (MJ Research, Biozym Diagnostik, Oldendorf, Deutschland). Standardmäßig wurde das folgende PCR-Programm verwendet:

3 min	94°C		
30 - 50 sec	94°C	x Zyklen	}
30 - 50 sec	Anlagerung		
30 - 60 sec	72°C		
5 min	72°C		
∞	8°C		

Die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide wurde 2 bis 3°C unterhalb der kalkulierten Schmelztemperatur gewählt. Ein 50 µl Standard PCR Ansatz enthielt 100 ng DNA; $\frac{1}{10}$ Volumen PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 0,01% [w/v] Gelatine), 0,4 mM dNTPs; 0,4 µM 3' Oligonukleotide; 0,4 µM 5' Oligonukleotide; 1 U Taq Polymerase und wurde mit ddH₂O aufgefüllt. Die Amplifikation von DNA-Fragmenten für anschließende Klonierungen erfolgte mit Taq Polymerasen mit Korrekturleseaktivität (Pwo Taq Polymerase, Roche, Basel, Schweiz oder Isis Taq Polymerase, MP Biomedicals, Heidelberg, Deutschland), nach Herstellerangaben.

3.20. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

PCR-Produkte wurden mit Anionenaustauschersäulen des „GFX PCR Purification Kit“ (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Anschließend wurde die Konzentration der Produkte durch den Auftrag auf ein 1%iges [v/v] Agarosegel bestimmt (3.18.).

3.21. Konstrukte für die Promotor-GUS Studien

Die Klonierungen wurden mit dem „Gateway System“ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt, welches die spezifischen Rekombinationseigenschaften des Bakteriophagen Lambda nutzt (Landy *et al.*, 1989). Die Amplifikation der putativen Promotorfragmente (Tabelle 3) erfolgte stromaufwärts des Startkodons oder der beschriebenen 5' UTR von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*. Die für die Amplifikation eingesetzten Oligonukleotide enthielten ein 5'-CACC Ende (Tabelle 2) für die direktionale Ligation der aufgereinigten Promotorfragmente in den pENTR/D-TOPO Vektor mittels Topoisomerase 1 (Cheng und Shuman, 2000). In LR-

Reaktionen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurden die Promotorfragmente in den Destinationsvektor pBWGFS7 (Vlaams Instituut voor Biotechnologie, Gent, Belgien) vor das *uidA* Gen kloniert, welches für die β -Glukuronidase kodiert. Der Vektor enthielt das Gen für die Phosphinothricin-Acetyltransferase (*BAR*) aus *Streptomyces hygrosopicus*, welches Resistenz gegen das Herbizid Phosphinotricin (Glufosinat) verleiht (Galbiati *et al.*, 2000).

Tabelle 3: Länge der amplifizierten Promotorenfragmente von *AtPSK1* bis *AtPSK5* und *AtPSKR1*.

Name	Fragmentlänge
<i>AtPSK1</i>	1121 bp
<i>AtPSK2</i>	1229 bp
<i>AtPSK3</i>	1102 bp
<i>AtPSK4</i>	1116 bp
<i>AtPSK5</i>	1198 bp
<i>AtPSKR1</i>	1363 bp

Die Klonierungen erfolgten nach Herstelleranweisungen mit folgenden Änderungen: Die Ligationzeit der PCR-Produkte in den pENTR/D-TOPO Vektor betrug 2 h. Die LR-Reaktionen wurden in einem Viertel des angegebenen Ansatzes durchgeführt.

3.22. Sequenzierung

Die Überprüfung, der in den pENTR/D-TOPO Vektor klonierten Promoterfragmente erfolgte nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) mit Fluoreszenz markierten dNTP's von der Firma SeqLab (Göttingen, Deutschland). Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Computerprogramm BioEdit 7.0.5. (Ibis Therapeutics, Carlsbad, Kanada).

3.23. Transformationen

3.23.1. Hitzeschocktransformation von *Escherichia coli*

Ein Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* DH5 α Zellen (Sambrook und Russell, 2001) wurde auf Eis aufgetaut. Es wurden 2 μ l des Ligationansatzes hinzugefügt und die Zellen 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 50 s einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und sofort auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium (10 g Bacto-Trypton; 5 g Bacto-Hefeextrakt; 10 g NaCl) wurden die Zellen 1 h bei 37°C inkubiert. Nach kurzem Sedimentieren der Bakterien wurden diese in einem

Volumen von 100 µl auf Petrischalen mit Selektionsmedium (Sambrook und Russell, 2001) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C angezogen. Von jeder Platte wurden 5 bis 10 Kolonien in 3 ml LB-Medium (10 g Bacto-Trypton; 5 g Bacto-Hefeextrakt; 10 g NaCl) angeimpft, über Nacht bei 37°C und 250 rpm (New Brunswick Scientific, Edison, USA) vermehrt. Am Folgetag wurde die Plasmid-DNA präpariert (3.15.2.). Die Integration der Fragmente in die Vektoren wurde über Restriktionsverdau oder über PCR (Weigel und Glazebrook, 2002) untersucht.

3.23.2. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Eine 5 ml *Agrobacterium tumefaciens* Vorkultur wurde in 50 ml LB-Medium (10 g Bacto-Trypton; 5 g Bacto-Hefeextrakt; 10 g NaCl) bei 28°C und 250 rpm (New Brunswick Scientific, Edison, USA) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1 angezogen. Die Bakterien wurden für 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und in 1 ml 20 mM CaCl₂ resuspendiert und in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. 100 µl kompetente Agrobakterien wurden mit 1 µg Plasmid-DNA bei 37°C für 5 min aufgetaut und anschließend 3 h mit 1 ml LB-Medium bei 28°C und 900 rpm in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Der Ansatz wurde für 1 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf Petrischalen mit LB-Medium mit 100 µg/ml Rifampicin; 40 µg/ml Gentamycin; 100 µg/ml Spectinomycin ausgestrichen. Nach 3 d Inkubation bei 28°C wurden resistente Klone mittels PCR auf das Vorhandensein des transformierten Vektors untersucht (Weigel und Glazebrook, 2002).

3.23.3. Transformation von *Arabidopsis thaliana* mit *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation der Arabidopsispflanzen erfolgte nach dem Protokoll von Clough und Bent (1998). Aus einer 5 ml *Agrobacterium tumefaciens* Vorkultur eines resistenten Klons wurde eine 200 ml Kultur circa 20 h bei 28°C und 250 rpm (New Brunswick Scientific, Edison, USA) angezogen. Die Bakterien wurden 10 min bei 5000 rpm pelletiert und in einer Infiltrationslösung (5% [w/v] Saccharose; 0,5 x MS; 0,02% [v/v] Silwet L-77 (Lehle Seeds, USA) pH 5,8) vorsichtig bis zu einer OD₆₀₀ von 1 resuspendiert. Circa 3 bis 4 Wochen alte Arabidopsispflanzen wurden mit den Blüten 10 s in die Lösung getaucht und über Nacht abgedeckt in die Klimakammer gelegt. Nach ungefähr 8 Wochen Anzucht (3.7.) konnten die Samen geerntet werden.

Die Selektion transgener Arabidopsispflanzen erfolgte mit 200 µM Glufosinat Ammonium verdünnt in Leitungswasser (BASTA, AgrEvo, Berlin, Deutschland). Keimlinge der T₁ Generation wurden auf Erde angezogen und 5 d nach Keimung jeden zweiten Tag mit der BASTA-Lösung besprüht, wodurch nicht resistente Pflanzen nach der zweiten und dritten Behandlung abstarben (Weigel und Glazebrook, 2002). Die

resistenten Pflanzen wurden vereinzelt. Deren Samen konnten nach weiteren 6 bis 7 Wochen Anzucht geerntet werden.

3.24. GUS-Färbung von *Arabidopsis thaliana*

Die GUS-Färbung von Pflanzengewebe erfolgte nach dem Protokoll von Vielle-Calzada *et al.* (2000). GUS exprimierende Pflanzen wurden 1 h in 90% [v/v] Aceton bei -20°C fixiert und anschließend 3 x mit 100 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7 gewaschen. In der GUS-Färbelösung mit 50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7; 10 mM EDTA; 0,1% [v/v] Triton X-100; 1 mM $K_3Fe(CN)_6$; 1 mM $K_4Fe(CN)_6$; 1 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indodyl- β -D-Glucuronid (X-Glu) wurden das Pflanzenmaterial über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Klärung, des zuvor mit ddH₂O gewaschenen Pflanzengewebes, ist in 3.12. beschrieben. Die Aufnahmen erfolgten unter Hellfeldbedingungen an einem Mikroskop (Leica DM LS, Leica Microsystems, Bensheim, Deutschland) mit einer Digitalkamera (Leica DC 300F, Leica Microsystems, Bensheim, Deutschland).

3.25. Herstellung von Kunststoffschnitten von Pflanzengeweben

Geklärtetes Pflanzengewebe wurde mit verschiedenen Ethanolkonzentrationen (30%, 50%, 70%, 90%, 100% [v/v]) für jeweils 1 h dehydriert und in Technovit 7100 (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland) eingebettet. Es wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. 10 bis 15 μ m dicke Schnitte wurden an einem Mikrotom (Leica RM 2255, Leica Microsystems, Bensheim, Deutschland) angefertigt und anschließend fotografiert an einem Mikroskop (Leica DM LS, Leica Microsystems, Bensheim, Deutschland) mit einer Digitalkamera (Leica DC 300F, Leica Microsystems, Bensheim, Deutschland). Die Anfärbung von Schnitten nicht GUS exprimierender Pflanzen erfolgte mit 0,05% [w/v] Toluidinblau.

3.26. Isolierung von Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzengeweben wurde mit dem Tri Reagenz (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) durchgeführt. Für die RNA Isolierung wurde frisches Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren oder bei -80°C aufbewahrte Gewebeproben verwendet. Das Pflanzengewebe wurde mit flüssigem Stickstoff zu feinem Puder gemörsert. Zu 100 mg Pflanzenmaterial wurde 1 ml des Tri-Reagenz

gegeben und gemäß der Anweisungen des Herstellers Gesamt-RNA isoliert. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.27. Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die RNA-Proben wurden vor der reversen Transkription mit DNase verdaut, um DNA-Verunreinigungen zu beseitigen. In einem Ansatz von 60 μl wurde Gesamt-RNA mit 5 mM NaCl; 1mM Tris-HCl; 1 mM MgCl_2 ; 0,1 mM DTT, pH 7,9; 20 U RNase Inhibitor (MBI Fermentas, Leon-Roth, Deutschland) und 3,5 U DNase (MBI-Fermentas, Leon Roth, Deutschland) 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion (1:1) aufgereinigt, mit $\frac{1}{10}$ Volumen [v/v] 3 M Natriumacetatlösung und 2,5 x Volumen 100% [v/v] Ethanol für 1 h bei -20°C gefällt und das RNA-Pellet mit 80% [v/v] Ethanol gewaschen. Die RNA wurde in ddH_2O re-suspendiert und für 5 min bei 55°C inkubiert. 1 μl der RNA wurde für eine Kontroll-PCR eingesetzt, um den vollständigen Verdau von DNA zu überprüfen (3.19.). Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung der RNA am Photometer (3.16.).

Für die reverse Transkription wurden 5 μg Gesamt-RNA mit 0,5 mM dNTPs und 0,5 μg Oligo dTs (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von $\frac{1}{5}$ Volumen Erststrangpuffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 10 mM DTT, 20 U RNase Inhibitor (MBI Fermentas, Leon-Roth, Deutschland) und 100 U Reverser Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) zu einem Gesamtvolumen von 20 μl auf Eis. Der Ansatz wurde 1 h bei 42°C und anschließend zur Enzyminaktivierung 15 min bei 70°C inkubiert. Die cDNA wurde 1:1 in ddH_2O verdünnt. Die PCR-Bedingungen wurden so gewählt, dass die Amplifikation nicht in der Sättigung war. Die cDNA von *AtActin2* wurde über PCR mit amplifiziert und diente als Kontrolle für die cDNA-Synthese sowie für die Menge eingesetzter mRNA. Die Proben wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.18.).

3.28. Datenbankrecherchen, Sequenzanalysen und Computerprogramme

Datenbankrecherchen wurden mit dem Internetportal des National Center of Biotechnology (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und mit dessen Blastserver (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) durchgeführt. Informationen zu genomischen Sequenzen, ESTs, Mutanten und Expressionsdaten wurden mit Hilfe der folgenden Internetportale gewonnen: 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/>), dem Salk Institute Genomic

Analysis Laboratory (SIGnAL, <http://signal.salk.edu/>), Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch/at/>) und The Botany Array Resource (<http://bbc.botany.utoronto.ca/>).

Die experimentellen Daten wurden statistisch mit dem Mann-Whitney-Test (U-test) analysiert. Dafür wurden die Internetprogramme <http://eatworms.swmed.edu/~leon/stats/utest.html> (Leon Avery, Southwestern Medical Center, Dallas, USA) und <http://faculty.vassar.edu/lowry/utest.html> (Richard Lowry, Vassar College, Poughkeepsie, USA) verwendet.

Für DNA- und Proteinsequenzanalysen wurde das Programm BioEdit 7.0.5. (Ibis Therapeutics, Carlsbad, Kanada) verwendet. Die Längenmessungen von *Arabidopsis thaliana* Wurzeln sowie die Bestimmung der Pollenkeimungsrate erfolgten mit Hilfe des Computerprogramms Image J (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit den Computerprogrammen Leica IM 500 (Leica Microsystems, Bensheim, Deutschland) und mit Olympus Cell^F (Olympus, Hamburg, Deutschland) erstellt. Die Bilder wurden für die Arbeit mit Photoshop CS2 (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) bearbeitet. Graphiken wurden mit Origin 6.0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) und mit Illustrator CS2 (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) erstellt.

4. Ergebnisse

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die funktionale Analyse des disulfatierten Pentapeptids PSK- α *in planta*. Aus Studien an *in vitro* kultivierten Zellen war bekannt, dass PSK- α Zellteilung von Zellkulturen mit geringer Dichte fördert (Matsubayashi und Sakagami, 1996) und bei der Zelldifferenzierung eine Rolle spielt (Matsubayashi *et al.*, 1999). In Pflanzen scheint PSK- α in verschiedene Entwicklungsprozesse involviert zu sein (Igasaki *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 1999; Yamakawa *et al.*, 1998). Jedoch sind klar definierte physiologische Funktionen des Pentapeptids bisher nicht beschrieben worden (Lorbiecke *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde ein Einfluss von PSK- α auf das Wachstum und auf die Reproduktion bei Arabidopsispflanzen untersucht. Dafür wurden sowohl physiologische als auch genetische Ansätze verfolgt.

4.1. Die PSK-Präproteingene und das PSK-Rezeptorgen *AtPSKR1* von *Arabidopsis thaliana*

4.1.1. Die PSK-Präproteingene

PSK- α wird in *Arabidopsis thaliana* durch fünf Präproteingene, *AtPSK1* bis *AtPSK5* kodiert (Lorbiecke und Sauter, 2002). Ein sechstes Gen, welches Strukturähnlichkeiten zu den fünf Präproteingenen aufweist, kodiert für ein modifiziertes Pentapeptid, dessen Funktionalität nicht geklärt ist. Die genomische Sequenz der Präproteingene *AtPSK1*, *AtPSK2*, *AtPSK4* und *AtPSK5* enthält eine Intronsequenz. Die Sequenz von *AtPSK3* hat zwei. Die PSK-Präproteine sind kleine Proteine mit einer Länge von 77 bis 87 Aminosäuren. Sie besitzen geringe Homologien auf Aminosäuresequenzebene innerhalb der PSK-Genfamilie aus Arabidopsis (Abbildung 7) sowie zwischen PSK-Genfamilien verschiedener Pflanzenarten. In phylogenetischen Analysen wurde die höchste Verwandtschaft zwischen *AtPSK4* und *AtPSK5* mit einer Sequenzidentität von 62% sowie zwischen *AtPSK2* und der PSK Variante *AtPSK6* mit einer Sequenzidentität von 57% festgestellt. *AtPSK3* und *AtPSK1* sind zu 30% identisch (eigene Daten, nicht gezeigt). Strukturanalysen von PSK-Präproteinen verschiedener Pflanzenarten zeigen eine konservierte Sekundärstruktur der Präproteine (Lorbiecke und Sauter, 2002).

Charakteristisch für die PSK-Präproteine ist ein sekretorisches N-terminales Signalpeptid, die hoch konservierte PSK-Sequenz nahe des C-Terminus sowie weitere konservierte Aminosäuren in der Nähe der Pentapeptidsequenz (Lorbiecke und

Sauter, 2002; Matsubayashi *et al.*, 2006). Die in verschiedenen PSK-Präproteinen gefundene Konsensussequenz von hoch konservierten Aminosäuren wurde als Signaturmotiv bezeichnet (Lorbiecke und Sauter, 2002). Darüber hinaus sind Regionen aus sauren Aminosäuren in der Mitte der Proteine sowie aus basischen Aminosäuren am C-Terminus spezifisch für PSK-Präproteine (Lorbiecke und Sauter, 2002).

	saure Region	baische Region	
AtPSK1	MMKTKSEVLIFFFTLVLLI-SMASS-----VILREDGFAPPKPSPTTHEKASTKGD RDGVECKNSDSEEEC-LVKK-TVAAH	TDVIYTC	DLNLSP 86
AtPSK2	----MANVSALLTIALLLCSTLMCTA-RPEPAISISITTAADPCNMEKKIEGKLDDMHMVDENCGADD--EDC-LMRR-TLVAHTD	VIYTC	KKKHP 87
AtPSK3	----MKQSLCLAVLFLIL-STSSA-----IRRGKEDQEINPLVSATSVEEDSVNKLGMMEYCGEGD--EEC-LRRRMMTESHL	DIYTC	HHKH 81
AtPSK4	----MGKPTTIFIMALLLCSTLTYA-----ARLTPTTTTALSRENSVKEIEGDKVEEESONGIG-EEEC-LIRR-SLVLHTD	VIYTC	NHHP 79
AtPSK5	----MVKFTTFLCIITALLLCSTLTHA-----SARLNPTSVPYEENSFKKLEQGEVIQEGVG-EEECFLIRR-TLVAHTD	VIYTC	NHNP 77
AtPSK6	----MANLSTLITIALLCATMLTCSA--RPEPAYFASFTTSPADTSLSEMIESKLHEVAGESCDKEDD-EDC-LVRR-TLTAHLD	VIYTC	KNNHH 87
	Signalpeptid	PSK-Sequenz	
		Signaturmotiv	

Abb. 7: Die PSK-Präproteine aus *Arabidopsis thaliana*. Aminosäuresequenzen der PSK-Präproteine und eines PSK-Pseudoproteins nach Lorbiecke und Sauter (2002). Hoch konservierte und konservierte Aminosäuren sind dunkelgrau beziehungsweise hellgrau unterlegt. Die Proteine besitzen eine N-terminale hydrophobe Signalpeptidsequenz, die durch einen Balken gekennzeichnet ist. In der Mitte der Proteine befindet sich eine Region aus vermehrt sauren Aminosäuren („saure Region“). Diese Region überlappt C-terminal mit einem Bereich aus hoch konservierten Aminosäuren mit der PSK-Sequenz (umrahmt, grau unterlegt). Die Länge des in PSK-Präproteinen konservierten Signaturmotivs (Lorbiecke und Sauter, 2002) wurde durch einen Balken dargestellt. Am C-terminalen Ende befindet sich eine Region aus vermehrt basischen Aminosäuren („baische Region“).

4.1.2. *At2g02220* kodiert für einen PSK-Rezeptor in *Arabidopsis*

Matsubayashi *et al.* (2002) identifizierten eine transmembrane Rezeptorkinase mit Leucin-reichen Wiederholungselementen („leucine-rich repeats“, LRR) aus *Daucus carota* als PSK-Rezeptor (DcPSKR1). Durch Datenbankrecherchen wurden in dieser Arbeit vier homologe Rezeptorkinasen in *Arabidopsis thaliana* ermittelt. Die Homologien der LRR-Kinasen zu DcPSKR1 sind in der Verwandtschaftsanalyse in Abbildung 8 gezeigt. *At2g02220* (NM 126282) wies mit 60% die höchste Aminosäuresequenzidentität und mit 76% die ebenfalls höchste Sequenzähnlichkeit auf. *At2g02220* hat eine Länge von 3027 bp. Die genomische Sequenz entspricht der cDNA und ist somit intronlos. Das Gen kodiert für eine LRR-Rezeptorkinase mit einer N-terminalen Signalpeptidsequenz, 21 leucin-reichen LR-Wiederholungselementen mit einer Inseldomäne zwischen dem 17. und 18. LR-Element, einer Transmembrandomäne und einer C-terminalen Kinasedomäne mit einer ATP Bindungsstelle. Kürzlich wurde über Bindungsstudien und genetische Analysen gezeigt, dass *At2g02220* für einen PSK-Rezeptor in *Arabidopsis* kodiert, der mit *AtPSKR1* bezeichnet wurde (Matsubayashi *et al.*, 2006).

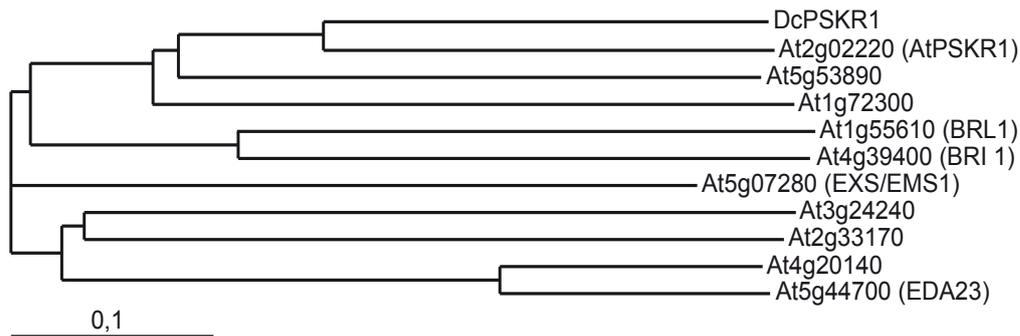


Abb. 8: Verwandtschaftsanalyse von zehn zu dem PSK-Rezeptor aus *Daucus carota* (DcPSKR1) homologen LRR-Rezeptorkinasen aus *Arabidopsis*. Für den Homologievergleich wurden die vollständigen Aminosäuresequenzen der LRR-Rezeptorkinasen verwendet. Der höchste Verwandtschaftsgrad mit einer Sequenzidentität von 60% besteht zwischen DcPSKR1 und At2g02220, der als PSK-Rezeptor AtPSKR1 identifizierte LRR-Kinase in *Arabidopsis* (Matsubayashi *et al.*, 2006). Die LRR-Rezeptorkinasen At5g53890 und At1g72300 sind zu DcPSKR1 mit 48% und 43% identisch. Die Sequenzidentität der übrigen Kinasen lag unterhalb von 35%. Unter den Homologen befinden sich zwei Brassinosteroidrezeptoren BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 LIKE (BRL1) und BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1) (Clouse *et al.*, 1996; Cano-Delgado *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004) sowie die Kinasen EXCESS MICROSPOROCTES 1 (EXS/EMS1), welche für die Spezialisierung von Tapetumzellen benötigt wird (Canales *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2002) und EMBRYO SAC DEVELOPMENT ARREST 23 (EDA23) (Pagnussat *et al.*, 2005).

4.1.3. Identifizierung der *AtPSKR1* T-DNA Insertionsmutante *Atpskr1-T*

Durch Datenbankrecherchen wurden zwei verschiedene T-DNA Insertionslinien für *AtPSKR1*, SALK_008584 und SALK_008585, identifiziert und beim NASC (University of Nottingham, UK) bestellt. Für die Erzeugung der T-DNA Insertionsmutanten wurde der pROK2 Vektor verwendet (Baulcombe *et al.*, 1986). Die Insertionen beider Linien befanden sich an Position 2337 bp nach dem ATG und damit in dem für die Kinasedomäne kodierenden Bereich wie in Abbildung 9 dargestellt. Für Funktionsanalysen der PSK-Rezeptormutante wurden für die T-DNA Insertion homozygote Linien benötigt. Von sechs überprüften SALK_008584 Linien war keine Linie homozygot. Von vier Linien der SALK_008585 Insertionsmutante enthielt eine Linie die T-DNA Insertion in beiden Allelen. In Transkriptanalysen wurde in dieser Linie keine mRNA von *AtPSKR1* nachgewiesen (Abbildung 9 B). Zur Kontrolle der cDNA Synthese und zur Überprüfung eingesetzter RNA Mengen für die reverse Transkription wurde in der anschließenden PCR die cDNA von *ACT2* amplifiziert (Laval *et al.*, 2002; Vielle-Calzada *et al.*, 1999). Die homozygote T-DNA Insertionslinie SALK_008585, die keine *AtPSKR1* mRNA exprimierte, wurde in dieser Arbeit für phänotypische und funktionale Analysen verwendet.

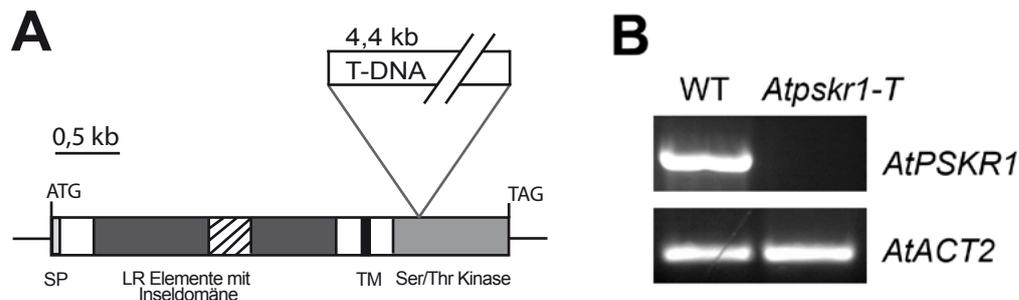


Abb. 9: Die PSK-Rezeptor T-DNA Insertionsmutante *Atpskr1-T* (SALK_008585).

A Position der T-DNA Insertion in *AtPSKR1-T*. Die Sequenzen, welche für das Signalpeptid (SP, schwarz), die Leuzin-reichen (LRR) Elemente (dunkelgrau) mit der Inseldomäne (gestreift), die Transmembranomäne (TM, schwarz) und die Kinase (hellgrau) kodieren, sind eingezeichnet. **B** Die mRNA von Wildtyp (WT) und *Atpskr1-T* wurde revers transkribiert und der PSK-Rezeptor mit genspezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. In der T-DNA Insertionsmutante ist kein Transkript detektierbar. Die mRNA von *Actin2* (*AtACT2*) wurde als Kontrolle über RT-PCR nachgewiesen.

4.2. Die PSK-Präproteingene und *AtPSKR1* werden gewebespezifisch in Arabidopsis exprimiert

Um Hinweise auf Bildungs- und Wirkungsorte von PSK- α und somit auf mögliche Funktionen des Pentapeptids *in planta* zu erhalten, wurden Expressionsstudien von *AtPSK1* bis *AtPSK5* und von *AtPSKR1* in Arabidopsis durchgeführt. Die Promotoraktivitäten sowie RT-PCR Transkriptanalysen der PSK-Präproteingene und von *AtPSKR1* wurden in vegetativen und in reproduktiven Pflanzengewebe untersucht. Die Expressionen in reproduktiven Organen von Arabidopsis sind in Abschnitt 4.4.8. gezeigt.

4.2.1. Generierung von Promotor-GUS Linien

Promotorfragmente stromaufwärts vom Startkodon mit einer Länge von 1121 bp für *AtPSK1*, 1102 bp für *AtPSK3* sowie 1363 bp für *AtPSKR1* und vom Anfang des 5' untranslatierten Bereiches mit einer Länge von 1229 bp für *AtPSK2*, 1116 bp für *AtPSK4* und 1198 bp für *AtPSK5* wurden für die Untersuchung der Promotor-GUS Expressionen in Arabidopsis ausgewählt. Die Positionen der PSK-Präproteingene und des PSK-Rezeptorgens mit den putativen Promotoren zu benachbarten Genen auf den Chromosomen sind in Abbildung 10 schematisch gezeigt.

Die Transformationsrate der Pflanzen lag zwischen 0,1% bis 1% und war mit der von Clough und Bent (1998) publizierten vergleichbar. Insgesamt wurden fünf $P_{AtPSK1}::GUS$, fünf $P_{AtPSK2}::GUS$, sechs $P_{AtPSK3}::GUS$, 11 $P_{AtPSK4}::GUS$, acht $P_{AtPSK5}::GUS$ und fünf $P_{AtPSKR1}::GUS$ Linien generiert und anschließend analysiert.

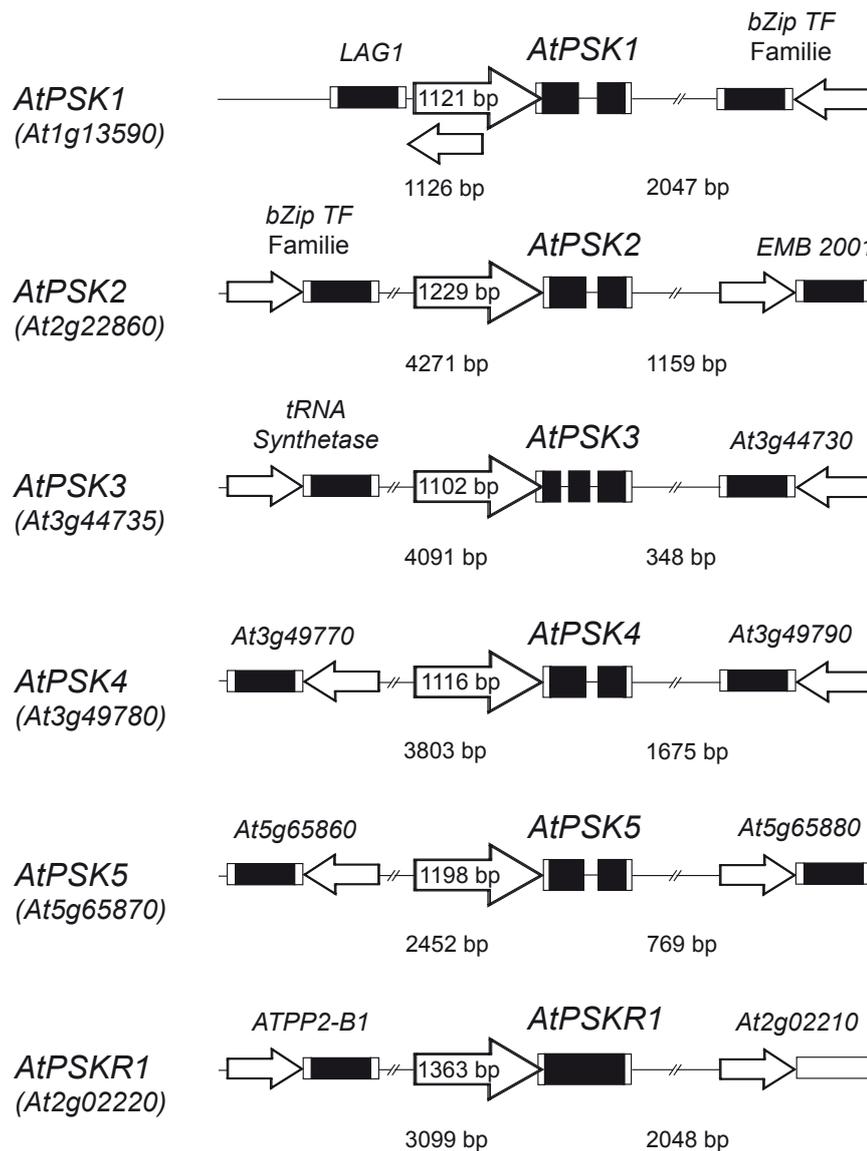


Abb. 10: Position der PSK-Präproteingene und von *AtPSKR1* zu benachbarten Genen auf chromosomaler Ebene. Die Exonen von *AtPSK1* bis *AtPSK5* und von *AtPSKR1* sind durch schwarze Rechtecke, die Introns durch Linien, die 3' und 5' untranslatierten Bereiche durch weiße Vierecke und die gewählten Promotorregionen durch große Pfeile dargestellt. Die sich stromauf- und stromabwärts befindenden Gene sind schematisch angedeutet und die Richtung der Promotoren mit der Pfeilen gekennzeichnet. Der Abstand zu den sich in 5'-Richtung befindenden Genen von *AtPSK1* bis *AtPSK5* und *AtPSKR1* ist vom Startkodon bis zum Ende des untranslatierten Bereiches (UTR) berechnet beziehungsweise vom Ende der 3' UTR bis zum Anfang der UTR der sich stromabwärts befindenden Gene.

4.2.2. Die PSK-Präproteingene und das PSK-Rezeptorgen *AtPSKR1* werden spezifisch im Spross exprimiert

Um die Expressionen der PSK-Gene und von *AtPSKR1* im Spross untersuchen zu können, wurden Promotor-GUS Transformanten 5 d, 8 d oder 36 d angezogen. Die Expressionen sind in Abbildung 11 im apikalen Sprossmeristem (A, E, J, N, S, a) und in

Kotyledonen (B, F, K, O, T, b) von 5 d alten Keimlingen, in jungen Blättern (C, G, L, P, U, c) von 8 d alten Keimlingen, in Blättern von adulten Pflanzen (D, H, M, Q, V, d) und in den Stomata (R, e) sowie in den Stomata der Hydathodenregion (I) gezeigt.

AtPSK1 weist eine schwache Expression im Spross (Abbildung 11 A) und Blättern (Abbildung 11 B, C) von Arabidopsiskeimlingen sowie in Blättern von adulten Pflanzen (Abbildung 11 D) auf. Charakteristisch für $P_{AtPSK1}::GUS$ Transformanten war eine Promotoraktivität in Stipulen (Abbildung 11 A) und in Hydathoden von Kotyledonen (Abbildung 11 B) sowie von jungen und älteren Blättern (Abbildung 11 C, D).

AtPSK2 wurde in Stipulen (Abbildung 11 E), in Hydathoden (Abbildung 11 F) von Kotyledonen, jungen (Abbildung 11 G) und älteren Blättern (Abbildung 11 H) exprimiert. Die Expression in den Stomata der Hydathoden war sehr spezifisch (Abbildung 11 I). Des Weiteren war der *AtPSK2* Promotor im Leitgewebe des Sprosses aktiv (Abbildung 11 F, H, I). *AtPSK2* war als einziges der PSK-Präproteingene in Trichomen von jungen Blättern aktiv (Abbildung 11 G).

AtPSK3 wurde sehr stark im Bereich des apikalen Sprossmeristems (Abbildung 11 J), in entstehenden Blättern (Abbildung 11 J), in Kotyledonen (Abbildung 11 K) sowie in jungen Blättern (Abbildung 11 L) von Keimlingen exprimiert, ohne dass eine Spezifizierung des Gewebes möglich war. Das Hypokotyl von $P_{AtPSK3}::GUS$ Transformanten wies keine Färbung auf (Abbildung 11 J). *AtPSK3* wurde sehr viel schwächer in Blättern adulter Pflanzen im Vergleich zu Keimlingen exprimiert (Abbildung 11 M). Die Expression war im Leitgewebe der Blätter erkennbar (Abbildung 11 M).

AtPSK4 wurde sehr spezifisch in Stomazellen von 5 und 8 d alten Keimlingen (Abbildung 11 N, O, P) und von adulten Pflanzen (Abbildung 11 Q, R) exprimiert. Der Promotor war ebenfalls verstärkt in Hydathoden der Kotyledonen (Abbildung 11 O), der jungen (Abbildung 11 P) und der älteren Blättern (Abbildung 11 Q) aktiv. Darüber hinaus war eine *AtPSK4* Expression im apikalen Sprossmeristem in entstehenden Blättern erkennbar (Abbildung 11 N). Das Leitgewebe war im Spross (Abbildung 11 N, O, P) von Keimlingen als auch in älteren Blättern (Abbildung 11 Q) von adulten Pflanzen gefärbt.

AtPSK5 wurde vor allem im Leitgewebe vom Spross in Keimlingen (Abbildung 11 S, T, U) und in Blättern älterer Pflanzen (Abbildung 11 V) exprimiert. Der *AtPSK5* Promotor war in Hydathoden der Kotyledonen (Abbildung 11 T), von jungen (Abbildung 11 U) und von adulten Blättern (Abbildung 11 V) aktiv. Des Weiteren waren die Stipulen von Keimlingen (Abbildung 11 S) und 14 d alten Pflanzen (eigene Daten, nicht gezeigt) gefärbt.

