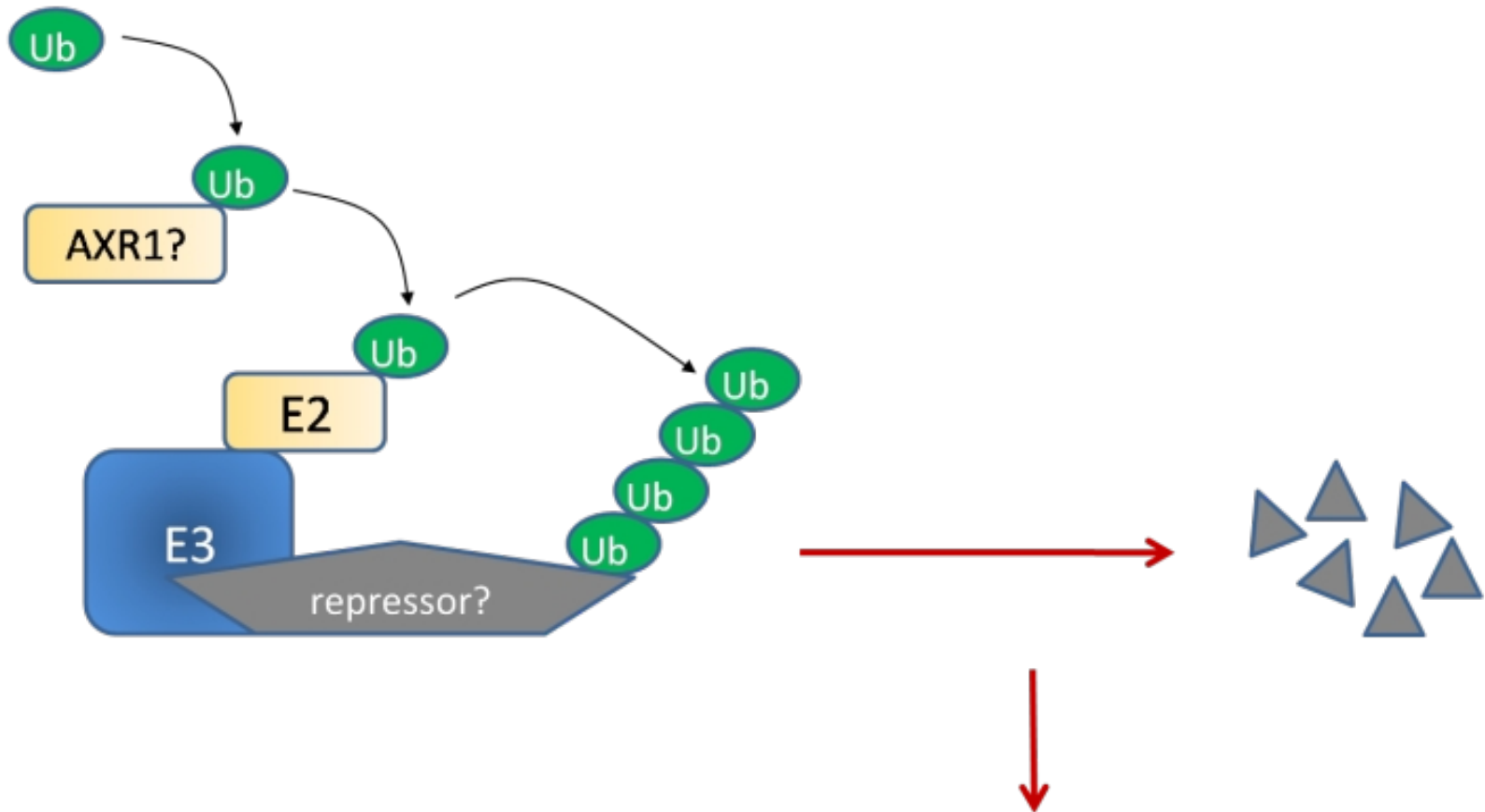


preliminary model



AXR1 similar to ubiquitin-activating enzyme E1

auxin response

Hintergründe

bis dahin bekannt (1993):

- schnelle Induktion der Zellelongation durch Auxin (~15-25 min)
 - transkriptionelle Induktion verschiedener Gene geht der phys. Reaktion voraus.
 - Hypothese: Auxin reguliert Zellelongation über Veränderung von Genexpressionsmustern
-
- Auxin-responsive Gene wurden in Erbse, Sojabohne und Arabidopsis identifiziert, die untereinander eine sehr hohe Homologie aufweisen und Kriterien als primäre Auxin-responsegene erfüllen:
 - Induktion der Expression schnell und spezifisch durch Auxin
 - Induktion erfordert keine *de novo* Proteinbiosynthese
 - erforderliche Signalelemente liegen bereits vor

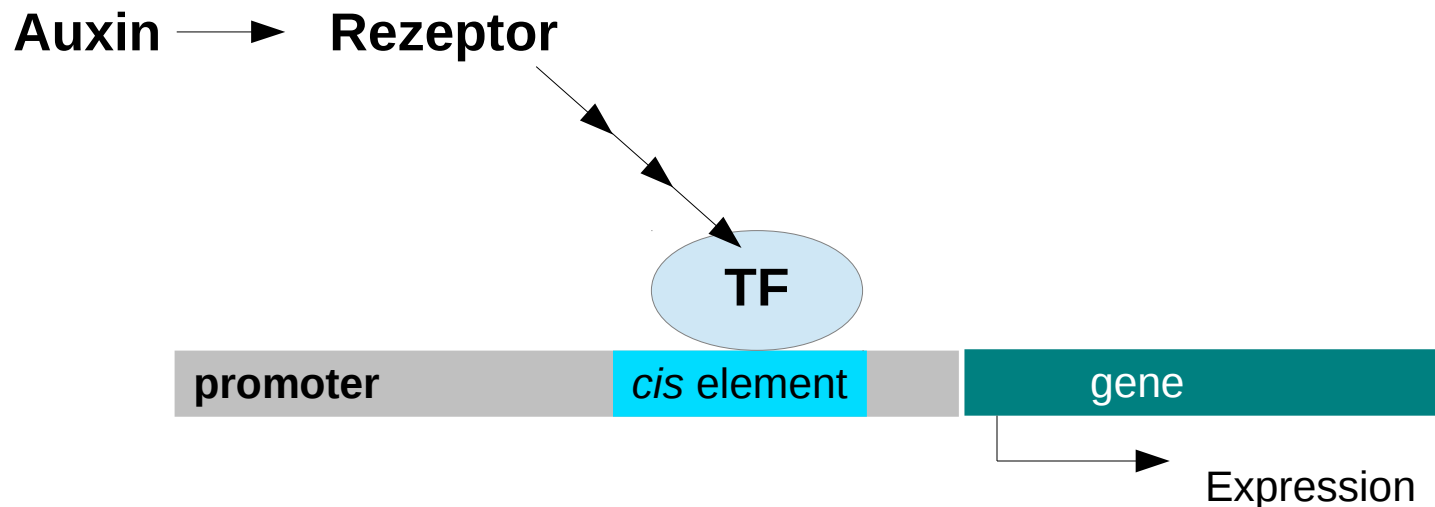
1. paper

J. Mol. Biol. (1993) 233, 580–596

Identification of the Auxin-responsive Element, *AuxRE*, in the Primary indoleacetic Acid-inducible Gene, *PS-IAA4/5*, of Pea (*Pisum sativum*)

Nurit Ballas†, Lu-Min Wong† and Athanasios Theologis†

Ziel: Identifizierung der Promotorsequenz, die für die Auxin response in Auxin-induzierbaren Genen verantwortlich ist = **Auxin Response Element (AuxRE)**



Voraussetzung:

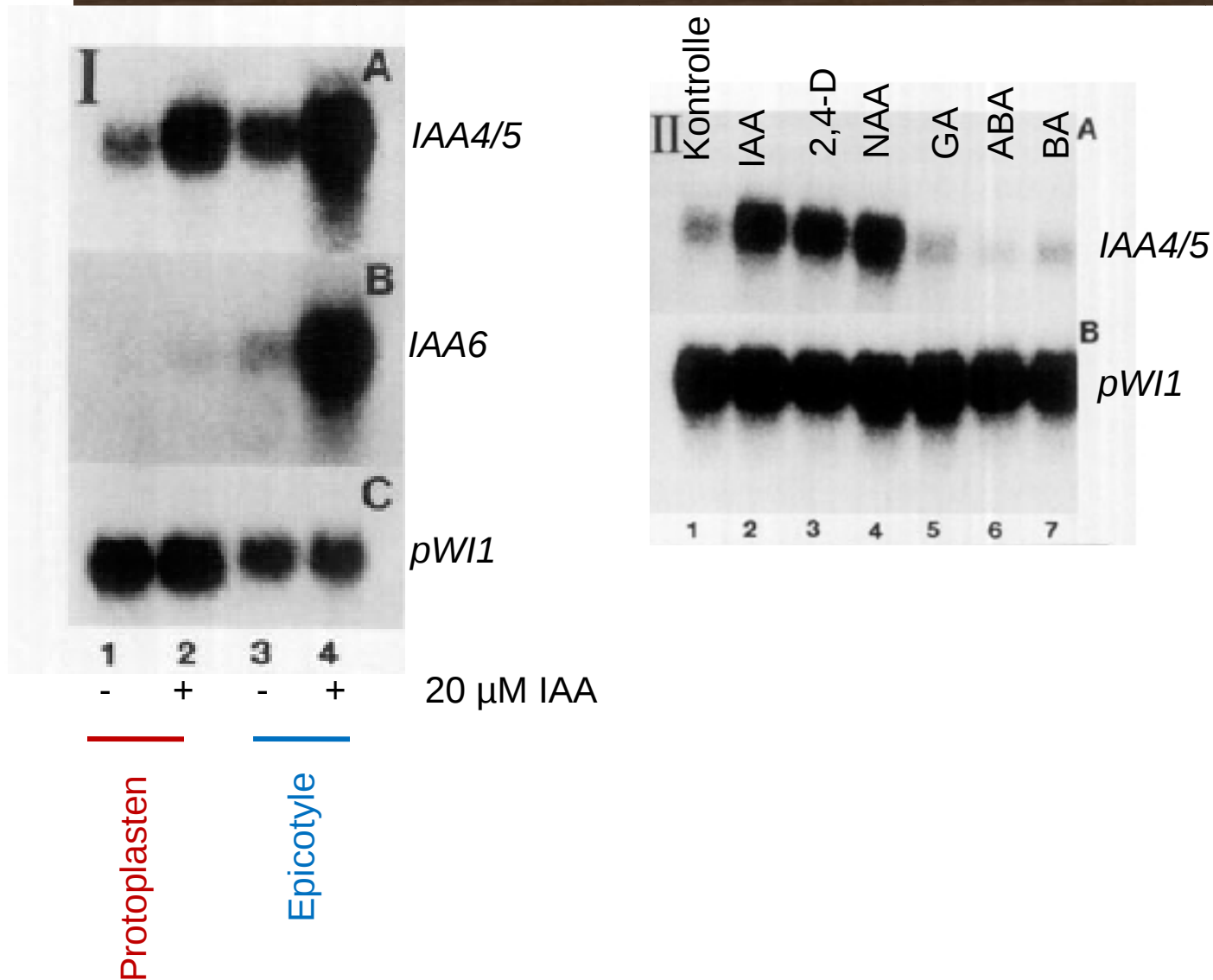
Etablierung eines Auxin-induzierbaren Protoplastensystems / Reportersystems

