

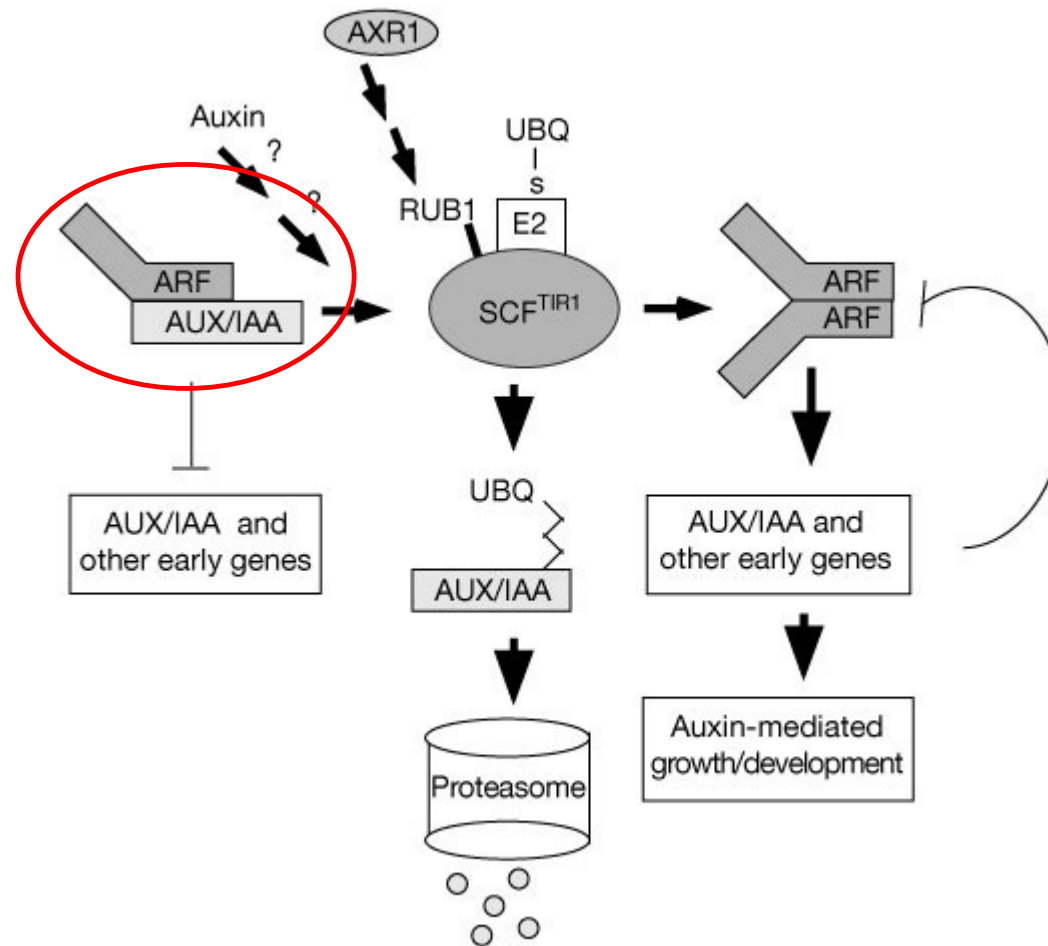
**The *Arabidopsis* *BODENLOS*  
gene encodes an auxin  
response protein inhibiting  
MONOPTEROS-mediated  
embryo patterning**

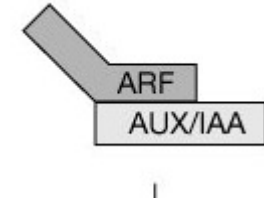
Thorsten Hamann, Eva Benkova, Isabel Bäurle,<sup>1</sup>  
Marika Kientz, and Gerd Jürgens<sup>2</sup>

ZMBP, Entwicklungsgenetik, Universität Tübingen,  
D-72076 Tübingen, Federal Republic of Germany

Received March 5, 2002; revised version accepted May 2,  
2002.

