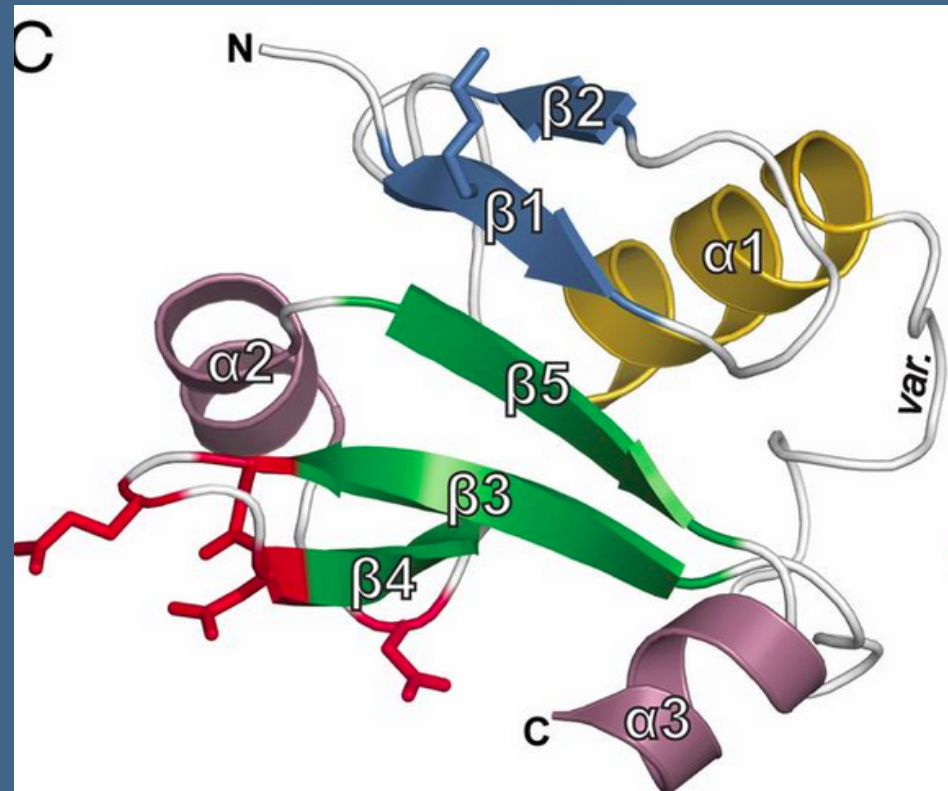


# Molekulare Mechanismen der Signaltransduktion

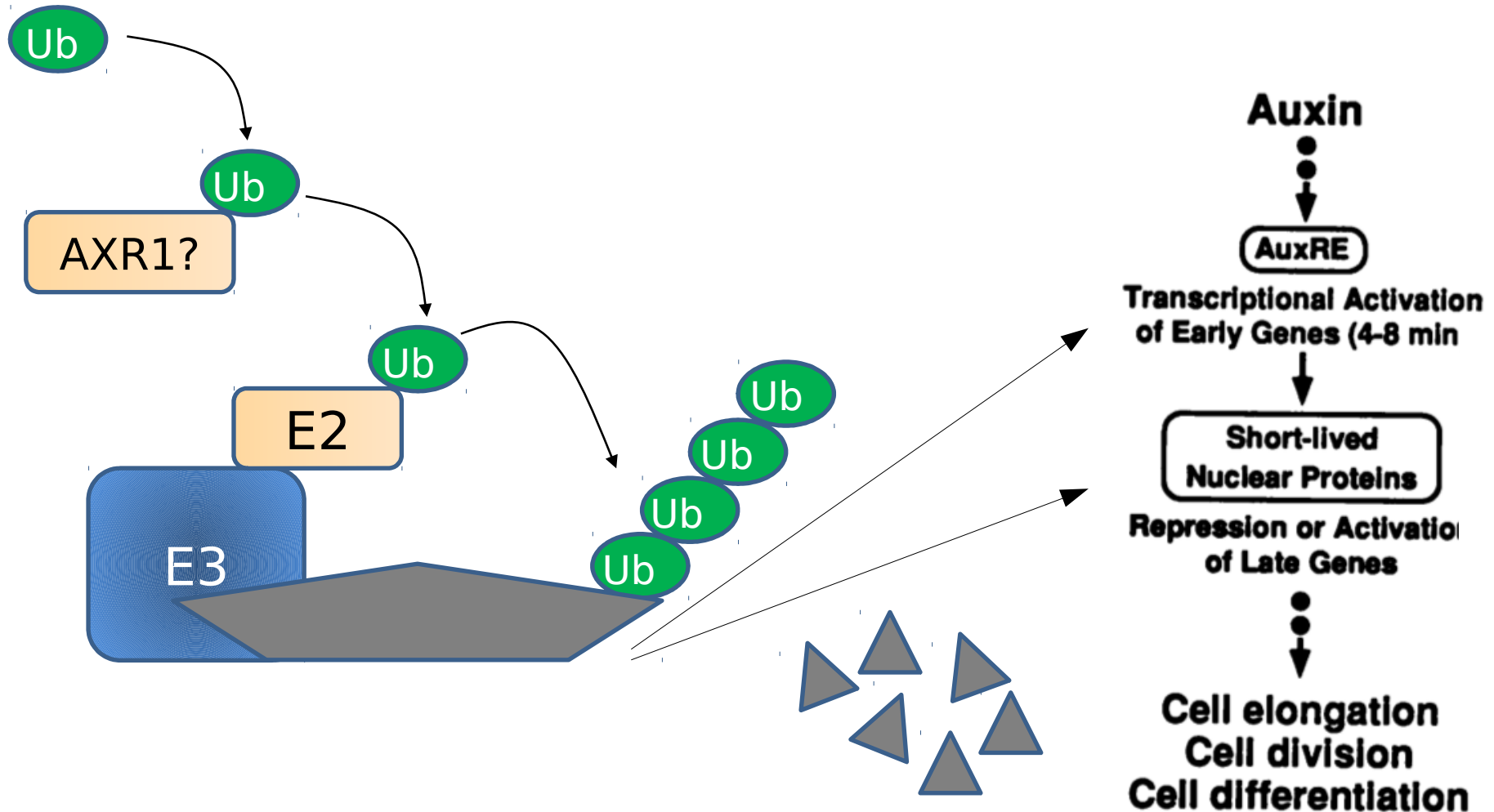


07 - Identifizierung von ARF1  
+ Hinweise für Vorträge

Folien:

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

# neues Modell

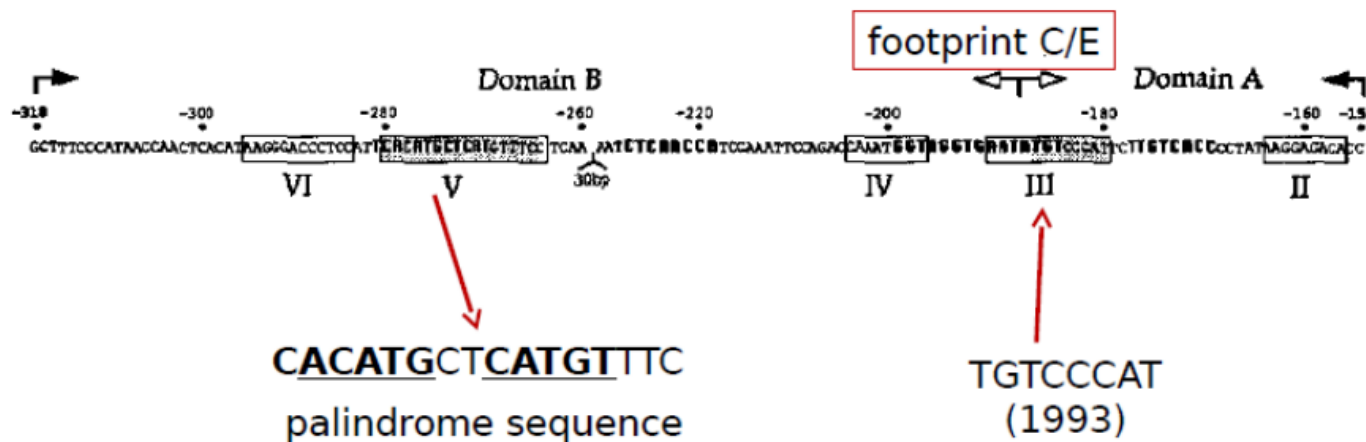


auxin response

# was bisher geschah.....

- ✓ Auxin induziert die Expression verschiedener Gene / Genfamilien
  - schnell (in Minuten) + stark (30 - 100 x)
  - keine *de novo* Proteinbiosynthese erforderlich
- ✓ Auxin-relevanter Promotorbereich wurde auf 164bp eingegrenzt (Promotordeletionen)

II-VI: five sequence motifs identified by Oeller et al. (1993)



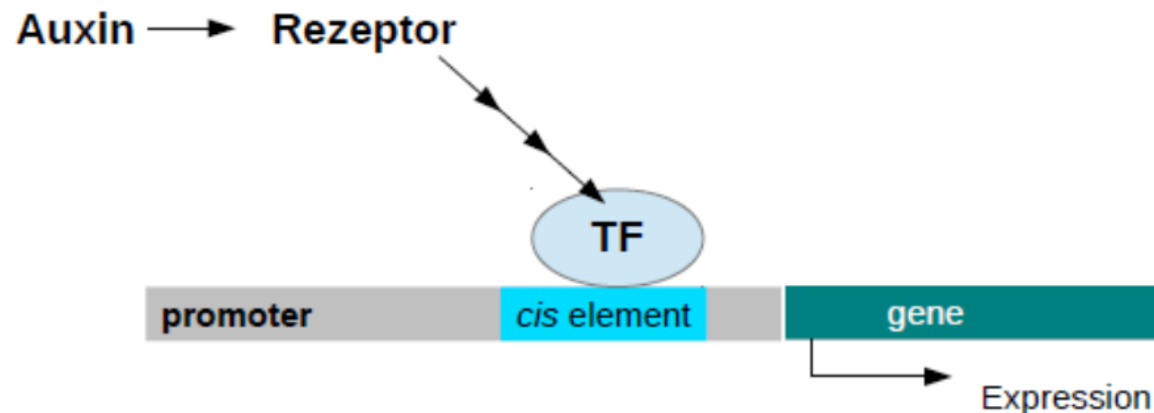
# ARF1, a Transcription Factor That Binds to Auxin Response Elements

Tim Ulmasov, Gretchen Hagen, Tom J. Guilfoyle\*

The plant hormone auxin regulates plant physiology by modulating the interaction of transcription factors with auxin response elements (AuxREs) of the affected genes. A transcription factor, Auxin Response Factor 1 (ARF1), that binds to the sequence TGTCTC in AuxREs was cloned from *Arabidopsis* by using a yeast one-hybrid system.

ARF1 has  
maize t  
identical  
ARF1 co  
protein-

minus of the  
in vitro are  
terminus of  
to mediate



Ziel:

- genauere Charakterisierung des AuxREs
- Identifizierung von Transkriptionsfaktor(en) die an das AuxRE binden

# Hintergründe.....

## GH3 Gen (Soja):

- antwortet schnell und spezifisch auf Auxin
- Promotor enthält zwei AuxREs D1 und D4 mit der konservierten Sequenz TGTCTC

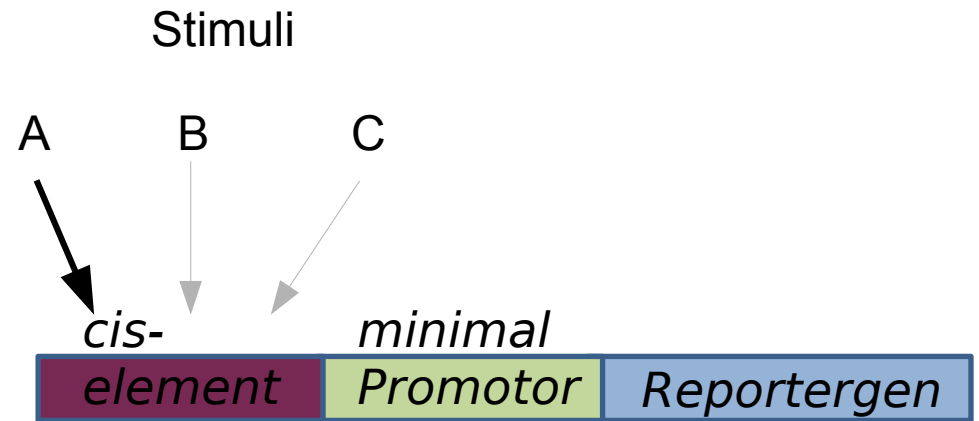
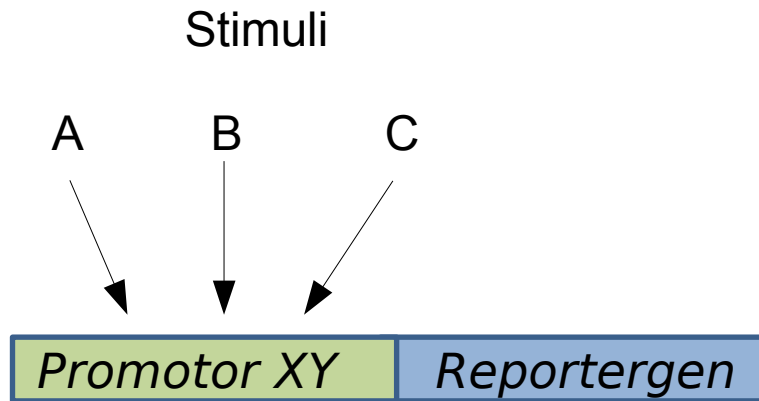
Auxin responsive elements (AuxREs) zeigen Ähnlichkeit zu glucocorticoid responsive elements „GREs“

