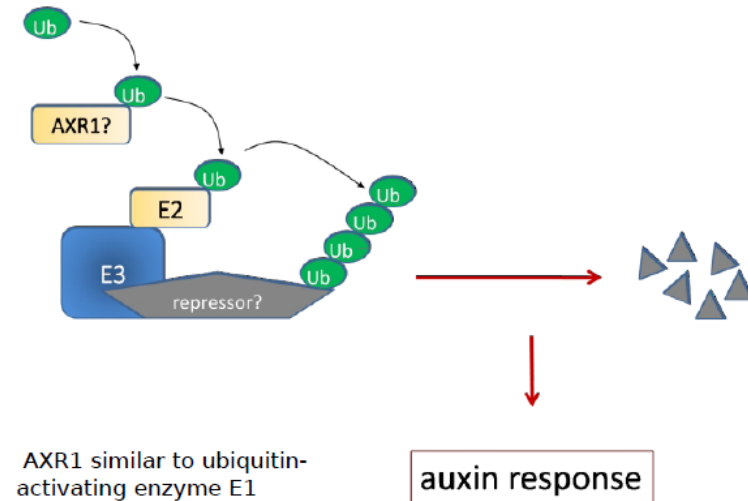
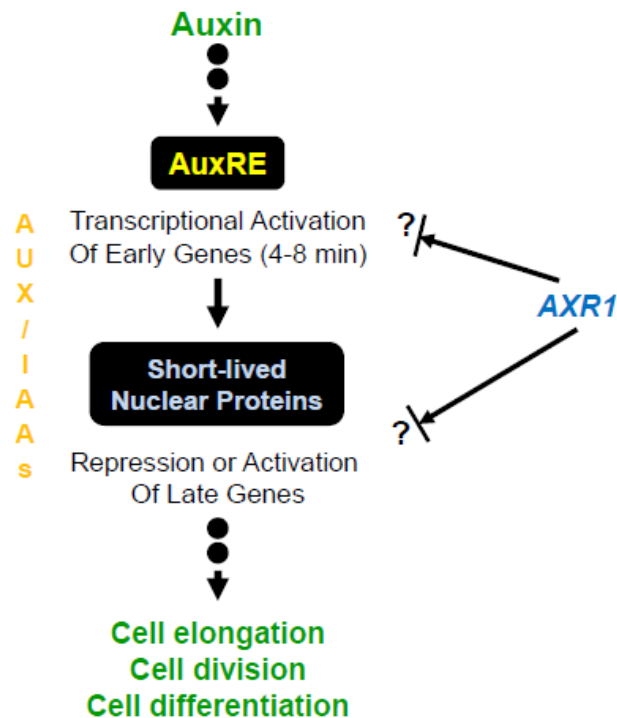


VORANGEGANGENE MODELLE

Abel *et al.* PNAS 1994

FIG. 5. Model for early auxin events

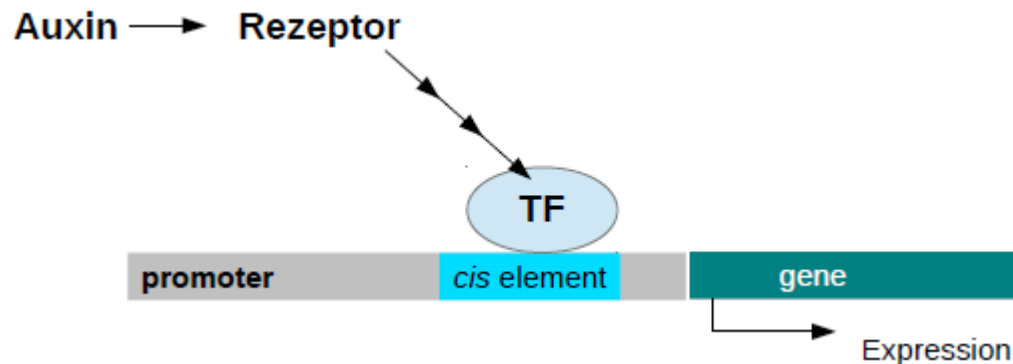


UNSER THEMA HEUTE

ARF1, a Transcription Factor That Binds to Auxin Response Elements

Tim Ulmasov, Gretchen Hagen, Tom J. Guilfoyle*

Julia, Lisa, Franziska G.