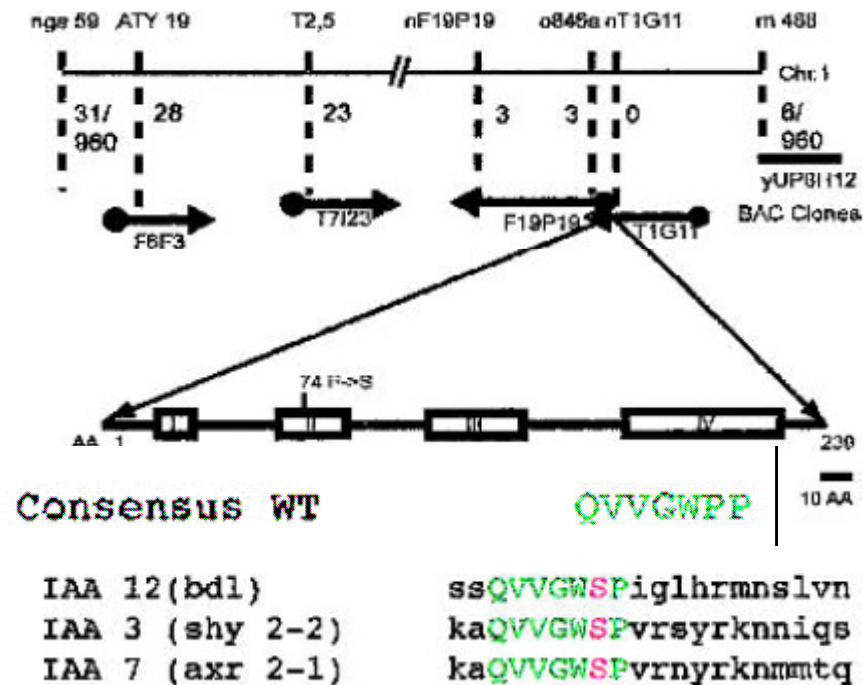
# Bisher bekannt.....





- MP codiert ARF5 (Auxin response factor; TF)
- *Arabidopsis thaliana* (*A.t.*)-Genom enthält 23 ARFs
- ARFs interagieren mit IAA- (indol-3-acetic acid) Proteinen (Domäne 3 und 4 der ARFs → C-terminaler Bereich)
- *A.t.*-Genom enthält ca. 28 IAAs
- SCFTIR1-Komplex ist am Abbau der IAA-Proteine beteiligt
- noch keine ARF/IAA Komplexe nachgewiesen

# Bodenlos/IAA12



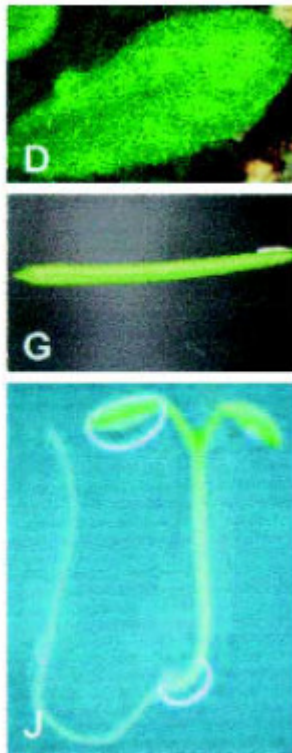
G→A Transition

- IAA7 (axr2-1) kann nicht mit SCFTIR1-Komplex interagieren→ kein Proteinabbau

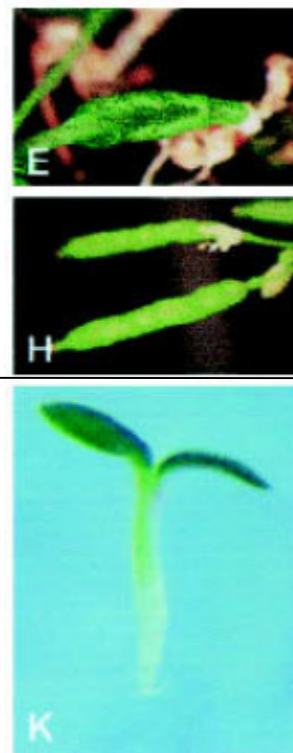
→ Mutation in Domäne II macht die Proteine deutlich stabiler

# Phänotypische Analysen

WT (BDL/BDL)

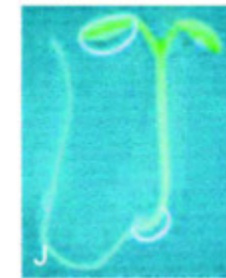
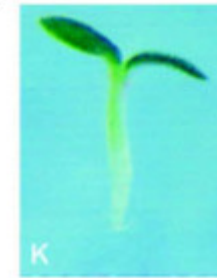