- GREs beinhalten palindromische Sequenzen (AGAACA<sub>n</sub>nnTGTTCT) → TF-Bindestelle

Frage: Sind AuxREs palindromisch angeordnet?  
→ Konstruktion eines synthetischen Promotors

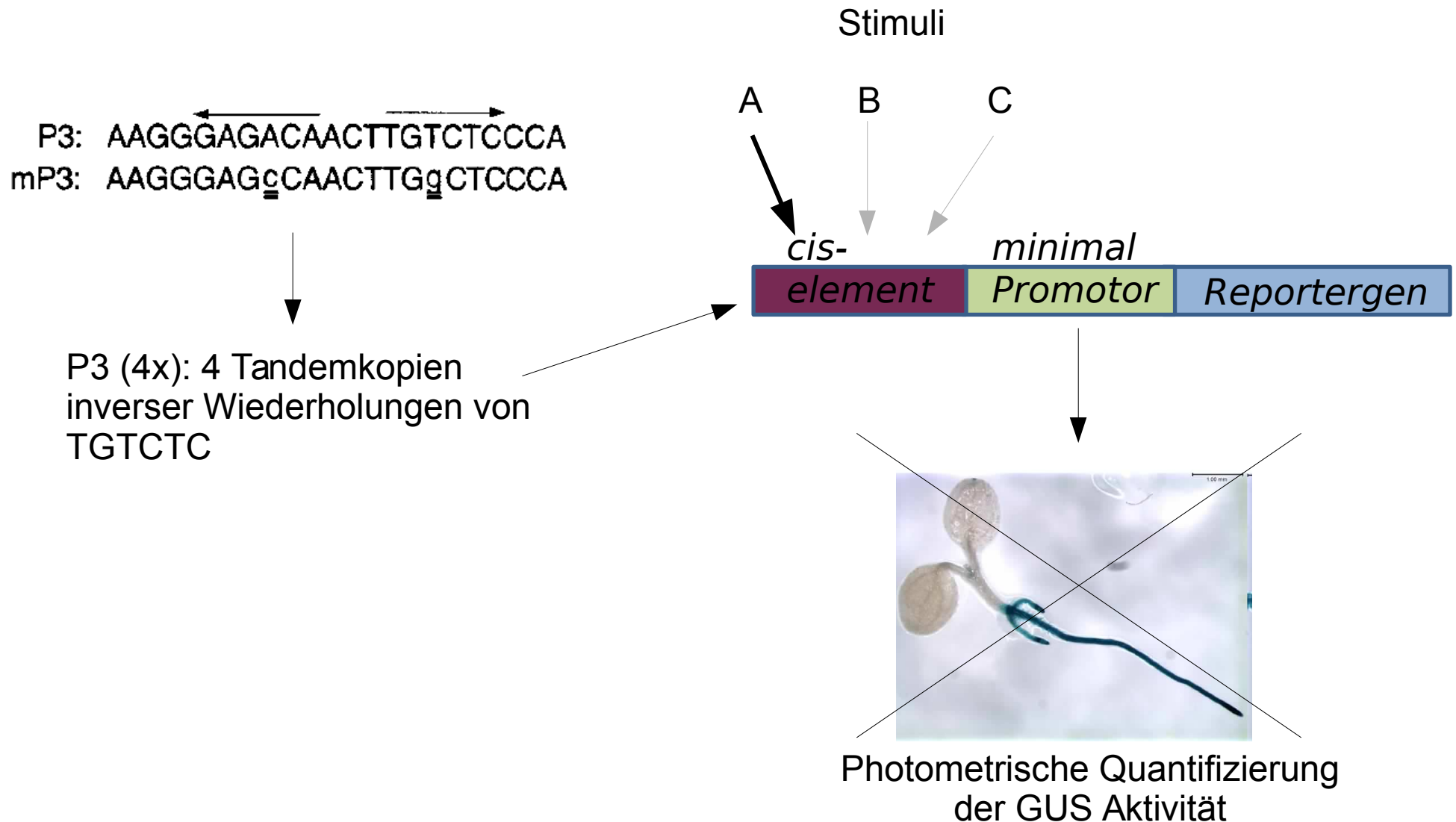
# full vs. synthetic reporters

→ Promotoranalysen = transcriptional fusion



# full vs. synthetic reporters

→ Promotoranalysen = transcriptional fusion

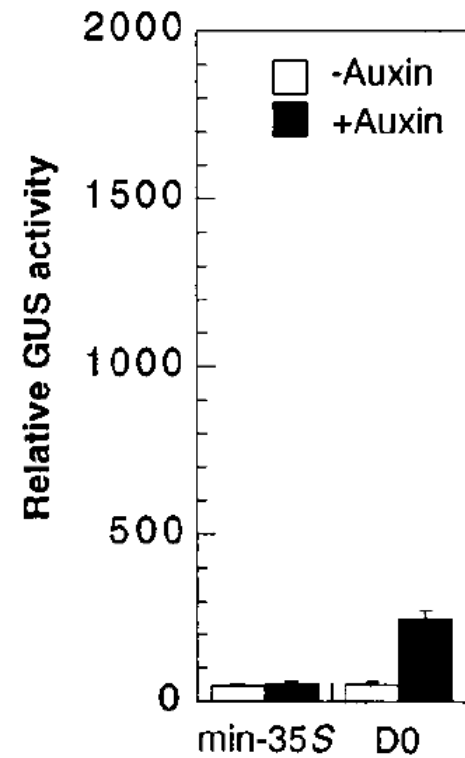


# AuxRe → Palindrom?

P3: AAGGGAGACAACTTGTCTCCCA  
mP3: AAGGGAGCCAACTTGGCTCCCA



P3 (4x): 4 Tandemkopien  
inverser Wiederholungen von  
TGTCTC



Promotor des cauliflower mosaic virus  
Ein AuxRE des GH3 Promotors

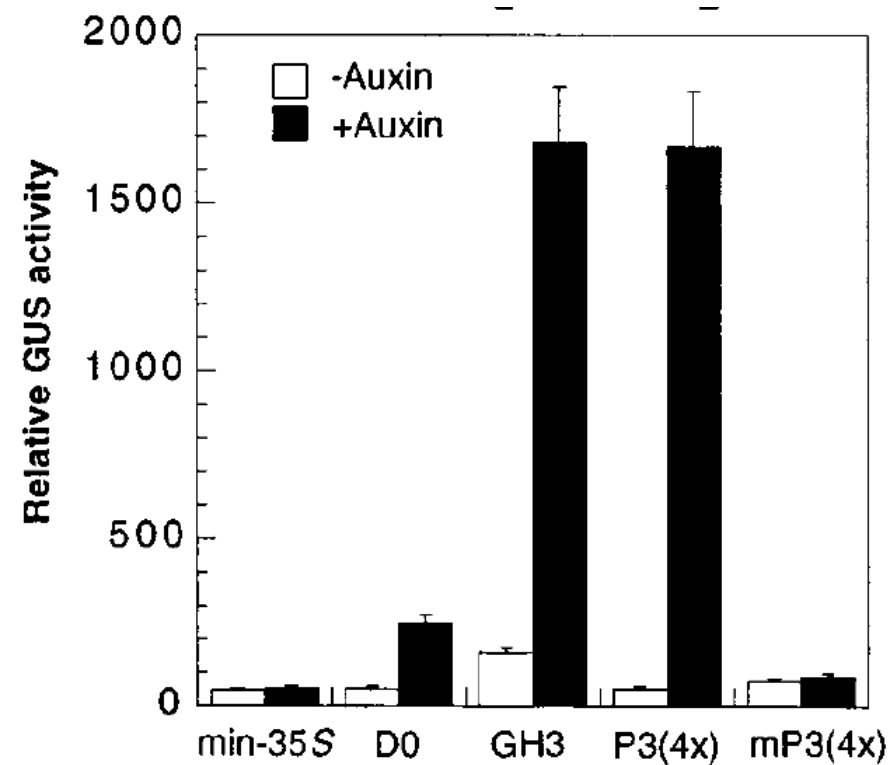


# AuxRe → Palindrom?

P3: AAGGGAGACAACTTGTCTCCCA  
mP3: AAGGGAGCCAACTTGGCTCCCA



P3 (4x): 4 Tandemkopien  
inverser Wiederholungen von  
TGTCTC

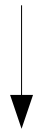


Promotor des cauliflower mosaic virus  
Ein AuxRE des GH3 Promotors  
Vollständiger GH3 Promotor  
Künstliche palindromische Sequenz  
Mutierte Palindromische Sequenz

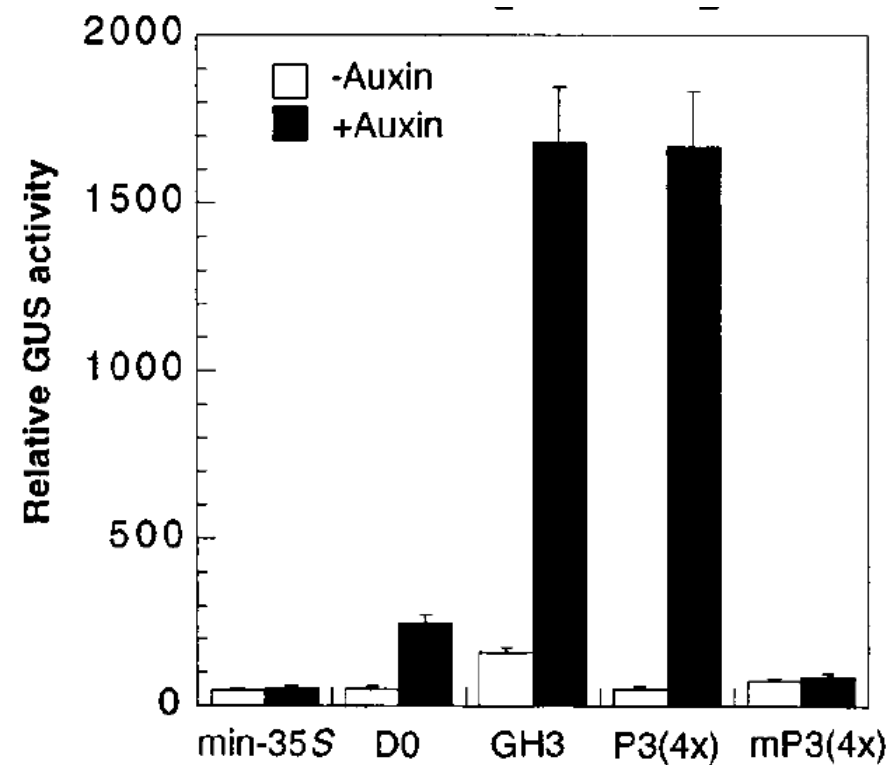
Fehlt: Angaben zu Balkendiagramm (Mittelwert +/- ?) + statistische Auswertung

# AuxRe → Palindrom?

P3: AAGGGAGACACTTGTCTCCCA  
mP3: AAGGGAGCCAACTTGGCTCCCA



P3 (4x): 4 Tandemkopien  
inverser Wiederholungen von  
TGTCTC



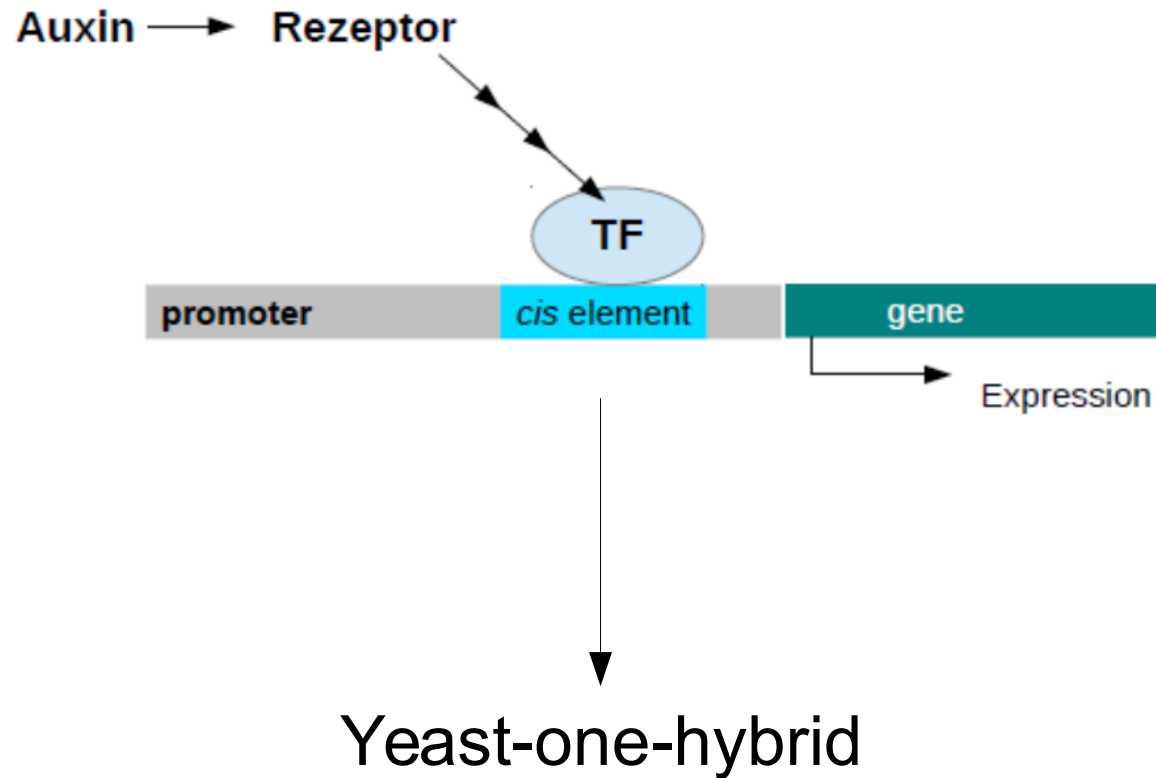
Fazit:

1. D0 AuxRE reicht nicht aus um maximale Auxinantwort zu gewährleisten
2. P3 (4x) zeigt die selbe Auxinantwort wie natürliches, vollständiges AuxRE

→ AuxRE braucht Palindrom

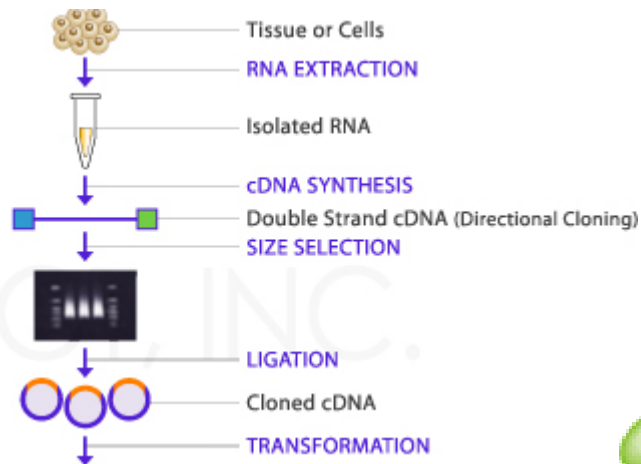
# AuxRE → interacting proteins

Ziel: Identification of proteins that interact with the AuxRE  
(→ Transcriptionfaktor)



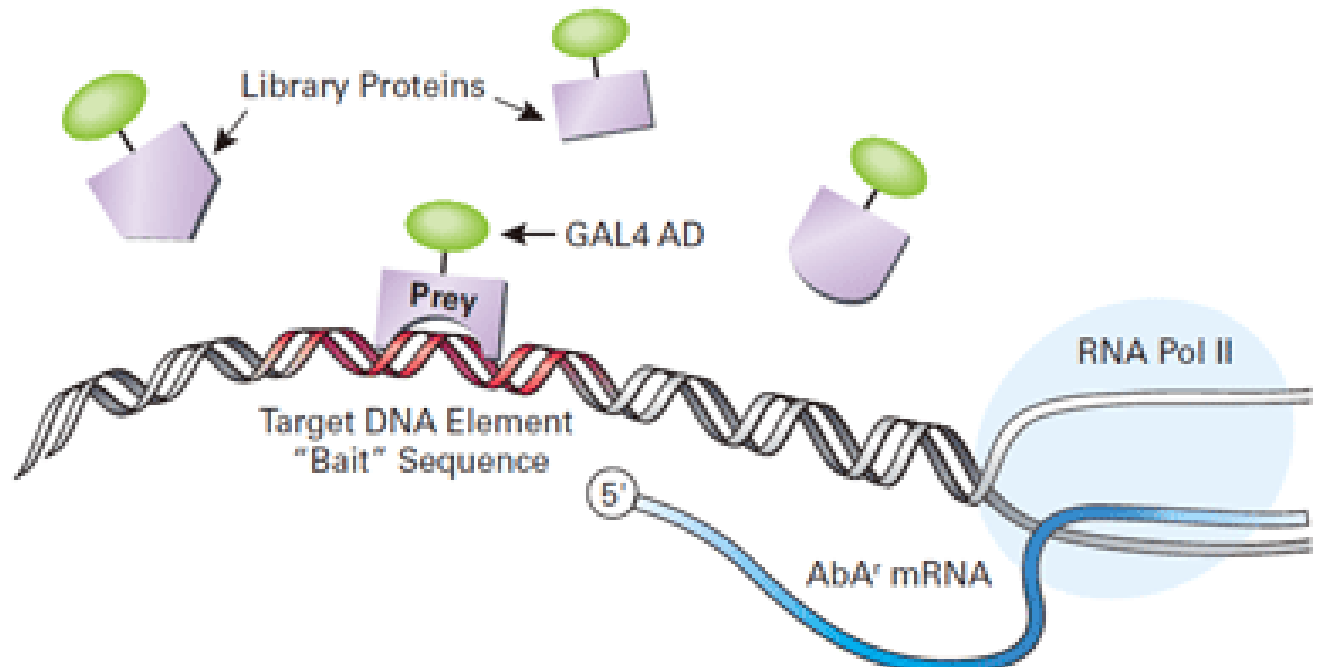
# AuxRE → interacting proteins

Ziel: Identification of proteins that interact with the AuxRE  
(→ Transcriptionfaktor)



1. cDNA expression library (jede cDNA → Protein+Aktivierungsdomäne)
2. AuxRE wird mit einem (LacZ) reporter verbunden

Hefe



bindet ein Protein (aus der cDNA expression library) and das AuxRE, kommt es zur Aktivierung des Reportergens

# Y1H: 5 Klonе → 1 Gen

5 cDNA Klonе wurden identifiziert – alle kodieren für das gleiche Protein: ARF1

**A**

```
1  MAASNHSSGK PGGVLSDALC RELWHACAGP LVTLPREGER VYYFPEGHME
51  QLEASMHQGL EQQMPSFNLP SKILCKVINI QRRAPETDE VYAQITLLPE
101 LDQSEPTSPD APVQEPEKCT VHSFCKTLTA SDTSTHGGFS VLRRHADDCL
151 PPLDMSQOPP WQELVATDLH NSEWHFRHIF RGQPRRHLLT TGWSVFVSSK
201 KLVAGDAFIF LRGENEELRV GVRHRMQOT NIPSSVISSH SMHIGVLATA
251 AHAIITGTIF SVFYKPRTSR SEFIVSVNRY LEAKTQKLSV GMRFKMRFEG
301 EEAPEKRFSG TIVGVQENKS SVWHDSEWRS LKVQWDEPSS VFRPERVSPW
351 ELEPLVANST PSSQPQPQR NKRPRPPGLP SPATGPSGPV TPDGVWKSPA
401 DTPSSVPLFS PPAKAATFGH GGNKSFGVSI GSAFWPTNAD SAAESFASAF
451 NNESTEKKQT NGNVCRLFGF ELVENNVNDE CFSAAVSIGA VAVDQPVPSN
501 EFDGSGQQSEP LNINQSDIPS GSGDPEKSSL RSPQESQSRQ IRSCTKVHMQ
551 GSAVGRAIDL TRSECYEDLF KKLEEMFDIK GELLESTKKW QVVYTDDEDD
601 MMMVGGDPWN EFCGMVRKIF IYTPEEVKKL SPKNKLAVNA RMQLKADAE
651 NGNTEGRSSS MAGSR
```

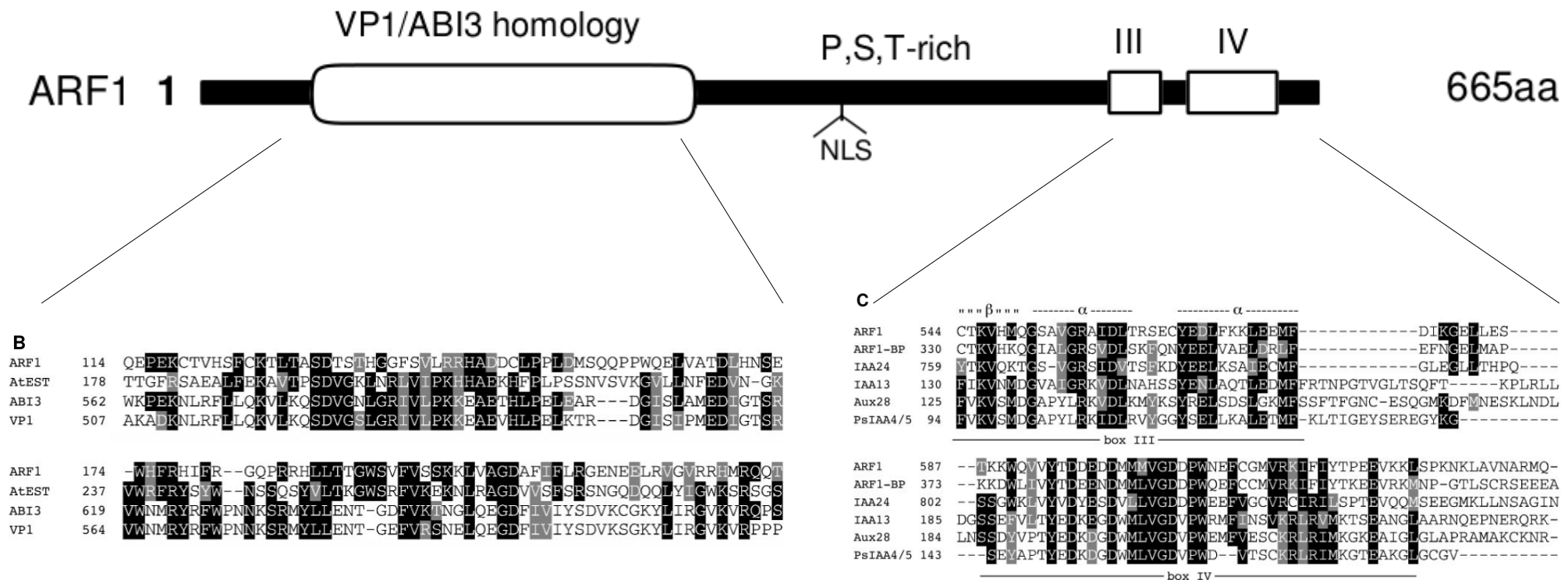
Homologe Bereiche:

VP1 (Mais), ABI 3  
(Arabidopsis)

NLS

Box III + IV  
in Aux/IAA Proteinen

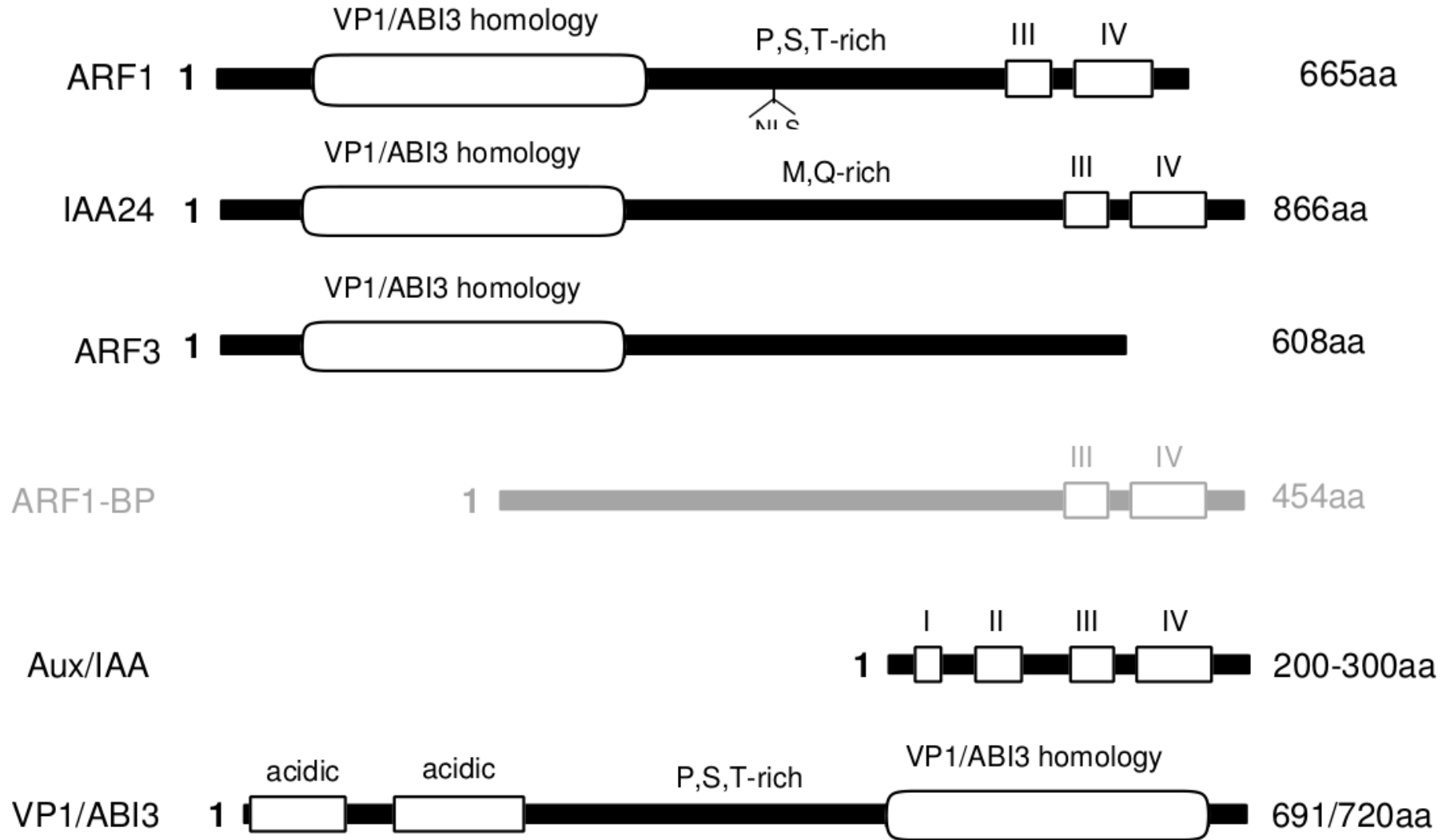
# was bisher geschah.....