Die Expression von *AtPSKR1* war gegenüber einigen PSK-Genen nur schwach im Spross (Abbildung 11 a, b, c) von Keimlingen und in den Blättern älterer Pflanzen (Abbildung 11 d) erkennbar. *AtPSKR1* wurde spezifisch in Stomazellen von Kotyledonen (Abbildung 11 b, e) und jungen Blättern (Abbildung 11 c) exprimiert. Des Weiteren war der *AtPSKR1* Promotor in Hydathoden von Kotyledonen (Abbildung 11 b), in den Blättern von Keimlingen (Abbildung 11 c) und von adulten Pflanzen (Abbildung 11 d) aktiv.

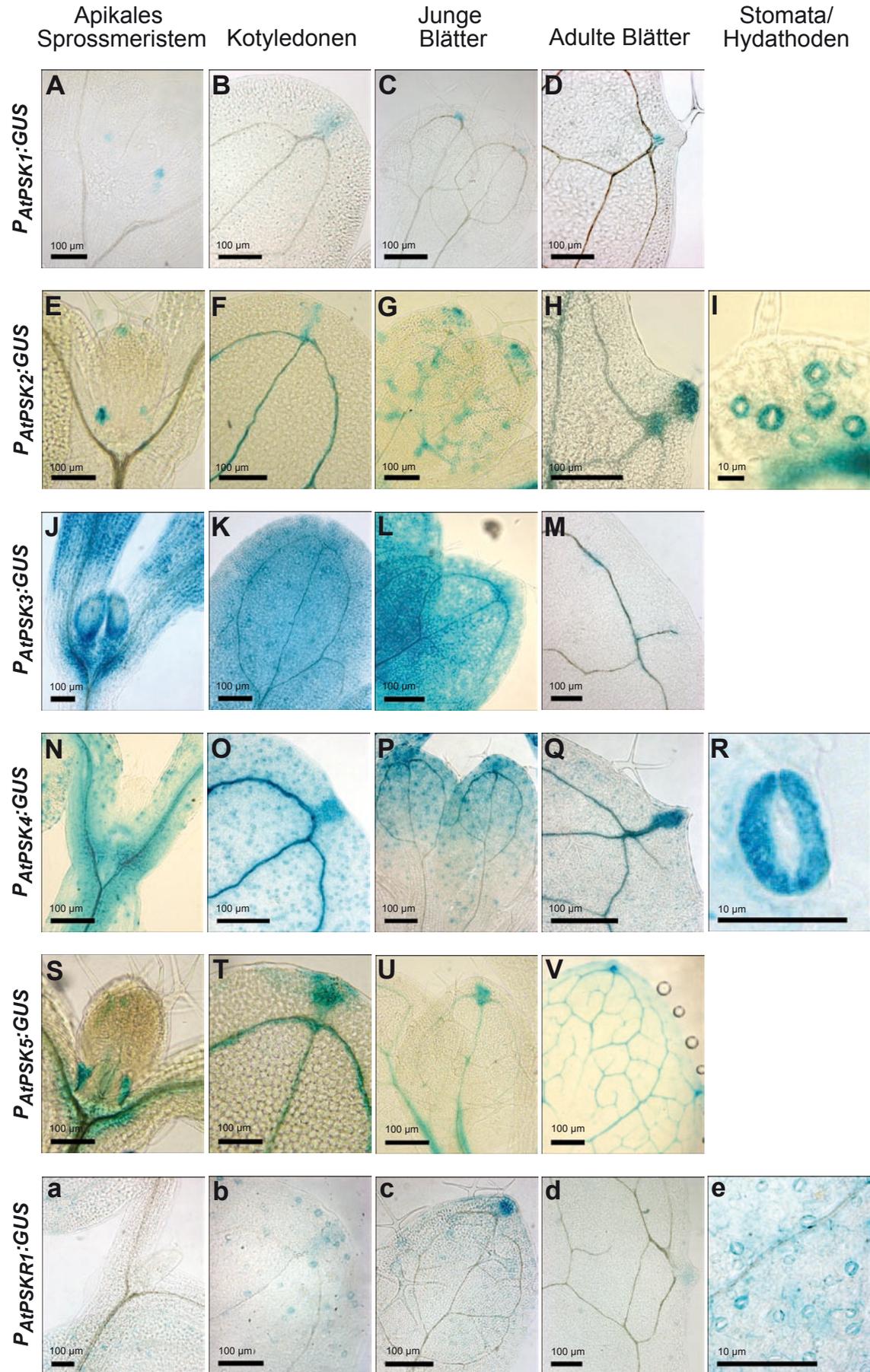


Abb. 11: Promotor-*GUS* Expressionen der PSK-Präproteingene und des PSK-Rezeptorgens *AtPSKR1* im Spross und in Blättern von *Arabidopsis* Keimlingen und adulten Pflanzen. Die Aufnahmen von *GUS* exprimierenden Pflanzengewebe erfolgte unter Hellfeldbedingungen. **A, E, J, N, S, a** zeigen das apikale Sprossmeristem 5 d alter Promotor-*GUS* Transformanten. In **B, F, K, O, T, b** sind Promotor-*GUS* Expressionen in Kotyledonen mit Hydathoden von 5 d alten Keimlingen, **C, G, L, P, U, c** in Blättern von 8 d alten Pflanzen, **D, H, M, Q, V, d** in Blättern von 6 Wochen alten Pflanzen, **I** in Stomata der Hydathodenregion und **R, e** in Stomata gezeigt.

Eine schwache *AtPSKR1* Expression war in Trichomen von jungen Blättern (Abbildung 11 c) erkennbar. Eine Promotoraktivität im Bereich des apikalen Sprossmeristems und im Hypokotyl war nicht sichtbar (Abbildung 11 a). Des Weiteren schien *AtPSKR1* nicht im Leitgewebe des Sprosses (Abbildung 11 a, b, c, d, e) exprimiert zu werden.

Die PSK-Präproteingene und das Rezeptorgen wurden bis auf *AtPSK3* gewebespezifisch im Spross von *Arabidopsis* exprimiert (Tabelle 4).

Tabelle 4: Zusammenfassung der Promotor-*GUS* Expressionen der PSK-Präproteingene und von *AtPSKR1* im Spross von *Arabidopsis*, welche in Abbildung 11 gezeigt sind. (+) = Expression im Gewebe, (-) = keine Expression im Gewebe

Gen \ Gewebe	<i>AtPSK1</i>	<i>AtPSK2</i>	<i>AtPSK3</i>	<i>AtPSK4</i>	<i>AtPSK5</i>	<i>AtPSKR1</i>
Hydathoden	+	+	nicht spezifisch	+	+	+
Stomazellen	-	-	nicht spezifisch	+	-	+
Leitgewebe	-	+	nicht spezifisch/+	+	+	-
Stipulen	+	+	nicht spezifisch	+	+	-
Trichome	-	junge Blätter	junge Blätter	-	-	junge Blätter

Sowohl in Keimlingen als auch in adulten Pflanzen wurden der PSK-Rezeptor und die PSK-Präproteingene in den Hydathoden von Blättern exprimiert. Darüber hinaus waren die Promotoren von *AtPSKR1* und *AtPSK4* spezifisch in Stomazellen von *Arabidopsis* aktiv. In diesen Geweben wäre eine Perzeption von PSK- α durch *AtPSKR1* und somit eine lokale Wirkung des Pentapeptids möglich. So wäre eine Funktion von PSK- α bei der Regulation des Gaswechsels und des Wasserhaushaltes denkbar. Des Weiteren kam es zu einer Überschneidung der *AtPSKR1* und *AtPSK2* Expression in Trichomen von jungen Blättern. Möglicherweise spielt PSK- α eine Rolle während der Entwicklung der Blatthaare. In Stipulen und im Leitgewebe war keine Promotoraktivität des PSK-Rezeptors jedoch der PSK-Präproteingene erkennbar. Eine Perzeption durch *AtPSKR1* scheint in diesen Geweben nicht möglich zu sein. Möglicherweise erfolgt eine Sekretion von PSK- α in den Stipulen sowie im Leitgewebe. Ein Transport des Pentapeptids ist ebenfalls nicht auszuschließen.

4.2.3. Expressionen der PSK-Präproteingene und des PSK-Rezeptorgens *AtPSKR1* in Wurzeln

Um die Expressionen der PSK-Präproteingene und des Rezeptorgens im Apex der Wurzeln zuordnen zu können, wurden nach Dolan *et al.* (1993) Wurzelbereiche definiert. Der Abstand vom apikalen Teil der Columellazellen bis zu den Zentralzellen von 7 d alten Pflanzen betrug circa 70 bis 80 μm . Einschließlich der lateralen Zellen hatte die Kalyptra insgesamt eine Länge von 200 bis 300 μm ab der Wurzelspitze. Sie umschließt teilweise das apikale Wurzelmeristem. Die meristematische Zone hat eine Länge von circa 300 bis 350 μm ab den Zentralzellen in basipetaler Richtung. Die Wurzelhaarzone beginnt oberhalb von 550 μm in basipetaler Richtung von der Hauptwurzelspitze. Zusätzlich wurden zum Vergleich der Expressionen in Wurzeln $P_{AtCycB1;1}:GUS$ Transformanten verwendet, die *GUS* unter dem Promotor des mitotischen *CycB1;1* exprimieren und als Marker für zellteilungsaktives Gewebe in Arabidopsis dienen (de Almeida Engler *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 1994; Hemerly *et al.*, 1993). In der Primärwurzelspitze von 40 h alten Keimlingen wird *CycB1;1* im Bereich des apikalen Wurzelmeristems auf einer Länge von circa 400 μm exprimiert (Beeckman *et al.*, 2001). Die Zone in jungen Lateralwurzeln, in der *CycB1;1* exprimiert wurde, war 100 bis 150 μm lang (Abbildung 18 A). Für Expressionsanalysen an Wurzeln wurden die Promotor-GUS Transformanten für 8 d oder 14 d angezogen. Die Expressionen sind in Abbildung 12 am Spross/Wurzelübergang (A, F, K, P, J, a), in Lateralwurzelsprimordien (B, G, L, Q, V, b), in jungen Lateralwurzeln (C, H, M, R, W, c) und in Wurzelspitzen (D, I, N, S, X, d) von 8 d alten Keimlingen sowie in Wurzelquerschnitten (E, J, O, T, Y, e) von 14 d alten Pflanzen gezeigt.

Im Vergleich zum Spross wurde *AtPSK1* verstärkt in Wurzeln exprimiert (Abbildung 12 A). Die Expression war jedoch insgesamt schwach. In Hauptwurzeln waren die Wurzelspitze und die subapikale Zone sehr schwach gefärbt (Abbildung 12 A; eigene Daten, nicht gezeigt). Der Promotor war verstärkt in Primordien (Abbildung 12 B) und in jungen Lateralwurzeln (Abbildung 12 C) aktiv. In älteren Seitenwurzeln wurde *AtPSK1* vom Lateralwurzelsansatz bis in den Apex in den Zellen uneinheitlich und unterschiedlich stark exprimiert (Abbildung 12 A). Die Expression von *AtPSK1* am Lateralwurzelsansatz wurde während der Lateralwurzelenwicklung in alten Seitenwurzeln schwächer (eigene Daten, nicht gezeigt). In der Wurzelspitze schienen die lateralen Zellen und die Columellazellen der Wurzelhaube verstärkt gefärbt (Abbildung 12 D). In der meristematischen Zone ab circa 70 μm waren neben lateralen Wurzelhaubenzellen einzelne Epidermiszellen gefärbt (Abbildung 12 D). Der Querschnitt durch die Wurzelspitze zeigte jedoch eine unterschiedlich starke *AtPSK1* Promotoraktivität in allen Zellschichten (Abbildung 12 E).

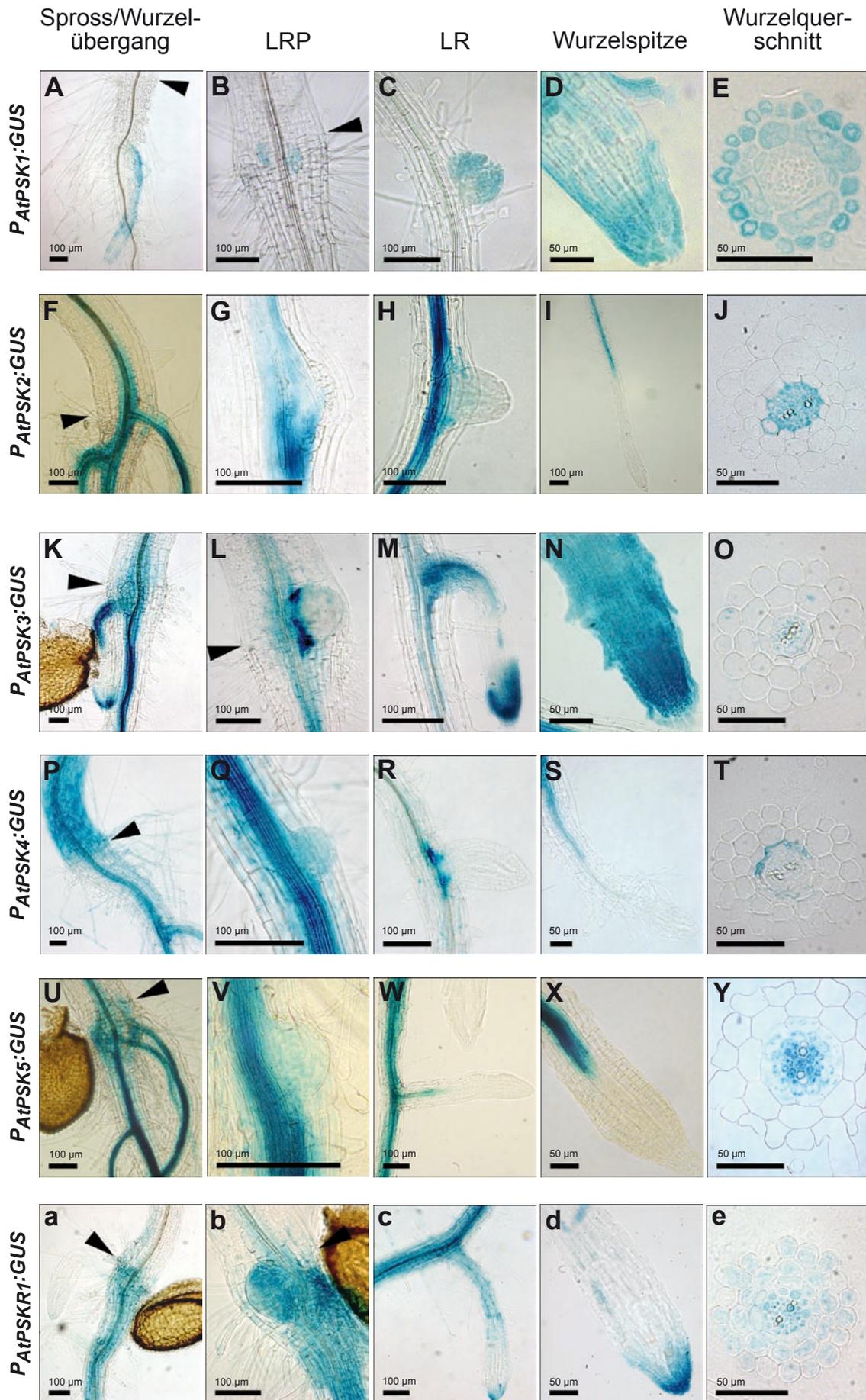


Abb. 12: Promotor-*GUS* Expressionen der PSK-Gene und des PSK-Rezeptorgens *AtPSKR1* in Wurzeln von *Arabidopsis thaliana*. Die Aufnahmen von *GUS* exprimierenden Pflanzengeweben erfolgte unter Hellfeldbedingungen. **A, F, K, P, U, a** zeigen Promotor-*GUS* Expressionen im Spross/Wurzelübergang. Dieser wurde durch einen Pfeil gekennzeichnet. In **B, G, L, R, V, b** sind Promotor-*GUS* Expressionen in Lateralwurzelpromordien, **C, H, M, R, W, c** in Lateralwurzeln und **D, I, N, S, X, d** in Wurzelspitzen von 8 d alten Transformanten und **E, J, O, T, Y, e** in Wurzelquerschnitten von 14 d alten Pflanzen gezeigt.

AtPSK2 wurde verstärkt im Leitgewebe von Haupt- und Lateralwurzeln exprimiert (Abbildung 12 F). Lateralwurzelpromordien und junge Lateralwurzeln waren in $P_{AtPSK2}::GUS$ Transformanten nicht gefärbt (Abbildung 12 G, H). Jedoch war der Promotor an der Basis auswachsender Lateralwurzeln aktiv (Abbildung 12 G, H). *AtPSK2* wurde nicht in der Wurzelhaube oder im meristematischen Bereich exprimiert (Abbildung 12 I), sondern wurde im Leitgewebe kurz vor Beginn der Wurzelhaarzone exprimiert (Abbildung 12 I), circa 550 μm von der Wurzelspitze entfernt. Der Querschnitt zeigte eine *AtPSK2* Expression im Zentralzylinder einschließlich des Perizykels und vereinzelt in Zellen der Endodermis (Abbildung 12 J). Epidermis und Cortex waren hingegen nicht gefärbt (Abbildung 12 J).

AtPSK3 wurde insgesamt stärker im Zentralzylinder der Wurzeln als im Hypokotyl exprimiert (Abbildung 12 K). Die Hauptwurzel war an Positionen der Lateralwurzelpromordien intensiver gefärbt (eigene Daten, nicht gezeigt). Promordien (Abbildung 12 L) und junge Lateralwurzeln (Abbildung 12 K) wiesen eine verstärkte Promotoraktivität an der Basis auf. Das Leitgewebe war in jungen Seitenwurzeln gefärbt (Abbildung 12 K, M). *AtPSK3* wurde im Apex der Wurzeln in einem Bereich von 100 μm oder länger exprimiert, wobei die Columellazellen am stärksten und die lateralen Zellen der Wurzelhaube in basipetaler Richtung schwächer gefärbt waren (Abbildung 12 K, M, N). Die *AtPSK3* Promotoraktivität in der Wurzelspitze war nicht mit der verstärkt im apikalen Meristem lokalisierten *AtCycB1;1* Expression vergleichbar (Abbildung 18 A, Abbildung 12 K, M, N). Von circa 200 μm bis zum Beginn der Wurzelhaarzone bei 550 μm wiesen die $P_{AtPSK3}::GUS$ Transformanten keine Expression in den Wurzeln auf (Abbildung 12 K, M; eigene Daten, nicht gezeigt). Im anschließenden differenzierten Wurzelgewebe war *AtPSK3* im Zentralzylinder einschließlich des Perizykels aktiv, wie im Querschnitt gezeigt (Abbildung 12 O).

AtPSK4 wurde im Zentralzylinder von Haupt- und Lateralwurzeln und im Hypokotyl exprimiert (Abbildung 12 P). In Lateralwurzelpromordien (Abbildung 12 Q) war der *AtPSK4* Promotor schwach und in sich entwickelnden Lateralwurzeln nur an der Basis aktiv (Abbildung 12 R). *AtPSK4* wurde nicht in Wurzelspitzen (Abbildung 12 S), aber in der Wurzelhaarzone im Zentralzylinder exprimiert. Der *AtPSK4* Promotor war im Zentralzylinder und Perizykel sowie vereinzelt in Zellen der Endodermis aktiv (Abbildung 12 T).

AtPSK5 wurde vorrangig im Leitgewebe von Haupt- und Lateralwurzeln und des Hypokotyls exprimiert (Abbildung 12 U). Die Expression war schwach in

Lateralwurzelprimordien (Abbildung 12 V) von P_{AtPSK5} :GUS Transformanten und im Zentralzylinder auswachsender Lateralwurzeln erkennbar (Abbildung 12 W). *AtPSK5* war, ähnlich wie *AtPSK2* und *AtPSK4* nicht im Apex von Haupt- und Lateralwurzeln (Abbildung 12 W, X) aktiv, sondern wurde kurz vor Beginn der Wurzelhaarzone im Leitgewebe exprimiert (Abbildung 12 W). Die Expression im Leitgewebe war teilweise unterhalb 400 μm von der Wurzelspitze nicht mehr erkennbar (Abbildung 12 X). Der *AtPSK5* Promotor war im Zentralzylinder einschließlich des Perizykels und vereinzelt in der Endodermis aktiv, wie im Querschnitt gezeigt (Abbildung 12 Y).

AtPSKR1 wurde in der Primärwurzel aber nicht im Hypokotyl exprimiert (Abbildung 12 a). Der *AtPSKR1* Promotor war sowohl in Lateralwurzelprimordien (Abbildung 12 b) als auch an der Basis der Primordien (Abbildung 12 b) sowie von auswachsenden Lateralwurzeln aktiv (Abbildung 12 c). Die Expression im basalen Teil von Haupt- und Lateralwurzeln umfasste alle Zellschichten (Abbildung 12 a, c, e). Im Apex der Wurzeln wurde *AtPSKR1* verstärkt in der Wurzelhaube exprimiert (Abbildung 12 c, d). Die Columellazellen sowie die lateralen Wurzelhaubenzellen an der Wurzelspitze waren intensiv gefärbt (Abbildung 12 c, d). Ab circa 80 μm wurde *AtPSKR1* schwächer in den lateralen Zellen der Wurzelhaube exprimiert (Abbildung 12 c, d). In der anschließenden subapikalen Zone bis circa 400 μm war nur eine sehr schwache Expression erkennbar, wobei vereinzelte Epidermiszellen gefärbt waren (Abbildung 12 c, d; eigene Daten, nicht gezeigt). Eine spezifische *AtPSKR1* Expression in der meristematischen Zone, wie sie $P_{AtCycB1;1}$:GUS Transformanten zeigen, war nicht erkennbar (Abbildung 12 c, d).

Die PSK-Präproteingene und das PSK-Rezeptorgen wurden spezifisch im Wurzelgewebe exprimiert. Die Expressionen der Präproteingene zeigten Überschneidungen mit der für den PSK-Rezeptor gezeigten Promotoraktivität in Arabidopsis, wie die Zusammenfassung der Ergebnisse in Tabelle 5 zeigt.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Promotor-GUS Expressionen der PSK-Gene und von *AtPSKR1* in Wurzeln von Arabidopsis, welche in Abbildung 12 gezeigt sind. (+) = Expression im Gewebe, (-) = keine Expression im Gewebe, (\pm) = Expression in einzelnen Zellen

Gen \ Gewebe	<i>AtPSK1</i>	<i>AtPSK2</i>	<i>AtPSK3</i>	<i>AtPSK4</i>	<i>AtPSK5</i>	<i>AtPSKR1</i>
Hauptwurzel	Apex	+	+	+	+	+
Primordium	+	+	+	+	+	+
Lateralwurzel	+	+	+	+	+	+
Basis von LRP und LR	-	+	+	+	-	+
Wurzelspitze	Wurzelhaube	-	Wurzelhaube	-	-	Wurzelhaube
Wurzelgewebe	Zentralzylinder, Perizykel	Zentralzylinder, Perizykel, \pm Endodermis	Zentralzylinder, Perizykel	Zentralzylinder, Perizykel, \pm Endodermis	Zentralzylinder, Perizykel, \pm Endodermis	Zentralzylinder, Perizykel, Endodermis, Cortex, Epidermis

Der PSK-Rezeptor wurde in Arabidopsis verstärkt in Wurzeln exprimiert, wobei der Übergang zwischen Spross und Wurzel als deutliche Grenze zu erkennen war. In ausdifferenziertem Wurzelgewebe wurde *AtPSKR1* in allen Zellschichten exprimiert. Die *AtPSKR1* Promotoraktivität überlappt mit der im Zentralzylinder, im Perizykel sowie vereinzelt mit der in der Endodermis lokalisierten Expression der PSK-Gene. Eine Perzeption von PSK- α sowie eine Signaltransduktion wäre in allen Zellschichten ausdifferenzierter Wurzeln möglich. Die Expressionen von *AtPSK1*, *AtPSK3* und von *AtPSKR1* in Wurzelspitzen deuten auf eine lokale Wirkung des Pentapeptids in Columellazellen sowie in lateralen Wurzelhaubenzellen als auch möglicherweise im ruhenden Zentrum und den Stammzellen hin. Eine weitere lokale Wirkung von PSK- α auf die Bildung und Entwicklung von Lateralwurzeln ist durch die beschriebenen Promotoraktivitäten an Initiationsstellen von Lateralwurzeln, in Primordien sowie in jungen Lateralwurzeln zu vermuten. Des Weiteren könnte PSK- α eine Rolle während der Ausbildung des Leitgewebes in Wurzeln spielen.

4.2.4. Die PSK-Präproteingene und *AtPSKR1* sind unterschiedlich stark in vegetativen und reproduktiven Geweben exprimiert

Zur Überprüfung der Promotor-GUS Expressionsstudien wurden die relativen Transkriptmengen der fünf PSK-Präproteingene sowie des PSK-Rezeptorgens bestimmt. mRNA aus vegetativen und reproduktiven Geweben wurde revers transkribiert und anschließend die cDNA mit genspezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. Die Expressionen von *AtPSK1* bis *AtPSK5* sowie von *AtSKR1* sind in Abbildung 13 gezeigt. *ACT2* wurde zur Kontrolle der cDNA Synthese und zur Überprüfung eingesetzter Mengen an mRNA über PCR mit amplifiziert.

Die Menge amplifizierter cDNA war in allen Geweben vergleichbar, außer in jungen Schoten. Damit wurde angenommen, dass die eingesetzten Mengen an mRNA in diesen Proben vergleichbar waren. In keinem der Ansätze wurde genomische DNA amplifiziert.

AtPSK1 wurde stark in jungem, etwas schwächer in älterem Wurzelgewebe, jedoch sehr schwach im Spross und reproduktiven Organen exprimiert (Abbildung 13).

AtPSK2 wurde im Spross, in reproduktiven Organen, in sehr jungen Schoten und in Wurzeln gleichmäßig stark exprimiert. Die Expression in jungen Schoten war hingegen sehr schwach. Insgesamt schien *AtPSK2* am stärksten von allen PSK-Genen exprimiert zu werden (Abbildung 13).

Im Gegensatz zu *AtPSK2* variierten die Transkriptmengen von *AtPSK3* in den untersuchten Geweben stärker (Abbildung 13). Das Präproteingen wurde verstärkt in reproduktiven Organen und in Wurzeln von Keimlingen exprimiert. Das *AtPSK3*

Transkript war im Spross von Keimlingen und im vegetativen Gewebe älterer Pflanzen schwächer nachweisbar. Die Expression schien in den Geweben unterschiedlich reguliert zu werden (Abbildung 13).

AtPSK4 wurde ähnlich wie *AtPSK2* gleichmäßig und stark im Spross, in Blättern, in reproduktiven Organen, in sehr jungen Schoten und in Wurzeln exprimiert (Abbildung 13). Die Expression in jungen Schoten war schwächer, jedoch wurde *AtPSK4* am stärksten von allen PSK-Präproteingenen in diesem Gewebe exprimiert (Abbildung 13).

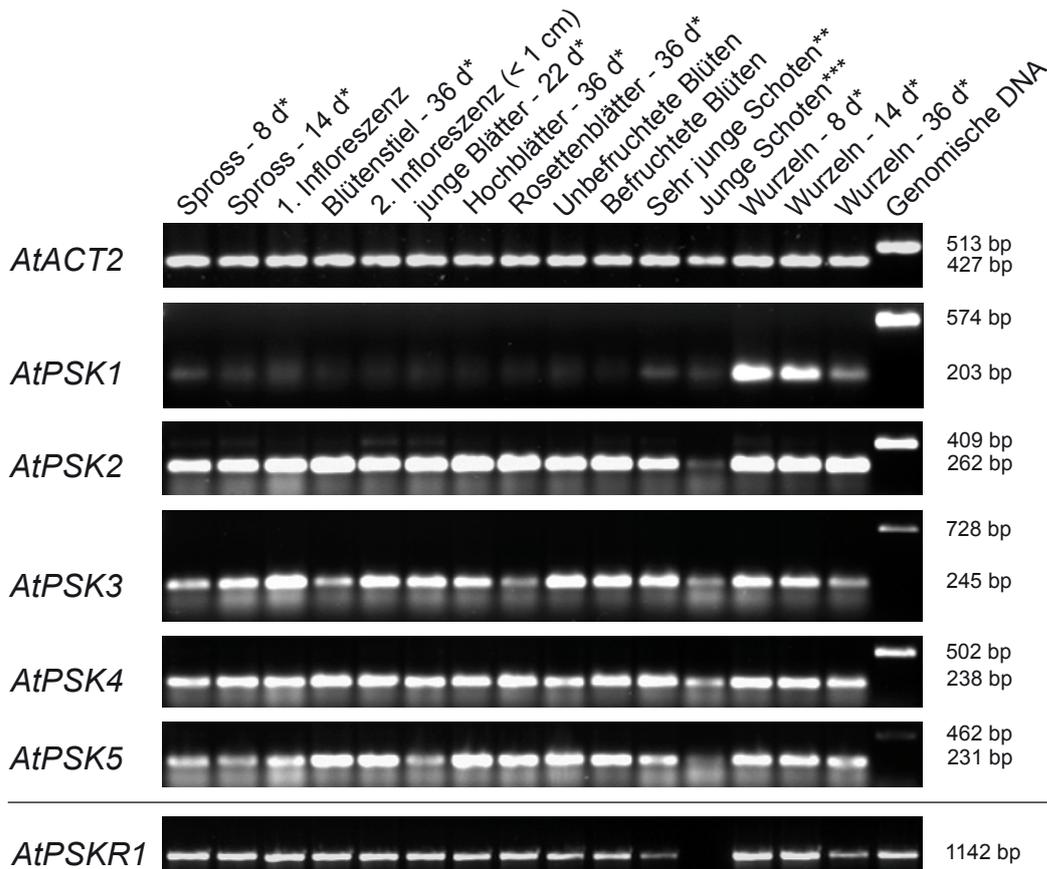


Abb. 13: Semiquantitative RT-PCR Expressionsanalyse der fünf PSK-Gene und des PSK-Rezeptorgens, *AtPSKR1*. Nachweis der cDNA von *AtPSK1* bis *AtPSK5* sowie von *AtPSKR1* in verschiedenen Pflanzengeweben unterschiedlichen Alters von Arabidopsis. (*) Tage nach Keimung. Die Schoten enthalten Samen mit Embryonen im präglobulären Stadium (**) und im Herzstadium (***). Für die Amplifikationen der PSK-Präproteingene wurden jeweils die gleiche cDNA-Menge, entsprechend die doppelte cDNA-Menge für *AtPSKR1* sowie ein Zehntel der cDNA-Menge für das Kontrollgen *ACT2* verwendet. Die Anzahl der PCR-Zyklen betrug 30. Zur Kontrolle wurde genomische DNA über PCR amplifiziert.

Die Transkriptmenge von *AtPSK5* war in Blättern, in reproduktiven Organen und in Wurzeln erhöht (Abbildung 13). Im Spross von Keimlingen sowie von jungen Pflanzen und in jungen Schoten wurde *AtPSK5* schwächer exprimiert. Die Expression von *AtPSK5* schien gewebespezifisch reguliert zu sein (Abbildung 13).

Die cDNA des PSK-Rezeptors wurde in allen Pflanzengeweben, außer in jungen

Schoten amplifiziert (Abbildung 13). Im Spross, in Infloreszenzen und in jüngeren Wurzeln wurde *AtPSKR1* gleichmäßig exprimiert. Hingegen war die Expression in Schoten sowie in älteren Wurzeln schwächer. Insgesamt zeigte *AtPSKR1* verglichen mit den PSK-Präproteingenen eine relativ schwache Expression (Abbildung 13).

Durch den Nachweis der Transkripte der PSK-Präproteingene und des Rezeptorgens in Spross und Wurzeln sowie in reproduktiven Organen von *Arabidopsis* konnten die gezeigten Genexpressionen in vegetativen und reproduktiven Geweben bestätigt werden. Beispielsweise war eine wurzelspezifische und schwache Expression von *AtPSK1* im Spross und in reproduktiven Organen sowie eine verstärkte *AtPSK4* Expression in Schoten erkennbar. Darüber hinaus konnte durch die RT-PCR Expressionsanalyse der PSK-Präproteingene und des Rezeptorgens eine unterschiedlich starke Expression der PSK-Präproteingene und von *AtPSKR1* in *Arabidopsis* gezeigt werden. Demnach wurde das PSK-Rezeptorgen wesentlich schwächer als die PSK-Präproteingene exprimiert.

4.3. Einfluss von PSK- α auf das Wachstum von *Arabidopsis* und Mais

Für Wachstumsversuche an *Arabidopsis thaliana* und *Zea mays* wurde synthetisch hergestelltes PSK- α eingesetzt. Zusätzlich wurden weitere Effektoren, ein unsulfatiertes Pentapeptid (dsPSK), welches eine mehr als tausendfach verringerte Aktivität im Vergleich zu PSK- α besitzt (Matsubayashi *et al.*, 1996) verwendet. Des Weiteren wurden für die Untersuchungen einzelne, im Pentapeptid vorkommende Aminosäuren (AS) in äquimolarer Konzentration eingesetzt.

4.3.1. PSK- α fördert das Wurzelwachstum von *Arabidopsis*

Um einen Einfluss von PSK- α auf das Wachstum zu untersuchen, wurden *Arabidopsis*-pflanzen für 14 d mit 10^{-10} bis 10^{-5} M PSK- α , unsulfatiertes Pentapeptid (dsPSK) oder ohne Effektor angezogen. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Frischgewichts vom Spross und Wurzeln. Die Behandlung der Pflanzen mit verschiedenen Konzentrationen an PSK- α hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Sprosswachstum (Abbildung 14 A). Die ermittelten Frischgewichte unterschieden sich sowohl bei niedrigen, als auch bei höheren Konzentrationen an PSK- α nicht signifikant von denen der unbehandelten Pflanzen (Abbildung 14 A). Die Behandlung mit 10^{-10} bis 10^{-5} M dsPSK hatte keinem signifikanten Einfluss auf das Sprosswachstum im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (Abbildung 14 A).

Die Behandlung von *Arabidopsis* mit 10^{-8} bis 10^{-5} M PSK- α führte zu einer signifikanten Zunahme ($P < 0,05$) des Wurzelfrischgewichts um 20% (Abbildung 14 B). Im Gegensatz

zur Behandlung mit PSK- α hatte die Anzucht mit verschiedenen Konzentrationen an dsPSK keinen Einfluss auf das Wurzelwachstum der untersuchten Pflanzen (Abbildung 14 B). Die ermittelten Wurzelfrischgewichte unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle (Abbildung 14 B).

Ab einer Konzentration von 10^{-8} M und höher hatte PSK- α einen fördernden Einfluss auf das Wurzelwachstum von Arabidopsis. Dieses erhöhte Wachstum führte jedoch zu keiner messbaren Zunahme des Sprossgewichts. Die Behandlung der Pflanzen mit 10^{-10} bis 10^{-5} M dsPSK führte weder zu einer Zunahme des Spross-, noch des Wurzelgewichts der Pflanzen.

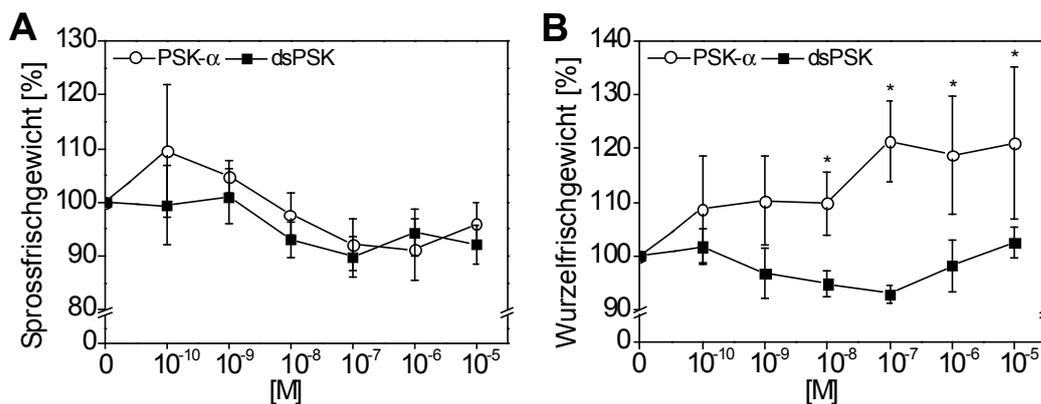


Abb. 14: Einfluss von PSK- α auf das Spross- und Wurzelwachstum von Arabidopsis. 14 d alte Pflanzen wurden ohne Effektor, mit 10^{-10} bis 10^{-5} M PSK- α oder unsulfatiertem Pentapeptid (dsPSK) angezogen. **A** Sprossfrischgewicht. **B** Wurzelfrischgewicht. Die Mittelwerte von $n = 30$ bis 45 Pflanzen sind mit Standardfehler angegeben. Die nach dem Mann-Whitney-Test signifikant unterschiedlichen Werte sind mit Sternchen angegeben.