BDL/bdl



bdl/bdl

# Gain- oder loss-of-function



**Table 1.** Analysis of progeny from transgenic plants bearing *bdl* alleles

| Parental genotypes <sup>a</sup>                                                                  | No. analyzed | Seedling progeny phenotypes <sup>b</sup> |                             |                     |                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|------------------------------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------|
|                                                                                                  |              | <i>bdl</i> (R) <sup>c</sup>              | <i>bdl</i> (s) <sup>d</sup> | WT (R) <sup>c</sup> | WT (s) <sup>d</sup> |
| <i>bdl</i> / <i>BDL</i> ; T( <i>BDL</i> )/- (selfing)                                            | 630          | 18%                                      | 5%                          | 57%                 | 20%                 |
| <i>BDL</i> / <i>BDL</i> ; T( <i>bdl</i> )/- (selfing)                                            | 3,672        | 22%                                      | 0                           | 53%                 | 25%                 |
| <i>bdl</i> / <i>BDL</i> ; -/- × <i>BDL</i> / <i>BDL</i> ; T( <i>bdl</i> )/- (reciprocal crosses) | 295          | 29%                                      | 0                           | 26%                 | 45%                 |
| <i>bdl</i> / <i>BDL</i> <sup>e</sup> (selfing)                                                   | 1,203        | 0                                        | 18%                         | 0                   | 82%                 |

<sup>a</sup>Endogenous alleles at *BDL* locus and transgenic alleles (T): (*bdl*) mutant; (*BDL*) wild type.

<sup>b</sup>See Figure 1. Phenotypes: (*bdl*) mutant; (WT) wild type.

<sup>c</sup>(R) Resistant to Basta due to transgene.

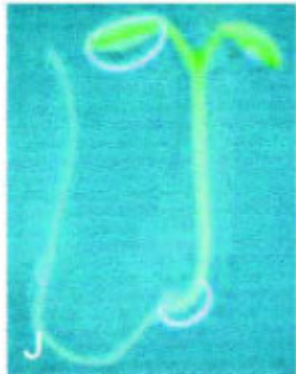
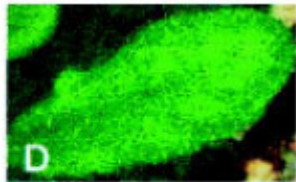
<sup>d</sup>(s) Sensitive to Basta due to lack of transgene.

<sup>e</sup>Data from Hamann et al. (1999).

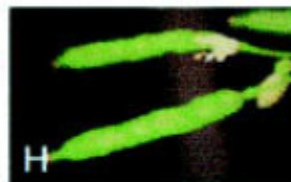
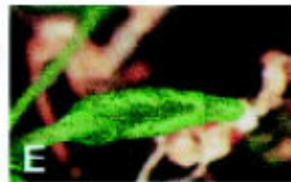
➔ die Anzahl an *bdl*-mutanten Allele ist entscheidend, sowohl in der Gegenwart als auch ohne WT-Allele

# *Gain- oder loss-of-function*

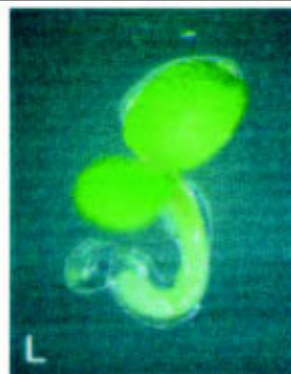
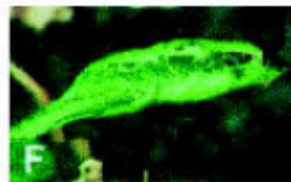
WT (BDL/BDL)