Homology to maize and Arabidopsis transcription factors

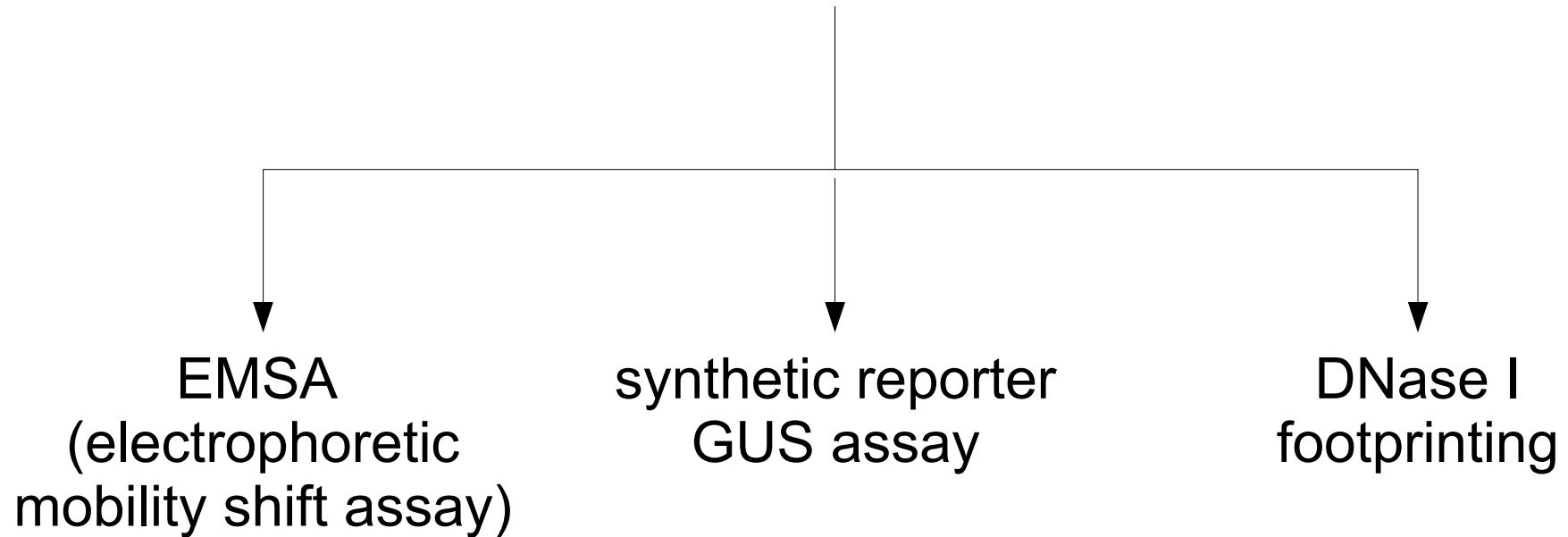
Homology to Aux/IAA domain III + IV  
→  $\beta\alpha\alpha$  structure of bacterial TFs

# was bisher geschah.....



# Bestätigung der ARF1 - AuxRE Interaktion

Fragen: Kann die Y1H Interaktion in unabhängigem System bestätigt werden?  
Ist die Bindung abhängig von der Struktur der AuxRE repeats?

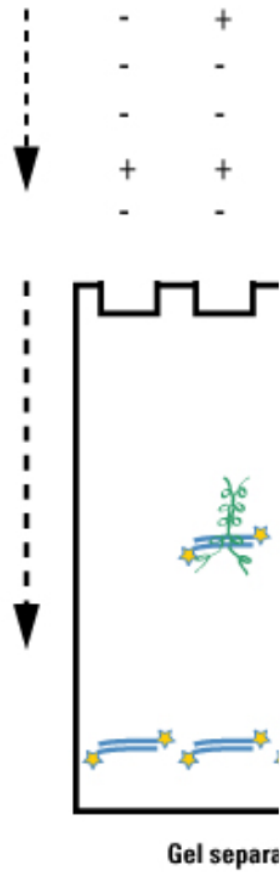


Alternative Methode: ChIP  
(chromatin immunoprecipitation)



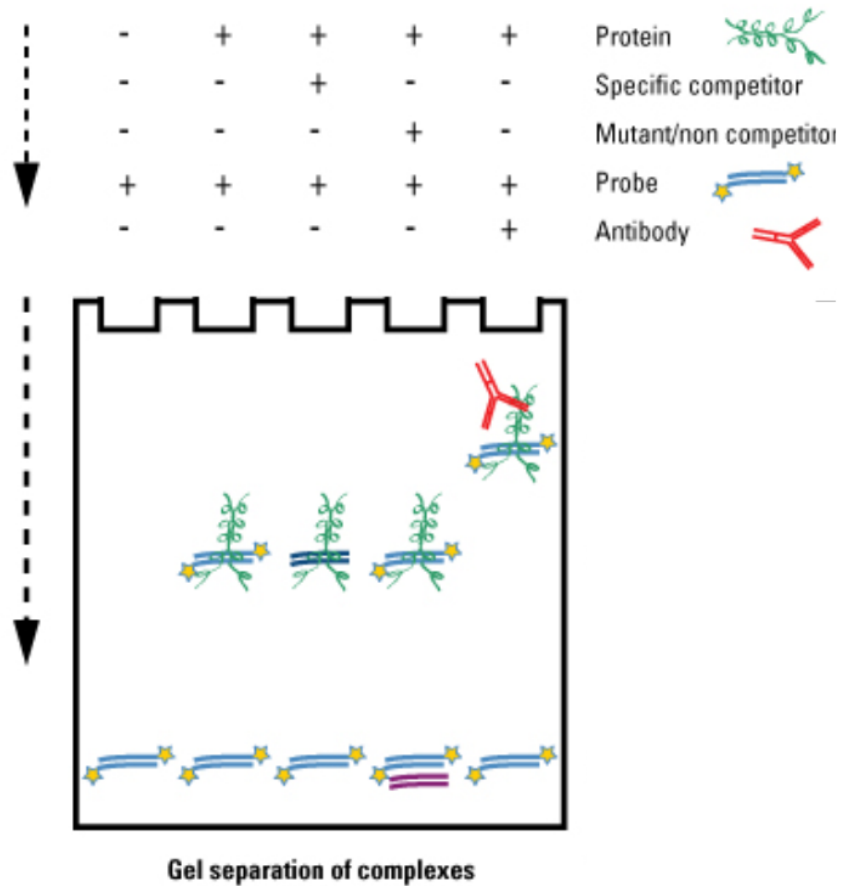
# EMSA

Prinzip: DNA Laufverhalten im Gel ändert sich wenn Protein gebunden ist



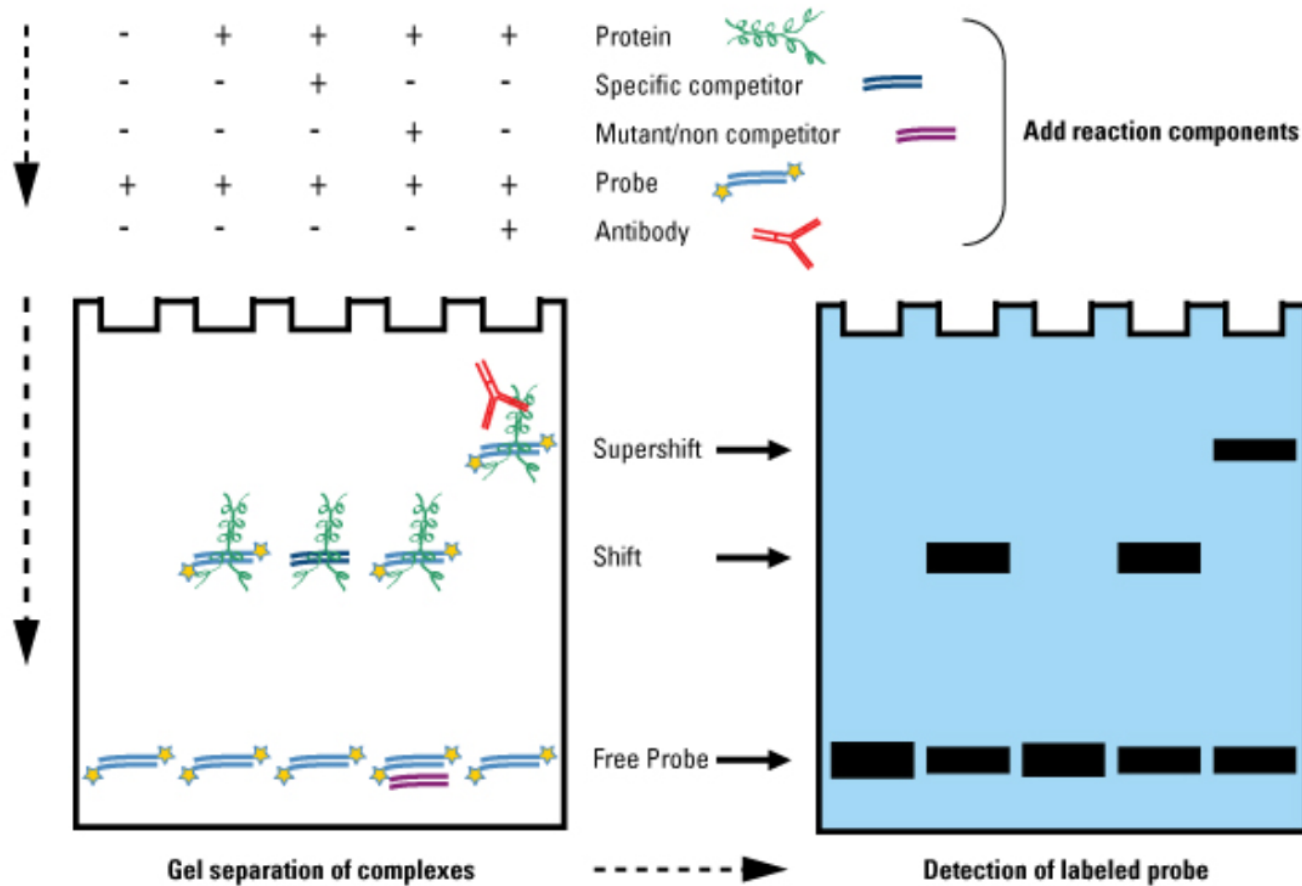
# EMSA

Prinzip: DNA Laufverhalten im Gel ändert sich wenn Protein gebunden ist

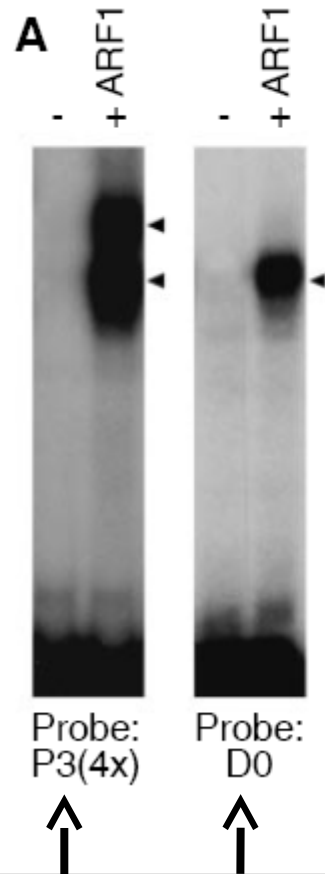


# EMSA

Prinzip: DNA Laufverhalten im Gel ändert sich wenn Protein gebunden ist



# EMSA: ARF1-AuxRe

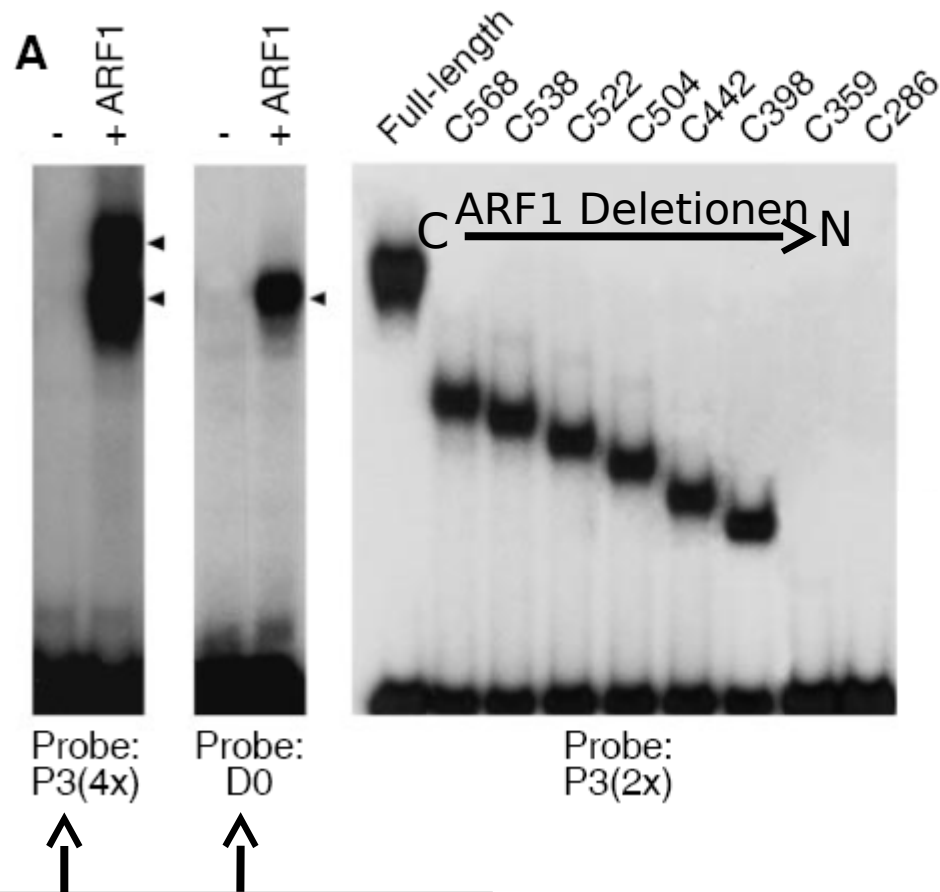


ARF1 wird von AuxRE  
gebunden  
Mit 4fachen Palindromen →  
unterschiedliche Komplexe

Welcher Teil des ARF1 ist für die Interaktion  
mit AuxRE verantwortlich?