- ✓ Lokalisation des AuxRE erfordert das Testen vieler verschiedener (chimärer) Konstrukte
- ✓ **transiente Transfektion** mit Protoplasten
 - ✓ (leichter zugänglich für die Aufnahme von DNA-Konstrukten und Chemikalien als komplexe Gewebe)
 - ✓ **stabile Trafo** (aufwändig/ zeitintensiv/ funktioniert nicht mit jeder Pflanzenart gleich gut)

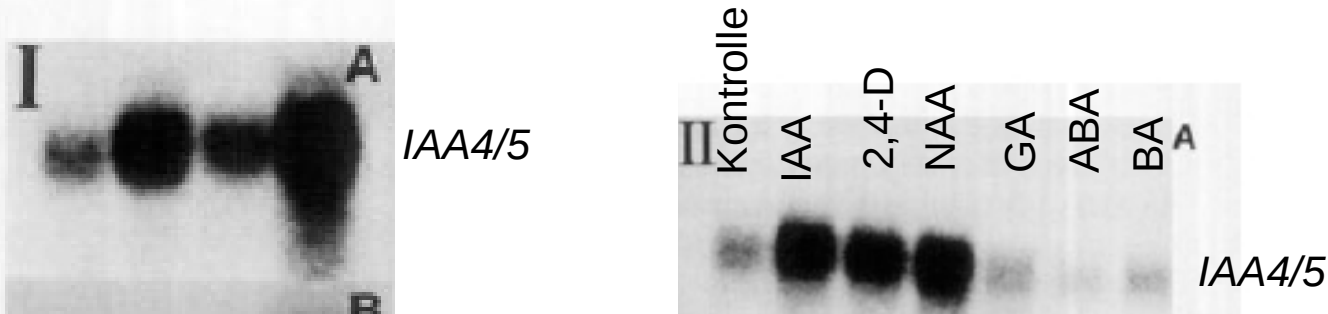
Notwendiger Test:

- ✓ Überprüfen ob sich die Protoplasten genauso verhalten wie intakte Keimlinge (Auxin response)

test protoplasts vs. epicotyls



test protoplasts vs. epicotyls



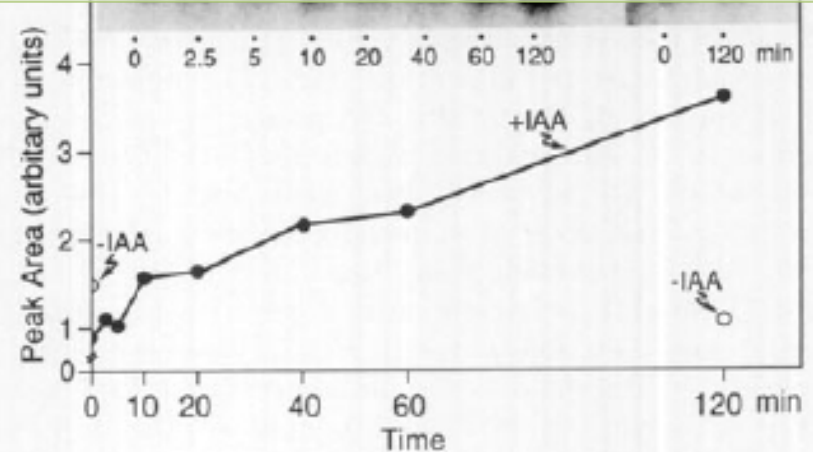
IAA4/5 Induktion in Protoplasten

- gleicht der in Epicotylen
- wird spezifisch durch Auxine induziert
- erfolgt schnell, Transkriptmenge akkumuliert in Abhäng. der Behandlungsdauer

- + - + 20 μM IAA

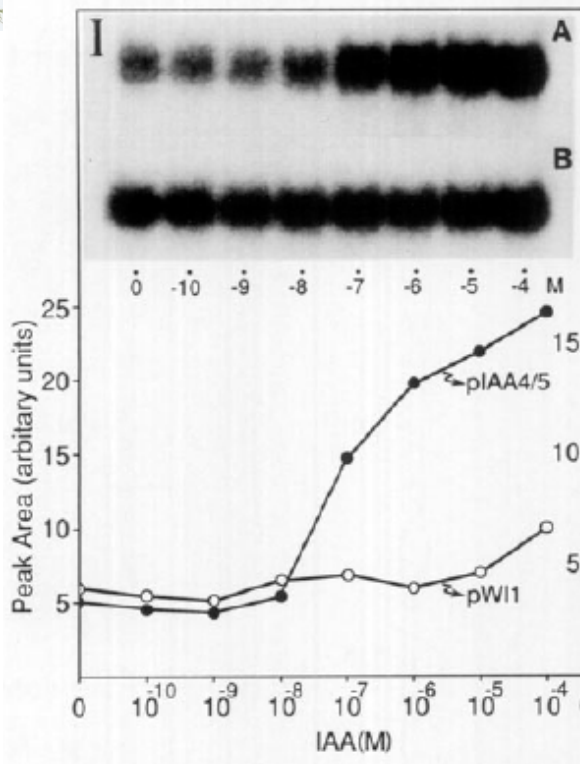
Protoplasten

Epicotyle





Konz. abhängigkeit



IAA4/5

pW11

Die Stärke der Expression von *IAA4/5* in Epicotylen ist abhängig von der Auxinkonzentration.

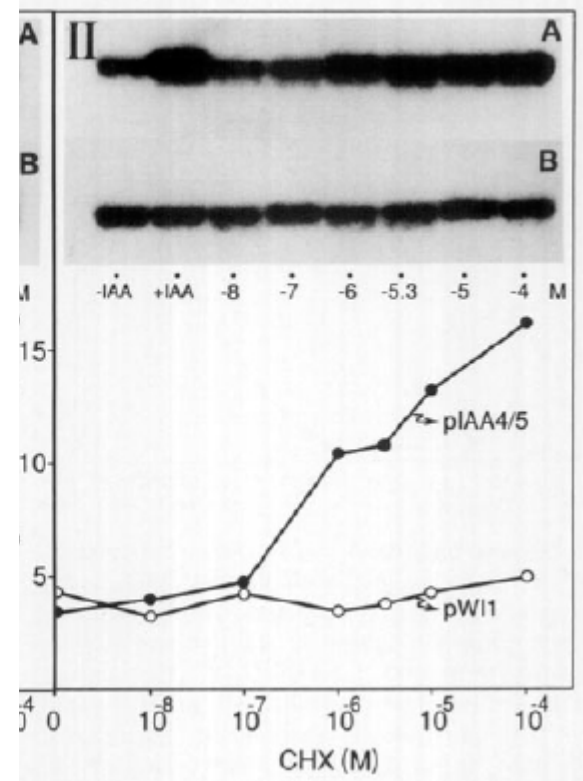
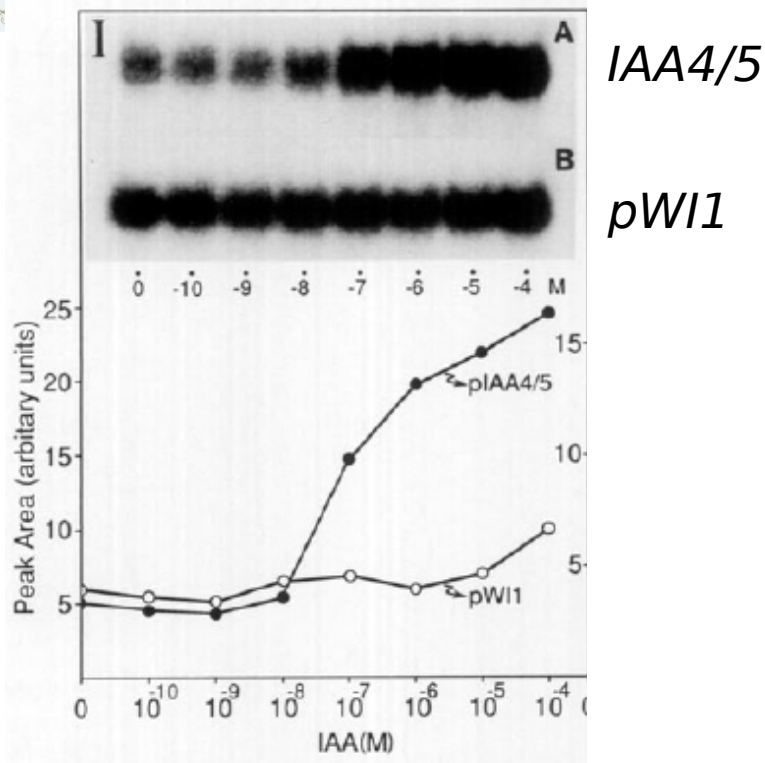
In Protoplasten auch?