BDL/bdl



BDL/BDL



BDL/BDL mit 1 Kopie  
des *bdl*-Transgens

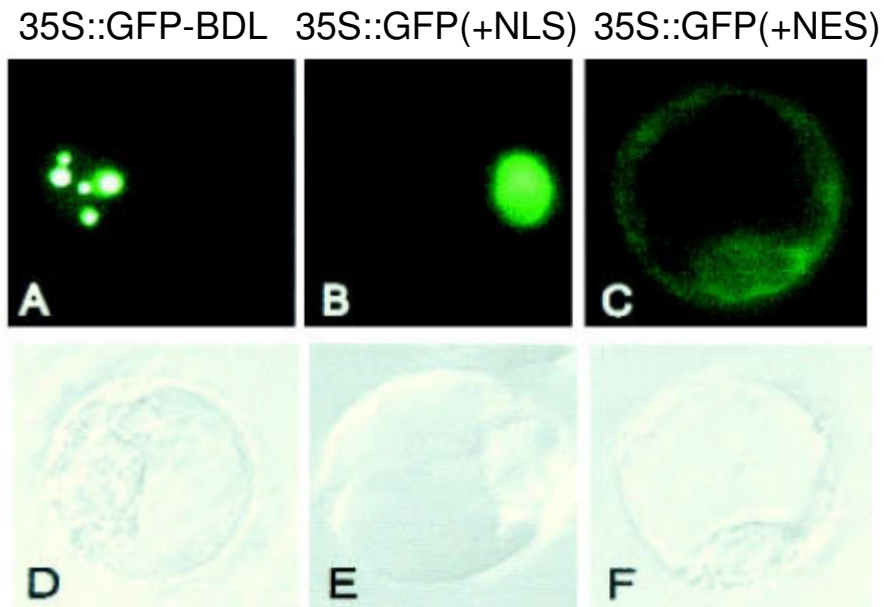
BDL/BDL mit 2 Kopien  
des *bdl*-Transgens

bdl/bdl

➔ Bodenlos Phänotyp durch eine *gain-of-function* Mutation im BDL/IAA12-Gen

Wo ist das Bodenlos-Protein lokalisiert  
???

# Subzelluläre Lokalisation des BDL-Proteins

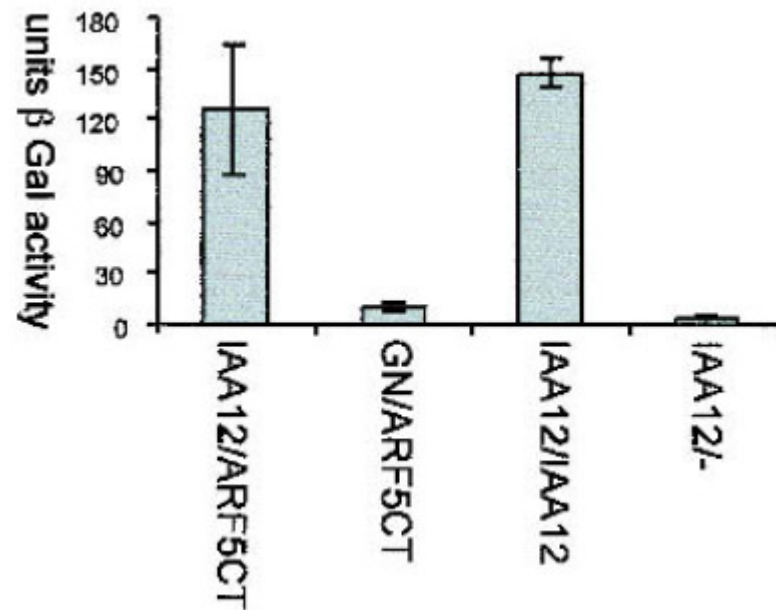


➔ GFP-BDL Protein tritt gehäuft im Nukleus auf

Mit wem interagiert das Bodenlos-  
Protein

???

# Interaktion des Bodenlos-Proteins



→ BDL kann mit sich selbst interagieren → Dimere

→ BDL kann direkt mit MP interagieren

- IAAs bilden mit den Domänen III und IV Homomere bzw. Heteromere

*In vivo* Interaktion nur möglich, wenn die  
Interaktionspartner co-exprimiert werden



Werden die Interaktionspartner BDL und MP  
*in vivo* co-exprimiert  
???