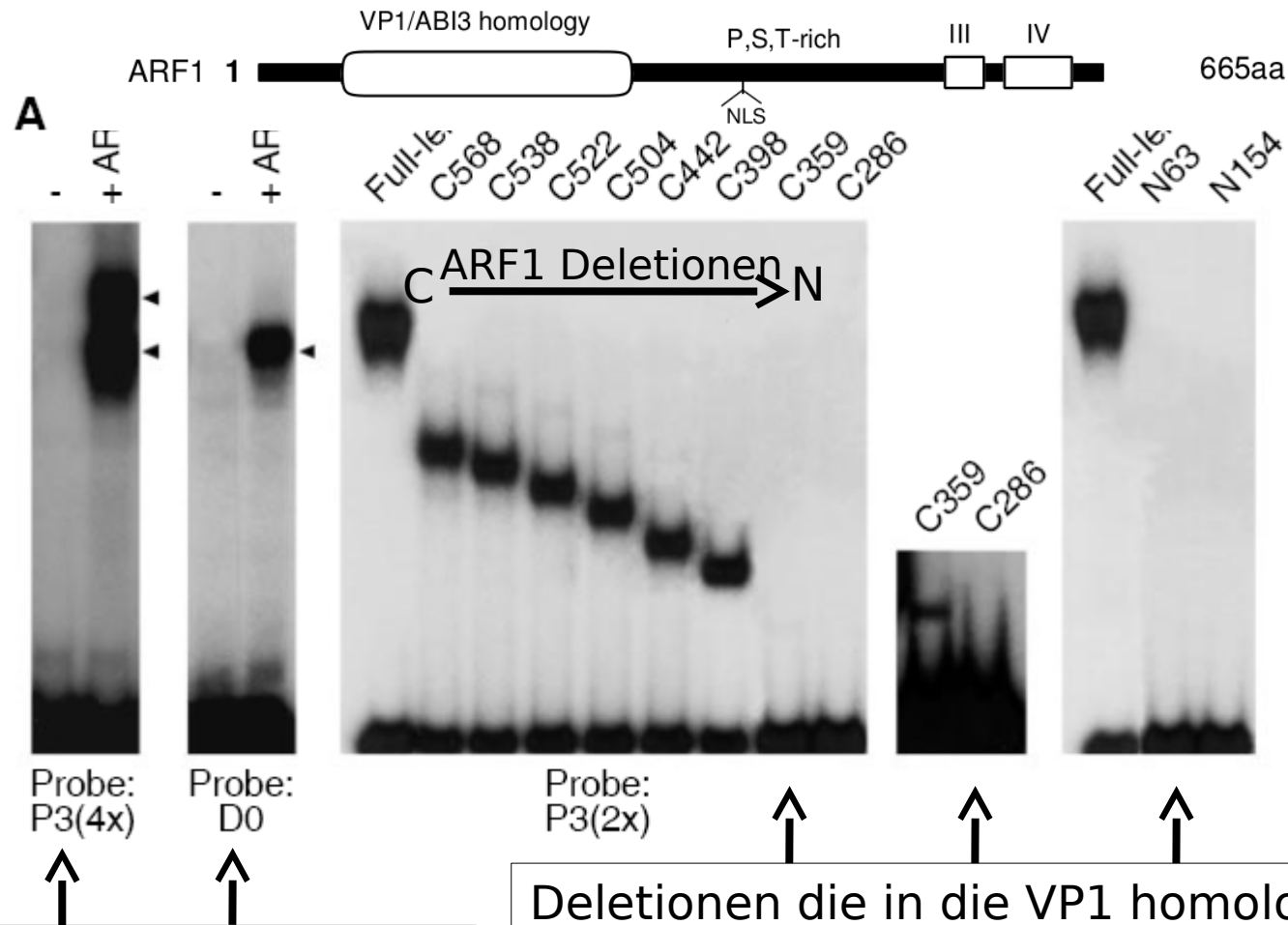
→ Proteindeletionen

# EMSA: ARF1-AuxRe



ARF1 wird von AuxRE  
gebunden  
Mit 4fachen Palindromen →  
unterschiedliche Komplexe

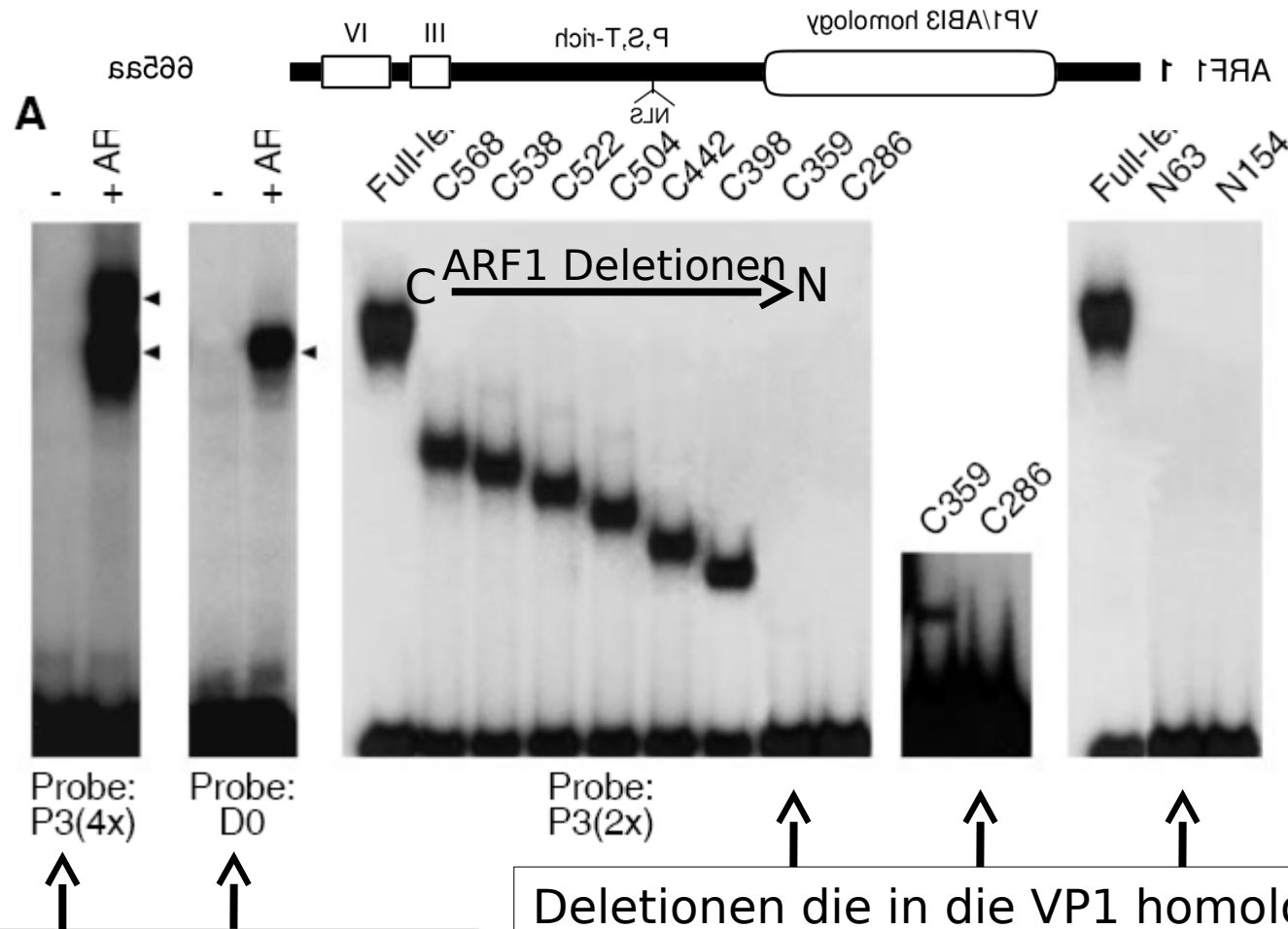
# EMSA: ARF1-AuxRe



ARF1 wird von AuxRE gebunden  
Mit 4fachen Palindromen = unterschiedliche Komplexe

Deletionen die in die VP1 homologe Region reichen (C286 bzw. N63 und N154) können kein P3(2x) mehr binden = DNA Bindedomäne liegt am N-terminus

# EMSA: ARF1-AuxRe



ARF1 wird von AuxRE gebunden  
Mit 4fachen Palindromen = unterschiedliche Komplexe

Deletionen die in die VP1 homologe Region reichen (C286 bzw. N63 und N154) können kein P3(2x) mehr binden = **DNA Bindedomäne liegt am N-terminus**

Welche Basen im P3(4x) Konstrukt sind essentiell für die Auxinantwort?