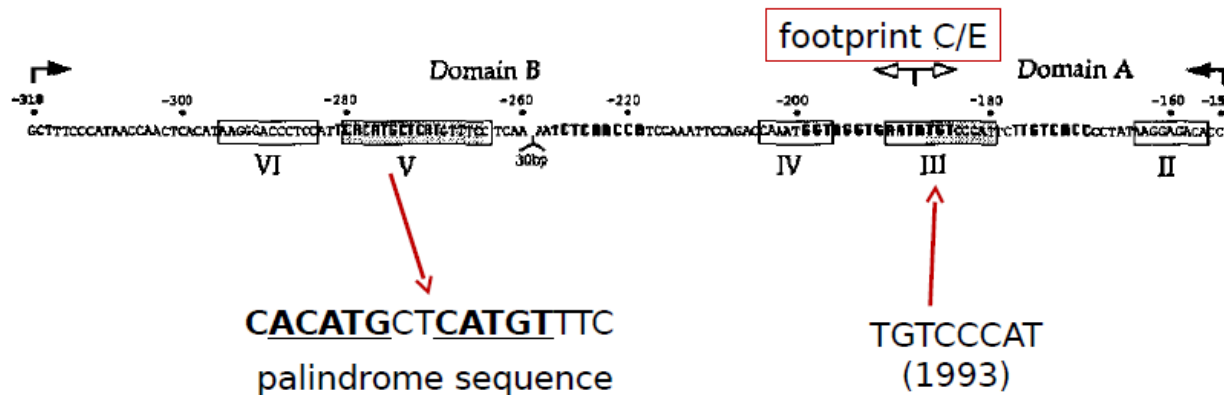


Ziel dieses Papers:

- Nähere Charakterisierung der AuxREs
- Analyse eines zu den AuxREs gehörenden Transkriptionsfaktors

- Auxin moduliert die Interaktion von Transkriptionsfaktoren mittels AuxREs der Zielgene
- Auxinrelevanter Promotorbereich wurde auf 164bp eingegrenzt

