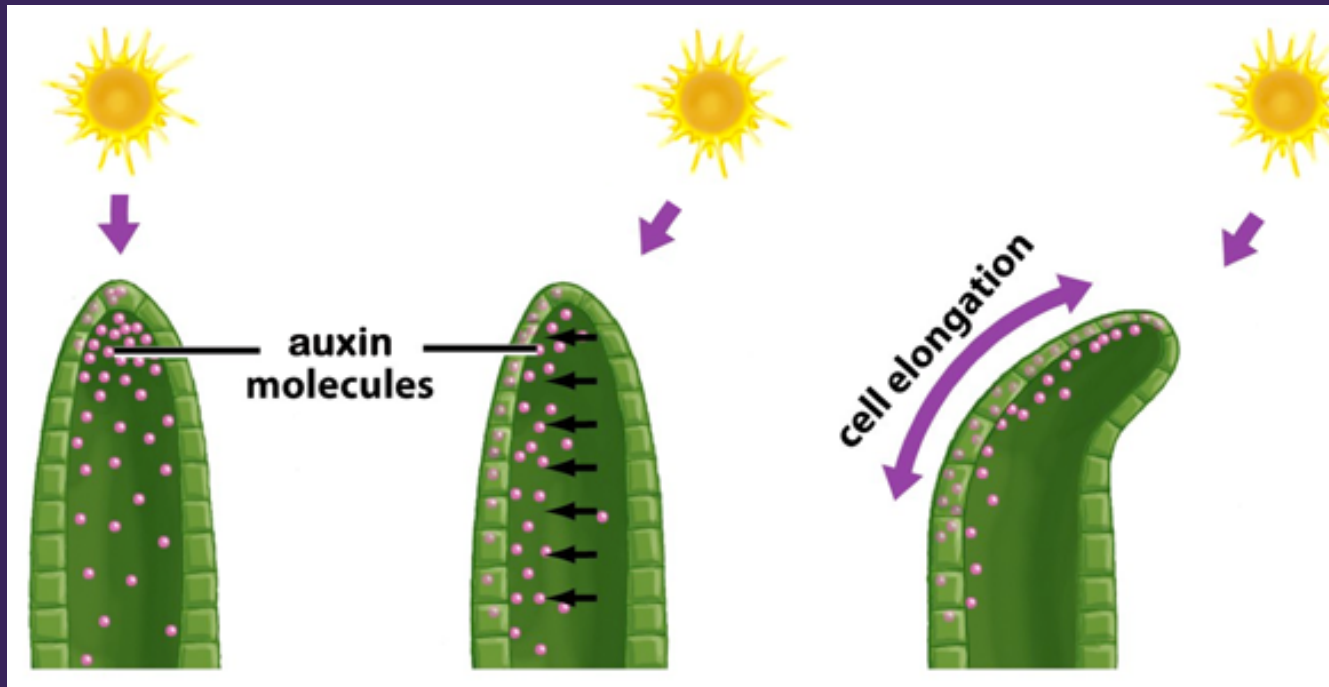


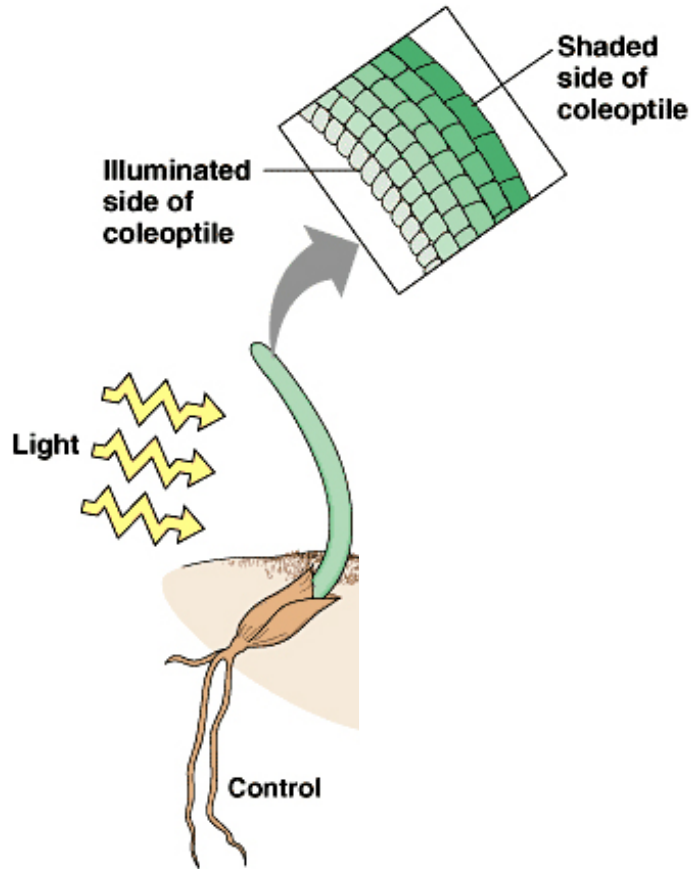
Molekulare Mechanismen der Signaltransduktion



05 - Auxin, EMS Mutagenese,
Isolierung und Charakterisierung der *axr1* Mutante
Folien:

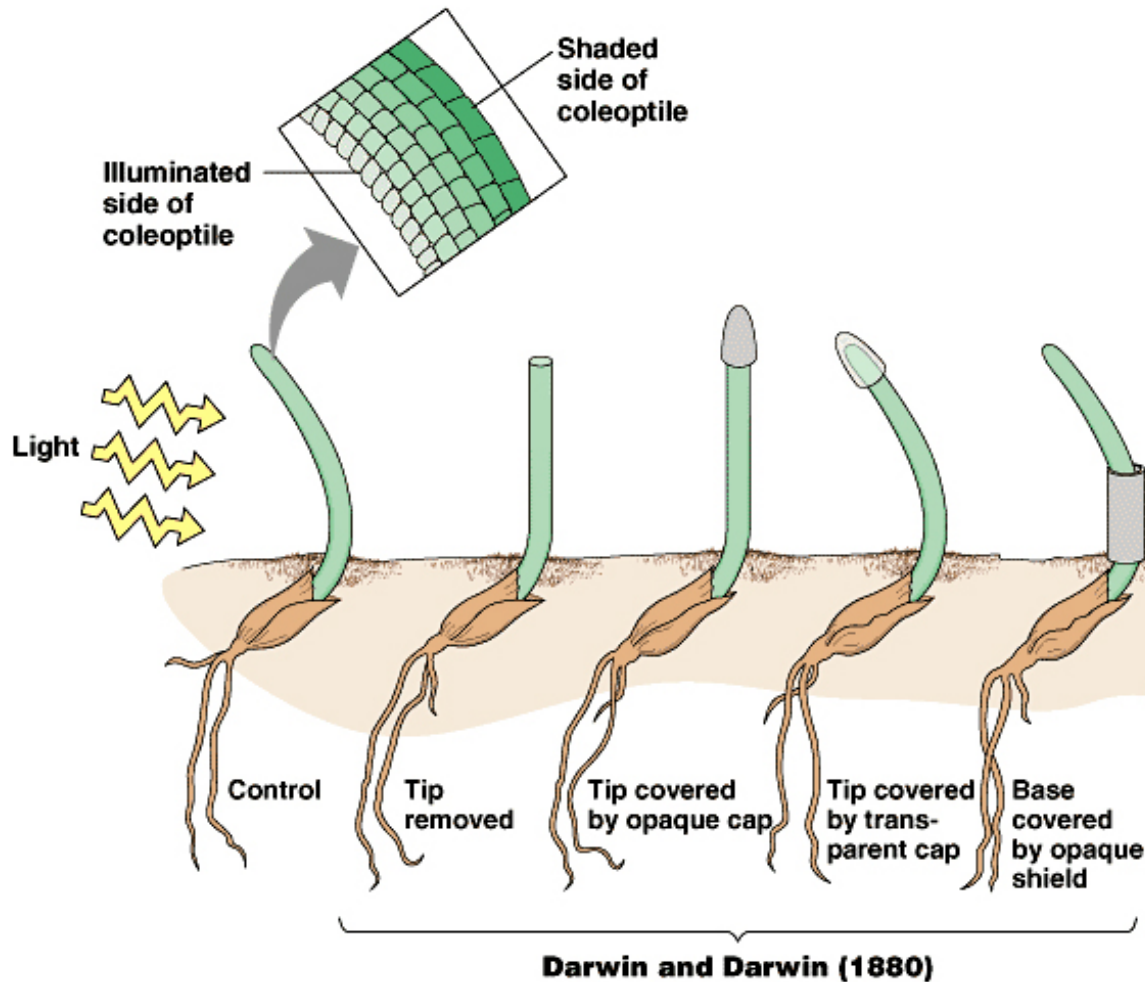
<http://tinyurl.com/Modul-MMS>

Wachstumsregulation - Phototropismus



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

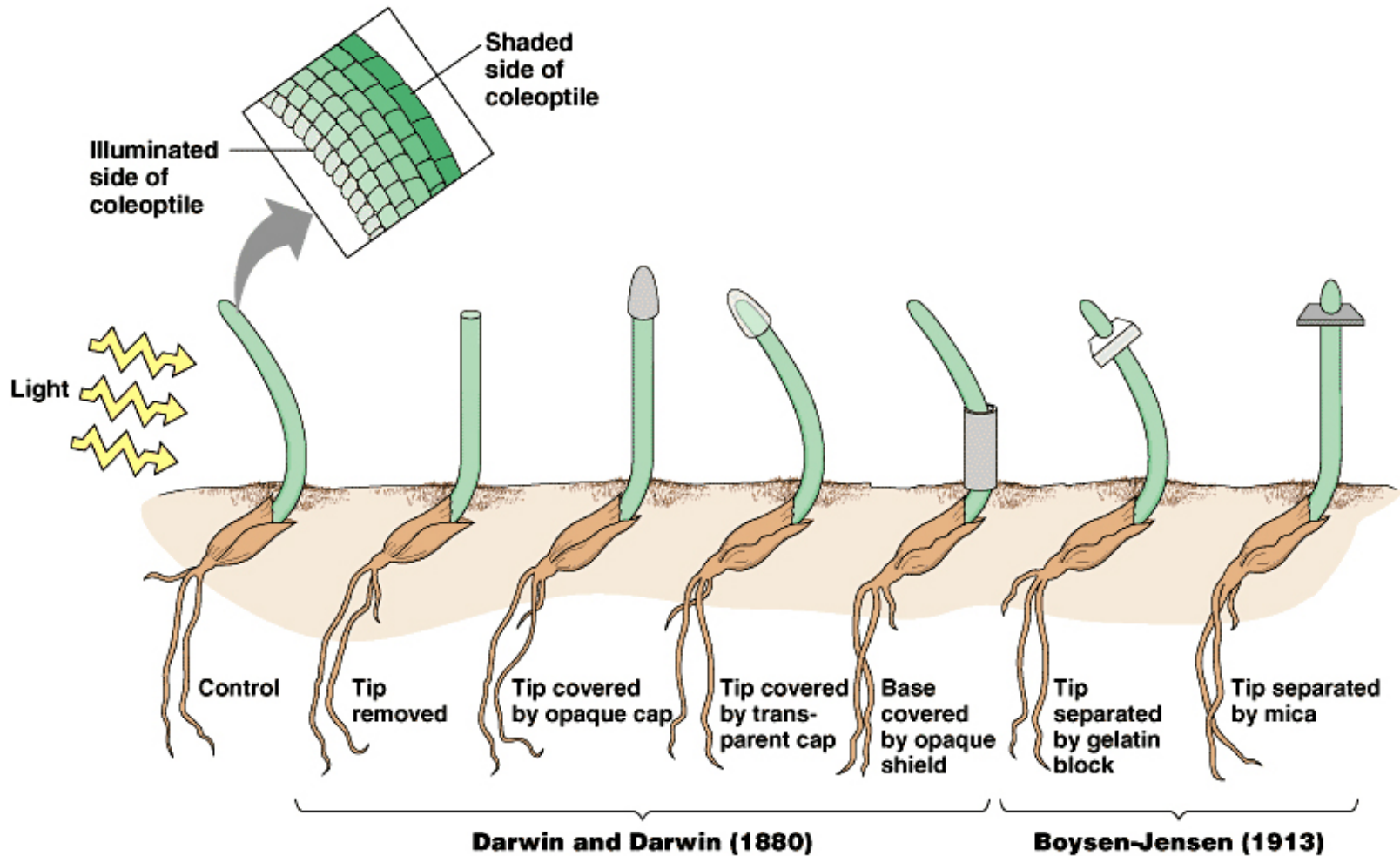
Wachstumsregulation - Phototropismus



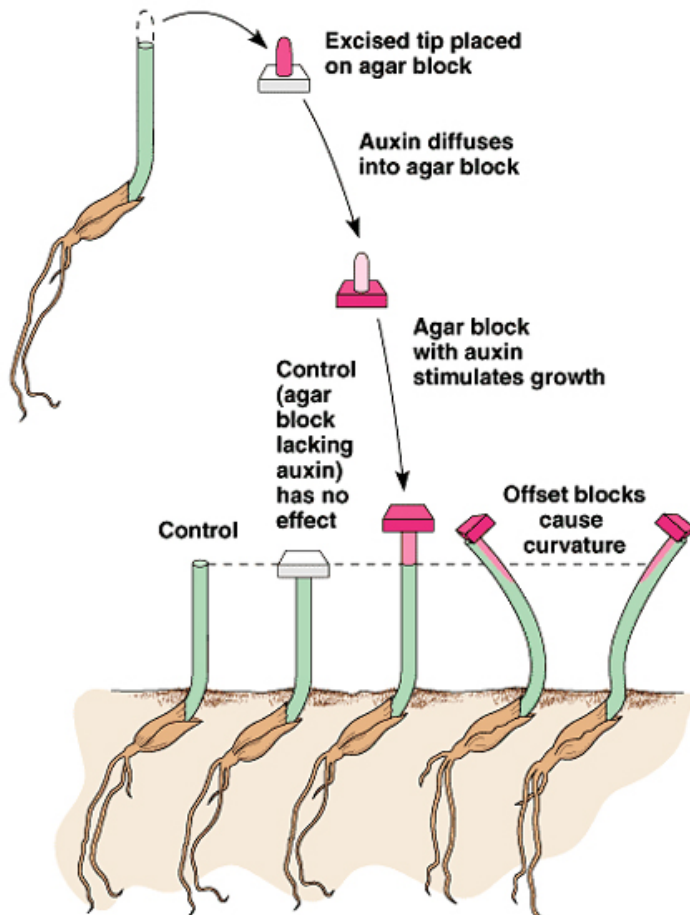
"When seedlings are freely exposed to a lateral light some influence is transmitted from the upper part of the coleoptile that acts on the lower part of the coleoptile"

"The Power of Movement in Plants" (1880) by Darwin and Darwin.