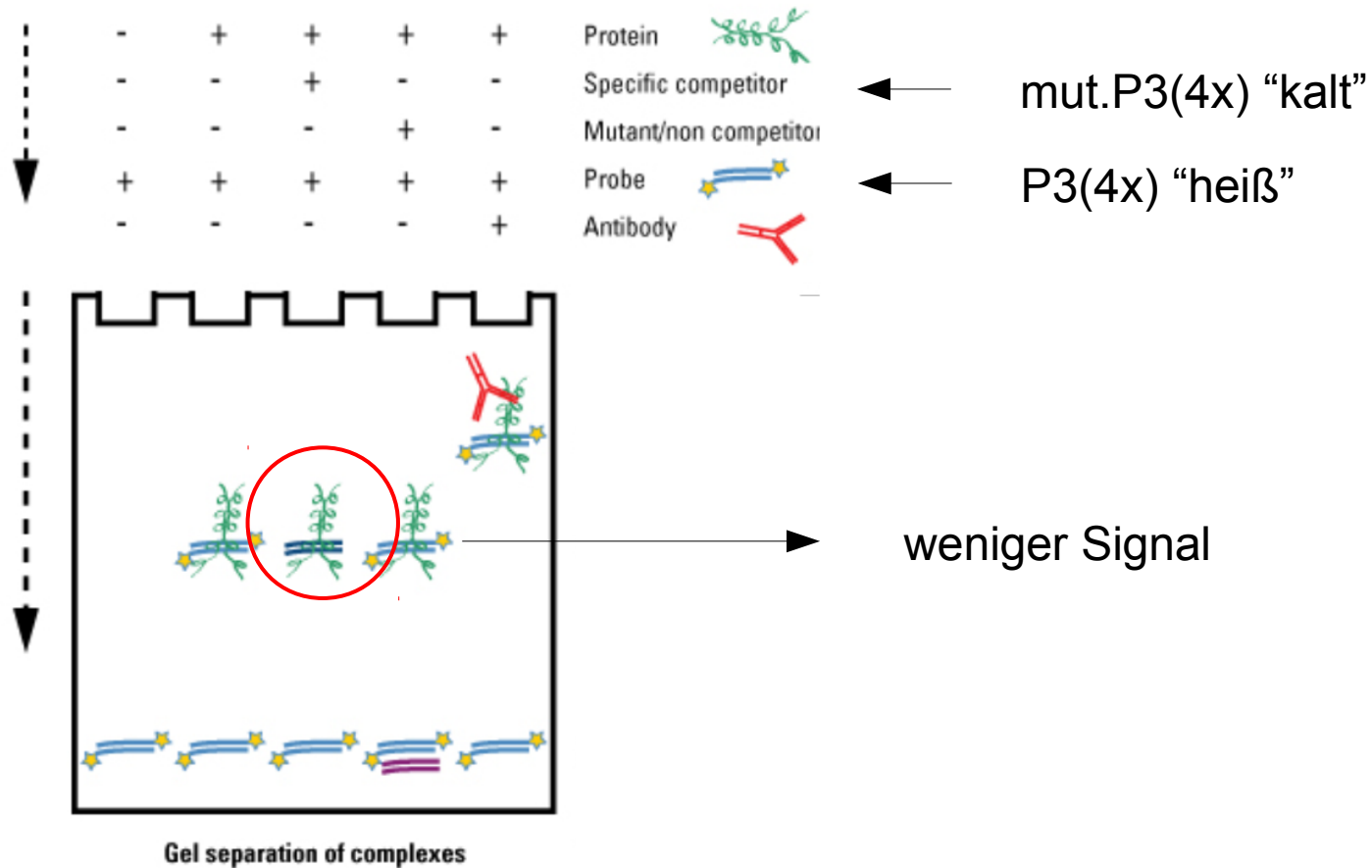


Competition assay und quantitativer GUS assay

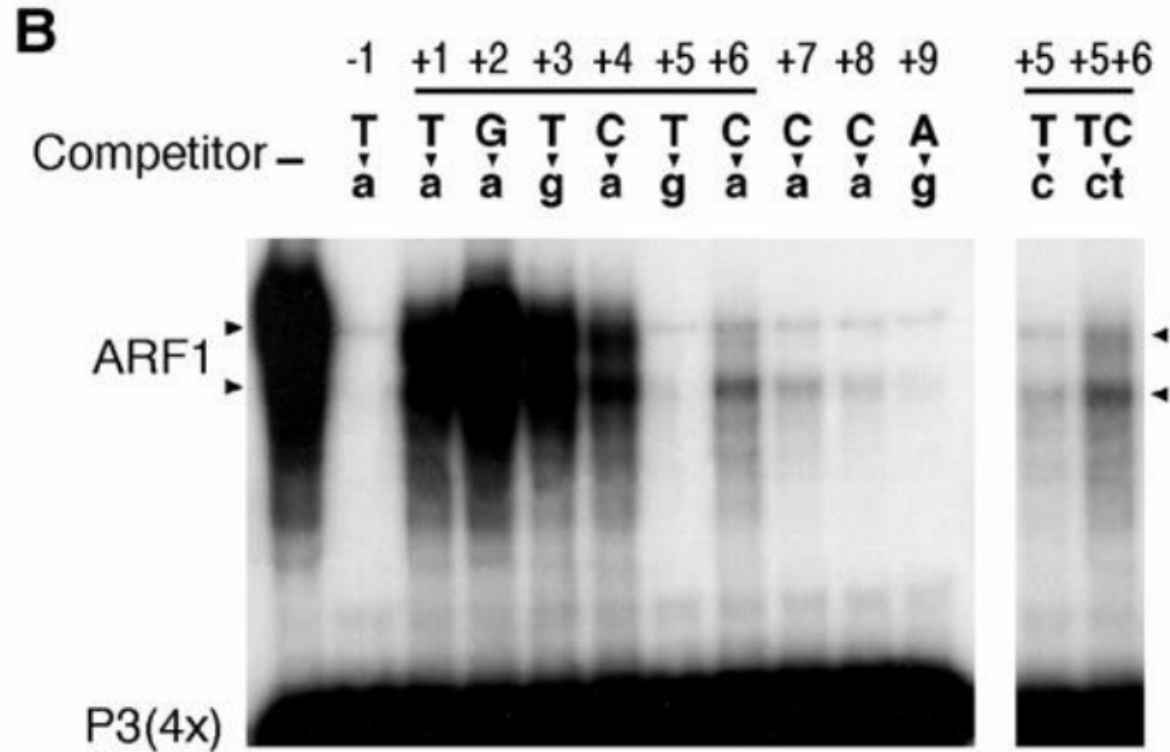


# EMSA - competition assay

Prinzip: DNA Laufverhalten im Gel ändert sich wenn Protein gebunden ist  
competition: wenn "kaltes" DNA target auch gebunden wird → weniger "heißes" Signal



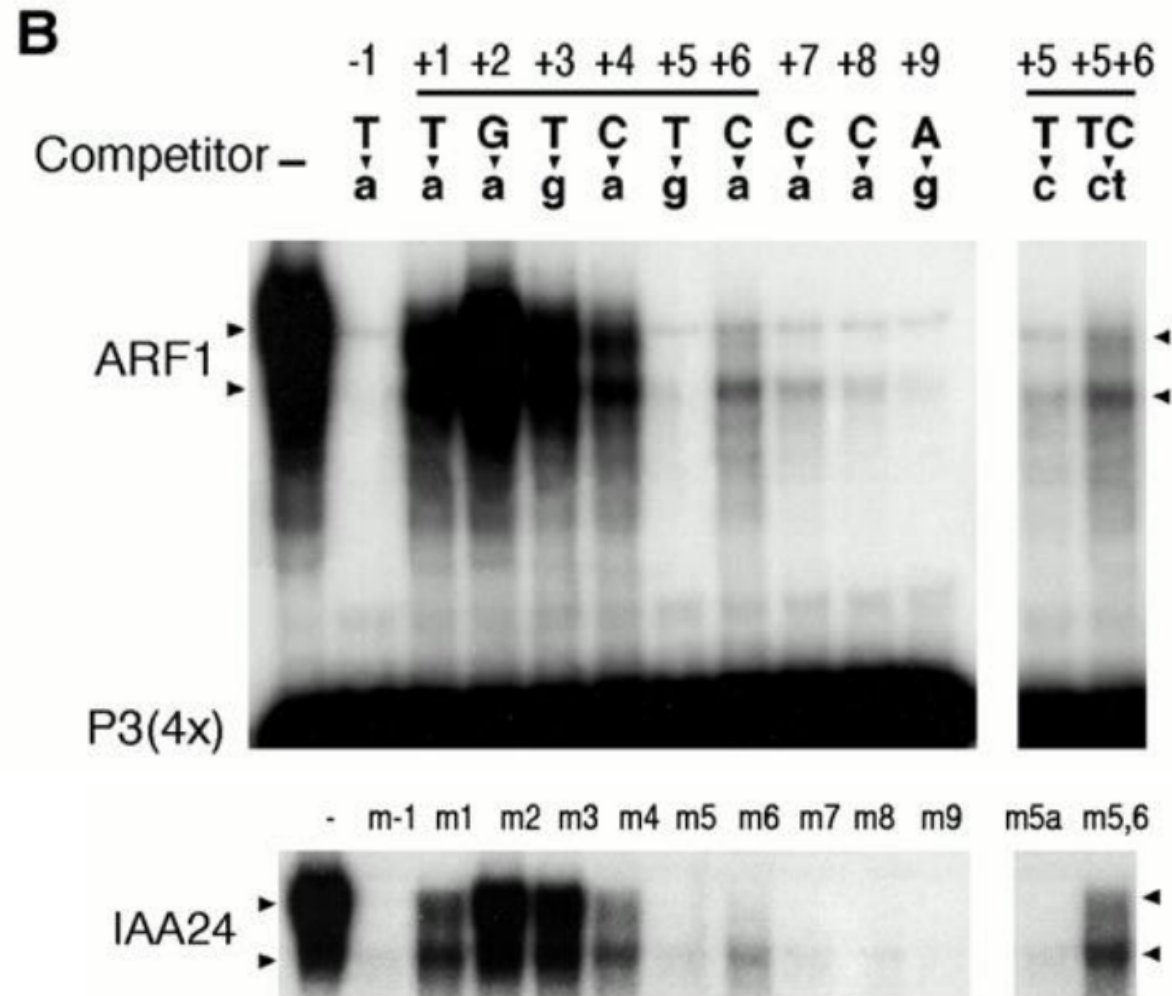
# EMSA: ARF1-AuxRe competition assay



Mutationen +1 bis +4  
→ keine Competition mit Sonde  
= essentiell für die Interaktion

Mutationen +5 bis +9  
→ Competition mit Sonde  
= weniger relevant für Interaktion

# EMSA: ARF1-AuxRe competition assay



Fazit: Bindspezifität von IAA24 ist identisch mit der von ARF1

Fehlt: Angaben zu Konzentrationen! Ladekontrollen?

Welche Basen im P3(4x) Konstrukt sind essentiell für die Auxinantwort?



Competition assay und **quantitativer GUS assay**

# AuxRE → weitere Charakterisierung

Frage: Welche Basen im Motif sind essentiell für die Auxininduktion?



# AuxRE → weitere Charakterisierung

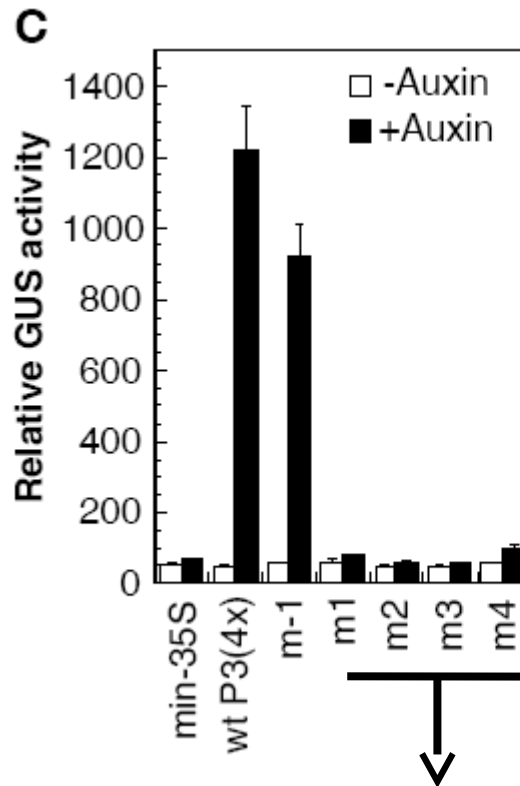
Frage: Welche Basen im Motif sind essentiell für die Auxininduktion?

-1 +1 +2 +3 +4 +5 +6 +7 +8 +9 +5 +5+6  
 T T G T C T C C C A T TC  
 a a a g a g a a a g c ct

+

*min*  
*pro*
*GUS*

→ Protoplasten



Bp 1-4 essentiell für die Bindung

# AuxRE → weitere Charakterisierung

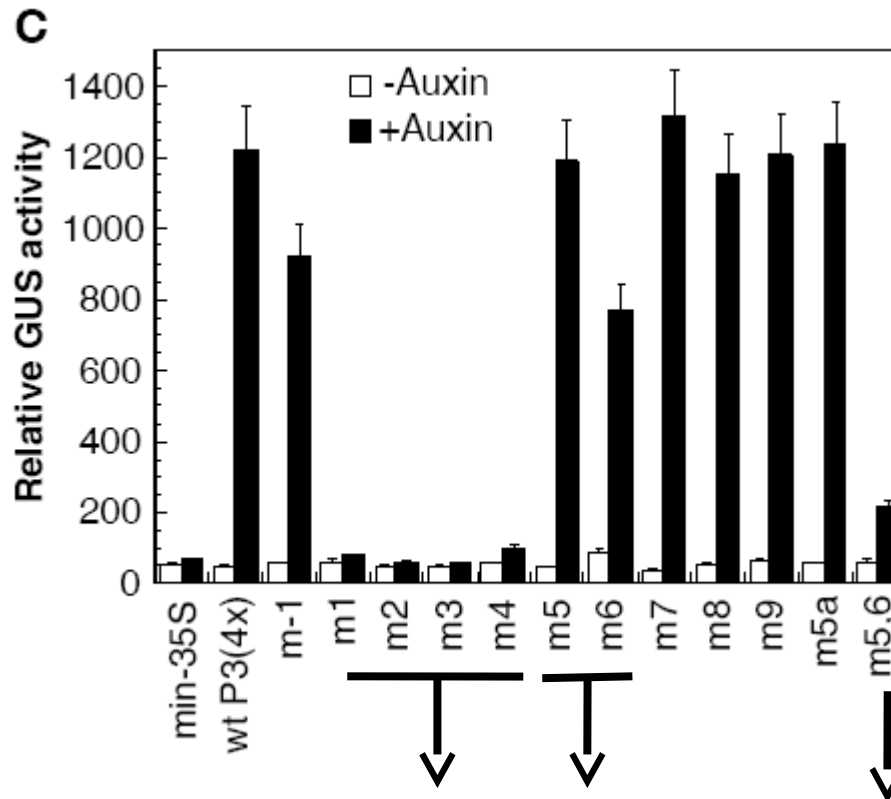
Frage: Welche Basen im Motif sind essentiell für die Auxininduktion?

-1 +1 +2 +3 +4 +5 +6 +7 +8 +9 +5 +5+6  
T T G T C T C C C A T TC  
a a a g a g a a a g c ct

+

*min*  
*pro* *GUS*

→ Protoplasten



Bp 1-4 essentiell für die Bindung

5 und 6 jeweils fakultativ, jedoch nicht beide gleichzeitig

# AuxRE → weitere Charakterisierung

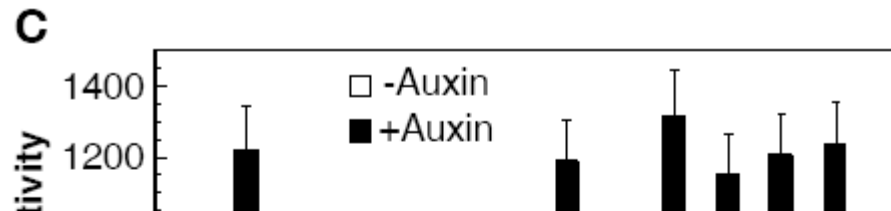
Frage: Welche Basen im Motif sind essentiell für die Auxininduktion?

-1 +1 +2 +3 +4 +5+6 +7 +8 +9 +5+5+6  
T T G T C T C C C A T TC  
a a a g a g a a a g c ct

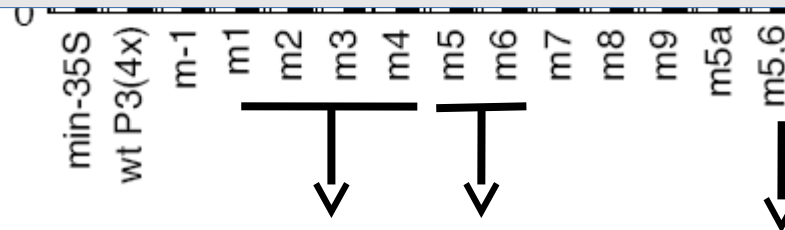
+

*min*  
*pro* *GUS*

→ Protoplasten



2 verschiedene Nachweismethoden mit gleichem Ergebnis! → vermutlich wahr!