4.3.2. PSK- α hat keinen Einfluss auf das Sprosswachstum von *Zea mays* Keimlingen

Die Wirkung von PSK- α auf die Koleoptil- und Primärblattentwicklung und das Sprosswachstum von *Zea mays* wurde untersucht. Dafür wurden Maiskeimlinge ohne Effektor, mit 10^{-10} bis 10^{-6} M PSK- α , dsPSK oder den einzelnen Aminosäuren in äquimolarer Konzentration behandelt. Die Koleoptil- und Primärblattlänge sowie des Sprossfrischgewicht von 7 d alten Keimlingen ist in Abbildung 15 gezeigt. Die mit PSK- α behandelten Maiskeimlinge wiesen bei den untersuchten Konzentrationen kein verändertes Koleoptilwachstum auf (Abbildung 15 A). Die Anzucht der Pflanzen mit dsPSK oder den einzelnen Aminosäuren führte ebenfalls zu keinem verändertem Koleoptilwachstum (Abbildung 15 A).

Die Primärblattlängen der Keimlinge waren nach PSK- α Behandlung mit denen der Kontrolle vergleichbar (Abbildung 15 B). Die exogene Applikation von dsPSK sowie der einzelnen AS führten zu keinem verändertem Primärblattwachstum (Abbildung 15 B).

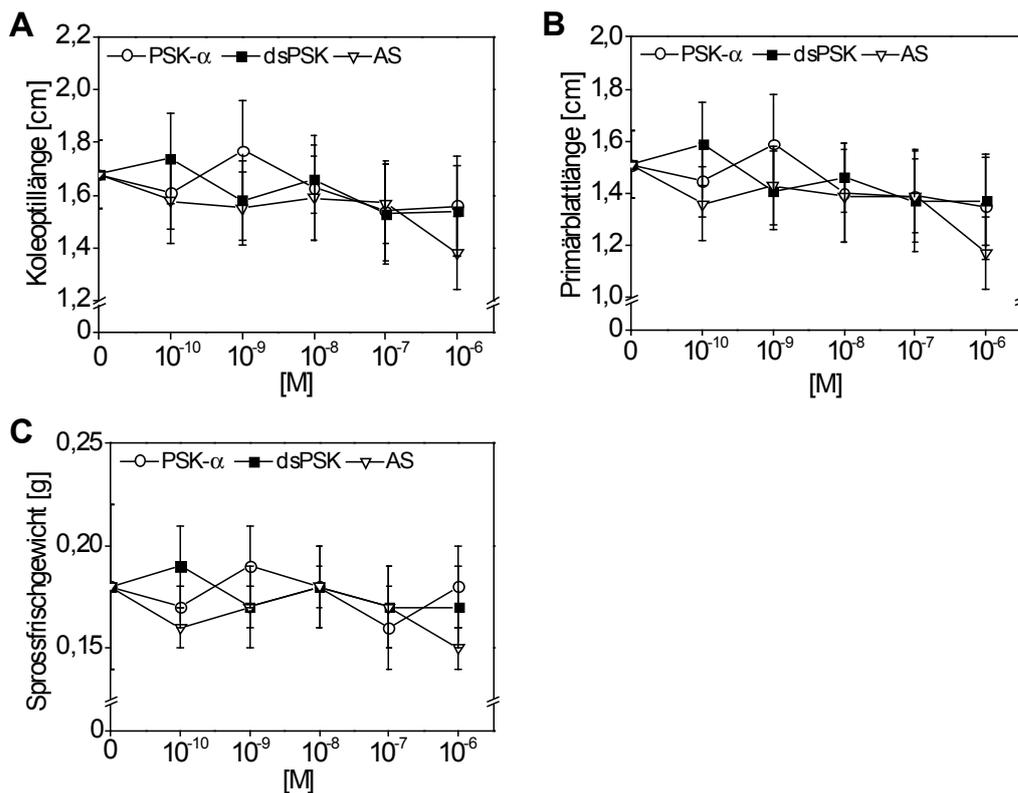


Abb. 15: PSK- α fördert das Sprosswachstum von Mais nicht. Maiskeimlinge wurden 7 d ohne Effektor, mit 10^{-10} bis 10^{-6} M PSK- α , dsPSK oder den einzelnen Aminosäuren in äquimolarer Konzentration behandelt. Bestimmung der **A** Koleoptillenlänge, **B** Länge des Primärblattes und **C** des Sprossfrischgewichts pro Pflanze. Die Mittelwerte von $n = 26$ bis 32 Pflanzen sind mit Standardfehler angegeben. Nach dem Mann-Whitney-Test waren die Werte nicht signifikant unterschiedlich.

Die Bestimmung der Sprossgewichte ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit PSK- α behandelten Keimlingen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 15 C). Die Anzucht der Pflanzen mit dsPSK oder den Aminosäuren führte ebenfalls zu keinem signifikant verändertem Sprosswachstum (Abbildung 15 C).

Wie schon für Arabidopsispflanzen gezeigt wurde, führte die PSK- α Behandlung zu keinen verändertem Sprosswachstum in Maiskeimlingen. PSK- α hatte somit keinen spezifischen Einfluss auf die Entwicklung der Maiskoleoptile und des Primärblattes.

4.3.3. *Atpskr1-T* besitzt ein verringertes Spross- und Wurzelwachstum

Die PSK-Rezeptor T-DNA Insertionsmutante (*Atpskr1-T*) wurde phänotypisch untersucht. In Wachstumsversuchen war ein vermindertes Spross- und Wurzelwachstum von *Atpskr1-T* Pflanzen im Vergleich zum WT erkennbar (Abbildung 16 A).

Von 14 d alten *Atpskr1-T* Pflanzen war das Sprossfrischgewicht um 20% ($P < 0,05$) und das Wurzelgewicht um 40% ($P < 0,001$) gegenüber dem WT vermindert (Abbildung 16 B, C). Das Wachstum *Atpskr1-T* Pflanzen wurde des Weiteren nach Behandlung

mit Effektoren, wie 1 μM PSK- α , 1 μM dsPSK oder der im Pentapeptid vorkommenden Aminosäuren in äquimolarer Konzentration, untersucht (Abbildung 16 B, C). Wurden *Atpskr1-T* und WT Pflanzen für 14 d mit 1 μM PSK- α , 1 μM dsPSK oder 1 μM der entsprechenden Aminosäuren angezogen, waren keine signifikanten Zunahmen der Sprossgewichte messbar (Abbildung 16 B).

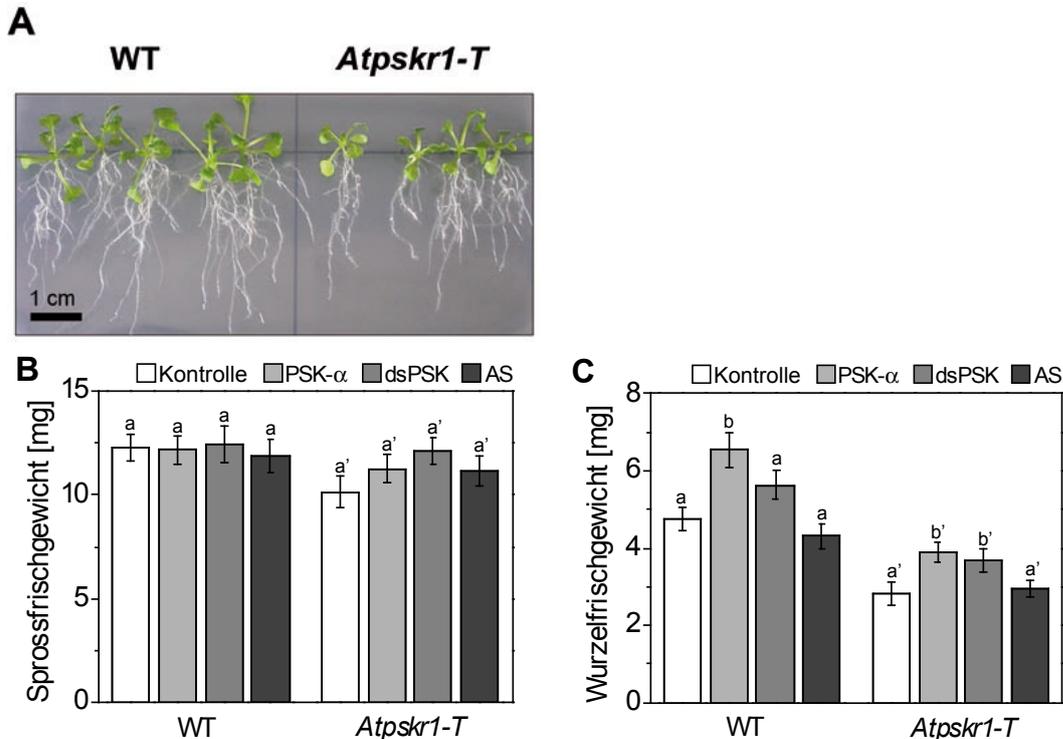


Abb. 16: Charakterisierung des Spross- und Wurzelwachstums von WT und *Atpskr1-T* Pflanzen. **A** Spross- u. Wurzelwachstum von 14 d alten WT und *Atpskr1-T*. **B, C** Bestimmung des Spross- und Wurzelfrischgewichts von WT und *Atpskr1-T* nach 14 d Anzucht auf MS-Medium (Kontrolle), mit 1 μM PSK- α , 1 μM dsPSK oder mit den im Pentapeptid vorkommenden Aminosäuren (AS) in äquimolarer Konzentration. Die Mittelwerte von $n = 36$ bis 50 Pflanzen sind mit Standardfehler angegeben. Nach dem Mann-Whitney-Test signifikant unterschiedliche Werte sind mit verschiedenen Buchstaben angegeben. Die Gruppenzugehörigkeit ist mit einem Apostroph gekennzeichnet.

Das Wurzelfrischgewicht war nach 14 d PSK- α Behandlung nicht nur im WT sondern ebenfalls in der Mutante im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Abbildung 16 C). Die Zunahme betrug sowohl im WT, als auch in *Atpskr1-T* 37%. Die Behandlung mit 1 μM dsPSK führte zu keiner signifikanten Zunahme des Wurzelfrischgewichts im WT. Dieses war in *Atpskr1-T* Pflanzen signifikant erhöht. Die Aminosäuren hatten keinen fördernden Einfluss auf das Wurzelwachstum von *Atpskr1-T* Pflanzen (Abbildung 16 C).

Die Behandlung mit PSK- α führte im WT zu einem erhöhten Wurzelfrischgewicht, wodurch ein Einfluss des Pentapeptids auf das Wurzelwachstum erneut gezeigt wurde (Abbildung 14 B). In *Atpskr1-T* Pflanzen wurde das Wurzelwachstum durch PSK- α gleichermaßen induziert. Das Ergebnis lässt die Existenz eines alternativen PSK- α Signalübertragungsweges via eines noch unbekanntem Rezeptors in Arabidopsis

vermuten. In *Atpskr1-T* war nach dsPSK Behandlung das Wurzelfrischgewicht ebenfalls erhöht. Anscheinend reichte die eingesetzte Konzentration aus, um Wurzelwachstum in der Mutante zu induzieren. Die Behandlung der Pflanzen mit den Aminosäuren zeigte, dass die Zunahme des Frischgewichts nicht auf ein erhöhtes Nährstoffangebot der Pflanzen zurückzuführen war.

4.3.4. Die Hauptwurzeln von *Atpskr1-T* sind kürzer als im WT

Um festzustellen, wieso die PSK-Rezeptormutante eine verringerte Wurzelmasse im Vergleich zum WT ausbildete, wurde das Wurzelwachstum von *Atpskr1-T* untersucht. Dafür wurden WT und *Atpskr1-T* Pflanzen für 7 d ohne Effektor, mit 1 μ M PSK- α , 1 μ M dsPSK oder 1 μ M der entsprechenden Aminosäuren behandelt. Nach 7 d wurde die Länge der Haupt- und Lateralwurzeln sowie die Anzahl der Seitenwurzeln von der Primärwurzel bestimmt.

Atpskr1-T Keimlinge wiesen deutlich kürzere Hauptwurzeln als der WT auf (Abbildung 17 A). Die ohne Effektor angezogene Rezeptormutante besaß um 35% signifikant kürzere ($P < 0,001$) Hauptwurzeln als der Wildtyp (Abbildung 17 B). Die Behandlung der *Atpskr1-T* und WT Keimlinge mit 1 μ M PSK- α führte jeweils zu signifikant längeren Hauptwurzeln im Vergleich zur Kontrolle, den mit dsPSK oder den Aminosäuren angezogenen Pflanzen (Abbildung 17 B).

Die Zunahme der Wurzellänge betrug im WT 23% und in *Atpskr1-T* Pflanzen 30%. Die Hauptwurzellänge von *Atpskr1-T* war nach PSK- α Behandlung mit der Länge der unbehandelten WT Pflanzen vergleichbar. Wildtypkeimlinge, die mit 1 μ M dsPSK angezogen wurden, hatten eine signifikant längere Hauptwurzel im Vergleich zur Kontrolle und mit AS behandelten Pflanzen. Hingegen war die Hauptwurzel der Rezeptormutante nicht signifikant länger. Die Aminosäuren hatten weder einen Wachstum fördernden Einfluss auf die Hauptwurzel der WT, noch der *Atpskr1-T* Keimlinge (Abbildung 17 B).

Die Gesamtlängen der Lateralwurzeln von *Atpskr1-T* Keimlingen war mit dem WT vergleichbar (Abbildung 17 C). Die PSK- α Behandlung führte im WT zu 45% längeren Lateralwurzeln im Vergleich zur Kontrolle. In *Atpskr1-T* Keimlingen hingegen waren die Lateralwurzeln nicht signifikant länger. Das Lateralwurzelnwachstum des WT und von *Atpskr1-T* war nach Behandlung mit dsPSK oder den Aminosäuren nicht erhöht (Abbildung 17 C).

Um einen Einfluss von PSK- α auf die Bildung von Lateralwurzeln zu untersuchen, wurde die Anzahl der Lateralwurzeln von 7 d alten Wildtyp und *Atpskr1-T* Keimlingen bestimmt (Abbildung 17 D). WT und *Atpskr1-T* Keimlinge unterschieden sich nicht in der Anzahl der ausgebildeten Lateralwurzeln. Die Behandlung der Keimlinge mit 1 μ M PSK- α führte zu einem signifikanten Anstieg der Seitenwurzeln um 27% im WT und um 24% in

Atpskr1-T im Vergleich zur Kontrolle. Gegenüber den mit dsPSK oder Aminosäuren angezogenen Pflanzen, führte die Behandlung mit PSK- α im WT und der Mutante zu einer nicht signifikant erhöhten Anzahl der Lateralwurzeln. Das dsPSK oder die Aminosäuren hatten keinen Einfluss auf die Zahl der gebildeten Seitenwurzeln (Abbildung 17 D).

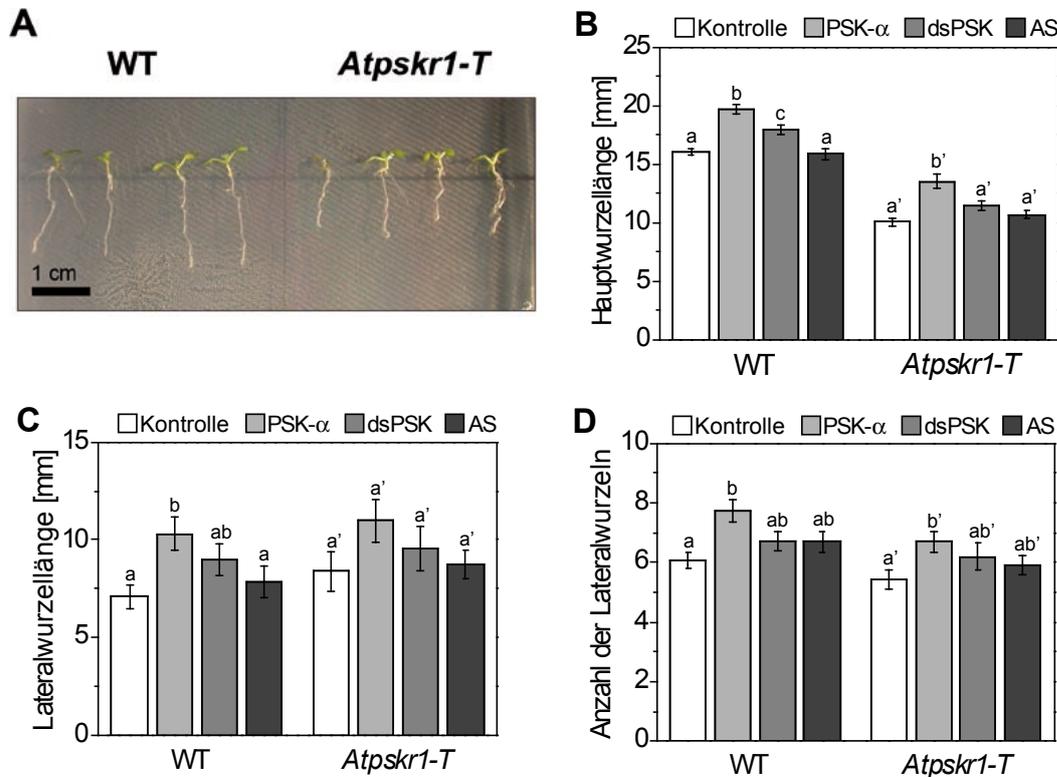


Abb. 17: Vergleich der Wurzellängen und der Anzahl der Lateralwurzeln von 7 d alten WT und *Atpskr1-T* Keimlingen. **A** 7 d alte WT und *Atpskr1-T* Keimlinge. **B** Die Keimlinge wurden 7 d ohne Effektor (Kontrolle), 1 μ M PSK- α , 1 μ M dsPSK oder mit den im Pentapeptid vorkommenden Aminosäuren (AS) in äquimolarer Konzentration behandelt. Anschließend wurde die Hauptwurzellänge von WT und *Atpskr1-T* Keimlingen bestimmt. **C** Länge der Lateralwurzeln pro Pflanze. Diese ergab sich aus der Summe der Längen der einzelnen Lateralwurzeln. **D** Anzahl der Lateralwurzeln von WT und *Atpskr1-T* Pflanzen. Die Mittelwerte von $n = 32$ bis 48 Pflanzen sind mit Standardfehler angegeben. Nach dem Mann-Whitney-Test signifikant unterschiedliche Werte sind mit verschiedenen Buchstaben angegeben und die Gruppenzugehörigkeit mit einem Apostroph gekennzeichnet.

In *Atpskr1-T* Pflanzen war das Wachstum der Hauptwurzel im Vergleich zum WT inhibiert. Jedoch schien Anzahl und Länge der Lateralwurzeln nicht verändert. Folglich wies die Mutante eine höhere Lateralwurzelichte im Gegensatz zum WT auf. PSK- α förderte sowohl im WT, als auch in *Atpskr1-T* Keimlingen das Hauptwurzelwachstum. Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass AtPSKR1 nicht der einzige mögliche PSK-Rezeptor in *Arabidopsis thaliana* sein muss.

4.3.5. PSK- α beeinflusst die Lateralwurzeldichte der Hauptwurzel nicht

In Wachstumsversuchen mit Arabidopsispflanzen wurde gezeigt, dass PSK- α einen Einfluss auf die Haupt- und Lateralwurzellänge hatte. Um zu untersuchen, ob die erhöhte Anzahl der Seitenwurzeln nach PSK- α Behandlung ebenfalls zu einer erhöhten Initiation von Lateralwurzeln führt, wurden $P_{AtCycB1;1}::GUS$ Pflanzen verwendet. Sie exprimieren das Reportergen β -Glucuronidase unter der Kontrolle des $CycB1;1$ -Promotors in Pflanzengeweben. Die $CycB1;1$ Transkriptmenge nimmt während der G2-Phase im Zellteilungszyklus zu und erreicht ein Maximum am Phasenübergang von der G2→M-Phase (Beeckmann *et al.*, 2001). $P_{AtCycB1;1}::GUS$ dienen als Marker der ersten antiklinen Zellteilung der „Gründerzellen“ im Perizykel und somit zur Lateralwurzelinitiation (De Smet *et al.*, 2006). Die $CycB1;1$ Expression während der Lateralwurzelentwicklung in *Arabidopsis* ist in Abbildung 18 in A bis C exemplarisch gezeigt.

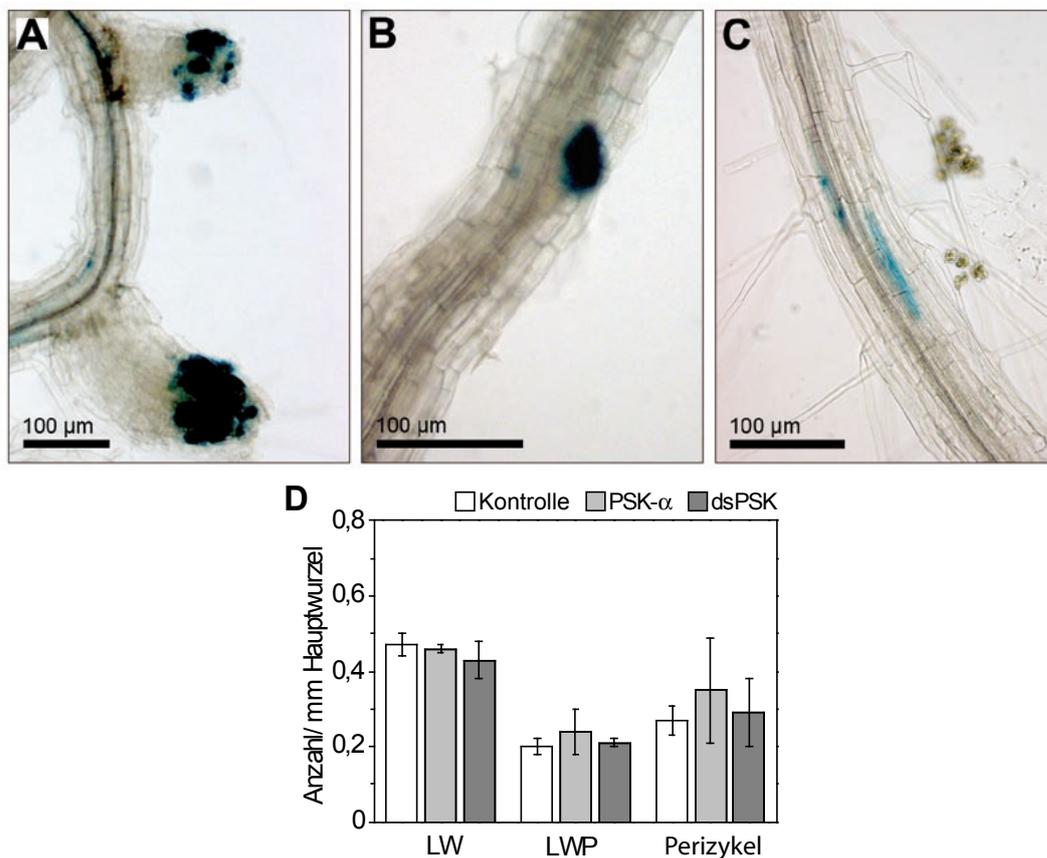


Abb. 18: Untersuchung der Lateralwurzelbildung an $P_{AtCycB1;1}::GUS$ Pflanzen. Anzucht der $P_{AtCycB1;1}::GUS$ Pflanzen ohne Effektor, mit 1 μ M PSK- α oder 1 μ M dsPSK. Die Wurzeln wurden unter Hellfeldbedingungen fotografiert. **A** $CycB1;1$ Expression im apikalen Wurzelmeristem von Lateralwurzeln, vereinzelt im Perizykel der Hauptwurzel und **B** im Lateralwurzelprimordium. **C** $CycB1;1$ exprimierende Zellen des Perizykels. **D** Die Anzahl, der von der Primärwurzel abgehenden Lateralwurzeln (LW), die Anzahl der Lateralwurzelprimordien (LWP) und die Anzahl $CycB1;1$ exprimierender Zellen des Perizykel wurde auf ein mm Hauptwurzel bezogen. Die Mittelwerte von $n = 30$ bis 47 Pflanzen sind mit Standardfehler angegeben. Die Werte waren nach dem Mann-Whitney-Test nicht signifikant unterschiedlich.

Die Expression des mitotischen *CycB1;1* war im apikalen Meristem der Lateralwurzeln, im Lateralwurzelprimordium und in teilungsaktiven Zellen des Perizykel lokalisiert. *P_{AtCycB1;1}:GUS* Pflanzen wurden 7 d ohne Effektor, mit 1 μ M PSK- α oder 1 μ M dsPSK behandelt. Anschließend wurde die Länge der Hauptwurzel ermittelt und anhand der *CycB1;1* Expression die Anzahl der Lateralwurzeln, der Lateralwurzelprimordien und der teilungsaktiven Zellen des Perizykels bestimmt.

Wie für 7 d alte WT Keimlinge gezeigt, entwickelten *P_{AtCycB1;1}:GUS* Pflanzen in Gegenwart von 1 μ M PSK- α längere Primär- und Lateralwurzeln und eine erhöhte Anzahl von Lateralwurzeln als Kontrollpflanzen (eigene Daten, nicht gezeigt). Die Anzahl von Lateralwurzeln, die pro mm Hauptwurzel gebildet wurden, war nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu unbehandelten oder mit dsPSK behandelten Pflanzen (Abbildung 18 D). Ebenso war die Anzahl der Lateralwurzelprimordien und der sich in Teilung befindender Zellen des Perizykels in den Keimlingen am höchsten, die mit 1 μ M PSK- α behandelt wurden (eigene Daten, nicht gezeigt). Jedoch führte die Behandlung zu keiner signifikant erhöhten Anzahl gebildeter Primordien sowie sich teilender Zellen im Perizykel gegenüber den Kontrollen (Abbildung 18 D).

Obwohl die Behandlung mit PSK- α in Arabidospispflanzen zu einer Zunahme der Wurzellänge und der Anzahl der Lateralwurzeln führt, war das Verhältnis pro mm Hauptwurzel gebildeter Lateralwurzeln, Primordien und sich teilender Zellen des Perizykel nicht signifikant erhöht. PSK- α hatte somit keinen Einfluss auf die Initiation der Lateralwurzeln.

4.4. PSK- α beeinflusst die Entwicklung von Blütenorganen und somit die Reproduktion in Arabidopsis

4.4.1. Der Aufbau von *Atpskr1-T* Blüten ist gegenüber dem Wildtyp unverändert

Der Aufbau von Blüten und die Morphologie der Blütenorgane der PSK-Rezeptor T-DNA Insertionslinie wurden untersucht. Dafür wurden die ältesten Blüten der Infloreszenz gewählt, da die Blütenorgane vollständig ausgebildet und erkennbar waren. Die Blüten vor und während der Befruchtung entsprachen den Entwicklungsstadien 12 bis 14 (Roeder und Yanofsky, 2006; Smyth *et al.*, 1990). In Abbildung 19 sind die Querschnitte von *Atpskr1-T* und WT Blüten gezeigt. Es wurden je drei Blüten analysiert. Anhand einer Blüte sind exemplarisch die vier Schnittebenen verdeutlicht (Abbildung 19 A). Die Linien eins bis vier entsprechen den Querschnitten durch den apikalen Teil des Stylus, den mittleren Teil und den basalen Teil der Blüte sowie den Blütenboden.

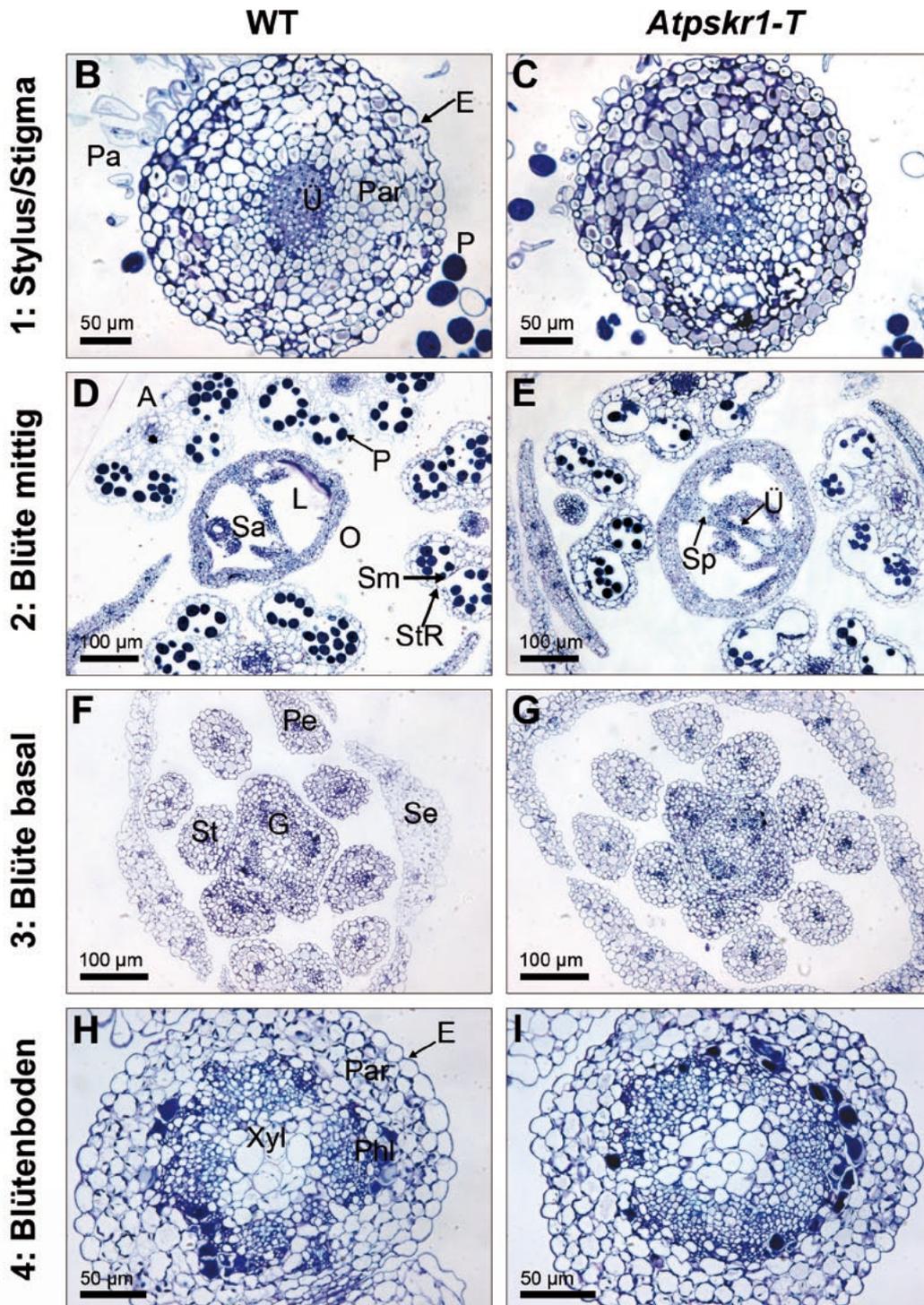
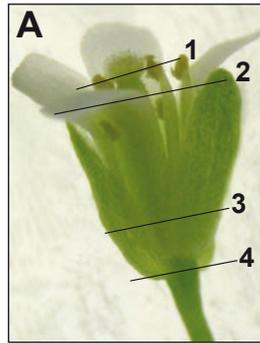


Abb. 19: Morphologie von WT und *Atpskr1-T* Blüten. 1 µm dicke Querschnitte von Blüten wurden unter Hellfeldbedingungen fotografiert. Die Einbettung der Blüten, die Anfertigung sowie die Anfärbung der Schnitte wurde von der Zentralen Mikroskopie des Botanischen Institutes der CAU Kiel durchgeführt. **A** Die Linien zeigen die Position der Querschnitte durch WT und *Atpskr1-T* Blüten. **1** Apikaler Teil des Stylus (B, C). **2** Blütenmitte auf der Höhe der Antheren (D, E). **3** Basaler Teil der Blüte (F, G). **4** Blütenboden (H, I). Stylus von **B** WT und **C** *Atpskr1-T* Blüten während der Befruchtung. Die Papillazellen (Pa) des Stigmas und der Pollen (P) sind erkennbar. Der Stylus ist abaxial aus einer Epidermis (E), anschließend aus Parenchymzellen (Par) und dem adaxialen, dunkler gefärbten Übertragungsgewebe (Ü) aufgebaut. **D** WT und **E** *Atpskr1-T* Blüten 1 d vor Befruchtung mit Antheren (A) mit degeneriertem Septum (Sm), aber vor dem Aufbruch der Stomiumregion (StR) und der Freisetzung der Pollen (P). Das Ovarium (O) wird durch das Septum (Sp) in zwei Loculi (L) unterteilt. Die Samenanlagen (Sa) wachsen in je zwei Reihen entlang des Septums, welches mittig vom Übertragungsgewebe (Ü) durchzogen ist. In **F** WT und **G** *Atpskr1-T* Blüten 1 d vor Befruchtung sind um das Gynoeceum (G) in der Mitte die sechs Stamina (St), anschließend die vier Petalen (Pe) und die vier Sepalen (Se) angeordnet. Der Blütenboden von **H** WT und **I** *Atpskr1-T* ist aus der abaxialen Epidermis (E), den Parenchymzellen (Par) und dem adaxialen Leitgewebe mit dem Xylem (Xyl) und Phloem (Phl) aufgebaut.

Der Aufbau des Stylus von *Atpskr1-T* Blüten während der Befruchtung, mit Epidermis, Parenchymzellen und dem mittig liegenden Übertragungsgewebe unterschied sich nicht vom WT (Abbildung 19 B, C). Jedoch wies das Übertragungsgewebe nicht die gleiche kompakte Struktur wie im WT auf. Einzelne Zellen waren vergrößert (Abbildung 19 B, C).

Im Querschnitt von mittig geschnittenen WT und *Atpskr1-T* Blüten kurz vor Befruchtung waren vier der sechs Antheren in der Schnittebene (Abbildung 19 D, E). In zwei von vier Antheren kurz vor der Dehiscenz war jeweils das Septum degeneriert und die beiden Pollensäcke vereinigt. Die Pollen der Mutante besaßen eine inhomogenere Morphologie im Vergleich zum WT. Die differierende Anzahl der Pollen in *Atpskr1-T* Antheren war kein phänotypisches Merkmal, sondern lag an der Schnitttechnik. In den Loculi des Ovariums von *Atpskr1-T* und WT Gynoeceen sind die Samenanlagen zu sehen, die über die Funiculi mit dem Septum verbunden waren. Zwei von vier Ovularreihen entlang des Septums waren im Querschnitt von *Atpskr1-T* und WT erkennbar. In der Mitte des Septums war das stärker angefärbte Übertragungsgewebe sichtbar, welches sich bis zum basalen Teil des Ovariums zog (Abbildung 19 D, E; eigene Daten, nicht gezeigt). Insgesamt war keine unterschiedliche Morphologie des *Atpskr1-T* Gynoeceums feststellbar (Abbildung 19 D, E).

Im Querschnitt durch den basalen Teil von *Atpskr1-T* und WT Blüten ist der symmetrische Blütenaufbau zu sehen, aus vier Sepalen, vier Petalen, sechs Stamina und dem sich in der Mitte befindenden Gynoeceum (Abbildung 19 F, G). Die Zellen des Leitgewebes waren stärker gefärbt und gut zu erkennen (Abbildung 19 F, G). Der Bau der *Atpskr1-T* Blüte war mit dem des WT vergleichbar.