Wachstumsregulation - Phototropismus



Wachstumsregulator - Auxin

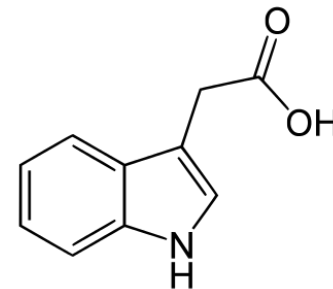


Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Went (1920s-30s) Total darkness

Fritz Went

- Nachweis der Mobilität
- Substanz kann in Agarblock übertragen werden
- Isolierung der Substanz:
→ Auxin
(griech. auxanein = wachsen lassen)



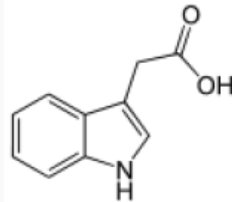
IAA

indole-3-acetic acid
(+ 20 Jahre)

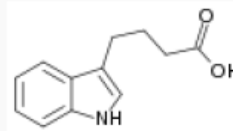
Das 1. identifizierte Phytohormon!

Auxine

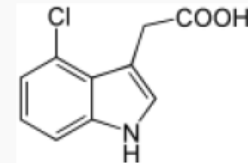
Native auxins:



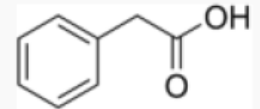
indole-3-acetic acid (IAA)



Indole-3-butyric acid (IBA)

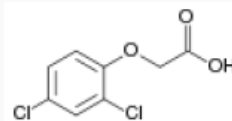


4-chloroindole-3-acetic acid (4-Cl-IAA)

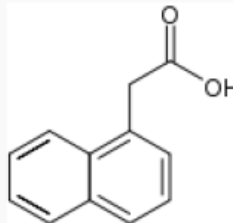


2-phenylacetic acid (PAA)

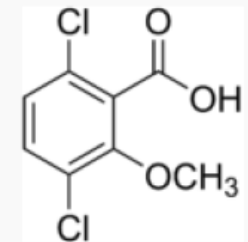
Gallery of synthetic auxins



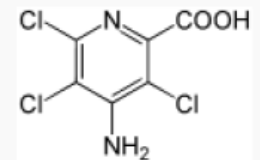
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)



α-Naphthalene acetic acid (α-NAA)



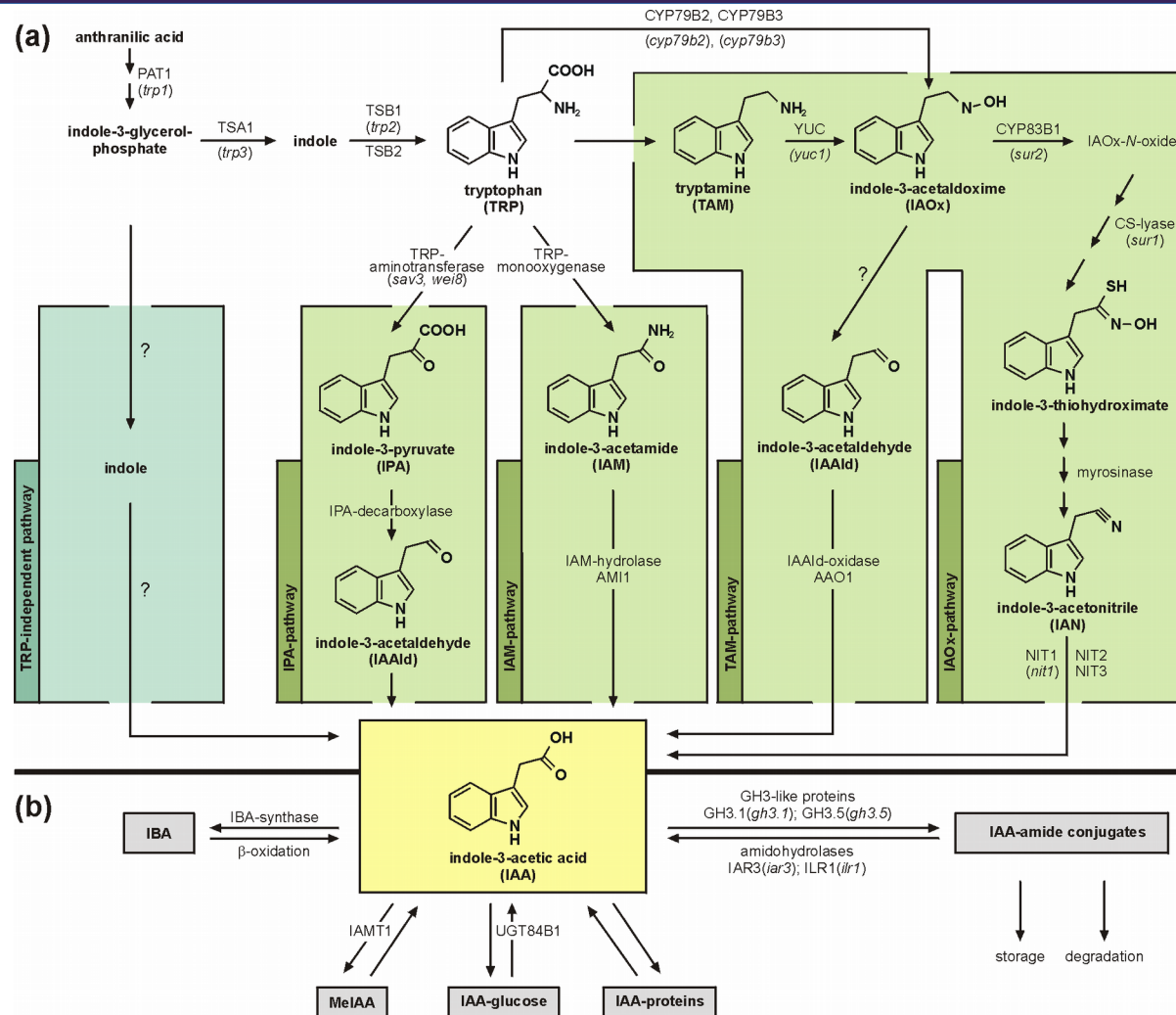
2-Methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid (dicamba)



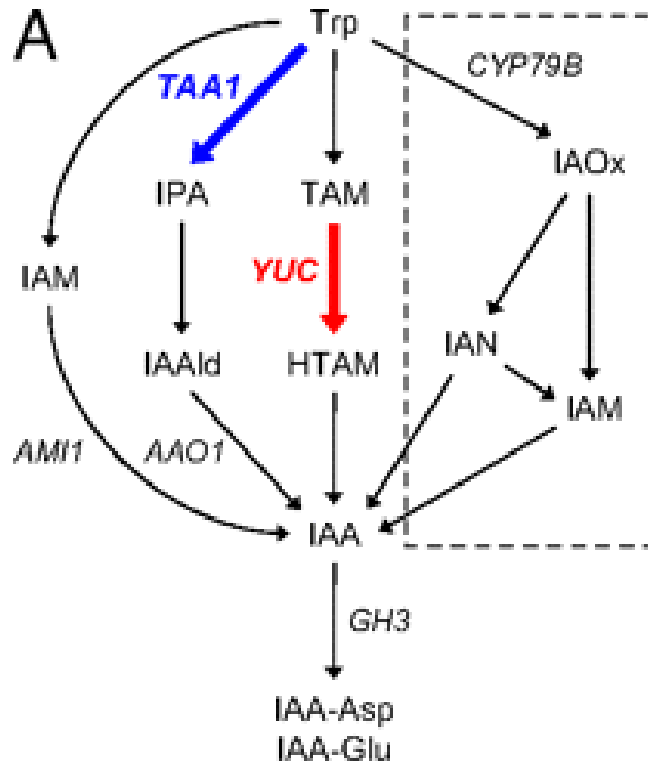
4-Amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (tordon or picloram)

Auxins have an aromatic ring and a carboxylic acid group

Auxinbiosynthese

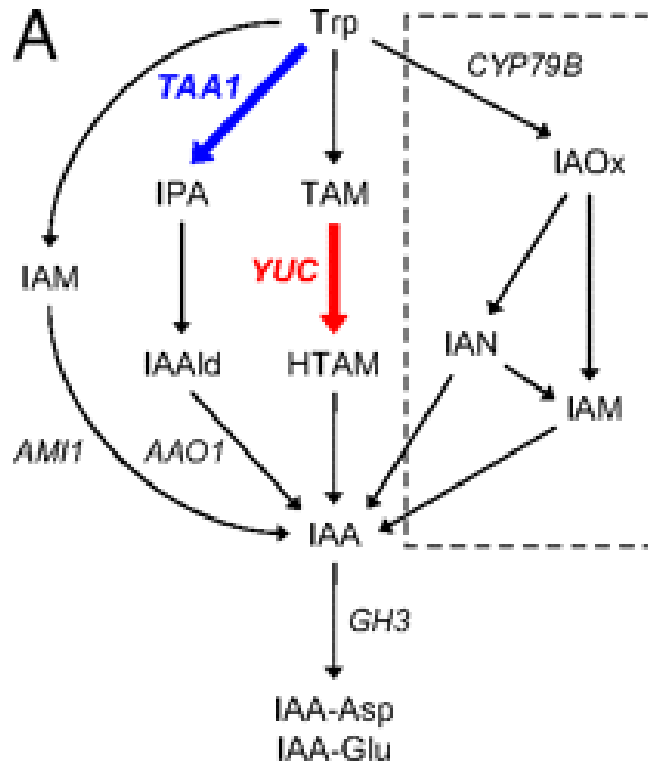


Auxinbiosynthese

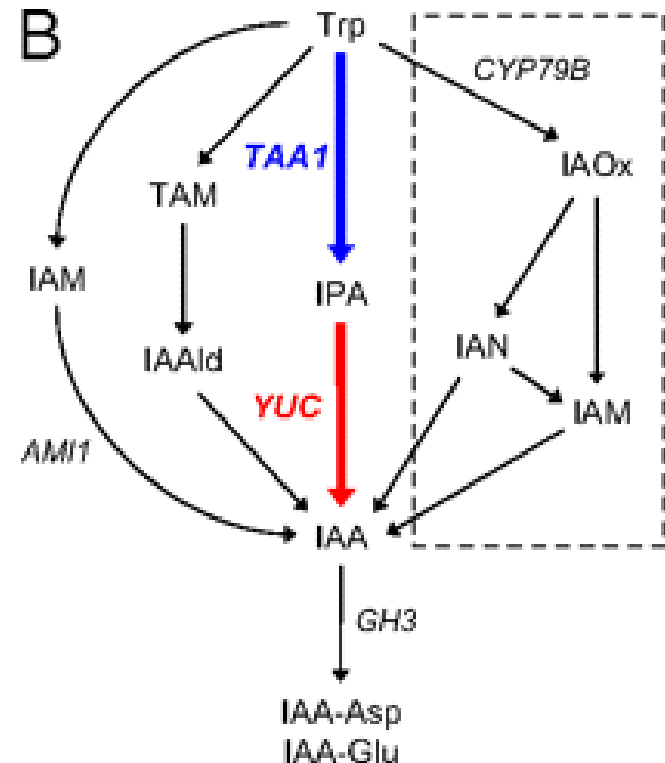


altes Biosyntheseschema

Auxinbiosynthese



altes Biosyntheseschema



neues Biosyntheseschema

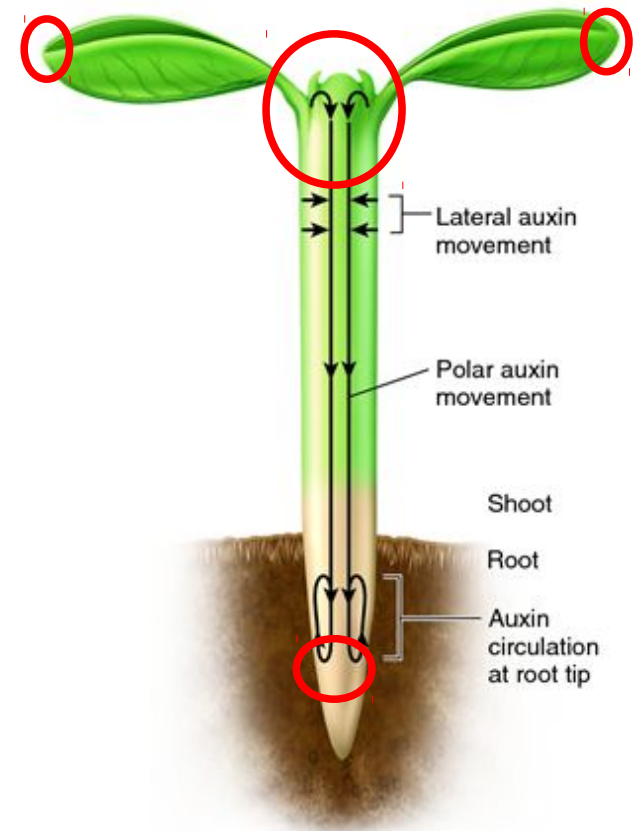
bis heute: keine Mutanten isoliert die kein Auxin mehr produzieren können!