# Räumliche und zeitliche Akkumulationsmuster von BDL und MP mRNA



*bdl*-Mutante imitiert den Phänotyp des frühen Embryostadiums von MP



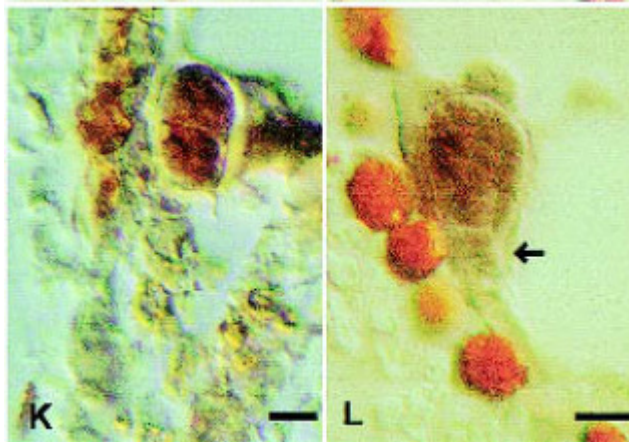
Behindert *bdl*-Mutante die MP-Transkription

???

# Räumliche und zeitliche Akkumulationsmuster von MP mRNA

*bdl*-Mutanten

MP



4-Zell-S.

Frühes Globular S.

→ *bdl*-Mutation verhindert nicht die Expression des MP-Gens

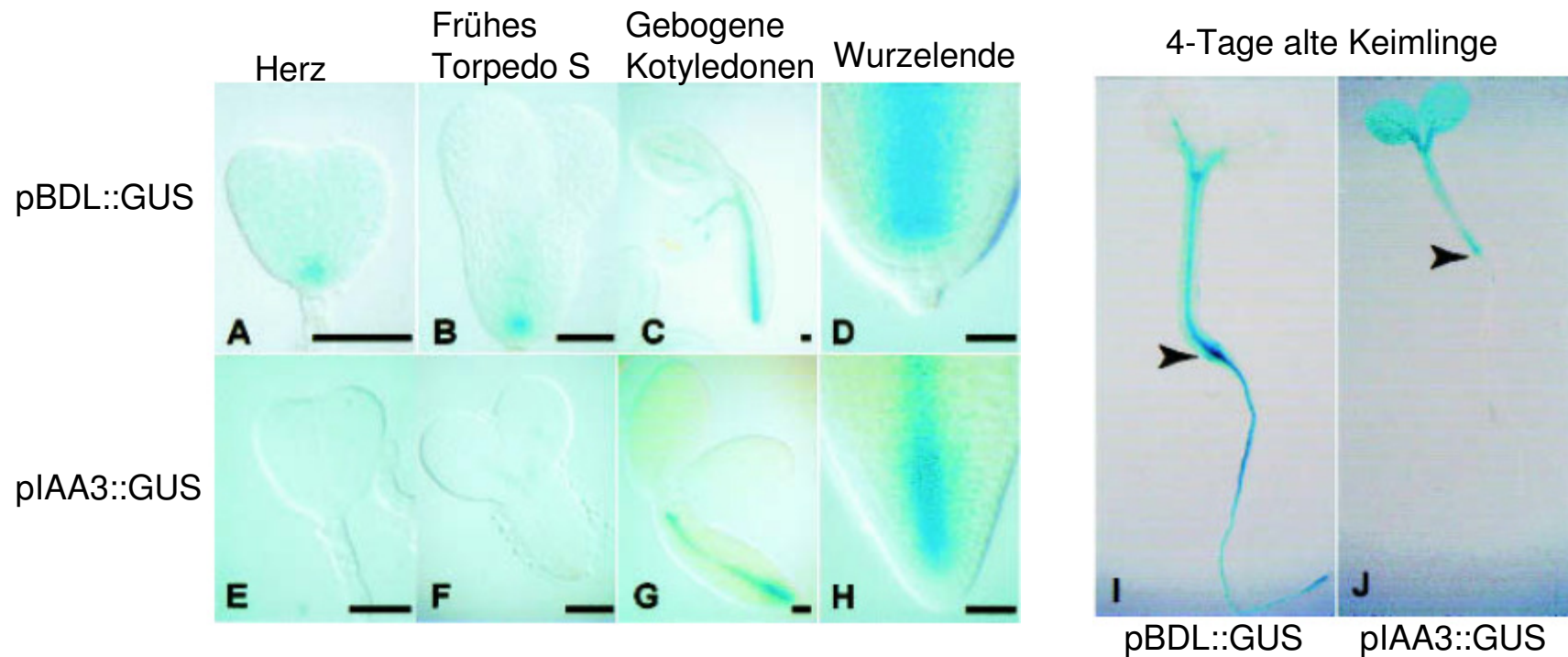
- *bdl*-Mutation → embryonaler Phänotyp
- identische Mutation in IAA3/SHY2 führt zu postembryonalen Phänotyp



Limitiert die transkriptionelle Regulation der IAA-  
Gene die *in vivo* Interaktion mit ARF-Proteinen

???