Der Querschnitt durch den Blütenboden von *Atpskr1-T* Blüten, mit der außen liegenden Epidermis, den Parenchymzellen und dem Leitgewebe in der Mitte, unterschied sich nicht vom WT (Abbildung 19 H, I). Die Morphologie des Leitgewebes mit dem

dunkel angefärbten Phloemzellen und den großen Gefäßelementen des Xylem war in Mutante und WT vergleichbar (Abbildung 19 H, I).

Aus den Querschnitten waren keine grundsätzlichen Unterschiede im Aufbau von *Atpskr1-T* Blüten erkennbar. Möglicherweise war in *Atpskr1-T* Blüten im Gegensatz zum WT die Keimung der Pollen vorangeschritten. Möglicherweise sind die vergrößerten Zellen des *Atpskr1-T* Übertragungsgewebes auf die Aktivität zellwandverdauender Enzyme während des Pollenschlauchwachstums zurückzuführen. Die Auswirkung der veränderten Pollenmorphologie auf die Fertilität von *Atpskr1-T* Pflanzen wurde in der Arbeit genauer untersucht und ist in den folgenden Abschnitten beschrieben.

4.4.2. Die Samenbildung in *Atpskr1-T* ist reduziert

Neben einer veränderten Pollenmorphologie war die unterschiedliche Entwicklung der Schoten von *Atpskr1-T* Pflanzen auffällig. Deutlich wurde der Phänotyp durch die exemplarische Anordnung der Schoten der ersten Infloreszenz einer 7 Wochen alten *Atpskr1-T* Pflanze im Vergleich zum WT. Die Schoten sind nach dem Alter bis zur Blüte in Abbildung 20 A, B gezeigt. Ältere WT Schoten waren über 1 cm und jüngere 200 bis 300 µm lang (Abbildung 20 A). Die Schoten der Rezeptormutante wiesen hingegen sehr unterschiedliche Längen auf (Abbildung 20 B). Die älteren *Atpskr1-T* Schoten erreichten nicht die Länge der Schoten von WT Pflanzen, sondern waren kürzer (Abbildung 20 A, B). Vereinzelt Schoten schienen normal entwickelt und waren wie im WT über 1 cm lang. Die jüngsten *Atpskr1-T* Schoten waren in der Länge mit dem WT vergleichbar (Abbildung 20 A, B).

Samen des WT waren regelmäßig entwickelt (Abbildung 20 C). Hingegen enthielten Schoten von *Atpskr1-T* Pflanzen neben ähnlich dem WT entwickelten Samen weiße, nicht entwickelte Samen (Abbildung 20 D). Die abgebildeten entwickelten Samen der Mutante enthielten zum Zeitpunkt der Untersuchung Embryonen im Kotyledonenstadium. Die Morphologie war mit der des WT vergleichbar (eigene Daten, nicht gezeigt). Neben entwickelten und nicht entwickelten Samen enthielten WT und *Atpskr1-T* Schoten vertrocknete, bräunliche Samen in den Schoten (eigene Daten, nicht gezeigt). Der Anteil dieser Samen lag unter 1% und war in WT und *Atpskr1-T* Pflanzen vergleichbar.

Um die unterschiedliche Samenentwicklung von *Atpskr1-T* und WT besser beschreiben zu können, wurde der prozentuale Anteil entwickelter und nicht entwickelter Samen von je 150 Schoten bestimmt (Abbildung 20 G, H). Die Anzahl entwickelter Samen von WT Schoten unterschied sich mit 73% hoch signifikant ($P < 0,001$) von der Anzahl entwickelter Samen in *Atpskr1-T* Schoten mit 37% (Abbildung 20 G).

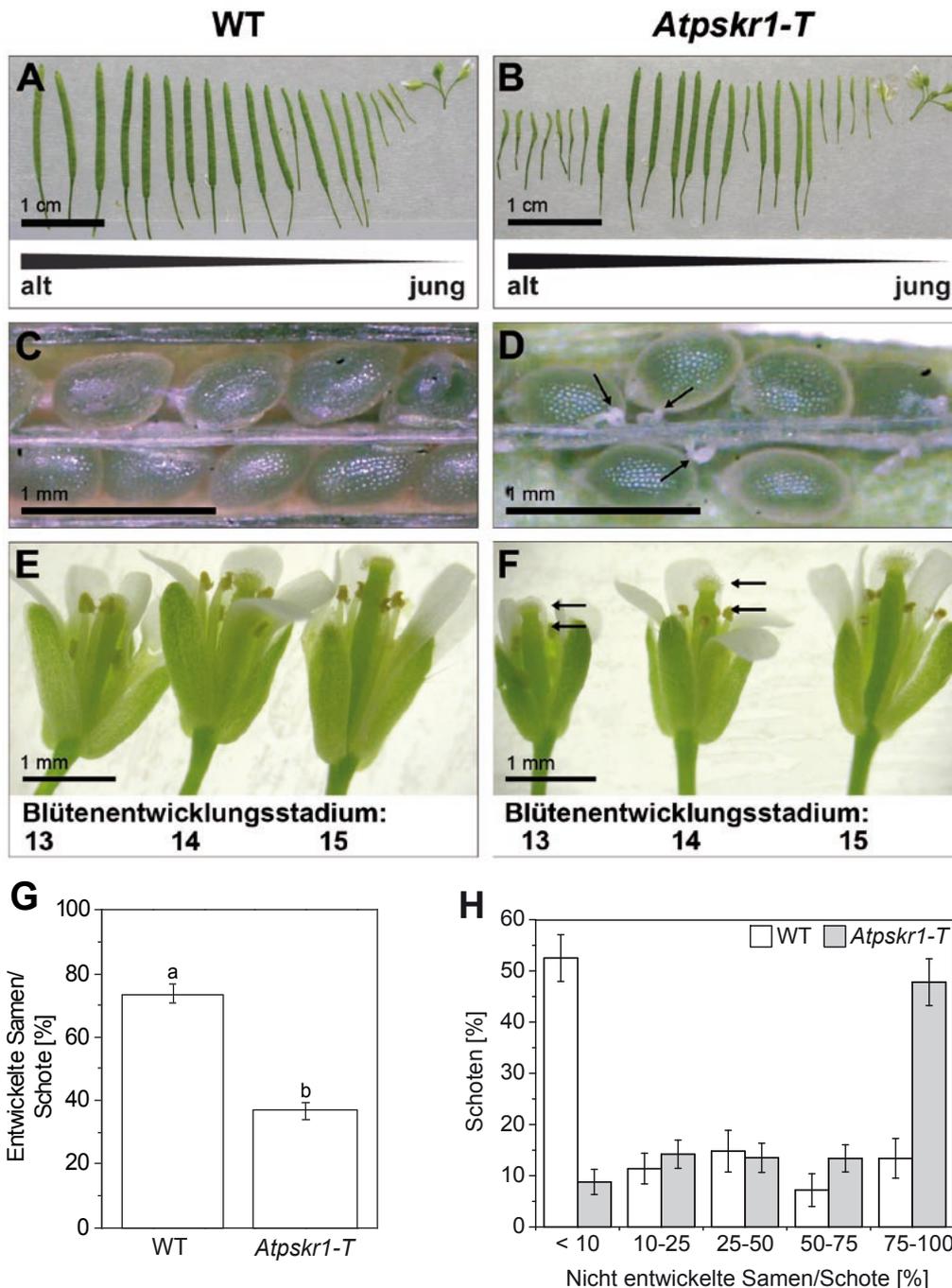


Abb. 20: Phänotypische Charakterisierung von Schoten, Samen und Blüten von *Arabidopsis* WT und *Atpskr1-T*. Schoten der ersten Infloreszenz von **A** WT und **B** *Atpskr1-T* Pflanzen sind nach Alter bis zu den Blüten angeordnet. Samen von **C** WT und **D** *Atpskr1-T* wurden freigelegt. Pfeile weisen auf nicht entwickelte Samen. **E** Blütenentwicklung von WT Blüten. Anthese (13), Stamina oberhalb des Stigmas (14), Auswachsen des Gynoeceums (15, Roeder und Yanofsky, 2006). **F** Blütenentwicklung von *Atpskr1-T*. Der Abstand der Antheren zum Stigma während des 13. und 14. Entwicklungsstadiums (Roeder und Yanofsky, 2006) ist durch Pfeile gekennzeichnet. **G** Bestimmung der Anzahl entwickelter Samen in WT und *Atpskr1-T* Schoten. Mittelwerte von $n = 150$ Schoten sind mit Standardfehler angegeben. Nach dem Mann-Whitney-Test unterschiedliche Werte wurden mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet. **H** Die Anzahl nicht entwickelter Samen pro Schote von WT und Rezeptormutante. Die Schoten wurden in Schoten mit Absterberaten von Samen kleiner als 10% (< 10%) bis 100% eingeteilt. Mittelwerte von $n = 150$ Schoten sind mit Standardfehler angegeben.

Um die prozentuale Verteilung nicht entwickelter Samen in WT und *Atpskr1-T* Schoten zu zeigen, wurden die Schoten in Kategorien mit weniger als 10% bis zu 100% nicht entwickelter Samen pro Schote eingeteilt (Abbildung 20 H). 44% der WT Schoten enthielten mehr als 90% entwickelte Samen. Die restlichen 56% WT Schoten wiesen höhere Anteile nicht entwickelter Samen auf. Der Anteil der WT Schoten mit bis zu einem Viertel, der Hälfte, Dreiviertel oder 100% nicht entwickelter Samen pro Schote lag bei je 10%. In *Atpskr1-T* Pflanzen waren hingegen von nur 10% der Schoten mehr als 90% der Samen entwickelt (Abbildung 20 H). In der Hälfte der Schoten waren weniger als ein Viertel der Samen entwickelt. Der Anteil der *Atpskr1-T* Schoten mit bis zu einem Viertel, der Hälfte oder Dreiviertel nicht entwickelter Samen pro Schote lag bei je 15% (Abbildung 20 H).

Die phänotypischen Untersuchungen von Schoten und Samen wiesen auf Defekte vor der Embryonalentwicklung von *Atpskr1-T* Blüten hin. Aus diesem Grund wurde die Entwicklung von *Atpskr1-T* und WT Blüten von Beginn der Anthese, während der Selbstbestäubung und nach Befruchtung, entsprechend den Blütenentwicklungsstadien 13, 14 und 15 nach Roeder und Yanofsky (2006), untersucht (Abbildung 20 E, F). In WT Blüten erreichten bei Anthese vier von sechs Stamina die Höhe des Stylus (Abbildung 20 E). An den Papillazellen des Stigmas waren vereinzelt Pollenkörner zu erkennen (eigene Daten, nicht gezeigt). Während des Stadiums 14 waren die Stamina auf Höhe des Stigmas beziehungsweise ragten teilweise über dieses hinaus. Am Stigma haften sehr viele Pollenkörner. Während des 15. Stadiums war der apikale Teil des Gynoeceums auf Höhe der Petalen und damit über die Stamina hinausgewachsen. Die Papillazellen waren teilweise degeneriert (Abbildung 20 E).

In Blüten der *Atpskr1-T* Pflanzen erreichten die längsten Stamina bei Anthese den basalen Teil des Stylus und waren auf Höhe der Valvenenden (Abbildung 20 F). Während der Bestäubung im 13. Blütenentwicklungsstadiums waren nur wenige oder gar keine freigesetzten Pollenkörner an den Papillazellen zu erkennen. Die Antheren von *Atpskr1-T* Pflanzen befanden sich in diesem Stadium unterhalb des Stigmas. Für *Atpskr1-T* Blüten im 14. Entwicklungsstadium war der Abstand von der Anthere zum Stigma ebenfalls charakteristisch. Während des 15. Entwicklungsstadiums erreichte der apikale Teil des Gynoeceums fast das Ende der Petalen, wie im WT (Abbildung 20 E, F). Die Stamina hatten die Länge der Sepalen (Abbildung 20 F). Die Papillazellen waren zu diesem Zeitpunkt nicht degeneriert, sondern waren morphologisch mit dem WT Blütenstadium 14 vergleichbar (Abbildung 20 F). Aus diesen Blüten entstanden Schoten mit einer hohen Zahl degenerierter Samen (eigene Daten, nicht gezeigt).

In *Atpskr1-T* Pflanzen war die Samenbildung deutlich reduziert, was eine veränderte Morphologie der Schoten im Vergleich zum WT zur Folge hatte. *Atpskr1-T* Schoten mit über 75% nicht entwickelter Samen waren stark im Längenwachstum inhibiert, hingegen waren Schoten mit unter 10% nicht entwickelter Samen normal entwickelt.

Die Schotenlänge ist anscheinend abhängig von der Zahl entwickelter Samen in der Schote. In *Atpskr1-T* Blüten des 14. Entwicklungsstadiums (Roeder und Yanofsky, 2006) führte der Abstand der Antheren zum Stigma zu einer eingeschränkten Selbstbefruchtung der Blüten. Möglicherweise ist dieser Defekt Folge einer asynchronen Entwicklung der Blütenorgane in *Atpskr1-T* Blüten während der Anthese.

4.4.3. *Atpskr1-T* Blüten weisen Defekte im paternalen und im maternalen Gewebe auf

Durch die Kreuzung von *Atpskr1-T* und WT Pflanzen wurde zu den paternalen Effekten ein möglicher maternaler Einfluss auf die Entwicklung der Samen in der PSK-Rezeptormutante untersucht. Zur Kontrolle wurden sowohl WT als auch *Atpskr1-T* Blüten der ersten Infloreszenz kurz nach Anthese untereinander von Hand polliniert. Zunächst wurde die Samenbildung von gekreuzten mit selbst bestäubten WT und *Atpskr1-T* Pflanzen verglichen (Abbildung 21 A). Die Handpollination der WT Kontrollpflanzen führte zu einer Reduzierung entwickelter Samen ($P < 0,001$) gegenüber den selbst bestäubten Pflanzen. Eine Veränderung der Anzahl entwickelter *Atpskr1-T* Samen nach der Kreuzung gegenüber selbst bestäubten Pflanzen war nicht messbar. Durch die Bestäubung der WT Blüten mit *Atpskr1-T* Pollen verringerte sich die Zahl entwickelter Samen ($P < 0,001$) im Vergleich zu den selbst bestäubten WT Pflanzen. Jedoch ergab sich kein signifikanter Unterschied zur Kreuzung der WT Kontrollpflanzen. Der WT Pollen bewirkte bei *Atpskr1-T* Blüten eine signifikante Zunahme entwickelter Samen ($P < 0,05$) gegenüber den selbst bestäubten Pflanzen. Gegenüber der Kreuzung der *Atpskr1-T* Kontrollpflanzen war kein signifikanter Unterschied in der Samenbildung feststellbar. Verglichen mit der Pollinierung von WT Blüten mit *Atpskr1-T* Pollen war die Samenbildung signifikant reduziert ($P < 0,001$) (Abbildung 21 A).

Um die Verteilung der nicht entwickelten Samen in den Schoten darzustellen, wurden die Schoten in Kategorien mit weniger als 10% bis zu 100% nicht entwickelter Samen pro Schote eingeteilt (Abbildung 21 B-E). In WT Pflanzen erhöhte sich nach *in vitro* Pollination die Anzahl nicht entwickelter Samen in den Schoten im Vergleich zu selbst bestäubten Pflanzen (Abbildung 21 B, Abbildung 20 H). So waren nach der Kreuzung circa 30% mehr Schoten mit bis 25% und circa 15% mehr Schoten mit bis zu 50% nicht entwickelter Schoten messbar (Abbildung 21 B, Abbildung 20 H). Hingegen sank der Anteil von Schoten mit weniger als 10% entwickelter Samen um circa die Hälfte (Abbildung 21 B, Abbildung 20 H).

Im Vergleich zu den WT Kontrollpflanzen hatte die Kreuzung der *Atpskr1-T* Pflanzen keine signifikante Verringerung der Anzahl entwickelter Samen zur Folge (Abbildung 21 A). Eine um die Hälfte verminderte Anzahl von Schoten mit bis zu 100% sowie weniger

als 10% nicht entwickelter Samen im Vergleich zu selbst bestäubten Pflanzen war feststellbar (Abbildung 21 A, C, Abbildung 20 H). Der Anteil von Schoten mit bis 25%, 50% und 75% nicht entwickelter Samen nahm um jeweils circa 10% zu (Abbildung 21 C, Abbildung 20 H).

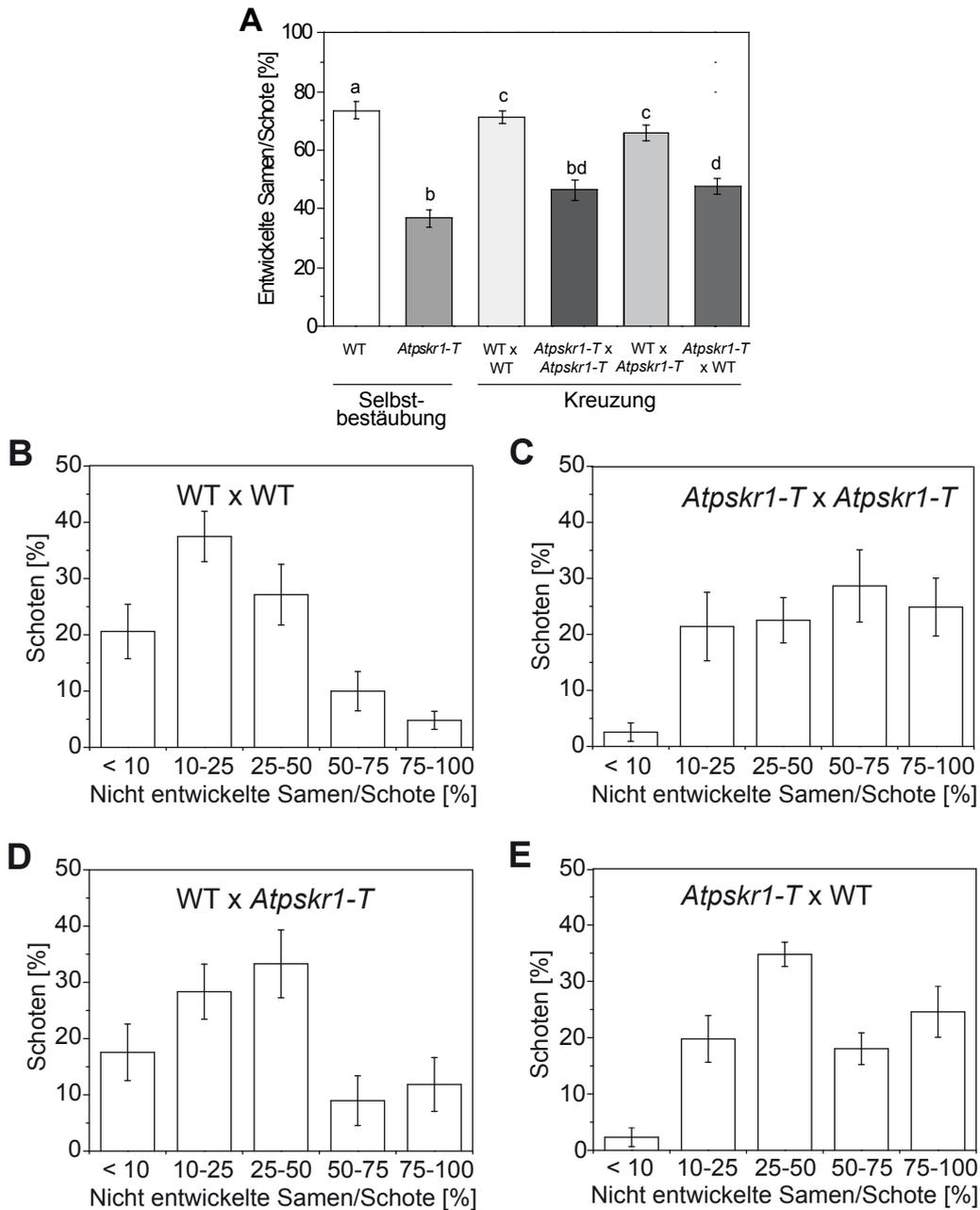


Abb. 21: *In vitro* Pollination von WT und *Atpskr1-T* Pflanzen. WT und *Atpskr1-T* Blüten der ersten Infloreszenz wurden nach Anthese mit WT oder *Atpskr1-T* Pollen von Hand bestäubt. **A** Anzahl entwickelter Samen pro Schote von selbst bestäubten (Abbildung 20) und gekreuzten Pflanzen. Die Mittelwerte von $n = 80$ bis 150 Blüten sind mit Standardfehler angegeben. Nach dem Mann-Whitney-Test signifikant unterschiedliche Werte wurden mit kleinen Buchstaben angegeben. **B-E** Anteile nicht entwickelter Samen in den Schoten. Die Schoten wurden in Schoten mit Absterberaten von Samen kleiner als 10% (< 10%) bis 100% eingeteilt. Die Mittelwerte von $n = 80$ bis 120 Blüten sind mit Standardfehler angegeben. **B** Kreuzung von WT Kontrollpflanzen. **C** Bestäubung von *Atpskr1-T* Blüten mit *Atpskr1-T* Pollen. **D** Kreuzung von WT und *Atpskr1-T* Pflanzen. **E** Bestäubung von *Atpskr1-T* Blüten mit WT Pollen.

Nach der Bestäubung von WT Blüten mit *Atpskr1-T* Pollen wurden mehr Schoten mit höheren Anteilen nicht entwickelter Samen im Vergleich zur Kreuzung von WT Kontrollpflanzen gebildet (Abbildung 21 B, D). In den Kategorien kleiner als 10% und bis 25% nicht entwickelter Samen war eine Abnahme der Schoten und in den Kategorien bis 50% und bis 100% nicht entwickelter Samen war eine Zunahme der Schoten erkennbar (Abbildung 21 B, D). Der *Atpskr1-T* Pollen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Samenbildung im Vergleich zur Kreuzung der WT Kontrollpflanzen (Abbildung 21 A).

Gegenüber der Kreuzung der *Atpskr1-T* Pflanzen stieg nach Bestäubung der *Atpskr1-T* Blüten mit WT Pollen die Anzahl der entwickelten Samen in den Schoten signifikant an (Abbildung 21 A, C, E). Eine Abnahme der Schotenanzahl der Kategorie bis 75% nicht entwickelte Samen und eine Zunahme der Schoten mit bis zu 50% nicht entwickelter Samen war erkennbar (Abbildung 21 C, E).

Der Vergleich beider Kreuzungen zeigte eine starke Zunahme von Schoten mit geringer Samenbildung nach Pollinierung von *Atpskr1-T* Blüten mit WT Pollen gegenüber der Bestäubung von WT Blüten mit und *Atpskr1-T* Pollen (Abbildung 21 D, E).

In vitro Pollination von WT Blüten hatte im Vergleich zu selbst bestäubten WT Pflanzen einen negativen Einfluss auf die Samenbildung. Bei *Atpskr1-T* Pflanzen war das jedoch nicht der Fall. Trotz einer insgesamt vergleichbaren Anzahl entwickelter Samen, war eine Zunahme von Schoten mit höheren Anteilen entwickelter Samen nach Handpollination im Vergleich selbst bestäubten Blüten zu erkennen. Die Zahl befruchteter Samenanlagen in den *Atpskr1-T* Pflanzen wurde möglicherweise durch die Handbestäubung erhöht. Möglicherweise konnte der Einfluss eines gestörten Wachstums der Filamente und des Gynoeceums auf die Samenbildung durch die Pollination reduziert werden. Gleichzeitig schien der positive Einfluss auf die Samenbildung in *Atpskr1-T* Pflanzen durch die Handbestäubung, wie nach der WT Kreuzung gezeigt, nivelliert zu werden. Asynchrones Wachstum der inneren Wirtel in *Atpskr1-T* Blüten nach Anthese schien die Samenentwicklung der Pflanzen zu beeinflussen. *Atpskr1-T* Pollen hatten einen geringen Einfluss auf die Samenbildung, weil möglicherweise ein Großteil des Pollens keimungsfähig ist. Das Ergebnis der Bestäubung von *Atpskr1-T* Blüten mit WT Pollen ließ einen Defekt während der Entwicklung der Samenanlagen in der PSK-Rezeptormutante vermuten. Somit wäre ebenfalls ein maternaler Einfluss auf die Ausbildung des *Atpskr1-T* Phänotyps möglich.

4.4.4. WT Pollen sind keimungsfähiger als *Atpskr1-T* Pollen

Die Untersuchung des Blütenaufbaus der PSK-Rezeptormutante sowie die Kreuzungsversuche mit WT Pflanzen zeigten, dass *Atpskr1-T* Pollen unterschiedlich entwickelt waren und möglicherweise teilweise eine verminderte Vitalität besaßen. Um einen Defekt in der Entwicklung von *Atpskr1-T* Pollen aufzuklären, wurde die Morphologie von Pollen detaillierter untersucht.

In Mikrosporangien von WT und *Atpskr1-T* Antheren kurz vor der Dehiscenz waren neben rundlich bis oval geformten und stark gefärbten Pollen, unregelmäßig gestaltete sowie schwächer angefärbte Pollenkörner zu erkennen (Abbildung 22 A, B). Die Zahl kleinerer sowie verkümmelter Pollenkörner in *Atpskr1-T* Pollensäcken war mit 10% höher als im WT mit circa 1% (Abbildung 22 F). Deutlich unterschieden sich degenerierte Pollenkörner von normal entwickelten Pollen mit oval länglicher Form (Abbildung 22 C, D).

Um die Pollenvitalität zu überprüfen, wurden *in vitro* Pollenkeimungsversuche mit *Atpskr1-T* und WT Pollen durchgeführt (Abbildung 22 E, F). Nach 24 h Inkubation der Körner auf Keimungsmedium waren *Atpskr1-T* und WT Pollen mit ausgewachsenem Pollenschlauch, mit aufgebrochener Pollenschale und ausgelaufenem Zytoplasma zu erkennen (Abbildung 22 E). Des Weiteren waren Pollen erkennbar, die Wasser aufgenommen hatten und angeschwollen waren, aber auch unveränderter, degenerierter Pollen (Abbildung 22 E). Pollenkeimungsversuche ergaben eine Pollenkeimungsrate von 27% für WT Pollen und eine von 16% für *Atpskr1-T* Pollenkörner (Abbildung 22 F). Die Keimungsfähigkeit des *Atpskr1-T* Pollens war demnach signifikant niedriger. Die Anzahl von Pollen mit aufgebrochener Pollenschale und von ungekeimten, geschwollenen Pollenkörnern war mit dem WT vergleichbar (Abbildung 22 F). Die *Atpskr1-T* Antheren enthielten 10% degenerierten Pollen. Im WT lag der Anteil bei 1% und war damit signifikant niedriger (Abbildung 22 F).

Im Vergleich zu der in Fan *et al.* (2001) publizierten *in vitro* Pollenkeimungsrate, konnte insgesamt nur ein geringes Pollenschlauchwachstum von WT Pollen erzielt werden, welches sehr wahrscheinlich nicht die *in vivo* Bedingungen widerspiegelte. Trotzdem wurde eine geringere Keimungsfähigkeit von *Atpskr1-T* Pollen im Vergleich zum WT deutlich. Die verminderte Keimungsfähigkeit könnte auf die erhöhte Zahl degenerierter Pollen in *Atpskr1-T* zurückzuführen sein. Die höhere Anzahl degenerierter Pollenkörner ließ eine teilweise gestörte Mikrospороgenese in *Atpskr1-T* vermuten. Möglicherweise spielt PSK- α eine Rolle bei der Pollenreifung, da nur 10% der Pollenkörner degeneriert waren. Ungeklärt ist, ob PSK- α das Auswachsen und die Länge des Pollenschlauchs beeinflusst.

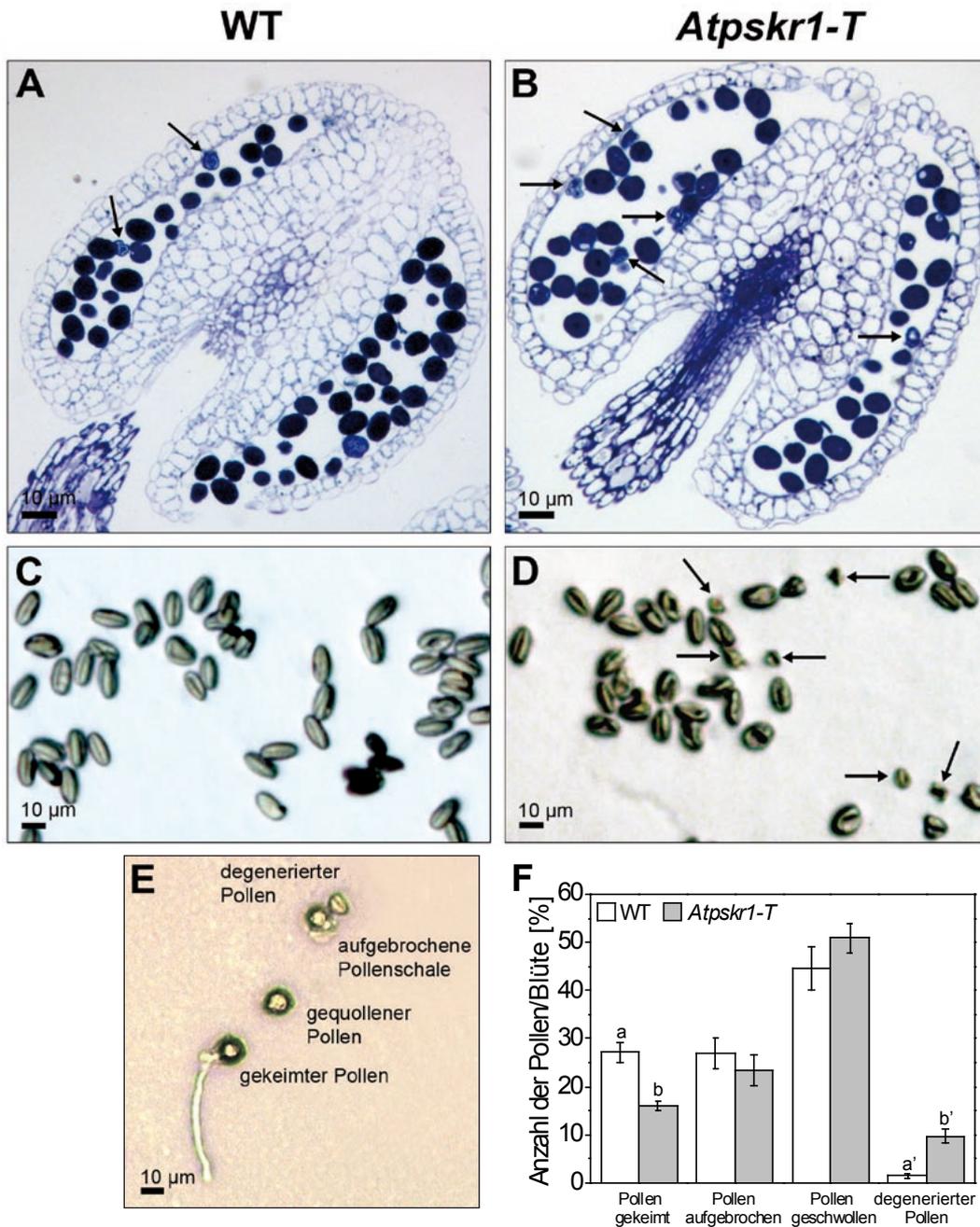


Abb. 22: Pollenmorphologie und Keimung von WT und *Atpskr1-T* Pollen. Längsschnitte von Antheren kurz vor der Dehiszenz. 1 μ m dicke Schnitte wurden unter Hellfeldbedingungen fotografiert. **A** WT und **B** *Atpskr1-T*. Mit Pfeilen gekennzeichnete Pollenkörner sind degeneriert. **C** Ausgereifter Pollen von WT und **D** *Atpskr1-T*. Die Pfeile weisen auf degenerierte Pollenkörner. **E** *In vitro* Keimung von WT und *Atpskr1-T* Pollen nach 24 h auf Keimungsmedium. **F** Einteilung des Pollens nach dem Keimungsversuch in 4 Kategorien: gekeimte Pollen mit ausgewachsenem Pollenschlauch, aufgebrochene Pollen mit entweichendem Zytoplasma, Pollen, die Wasser aufgenommen haben, aber nicht keimen und degenerierter Pollen. Die Mittelwerte von $n = 12$ Blüten sind mit Standardfehler angegeben. Nach dem Mann-Whitney-Test signifikant unterschiedliche Werte sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

4.4.5. *Atpskr1-T* besitzt mehr Mikrosporen mit verändertem Phänotyp

Aufgrund der erhöhten Zahl degenerierter Pollen in *Atpskr1-T* wurde die Pollenentwicklung in Antheren der Mutante untersucht. Dafür wurden Querschnitte von *Atpskr1-T* und WT Staubbeuteln der Entwicklungsstufen 7 und 11 nach Sanders *et al.* (1999) angefertigt (Abbildung 23).

Charakteristisch für WT Antheren im Entwicklungsstadium 7 sind haploide Mikrosporen in Tetradenanordnung (Sanders *et al.*, 1999). Diese entwickelten sich in den Mikrosporangien und waren vom Tapetum umgeben (Abbildung 23 A, C). Die Mittelschicht zwischen dem Nährgewebe und dem Endothecium sowie die Epidermis war zu erkennen. Zwischen dem Leitgewebe und den Mikrosporangien war das Konnektiv ausgebildet (Abbildung 23 A).

Die Querschnitte der *Atpskr1-T* Antheren zeigten den gleichen zellulären Aufbau wie der WT (Abbildung 23 B, D). Die Mikrosporentetraden waren morphologisch ebenfalls mit denen des Wildtyps vergleichbar (Abbildung 23 B, D).

Im Vergleich zu Antheren im 7. Entwicklungsstadium waren die Antheren des 11. Stadiums insgesamt größer. Die Mittelschicht war abgebaut und das Tapetum teilweise degeneriert (Abbildung 23 E, G). Charakteristisch ist die Ausdehnung des Endotheciums sowie die Ausbildung faseriger Strukturen in dieser Zellschicht, wie in Abbildung 23 E, G gezeigt (Sanders *et al.*, 1999). In den Pollensäcken waren freie Mikrosporen mit entstehender Pollenwand erkennbar (Abbildung 23 E, G).

Der Bau des sporophytischen Gewebes der *Atpskr1-T* Antheren im 11. Entwicklungsstadium war mit dem des Wildtyps vergleichbar (Abbildung 23 F, H). In den Pollensäcken war das degradierte Tapetum sowie das vergrößerte Endothecium mit faserigen Strukturen sichtbar. Die Mikrosporen lagen ebenfalls vereinzelt in den Mikrosporangien vor. Allerdings enthielten die *Atpskr1-T* Mikrosporangien neben normal entwickelten Mikrosporen vermehrt unreife Pollen mit veränderter Morphologie (Abbildung 23 F, H). Einige unreife *Atpskr1-T* Pollen waren kleiner, teilweise verkümmert oder vergrößert (Abbildung 23 F, H).

In *Atpskr1-T* Pflanzen scheint die Entwicklung der Mikrosporentetraden bis zur Bildung freier Mikrosporen in Antheren, die morphologisch WT Staubbeuteln gleichen, normal zu verlaufen. Möglicherweise sind nachfolgende Prozesse, wie die Auflösung der Tetradenstruktur und der Aufbau der Pollenwand in *Atpskr1-T* Antheren gestört. In den Loculi der *Atpskr1-T* Antheren waren mehr inhomogen entwickelte Pollen als in WT Pflanzen sichtbar. Möglicherweise ist in *Atpskr1-T* Pflanzen der Aufbau der Pollenwand gestört.