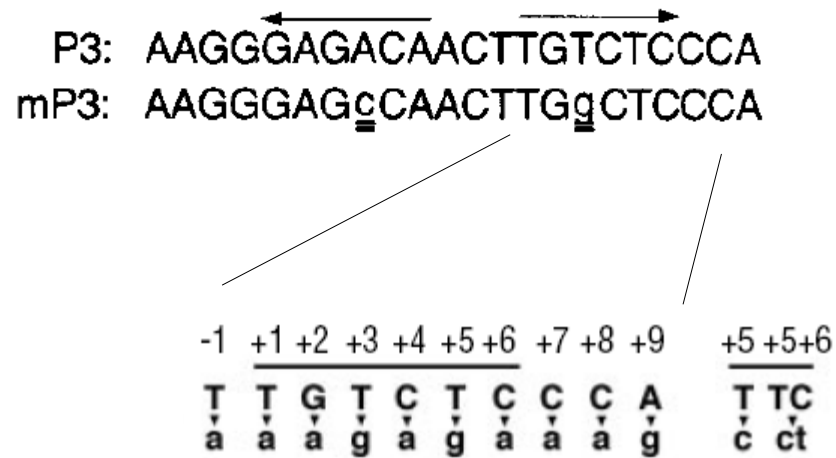


Bp 1-4 essentiell für die Bindung

5 und 6 jeweils fakultativ, jedoch nicht beide gleichzeitig



# Struktur des AuxREs



AuxRE:  
Palindrom  
4x besser als 1x

Basen tragen untersch. zur  
Stringenz der Interaktion mit ARF bei

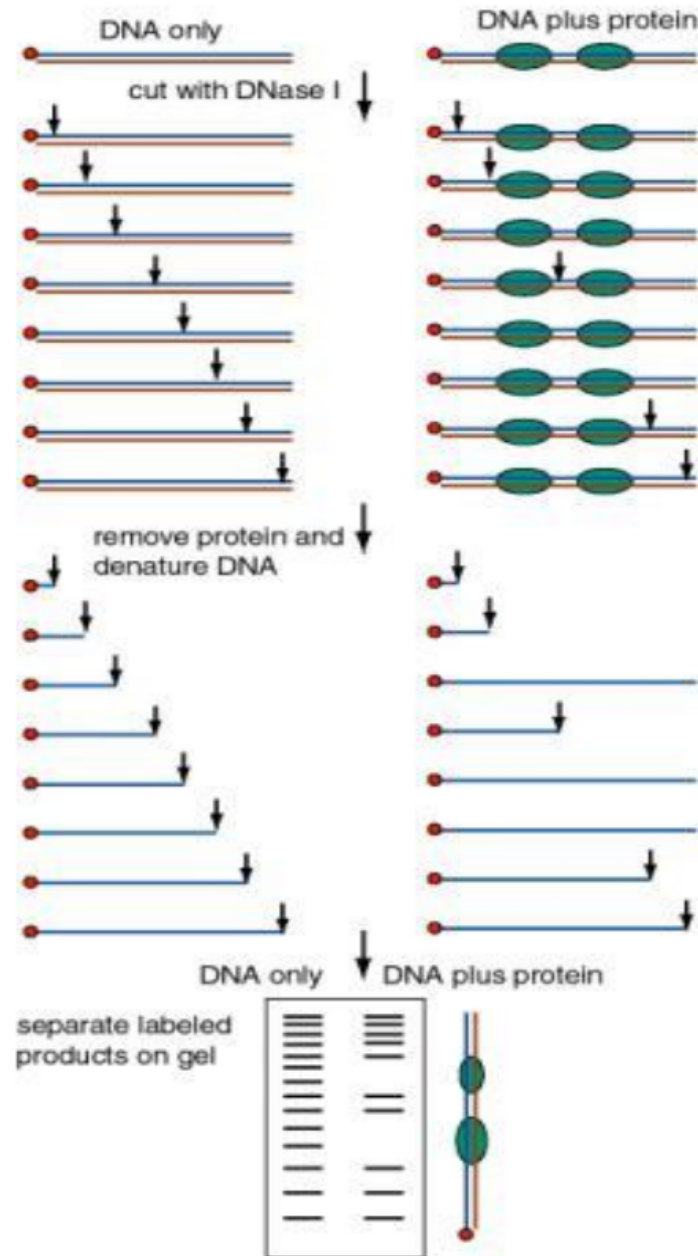
Ist die Struktur des Palindroms (e.g. Abstand zwischen Elementen) relevant?



DNaseI footprinting

# Struktur des AuxREs - DNase I footprinting

radioaktiv-markiertes template

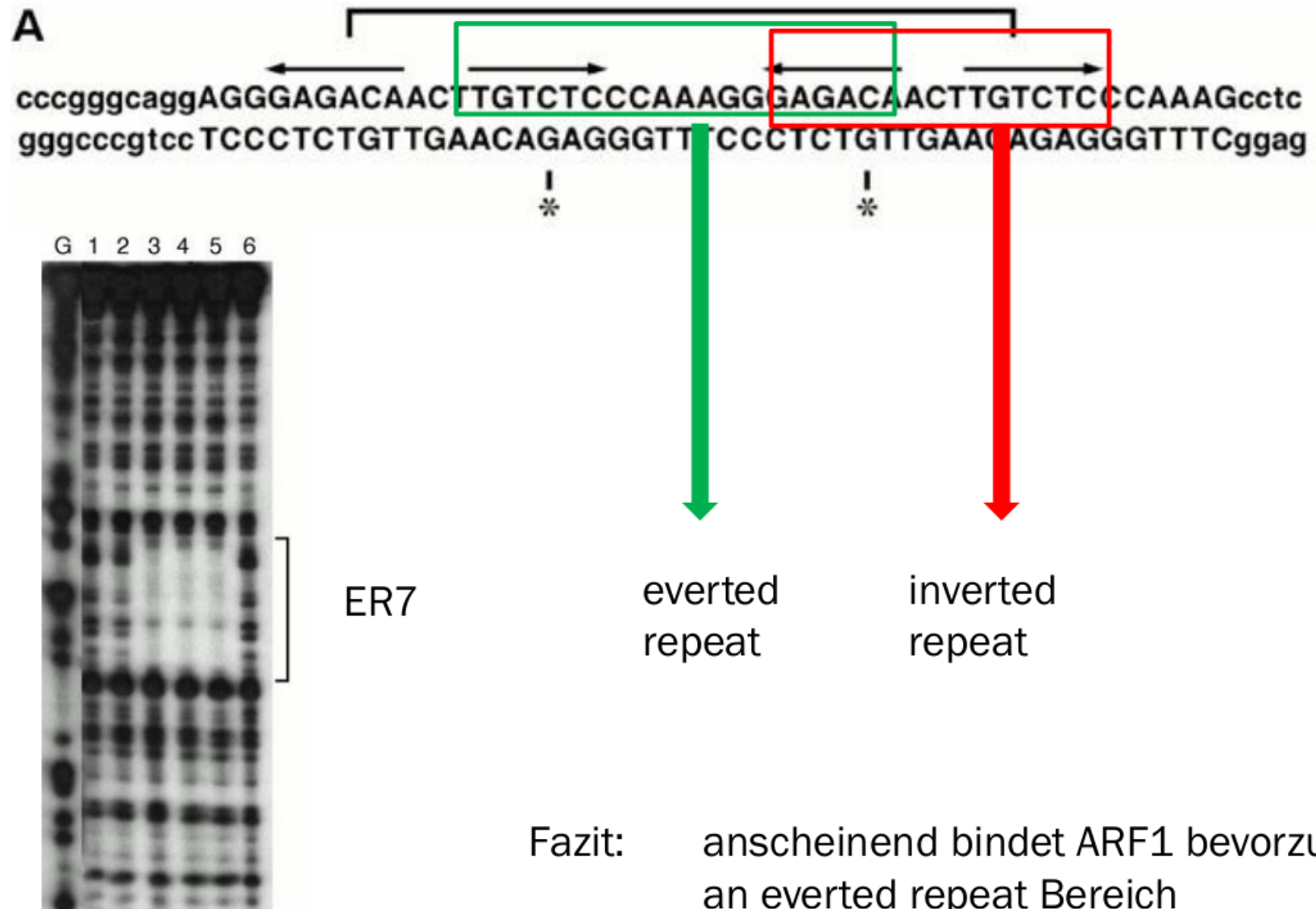


DNase I baut dsDNA ab

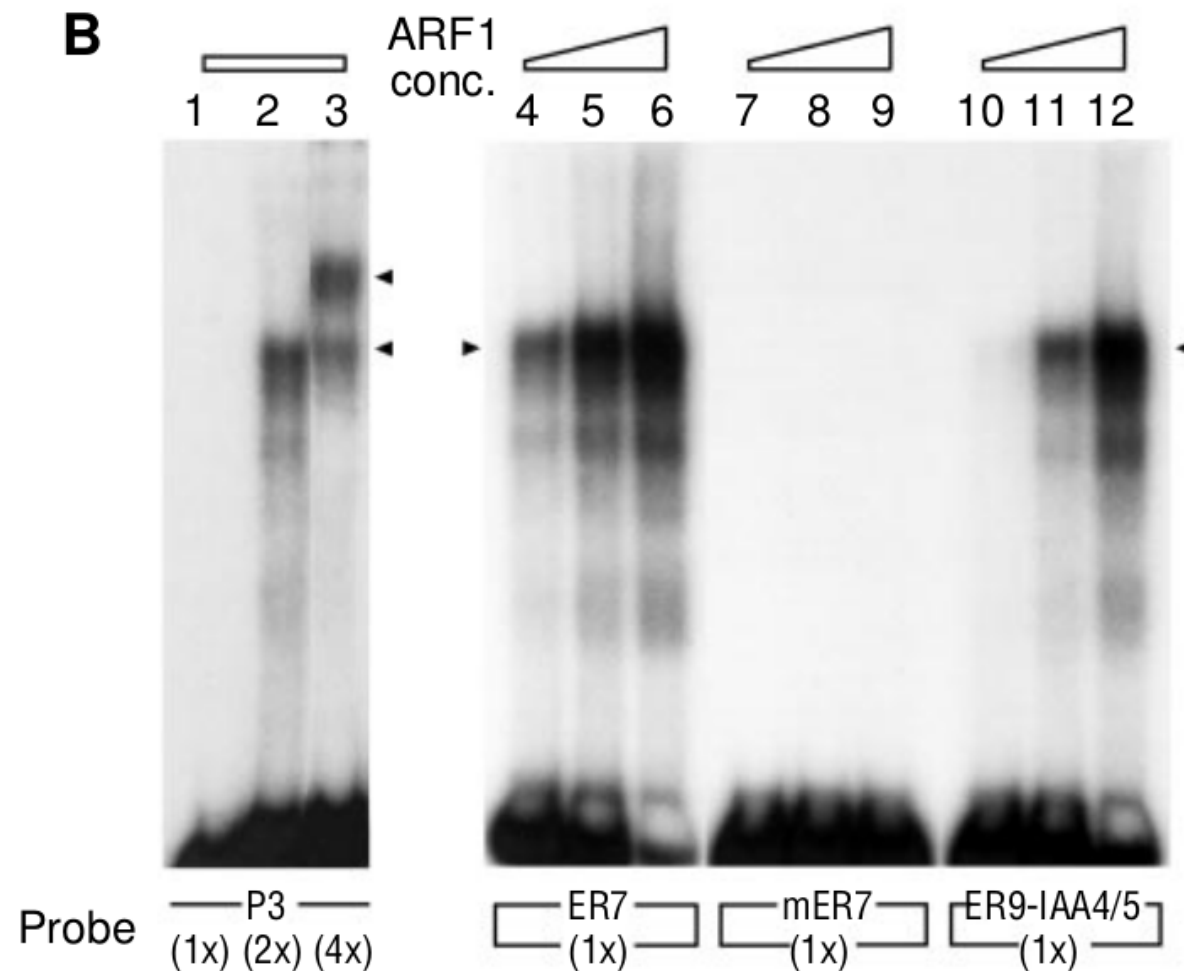
→ kann nicht schneiden wenn Proteine gebunden sind!

→ Werden als "blanks" in Sequenziergelen sichtbar

# Struktur des AuxREs - DNaseI footprinting



# EMSA: ARF1-AuxRe competition assay



Fazit:

1. Ein IR reicht nicht aus für Proteinbindung
2. Bindung erfolgt am ER
3. 2 ER können 2 ARF1 binden

|             |                                     |                            |
|-------------|-------------------------------------|----------------------------|
| P3:         | AAGGGAGACAACCTTGTCTCCA              | Inverted repeat            |
| ER7:        | CTTGTCTCCCAAAGGGAGACAA              | Everted repeat             |
| mER7:       | CTTGTCTCCCAAAGGGAGA <sub>1</sub> AA |                            |
| ER9-IAA4/5: | CTTGTCaCCCCTATAAGGAGACAA            | <i>PsIAA4/5</i> , Domain A |