IAA4/5 Expression

- nimm mit steigender Auxinkonz. zu



Konz. abhängigkeit



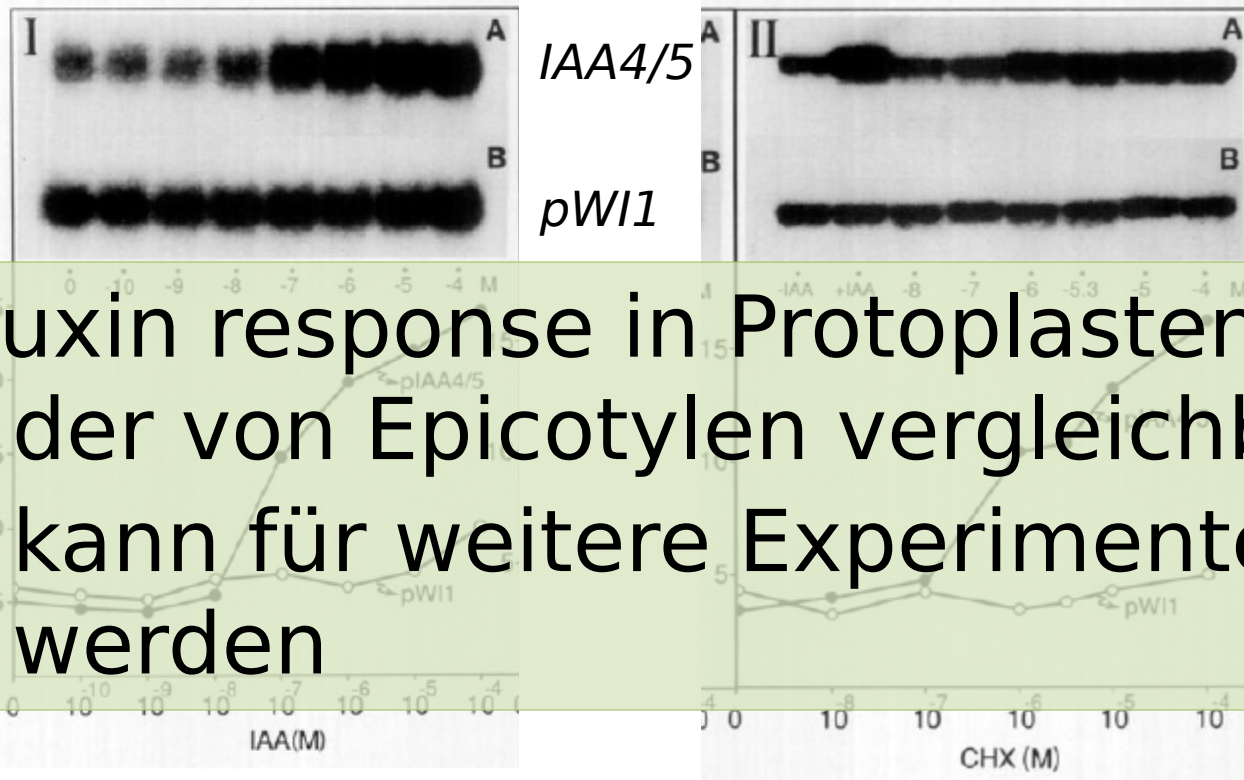
IAA4/5 Expression

- nimm mit steigender Auxinkonz. zu
- Inhibierung der Proteinbiosynthese aktiviert Expression auch in Abwesenheit von Auxin!

1. Signalelemente müssen nicht erst gebildet werden
2. fehlende Aktivierung im Grundzustand vermutlich durch Repressorproteine



Konz. abhängigkeit



Auxin response in Protoplasten ist mit der von Epicotylen vergleichbar
➤ kann für weitere Experimente genutzt werden

IAA4/5 Expression

- nimm mit steigender Auxinkonz. zu
- Inhibierung der Proteinbiosynthese aktiviert Expression auch in Abwesenheit von Auxin!

1. Signalelemente müssen nicht erst gebildet werden
2. fehlende Aktivierung im Grundzustand vermutlich durch Repressorproteine

Voraussetzung:

Etablierung eines Auxin-induzierbaren Protoplastensystems / Reportersystems

- ✓ Lokalisation des AuxRE erfordert das Testen vieler verschiedener (chimärer) Konstrukte
- ✓ **transiente Transfektion** mit Protoplasten
 - ✓ (leichter zugänglich für die Aufnahme von DNA-Konstrukten und Chemikalien als komplexe Gewebe)
 - ✓ **stabile Trafo** (aufwändig/ zeitintensiv/ funktioniert nicht mit jeder Pflanzenart gleich gut)

Notwendiger Test:



- ✓ Überprüfen ob sich die Protoplasten genauso verhalten wie intakte Keimlinge (Auxin response)

Voraussetzung:

Etablierung eines Auxin-induzierbaren Protoplastensystems / Reportersystems

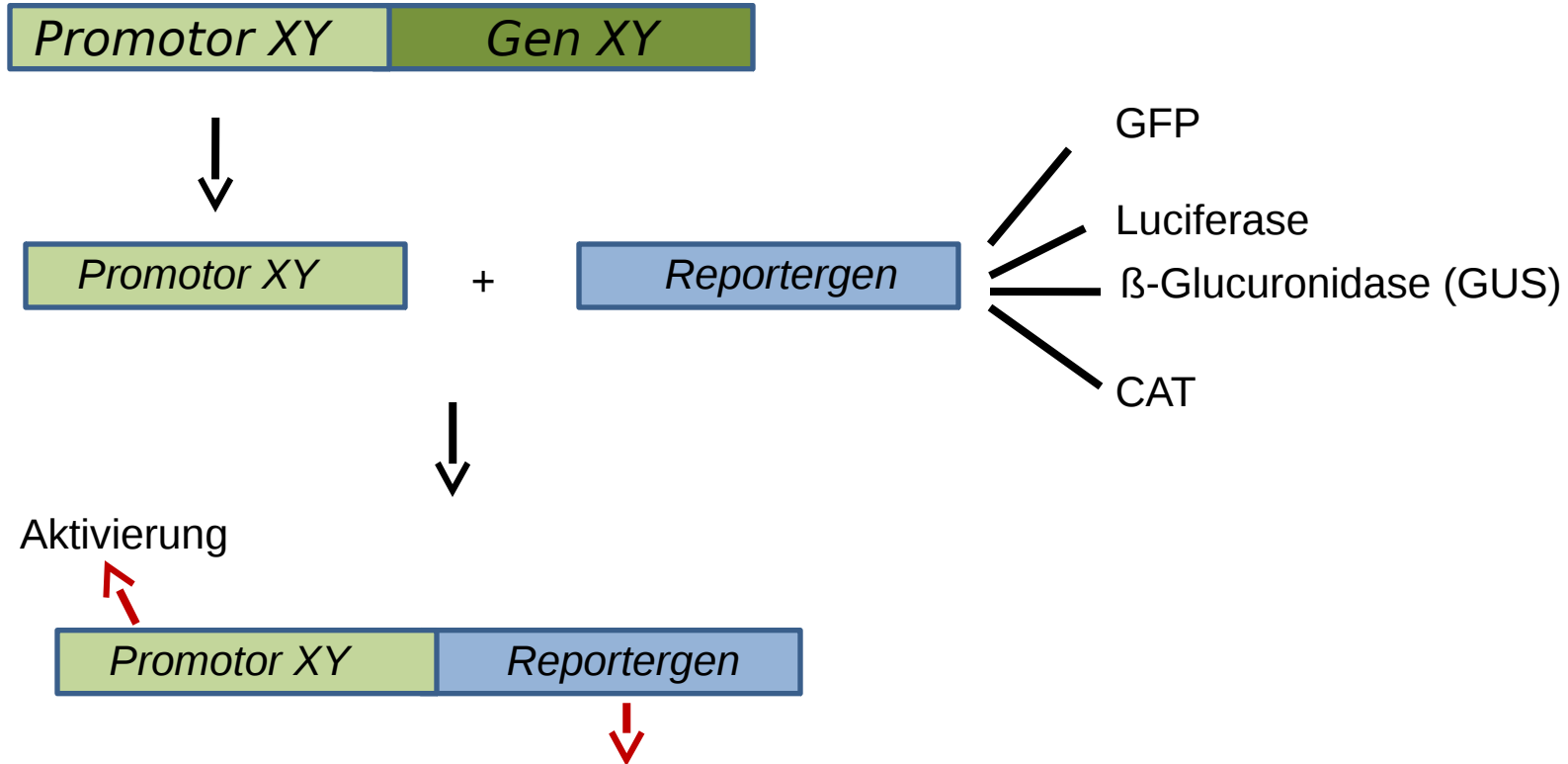
- ✓ Lokalisation des AuxRE erfordert das Testen vieler verschiedener (chimärer) Konstrukte
- ✓ **transiente Transfektion** mit Protoplasten
 - ✓ (leichter zugänglich für die Aufnahme von DNA-Konstrukten und Chemikalien als komplexe Gewebe)
 - ✓ **stabile Trafo** (aufwändig/ zeitintensiv/ funktioniert nicht mit jeder Pflanzenart gleich gut)

Notwendiger Test:

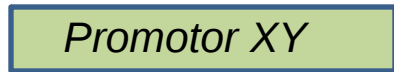


- ✓ Überprüfen ob sich die Protoplasten genauso verhalten wie intakte Keimlinge (Auxin response)

Transkriptionelle Fusion (chimäre Konstrukte)



Transkriptionelle Fusion (chimäre Konstrukte)



+



GFP

Luciferase

β -Glucuronidase (GUS)