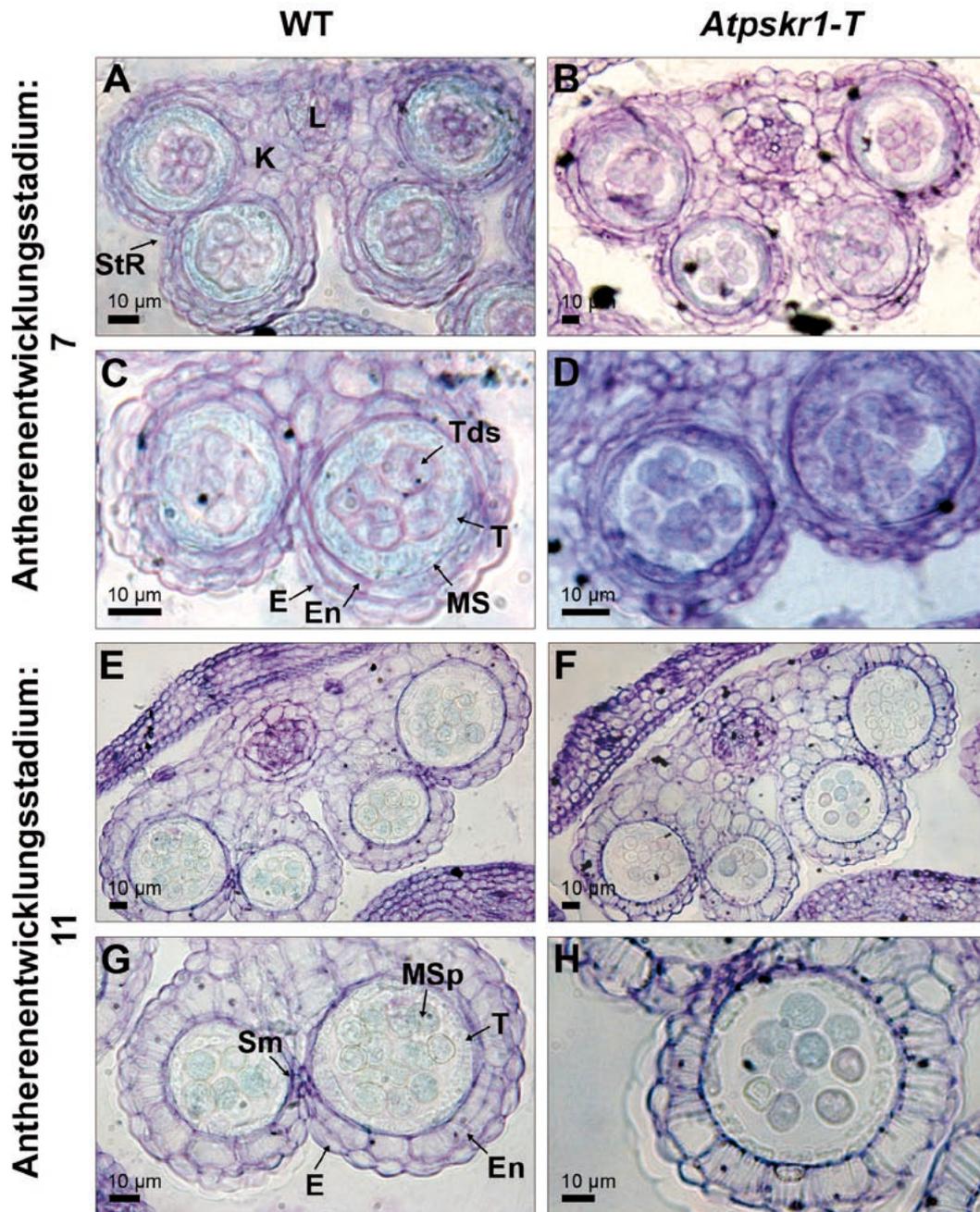


Abb. 23: Antherenquerschnitte von WT und *Atpskr1-T*. Querschnitte von Antheren von WT und *Atpskr1-T* der Entwicklungsstadien 7 **A-D** und 11 **E-H** (Sanders *et al.*, 1999). Die Schnitte von 10-15 µm wurden unter Hellfeldbedingungen fotografiert. **A, C, E, G** Antherenquerschnitte von WT und **B, D, F, H** *Atpskr1-T*. **A, B** Antheren mit haploiden Mikrosporen in Tetradenanordnung. Leitbündel (L), Konnektiv (K), Stomium Region (StR). **C, D** Vergrößerte Aufnahmen der Pollensäcke mit den Zellschichten Epidermis (E), Endothecium (En), Mittelschicht (MS), Tapetum (T). Die Tetraden (Tds) sind vom Tapetum umgeben. **E, F** Antheren mit teilweise degeneriertem Tapetum und vergrößertem Endothecium mit beginnender Ausbildung faseriger Strukturen. **G, H** Pollensäcke mit Epidermis (E), Endothecium (En), degenerierendem Tapetum (T), Mikrosporen (Msp) und dem Septum (Sm).

4.4.6. Gynoeceen von *Atpskr1-T* und WT Pflanzen sind morphologisch vergleichbar

Die Schoten der PSK-Rezeptormutante enthielten eine hohe Zahl nicht entwickelter Samen. Von paternaler Seite war eine verminderte Pollenvitalität und der Abstand der Antheren zum Stigma in *Atpskr1-T* Blüten während der Befruchtung verantwortlich war. Kreuzungsversuche mit WT Blüten wiesen auf Defekte im maternalen Gewebe hin, die zur Ausbildung des Mutantenphänotyps beitragen. Zunächst wurden *Atpskr1-T* Gynoeceen auf eine veränderte Morphologie im Vergleich zum WT untersucht. Dafür wurden Längsschnitte von Blüten vor und während der Befruchtung gewählt. Sie entsprachen den Entwicklungsstadien 12 bis 14 (Roeder und Yanofsky, 2006; Smyth *et al.*, 1990) Die Längsschnitte von WT und *Atpskr1-T* Gynoeceen vor und während der Befruchtung sind in Abbildung 24 gezeigt.

In tangentialen Längsschnitten parallel zur lateralen Ebene der Gynoeceen sind die Ovarien von WT und *Atpskr1-T* Blüten vor Befruchtung gezeigt (Abbildung 24 A, B). Die WT und *Atpskr1-T* Ovarien wurden von außen durch je zwei Valven begrenzt. Diese sind aus einer abaxialen Epidermis, drei Chloroplasten enthaltenden Zellschichten, den Chlorenchymazellen und zwei adaxialen epidermalen Zellschichten aufgebaut. In der Mitte der Ovarien war das Septum mit dem Übertragungsgewebe zu erkennen, welches aus sekretorischen Zellen besteht und im WT und in *Atpskr1-T* stärker angefärbt war. Das Septum teilt die Ovarien in je zwei Loculi. Die Samenanlagen sind in je zwei Reihen entlang des Septums positioniert, wovon jedoch nur zwei in der Schnittebene in *Atpskr1-T* lagen und zu erkennen waren (Abbildung 24 B). Die Samenanlagen der WT Blüten wurden herausgelöst und waren nur teilweise erkennbar (Abbildung 24 A). Der Embryosack war weder im WT noch in der Mutante sichtbar (Abbildung 24 A, B).

In Abbildung 24 C, D sind Längsschnitte parallel zur medialen beziehungsweise zur lateralen Ebene durch den apikalen Teil von WT und *Atpskr1-T* Gynoeceen während der Befruchtung gezeigt. An den stigmatischen Papillazellen des WT und von *Atpskr1-T* hafteten vereinzelt Pollenkörner. Der sich in basipetaler Richtung anschließende feste Stylus von *Atpskr1-T* ist aus einer abaxialen Epidermis, einer Schicht aus Parenchymzellen und dem adaxialen, dunkler angefärbten Übertragungsgewebe aufgebaut (Abbildung 24 D). Die Zellen der Epidermis, des Stylusparenchym sowie des Übertragungsgewebes waren longitudinal geformt. Das dunkler gefärbte Übertragungsgewebe zog sich ausgehend vom Stigma durch den Stylus in des Septums und in basipetaler Richtung durch die Ovarien des *Atpskr1-T* Gynoeceums (Abbildung 24 D). Im WT hatten die Zellen der Epidermis und des Stylusparenchym ebenfalls eine längliche Form, jedoch war das Übertragungsgewebe nicht zu erkennen (Abbildung 24 C).

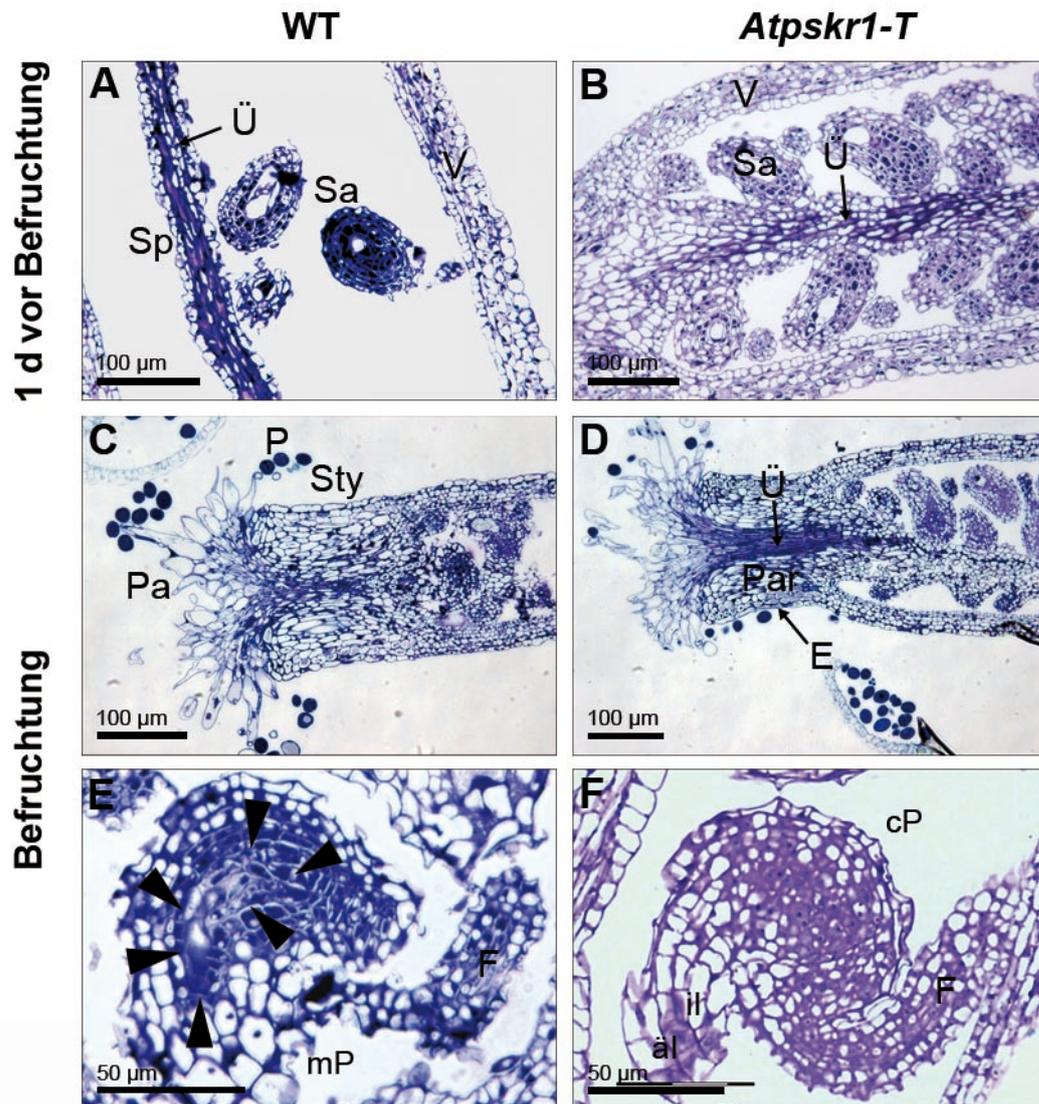


Abb. 24: Morphologie von WT und *Atpskr1-T* Gynoeceen vor und während der Befruchtung. 1 µm dicke longitudinale Schnitte von Blüten wurden unter Hellfeldbedingungen fotografiert. Die Einbettung der Blüten, die Anfertigung und Färbung der Schnitte wurde von der Zentralen Mikroskopie des Botanischen Institutes der CAU Kiel durchgeführt. Ovarien von **A** WT und **B** *Atpskr1-T* Blüten 1 d vor Befruchtung. Valve (V), Septum (Sp), Samenanlagen (Sa) und Übertragungsgewebe (Ü). Apikaler Teil eines **C** WT und eines **D** *Atpskr1-T* Gynoeceums während der Befruchtung. An den Papillazellen (Pa) des Stigmas haften einzelne Pollen (P). Der Stylus (Sty) besteht aus Epidermis (E), Parenchymzellen (Par) und adaxialem Übertragungsgewebe (Ü). **E** WT Ovulum aus Blüten während der Befruchtung. Die Umrise des Embryosacks wurden mit Pfeilen gekennzeichnet. Funiculus (F), mikropylarer Pol (mP). **F** Ovulum aus *Atpskr1-T* Blüten während der Befruchtung. Der Embryosack war nicht erkennbar. Funiculus (F), chalazaler Pol (cP), äußeres und inneres Integument (äl, il).

Die Ovarien wiesen einen vergleichbaren Aufbau mit denen von Blüten 1 d vor Befruchtung auf, der zuvor beschrieben wurde (Abbildung 24 A, B).

In Abbildung 24 E, F sind WT und *Atpskr1-T* Ovula aus Blüten während der Befruchtung dargestellt. Die länglichen Zellen des äußeren sowie des inneren Integuments sind parallel angeordnet. Beide Zellschichten verlaufen vom chalazalen zum mikro-

pylaren Pol. Dabei umschließt das innere Integument den größten Teil des Embryosacks, der in der WT Samenanlage war zu erkennen war. Eine Spezifizierung der Zellen war jedoch nicht möglich. Der Funiculus war teilweise erkennbar (Abbildung 24 E). In *Atpskr1-T* war der Embryosack nicht sichtbar, dafür wurde die Verbindung der Samenanlage über den Funiculus mit dem Septum gezeigt (Abbildung 24 F).

Der Aufbau des *Atpskr1-T* Gynoeceums war mit dem WT vergleichbar. Die untersuchten *Atpskr1-T* Samenanlagen wiesen keine erkennbaren morphologischen Unterschiede des sporophytischen Gewebes auf. Somit kann ein Einfluss des weiblichen Sporophyten auf die Ausbildung des *Atpskr1-T* Phänotyps, durch eine veränderte Morphologie, ausgeschlossen werden. Da der zelluläre Aufbau des Embryosacks von *Atpskr1-T* Ovula nicht untersucht wurde, ist weiterhin unklar, ob ein maternaler Effekt auf eine veränderte Morphologie des Gametophyten und/oder möglicherweise auf Störungen von Signalprozessen im Ovarium zurückzuführen ist.

4.4.7. Die Embryonalentwicklung in *Atpskr1-T* Samen ist nicht gestört

Die Gynoeceen der PSK-Rezeptor Insertionsmutante wiesen keine erkennbaren anatomischen Unterschiede im Vergleich zum WT auf. Ebenso konnte gezeigt werden, dass *Atpskr1-T* Pflanzen teilweise fertil waren und Samen bildeten. Ein möglicher Einfluss der Samenanlagen auf die Fertilisation und die Embryonalentwicklung in *Atpskr1-T* war jedoch ungeklärt. Ovula von *Atpskr1-T* Blüten 2 d vor und während der Befruchtung sowie Samen mit sich entwickelnden Embryonen wurden morphologisch untersucht (Abbildung 25).

In Abbildung 25 A, B sind Ovula von WT und *Atpskr1-T* Blüten 2 d vor Befruchtung des späten 12./frühen 13. Blütenentwicklungsstadiums gezeigt (Robinson-Beers *et al.*, 1992; Roeder und Yanofski, 2006). Die Ovula hatten vom chalazalen zum mikropylaren Pol eine vergleichbare Länge von 150 µm. Die äußeren Integumente umschlossen die inneren Integumente sowie den Nucellus des *Atpskr1-T* Ovulums. Der Funiculus des WT und des *Atpskr1-T* Ovulums waren mit der Placenta verbunden und das Leitgewebe im Funiculus war erkennbar (Abbildung 25 A, B). Somit waren die *Atpskr1-T* Samenanlagen morphologisch und vom Entwicklungsstand mit den WT Ovula zum untersuchten Zeitpunkt vergleichbar.

In Abbildung 25 C, D sind WT und *Atpskr1-T* Blüten während der Befruchtung gezeigt. Der Pollenschlauch war in der Mikropyle des WT Ovulums erkennbar (Abbildung 25 C). In *Atpskr1-T* Gynoeceen während der Befruchtung waren wachsende Pollenschläuche in den Ovarien sichtbar (eigene Daten, nicht gezeigt). Das gezeigte *Atpskr1-T* Ovulum wies im Bereich der Integumente und des Funiculus einen stark gewundenen Pollenschlauch auf (Abbildung 25 D).

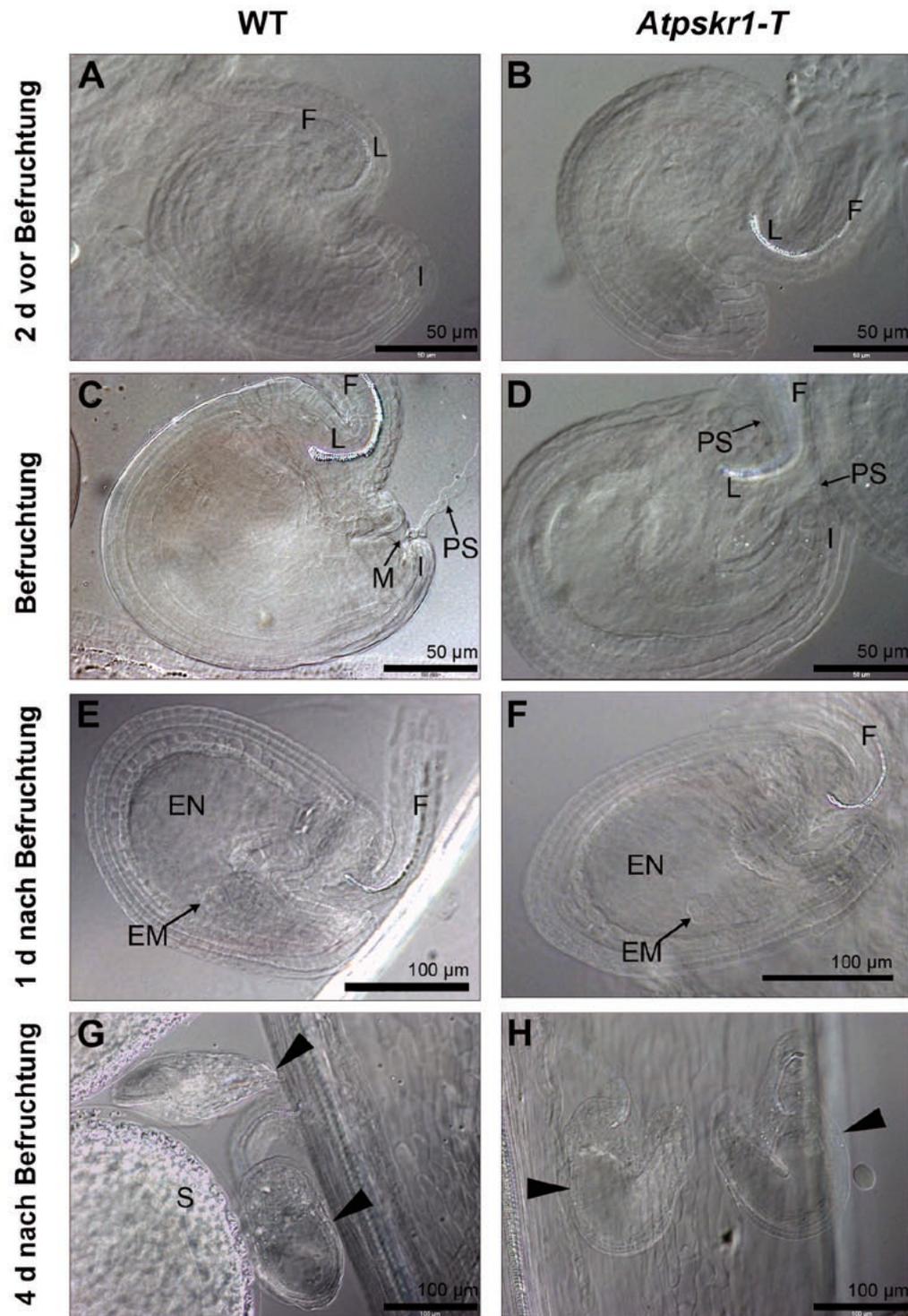


Abb. 25: Samenentwicklung von WT und *Atpskr1-T* Pflanzen. Ovula und Samen von WT und *Atpskr1-T* Schoten wurden mit einem Mikroskop mit Nomarskiptik fotografiert. Ovula von WT **A** und *Atpskr1-T* **B** isoliert aus Blüten 2 d vor Befruchtung. Funiculus (F) mit dem Leitgewebe (L), Integumente (I) **C** WT Ovulum während der Befruchtung. In der Mikropyle (M) zwischen den Integumenten (I) treffender Pollenschlauch (PS), Leitgewebe (L). **D** *Atpskr1-T* Ovulum während der Befruchtung. Gewundener Pollenschlauch (PS) im Bereich der Integumente (I). Funiculus (F) mit dem Leitgewebe (L). **E** WT und **F** *Atpskr1-T* Samen mit sich entwickelnden Embryonen (EM) und Endosperm (EN), Funiculus (F). **G** Durch Pfeile gekennzeichnete nicht entwickelte WT Ovula im Vergleich zu entwickelten Samen (S) 4 d nach Befruchtung. **H** Durch Pfeile gekennzeichnete nicht entwickelte *Atpskr1-T* Samen.

Möglicherweise hatte die doppelte Befruchtung stattgefunden, da die Samenanlage insgesamt etwas größer war (Abbildung 25 D).

In Blüten 1 d nach der Befruchtung waren in WT und teilweise in *Atpskr1-T* Samen die entwickelten Embryonen und das ausgebildete Endosperm erkennbar (Abbildung 25 E, F). Die Embryogenese in den entwickelten *Atpskr1-T* Samen verlief in den ersten vier bis fünf Tagen analog zu der von WT Samen wie von Goodrich (1998) beschrieben (eigene Daten, nicht gezeigt).

Neben normal entwickelten Samen enthielten WT und häufiger *Atpskr1-T* Schoten verkümmerte Samen (Abbildung 25 G, H). Im Gegensatz zu den gleichaltrigen entwickelten Samen 4 d nach Befruchtung, waren diese kleiner, im Wachstum inhibiert und Embryonen nicht erkennbar (Abbildung 25 G, H). Vermutlich handelt es sich bei diesen Samen um nicht befruchtete Ovula, die sich nicht weiterentwickeln und abgestorben sind.

Die Anatomie der Samenanlagen und der Samen von *Atpskr1-T* Pflanzen waren mit der von WT Pflanzen vergleichbar. Die Embryogenese in *Atpskr1-T* Pflanzen unterschied sich ebenfalls nicht von der von WT Pflanzen. Die Morphologie der nicht entwickelten *Atpskr1-T* Samen war ähnlich der von WT Samen. Grundsätzlich scheint aber eine Befruchtung der Samenanlagen in der PSK-Rezeptor T-DNA Insertionsmutante möglich zu sein. So könnte möglicherweise das orientierte Wachstums der Pollenschläuche im Ovarium zu den Samenanlagen gestört sein. Es ist bekannt, dass das Wachstum des Pollenschlauchs zu den Ovula zu einem großen Teil vom weiblichen Gametophyt abhängt (Huck *et al.*, 2003; Sanchez *et al.*, 2004).

4.4.8. Die PSK-Präproteingene und das PSK-Rezeptorgen sind sowohl in Stamina als auch in Samenanlagen aktiv

Die phänotypische Analyse der PSK-Rezeptormutante wies auf eine gestörte Pollenentwicklung sowie auf ein asynchrones Wachstum der inneren Wirtel in Blüten nach Anthese hin. Aus Kreuzungsversuche wurde ein maternaler Effekt in *Atpskr1-T* Pflanzen deutlich. Die Morphologie der *Atpskr1-T* Samenanlagen war jedoch mit dem WT vergleichbar. Promotor-GUS Analysen in Blüten von Arabidopsis sollten zeigen, ob die PSK-Präproteingene sowie *AtPSKR1* in reproduktiven Organen, wie beispielsweise im Pollen, exprimiert werden und ob eine Perzeption in diesen Geweben möglich wäre. Die Expressionen der PSK-Präproteingene und von *AtPSKR1* in Blüten 4 bis 5 Wochen alter Pflanzen sind in Abbildung 26 gezeigt.

AtPSK1 wurde entwicklungsabhängig und insgesamt schwach in Blüten exprimiert (Abbildung 26 A, C, D). Die Expression war in jungen Blüten schwach in den Filamenten, Antheren sowie im Gynoeceum, insbesondere im Ovarium erkennbar (Abbildung 26

A). In älteren Blüten wurde *AtPSK1* Expression am Blütenboden exprimiert (Abbildung 26 A). In Blüten nach Anthese war keine Promotoraktivität in den Blütenorganen zu erkennen (Abbildung 26 B). Querschnitte von Antheren des 7./8. Entwicklungsstadiums (Sanders *et al.*, 1999) zeigten eine schwache *AtPSK1* Expression im Tapetum. In Blüten des 12. Entwicklungsstadiums wurde *AtPSK1* schwach in den Ovula und im Leitgewebe des Ovariums exprimiert (Abbildung 26 D). In Blüten nach der Befruchtung waren in den sich entwickelnden Samen und in Schoten keine *AtPSK1* Promotoraktivität feststellbar (Abbildung 26 E).

In Blüten wurde *AtPSK2* hauptsächlich in männlichen Reproduktionsorganen, während der Antherenentwicklung exprimiert (Abbildung 26 F). Zum Zeitpunkt der Anthese und beginnender Befruchtung wiesen die Blüten eine starke GUS Expression in Pollen, im oberen Teil des Filaments und im Leitgewebe der Antheren auf (Abbildung 26 G). Aus Querschnitten von Staubbeuteln des 9. Entwicklungsstadiums (Sanders *et al.*, 1999) war eine schwache *AtPSK2* Expression im Konnektiv, im Leitbündel, im Tapetum und in den Mikrosporen zu erkennen. In Pollen mit ausgekeimten Pollenschlauch wurde ebenfalls *AtPSK2* exprimiert (Abbildung 26; eigene Daten, nicht gezeigt). Der *AtPSK2* Promotor war nicht im weiblichen sporophytischen oder gametophytischen Gewebe aktiv (Abbildung 26 G, I). Eine *AtPSK2* Expression war in den Nektarien zu erkennen (Abbildung 26 J). In sich entwickelnden Samen war der *AtPSK2* Promotor nicht aktiv (Abbildung 26 J).

AtPSK3 wurde verstärkt in weiblichen reproduktiven Organen und in jungen, sich entwickelnden Antheren exprimiert (Abbildung 26 K). In den Blüten vor Anthese war eine starke GUS Expression in Gynoeceen sowie im Blütenstiel sichtbar (Abbildung 26 K). In Blüten während der Befruchtung wurde *AtPSK3* im Filament und im Ovarium, im Stylus exprimiert (Abbildung 26 L). Eine *AtPSK3* Expression im Stigma war nicht sichtbar (Abbildung 26 L). Des Weiteren war keine Expression in den Antheren oder im Pollen zu erkennen (Abbildung 26 L). Antheren des 6. Entwicklungsstadiums von $P_{AtPSK3}::GUS$ Transformanten wiesen eine Expression im sporophytischen Gewebe, verstärkt im Tapetum auf (Abbildung 26 M). Die haploiden Mikrosporen, die Tetraden, waren ebenfalls gefärbt (Abbildung 26 M). In Blüten vor Anthese wurde *AtPSK3* im gesamten Ovarium exprimiert (Abbildung 26 N). Die Expression im Ovulum konnte nicht spezifiziert werden (Abbildung 26 N). In älteren Blüten war *AtPSK3* im Funiculus und in der Plazenta sowie in den Valven aktiv (Abbildung 26 K, L, eigene Daten, nicht gezeigt). Schoten wiesen eine starke Promotoraktivität im Leitgewebe auf (Abbildung 26 O). Des Weiteren waren die Nektarien gefärbt (Abbildung 26 O). In Samen von $P_{AtPSK3}::GUS$ Transformanten war keine Expression erkennbar (Abbildung 26 O).

AtPSK4 wurden in weiblichen und männlichen Reproduktionsorganen der Blüte, im Leitgewebe und in den Stomazellen der Sepalen, des Stylus sowie im Blütenstiel exprimiert (Abbildung 26 P).

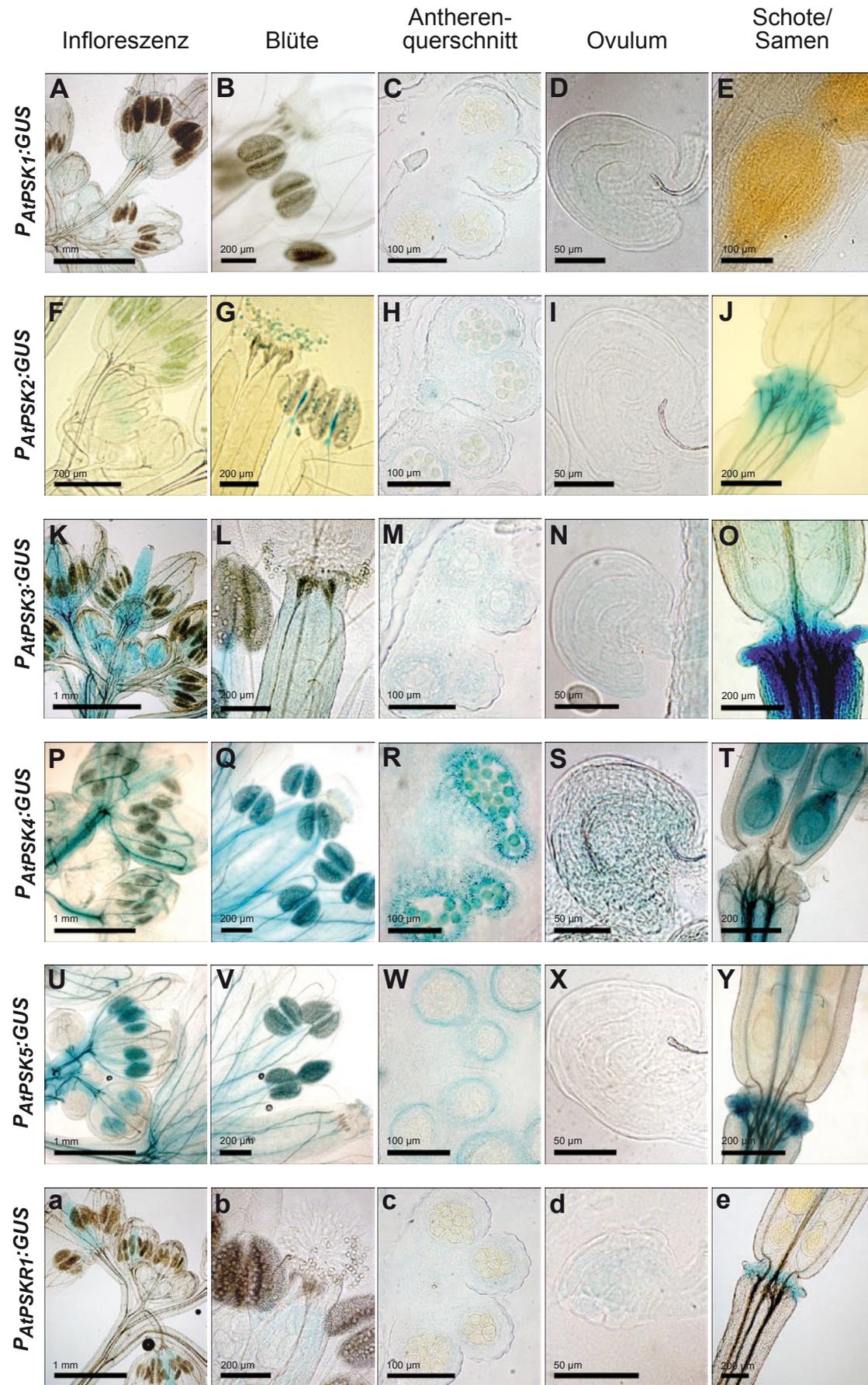


Abb. 26: Promotor-GUS Expressionen der PSK-Präproteingene und des PSK-Rezeptorgens *AtPSKR1* in Blüten und Schoten von *Arabidopsis thaliana*. Die Aufnahmen von GUS exprimierenden Pflanzengeweben erfolgte unter Hellfeldbedingungen. **A, F, K, P, U, a** Infloreszenzen von 4 bis 5 Wochen alten Promotor-GUS Transformanten und **B, G, L, Q, V, b** Blüten nach Anthese (Entwicklungsstadium 13/14 nach Roeder und Yanofsky, 2006) mit teilweise einsetzender Befruchtung. Querschnitte von Antheren der Entwicklungsstadien nach Sanders *et al.* (1999) **C** 7/8, **H** 9, **M** 6, **R** 12, **W** 8, **c** 8. Ovula aus Blüten der Entwicklungsstadien nach Robinson-Beers *et al.* (1992) **D** 13, **I** 13/14 **N** 13, **S** 13, **X** 13, **d** 12. **E, J, O, T, Y, e** Promotor-GUS Expressionen in Samen und Schoten.

In Blüten nach Anthese wiesen die Ovarien, die Filamente, die Antheren und der Pollen eine verstärkte GUS Expression auf (Abbildung 26 Q). In Blüten vor Anthese war der *AtPSK4* Promotor ebenfalls in den Ovula aktiv (Abbildung 26 R). Antheren vor Dehiscenz zeigten eine starke *AtPSK4* Expression in Pollen sowie im gesamten sporophytischen Gewebe (Abbildung 26 S). *AtPSK4* war als einziges der PSK-Präproteingene in sich entwickelnden Samen aktiv (Abbildung 26 T). Des Weiteren war die Expression im Leitgewebe der Schoten und des Blütenstiels lokalisiert (Abbildung 26 T).

Der *AtPSK5* Promotor war in Blüten vor allem in den Stamina und im vaskulären System aktiv (Abbildung 26 U). In Blüten nach Anthese wurde *AtPSK5* im Leitgewebe, in den Filamenten und Antheren, aber nicht im Pollen exprimiert (Abbildung 26 V). Aus Querschnitten von Antheren des 8. Entwicklungsstadiums war eine verstärkte *AtPSK5* Promotoraktivität im Tapetum erkennbar (Abbildung 26 W). Die Mikrosporen waren nicht gefärbt (Abbildung 26 W). In weiblichen Reproduktionsorganen wurde *AtPSK5* ausschließlich im Leitgewebe des Gynoeceums, aber nicht in den Ovula exprimiert (Abbildung 26 X). Nach Befruchtung war der Promotor im Leitgewebe von Schoten und in den Nektarien aktiv (Abbildung 26 Y).

Das PSK-Rezeptorgen wurde in Blüten verstärkt im Gynoeceum mit sich entwickelnden Samenanlagen und schwächer in jungen männlichen Reproduktionsorganen exprimiert (Abbildung 26 a). Die *AtPSKR1* Promotoraktivität in Blüten nach Anthese nahm in den Samenanlagen ab und war in den Filamenten, aber nicht in den Antheren erkennbar (Abbildung 26 b). Im Stylus und im Stigma von Blüten nach Anthese war keine *AtPSKR1* Expression erkennbar (Abbildung 26 b). Querschnitte von Antheren des 8. Entwicklungsstadiums (Sanders *et al.*, 1999) zeigten eine insgesamt schwache *AtPSKR1* Expression im sporophytischen Gewebe, wovon das Tapetum am intensivsten gefärbt war (Abbildung 26 c). Eine Expression in den Mikrosporen war nicht zu erkennen (Abbildung 26 c). In Querschnitten von Antheren älteren Entwicklungsstadiums war eine sehr schwache Promotoraktivität in den Pollen zu erkennen, hingegen war das sporophytische Gewebe nicht mehr gefärbt (eigene Daten, nicht gezeigt). Die Expression in den Samenanlagen war entwicklungsabhängig. In Blüten des 12. Entwicklungsstadiums waren die Ovula gefärbt (Abbildung 26 d), hingegen wiesen diese in Blüten des 13. Entwicklungsstadiums keine Promotoraktivität mehr auf, jedoch war das Leitgewebe des Gynoeceums gefärbt (eigene Daten, nicht gezeigt). Nach der Befruchtung war in den

Samen keine Expression erkennbar (Abbildung 26 e). Darüber hinaus wurde *AtPSKR1* schwach im Leitgewebe von Schoten und in den Nektarien exprimiert (Abbildung 26 e).