# Expressionsmuster von BDL und IAA3 Promotorsequenzen



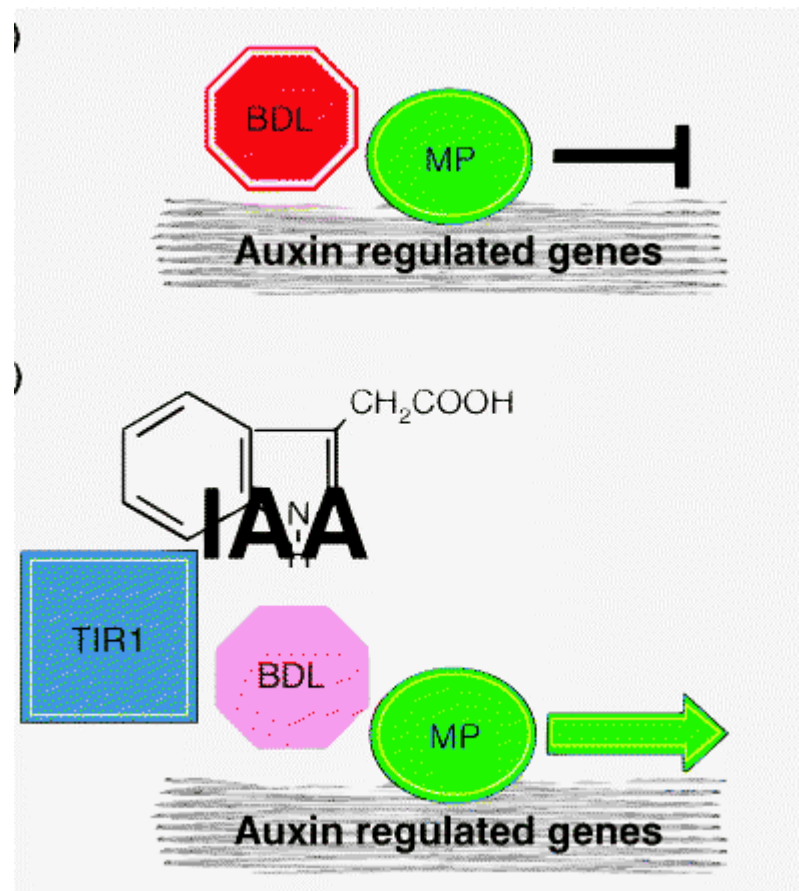
- pIAA3::GUS Expression erst ab mittleren Torpedo Stadium der Embryogenese

➔ Transkriptionelle Regulation führt zur Limitierung möglicher Interaktionen zwischen IAA und ARF-Proteinen

# Zusammenfassung

- BDL und MP sind interagierende IAA und ARF-Proteine, die für die Wurzelmeristeminitiation in der frühen Embryogenese nötig sind
- fungieren genetisch im gleichen *pathway*
- können physikalisch interagieren
- in den gleichen Zellen exprimiert