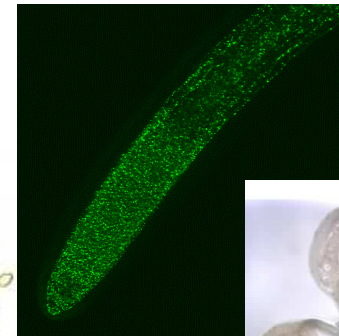
CAT



Aktivierung



Nachweis der mRNA

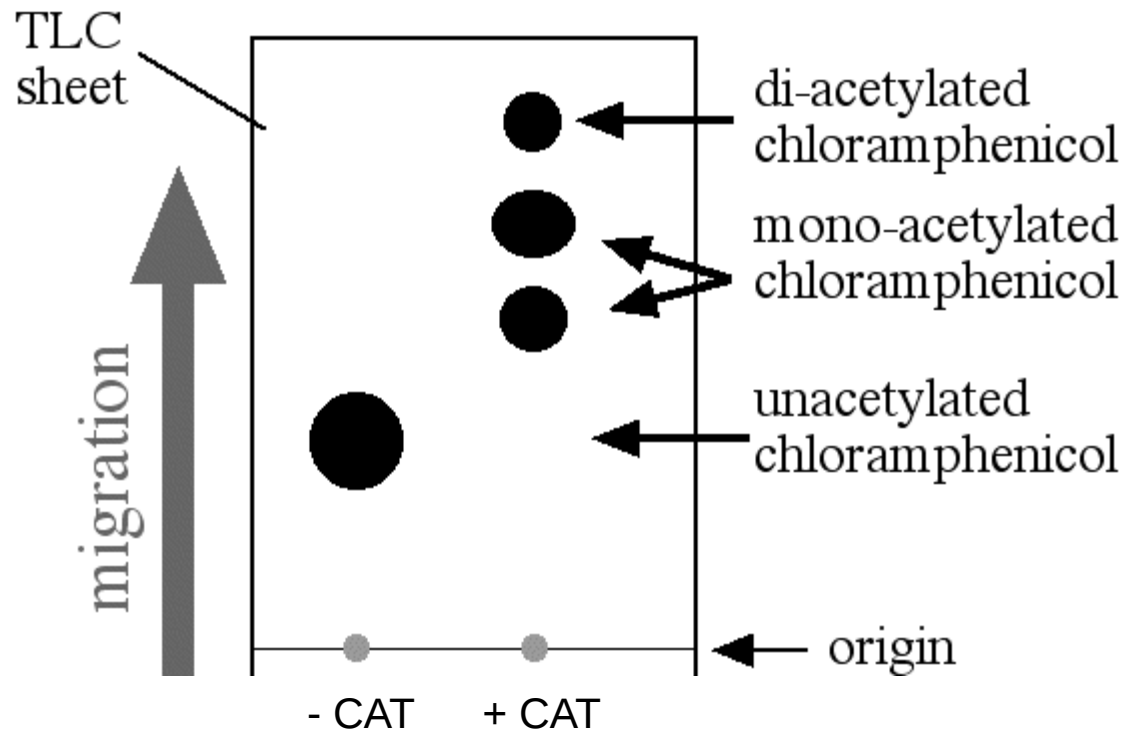


Nachweis der Proteinaktivität

CAT reporter system

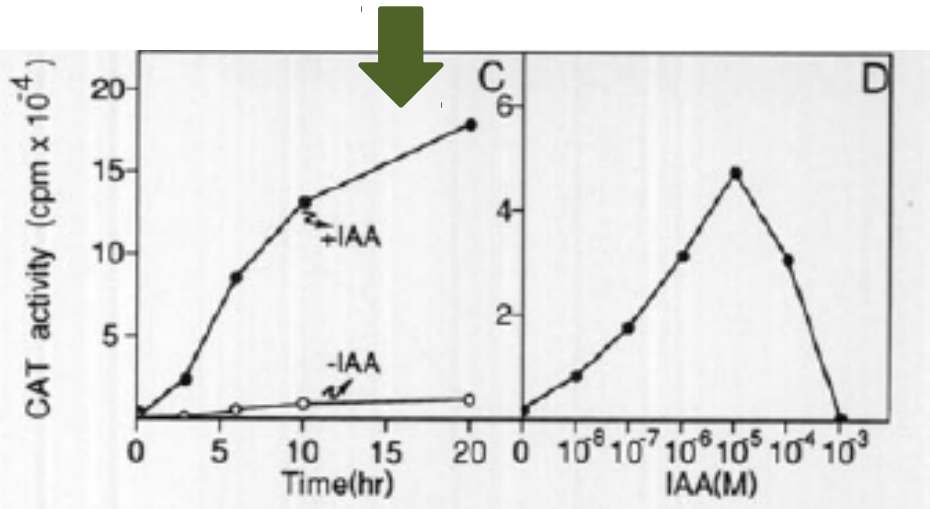
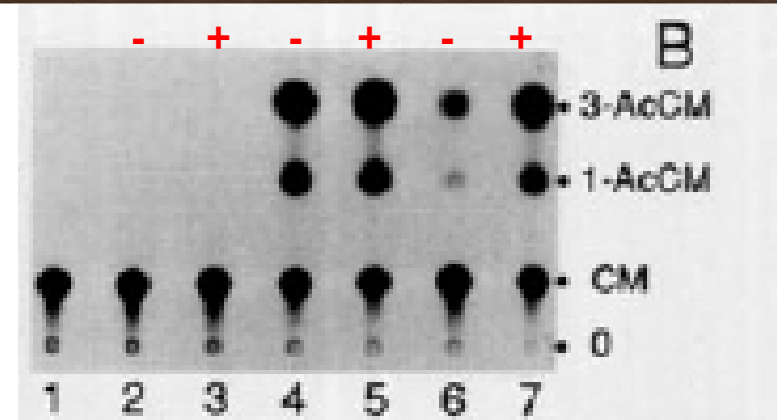
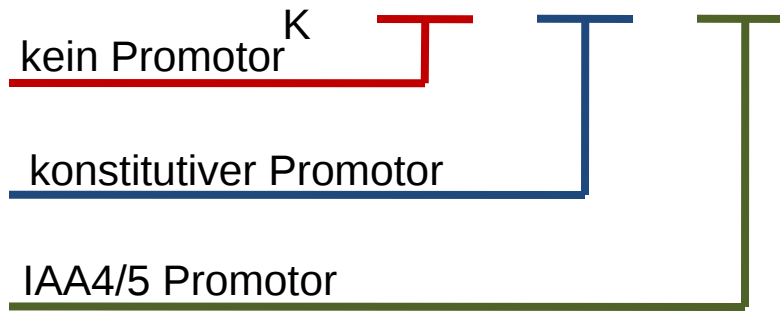
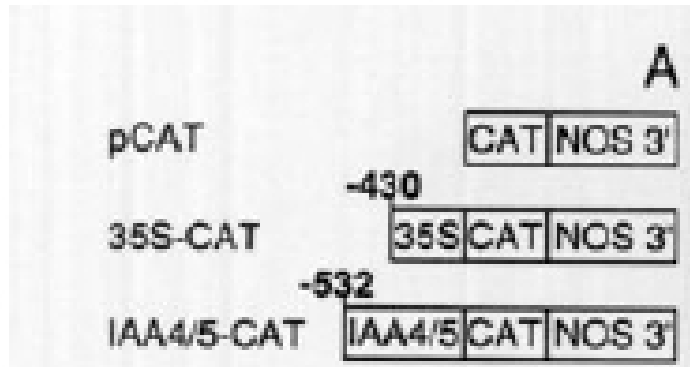
CAT = Chloramphenicol acetyltransferase

(Enzym kann das Antibiotikum Chloramphenicol neutralisieren, indem Acetylgruppen übertragen werden)



CAT reporter system

Test des CAT reporter systems



IAA4/5::CAT:

CAT-Aktivität spiegelt die Auxin
response des Promotors zeit- und
konzentrationsabhängig wider

Voraussetzung:

Etablierung eines Auxin-induzierbaren Protoplastensystems / Reportersystems



- ✓ Lokalisation des AuxRE erfordert das Testen vieler verschiedener (chimärer) Konstrukte
- ✓ **transiente Transfektion** mit Protoplasten
 - ✓ (leichter zugänglich für die Aufnahme von DNA-Konstrukten und Chemikalien als komplexe Gewebe)
 - ✓ **stabile Trafo** (aufwändig/ zeitintensiv/ funktioniert nicht mit jeder Pflanzenart gleich gut)
- ✓ Überprüfen ob sich die chimären Konstrukte genauso verhalten wie das natürliche Promotor-Gen Konstrukt (Expression, Auxininduktion, Transkriptionsstart)

Notwendiger Test:



- ✓ Überprüfen ob sich die Protoplasten genauso verhalten wie intakte Keimlinge (Auxin response)

Zielstellung:

Etablierung eines Auxin-induzierbaren Protoplastensystems / Reportersystems



Notwendigen Tests:



Lokalisation / Identifizierung des AuxRE im Promotor des IAA4/5 Gens

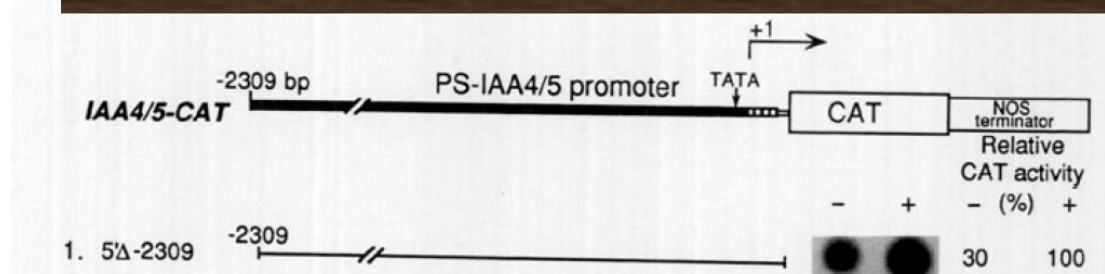
Was ist ein Promotor?

- DNA Sequenz *upstream* des Transkriptionsstarts
- enthält Bindungsstelle(n) für RNA-Polymerase, usw (z.B. TATA box)

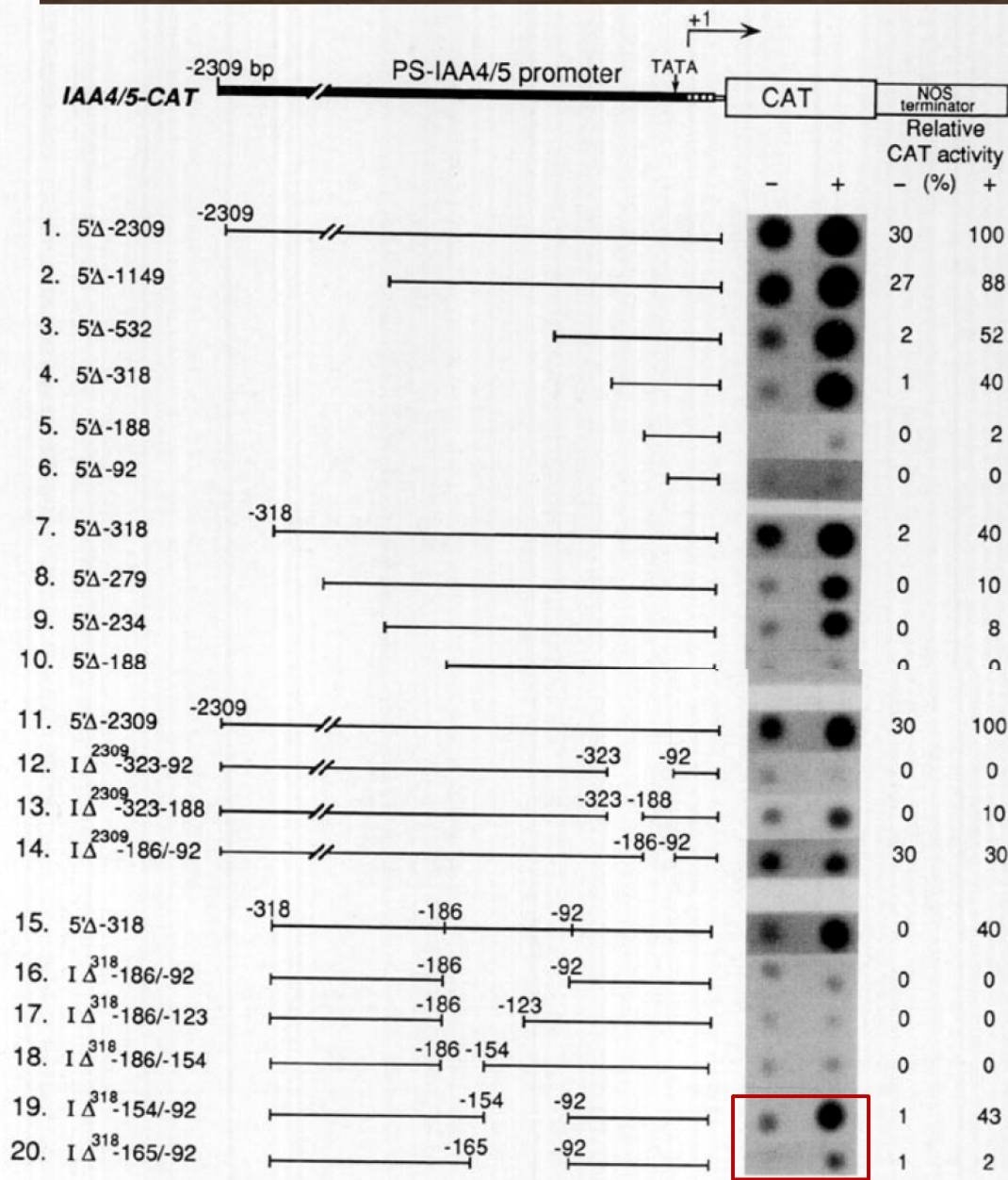
Wo sucht man nach regulatorischen *cis* Elementen?