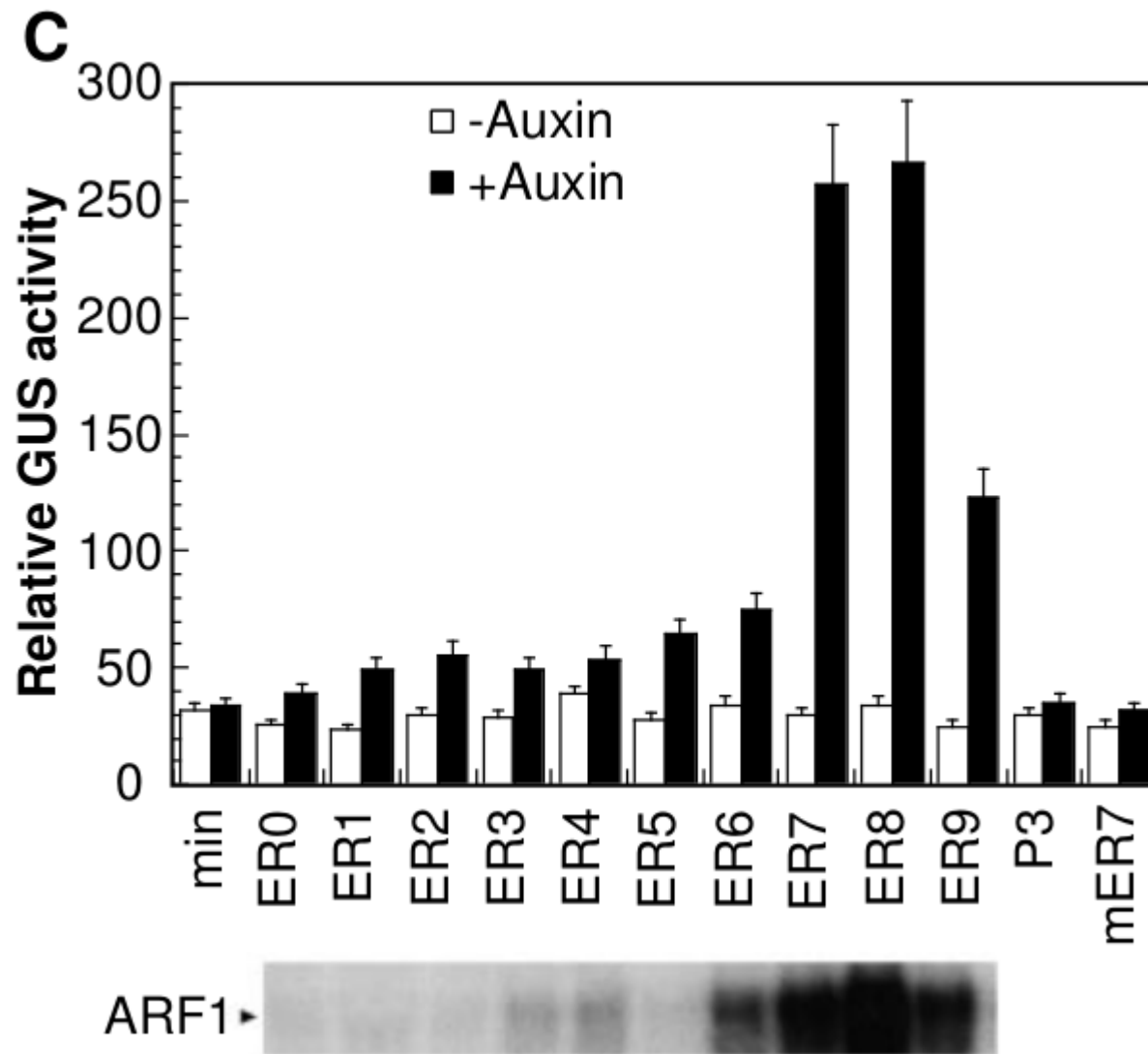
# EMSA: ARF1-AuxRe competition assay

Frage:

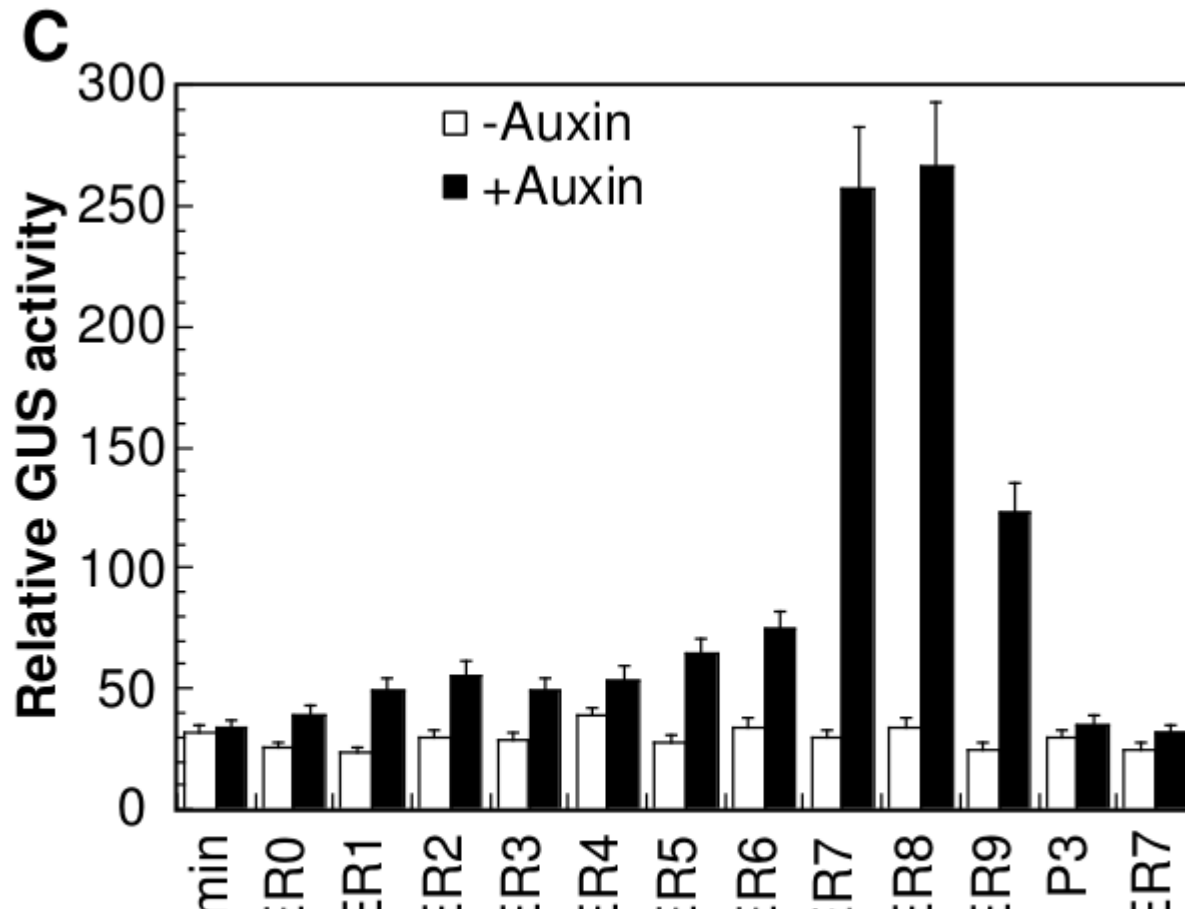
Ist der Basenabstand von Bedeutung ?

→ quantitativer GUS assay mit synthetischen Promotorkonstrukten

# EMSA: ARF1-AuxRe competition assay



# EMSA: ARF1-AuxRe competition assay

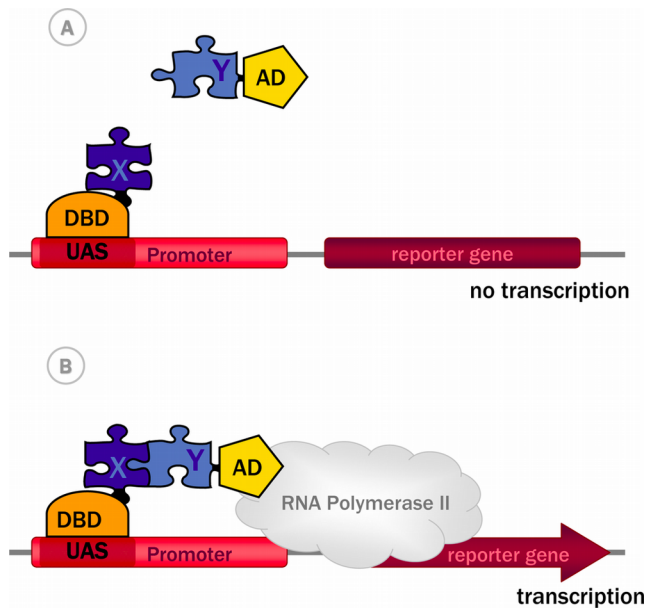


Wenn der Abstand der ER's 7 bis 8 Basen beträgt,  
ist die Auxin response am stärksten  
→ mögliche Dimerbildung?

# ARF1 - Multimerbildung?

## Yeast-2-Hybrid

ARF1 + DBD (DNA binding domain)  
y + AD (activation domain)



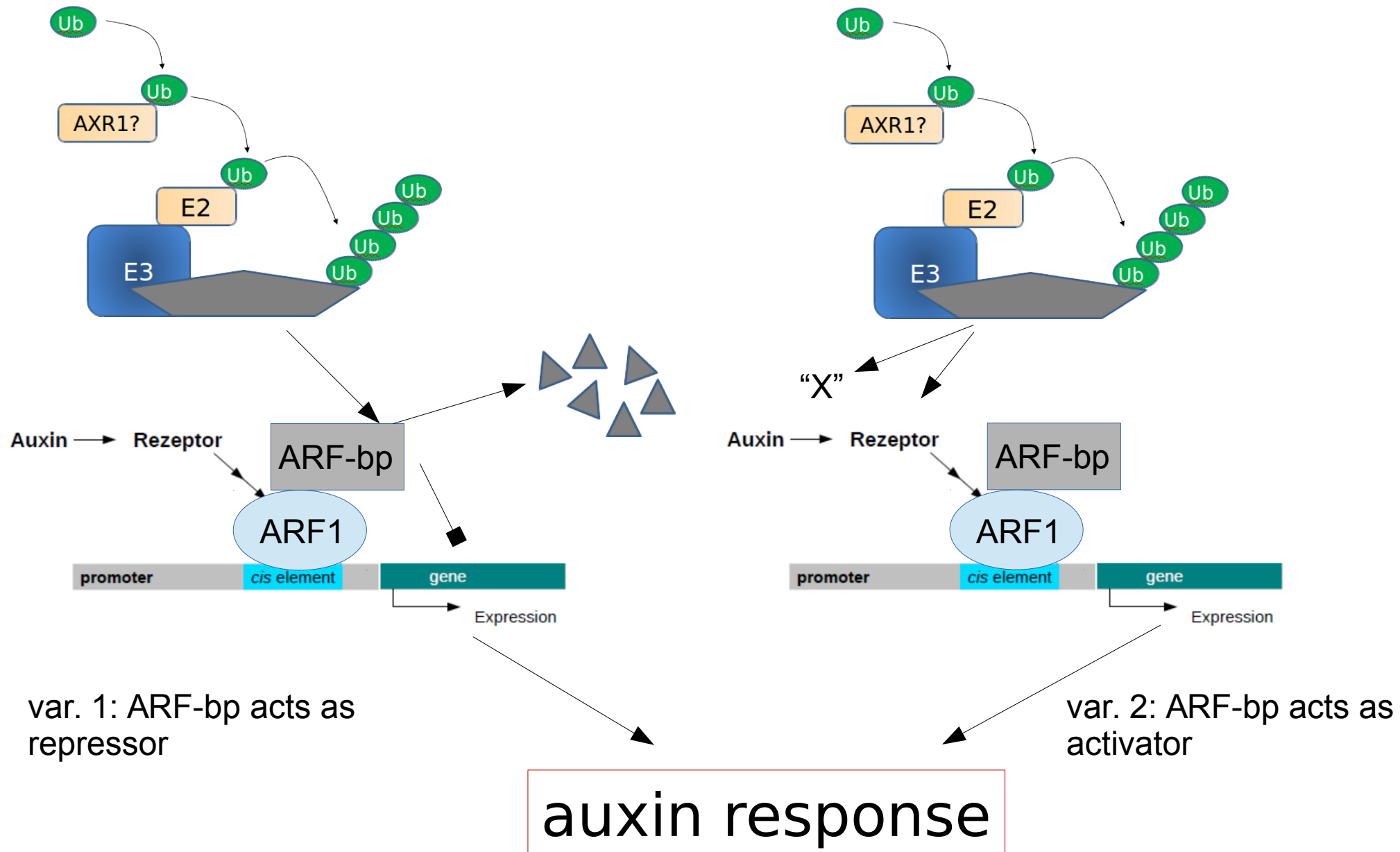
2 cDNAs →  
1 Protein mit Box III und IV → ARF1-BP



# Zusammenfassung

- Identifizierung und nähere Charakterisierung des Transkriptionsfaktors ARF1 → bindet AuxRE
- Nähere Strukturbestimmung der AuxREs (palindromischer Aufbau, +1 - +4 Nukleotide essentiell)
- Bindungsvoraussetzung für ARF1 sind ERs, 7-8bp Abstand
- Identifizierung des ARF1-BP (Sequenzhomologie Box III+IV)

# neues Modell



# nächste Woche:

## **The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p**

Max Ruegger, Elizabeth Dewey, William M. Gray, Lawrence Hobbie, Jocelyn Turner and Mark Estelle

*Genes & Dev.* 1998 12: 198-207

Access the most recent version at doi:[10.1101/gad.12.2.198](https://doi.org/10.1101/gad.12.2.198)

————▶ Christina Staudigl

# Hinweise zum Aufbau der Vorträge:

## Struktur:

1. Modell der letzten Woche
2. was bisher geschah.... (wenn nötig, Infos in Besprechung/Vorbereitung)
3. aktuelles paper + wesentliche Ziele
4. Vorstellen der Ergebnisse
  - 3 “c” Regeln beachten!
    - clear, concise, correct
    - context, content, conclusion!!!
  - Verwendete Methoden erklären
  - Kritikpunkte?
5. Zusammenfassung
6. neues Modell

# Hinweise zu Vorträgen allgemein:

## **Farbe:**

- VORSICHT!
- Vermeiden: gelbe, rote, hellgrüne Schrift (auf weiß)
- rot/grün-Schwächen beachten!

## **Animation:**

- VORSICHT!
- gut um Sachen nacheinander zu zeigen und den Focus beim aktuellen Objekt zu behalten
- “fancy effects” und verschiedene Effekte vermeiden!

## **Inhalt:**

- weniger ist mehr (→ clear + concise)
- I.d.R. nicht mehr als 5 Objekte/Folie
- Größe - 1m Regel beachten (auf Bildschirm in 1m Abstand lesbar?)

Objekte aus pdf Dateien einfügen: → pdf so groß wie möglich anzeigen lassen

## **Sonstiges:**

- frei sprechen (wenn möglich), Notizzettel sind OK
- Fragen stellen / Publikum einbeziehen
- @ alle: feedback geben