# Model der Interaktion von BDL und MP



# Vielen Dank für eure Aufmerksamkeit!!!



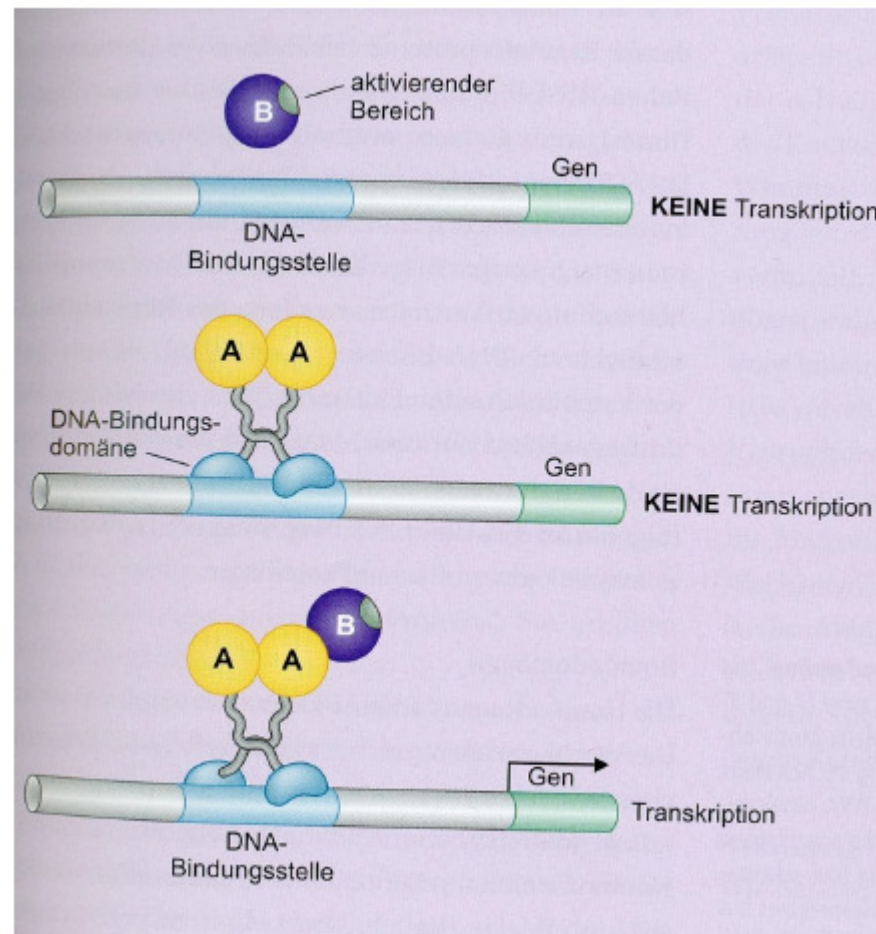
MONOPTEROS

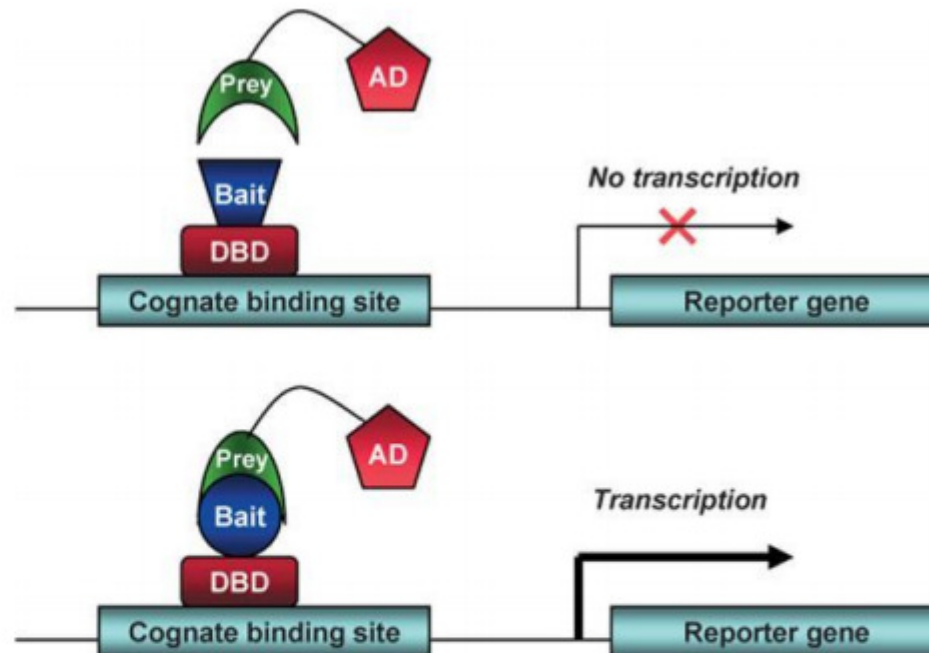


BODENLOS



# Nachweis von Protein-Protein-Interaktion über das Hefe-2-Hybridsystem





- In-vivo Methode zum Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen
- Das Bait-Fusionsprotein bindet an die GAL4-Bindestelle vor einem Reportergen im Genom einer Hefezelle. Ein Prey bindet an das Bait-Fusionsprotein. Daraus resultiert eine Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors und die Expression des Reportergens.

# *In situ*-Hybridisierung