Auxintransport

Auxin wird primär an einigen wenigen Stellen innerhalb der Pflanze gebildet

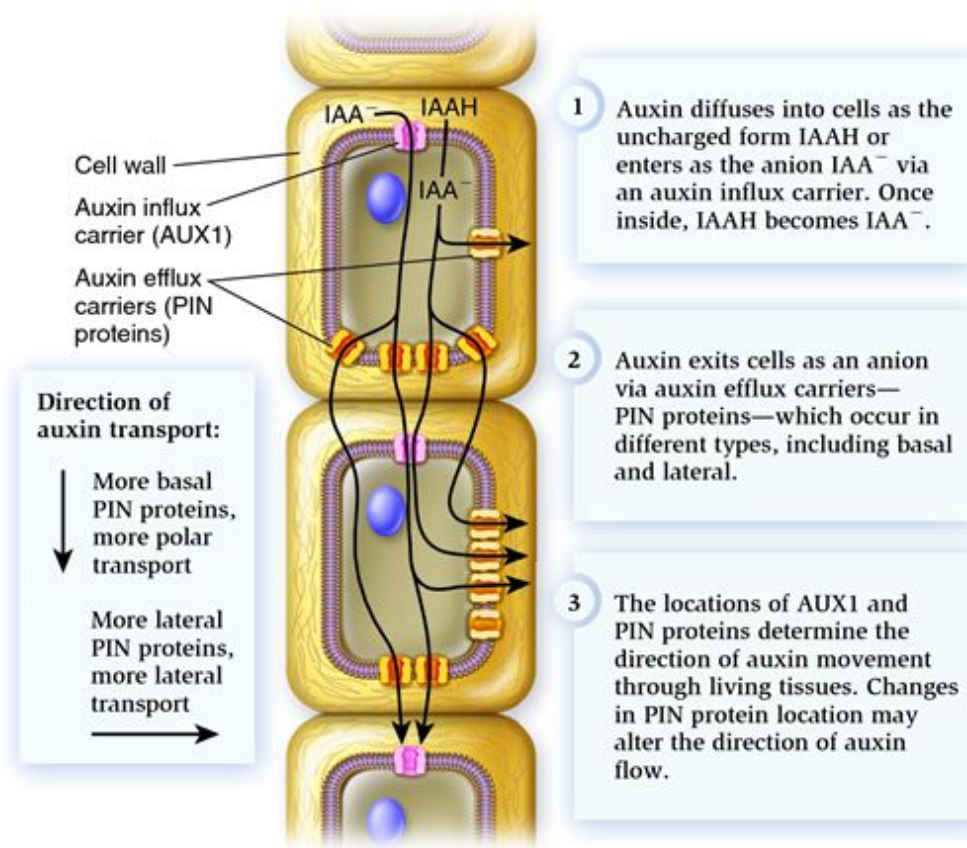
→ Meristeme + Blattspitzen

von dort aus wird Auxin in andere Teile der Pflanze transportiert

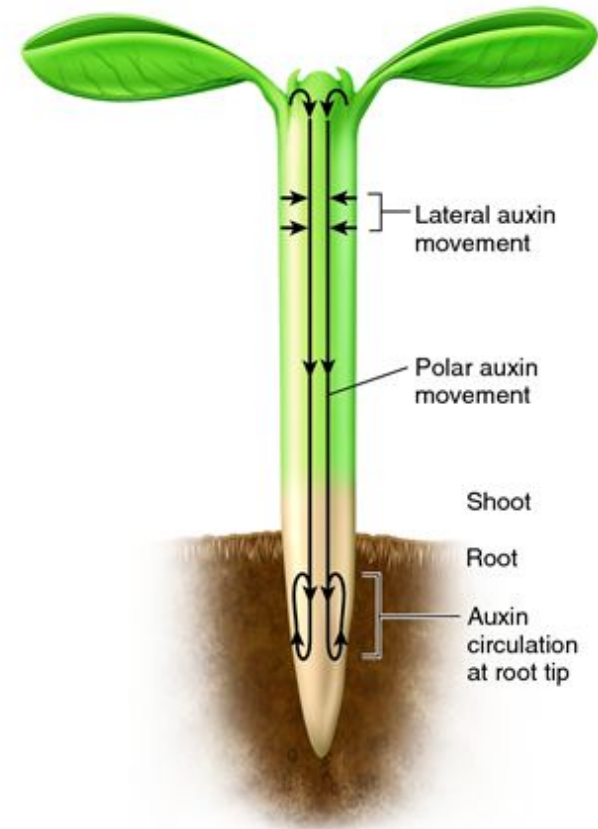


(b) Auxin transport throughout a plant

Auxintransport

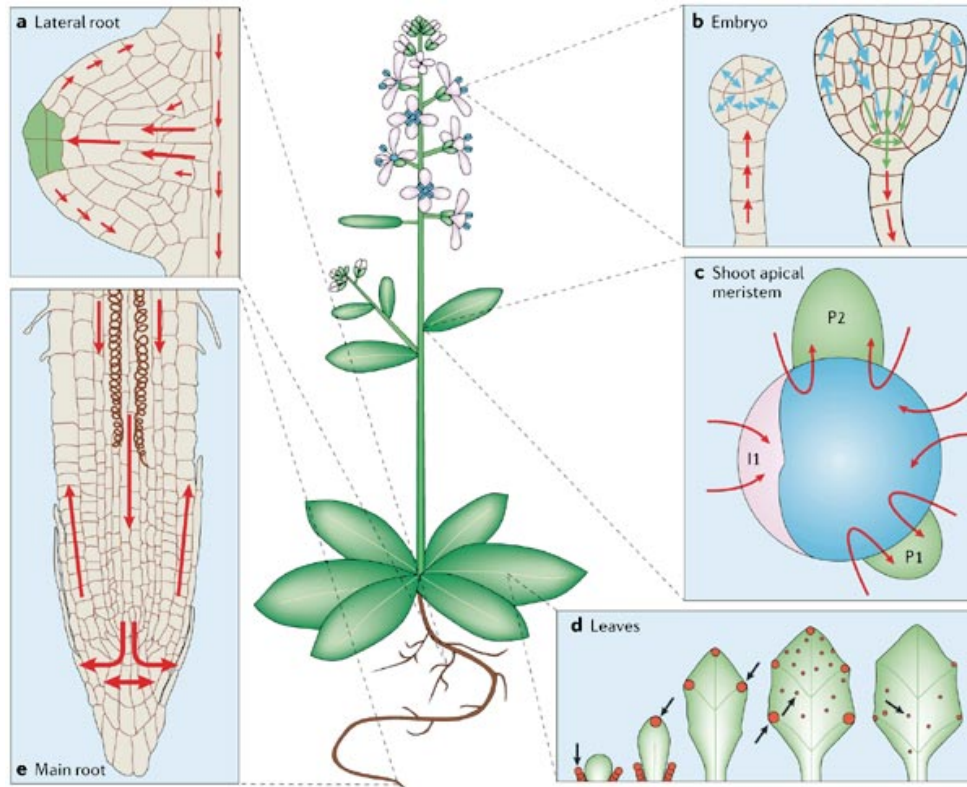


(a) Cellular mechanism of auxin transport



(b) Auxin transport throughout a plant

Auxintransport → Auxingradienten

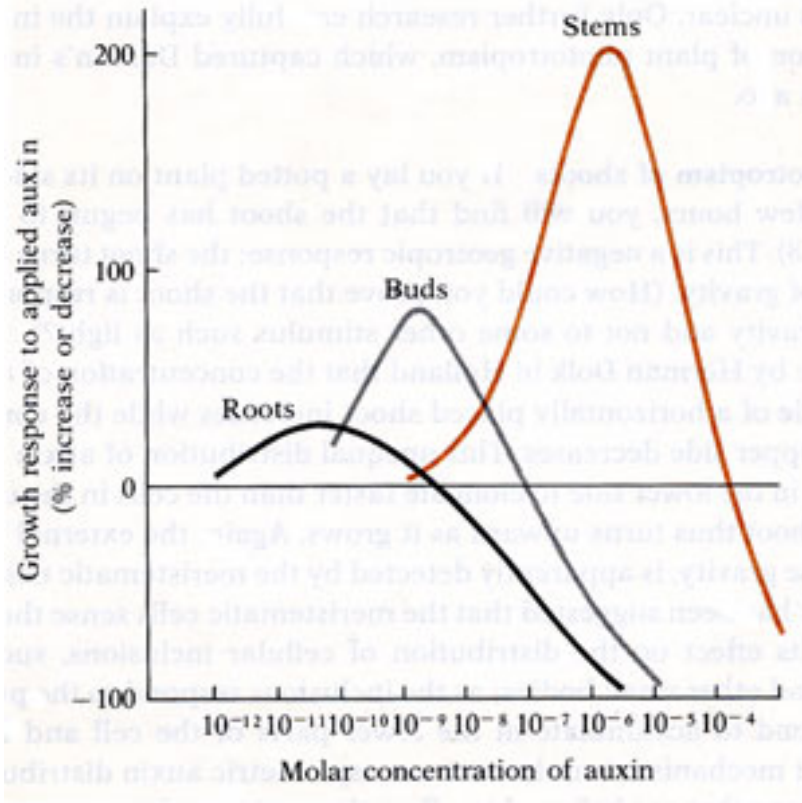


Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

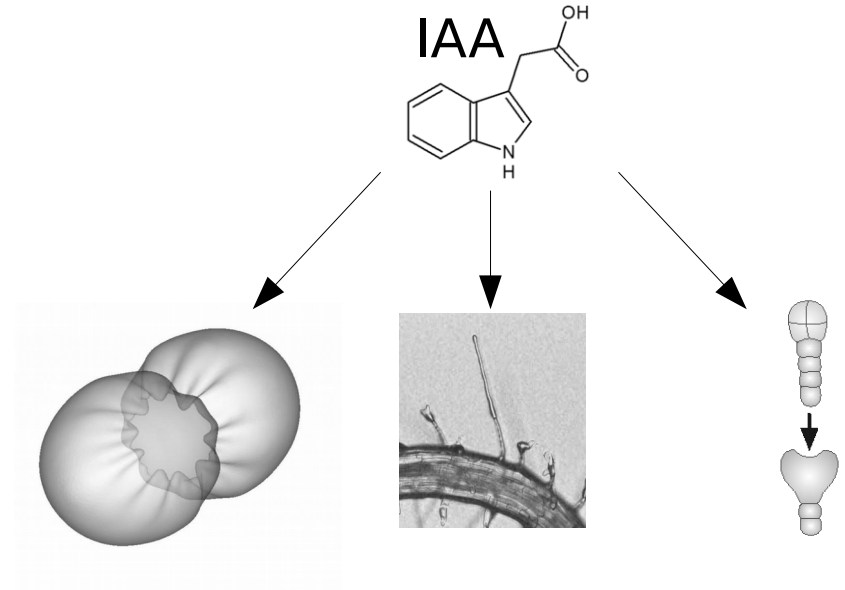
Transport is essentiell für
alle Auxin-regulierten
Prozesse

- Polarität des Embryos
- Apikaldominanz
- Wurzelentwicklung
- Vaskularisierung
-

Auxintransport



Die Sensitivität gegenüber Auxin ist abhängig vom Gewebe (und Spezies)



Die Reaktion ist abhängig von der Konzentration und Sensitivität des jeweiligen Gewebes

Auxin - Zusammenfassung

- das erste identifizierte Phytohormon → Wachstumsfaktor
- reguliert zahlreiche Prozesse in Wachstum und Entwicklung
- Biosynthese weitgehend aufgeklärt (1930 - 2011)
- Verschiedenste natürliche + synthetische Auxine verfügbar
- Transport essentiell für Diversität in biologischer Funktion

—————▶ Signaltransduktion ?

die ersten paper

1. Estelle and Somerville, (**1987**) Auxin resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. **MGG** 206:200
2. Lincoln et al., (**1990**) Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. **PC** 2:1071
3. Leyser et al., (**1993**) *Arabidopsis* auxin-resistance gene *AXR1* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. **N** 364:161

—► nächster Termin

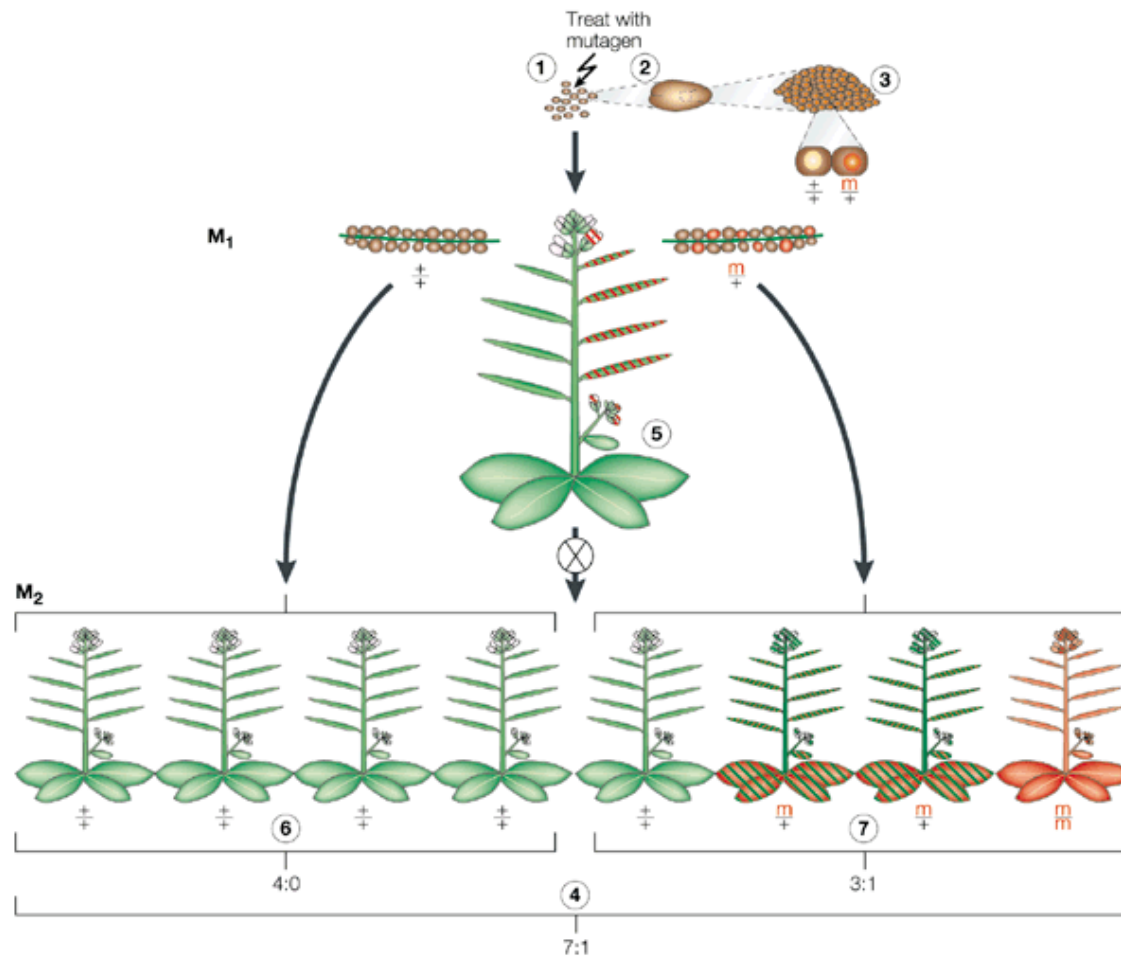
Arabidopsis thaliana



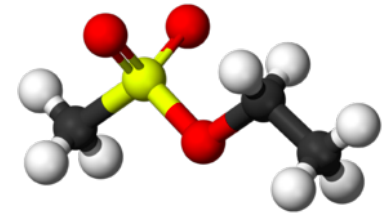
- Small size (30 cm)
- Rapid life cycle (6 weeks)
- Prolific seed production (5000 seeds/plant)
- Sequenced genome (125 Mb; ~26,000 genes)
- Easily transformable
- Tremendous community resources