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



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

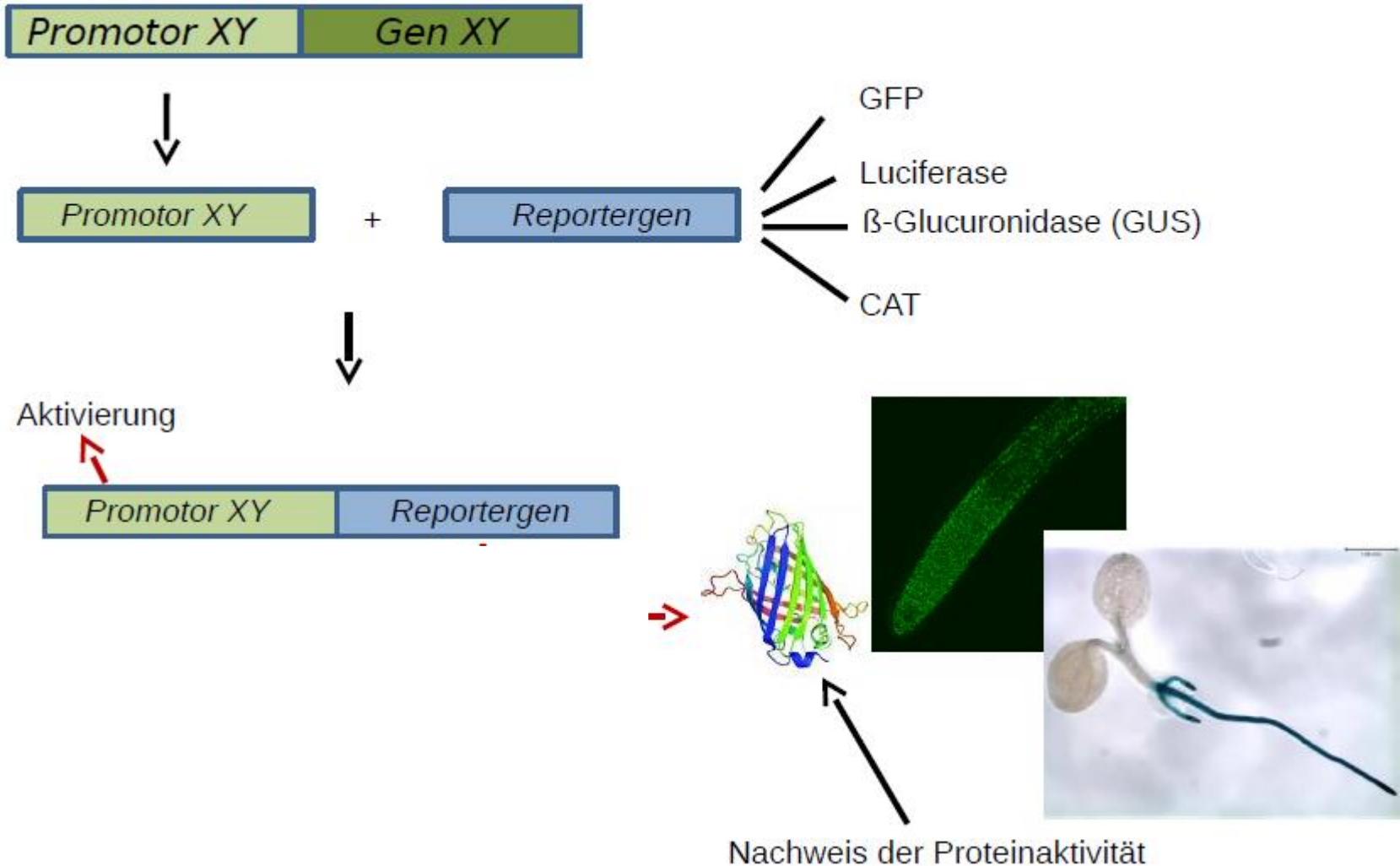
WAS BEREITS BEKANNT WAR

- Sojabohnengen GH 3: antwortet schnell und spezifisch auf Auxin, der Promotor enthält zwei AuxREs D1 und D4 mit der konservierten Sequenz TGTCTC
- **Auxin responsiv elements** zeigen Ähnlichkeit zu **glucocorticoid responsive elements** „GREs“
- GREs beinhalten palindromische Sequenzen (AGAACA_nnnnTGTTCT), an die ein Transkriptionsfaktor bindet

Fragestellung: Sind AuxREs palindromisch angeordnet?

→ Konstruktion des künstlichen P3-Konstruktes

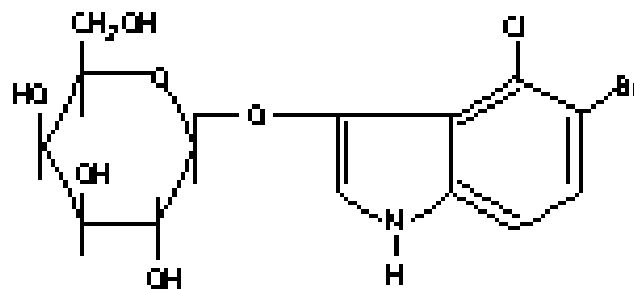
GUS-REPORTERASSAY



GUS-REPORTERASSAY

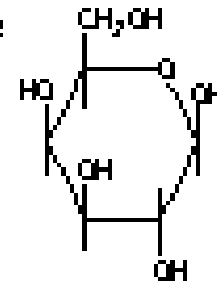
Promotor XY

Gen XY

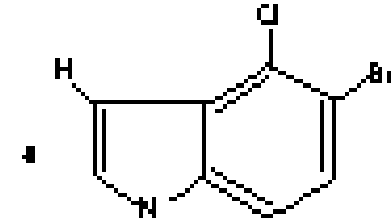


Xgal
(colorless)

β -galactosidase



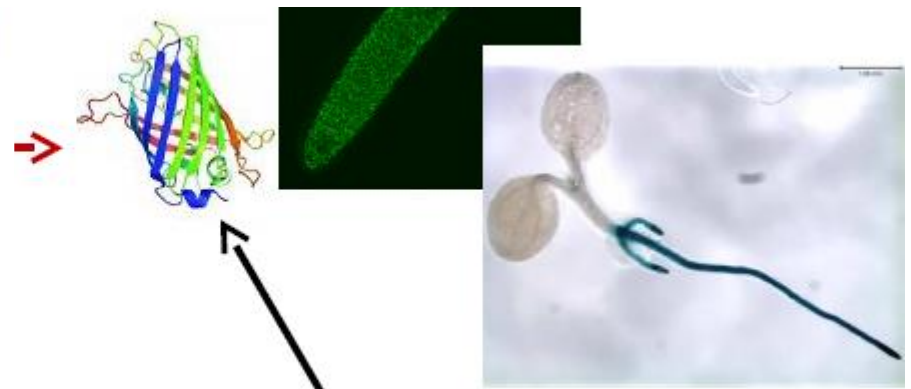
Galactose
(colorless)