klassisch: innerhalb der ersten 500 (bis 2000) Basen *upstream* des Transkriptionsstarts
aber:
auch weiter *upstream* und *downstream* möglich!

promoter deletion analysis

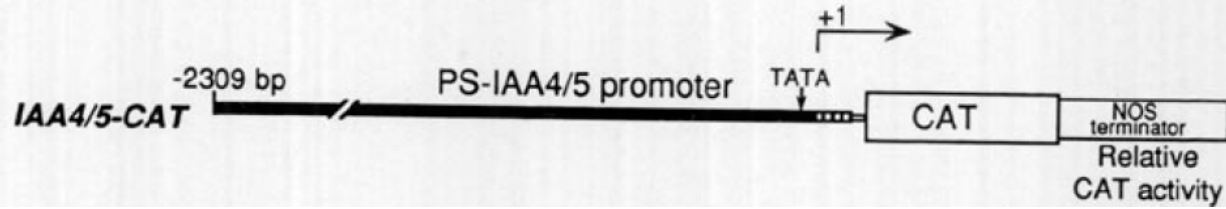


promoter deletion analysis

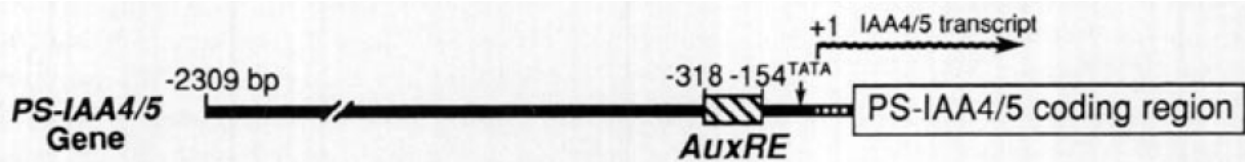


← -154 markiert 3' Ende des AuxRE

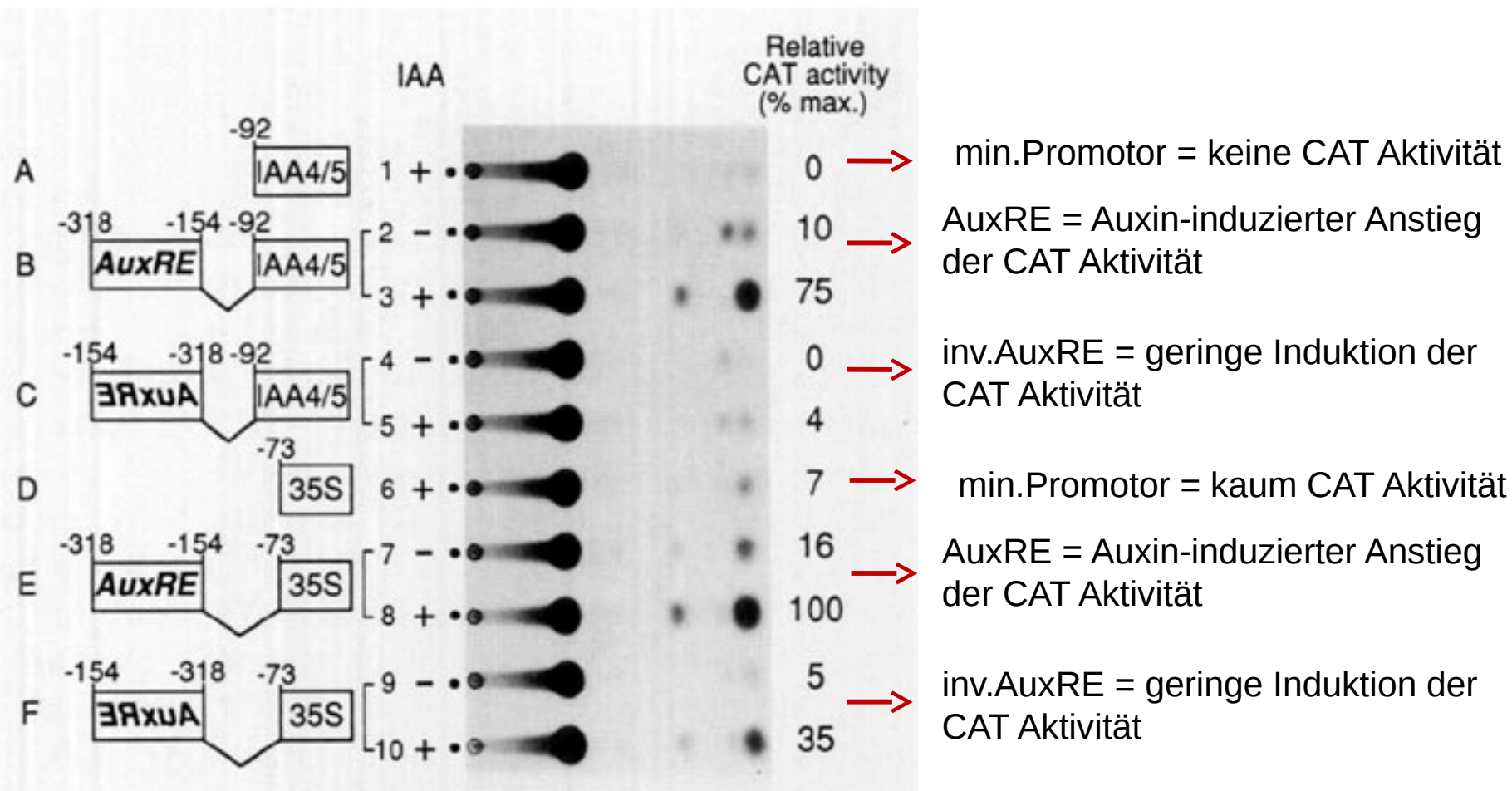
promoter deletion analysis



Das AuxRE liegt im Bereich von -154 bis -318

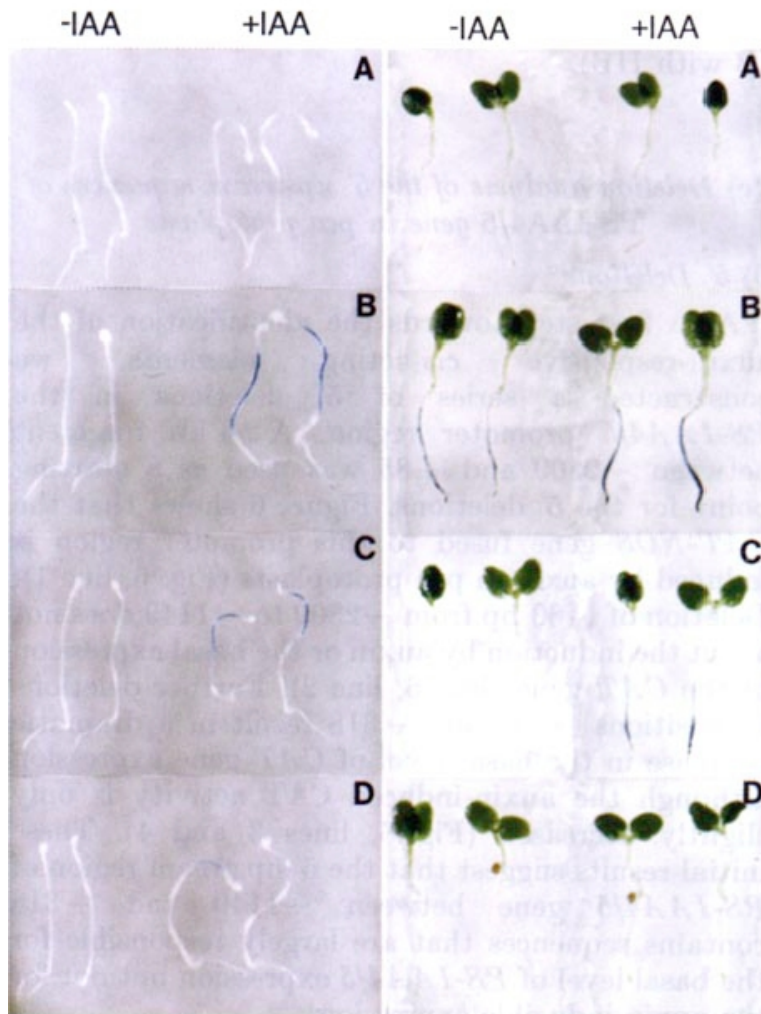


Testen der "core" sequence



(-318 AuxRE -154) reicht für die Auxin response aus - korrekte Orientierung ist essentiell!

in vivo reporter assay in Tabak



GUS

-2309

IAA4/5 Promotor

GUS

-318

IAA4/5 Prom.

GUS

-188

IAA4/5

GUS

Bestätigung der Region -318 bis -154 als notwendig für die Auxin response + Faktoren die dafür in Erbse nötig sind finden sich auch in Tabak

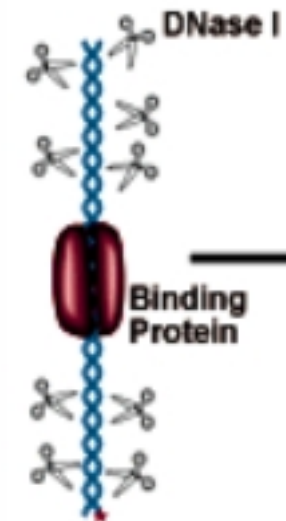
DNase I footprinting

Auxin-relevante Promotorbereich
wurde auf 164 bp eingegrenzt
(-318 bis -154)