A powerful multicellular eukaryotic model system

EMS Mutagenese

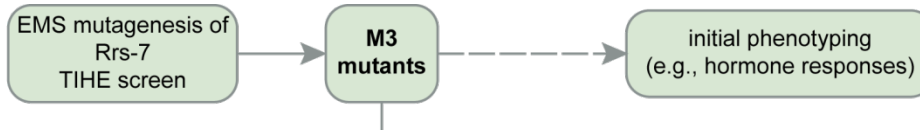


**EMS =
Ethylmethansulfonat**

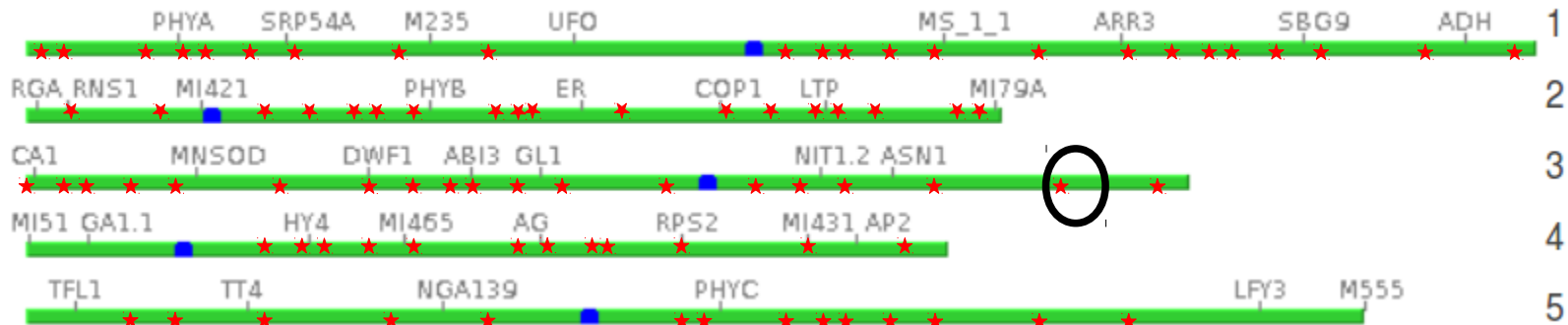


Basenpaarsubstitution
G/C nach A/T

Mutante → Gen

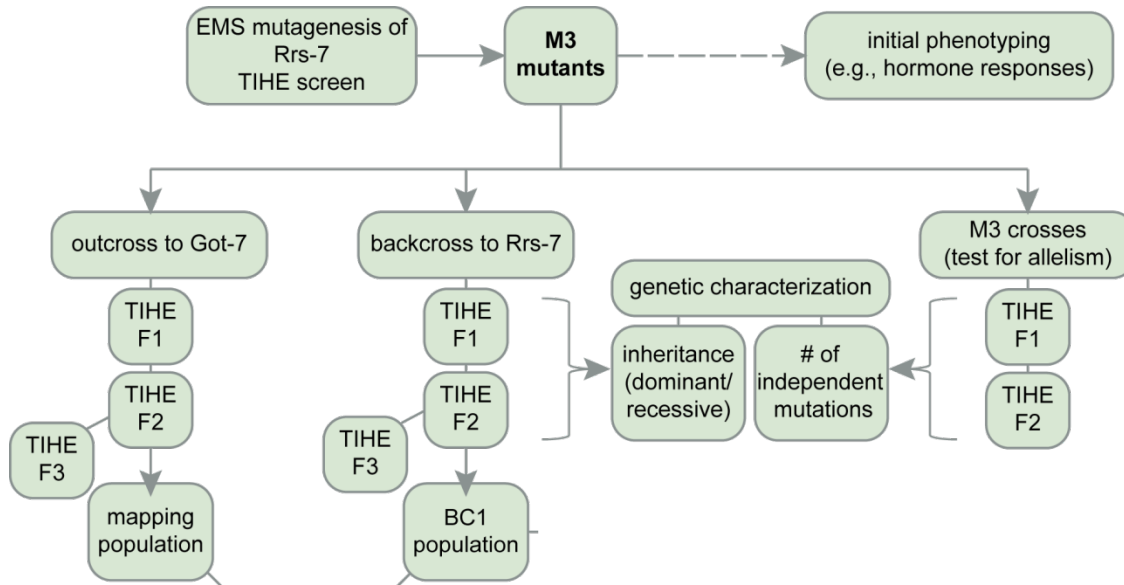


mutant isolation



EMS löst viele hundert Mutationen im Genom aus
→ I.d.R.: nur eine Mutation kausal an Phänotyp beteiligt

Mutante → Gen

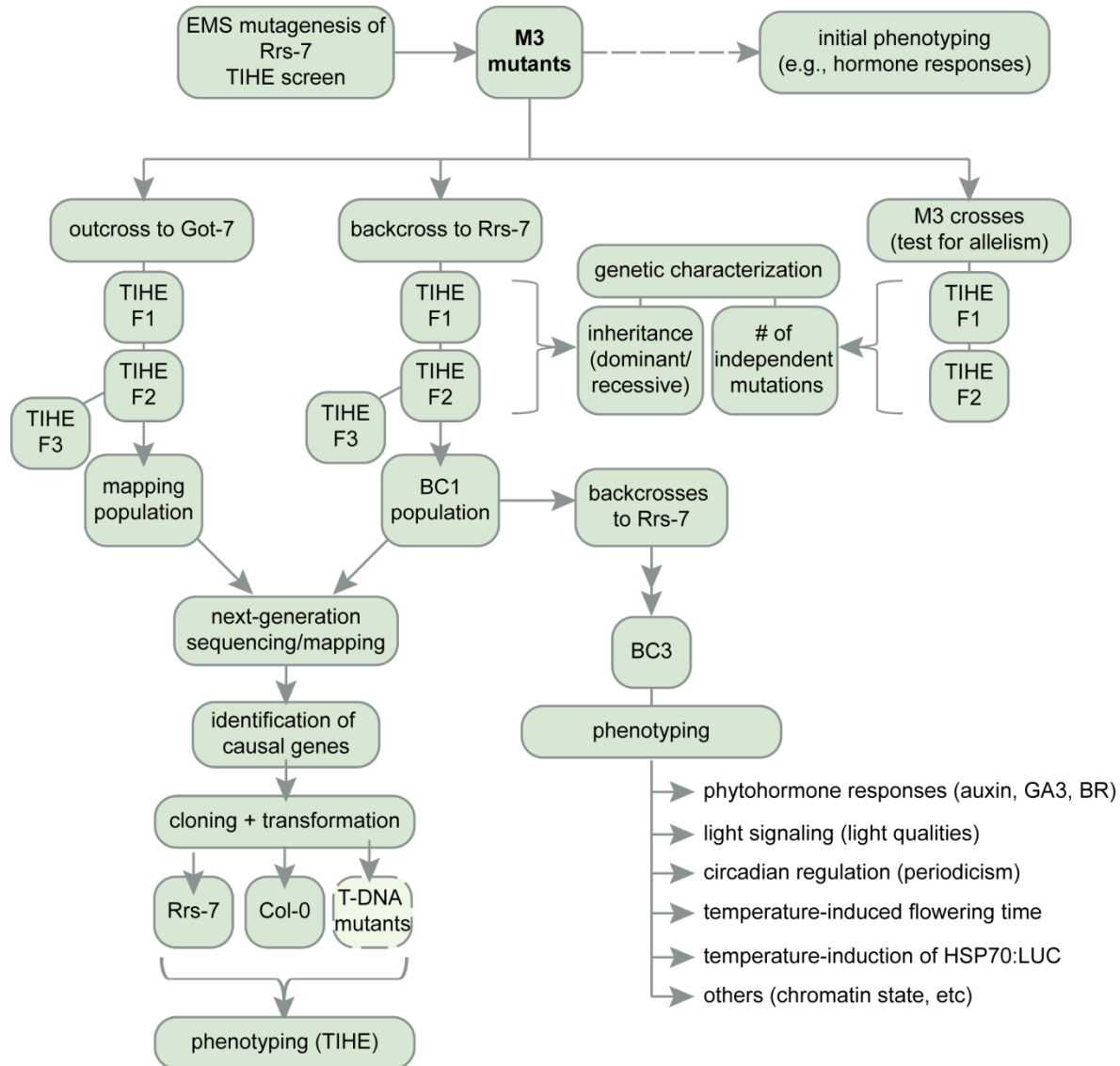


mutant isolation



genetic characterization

Mutante → Gen



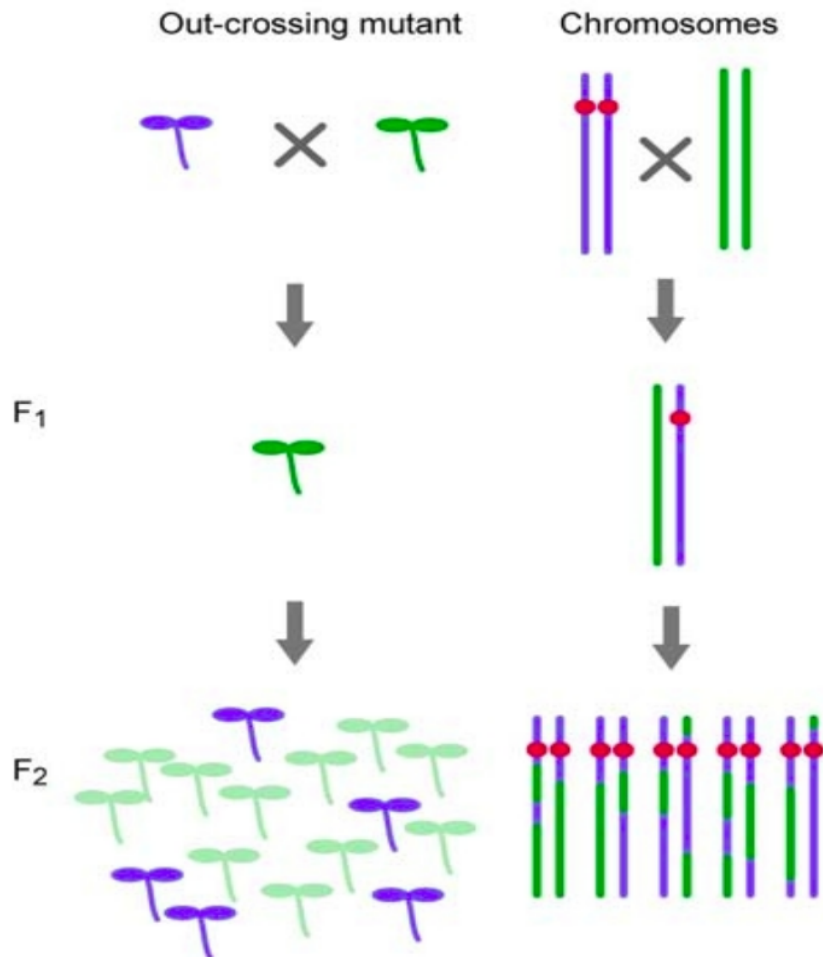
mutant isolation

genetic characterization

Identification of SNP
and “clean-up”

mutant verification
and characterization

Kartierungspopulation



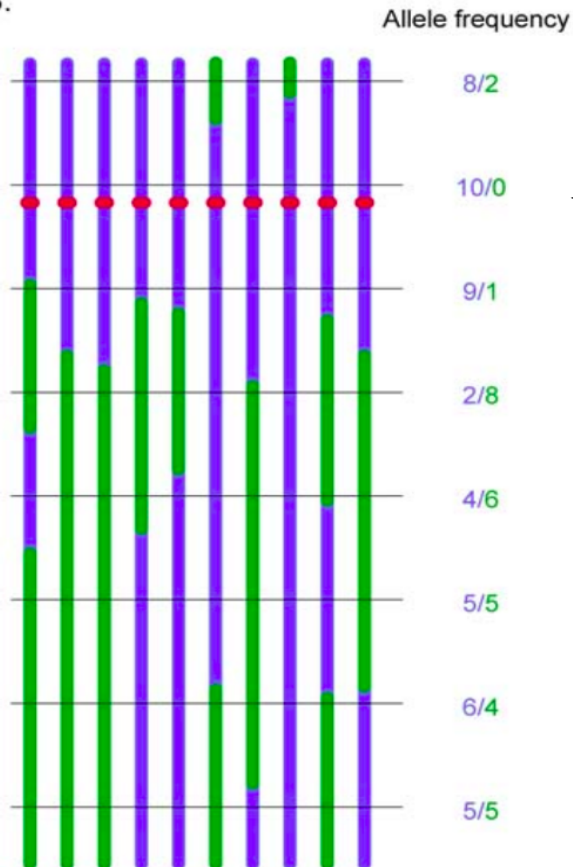
rezessive Mutante x (Fremd-) WT

Selbstbestäubung der F₁

segregierende F₂ +
Selektion über mut. Phänotyp

Kartierung

B.