Um einen Überblick der Promotor-*GUS* Expressionen der PSK-Präproproteingene und des PSK-Rezeptorgens in Blüten zu erhalten, wurden die Expressionsdaten in der Tabelle 6 zusammengestellt. PSK-Präproproteingene und *AtPSKR1* wiesen eine entwicklungsabhängige und gewebespezifische Expression in den Blüten auf. Alle untersuchten Promotoren waren in proliferierenden Antheren vor der Anthese, insbesondere im Tapetum aktiv. Möglicherweise ist PSK in die Differenzierung des Tapetums in Sekretionsgewebe involviert.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Promotor-*GUS* Expressionen der PSK-Präproproteingene und von *AtPSKR1* in reproduktiven Organen von *Arabidopsis*, welche in Abbildung 26 gezeigt sind. (+) = Expression im Gewebe, (-) = keine Expression im Gewebe

Gen	<i>AtPSK1</i>	<i>AtPSK2</i>	<i>AtPSK3</i>	<i>AtPSK4</i>	<i>AtPSK5</i>	<i>AtPSKR1</i>
Gewebe						
Antheren	Tapetum vor Anthese	+	vor Anthese	+	Leitgewebe, Tapetum	+
Mikrosporen	-	freie Mikrosporen	Tetradenstadium	freie Mikrosporen	-	-
Pollen	-	+ / Pollenschlauch	-	+	-	+ schwach
Filament	vor Anthese	apikaler Teil	+	+	+	+
Gynoeceum	vor Anthese Leitgewebe, Ovarien	-	+	kurz vor Anthese, Ovarien, Stomazellen, Leitgewebe	Leitgewebe	+ / nach Anthese Leitgewebe
Ovulum	+	-	+	+	-	+
Schoten	-	Leitgewebe	+ / Leitgewebe	Stomazellen, Leitgewebe	+ / Leitgewebe	+ / Leitgewebe
Samen	-	-	-	+	-	-
Nektarien	-	+	+	-	+	+
Sepalen, Petalen	-	-	-	Leitgewebe	Leitgewebe	-

Die Expression von *AtPSK2* und *AtPSK3* sowie von *AtPSKR1* in freien Mikrosporen läßt ebenfalls eine Rolle von PSK während der Pollenreifung vermuten. Die Promotor-*GUS* Expressionen im Tapetum und in den Mikrosporen sowie eine stärker veränderte Pollenmorphologie der PSK-Rezeptormutante, bestärken die Möglichkeit einer Rolle von PSK während der Mikrosporogenese. Die unspezifische Expression von *AtPSK1*, *AtPSK3*, *AtPSK4* und *AtPSKR1* in den Samenanlagen ließ Funktionen von PSK während der Entwicklung und möglicherweise der Befruchtung der Ovula vermuten. *AtPSK4* wurde in Samen exprimiert. Eine Expression von *AtPSKR1* war in sich entwickelnden Samen allerdings nicht erkennbar. Die spezifische Expression einiger PSK-Präproproteingene und des Rezeptorgens in den Nektarien und aller untersuchten Gene im Tapetum weist auf eine möglichen Rolle von PSK in sekretorischen Geweben hin.

5. Diskussion

5.1. PSK- α fördert das Wurzelwachstum

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PSK- α konzentrationsabhängig das Wurzelwachstum von Arabidopsis fördert. An Zellkulturen ist beschrieben, dass exogenes PSK- α in nanomolaren Konzentrationen die Proliferation von Zellen in Kulturen geringer Dichte positiv beeinflusst (Matsubayashi *et al.*, 1996; Matsubayashi und Sakagami, 1996). In Arabidopsispflanzen waren 10 nM PSK- α ausreichend, um die Wurzelbiomasse signifikant zu erhöhen. Diese Konzentration war mit der in *in vitro* Studien an Membranfraktionen gezeigten Bindungsaffinität von [³H]PSK- α an den PSK-Rezeptor AtPSKR1 mit $7,7 \pm 0,9$ nM vergleichbar (Matsubayashi *et al.*, 2006). 100 nM und höhere Konzentrationen von PSK- α führten zu einer Zunahme des Wurzelfrischgewichts um 20%. Bei Zugabe von 1 oder 10 μ M PSK- α wurde kein vermehrtes Wurzelwachstum beobachtet. Das Pentapeptid lag in der Sättigung vor. PSK- α förderte das Wurzelwachstum von Arabidopsispflanzen in relativ geringen Konzentrationen.

Die vermehrte Bildung von Wurzelbiomasse nach PSK- α Zugabe war auf ein verstärktes Wachstum der Haupt- sowie der Lateralwurzeln und auf eine erhöhte Anzahl gebildeter Lateralwurzeln in den Pflanzen zurückzuführen. Allerdings änderte sich, wie mit Hilfe von $P_{AtCycB1;1}::GUS$ Transformanten festgestellt wurde, die Lateralwurzelichte durch PSK- α nicht. *CycB1;1* ist ein Marker für Zellen in der Mitose (Beeckman *et al.*, 2001). $P_{AtCycB1;1}::GUS$ Transformanten wurden für die Bestimmung von Primordien und Seitenwurzeln von Keimlingen verwendet. Die mit exogen appliziertem PSK- α behandelten Pflanzen bildeten aufgrund einer längeren Hauptwurzel entsprechend mehr Lateralwurzeln aus. Die konstitutive Überexpression von *AtPSK4*, eines PSK-Präproteingens, führte ebenfalls zu einem erhöhten Wurzelwachstum von Arabidopsispflanzen (Matsubayashi *et al.*, 2006). Interessanterweise war weder nach konstitutiver Überexpression von *AtPSKR1* noch nach Erhöhung der *AtPSKR1* Genkopienzahl ein erhöhtes Wurzelwachstum der transgenen Pflanzen messbar (Matsubayashi *et al.*, 2006). Somit scheint *in vivo* PSK- α und nicht der PSK-Rezeptor limitiert zu sein.

Das Sprosswachstum von Arabidopsispflanzen oder *Zea mays* Keimlingen wurde durch exogen appliziertes PSK- α nicht induziert. Das erhöhte Wurzelwachstum bewirkte keine Zunahme der Sprossbiomasse der Pflanzen. In *AtPSK4* und *AtPSKR1* überexprimierenden Transformanten wurde ebenfalls kein vermehrtes Sprosswachstum beobachtet (Matsubayashi *et al.*, 2006). In der PSK-Rezeptor T-DNA Insertionsmutante *Atpskr1-T* war das Spross- und das Wurzelgewicht im Vergleich zu Wildtyppflanzen um 20% beziehungsweise um 40% reduziert. Möglicherweise bedingte das verminderte

Wurzelwachstum eine geringere Ausbildung von Blattmasse in der Mutante. Charakteristisch für *Atpskr1-T* Pflanzen waren verkürzte Hauptwurzeln und dem Wildtyp vergleichbare Längen der Seitenwurzeln. Die Anzahl ausgebildeter Lateralwurzeln von *Atpskr1-T* differierte nicht von der von Wildtyppflanzen. PSK- α förderte somit nicht die Organogenese von Wurzeln in Arabidopsis, wie für Hypokotylsegmente von *Cucumis sativus* gezeigt. *Cucumis sativus* bildete vermehrt Adventivwurzeln nach PSK- α Behandlung aus (Yamakawa *et al.*, 1998). Der Phänotyp von *Atpskr1-T* deutete ebenfalls auf eine Rolle von PSK- α bei der Regulation des Wurzelwachstums hin. Möglicherweise interagiert das Pentapeptid bei diesem Prozess mit anderen Phytohormonen, beispielsweise mit Jasmonsäure (JA), Abscisinsäure (ABA) oder Cytokinin. JA, ABA und Cytokinine haben Einfluss auf die mitogene Aktivität von Zellen (Swiatek *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 1998; Werner *et al.*, 2003). Arabidopsiskeimlinge, die mit exogen applizierter JA (Devoto und Turner, 2003; Feys *et al.*, 1994; Staswick *et al.*, 1992; Swiatek *et al.*, 2002; 2003) oder ABA (Ghassemian *et al.*, 2000; Gosti *et al.*, 1999; Leung *et al.*, 1997) behandelt wurden, zeigten ein inhibiertes Wurzelwachstum. Einige JA insensitive Mutanten wiesen in Gegenwart von JA keine verkürzten Hauptwurzeln im Vergleich zu Wildtyppflanzen auf (Feys *et al.*, 1994; Lorenzo *et al.*, 2004; Staswick *et al.*, 1992). Die Überexpression von Cytokinin Oxidase/Dehydrogenasengen (AtCKX) in Tabak reduzierte die endogene Konzentration von Cytokinin, was in starkem Maße das Wurzelwachstum beeinflusste (Werner *et al.*, 2001). *AtCKX1* überexprimierende Arabidopsismutanten wiesen längere Hauptwurzeln, eine erhöhte Anzahl initiiertes Lateral- und Adventivwurzeln und ein vergrößertes Wurzelmeristem als der Wildtyp auf. Eine Regulation des Wurzelwachstums in Arabidopsis könnte, möglicherweise durch Interaktion der von PSK- α transduzierten Signale, mit denen der Phytohormone Jasmon-, Abscisinsäure oder Cytokinin erfolgen.

Das durch PSK- α geförderte Wurzelwachstum ist möglicherweise auf eine Rolle des Pentapeptids während der Zellteilung zurückzuführen. Dies würde mit der beschriebenen Funktion von PSK- α bei der Proliferation von Zellen in Kulturen niedriger Dichte korrespondieren (Matsubayashi und Sakagami, 1996). Zudem wurde bei synchronisierten Zellkulturen von Arabidopsis eine zellzyklusabhängige Expressionen von *AtPSK4* und *AtPSKR1* gezeigt (Zimmermann *et al.*, 2004). Diese korrelieren mit der S-Phase im Zellzyklus (Menges *et al.*, 2003). Für *OsPSK1* und *OsPSK4*, zwei PSK-Präproteingenen aus Reis wurden ebenfalls Replikations-spezifische Expressionen gezeigt (AG Sauter unveröffentlichte Daten). PSK- α könnte eine Rolle während der DNA Synthese oder im weiteren Verlauf des Zellteilungszyklus spielen und auf diese Weise die Proliferation der Zellen begünstigen.

Interessanterweise enthält der *AtPSK4* Promotor an Position -398 bp ein Mitose spezifisches Aktivator cis-Element (MSA-Element) (A/C)CCAACNG(C/T)C, welches der identifizierten Bindungsstelle von c-Myb-Transkriptionsfaktoren aus Vertebraten

ähnelt (Howe und Watson, 1991; Ito *et al.*, 2001). An MSA-Elemente binden in Pflanzen Myb-Faktoren mit drei Domänen R1, R2 sowie R3 (MYBR3) Transkriptionsfaktoren (Ito *et al.*, 2001). Diese weisen Struktur- sowie Sequenzähnlichkeit mit c-Myb-Transkriptionsfaktoren aus Vertebraten auf (Kranz *et al.*, 2000; Stracke *et al.*, 2001). Die in Arabidopsis identifizierten *AtMYBR3* Gene spielen, ebenso wie c-Myb-Transkriptionsfaktoren aus Vertebraten, eine Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus (Kranz *et al.*, 2000; Stracke *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2001). So zeigen c-Myb-Proteine eine maximale Aktivität während der späten G1- und der S-Phase im Zellzyklus (Weston, 1998). c-Myb-Transkriptionsfaktoren sind unter anderem in die transkriptionelle Regulation von *CDC2* (Ku *et al.*, 1993), der DNA Polymerase α (Venturelli *et al.*, 1990) und von *CyclinA* (Müller *et al.*, 1999) involviert, die wichtig für den G1/S-Phasenübergang sind (Ito *et al.*, 2001). Die S-Phasen spezifische *AtPSK4* Expression könnte durch *AtMYBR3*-Transkriptionsfaktoren reguliert werden, die an die Myb-Erkennungssequenz im *AtPSK4* Promotor binden. PSK- α könnte auf diese Weise an Steuerungsprozessen des Zellzyklus beteiligt sein, die die Teilung von Zellen positiv beeinflussen.

Das durch PSK- α induzierte Wurzelwachstum könnte nicht nur auf eine Rolle von PSK- α bei der Regulation des Zellzyklus zurückzuführen sein, sondern möglicherweise auch auf einen Einfluss des Pentapeptids auf die Zellstreckung. Der Längenzuwachs von Wurzeln beruht hauptsächlich auf Zellverlängerung im Bereich der Streckungszone in der Wurzelspitze. Evidenzen für ein PSK- α gefördertes Streckungswachstum sind bisher *in planta* noch nicht beschrieben worden. Allerdings löste PSK- α in nanomolaren Konzentrationen eine von Kaliumionen abhängige Schwellung von Protoplasten aus Koleoptilen von *Zea mays* aus (Renate Dahlke, AG Sauter unveröffentlichte Daten). Koleoptilen stellen ein klassisches System dar, um die Regulation von Wachstum und Tropismen durch Zellstreckung zu untersuchen (Philippbar *et al.*, 1999). Möglicherweise beeinflusst PSK- α auch die Streckung von Wurzelzellen in Arabidopsispflanzen. Gestützt wird diese Vermutung durch den Phänotyp der *Atpskr1-T* Mutante, die bei einer um 35% kürzeren Hauptwurzel eine vergleichbare Zahl Lateralwurzeln wie der Wildtyp ausbildete. In Analogie zu den Wachstumsexperimenten mit Wildtypkeimlingen nach PSK- α Applikation, hätten relativ zur Hauptwurzellänge weniger Lateralwurzeln in der Mutante gebildet werden müssen, was jedoch nicht der Fall war. Vielleicht besitzen die Wurzelzellen der Mutante eine geringere Zellgröße im Gegensatz zu Wildtyppflanzen. Infolgedessen würden in *Atpskr1-T* Pflanzen vermutlich ebenso viele Lateralwurzeln wie im Wildtyp gebildet. Eine Untersuchung der Anzahl und Größe von Wurzelzellen von jungen Keimlingen von der Kalyptra bis zur Initiationsstelle der ersten Seitenwurzeln könnten darüber Aufschluss geben.

Um herauszufinden, in welchen Geweben von Arabidopsis PSK- α gebildet und perzipiert wird und um daraus mögliche Funktionen des Pentapeptids in Wurzeln ableiten zu können, wurden Expressionsstudien der PSK-Präproteingene und

des PSK-Rezeptorgens durchgeführt. *AtPSKR1* wurde sowohl im ausdifferenzierten Wurzelgewebe, als auch im Apex von Haupt- und Lateralwurzeln exprimiert. Die Expression war in allen Zellschichten zu erkennen. Die Expression in der Wurzelspitze war verstärkt in der Kalyptra und ab circa 80 μm von der Wurzelspitze in basipetaler Richtung schwächer in der meristematischen Zone erkennbar. *AtPSKR1* wurde somit ubiquitär in Wurzeln gebildet. Eine Perzeption von PSK- α wäre theoretisch im gesamten Wurzelgewebe möglich. Die fünf PSK-Präproteingene wurden jedoch spezifisch in unterschiedlichen Wurzelgeweben exprimiert. Die PSK-Promotoraktivitäten in diesen Geweben weisen auf verschiedene Prozesse der Wurzelentwicklung hin, in die PSK- α möglicherweise involviert sein könnte.

AtPSK1 und *AtPSK3* wurden in der Wurzelspitze exprimiert, *AtPSK2*, *AtPSK4* und *AtPSK5* hingegen nicht. *AtPSK1* war im gesamten Apex und *AtPSK3* in der Wurzelspitze auf einer Länge von circa 100 μm aktiv. Dieser Bereich umfasst nach Dolan *et al.* (1993) die Columellazellen und die Zellen der lateralen Wurzelhaube, das apikale Wurzelmeristem mit den Wurzelinitialzellen und den mitotisch inaktiven Zellen des ruhenden Zentrums (Wang *et al.*, 2005), die Zellstreckungszone und die Differenzierungszone. Die Expressionsdaten zeigten eine Aktivität der PSK-Präproteingene und von *AtPSKR1* in meristematischen Zellen sowie in der Streckungszone. Möglicherweise besitzt das Pentapeptid eine Funktion bei der Proliferation und der Elongation von Wurzelzellen im Apex. Dies korrespondiert mit dem gezeigten Einfluss von PSK- α auf das Wurzelwachstum und dem Phänotyp von *Atpskr1-T* Pflanzen. Das Genexpressionsmuster von *AtPSK1*, *AtPSK3* und *AtPSKR1* in der Wurzelspitze unterschied sich jedoch von dem von $P_{AtCycB1;1}::GUS$ Transformanten in der meristematischen Zone. Möglicherweise spielt PSK- α insbesondere bei der Ausbildung der Columella- und der lateralen Wurzelhaube eine Rolle. So könnte das Pentapeptid einen Einfluss auf die antiklinale Teilung der Columellastammzellen, die periklinale Teilungen der epidermalen sowie lateralen Wurzelhaubeninitialen und den folgenden antiklinale Teilungen der Tochterzellen haben (Dolan *et al.*, 1993, Sack, 1997). Weiterhin wäre eine Funktion des Pentapeptids bei der Zellstreckung und Differenzierung der Wurzelhaubenzellen denkbar (Dolan *et al.*, 1993; Sack, 1997). Der *Atpskr1-T* Phänotyp gab keine Hinweise auf eine spezifische Funktion des Pentapeptids in der Wurzelspitze. Jedoch könnte PSK- α an redundanten Signalwegen bei der Ausbildung und/oder bei Differenzierungsprozessen der Kalyptra beteiligt sein.

Verschiedene Gene, die für Proteine des JA-Synthese- oder JA-Signalwegs kodieren, wurden in den äußeren Zellschichten der Wurzelspitze exprimiert (Birnbaum *et al.*, 2003). In diesen Geweben wurden ebenfalls *AtPSK1*, *AtPSK3* und *AtPSKR1* Promotoraktivitäten festgestellt. Die Behandlung von Arabidopsiskeimlingen mit JA oder dem flüchtigen Derivat Methyljasmonat (MeJA) führte zu einem inhibierten Wurzelwachstum (Devoto und Turner, 2003; Feys *et al.*, 1994; Lorenzo *et al.*, 2004; Staswick *et al.*, 1992;

Swiatek *et al.*, 2003). JA hat einen Einfluss auf die Streckung von Zellen und auf den Verlauf des Zellzyklus in meristematischen Wurzelzellen (Swiatek *et al.*, 2003; Staswick *et al.*, 1992). Die Zugabe von JA vor dem G1/S-Phasenübergang von synchronisierten BY-2 Tabakzellen verhindert die DNA-Replikation sowie die Zellteilung. Wenn die Behandlung in der späten S-Phase erfolgte, blieb ebenfalls die Teilung der Tabakzellen aus (Swiatek *et al.*, 2003; 2004). Neben dem Expressionsmuster von *AtPSK1*, *AtPSK3* und *AtPSKR1* im Apex, welches mit dem von JA-Genen korreliert und dem inhibierten Wurzelwachstum von *Atpskr1-T* Pflanzen, spricht eine weitere Beobachtung für eine mögliche Interaktion von PSK- α mit dem Phytohormon JA in Wurzeln von Arabidopsis. Die Expressionen der PSK-Präproteingene und von *AtPSKR1* sind in 7 d alten Arabidopsiskeimlingen nach MeJA Behandlung herunterreguliert (Zimmerman *et al.*, 2004). Möglicherweise interagieren PSK- α und JA und beeinflussen dadurch die Teilung und/oder die Streckung von Wurzelzellen. Diese Hypothese sollte in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

5.2. PSK- α ist möglicherweise in redundante Signalwege während der Leitgewebedifferenzierung involviert

Expressionsdaten wiesen neben der Wurzelspitze auf eine mögliche Bildung von PSK- α im Leitgewebe von Wurzeln und im Spross hin. PSK-Präproteingene wurden im Zentralzylinder, im Perizykel und vereinzelt in Zellen der Endodermis von Wurzeln exprimiert. Das Leitgewebe, bestehend aus Xylem- und Phloemelementen, ist vorrangig für den Langstreckentransport von Wasser und darin gelösten Substanzen und von Assimilaten verantwortlich. Das Pentapeptid ist durch die Sulfatierung der Tyrosinreste sehr hydrophil, wodurch es für einen Transport über das Phloem in der Pflanze gut geeignet wäre. Jedoch wurde PSK- α nicht nur im Leitgewebe der Wurzeln, sondern in der gesamten Pflanze gebildet. Somit ist die Notwendigkeit eines Langstreckentransports von PSK- α in Spross und Wurzeln nicht gegeben. Möglicherweise erfolgt ein nicht vaskulärer abaxialer Transport von PSK- α in Wurzeln von Arabidopsis. Die Expressionsdaten von *AtPSKR1* lassen neben einer Perzeption von PSK- α im Zentralzylinder eine PSK-Signalweiterleitung im Cortex sowie in der Wurzelepidermis vermuten.

PSK- α könnte in Differenzierungsprozesse des vaskulären Gewebes involviert sein. Die Expressionen von *AtPSK2*, *AtPSK3*, *AtPSK4* und *AtPSK5* im Zentralzylinder erstreckten sich in akropetaler Richtung über die Wurzelhaarzone bis in die Zellstreckungszone. In diesem Bereich finden Reifungsprozesse der angelegten Xylemelemente und teilweise des Phloems in Sieb- und Geleitzellen statt. Die Differenzierung des Xylems, welches aus lignifizierten Zellen wie den Tracheiden und Tracheen besteht, führt unter

anderem zur Verstärkung der Zellwände und zum Absterben der Zellen (Bonke *et al.*, 2003). Matsubayashi *et al.* (1999) zeigten in *in vitro* Studien an Mesophyllzellen von *Zinnia elegans* einen Einfluss von PSK- α auf die Differenzierung dieser Zellen in Tracheenelemente. Das Pentapeptid förderte konzentrationsabhängig die Reifung der Mesophyllzellen in Tracheenelemente (Matsubayashi *et al.*, 1999). Somit ist neben den Phytohormonen Auxin und Cytokinin (Fukuda, 1997) PSK- α in den Differenzierungsprozess zur Bildung von Tracheenelementen involviert (Matsubayashi *et al.*, 1999). In einer Reihe von Experimenten konnte ein Einfluss von Auxin auf die Bildung und die Gestalt des Gefäßgewebes gezeigt werden (Berleth und Mattsson, 2000; Ye, 2002). Die Expressionsmuster der PSK-Präproteingene im Zentralzylinder von Wurzeln und Spross überschneiden sich mit denen von Genen, die eine Funktion bei der Auxin vermittelten Entwicklung des vaskulären Systems haben (Aloni *et al.*, 2003; Birnbaum *et al.*, 2003; Scarpella *et al.*, 2004). Möglicherweise interagieren Auxin und PSK- α während der Ausbildung und Differenzierung des Leitgewebes in Pflanzen.

Ein weiterer Hinweis auf eine Rolle von PSK- α während der Differenzierung des Leitgewebes ergaben Transkriptanalysen der PSK-Präproteingene und von *AtPSKR1* in der *continuous vascular ring (cov1)* Mutante (Zimmerman *et al.*, 2004). Der Stamm der *cov1* Pflanzen weist eine dramatische Zunahme von vaskulärem Gewebe anstelle der interfasikularen Region auf, die normalerweise die Leitbündel voneinander trennt (Parker *et al.*, 2003). Erhöhte *AtPSK1*, *AtPSK2* und *AtPSK3* Expressionen im Leitgewebe von Blüten von *cov1* wurde festgestellt (Zimmerman *et al.*, 2004). Bisher ist unklar, ob *cov1* die Leitgewebeentwicklung in einem von Auxin unabhängigen Mechanismus beeinflusst (Parker *et al.*, 2003).

AtPSK2, *AtPSK3* und *AtPSK4* wurden in Wurzeln von Keimlingen verstärkt im Zentralzylinder und Perizykel an Stellen exprimiert, an denen Lateralwurzeln entstehen. Aus den Zellen des Perizykels werden Lateralwurzeln unter dem Einfluss von Auxin *de novo* initiiert (Beeckman *et al.*, 2001; Himanen *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der $P_{AtCycB1;1}::GUS$ Transformanten gezeigt, dass exogenes PSK- α keinen Einfluss auf die Bildung neuer Lateralwurzeln hatte. Möglicherweise ist PSK- α eher an der Ausbildung und Differenzierung des Leitgewebes in jungen Seitenwurzeln und an der Verknüpfung der Gefäße beteiligt. Jedoch waren in *Atpskr1-T* Pflanzen keine morphologische Veränderungen des ausgebildeten Leitgewebes zu beobachten. Einerseits könnte das Pentapeptid an redundanten Signalwegen während der Ausbildung und Differenzierung des Leitgewebes sowie der Verknüpfung der Gefäße beteiligt sein. Andererseits könnte möglicherweise nicht *AtPSKR1*, sondern ein weiterer unbekannter PSK-Rezeptor bei diesem Signalprozess eine Rolle spielen.

5.3. AtPSKR1 ist nicht der einzige PSK-Rezeptor in Arabidopsis

Physiologische Versuche mit exogenem PSK- α sowie der Phänotyp der PSK-Rezeptor T-DNA Insertionsmutante *Atpskr1-T* zeigten eine Rolle des Pentapeptids bei der Regulation des Wurzelwachstums in Arabidopsis. *Atpskr1-T* Keimlinge waren wie Wildtyppflanzen in der Lage, längere Wurzeln durch exogenes PSK- α auszubilden. Anscheinend war eine Perzeption und eine PSK-Signalweiterleitung in *Atpskr1-T* Keimlingen möglich. In Membranfraktionen von Kalluszellen, die von Matsubayashi *et al.* (2006) identifizierten Funktionsverlustmutante *pskr1-1*, war die spezifische [³H]PSK Bindungsaktivität im Vergleich zu der von WT Kalli signifikant reduziert. Eine AtPSKR1 vermittelte PSK-Antwort war in dieser Mutante demnach nicht mehr möglich. Matsubayashi *et al.* (2006) beschrieben aber in ihrer Arbeit, dass Kalli, die von *pskr1-1* Pflanzen hergestellt wurden, weniger sensitiv für PSK- α im Gegensatz zu denen aus WT Pflanzen sind. Das Wachstum der Kalli der *pskr1-1* Mutante schien jedoch nach PSK- α Behandlung ebenfalls induziert, wenn auch in geringerem Maße als bei WT Kalli. Demnach kann nicht ausgeschlossen werden, dass in Kalli von *pskr1-1* Pflanzen keine PSK-Signalweiterleitung erfolgte. Möglicherweise existieren weitere noch unbekannte PSK-Rezeptoren in Arabidopsis die eine PSK-Antwort vermitteln. AtPSKR1 könnte der einzige identifizierbare PSK-Rezeptor in Membranfraktionen von Kalluszellen sein. Möglicherweise bindet PSK- α auch an lösliche Rezeptoren oder Rezeptorkomponenten, die nicht isoliert wurden.

An Membranfraktionen von Kalluszellen von Arabidopsis und von *Daucus carota* wurden jeweils 120 kDa und 150 kDa PSK-Rezeptoren identifiziert (Matsubayashi *et al.*, 2002; 2006), deren Peptidrückgrat identisch war (Matsubayashi *et al.*, 2002). Die Verwandtschaftsanalyse zeigte weitere mit DcPSKR1 und AtPSKR1 verwandte Rezeptorkinasen mit Leucin-reichen Wiederholungselementen („leucine-rich repeats“, LRR) in Arabidopsis. LRR-Rezeptorkinasen gehören mit über 200 Mitgliedern zu der größten Untergruppe von transmembranen Rezeptorkinasen in Arabidopsis (Torii, 2004). Mit 48% und 43% Sequenzidentität waren At5g53890 und At1g72300 nach AtPSKR1 die zweit- beziehungsweise dritthomologsten LRR-Kinasen zu DcPSKR1. Von beiden LRR-Rezeptorkinasen sind bisher keine Funktionen beschrieben worden. Durch den Verwandtschaftsgrad zu AtPSKR1 kämen At5g53890 und At1g72300 als mögliche PSK-Rezeptorkandidaten in Frage. Darüber hinaus sind DcPSKR1 und AtPSKR1 homolog zu weiteren LRR-Rezeptorkinasen mit Sequenzidentitäten unterhalb von 35%. Zu diesen verwandtschaftlich weiter entfernten Rezeptorkinasen zählten die als Brassinosteroidrezeptoren identifizierten BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 LIKE (BRL1) und BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1) (Clouse *et al.*, 1996; Cano-Delgado *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004), die LRR-Rezeptorkinasen EXCESS MICROSPOROCTES 1 (EXS/EMS1) (Canales *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2002)

und EMBRYO SAC DEVELOPMENT ARREST 23 (EDA23) (Pagnussat *et al.*, 2005). Vom Brassinosteroidrezeptor BRI1 aus Tomate ist bekannt, dass dieser nicht nur Brassinosteroide, sondern auch das nach Verwundung frei gesetzte Signalpeptid Systemin perzipiert (Scheer und Ryan, 2002; Montoya *et al.*, 2002; Holton *et al.*, 2007). Dieses Beispiel zeigt, dass ein Rezeptorprotein als Schnittstelle verschiedener Signalwege agieren kann. Es ist nicht auszuschließen, dass PSK- α durch weitere Rezeptoren perzipiert werden kann.

Parallel zu den Wachstumsversuchen an Arabidopsispflanzen mit exogen appliziertem PSK- α wurden Versuche mit unsulfatiertem Pentapeptid (dsPSK) oder einzelnen, im Pentapeptid vorkommenden Aminosäuren, in äquimolarer Konzentration als Effektoren durchgeführt. Das Wurzelfrischgewicht von *Atpskr1-T* Pflanzen war ebenfalls durch dsPSK signifikant erhöht. Ebenso wurde in Wildtyppflanzen die Wurzellänge durch dsPSK beeinflusst. Die Behandlung der Pflanzen mit einzelnen Aminosäuren in äquimolarer Konzentration führte weder im WT noch in der Mutante zu einem verstärktem Wurzelwachstum. In Studien zur Bestimmung der mitogenen Aktivität von PSK- α Strukturanaloga an *Asparagus officinalis* Mesophyllzellen wurde gezeigt, dass dsPSK eine mehr als tausendfach verringerte Aktivität im Vergleich zu PSK- α besitzt (Matsubayashi *et al.*, 1996). Ebenso findet eine geringe Verdrängung von an Plasmamembranen von Reis gebundenem [³H]PSK- α durch das unsulfatierte Pentapeptid statt (Matsubayashi und Sakagami, 1999). Die für die Wachstumsexperimente gewählte Konzentration von 1 μ M PSK- α lag im sättigenden Bereich. Möglicherweise rief die gleiche Konzentration von dsPSK eine geringe PSK- α Antwort in Pflanzen hervor und förderte dadurch das Wurzelwachstum.

5.4. PSK- α fördert das Wachstum der Filamente und spielt eine Rolle bei der Pollenentwicklung

Die Architektur der Blüten der PSK-Rezeptormutante unterschied sich nicht hinsichtlich des Aufbaus aus vier Wirteln von dem von Wildtyppflanzen. Die Anatomie der Blütenorgane war ebenfalls unverändert. Somit scheint AtPSKR1 nicht in die Ausbildung der Blütenidentität involviert zu sein. Ebenso wurde kein veränderter Blühzeitpunkt beobachtet. Jedoch unterschied sich die Morphologie der *Atpskr1-T* Schoten von der von WT Schoten. Die Mutante bildete eine höhere Zahl von kürzeren Schoten aus, die eine geringere Anzahl entwickelter Samen enthielten. Durchschnittlich entwickelten sich in den Schoten von *Atpskr1-T* Pflanzen nur halb so viele Samen wie in Wildtyppflanzen. Über 50% der *Atpskr1-T* Schoten enthielten unter 25% entwickelte Samen. In den Schoten waren grünliche entwickelte Samen mit Embryonen, bräunliche

abotierte Samen und weiße nicht entwickelte Samen erkennbar. Die Morphologie der entwickelten Samen mit Embryonen unterschied sich deutlich von der der abotierten Samen, die klein, in der Embryonalentwicklung inhibiert und bräunlich aufgrund eines erhöhten Anthozyangehaltes (Grossniklaus *et al.*, 1998) waren. Die Zahl dieser abotierten Samen war mit unter 1% in WT und *Atpskr1-T* Schoten vergleichbar niedrig. Die weißen nicht entwickelten Samen waren verkümmert und um ein Vielfaches kleiner als die entwickelten und abotierten Samen. Der Phänotyp der Mutante ließ daher eine eingeschränkte Befruchtung der Samenanlagen und/oder eine Störung früher embryonaler Entwicklungsprozesse vermuten.

Untersuchungen von *Atpskr1-T* Infloreszenzen zeigten, dass Blüten nach Anthese und bei Bestäubung (12. und 13. Blütenentwicklungsstadium nach Roeder und Yanofsky, 2006) ein unkoordiniertes Wachstum der inneren Blütenorgane aufwiesen. In *Atpskr1-T* Blüten bei Bestäubung waren die Antheren unterhalb des Stylus, wodurch die Pollinierung beeinträchtigt war. Möglicherweise waren die Filamente von *Atpskr1-T* Blüten so verkürzt, so dass die Antheren nicht die Höhe des Stigmas erreichten. Ebenso könnte das Auswachsen des Gynoeceums in *Atpskr1-T* Blüten verfrüht sein, welches in Wildtyppflanzen charakteristisch für das 15. Entwicklungsstadium ist (Roeder und Yanofsky, 2006). Mutanten mit gestörter JA-Synthese zeigen Defekte bei der Synchronisierung der Dehiszenz von Antheren, der Pollenreifung und der Öffnung der Blütenknospen (Ishiguro *et al.*, 2001; Sanders *et al.*, 1999; 2000; Stintzi und Browse, 2000). Die meisten in der JA-Synthese und JA-Antwort gestörten Mutanten sind männlich steril (Ishiguro *et al.*, 2001; Feys *et al.*, 1994; Park *et al.*, 2002; Sanders *et al.*, 2000; Stintzi und Browse, 2000). Durch Applikation von exogener JA auf Blüten während eines bestimmten Entwicklungszeitraumes kann die Fertilität der Mutanten teilweise wieder hergestellt werden (Ishiguro *et al.*, 2001; Sanders *et al.*, 2000; Stintzi und Browse, 2000). Nach dem Modell von Ishiguro *et al.* (2001), welches in Abbildung 27 gezeigt ist, fördert JA den synchronen Ablauf von Pollenreifung, Dehiszenz und Anthese.

Die Phospholipase *DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE1 (DAD1)*, welche Lipide in Linolensäure umsetzt und somit den ersten Schritt der JA-Biosynthese katalysiert, wird im apikalen Teil der Filamente in Blüten im frühen 12. Entwicklungsstadium (Roeder und Yanofsky, 2006) exprimiert (Ishiguro *et al.*, 2001). Die im oberen Filament gebildete JA fördert zunächst die Aufnahme und den Transport von Wasser aus den Loculi der Antheren durch das Endothecium und das Konnektiv ins Filament. Die Aufnahme von Wasser aus den Antheren verursacht die Streckung der Filamente. JA wird während des 12. Entwicklungsstadiums im gesamten Filament gebildet und fördert des Weiteren den Transport von Wasser aus dem Blütenstiel in die Petalen und bewirkt auf diese Weise die Streckung der Zellen. Die Streckung der Filamente und der Petalen resultieren in der Öffnung der Blüten und der Dehiszenz der Antheren. Durch die Aufnahme des Wassers aus den Loculi der Antheren ins Filament trocknen die Loculi aus. Dieser Vorgang trägt

zur Pollenreifung und zur anschließenden Dehiszenz der Antheren bei (Abbildung 27). Der Transport des Wassers durch die Filamente in die Petalen wird durch den Aufbau eines osmotischen Gradienten, durch die Umsetzung von Stärke in Zucker gewährleistet (Bonner und Dickinson, 1990).