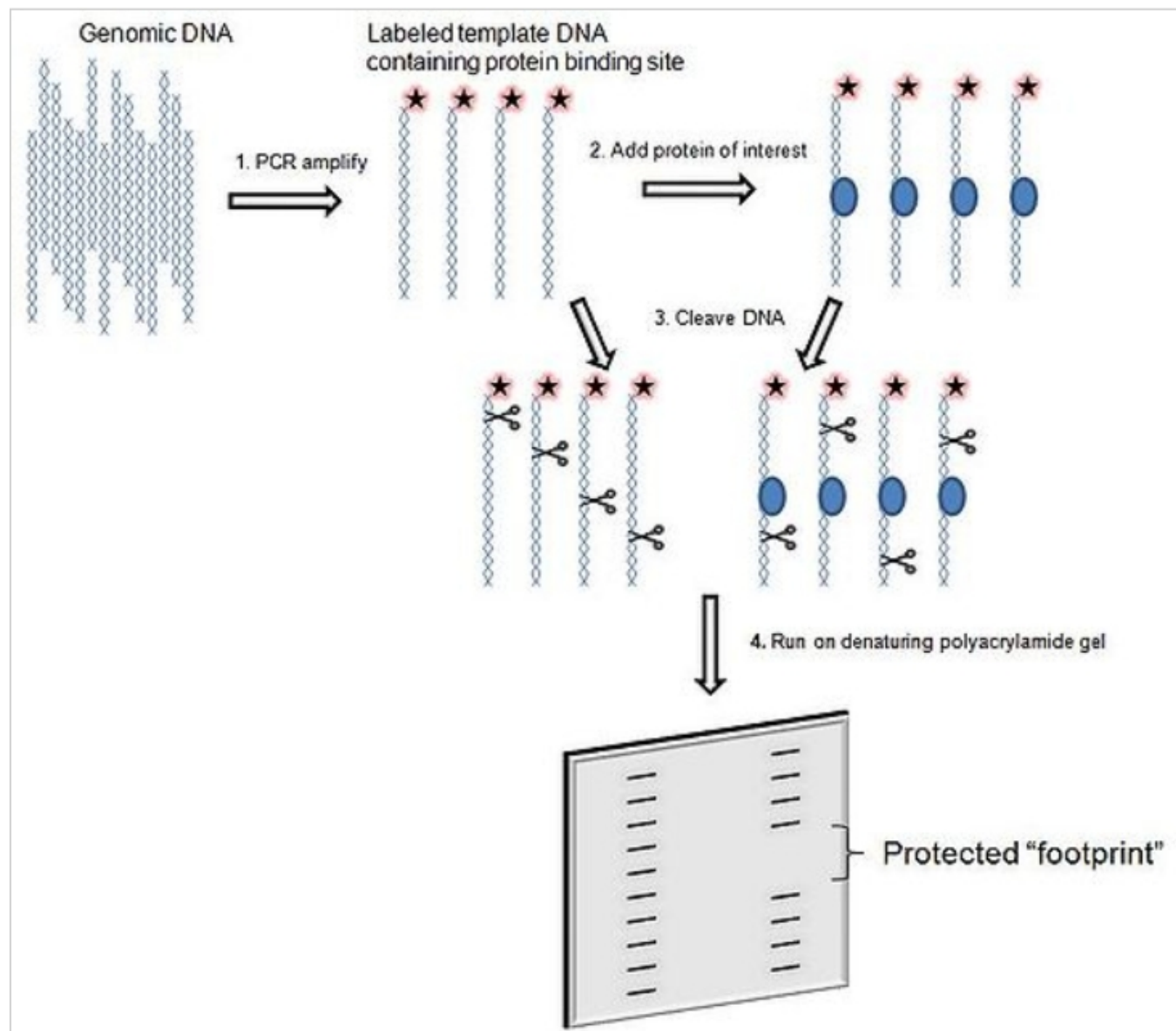
Liegen Bindestellen für
kernlokalisierte Proteine
(Transkriptionsfaktoren) in
diesem Bereich?