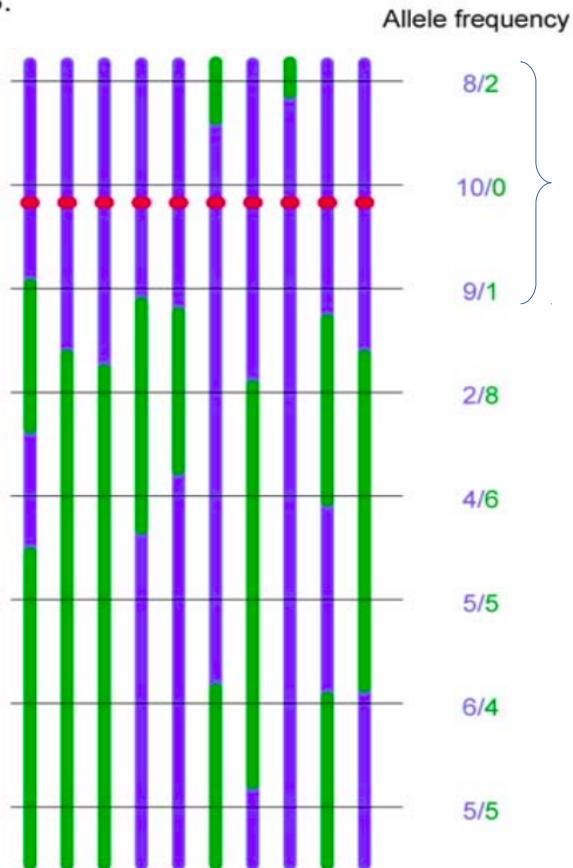
← Anreicherung d. kausalen Mutation
→ alle Pflanzen mit mut. Phänotyp homozygot

← Ausdünnung d. SNPs (Col vs. Ler) durch
Rekombination

→ Kopplung/linkage:
je näher zwei Loci zusammenliegen, desto
unwahrscheinlicher ist das Auftreten eines
Rekombinationsereignis zwischen ihnen

Kartierung

B.



candidate gene
interval

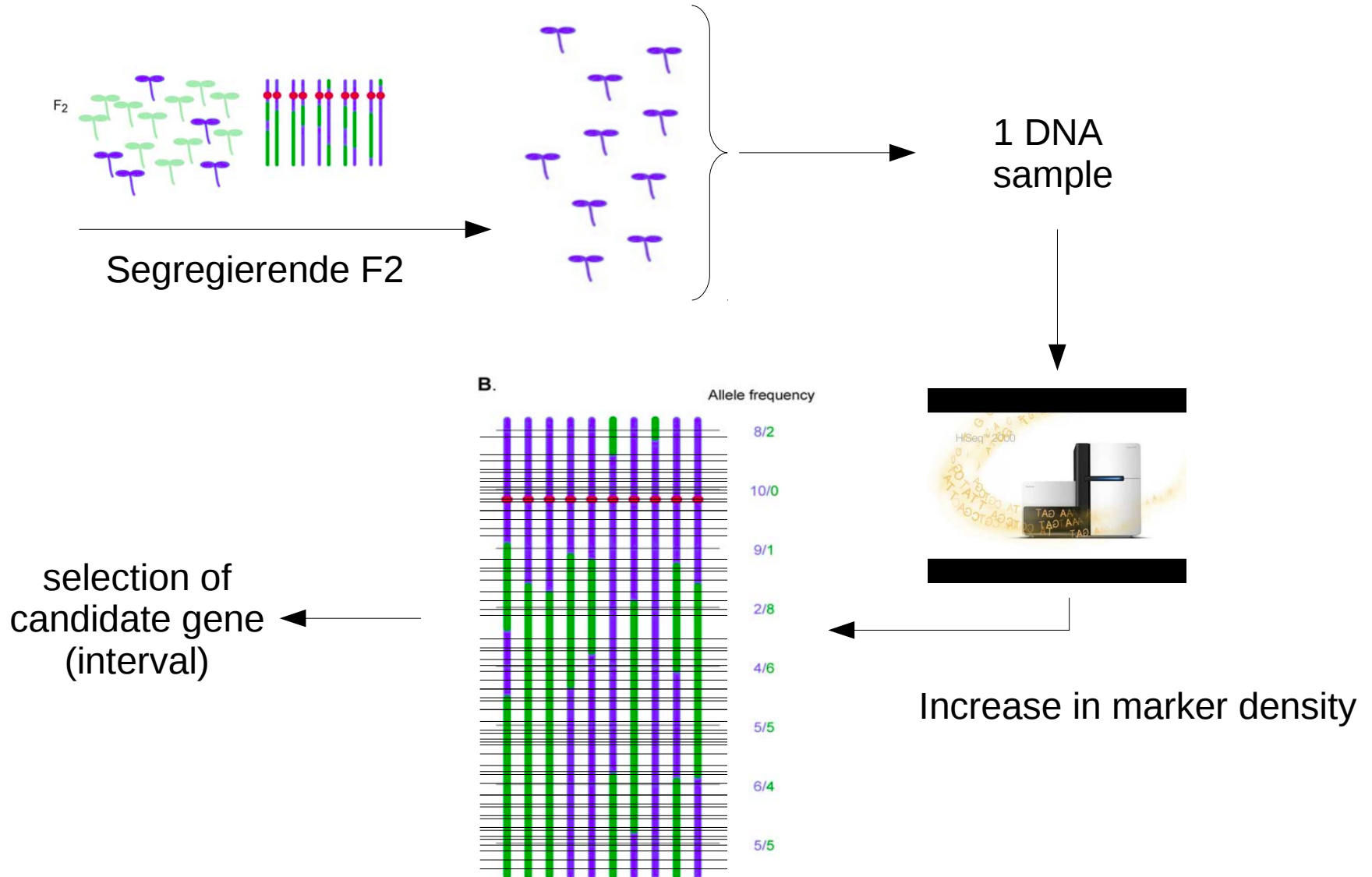
further fine-
mapping (F3, F4)

candidate gene

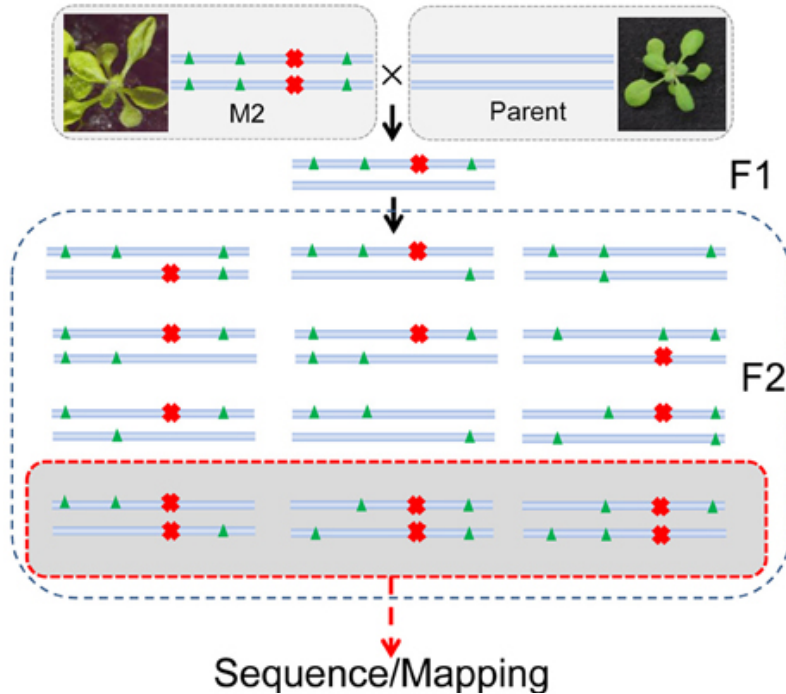
→ Zeitaufwändig, viel “hands-on” Arbeit!



“new”: mapping-by-sequencing



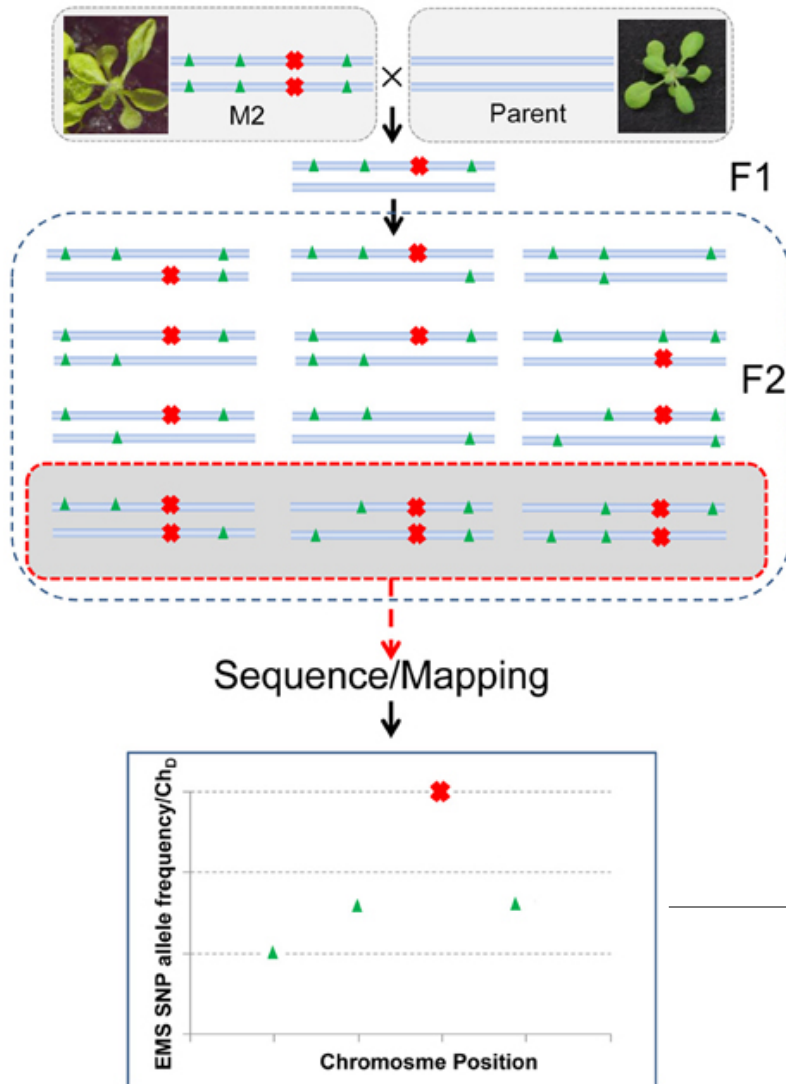
“new”: mapping-by-sequencing



Funktioniert auch mit Rückkreuzungen

Material ist immer
verfügbar
→ Charakterisierung der
Mutationsvererbung

“new”: mapping-by-sequencing

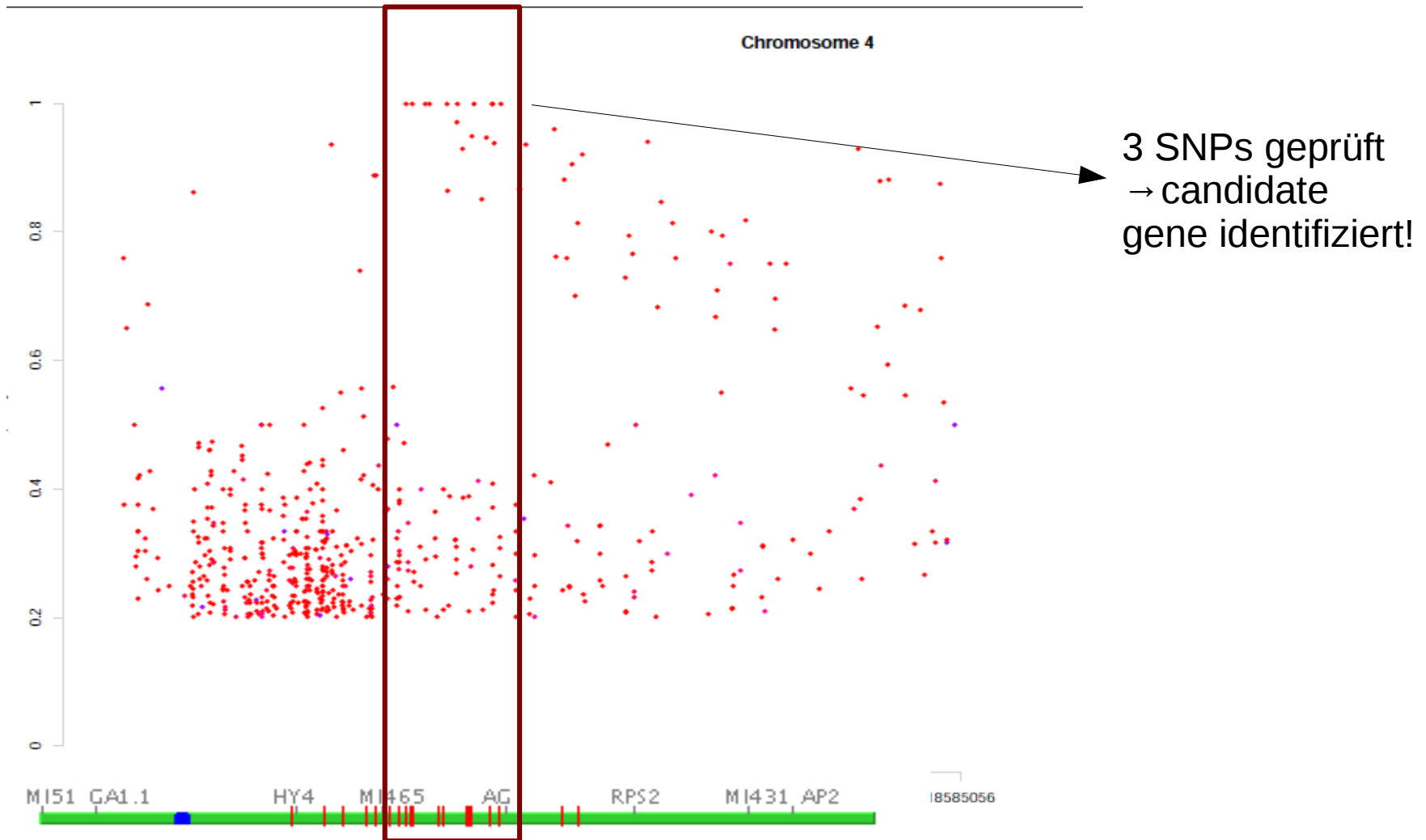


Funktioniert auch mit Rückkreuzungen

Material ist immer
verfügbar
→ Charakterisierung der
Mutationsvererbung

candidate gene
(interval)

allele frequency in reality



Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology

Mark A. Estelle* and Chris Somerville

MSU-DOE Plant Research Laboratory, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA

Ziel:

Isolierung von Mutanten, die eine erhöhte Resistenz gegenüber Auxin aufweisen

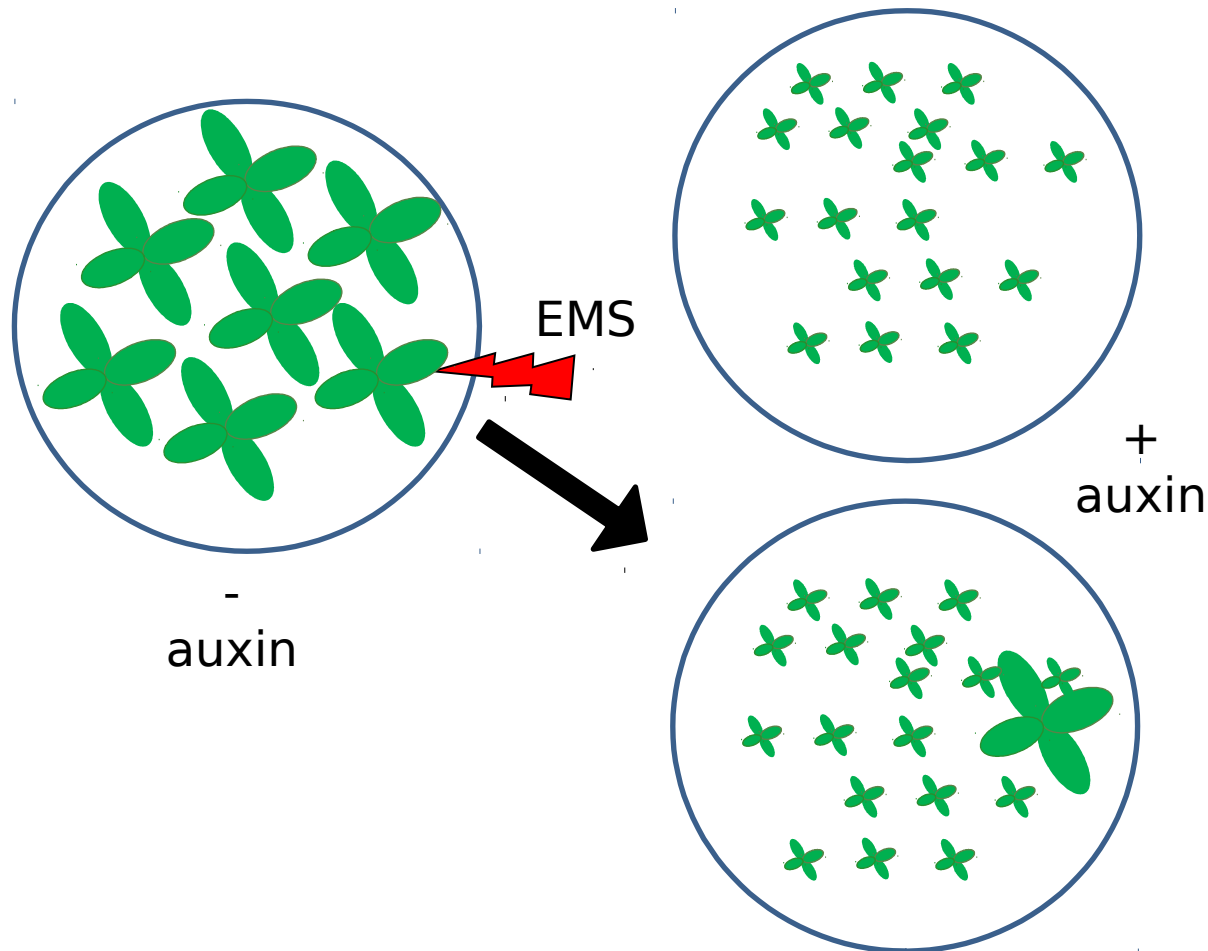
Identifizierung von Signalelementen, die an der Auxinresponse beteiligt sind

Zu diesem Zeitpunkt:

- keine Enzyme der Auxinbiosynthese bekannt
- keine Information zu Elementen der Signaltransduktion
- *Arabidopsis* war noch nicht sequenziert!

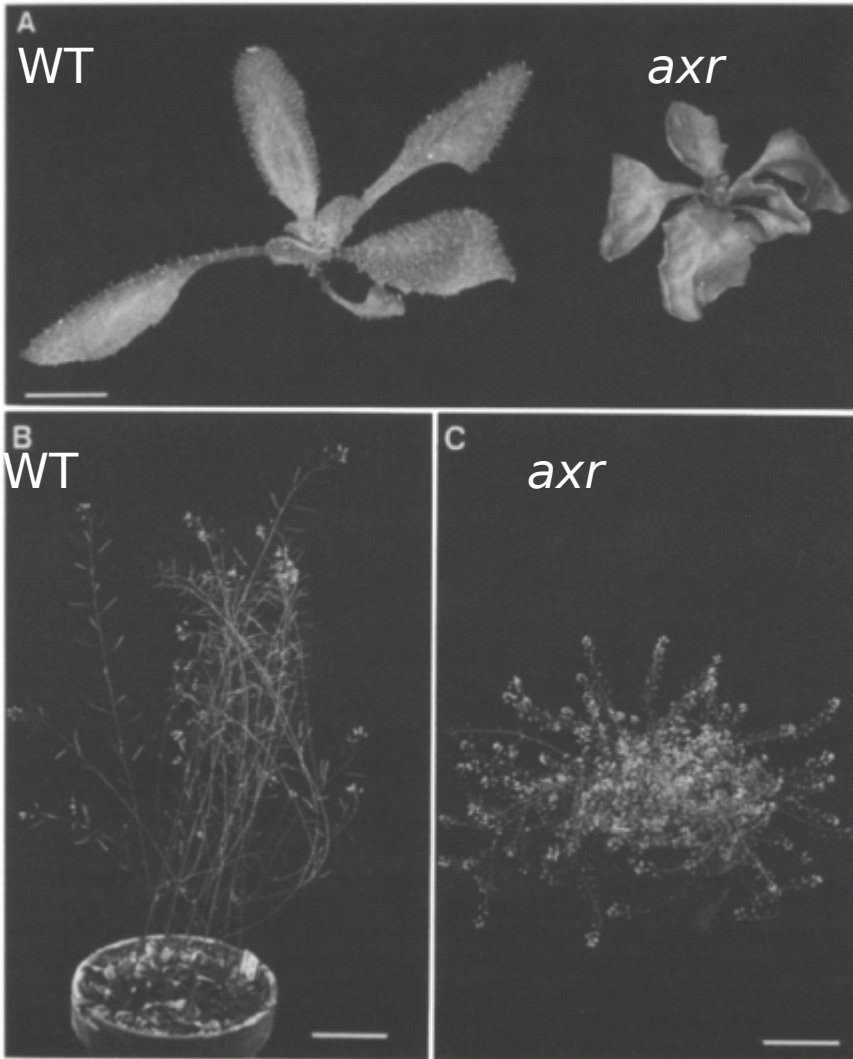
axr Mutantenscreen

Ziel: Isolierung von Mutanten, die resistent gegenüber der Auxinbehandlung sind (*axr* = a*uxin* resistant 1)



6+7 *axr* Mutanten
aus 2x 150 000
gescreenten M2

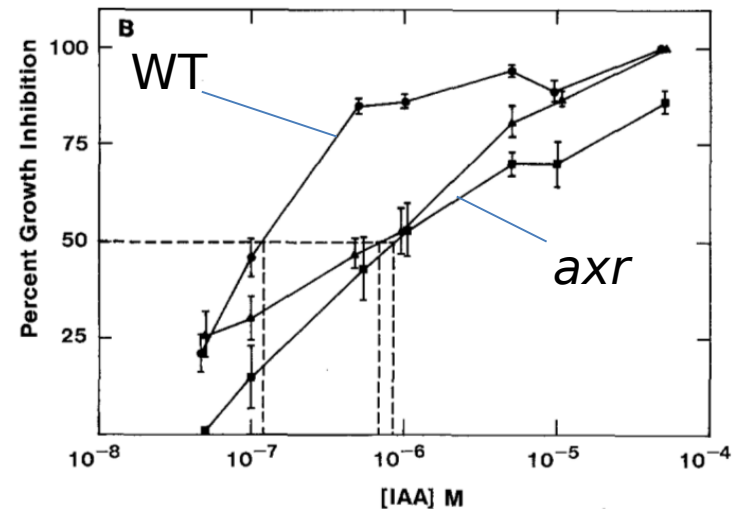
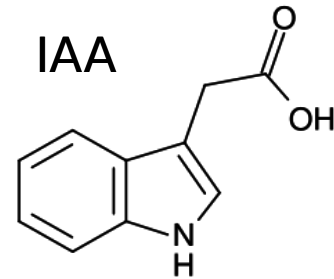
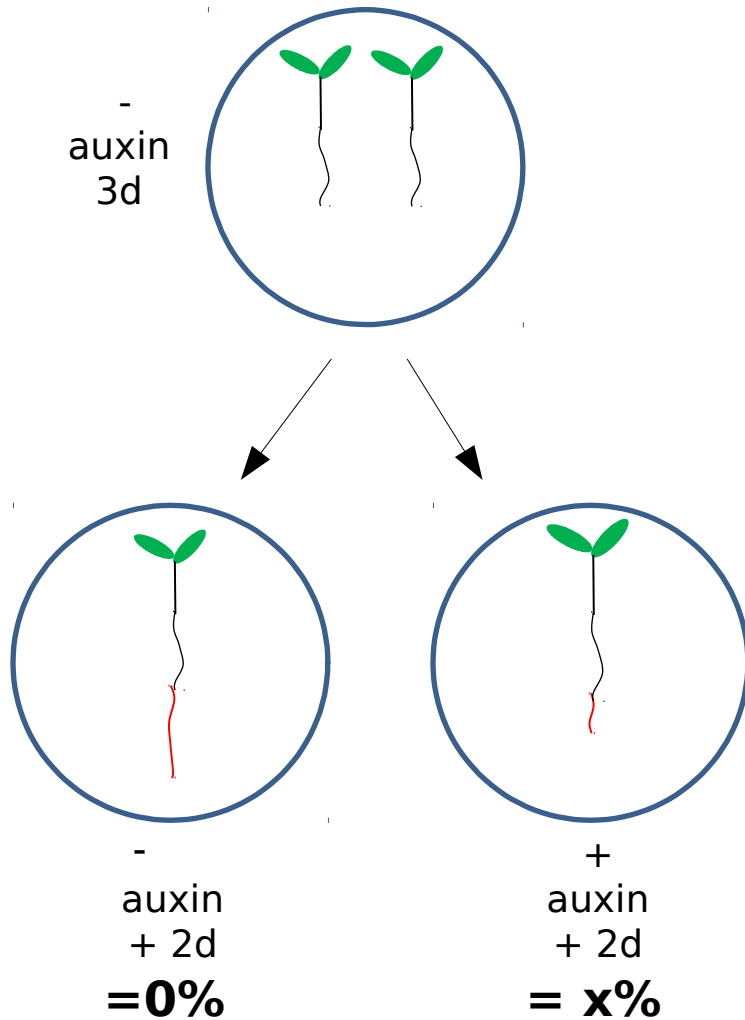
weitere Phänotypen der *axr1* Mutante



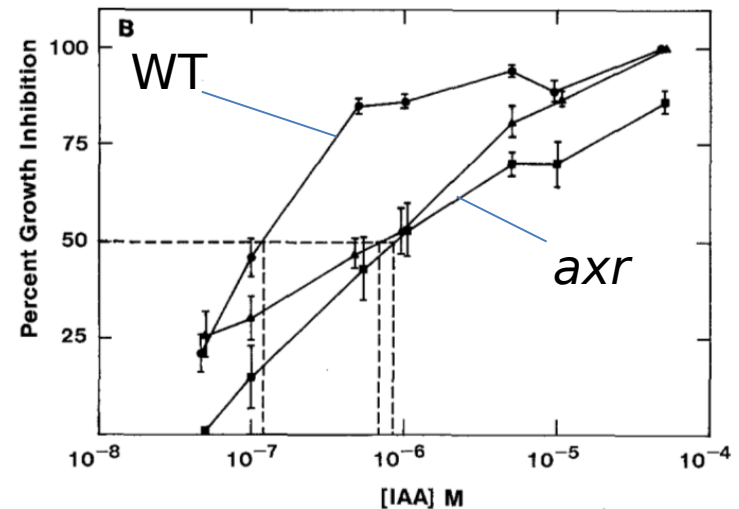
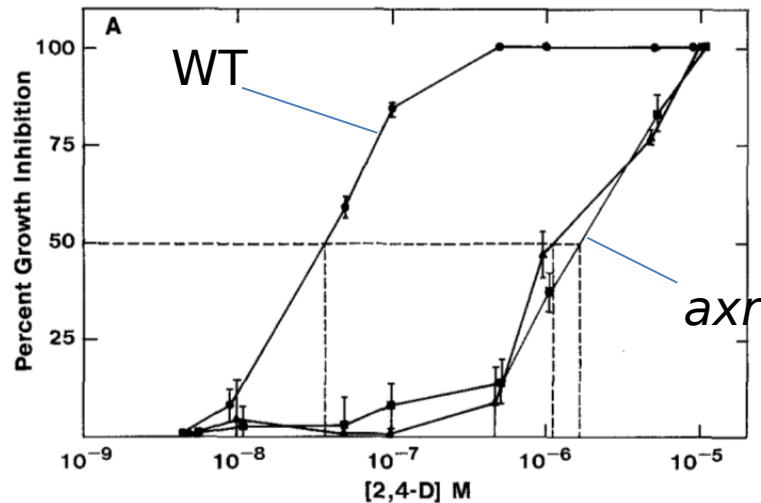
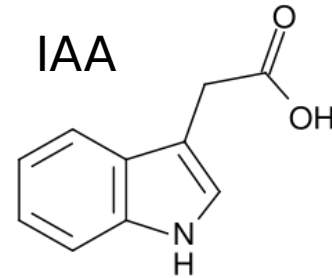
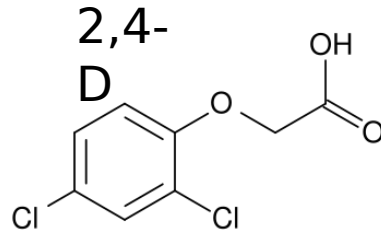
➔ *axr1* Mutanten sind:
kleiner (Rosette)
kürzere Blattstiele
Veränderte Blattform

➔ *axr1* Mutanten bilden
vermehrt sekundäre
Infloreszenzen
= Verlust der
Apikaldominanz

Wurzelreaktion auf Auxin - IAA



Wurzelreaktion auf Auxin - 2,4-D



axr Mutanten zeigen verminderte Wurzelinhibierung in Reaktion auf 2,4-D und IAA

Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology

Mark A. Estelle* and Chris Somerville

MSU-DOE Plant Research Laboratory, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA

Fazit:

Isolierung von *axr1* Mutanten mit erhöhter Resistenz gegenüber Auxin, die außerdem zahlreiche Wachstums- und Entwicklungsphänotypen zeigen

eine mögliche Hypothese:

“....An attractive possibility is that the *AXR1* gene coded for an auxin receptor and that resistance is due to an alteration that has a greater effect on the affinity of this receptor for 2,4-D than for IAA.....”