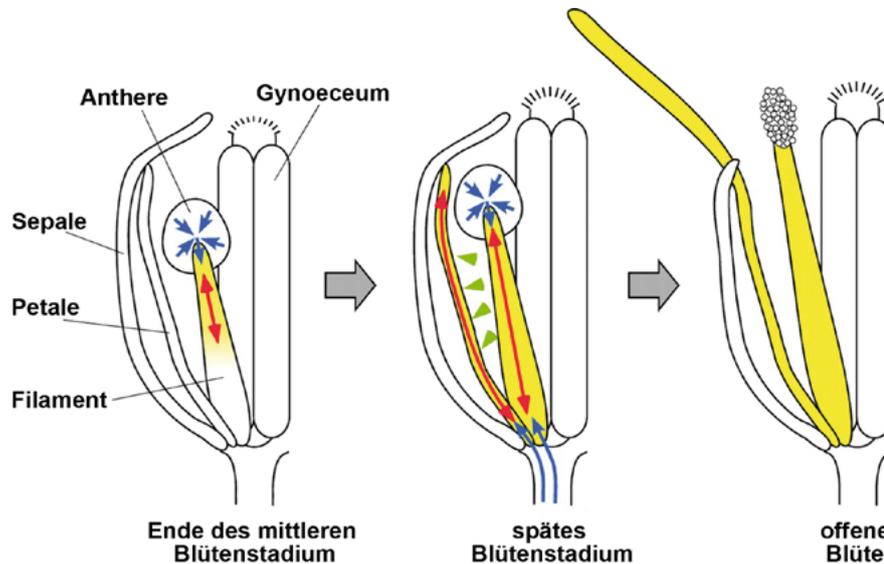


Abb. 27: Synchronisierung der Pollenreifung, Dehiszenz der Antheren und der Blütenöffnung durch Jasmonsäure (JA) nach Ishiguro *et al.* (2001). Die gelb gefärbten Regionen repräsentieren Organe, welche aktiv Wasser aufnehmen und in denen Zellstreckung in Antwort auf JA stattfindet. Die Übertragung von JA, die Elongation von Organen und der Transport von Wasser sind mit grünen Pfeilköpfen, beziehungsweise mit roten sowie mit blauen Pfeilen gezeigt. Die angegebenen Blütenstadien entsprechen nach Roeder und Yanofsky (2006) dem frühen 12., dem 12. und dem 13. Blütenentwicklungsstadium.

In *Atpskr1-T* Pflanzen war nicht die Dehiszenz der Antheren und somit die Freisetzung der Pollen, aber die möglicherweise die Streckung der Filamente gestört. PSK- α könnte einen Einfluss auf die Streckung der Zellen in den Filamenten haben. Promotor-GUS Analysen von Infloreszenzen von *Arabidopsis* bestätigen Aktivität aller PSK-Präproteingene und des PSK-Rezeptorgens in Antheren und im Filament vor und während der Anthese. Zudem war der *AtPSK2* Promotor in sich öffnenden Blüten im apikalen Teil der Filamente aktiv, in dem nach Ishiguro *et al.* (2001) eine verstärkte JA-Synthese stattfindet. Möglicherweise hat PSK- α einen Einfluss auf das Streckungswachstum der Filamente, vielleicht in Interaktion mit JA. Interessant wäre festzustellen, ob bei *Atpskr1-T* Pflanzen in Analogie zu einigen JA-Mutanten (Ellis und Turner, 2002; Ishiguro *et al.*, 2001; Sanders *et al.*, 2000), die Applikation exogener JA und/oder von exogenem PSK- α auf Blütenknospen zu einer erhöhten Samenbildung führen würde. Darüber hinaus müsste in weiteren Untersuchungen ein möglicher Einfluss von PSK- α auf das Wachstum des Gynoeceums geklärt werden.

Die Expressionen der PSK-Präproteingene und von *AtPSKR1* in Infloreszenzen von *Arabidopsis* wiesen auf mögliche Rollen des Pentapeptids bei der Entwicklung

der männlichen Reproduktionsorgane und bei der Pollenentwicklung hin. Neben einer möglichen Funktion bei der Filamentelongation könnte PSK- α in sehr frühe Prozesse der Staminaentwicklung involviert sein. So könnte PSK- α bei der Regulierung von Zellteilung und von Differenzierungsprozessen in Antheren beteiligt sein, die zur Bildung der Mikrosporangien, des Konnektivs und des Leitgewebes führen. Allerdings wiesen *Atpskr1-T* Blüten keine veränderte Anatomie der Stamina auf. Jedoch könnte PSK- α an redundanten Signalwegen der Entwicklung der männlichen Blütenorgane beteiligt sein, die sich nicht anatomisch auf den Bau der Stamina auswirken. Die Expressionsdaten stützen einen möglichen Einfluss von PSK- α bei der Entwicklung des Konnektivs und des Leitgewebes, welche zusammen aus dem Kern des Staminaprimordiums gebildet werden (Scott *et al.*, 2004). Eine Funktion von PSK- α in Antheren bei Entwicklung der Mikrosporangien würde sowohl die Entstehung des diploiden sporophytischen Gewebes als auch des haploiden Mikrogametophyten beeinflussen. Die Pollensäcke entstehen aus vier Mikrosporangienründerzellen, den Archesporen, der subepidermalen Schicht des Staminaprimordiums, die durch periklinale Zellteilung parietale Zellen und primäre Sporen bilden (Jenik und Irish, 2000; Sander *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 1999). Aus den primären Sporen entwickeln sich durch weitere Zellteilungen die Pollenmutterzellen und nach folgenden Meiosen vier haploide Mikrosporen (Scott *et al.*, 2004). *AtPSK3* wurde in den Tetraden und *AtPSK2* und *AtPSK4* in freien Mikrosporen sowie im reifen Pollen exprimiert. *AtPSK2* war ebenso im keimenden Pollen aktiv. Somit erfolgte eine entwicklungsabhängige Regulation dreier PSK-Präproteingene während der Mikrosporangienentwicklung, jedoch schien PSK- α von der Entwicklung der Tetraden bis zum reifen Pollen eine Rolle zu spielen. Ob die PSK-Präproteingene in Pollenmutterzellen aktiv waren ist ungeklärt, jedoch durchaus denkbar. Das hieße, dass das Pentapeptid in eine Vielzahl verschiedener Prozesse der Pollenentwicklung involviert sein könnte. Eine Perzeption von PSK- α durch *AtPSKR1* könnte nach Promotor-GUS-Studien oder auf Mikrochip gestützte Transkriptanalysen (Winter *et al.*, 2007) erst im reifen Pollen erfolgen. Die Genexpressionen von *AtPSK2*, *AtPSK4* und *AtPSKR1* im reifen Pollen weisen auf eine mögliche Funktion von PSK- α bei Signalaustauschprozessen zwischen Pollen bei der Keimung und/oder beim Pollenschlauchwachstum hin.

Nach den Expressionsdaten war in sich entwickelnden Mikrosporen keine *AtPSKR1* Aktivität erkennbar. Möglicherweise könnte eine Perzeption von PSK- α durch andere Rezeptorkinasen in den Mikrosporen erfolgen, wodurch die Entwicklung der Pollen beeinflusst werden würde. Allerdings wurden nach Winter *et al.* (2007) die beiden zu *AtPSKR1* homologsten LRR-Kinasen unbekannter Funktion *At5g53890* und *At1g72300* weder in den Mikrosporen, noch im reifen Pollen exprimiert.

Durch periklinale Zellteilung entstehen aus den parietalen Zellen das Endothecium und durch weitere Teilungen die Mittelschicht sowie das Tapetum (Scott *et al.*, 2004). Eine Expression der PSK-Präproteingene und von *AtPSKR1* war in jungen Antheren im sich

entwickelnden sporophytischen Gewebe, aber insbesondere im Tapetum erkennbar. Um Proteine, Lipide, Polysaccharide und andere Moleküle absondern zu können, die wichtig für die Pollenentwicklung und den Aufbau der Pollenwand sind (Goldberg *et al.*, 1993), findet die Differenzierung des Tapetums in sekretorisches Gewebe statt (Scott *et al.*, 2004). Möglicherweise ist PSK- α an Differenzierungsprozessen im Tapetum beteiligt. Die Bildung und Absonderung von Nährstoffen sowie von Bestandteilen für den Aufbau der Pollenwand erfordern eine erhöhte metabolische Kapazität der Tapetumzellen, die zum Teil mit Zellkernveränderungen durch Endomitose und Endoreduplikation einhergeht (Inzé und Veylder, 2006; Scott *et al.*, 2004). Die S-Phasen abhängige Expression von *AtPSK4* und *AtPSKR1* im Zellzyklus ließ eine Rolle von PSK- α bei der DNA-Replikation vermuten (Zimmermann *et al.*, 2004). Diese findet sowohl im mitotischen als auch im Endozyklus statt, woran die gleiche Maschinerie beteiligt ist (Inzé und Veylder, 2006). Junge *Atpskr1-T* Antheren wiesen im Vergleich zum WT keinen veränderten Aufbau des sporophytischen Gewebes auf. Weder die Anzahl der Zellschichten der Pollensäcke, noch die Morphologie und die Dicke des Tapetums waren in der Mutante verändert. Da Endoreduplikation nicht zwangsläufig eine Zunahme der Zellgröße bedingen muss (Inzé und Veylder, 2006), könnte ein fehlender Einfluss von PSK- α in der Mutante im Umkehrschluss nicht unbedingt eine sichtbare Veränderung der Zellschichtdicke des Tapetums hervorrufen. Anscheinend sind in jungen *Atpskr1-T* Pflanzen keine essentiellen Vorgänge während der Antherenentwicklung gestört, die sich direkt auf die Antherenmorphologie auswirkten.

Während der frühen Pollenentwicklungsphase bestehen Verbindungen zwischen den Pollenmutterzellen untereinander und dem Nährgewebe über Plasmodesmata, worüber Signalaustausch stattfindet und Entwicklungsprozesse synchronisiert werden (Heslop-Harrison, 1966). Da durch die Bildung der Tetraden der zytoplasmatische Kontakt zwischen den Mikrosporen und dem Tapetum verloren geht (Boavida *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2004), scheinen andere Kommunikationsmöglichkeiten zwischen den sich entwickelnden Mikrosporen und dem Tapetum eine Rolle zu spielen. *AtPSKR1* war verstärkt im Tapetum aktiv. PSK- α wurde in sich entwickelnden Mikrosporen gebildet und könnte möglicherweise im Tapetum perzipiert werden. Das Pentapeptid könnte auf diese Weise eine Rolle bei Signalprozessen spielen, bei denen das Tapetum zur Absonderung von Substanzen stimuliert wird, die für Entwicklung des Pollens und den Aufbau der Pollenwand wichtig sind. Die Bildung der Pollenwand beginnt kurz nach der Meiose, dauert während des Tetradenstadiums und des Stadiums in dem Vakuolen in den Mikrosporen ausgebildet werden an und ist nach der ersten Pollenmitose beendet (Boavida *et al.*, 2005). So finden im Tetradenstadium erste Ablagerungen zur Bildung einer Pollenwand statt, wobei um jede Mikrospore eine primäre Exineschicht ausgebildet wird (Heslop-Harrison, 1963). *Atpskr1-T* Mikrosporen im Tetradenstadium während des siebten Antherenentwicklungsstadiums schienen morphologisch vergleichbar mit

Tetraden von WT Pflanzen zu sein (Sander *et al.*, 1999). Im 11. Stadium zeigte sich, dass *Atpskr1-T* Pollensäcke vermehrt unregelmäßig geformte Mikrosporen enthielten. Die veränderte Morphologie dieser unreifen Pollen war möglicherweise auf eine defekt aufgebaute Pollenwand zurückzuführen. Defekte bei der Ausbildung der Pollenwand traten vermutlich vor dem 11. Entwicklungsstadium der Antheren auf, da in diesem Stadium nach Boavida *et al.* (2005) der Aufbau der Pollenwand fast abgeschlossen ist. Charakteristisch für dieses Stadium ist der Aufbau eines Schutzmantels aus degeneriertem Nährgewebe, welches sich als Abschluss um die äußere Exineschicht der Mikrosporen legt (Dickinson *et al.*, 2000), die Dehydrierung der Pollen (McCormick, 1993) und die zweite Pollenmitose (Sanders *et al.*, 1999). Die Expressionsdaten lassen einen Einfluss von PSK- α während des gesamten Zeitraumes beim Aufbau der Pollenwand vermuten. Ungeklärt ist, bei welchen Signalprozessen das Pentapeptid eine Rolle spielen könnte. Möglicherweise ist PSK- α auch an Prozessen beteiligt, die zur Degeneration des Nährgewebes führen. Insgesamt waren 10% der reifen *Atpskr1-T* Pollenkörner kleiner und schienen degeneriert zu sein. Im WT lag die Zahl dieser Pollenkörner bei 1%. Arabidopsismutanten, die Pollen mit einer defekten Pollenwand ausbilden, können nicht hydrieren und keinen Pollenschlauch ausbilden (Preuss *et al.*, 1993). *In vitro* Pollenkeimungsversuche zeigten, dass die degenerierten *Atpskr1-T* und WT Pollenkörner nicht in der Lage waren zu hydrieren und auszukeimen. Möglicherweise wiesen diese Pollenkörner eine fehlerhaft ausgebildete Pollenwand auf.

Die *in vitro* Keimungsrate von WT Pollen lag mit 27% weit unter der von Fan *et al.* (2001) publizierten mit 70%. Möglicherweise ist die geringere Keimungsrate des WT Pollens auf die Verwendung eines anderen *Arabidopsis thaliana* Ökotyps zurückzuführen. Die Keimungsversuche wurden mit dem Ökotyp Columbia und nicht mit Landsberg erecta durchgeführt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Keimungsrate von *Atpskr1-T* Pollen mit 16% noch deutlich geringer war. Die um 40% verminderte Keimungsfähigkeit von *Atpskr1-T* Pollen gegenüber WT Pollen ließ einen möglichen Einfluss des Pentapeptids bei der Keimung der Pollen vermuten. Chen *et al.* (2000) zeigte, dass exogenes PSK- α die Keimungsrate von *in vitro* kultivierten Tabakpollen geringer Dichte erhöhte und auf diese Weise zum Pollenpopulationseffekt beiträgt. Die verminderte Keimungsfähigkeit der *Atpskr1-T* Pollen könnte auf eingeschränkte Pollen-Pollen-Interaktion in der Mutante zurückzuführen sein, da in der Mutante eine Perzeption von PSK- α durch AtPSKR1 nicht möglich war.

Über Kreuzung von WT und *Atpskr1-T* Pflanzen wurden die Einflüsse einer geringeren Keimungsfähigkeit der *Atpskr1-T* Pollen und von asynchronem Wachstum der inneren Wirtel auf die Samenbildung in der Mutante untersucht. Wildtyppflanzen bildeten durchschnittlich doppelt so viele Samen wie die Mutante. Interessanterweise wurden nach *in vitro* Pollination der WT Pflanzen durchschnittlich nur 3% weniger Samen im Vergleich zu selbst bestäubenden Pflanzen gebildet. Die Entfernung der Stamina sowie

der Bestäubungsvorgang hatten somit kaum einen Einfluss auf die Samenentwicklung. Die Kreuzung von *Atpskr1-T* Eltern zeigte, dass der Abstand der Antheren zum Stigma in *Atpskr1-T* Blüten zu einer eingeschränkten Samenbildung führte. Die Eliminierung dieses Einflusses durch die Bestäubung zeigte, dass nach der *Atpskr1-T* Kreuzung nur 35% weniger Samen im Gegensatz zur WT Kreuzung gebildet wurden. Selbst bestäubte *Atpskr1-T* Pflanzen bildeten hingegen nur halb so viele Samen wie WT Pflanzen aus. Sicherlich wirkte sich der Bestäubungsvorgang der *Atpskr1-T* negativ auf die Samenentwicklung aus. Jedoch war dessen Anteil im Gegensatz zur der Kreuzung von WT Eltern nicht erkennbar. Der Abstand der Antheren zum Stigma beeinflusste die Samenbildung in *Atpskr1-T* Pflanzen zu 27%.

Die *in vitro* gezeigte verminderte Keimungsfähigkeit von *Atpskr1-T* Pollen, wirkte sich mit 13% in geringem Maße auf die Samenbildung aus, wie die Bestäubung von WT Blüten mit *Atpskr1-T* Pollen zeigte. Im Vergleich zur Kreuzung von WT Eltern wurden 7% weniger Samen nach der Bestäubung gebildet. *In vivo* spielten Einflüsse des weiblichen WT Blütengewebes bei der Keimung von *Atpskr1-T* Pollen eine verstärkte Rolle und nicht Pollen-Pollen-Interaktionen. *Atpskr1-T* Pollen weisen möglicherweise keine Defekte bei Pollen-Stigma-Signalprozessen auf.

Die Bestäubung der *Atpskr1-T* Blüten mit WT Pollen führte zu keiner Komplementierung des Mutantenphänotyps. Die Zahl entwickelter Samen war mit der nach der *Atpskr1-T* Kreuzung vergleichbar. Durch die Pollination wurde deutlich, dass das weibliche Blütengewebe einen großen Einfluss auf die Samenbildung in *Atpskr1-T* Pflanzen hat. Dieser lag bei 60%.

Insgesamt wirkte sich ein maternaler Effekt mit 60% am stärksten, das asynchrone Wachstum der inneren Wirtel mit 27% und am schwächsten die geringere Keimungsfähigkeit des Pollens mit 13% auf die Samenbildung in *Atpskr1-T* Pflanzen aus.

5.5. PSK- α kontrolliert die Befruchtung von maternaler und paternaler Seite

Promotor-GUS Expressionen der *PSK-Präproproteingene* und von *AtPSKR1* ließen eine Funktion von PSK- α im weiblichen Blütenorgan vor Anthese vermuten. *AtPSK3* war in allen Geweben des sich entwickelnden Gynoeceums aktiv. *AtPSKR1* wurde verstärkt im weiblichen Blütenorgan mit sich entwickelnden Samenanlagen exprimiert. Querschnitte zeigten sehr unspezifische Expressionen von *AtPSK3* und *AtPSKR1* im Gynoeceum. *AtPSK1*, *AtPSK4* waren in diesem Zeitraum verstärkt in den Ovarien und ebenso wie *AtPSK5* im Leitgewebe aktiv. PSK- α scheint somit in Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse des weiblichen Blütenorgans involviert zu sein. Zudem könnte PSK- α in Prozesse

zur Vorbereitung auf die Bestäubung, sogenannte Präpollinationsprozesse involviert sein (Heslop-Harrison, 1999). So wäre durch die Expression der PSK-Präproteingene und von *AtPSKR1* im apikalen Teil des Gynoeceums eine Rolle des Pentapeptids während der Entwicklung der stigmatischen Papillazellen denkbar. Diese sind für die Adhäsion und Hydrierung des Pollens wichtig (Heslop-Harrison, 1999; Smyth *et al.*, 1990). Ein Einfluss von PSK- α bei der Verlängerung des Stylus sowie die Differenzierung des inneren Gewebes in das sekretorische Übertragungsgewebe wäre möglich (Sanchez *et al.*, 2004).

Die Expressionsdaten wiesen auf eine Rolle von PSK- α während der Entwicklung der Samenanlagen hin. *AtPSKR1* war verstärkt in Blüten ab circa dem neunten Entwicklungsstadium aktiv. Dieser Zeitpunkt korreliert mit der Initiation der Samenanlagen im weiblichen Blütenorgan (Robinson-Beers *et al.*, 1992). PSK- α könnte vermutlich in Blüten vor und während der Fertilisation sowohl im gametophytischen, als auch im sporophytischen Gewebe der Ovula gebildet und perzipiert werden. Eine Spezifizierung der Zellen war allerdings nicht möglich. Lorbiecke *et al.* (2005) zeigten für zwei PSK-Präproteingene aus Mais, *ZmPSK1* und *ZmPSK3*, Expressionen in der Eizelle und der Zentralzelle des weiblichen Gametophyten. *ZmPSK1* wurde zudem in Synergiden exprimiert. PSK- α könnte somit tatsächlich einen Einfluss auf die Entwicklung oder Befruchtung des weiblichen Gametophyten haben. Darüber hinaus sind beide Gene im sporophytischen Nucellusgewebe aktiv (Lorbiecke *et al.*, 2005). Das sporophytische Gewebe, welches den Gametophyten umgibt, spielt bei der Kontrolle der Megagametogenese eine Rolle (Chaudhury *et al.*, 1998; Gasser *et al.*, 1998; Grossniklaus und Schneitz, 1998). Die Expressionsdaten weisen auf mögliche Funktionen von PSK- α während der Entwicklung und Differenzierung der Samenanlagen hin. Ein maternaler Effekt während der Samenbildung könnte in Gynoeceen von *Atpskr1-T* Blüten schon vor Anthese determiniert sein. Die weiblichen Blütenorgane und Ovula von *Atpskr1-T* Pflanzen schienen zu diesem Zeitpunkt normal entwickelt. Allerdings ist unklar, ob das auch auf die Entwicklung des Embryosacks zutrifft.

Signalaustauschprozesse zwischen dem Stigma und dem Pollen sind Voraussetzung für eine Keimung des Pollens (Zinkl *et al.*, 1999; Wilhelmi und Preuss, 1999). Die Expressionen der PSK-Präproteingene und von *AtPSKR1* im reifen Pollen sind ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von PSK- α bei Pollen-Stigma-Interaktionen. In den Papillazellen des Stigmas von Blüten während der Bestäubung waren jedoch keine Promotoraktivitäten der PSK-Präproteingene und von *AtPSKR1* erkennbar. Möglicherweise waren die Genexpressionen in diesen Geweben zu schwach, so dass keine GUS-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Nicht auszuschließen sind PSK-Signalprozesse zwischen Pollen und Stigma, welche durch einen anderen PSK-Rezeptor vermittelt werden. Ob PSK- α eine Rolle bei Pollen-Stigma-Interaktionen spielt, ist noch ungeklärt. Eine mögliche Beteiligung des Pentapeptids an Signalprozessen,

die das Pollenschlauchwachstum in der extrazellulären Matrix im Übertragungsgewebe beeinflussen, ist noch unerforscht. Die Zellen des Übertragungsgewebes sekretieren unter anderem Nährstoffe für den wachsenden Pollenschlauch (Cheung, 1996). Darüber hinaus lenken im Übertragungsgewebe aufgebaute chemische Gradienten den Pollenschlauch in das Ovarium (Panlani et al., 2003; Wu et al., 1995). *AtPSK3* wurde im Stylus von Blüten nach Anthese exprimiert. Expressionen von *AtPSK1*, *AtPSK5* und *AtPSKR1* waren in Blüten während der Bestäubung im Leitgewebe des apikalen Gynoeceums erkennbar. Jedoch war eine spezifische Expression der PSK-Präproteingene und von *AtPSKR1* im Übertragungsgewebe von Blüten während der Bestäubung nicht sichtbar (eigene Daten, nicht gezeigt). Eine Funktion von PSK- α bei Prozessen, die der Ernährung und Orientierung des wachsenden Pollenschlauchs seitens des Übertragungsgewebes dienen, ist daher unwahrscheinlich.

Das Wachstum des Pollenschlauchs im Übertragungsgewebe zu den Samenanlagen wird in besonderem Maße von Signalen beeinflusst, die vom weiblichen Gametophyten ausgesendet werden (Sanchez et al., 2004; Yadegari und Drews, 2004). Mutanten, die Defekte während der Embryosackentwicklung aufweisen oder keinen weiblichen Gametophyten ausbilden, sind nicht in der Lage, das Wachstum des Pollenschlauchs in Richtung des Ovulums zu führen (Hülkamp et al., 1995; Ray et al., 1997; Shimizu und Okada, 2000). Eine besondere Rolle spielen dabei die Synergiden (Higashiyama et al., 2001; Skinner et al., 2004), in denen in *Zea mays* die Expression eines PSK-Gens gezeigt wurde (Lorbiecke et al., 2005). Zusätzlich scheinen Faktoren, die im sporophytischen Gewebe gebildet werden, für das gerichtete Wachstum des Pollenschlauchs zu den Ovula wichtig zu sein (Higashiyama, 2002; Palanivelu und Preuss, 2000). Allgemein wird vermutet, dass sekretierte Proteine und Peptide kleiner als 15 kDa an Kommunikationsprozessen zwischen Zellen in frühen Reproduktionsstadien involviert sind (Hennig et al., 2004) so möglicherweise auch PSK- α . Das Pentapeptid hat eine Größe von circa 0,6 kDa. PSK- α könnte nicht nur einen Einfluss auf die Entwicklung der Samenanlagen haben, sondern darüber hinaus an Prozessen beteiligt sein, die eine Orientierung des Pollenschlauchs zum Ovulum hin bewirken. Für das Wachstum des Pollenschlauchs zur Samenanlage scheinen ebenfalls Signale eine Rolle zu spielen, die von den Spermazellen ausgesendet werden (von Besser et al., 2006). PSK- α wird in Mais nicht nur in der Samenanlage, sondern auch in den Spermazellen gebildet (Lorbiecke et al., 2005). *AtPSK2* und *AtPSK4* wurden im Pollen exprimiert. *AtPSK2* war zudem im wachsenden Pollenschlauch aktiv (eigene Daten, nicht gezeigt). Somit könnte PSK- α auch von paternaler Seite in Prozesse involviert sein, die die Orientierung des Pollenschlauchs zur Micropyle des Ovulums bewirken.

In der *Atpskr1-T* Mutante könnten Defekte während der Entwicklung des Embryosacks, sowie des sporophytischen Gewebes der Ovula und des dreizelligen Pollens zu einer Beeinträchtigung von Signalprozessen führen, die das Pollenschlauchwachstum

zum Ovulum beeinflussen. Darüber hinaus könnte die Wachstumsgeschwindigkeit des Pollenschlauchs im Übertragungsgewebe zu den Ovula verlangsamt sein. Früher befruchtete Ovula werden vom weiblichen Gewebe besser unterstützt als später befruchtete (Delph *et al.*, 1998). Untersuchungen von *Atpskr1-T* Gynoeceen während der Fertilisation der Samenanlagen zeigten im Gegensatz zu WT Gynoeceen stark gewundene Pollenschläuche am mikropylaren Pol der Ovula. Jedoch müssten weitere Untersuchungen des Pollenschlauchwachstums *in planta* erfolgen, um diesbezüglich Aussagen machen zu können.

PSK- α spielte sowohl von paternaler als auch von maternaler Seite eine Rolle während der Befruchtung mit einem maternalen Anteil von 60%. Möglicherweise spielt eine durch AtPSKR1 vermittelte PSK-Antwort bei einer Vielzahl von Prozessen im Gynoeceum eine Rolle, die zu einer erfolgreichen Befruchtung der Eizelle und der Zentralzelle und somit zur Entstehung der Zygote und des Endosperms beitragen. Die von Lorbiecke *et al.* (2005) gezeigte Expression in Synergiden ließ eine Rolle des Pentapeptids bei der Degenerierung dieser Zellen vermuten. Das Absterben der Synergiden ist eine Voraussetzung für eine normale Befruchtung (Yadegari und Drews, 2004). Derzeit ist unklar, ob dieser Vorgang in Arabidopsis vor dem Eintritt des Pollenschlauchs auf die Synergiden stattfindet oder physikalisch durch das Auftreffen des Pollenschlauchs erzeugt wird. Jedoch wird eher ein physiologisch induzierter Prozess diskutiert (Yadegari und Drews, 2004). Möglicherweise ist PSK- α in verschiedene Prozesse des programmierten Zelltods, der Degeneration der Synergiden, des Tapetum oder möglicherweise während der Megasporogenese oder während der Ausbildung des Leitgewebes involviert. Das Pentapeptid wurde in vegetativen Geweben mit einer Form des programmierten Zelltods, der Seneszenz, in Verbindung gebracht (Matsubayashi *et al.*, 2006).

AtPSK4 wurde als einziges PSK-Gen nach Befruchtung im sich entwickelnden Samen exprimiert. Möglicherweise erfolgte eine Bildung von PSK- α während der gesamten Samenentwicklung, was eine Funktion des Pentapeptids bei Zellteilungs- und Wachstumsprozessen während der Entwicklung des Embryos und des Endosperms vermuten ließe. In sich entwickelnden Samen wurde keine *AtPSKR1* Promotoraktivität festgestellt. Die *AtPSKR1* Expression in diesem Gewebe lag möglicherweise unterhalb der Nachweisgrenze, da Mikrochip gestützte Transkriptanalysen eine schwache *AtPSKR1* Expression in sich entwickelnden Samen zeigen (Winter *et al.*, 2007; Zimmerman *et al.*, 2004). In sich entwickelnden *Atpskr1-T* Samen war keine veränderte Morphologie während der Embryogenese erkennbar. Die Embryogenese in *Atpskr1-T* Samen verlief analog zu der in WT Pflanzen wie von Goodrich (1998) gezeigt. Einerseits könnte AtPSKR1 in redundante PSK- α vermittelte Signalwege während der Samenentwicklung involviert sein, die sich phänotypisch nicht auswirkten. Genredundanz scheint die Funktionsanalyse der meisten LRR-Rezeptorkinasen zu erschweren (Zhou *et al.*, 2004). Andererseits könnte AtPSKR1 bei einer PSK- α vermittelten Antwort während

der Samenentwicklung eine untergeordnete oder keine Rolle spielen. Möglicherweise könnte AtPSKR1 in PSK- α vermittelte Signalprozesse vor der Embryonalentwicklung involviert sein, das hieße während der Befruchtung der Samenanlagen. Die zu AtPSKR1 homologste LRR-Rezeptorkinase *At5g53890* wurde ebenfalls im sich entwickelnden Samen exprimiert (Winter *et al.*, 2007). Diese Kinase könnte eine Rolle bei PSK- α vermittelten Signalprozessen bei der Regulierung des Wachstums und der Proliferation von Zellen im sich entwickelnden Samen spielen.

5.6. PSK- α interagiert möglicherweise mit dem Phytohormon Jasmonsäure in unterschiedlichen Geweben

An verschiedenen Stellen wurde in der Arbeit auf eine mögliche Interaktion von PSK- α mit dem Phytohormon JA eingegangen. Kim *et al.* (2006) zeigten einen synergistischen Einfluss von PSK- α und MeJA, der zu einer erhöhten Taxolproduktion von *Taxus canadensis* Zellkulturen führte.

Charakteristisch für *Atpskr1-T* Blüten während der Befruchtung war der Abstand von Antheren zum Stigma, wodurch die Pollinierung der Blüten beeinträchtigt war. Dieser Defekt wirkte sich in der Mutante negativ auf die Samenbildung aus. Expressionsanalysen bestätigten Promotoraktivitäten der PSK-Präproteingene und von *Atpskr1-T* vor und während der Anthese in den Stamina. Daraus ließ sich eine mögliche Funktion von PSK- α beim Wachstum der Filamente ableiten. Ishiguro *et al.* (2001) zeigten, dass JA den Wassertransport in die Filamente und die Petalen reguliert und dadurch das Wachstum der Filamente und der Petalen bewirkt. JA synchronisiert auf diese Weise die Pollenreife, die Dehiscenz der Antheren und die Blütenöffnung miteinander. Möglicherweise interagieren PSK- α und JA im männlichen Blütengewebe und haben einen synergistischen Einfluss auf das Streckungswachstum der Filamente.

Im Apex von Arabidopsiswurzeln überschneiden sich die Expressionsmuster der PSK-Präproteingene und von AtPSKR1 mit denen von Genen, die in Zusammenhang mit JA-Funktionen stehen (Birnbaum *et al.*, 2003). Was mögliche Wechselwirkungen von PSK- α mit JA in diesem Gewebe vermuten ließ. JA spielt bei der Inhibierung von Wachstumsprozessen nach Stresseinfluss eine Rolle (Ellis und Turner, 2002). So inhibiert exogen applizierte JA das Wurzelwachstum von Arabidopsis (Devoto und Turner, 2003; Feys *et al.*, 1994; Staswick *et al.*, 1992; Swiatek *et al.*, 2003). JA beeinträchtigt die Elongation von Wurzelzellen (Staswick *et al.*, 1992) und beeinflusst den Verlauf des Zellzyklus in meristematischen Wurzelzellen (Swiatek *et al.*, 2003). Hingegen förderten exogen appliziertes PSK- α und die Überexpression eines PSK-Präproteingens in Arabidopsis (Matsubayashi *et al.*, 2006) das Wurzelwachstum von Arabidopsispflanzen.

Die PSK-Rezeptormutanten *Atpskr1-T* und *pskr1-1* (Matsubayashi *et al.*, 2006) wiesen verkürzte Hauptwurzeln auf. Ein Einfluss von PSK- α auf das Wurzelwachstum könnte möglicherweise auf eine antagonistische Wirkungsweise von PSK- α und JA zurückgehen. Die in der Perzeption von JA defekte *coronatine insensitive* Mutante (*coi1*) zeigte kein inhibiertes Wurzelwachstum nach JA Behandlung, war jedoch männlich steril (Feys *et al.*, 1994; Staswick *et al.*, 1992). Wie der Phänotyp der *coi1* Mutante zeigt, wäre eine synergistische und antagonistische Interaktion von PSK- α und JA in verschiedenen Geweben nicht ausgeschlossen.

Expressionen der PSK-Präproteingene und von *AtPSKR1* in den Hydathoden, den Stomata und den Nektarien ließen eine Rolle von PSK- α in sekretorischen Geweben vermuten. Gewebe, welche natürliche oberirdische Öffnungen von Pflanzen darstellen, dienen Bakterien als passiven Eingang (Underwood *et al.*, 2007). Stomata reagieren auf eine Reihe von Faktoren, Elizitoren und Phytohormonen (Underwood *et al.*, 2007). MeJA, welches in zahlreiche Pathogenabwehrprozesse involviert ist, induziert das Schließen der Stomata (Munemasa *et al.*, 2006). MeJA bewirkt in vergleichbarer Weise wie ABA die Öffnung von Ca^{2+} Kanälen an der Plasmamembran. Diese öffnen wiederum langsame (S-Typ) Anionenkanäle, wodurch eine langfristige Depolarisierung der Plasmamembran erfolgt, welche einen K^+ Efflux via auswärts gerichteter Kaliumkanäle hervorruft (Munemasa *et al.*, 2006). PSK- α könnte in Hydathoden, Stomata und Nektarien in Signalprozesse bei der Pathogenabwehr involviert sein. Möglicherweise ist das Pentapeptid in Stomata an JA vermittelten Prozessen der Pathogenantwort beteiligt. *AtPSK1*, *AtPSK2*, *AtPSK4*, *AtPSK5* und *AtPSKR1* wurden verstärkt in Blättern nach Inkubation mit dem Pflanzenpathogen *Pseudomonas syringae* exprimiert (Zimmerman *et al.*, 2004). Der verwendete Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 produziert das Phytotoxin Koronatin (Bender *et al.*, 1999). Koronatin ist von der Struktur der JA ähnlich und besitzt funktionelle Homologien zu dem Phytohormon. Das Phytotoxin fungiert möglicherweise als molekulare Mimikry von JA (Feys *et al.*, 1994; Underwood *et al.*, 2007). Koronatin bewirkt das Schließen von Stomata (Underwood *et al.*, 2007; Munemasa *et al.*, 2006). Das Phytotoxin unterdrückt die Expression von Genen, die in Pathogenabwehr involviert sind (Thilmony *et al.*, 2006). Melotto *et al.* (2006) zeigten, dass die Inkubation von Arabidopsis Epidermisstreifen mit Koronatin oder *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 zunächst das Schließen der Stomata bewirkten. Jedoch bewirkt das Phytotoxin auf noch unbekannte Weise nach 3 h Inkubation die Wiederöffnung der Stomata. Auf diese Weise kann das Bakterium von der Pflanze unerkannt durch die Stomata in die Blätter eindringen (Underwood *et al.*, 2007).

Darüber hinaus könnte PSK- α eine Rolle bei Wundantwortprozessen spielen, die in Zusammenhang mit JA stehen (Müller *et al.*, 1993; McConn *et al.*, 1997). Nicht nur *AtPSK4*, sondern auch *AtPSK1*, *AtPSK5* (eigene Daten nicht gezeigt) und *AtPSKR1* werden verstärkt nach Verwundung exprimiert (Matsubayashi *et al.*, 2006; Zimmerman

et al., 2004). Matsubayashi und Sakagami (1996) diskutieren einen möglichen Zusammenhang zwischen der Bildung von PSK- α in Zellkulturen und mechanischer Verwundung dieser Zellen. Möglicherweise fördert PSK- α das Wachstum von Zellen oder die Organogenese in Geweben in Folge einer Wundantwort.

In weiteren Untersuchungen müsste geklärt werden, ob und wie eine mögliche Interaktion von PSK- α und JA erfolgen könnte. Promotor-GUS und auf Mikrochip basierende Transkriptanalysen der PSK-Präproteingene und von *AtPSKR1* sowie die Analyse von *Atpskr1-T* wiesen auf mögliche Wechselwirkungen von PSK- α mit JA in vegetativen und reproduktiven Geweben von *Arabidopsis* hin.