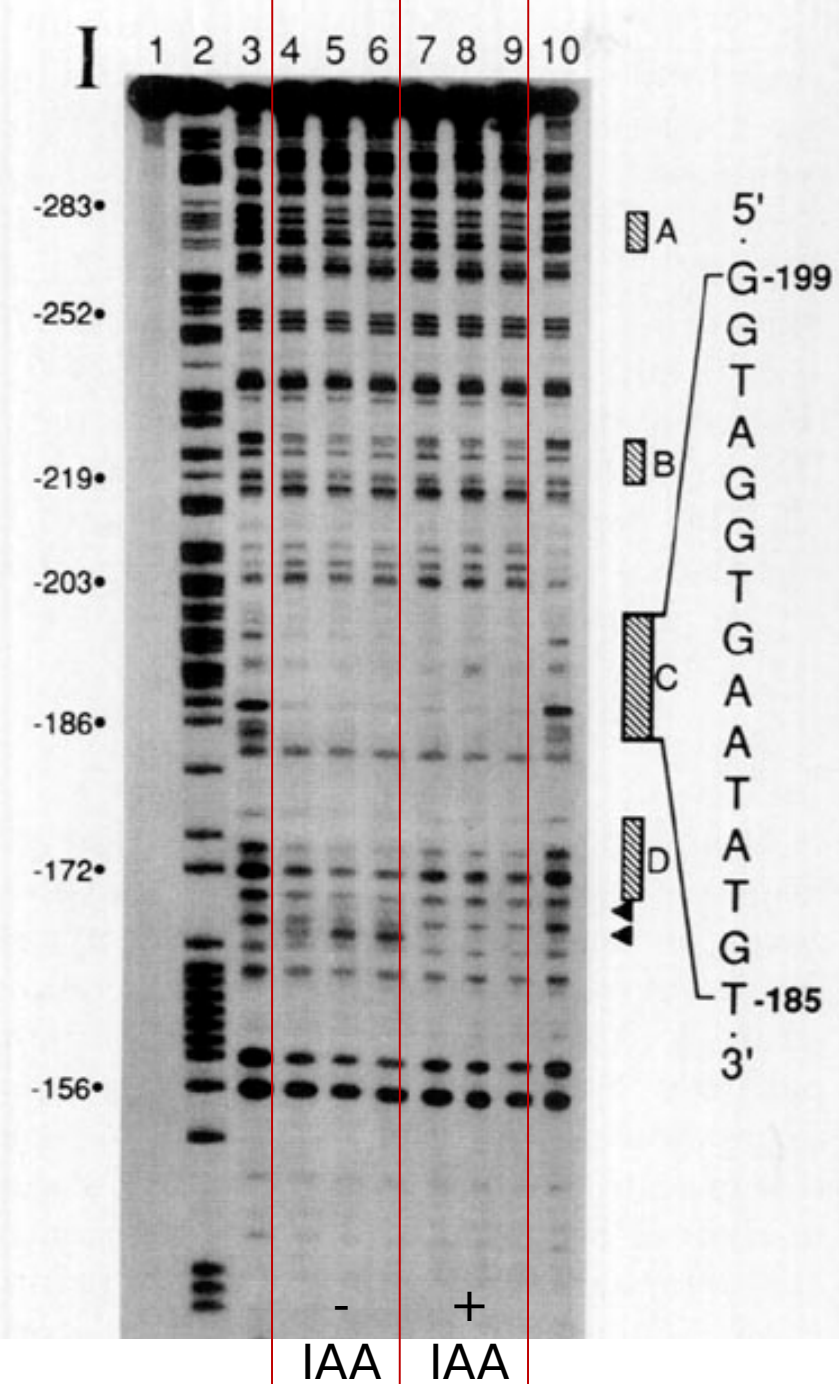


DNase I
footprinting



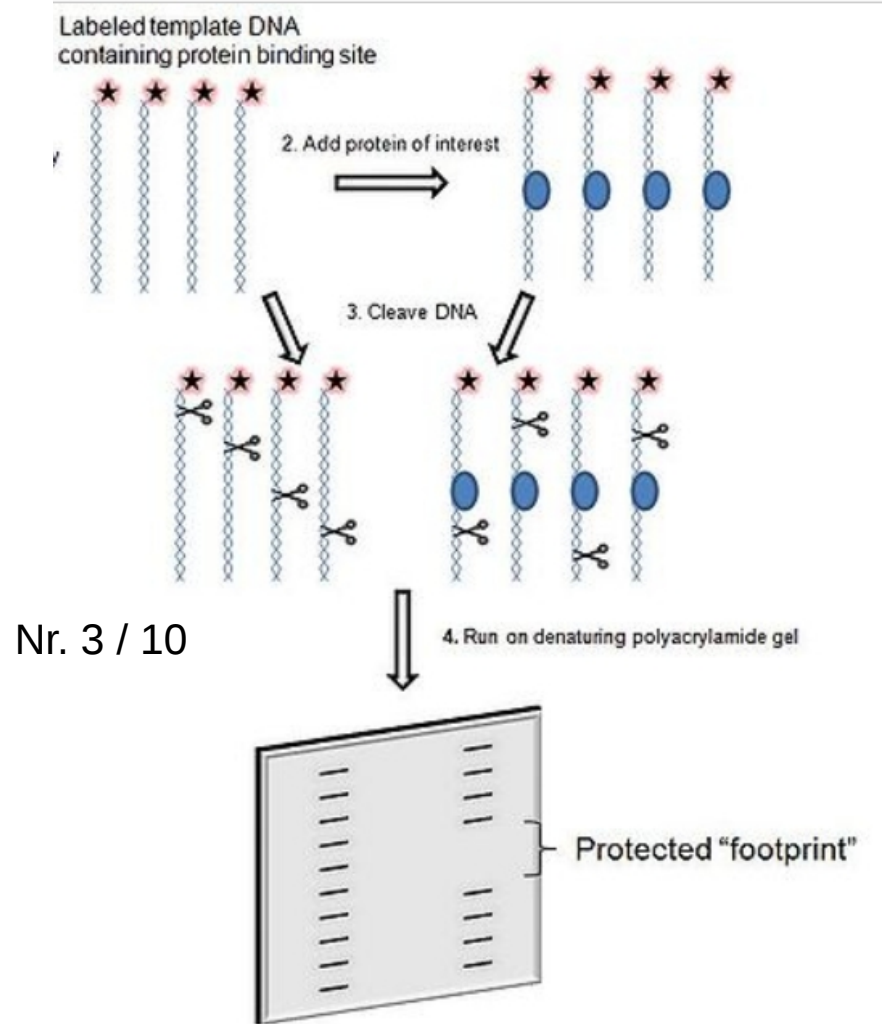
DNase I footprinting

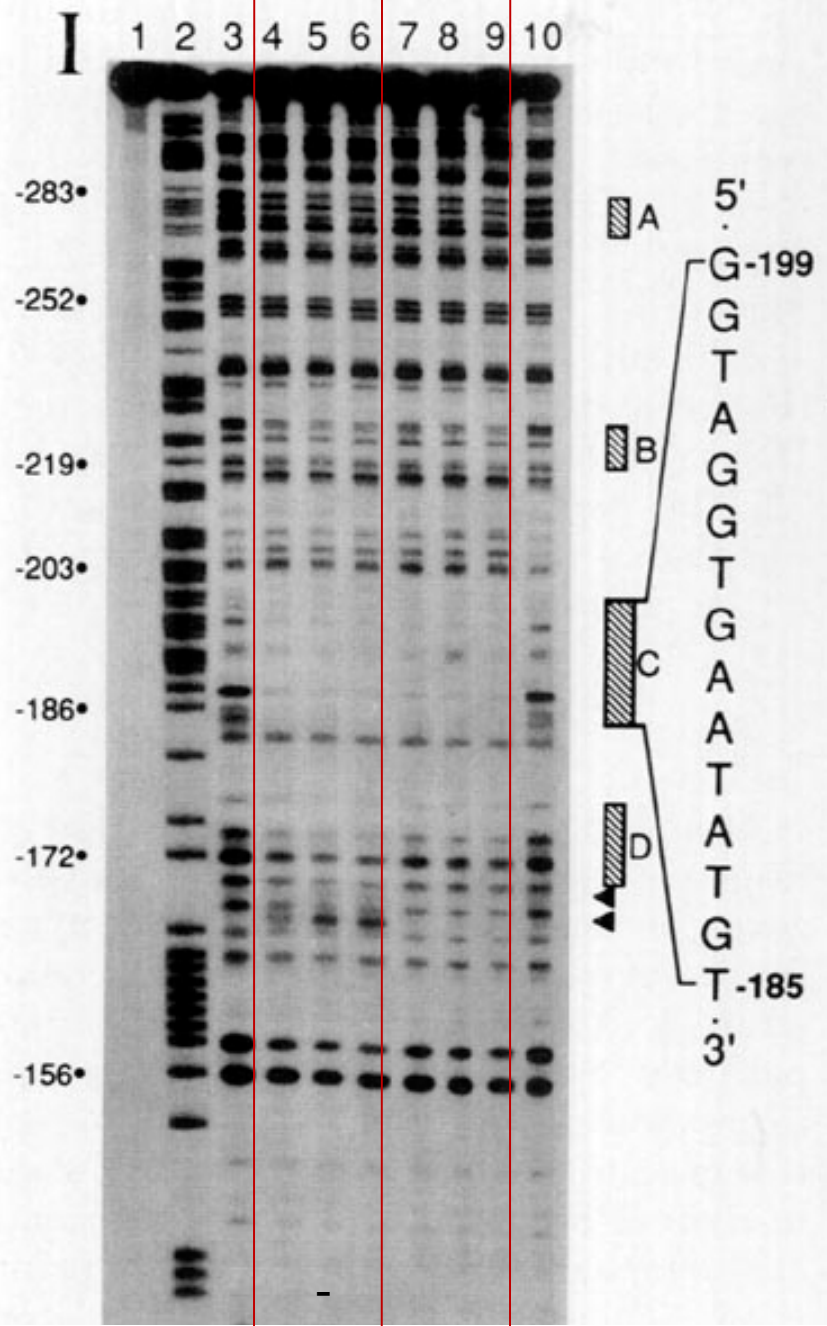




Nr. 4 / 5 / 6 (- IAA)

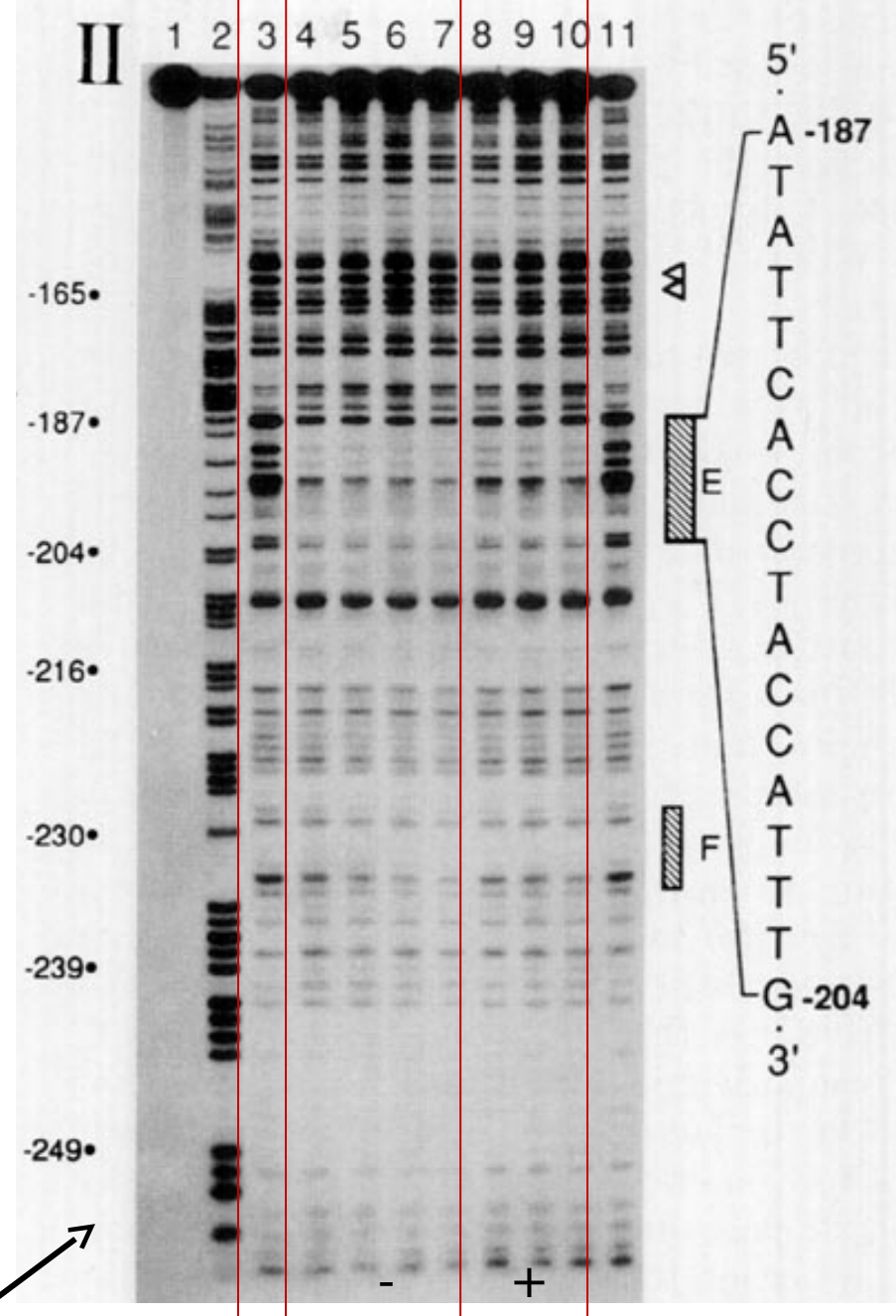
Nr. 7 / 8 / 9 (+IAA)





-
IAA

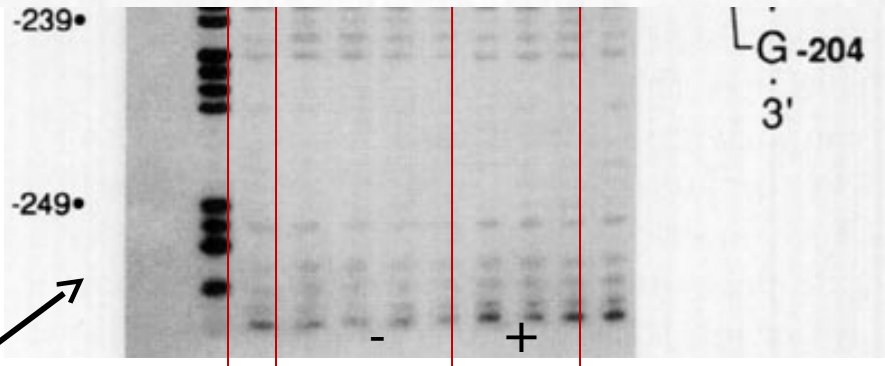
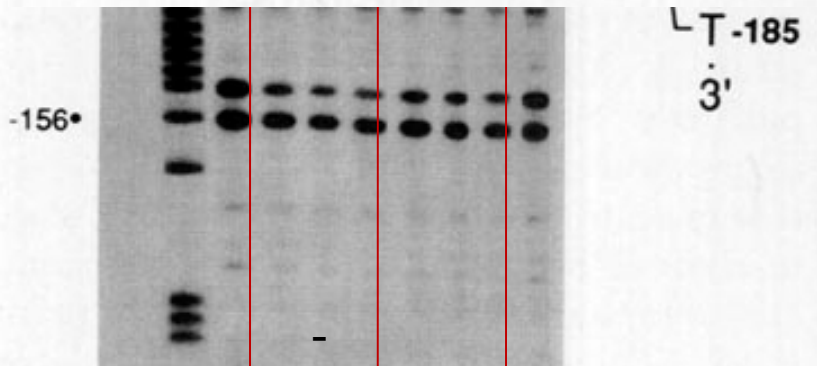
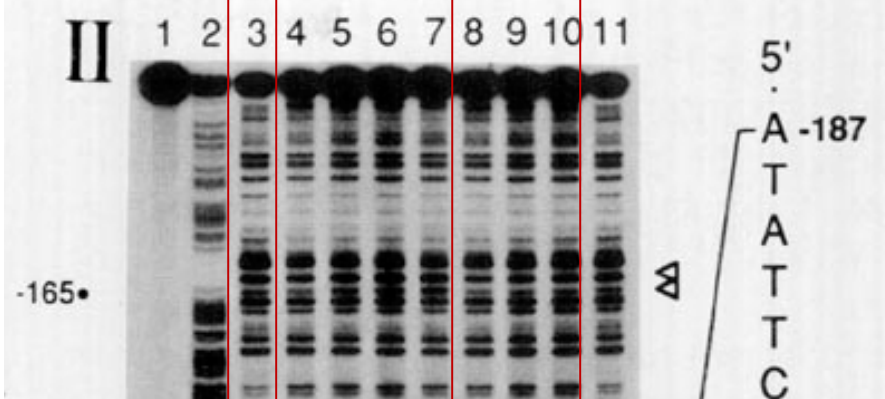
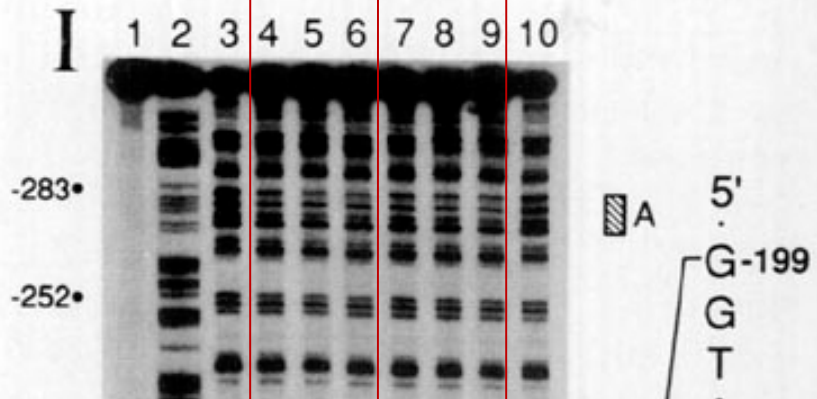
komplementärer Strang