The Plant Cell, Vol. 2, 1071–1080, November 1990 © 1990 American Society of Plant Physiologists

Growth and Development of the *axr1* Mutants of *Arabidopsis*

Cynthia Lincoln, James H. Britton, and Mark Estelle¹

Department of Biology, Indiana University, Bloomington, Indiana 47405

Ziel:

Weitere Charakterisierung der *axr1*-Mutanten
Kartierung des betroffenen Gens

Isolierung weiterer *axr* Mutanten

Table 1. Recovery of *axr1* Mutants^a

M2 population	Mutagen	Selection	Mutants recovered
A ^b	EMS	2,4-D	<i>axr1-1</i> <i>axr1-2</i> <i>axr1-3</i> <i>axr1-4</i> <i>axr1-5</i> <i>axr1-6</i>
B ^b	EMS	2,4-D	<i>axr1-7</i> <i>axr1-8</i> <i>axr1-9</i> <i>axr1-11</i> <i>axr1-12</i> <i>axr1-15</i>
C ^c	EMS	2,4-D	<i>axr1-16</i> <i>axr1-17</i> <i>axr1-18</i> <i>axr1-19</i> <i>axr1-20</i> <i>axr1-21</i>
C ^c	EMS	IAA	<i>axr1-22</i>
D ^c	γ	2,4-D	<i>axr1-23</i>

^a A total of 470,000 seeds from four distinct M2 populations was screened for mutants that were able to elongate roots on either 5 μ M 2,4-D or 50 μ M IAA.

^b Estelle and Somerville (1987).

^c This study.

Charakterisierung der Mutationen
→ rezessiv/dominant
→ Allelie



zu den 12 *axr1*-
Mutanten noch
weitere 8 isoliert

Genetische Charakterisierung

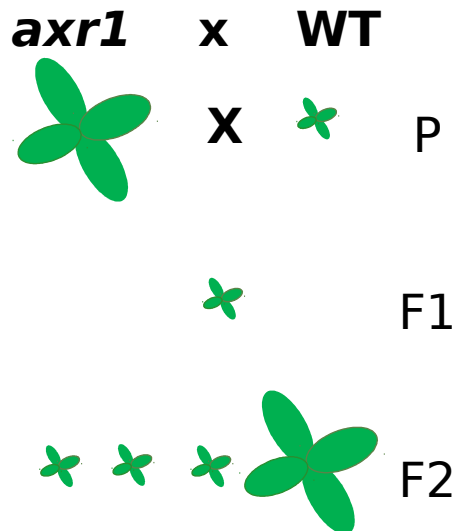
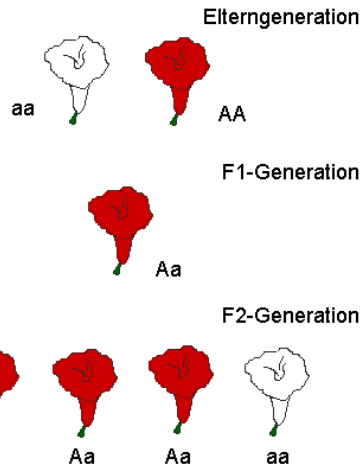


Table 2. Genetic Segregation of 2,4-D Resistance in *axr1* Lines

Cross	Number of Plants		χ^2 ^a
	Resistant	Sensitive	
<i>axr1</i> -19 × wild-type F1	0	23	
F2	186	493	2.07 ^b
<i>axr1</i> -21 × wild-type F1	0	51	
F2	82	281	1.12 ^b
<i>axr1</i> -22 × wild-type F1	0	22	
F2	56	216	2.83 ^b
<i>axr1</i> -23 × wild-type F1	0	33	
F2	117	383	0.683 ^b

^a χ^2 was calculated based on an expected ratio of three sensitive to one resistant.

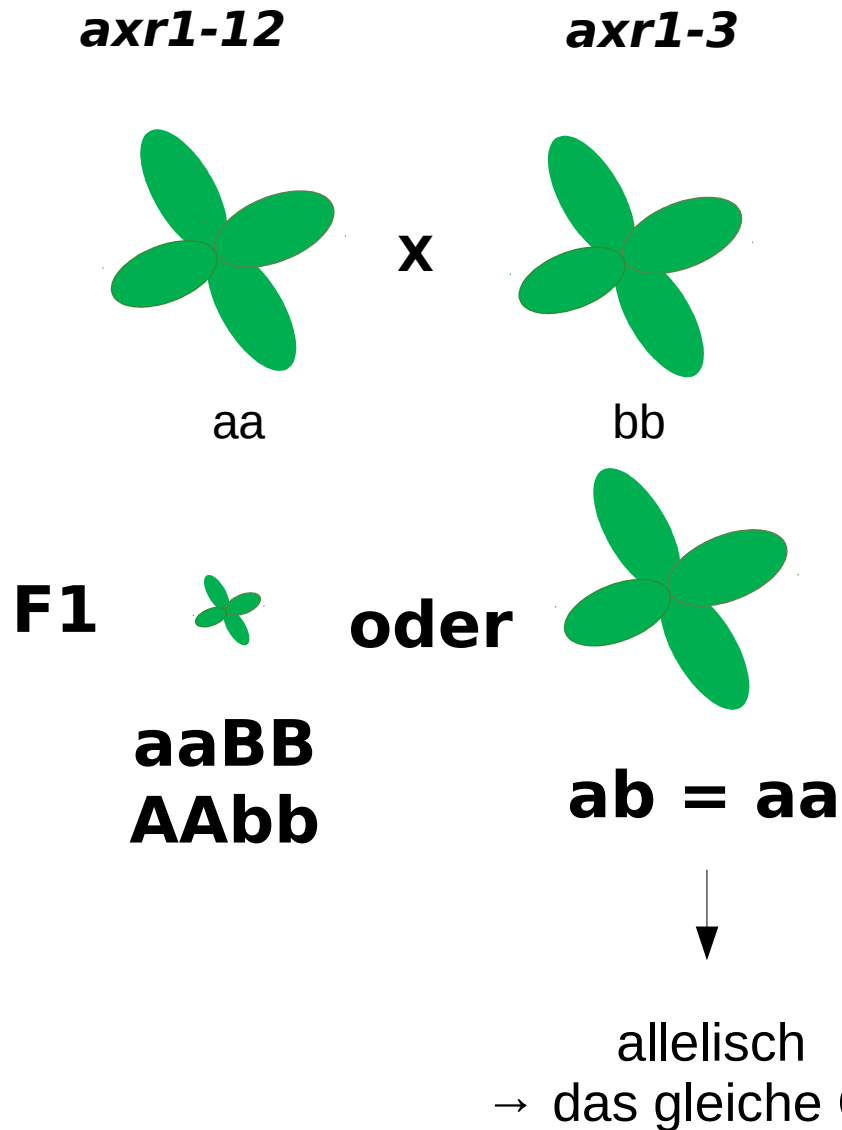
^b $P > 0.05$.

➔ *axr1* mutants are recessive

Allelietest

- 30 *axr* Mutanten isoliert
 - 30 verschiedene Gene oder 30 Mutationen im gleichen Gen?

Allelietest

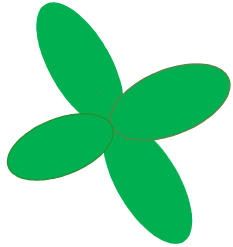


Komplementationstest
auf Auxin

Mutationen allelisch
oder in verschiedenen
Genen?

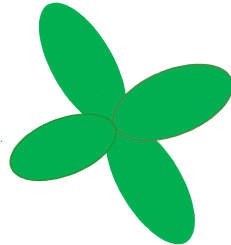
Allelietest

axr1-12/
axr1-12



x

axr1-3/
axr1-3

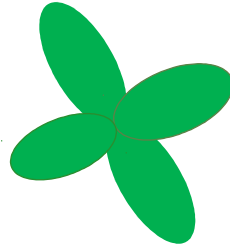


Komplementationstest
auf Auxin

F1



oder



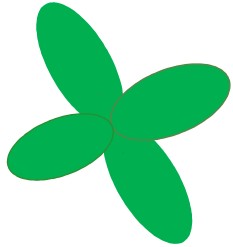
axr/AXR

axr/axr

Mutationen allelisch
oder in verschiedenen
Genen?

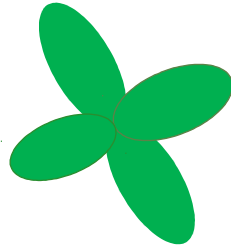
Allelietest

axr1-12/
axr1-12



x

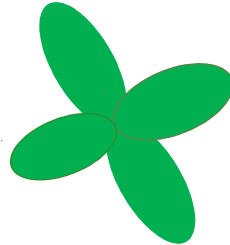
axr1-3/
axr1-3



F1



oder



axr/AXR

axr/axr

Table 3. Complementation Analysis of *axr1* Lines

Cross	Number of Plants	
	Resistant	Sensitive
<i>axr1-12</i> × <i>axr1-3</i>	33	0
<i>axr1-19</i> × <i>axr1-3</i>	21	0
<i>axr1-20</i> × <i>axr1-3</i>	13	0
<i>axr1-22</i> × <i>axr1-3</i>	24	0
<i>axr1-23</i> × <i>axr1-3</i>	39	0

⇒ Mutationen sind verschiedene Allele im selben Gen!

axr1 Phänotypen

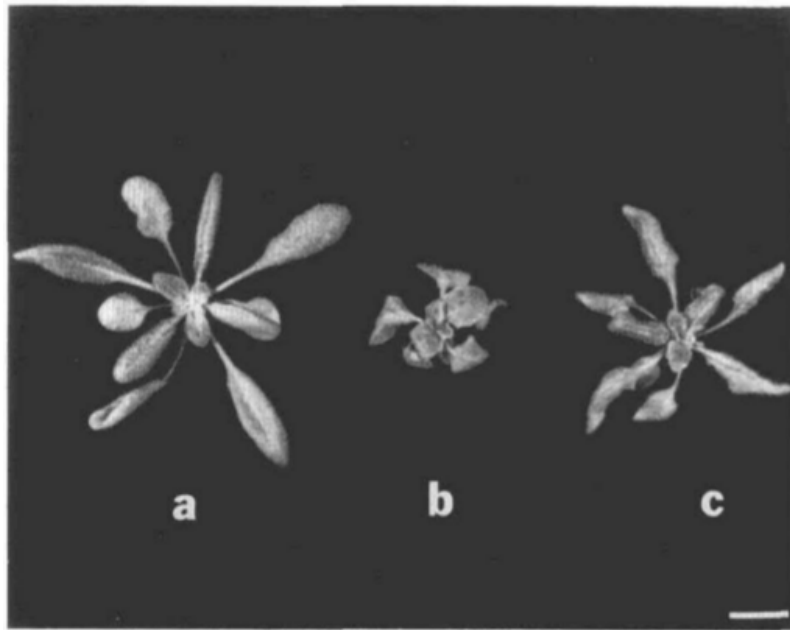


Figure 1. Phenotype of Wild-Type and Mutant Rosettes.

Rosettes were photographed when the plants were 3 weeks old.

(a) Wild type.

(b) *axr1-12/axr1-12*.

(c) *axr1-3/axr1-3*.

Bar = 1 cm.

→ Allele zeigen
unterschiedliche Ausprägung
morphologischer Defekte



Figure 2. Comparison of Mature Wild-Type and Mutant Plants.

Wild-type and mutant plants were photographed when 7 weeks old.

(a) Wild type.

(b) *axr1-12/axr1-12*.

(c) *axr1-3/axr1-3*.

Bar = 3 cm.