6. Literatur

- Aloni, R., Schwalm, K., Langhans, M., Ullrich, C.I.** (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*. Mar;216(5): 841-53.
- Baeuerle, P.A. and Huttner, W.B.** (1987) Tyrosine sulfation is a trans-Golgi-specific protein modification. *J Cell Biol.* Dec;105(6 Pt 1): 2655-64.
- Baulcombe, D.C., Saunderson, G.R., Bevan, M.W., Mayo, M.A., Harrison, B.D.** (1986) Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature (London)* 321: 446-449.
- Beeckman, T., Burssens, S., Inze, D.** (2001) The peri-cell-cycle in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* Mar;52(Spec Issue): 403-11.
- Bellincampi, D., Morpurgo, G.** (1987) Conditioning factor affecting growth in plant cells in culture. *Plant Sci* 51: 83-91.
- Bender, C.L., Alarcon-Chaidez, F., Gross, D.C.** (1999) *Pseudomonas syringae* phyto-toxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev.* Jun;63(2): 266-92.
- Berleth, T., Mattsson, J.** (2000) Vascular development: tracing signals along veins. *Curr Opin Plant Biol.* Oct;3(5): 406-11.
- von Besser, K., Frank, A.C., Johnson, M.A., Preuss, D.** (2006) *Arabidopsis* HAP2 (GCS1) is a sperm-specific gene required for pollen tube guidance and fertilization. *Development.* Dec;133(23): 4761-9.
- Birnbaum, K., Shasha, D.E., Wang, J.Y., Jung, J.W., Lambert, G.M., Galbraith, D.W., Benfey, P.N.** (2003) A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science.* Dec 12;302(5652): 1956-60.
- Birnberg, P.R., Somers, D.A., Brenner, M.L.** (1988) Characterization of conditioning factors that increase colony formation from Black Mexican sweet corn protoplasts. *J Plant Physiol* 132: 316-321.
- Birnboim, H.C. and Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513.
- Boavida, L.C., Becker, J.D., Feijo, J.A.** (2005) The making of gametes in higher plants. *Int J Dev Biol.* ;49(5-6): 595-614.
- Bonner, L.J., and Dickinson, H.G.** (1990) Anther dehiscence in *Lycopersicon-esculentum*. 2. Water relations. *New Phytol.* 115, 367-375.
- Brand, U., Fletcher, J.C., Hobe, M., Meyerowitz, E.M., Simon, R.** (2000) Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science.* Jul 28;289(5479): 617-9.
- Brewbaker, J.L. and Majumder, S.K.** (1961) Cultural studies of the pollen population effect and the self-incompatibility inhibition. *J. Bot.* 48: 457-464.
- Bonke, M., Thitamadee, S., Mähönen, A.P., Hauser, M.-T. and Helariutta, Y.** (2003) APL regulates vascular tissue identity in *Arabidopsis*. *Nature*, Nov 13;426(6963): 181-6.
- Bundgaard, J.R., Vuust, J. and Rehfeld, J.F.** (1995) Tyrosine O-sulfation promotes proteolytic processing of progastrin. *EMBO J.* Jul 3;14(13): 3073-9.

- Canales, C., Bhatt, A.M., Scott, R., Dickinson, H.** (2002) EXS, a putative LRR receptor kinase, regulates male germline cell number and tapetal identity and promotes seed development in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 12: 1718-1727.
- Cano-Delgado, A., Yin, Y., Yu, C., Vafeados, D., Mora-Garcia, S., Cheng, J.C., Nam, K.H., Li, J., Chory, J.** (2004) BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. *Development* 131: 5341-5351.
- Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G., Bennett, M.J.** (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci.* Apr;8(4): 165-71.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inze, D., Sandberg, G., Casero, P.J., Bennett, M.** (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell.* Apr;13(4): 843-52.
- Chaudhury, A.M., Craig, S., Dennis, E., Peacock, W.** (1998) Ovule and embryo development, apomixis and fertilization. *Curr Opin Plant Biol.* Feb;1(1): 26-31.
- Chen, Y.-F., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y.** (2000) Peptide growth factor phyto-sulfokine- α contributes to the pollen population effect. *Planta* 211: 752-755.
- Cheng, C. and Schuman, S.** (2000) Recombinogenic Flap Ligation Pathway for Intrinsic Repair of Topoisomerase IB-Induced Double-Strand Breaks. *Mol. Cell. Biol.* 20: 8059-8068.
- Cheung, A.Y.** (1996) Pollen-pistil interactions during pollen-tube growth. *Trends Plant Sci.* 1: 45-51.
- Clark, S.E., Running, M.P., Meyerowitz, E.M.** (1993) CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development.* Oct;119(2): 397-418.
- Clark, S.E., Williams, R.W., Meyerowitz, E.M.** (1997) The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell.* May 16;89(4): 575-85.
- Clough, S.J. and Bent, A.** (1998) Floral Dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-743.
- Clouse, S.D., Langford, M., McMorris, T.C.** (1996) A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol.* Jul;111(3): 671-8.
- Cock, J.M. and McCormick, S.** (2001) A large family of genes that share homology with CLAVATA3. *Plant Physiol.* Jul;126(3): 939-42.
- Cordes, J.F.** (1972) Das internationale Einheitensystem. *Naturwissenschaften* 59: 177-182.
- deAlmeida Engler, J., De Vleeschauwer, V., Burssens, S., Celenza, J.L. Jr., Inze, D., Van Montagu, M., Engler, G., Gheysen, G.** (1999) Molecular markers and cell cycle inhibitors show the importance of cell cycle progression in nematode-induced galls and syncytia. *Plant Cell.* May;11(5): 793-808.
- Delph, L.F., Weinig, C., Sullivan, K.** (1998) Why fast-growing pollen tubes give rise to vigorous progeny: a test of a new mechanism. *Proceedings of the Royal Society of London* 265: 935-939.
- De Smet, I., Vanneste, S., Inze, D., Beeckman, T.** (2006) Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Mol Biol.* Apr;60(6): 871-87.
- De Smet, I., Signora, L., Beeckman, T., Inze, D., Foyer, CH., Zhang, H.** (2003) An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant J.* Feb;33(3): 543-55.

- Devoto A, Turner JG.** (2003) Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. *Ann Bot (Lond)*. Sep;92(3): 329-37.
- Dickinson, H.G.** (2000) Pollen stigma interactions: so near yet so far. *Trends Genet*. Sep;16(9): 373-6.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., Scheres, B.** (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*. Sep;119(1): 71-84.
- Drews, G.N. and Yadegari, R.** (2002) Development and function of the angiosperm female gametophyte. *Annu Rev Genet* 36: 99-124.
- Dubrovsky, J.G., Doerner, P.W., Colon-Carmona, A., Rost, T.L.** (2000) Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. Dec;124(4): 1648-57.
- Ellis, C., and Turner, J.G.** (2002). A conditionally fertile *coi1* allele indicates cross-talk between plant hormone signalling pathways in *Arabidopsis thaliana* seeds and young seedlings. *Planta* 215: 549-556.
- Escobar-Restrepo, J.M., Huck, N., Kessler, S., Gagliardini, V., Gheyselinck, J., Yang, W.C., Grossniklaus, U.** (2007) The FERONIA receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception. *Science*. Aug 3;317(5838): 656-60.
- Fan, L.M., Wang, Y.F., Wang, H., Wu, W.H.** (2001) In vitro *Arabidopsis* pollen germination and characterization of the inward potassium currents in *Arabidopsis* pollen grain protoplasts. *J Exp Bot*. Aug;52(361): 1603-14.
- Feys, B.F., Benedetti, C.E., Penford, C.N., and Turner, J.G.** (1994). *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* 6: 751-759.
- Fiers, M., Ku, K.L., Liu, C.M.** (2007) CLE peptide ligands and their roles in establishing meristems. *Curr Opin Plant Biol*. Feb;10(1): 39-43.
- Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R., Meyerowitz, E.M.** (1999) Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science*. Mar 19;283(5409): 1911-4.
- Fukuda, H.** (1997) Tracheary Element Differentiation. *Plant Cell*. Jul;9(7): 1147-1156.
- Galbiati, M., Moreno, M.A., Nadzan, G., Zourelidou, M., Dellaporta, S.L.** (2000) Large-scale T-DNA mutagenesis in *Arabidopsis* for functional genomic analysis. *Funct Integr Genomics*. May;1(1): 25-34.
- Gasser, C.S., Broadhvest, J., Hauser, B.A.** (1998) Genetic analysis of ovule development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. Jun;49: 1-24.
- Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y., McCourt, P.** (2000) Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. Jul;12(7): 1117-26.
- Goldberg, R.B., Beals, T.P., Sanders, P.M.** (1993) Anther development: Basic principles and practical applications. *Plant Cell* 5: 1217-1229.
- Gómez-Gómez, L. and Boller, T.** (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell*. Jun;5(6): 1003-11.
- Goodrich, J.** (1998) Plant development: Medea's maternal instinct. *Curr Biol*. Jul 2;8(14): 480-4.

- Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, Webb AA, Vartanian N, Giraudat J.** (1999) ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell*. Oct;11(10): 1897-910.
- Grossniklaus, U., Spillane, C., Page, D.R., Kohler, C.** (2001) Genomic imprinting and seed development: endosperm formation with and without sex. *Curr Opin Plant Biol*. Feb;4(1): 21-7.
- Grossniklaus, U. and Schneitz, K.** (1998) The molecular and genetic basis of ovule and megagametophyte development. *Semin Cell Dev Biol* 9: 227-238.
- Hanai, H., Matsuno, T., Yamamoto, M., Matsubayashi, Y., Kobayashi, T., Kamada, H., Sakagami, Y.** (2000) A secreted peptide growth factor, phyto-sulfokine, acting as a stimulatory factor of carrot somatic embryo formation. *Plant Cell Physiol*. Jan;41(1): 27-32.
- Hennig L, Gruissem W, Grossniklaus U, Kohler C.** (2004) Transcriptional programs of early reproductive stages in Arabidopsis. *Plant Physiol*. Jul;135(3): 1765-75.
- Heslop-Harrison, J.** (1966) Cytoplasmic connections between angiosperm meiocytes. *Ann. Bot.* 30: 221-230.
- Heslop-Harrison, J.** (1963) An ultrastructural study of pollen wall ontogeny in *Silene pendula*. *Grana Palynol.* 4: 1-24.
- Heslop-Harrison, Y.** (1999) Control Gates and Micro-ecology: The Pollen-Stigma Interaction in Perspective. *Ann. Bot.* 85 (supplement A): 5-13.
- Higashiyama, T., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T.** (2003) Pollen-tube guidance: beacons from the female gametophyte. *Curr Opin Plant Biol*. Feb;6(1): 36-41.
- Higashiyama T** (2002) The synergid cell: attractor and acceptor of the pollen tube for double fertilization. *J Plant Res* 115: 149-160.
- Higashiyama, T., Yabe, S., Sasaki, N., Nishimura, Y., Miyagishima, S., Kuroiwa, H. and Kuroiwa, T.** (2001) Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science* 293: 1480-1483.
- Hille, A., Rosa, P. and Huttner, W.B.** (1984) Tyrosine sulfation: a post-translational modification of proteins destined for secretion? *FEBS Lett.* Nov 5;177(1): 129-34.
- Himanen, K., Boucheron, E., Vanneste, S., de Almeida Engler, J., Inze, D., Beeckman, T.** (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell*. Oct;14(10): 2339-51.
- Höfgen, R. and Willmitzer, L.** (1998) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.* 16: 9877.
- Holton, N., Caño-Delgado, A., Harrison, K., Montoya, T., Chory, J., Bishop, G.J.** (2007) Tomato BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 is required for systemin-induced root elongation in *Solanum pimpinellifolium* but is not essential for wound signaling. *Plant Cell*. May;19(5): 1709-17.
- Howe, K.M. and Watson, R.J.** (1991). Nucleotide preference in sequence-specific recognition of DNA by c-myb protein. *Nucleic Acids Res.* 19: 3913-3919.
- Huck, N., Moore, J.M., Federer, M., Grossniklaus, U.** (2003) The Arabidopsis mutant *feronia* disrupts the female gametophytic control of pollen tube reception. *Development*. May;130(10): 2149-59.
- Hülkamp, M., Schneitz, K., and Pruitt, R.E.** (1995) Genetic evidence for a long-range activity that directs pollen tube guidance in Arabidopsis. *Plant Cell* 7: 57-64.
- Huttner, W.B.** (1982) Sulphation of tyrosine residues—a widespread modification of proteins. *Nature*, 1982 Sep 16;299(5880): 273-6.

- Igasaki, T., Akashi, N., Ujino-Ihara, T., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y., Shinohara, K.** (2003) Phytosulfokine stimulates somatic embryogenesis in *Cryptomeria japonica*. *Plant Cell Physiol.* Dec;44(12): 1412-6.
- Inze, D., De Veylder, L.** (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet.* 40: 77-105.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., Okada, K.** (2001) The *DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE1* gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 2191-2209.
- Ito, M., Araki, S., Matsunaga, S., Itoh, T., Nishihama, R., Machida, Y., Doonan, J. H. and Watanabe, A.** (2001). G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *Plant Cell* 13: 1891-1905.
- Jenik, P.D. and Irish, V.F.** (2000) Regulation of cell proliferation patterns by homeotic genes during *Arabidopsis* floral development. *Development* 127: 1267-1276.
- Jensen, S.L., Holst, J.J., Nielsen, O.V. and Rehfeld, J.F.** (1981) Effect of sulfation of CCK-8 on its stimulation of the endocrine and exocrine secretion from the isolated perfused porcine pancreas. *Digestion* 22(6): 305-9.
- Jeong, S., Trotochaud, A.E., Clark, S.E.** (1999) The *Arabidopsis CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the *CLAVATA1* receptor-like kinase. *Plant Cell.* Oct;11(10): 1925-34.
- Johnson, M.A. and Preuss, D.** (2002) Plotting a course: multiple signals guide pollen tubes to their targets. *Dev. Cell* 2: 273-281.
- Jones, D.A. and Jones, J.D.** (1997) The role of leucine-rich repeats in plant defences. *Adv. Bot. Res.* 24: 90-167.
- Kamiya, N., Nagasaki, H., Morikami, A., Sato, Y., Matsuoka, M.** (2003) Isolation and characterization of a rice *WUSCHEL*-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent centre in the root apical meristem. *Plant J* 35: 429-441.
- Kehoe, J.W. and Bertozzi, C.R.** (2000) Tyrosine sulfation: a modulator of extracellular protein-protein interactions. *Chem Biol. Mar*;7(3): 57-61.
- Kim, B.J., Gibson, D.M., Shuler, M.L.** (2006) Effect of the plant peptide regulator, phytosulfokine-alpha, on the growth and Taxol production from *Taxus* sp. suspension cultures. *Biotechnol Bioeng.* Sep 5;95(1): 8-14.
- Kinoshita, T., Caño-Delgado, A., Seto, H., Hiranuma, S., Fujioka, S., Yoshida, S., Chory, J.** (2005) Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature.* Jan 13;433(7022): 167-71.
- Klein, M., Papenbrock, J.** (2004) The multi-protein family of *Arabidopsis* sulphotransferases and their relatives in other plant species. *J Exp Bot.* Aug;55(404): 1809-20.
- Kobayashi, T., Eun, C.-H., Hanai, H., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y., Kamada, H.** (1999) Phytosulfokine-alpha, a peptidyl plant growth factor, stimulates cell division that leads to somatic embryogenesis in carrot. *J Exp Bot.* 50: 1123-1128.
- Kobe, B. and Kajava, A.V.** (2001). The leucine-rich repeat (LRR) as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11: 725-732.
- Kobe, B. and Deisenhofer, J.** (1994) The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci.* Oct;19(10): 415-21.

- Koncz, C. and Shell, J.** (1986) The promoter of T_L -DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Genet.* 204: 383-396.
- Kranz, H., Scholz, K., and Weisshaar, B.** (2000). c-MYB oncogene-like genes encoding three MYB repeats occur in all major plant lineages. *Plant J.* 21: 231-235.
- Ku, D.H., Wen, S.C., Engelhard, A., Nicolaidis, N.C., Lipson, K.E., Marino, T.A. and Calabretta, B.** (1993) c-myb transactivates *cdc2* expression via Myb binding sites in the 5'-flanking region of the human *cdc2* gene. *J. Biol. Chem.* 268: 2255-2259.
- Landy, A.** (1989) Dynamic, Structural and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific Recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 913-949.
- Laux, T., Mayer, K.F., Berger, J., Jurgens, G.** (1996) The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development.* Jan;122(1): 87-96.
- 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.* Jun;215(2): 287-92.
- Lee, R.W. and Huttner, W.B.** (1983) Tyrosine-O-sulfated proteins of PC12 pheochromocytoma cells and their sulfation by a tyrosylprotein sulfotransferase. *J Biol Chem.* Sep 25;258(18): 11326-34.
- Léon-Kloosterziel, K.M., Keijer, C.J., and Koornneef, M.** (1994). A seed shape mutant of *Arabidopsis* that is affected in integument development. *Plant Cell* 6: 385-392.
- Leung, J., Merlot, S., Giraudat, J.** (1997) The *Arabidopsis* *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2* (*ABI2*) and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell.* May;9(5): 759-71.
- Li, J. and Chory, J.** (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell.* Sep 5;90(5): 929-38.
- Linkohr, B.I., Williamson, L.C., Fitter, A.H., Leyser, H.M.** (2002) Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *Plant J.* Mar;29(6): 751-60.
- Lorbiecke, R., Steffens, M., Tomm, J.M., Scholten, S., von Wiegen, P., Kranz, E., Wienand, U., Sauter, M.** (2005) Phytosulphokine gene regulation during maize (*Zea mays* L.) reproduction. *J Exp Bot* 56: 1805-1819.
- Lorbiecke, R., Sauter, M.** (2002) Comparative analysis of PSK peptide growth factor precursor homologs. *Plant Science* 163: 321-332.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sanchez-Serrano, J.J., Solano, R.** (2004) *JASMONATE-INSENSITIVE1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* Jul;16(7): 1938-50.
- 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.** (2000) 120- and 160-kDa receptors for endogenous mitogenic peptide, phytosulfokine- α , in rice plasma membranes. *J Biol Chem.* May 19;275(20): 15520-5.

- 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.* Aug;120(4): 1043-8.
- 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 U S A.* Nov 25;94(24): 13357-62.
- 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. and Sakagami, Y.** (1996) Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 23;93 (15): 7623-7.
- McConn, M., Creelman, R.A., Bell, E., Mullet, J.E., Browse, J.** (1997) Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 13;94(10): 5473-7.
- McCormick, S.** (1993) Male gametophyte development. *Plant Cell* 5: 1265-1275.
- McGurl, B., Pearce, G., Orozco-Cardenas, M., Ryan, C.A.** (1992) Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science.* Mar 20;255(5051): 1570-3.
- Mellotto, M., Underwood, W., KocZan, J., Nomura, K., He, S.Y.** (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969-980.
- Menges, M., Hennig, L., Grisse, W., Murray, J.A.H.** (2003) Genome-wide gene expression in an *Arabidopsis* cell suspension. *Plant Mol Biol* 53: 423-442.
- Mironov, V. V., De Veylder, L., Van Montagu, M., Inze, D.** (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants- the nexus. *Plant Cell.* Apr;11(4): 509-22.
- Montiel, G., Gantet, P., Jay-Allemand, C., Breton, C.** (2004) Transcription factor networks. Pathways to the knowledge of root development. *Plant Physiol.* Nov;136(3): 3478-85.
- Montoya, T., Nomura, T., Farrar, K., Kaneta, T., Yokota, T., Bishop, G.J.** (2002) Cloning the tomato curl3 gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling. *Plant Cell.* Dec;14(12): 3163-7.
- Müller, C., Yang, R., Idos, G., Tidow, N., Diederichs, S., Koch, O.M., Verbeek, W., Bender, T.P., and Koeffler, H.P.** (1999). c-myb transactivates the human *cyclin A1* promoter and induces *cyclin A1* gene expression. *Blood* 94: 4255-4262.
- Mueller, M.J., Brodschelm, W., Spannagl, E., Zenk, M.H.** (1993) Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 7490-7494.
- Munemasa, S., Oda, K., Watanabe-Sugimoto, M., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., Murata, Y.** (2007) The coronatine-insensitive 1 mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in *Arabidopsis* guard cells. Specific impairment of ion channel activation and second messenger production. *Plant Physiol.* Mar;143(3): 1398-407.
- Murashige, T., Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

- Pagnussat, G.C., Yu, H.J., Ngo, Q.A., Rajani, S., Mayalagu, S., Johnson, C.S., Capron, A., Xie, L.F., Ye, D. and Sundaresan, V.** (2005) Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis*. *Development*, 132: 603-614.
- Palanivelu, R., Brass, L., Edlund, A.F., Preuss, D.** (2003) Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an *Arabidopsis* gene that controls GABA levels. *Cell*. Jul 11;114(1): 47-59.
- Palanivelu, R. and Preuss, D.** (2000) Pollen tube targeting and axon guidance: parallels in tip growth mechanisms. *Trends Cell Biol.* 10: 517-524.
- Park, J.H., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A., Feyereisen, R.** (2002) A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J.* Jul;31(1): 1-12.
- Parker, G., Schofield, R., Sundberg, B., Turner, S.** (2003) Isolation of COV1, a gene involved in the regulation of vascular patterning in the stem of *Arabidopsis*. *Development*. May;130(10): 2139-48.
- Pasonen, H.L. and Käpylä, M.** (1998) Pollen-pollen interactions in *Betula pendula* in vitro. *New Phytologist* 138: 481-487.
- Pauwels, S., Dockray, G. J., and Walker, R.** (1987) Comparison of the metabolism of sulfated and unsulfated heptadecapeptide gastrin in humans. *Gastroenterology*. May;92(5 Pt 1): 1220-5.
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., Ryan, C.A.** (1991) A Polypeptide from Tomato Leaves Induces Wound-Inducible Proteinase Inhibitor Proteins. *Science*. Aug 23;253(5022): 895-897.
- Philippar, K., Fuchs, I., Luthen, H., Hoth, S., Bauer, C.S., Haga, K., Thiel, G., Ljung, K., Sandberg, G., Bottger, M., Becker, D., Hedrich, R.** (1999) Auxin-induced K⁺ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 12;96(21): 12186-91.
- Preuss, D., Lemieux, B., Yen, G., Davis, R.W.** (1993) A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Dev.* 7: 974-985.
- Ray, S.M., Park, S.S. and Ray, A.** (1997) Pollen tube guidance by the female gametophyte. *Development* 124: 2489-2498.
- Reiser, L. and Fischer, R.L.** (1993) The Ovule and the Embryo Sac. *Plant Cell*. Oct;5(10): 1291-1301.
- Robinson-Beers, K., Pruitt, R.E., and Gasser C.S.** (1992) Ovule development in wild-type *Arabidopsis* and two female-sterile mutants. *Plant Cell*. 4: 1237-1249.
- Roeder, A.H., Yanofsky, M.F.** (2006) Fruit Development in *Arabidopsis*. In CR Somerville, EM Meyerowitz, eds, *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi: 10.1199/tab.0075, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>.
- Russell, S.D.** (1993) The Egg Cell: Development and Role in Fertilization and Early Embryogenesis. *Plant Cell*. Oct;5(10): 1349-1359.
- Ryan, C.A., Pearce, G.** (2003) Systemins: a functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in Solanaceae species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 25;100 Suppl 2: 14577-80.
- Sack, F.D.** (1997) Plastids and gravitropic sensing. *Planta*. Sep;203(Suppl 1): 63-8.

- Saghai-Marouf, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A., Allard, R.W.** (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec;81(24): 8014-8.
- Sambrook, J. and Russell, D.W.** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanchez, A.M., Bosch, M., Bots M, Nieuwland, J., Feron, R., Mariani, C.** (2004) Pistil factors controlling pollination. *Plant Cell*. ;16 Suppl: 98-106.
- Sandaklie-Nikolova, L., Palanivelu, R., King, E.J., Copenhaver, G.P., Drews, G.N.** (2007) Synergid cell death in *Arabidopsis* is triggered following direct interaction with the pollen tube. *Plant Physiol*. Aug;144(4): 1753-62.
- Sanders, P.M., Lee, P.Y., Biesgen, C., Boone, J.D., Beals, T.P., Weiler, E.W., and Goldberg, R.B.** (2000). The *Arabidopsis DELAYED DEHISCENCE1* gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant Cell* 12: 1041-1062.
- Sanders, P.M., Bui, A.Q., Weterings, K., McIntire, K.N., Hsu, Y.-C., Lee, P.Y., Truong, M.T., Beals, T.P., and Goldberg, R.B.** (1999). Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sex. Plant Reprod.* 11: 297-322.
- Sanger, F., Nickler, S., Clouson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Sarkar, A.K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R., Laux, T.** (2007) Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature*. Apr 12;446(7137): 811-4.
- Scarpella, E., Francis, P., Berleth, T.** (2004) Stage-specific markers define early steps of procambium development in *Arabidopsis* leaves and correlate termination of vein formation with mesophyll differentiation. *Development*. Jul;131(14): 3445-55.
- Scheres, B., Wolkenfelt, H., Willemsen, V., Terlouw, M., Lawson, E., Dean, C., Weisbeek, P.** (1994). Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development* 120: 2475-2487.
- Scheer, J.M. and Ryan, C.A. Jr.** (2002) The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 9;99(14): 9585-90.
- Schmülling, T.** (2002) New insights into the functions of cytokinins in plant development. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 40-49.
- Scott, R.J., Spielman, M., Dickinson, H.G.** (2004) Stamen structure and function. *Plant Cell*. 16 Suppl: 46-60.
- Shimizu, K.K. and Okada, K.** (2000) Attractive and repulsive interactions between female and male gametophytes in *Arabidopsis* pollen tube guidance. *Development* 127: 4511-4518.
- Shiu, S.H. and Bleecker, A.B.** (2001) Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Sci STKE*. Dec 18;2001(113): RE22.
- Skinner, D.J., Hill, T.A., Gasser, C.S.** (2004) Regulation of ovule development. *Plant Cell* 16 (suppl.): 32-45.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L., Meyerowitz, E.M.** (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2: 755-767.
- Stahl, Y. and Simon, R.** (2005) Plant stem cell niches. *Int. J. Dev. Biol.* 49: 479-489.

- Staswick, P.E., Tiryaki, I., and Rowe, M.L.** (2002). Jasmonate response locus JAR1 and several related Arabidopsis genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* 14: 1405-1415.
- Staswick, P.E., Su, W., and Howell, S.H.** (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6837-6840.
- Stintzi, A., and Browse, J.** (2000). The Arabidopsis male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10625-10630.
- Stracke, R., Werber, M., Weisshaar, B.** (2001) The R2R3-MYB gene family in Arabidopsis thaliana. *Curr Opin Plant Biol.* Oct;4(5): 447-56.
- Stratmann, J., Scheer, J., Ryan, C.A.** (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 U S A.* Aug 1;97(16): 8862-7.
- Swiatek, A., Azmi, A., Stals, H., Inze, D., Van Onckelen, H.** (2004) Jasmonic acid prevents the accumulation of cyclin B1;1 and CDK-B in synchronized tobacco BY-2 cells. *FEBS Lett.* Aug 13;572(1-3): 118-22.
- Swiatek, A., Azmi, A., Witters, E., Van Onckelen, H.** (2003) Stress messengers jasmonic acid and abscisic acid negatively regulate plant cell cycle. *Bulg. J. Plant Physiol., special issue:* 172-178.
- Swiatek, A., Lenjou, M., Van Bockstaele, D., Inzé D., Van Onckelen, H.** (2002) Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol.* 2002 Jan;128(1): 201-11.
- Thilmony, R., Underwood, W., He, S.Y.** (2006) Genome-wide transcriptional analysis of the Arabidopsis thaliana interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Plant J.* Apr;46(1): 34-53.
- Thordal-Christensen, H.** (2003) Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr Opin Plant Biol.* Aug;6(4): 351-7.
- Torii, K.U.** (2004) Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. *Int Rev Cytol.* 234: 1-46.
- Trotochaud, A.E., Hao, T., Wu, G., Yang, Z., Clark, S.E.** (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.* Mar;11(3): 393-406.
- Turner, J.G., Ellis, C., and Devoto, A.** (2002). The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 14 (suppl.): 153-164.
- Underwood, W., Melotto, M., He, S.Y.** (2007) Role of plant stomata in bacterial invasion. *Cell Microbiol.* Jul;9(7): 1621-9.
- vandenBerg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., Scheres, B.** (1997) Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature* 390: 287-289.
- Venturelli, D., Travali, S., and Calabretta, B.** (1990). Inhibition of T-cell proliferation by a MYB antisense oligomer is accompanied by selective down-regulation of DNA polymerase α expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5963-5967.
- Vielle-Calzada, J.P., Baskar, R., Grossniklaus, U.** (2000) Delayed activation of the paternal genome during seed development. *Nature* 404: 91-94.

- Vielle-Calzada, J.P., Thomas, J., Spillane, C., Coluccio, A., Hoepfner, M.A., Grossniklaus, U.** (1999) Maintenance of genomic imprinting at the Arabidopsis *medea* locus requires zygotic DDM1 activity. *Genes Dev.* Nov 15;13(22): 2971-82.
- Wang, J.-W., Wang, L.-J., Mao, Y.-B., Cai, W.-J., Xue, H.-W., Chena, X.-Y.** (2005) Control of Root Cap Formation by MicroRNA-Targeted Auxin Response Factors in Arabidopsis. *The Plant Cell*, August Vol. 17: 2204-2216.
- Wang H., Qi Q., Schorr P., Cutler A., Crosby W.L., Fowke L.C.** (1998) ICK1, a cyclin dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J.*,15: 501-510.
- Weigel, D. and Glazebrook, J.** (2002) *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., and Schmülling, T.** (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10487-10492.
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., VanOnckelen, H., Schmülling, T.** (2003) Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell*. Nov;15(11): 2532-50.
- Weston, K.** (1998). Myb proteins in life, death and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 76-81.
- Wilhelmi, L.K., Preuss, D.** (1999) The mating game: pollination and fertilization in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol.* Feb;2(1): 18-22.
- Williamson, L.C., Ribrioux, S.P.C.P., Fitter, A.H. and Leyser, H.M.O.** (2001) Phosphate availability regulates root system architecture in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 29: 875-890.
- Windsor, J.B., Vaughan-Symonds, V., Mendenhall, J., and Lloyd, A.M.** (2000) Arabidopsis seed coat development: Morphological differentiation of the outer integument. *Plant J.* 22: 483-493.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., Provart, N.J.** (2007) An „electronic fluorescent pictograph“ browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE*. Aug 8;2(1): e718.
- Wu, H.-M., Wang, H., Cheung, A.Y.** (1995) A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell* 82: 395-403.
- Yadegari, R., Drews, G.N.** (2004) Female gametophyte development. *Plant Cell*. 2004;16 (suppl): 133-41.
- Yadegari, R., Paiva, G., Laux, T., Koltunow, A.M., Apuya, N., Zimmerman, J.L., Fischer, R.L., Harada, J.J., Goldberg, R.B.** (1994) Cell differentiation and morphogenesis are uncoupled in Arabidopsis raspberry embryos. *Plant Cell* 6: 1713-1729.
- Yamaguchi, Y., Pearce, G., Ryan, C.A.** (2006) The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in Arabidopsis, is functional in transgenic tobacco cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 27;103(26): 10104-9.
- Yamakawa, S., Sakuta C., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y., Kamada, H., Satoh, S.** (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, G., Shen, S., Kobayashi, T., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y., Kamada, H.** (1999) Stimulatory effects of a novel peptidyl plant growth factor, phytosulfokine- α , on the adventitious bud formation from callus of *Antirrhinum majus*. *Plant Biotechnology* 16: 231-234.
- Yang, H., Matsubayashi, Y., Hanai, H., Sakagami, Y.** (2000) Phytosulphokine- α , a peptide growth factor found in higher plants: its structure, functions, precursor and receptors. *Plant Cell Physiol* Jul;41(7): 825-30.
- Yang, H., Matsubayashi, Y., Nakamura, K., Sakagami, Y.** (1999) *Oryza sativa* PSK encodes a precursor of phytosulfokine- α , a sulfated peptide growth factor found in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 13560-13565.
- Yang, W.C., Ye, D., Xu, J., Sundaresan, V.** (1999) The SPOROCTELESS gene of *Arabidopsis* is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. *Genes Dev*. 13: 2108-2117.
- Ye, ZH.** (2002) Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 53: 183-202.
- Zhang, H. and Forde, B.G.** (1998) An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 29: 407-409.
- Zhao, D.Z., Wang, G.F., Speal, B., Ma, H.** (2002) The excess microsporocytes1 gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther. *Genes Dev* 16: 2021-2031.
- Zhou, A., Wang, H., Walker, J.C., Li, J.** (2004) BRL1, a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, is functionally redundant with BRI1 in regulating *Arabidopsis* brassinosteroid signaling. *Plant J* 40: 399-409.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., Gruissem, W.** (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiol*. 136: 2621-2632.
- Zinkl, G.M., Zwiebel, B.I., Grier, D.G., Preuss, D.** (1999) Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. *Development*. Dec;126(23): 5431-40.

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit von April 2003 bis Oktober 2007 am Botanischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Abteilung Entwicklungsphysiologie von Pflanzen von Prof. Dr. Margret Sauter angefertigt.

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Doktormutter, Prof. Dr. Margret Sauter, bedanken, die mir ermöglichte, dieses interessante Thema in ihrem Labor zu bearbeiten. Sie stand mir während der gesamten Zeit mit Rat und Verständnis zur Seite und verhalf mir mit fairer und konstruktiver Kritik zur Lösung so mancher Probleme. Ihr Engagement sowie Überzeugungstalent haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich möchte mich bei meiner Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft bedanken. Mein Dank gilt insbesondere Dr. Bianka Steffens, Dr. Guillaume Rzewuski, Manuela Hinz, Renate Dahlke, Timo Staffel und Michael Motzkus.

Des Weiteren möchte ich mich für die Hilfe von PD. Dr. M. Mulisch und Prof. Dr. C. Desel (Jun.) bedanken, ohne die die Bilder nicht so gelungen wären.

Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Sandra Kehrbach für das schnelle Korrekturlesen und bei Tim Albrecht für das tolle Layout der Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für die moralische, seelische und finanzielle Unterstützung sowie das Verständnis, welches mir während der gesamten Zeit von ihr entgegen gebracht wurde. Meinem Verlobten Maic Verbücheln kann ich für seine Geduld, sein Verständnis und seine Fähigkeit, die Welt wieder ins richtige Licht rücken zu können, gar nicht genug danken.

Schließlich möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich in dieser Zeit dabei unterstützt haben, aber nicht extra genannt wurden.

Lebenslauf

Name: **Anke Kutschmar**

Geburtsdatum: 02.02.1977 in Berlin

Nationalität: deutsch

- 04.2003 Beginn der Dissertation an der Universität Kiel, Abteilung für Entwicklungsphysiologie der Pflanzen bei Prof. Dr. M. Sauter mit dem Titel „Der Peptidwachstumsfaktor Phytosulphokin- α steuert das Wurzelwachstum und reproduktive Prozesse in *Arabidopsis thaliana*“
- 12.2002 - 03.2003 Praktikum an der Universität Hamburg, Botanisches Institut, Abteilung Molekularbiologie von Pflanzen bei PD Dr. M. Sauter
- 05.2002 Erlangung des akademischen Grades einer Diplom-Ingenieurin für Biotechnologie (FH)
- 10.2001 - 04.2002 Diplomarbeit an der Universität Zürich, Institut für Pflanzenbiologie, Abteilung für Entwicklungsgenetik von Pflanzen von Prof. Dr. U. Grossniklaus mit dem Titel „Charakterisierung eines putativen Zielgens des *Polycomb* Gruppen Proteins MEDEA“
- 10.2000 - 02.2001 Praktikum an der Universität von Bordeaux „Victor Segalen“, im Labor für molekulare Histologie und Pathologie von Prof. Dr. J.P. Merlio
- 02.2000 Vordiplom
- 04.1998 Studienbeginn im Fach Biotechnologie an der Technischen Fachhochschule Berlin (TFH)
- 09.1997 - 02.1998 Praktikum am Universitätsklinikum der Humboldt Universität Berlin „Charité“, Dermatologische Klinik bei Dr. S. Gellrich und Dr. S. Jahn
- 08.1996 - 07.1997 Auslandsaufenthalt in Bordeaux, Frankreich
- 09.1991 - 07.1996 Besuch des Louis-Pasteur-Gymnasiums in Berlin Prenzlauer Berg mit dem Abitur als Abschluss
- 09.1983 - 08.1991 Besuch der Polytechnischen Oberschule in Berlin