-
IAA

+
IAA





-
IAA

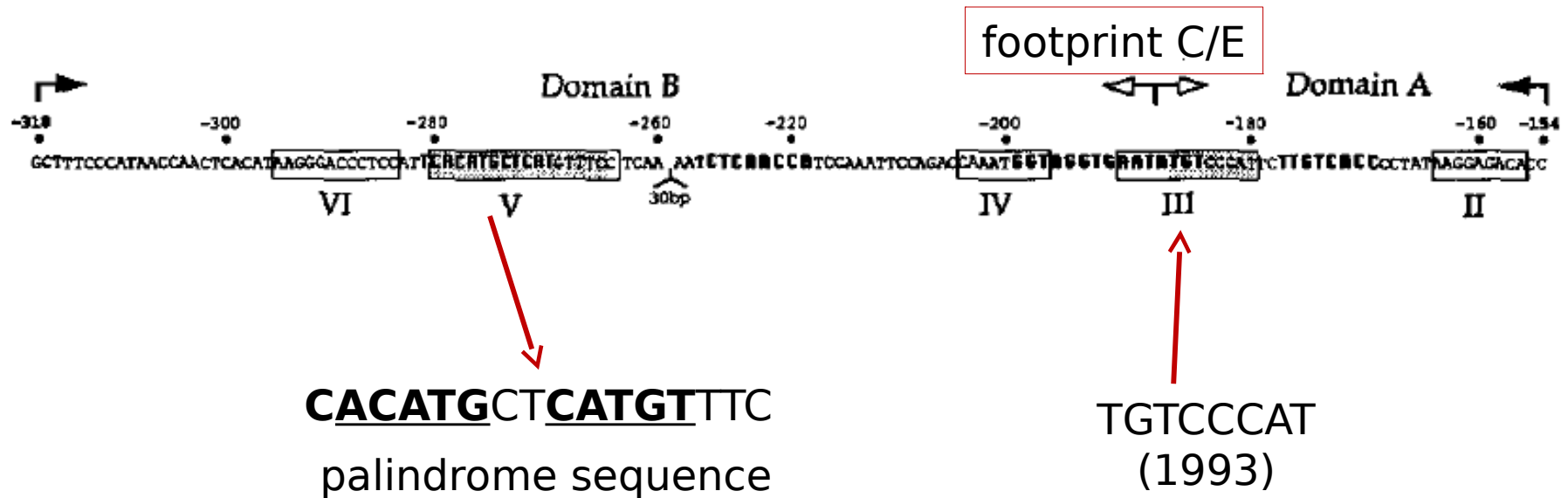
komplementärer Strang

-
IAA

+
IAA

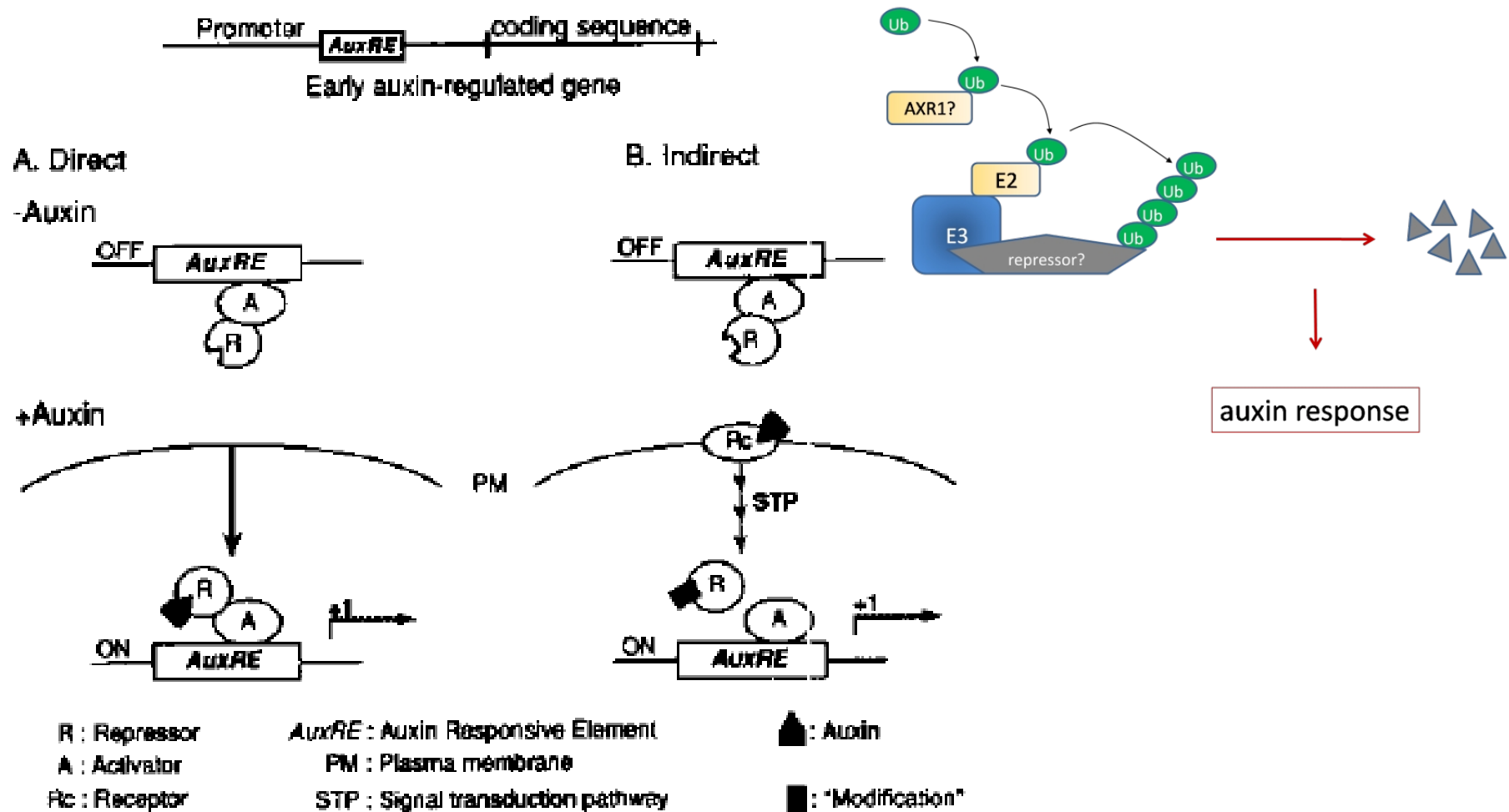
Struktur des AuxRE

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



found in: auxin-responsive genes of *P. sativum*, soybean and *A. thaliana*

Modelle (1993)



Zusammenfassung

J. Mol. Biol. (1993) 233, 580–596

**Identification of the Auxin-responsive Element, *AuxRE*, in the
Primary indoleacetic Acid-inducible Gene, *PS-IAA4/5*, of Pea
(*Pisum sativum*)**

Nurit Ballas†, Lu-Min Wong† and Athanasios Theologis‡

Fazit:

- ✓ Es konnten zwei verschiedene Sequenzbereiche identifiziert werden, die zusammen die Auxin response vermitteln.
- ✓ Für beide Bereiche konnte die Bindung von Kernproteinen gezeigt werden
- ✓ es wurden konservierte Sequenzen gefunden werden die in Auxin-responsiven Genen verschiedener Arten auftreten



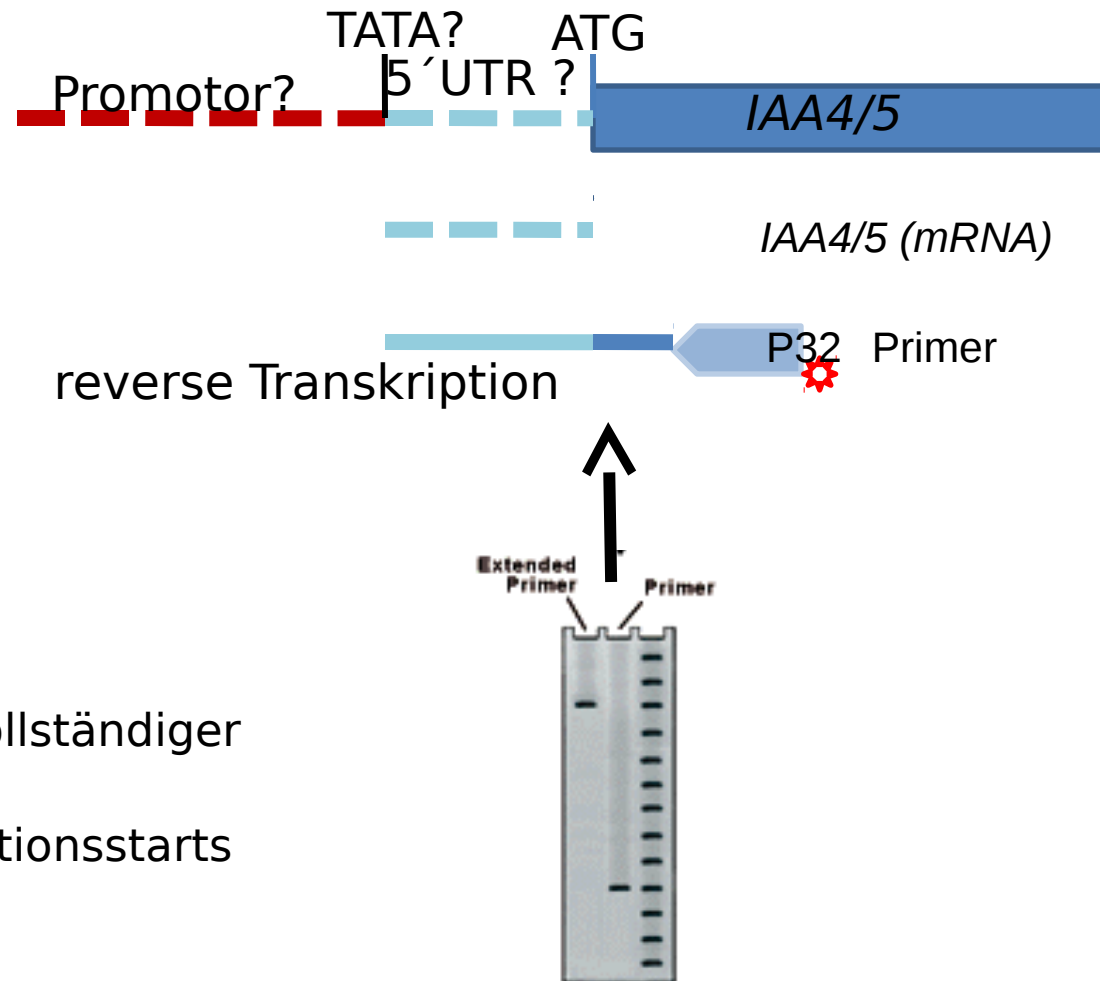
nächste Woche:

ARF1, a Transcription Factor That Binds to Auxin Response Elements

Tim Ulmasov, Gretchen Hagen, Tom J. Guilfoyle*

Julia, Lisa, Franziska G.

Aufklärung der Promotorstruktur



primer extension:

- i.d.R. erster Schritt zur Charakterisierung von Promotorbereichen/Erhalt vollständiger Transkripte
- Identifizierung des Transkriptionsstarts (5' UTR)

I

A nt

←114→

-80

-40

1234

ACGT

B

3' 5'

G C
T A
T A
T A
G C
A T
A T
A T
A C
C T
G A
C C
T T
G C
C A
T A
C G
A T
A T
A T
G C
C G

A-10

A+1

A+10

5' 3'

←30mer

12 34

Pr Epi