Quantifizierung morphometrischer Parameter

Table 4. Morphology of Wild-Type and Mutant Plants

	Wild Type	<i>axr1-3</i>	<i>axr1-12</i>
Height (cm)	50.9 ± 1.0	38.4 ± 1.3	19.2 ± 1.8
No. of inflorescences	5.75 ± 0.25	6.25 ± 1.4	6.6 ± 1.6
No. of lateral branches	46.2 ± 4.5	96.7 ± 21.4	124.0 ± 24.4
Distance between siliques (cm)	0.65 ± 0.04	0.30 ± 0.01	0.32 ± 0.02
No. of siliques	673.75 ± 68.0	526.5 ± 56.0	2.4 ± 1.3
No. of pollen grains/flower	2035.0 ± 500.0	2700.0 ± 337.0	680.0 ± 32.0
Hypocotyl length in etiolated seedlings (cm)	1.40 ± 0.04	1.20 ± 0.05	0.77 ± 0.03



axr1-3 Mutante zeigt eine schwächere Ausprägung der Phänotypen als die *axr1-12* Mutante

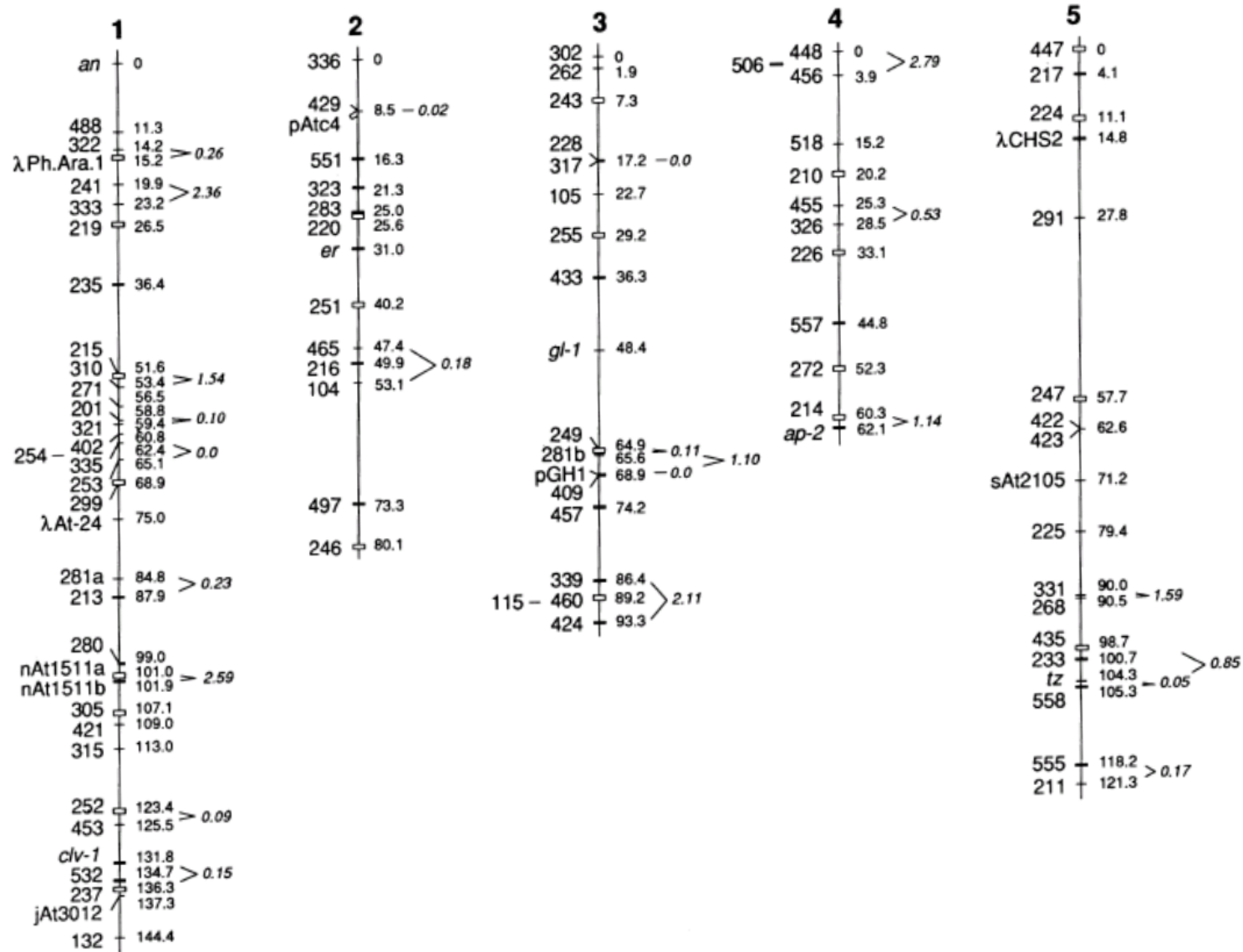
weitere Phänotypen:

→ Wurzel Gravitropismus + Wurzelelongation
= klassische Auxinprozesse

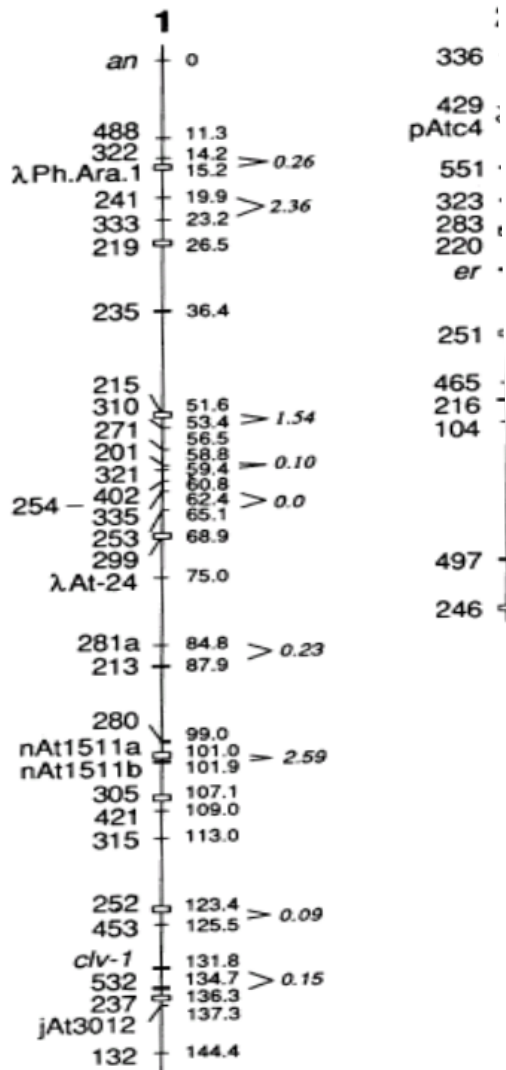
Map-based cloning

- Voraussetzungen:
 - Spaltende F2-Generation einer Kreuzung aus der Mutante (im Col-0 Hintergrund) mit einem anderen Genotyp (Ni)
 - Auskreuzung
 - Molekulare Marker zur Unterscheidung der 2 Genotypen (Col-0 und Ni) z.B. RFLP- oder SSLP-Marker
 - genetische Karte der Markerpositionen

genetische Karte Col vs Ler

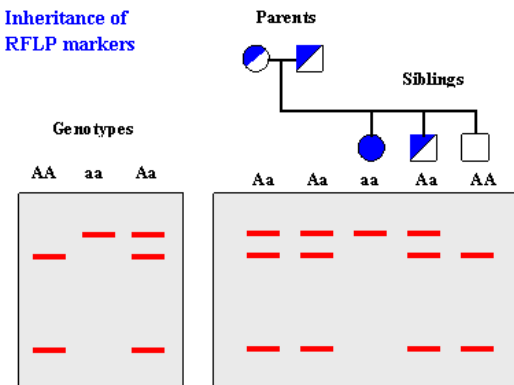


RFLP marker Karte



- An verschiedenen Positionen im Genom lassen sich Col-0 und Ler unterscheiden, da die DNA-Fragmente unterschiedlich groß sind (= molekul. Marker)

Inheritance of RFLP markers



Map-based cloning

- Voraussetzungen:
 - Spaltende F2-Generation einer Kreuzung aus der Mutante (im Col-0 Hintergrund) mit einem anderen Genotyp (Ler)
 - Auskreuzung
 - Molekulare Marker zur Unterscheidung der 2 Genotypen (Col-0 und Ni) z.B. RFLP- oder SSLP-Marker
 - genetische Karte der Markerpositionen

Durchführung:

Untersucht die F2-Pflanzen auf:

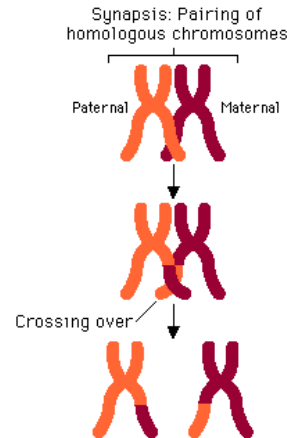
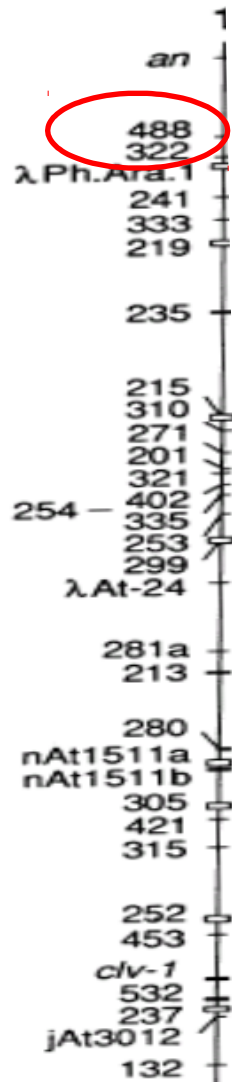
axr1 Phänotyp (= Auxinresistenz und Phänotypen)

Genotypen an verschiedenen Markerpositionen

Kopplungsanalyse:

tritt die *axr1* Mutation bevorzugt mit einem bestimmten Marker auf

Map-based cloning of *axr1*



je näher das Gen an einem bestimmten Marker liegt, desto weniger Rekombinationsereignisse treten auf
(d.h. es liegt hauptsächlich der Col-0 und nicht der Ni Genotyp am Marker vor)

Table 6. Linkage Analysis between the *AXR1* Gene and RFLP Markers on Chromosome 1

Markers	Recombination Frequency (%)	Number Scored ^a	χ^2 Associated ^b	P
RFLP 219	12.4 $\pm$ 2.0	136	123.3	<0.05 ^c
RFLP 253	47.8 $\pm$ 6.3	63	5.6	0.231
RFLP 488	2.6 $\pm$ 1.0	99	174.0	<0.05
phyA1	7.1 $\pm$ 2.0	102	135.0	<0.05

^a Refers to number of F3 families scored.

^b χ^2 associated is the total χ^2 adjusted for deviations of each individual marker from Mendelian segregation.

^c P value < 0.05 indicates deviation from nonlinkage (i.e., linkage).

Growth and Development of the *axr1* Mutants of *Arabidopsis*

Cynthia Lincoln, James H. Britton, and Mark Estelle¹

Department of Biology, Indiana University, Bloomington, Indiana 47405

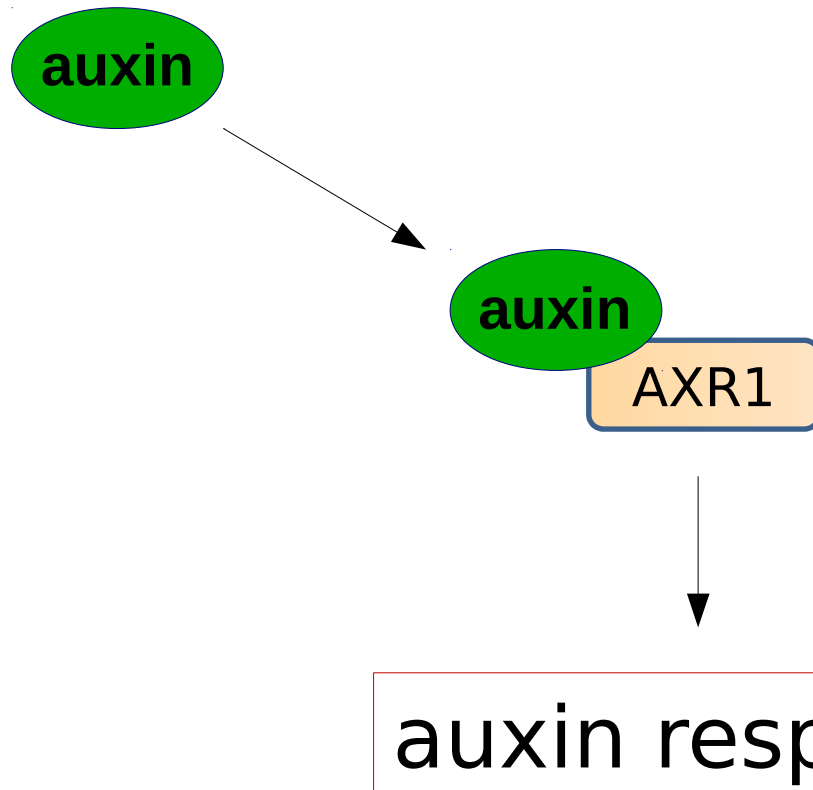
Fazit:

axr1 Mutanten zeigen zahlreiche Phänotypen in verschiedenen Geweben (Spross und Wurzel!)

- AXR1 muss ein zentrales Element in der Vermittlung der Auxin response sein
 - auxin rezeptor oder wichtiges Element in der Signaltransduktion
- und/oder: eventuell einen Knotenpunkt darstellen, an dem Signale aus verschiedenen Hormon-Signalwegen zusammenlaufen

Kartierung des betroffenen Gens (*AXR1*) ergab eine Lage auf Chromosom1

vorläufiges Modell



AXR1
→ potentieller
Auxinrezeptor

nächstes Mal:

1. Estelle and Somerville, (**1987**) Auxin resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. **MGG** 206:200
2. Lincoln et al., (**1990**) Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. **PC** 2:1071
3. Leyser et al., (**1993**) *Arabidopsis* auxin-resistance gene *AXR1* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. **N** 364:161

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 91, pp. 326–330, January 1994
Biochemistry

Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins

(plant hormone action/plant cell growth/protein stability/ $\beta\alpha\alpha$ DNA binding motif/nuclear localization)

STEFFEN ABEL, PAUL W. OELLER*, AND ATHANASIOS THEOLOGIS[†]

Plant Gene Expression Center, 800 Buchanan Street, Albany, CA 94710

Communicated by Kenneth V. Thimann, October 4, 1993 (received for review August 11, 1993)