Blue

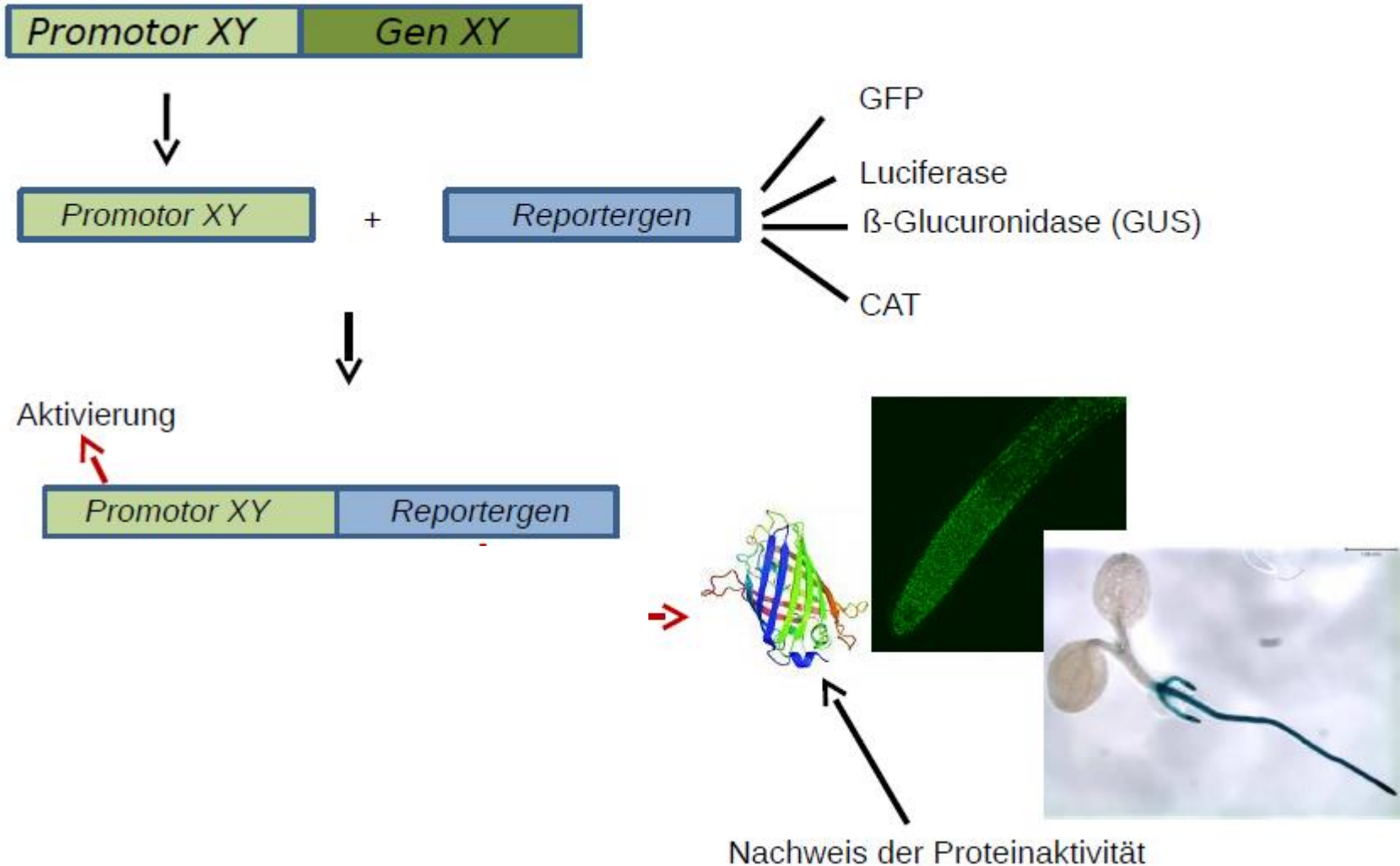
Promotor XY

Reportergen



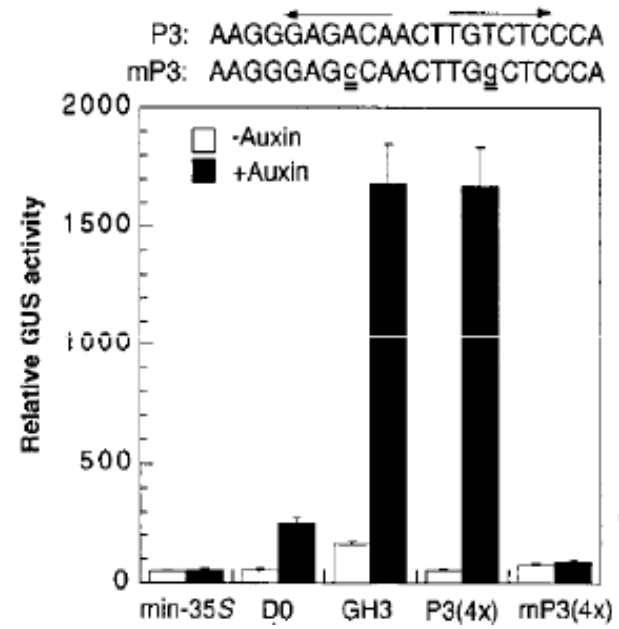
Nachweis der Proteinaktivität

GUS-REPORTERASSAY



GUS-REPORTERASSAY IN PROTOPLASTEN

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



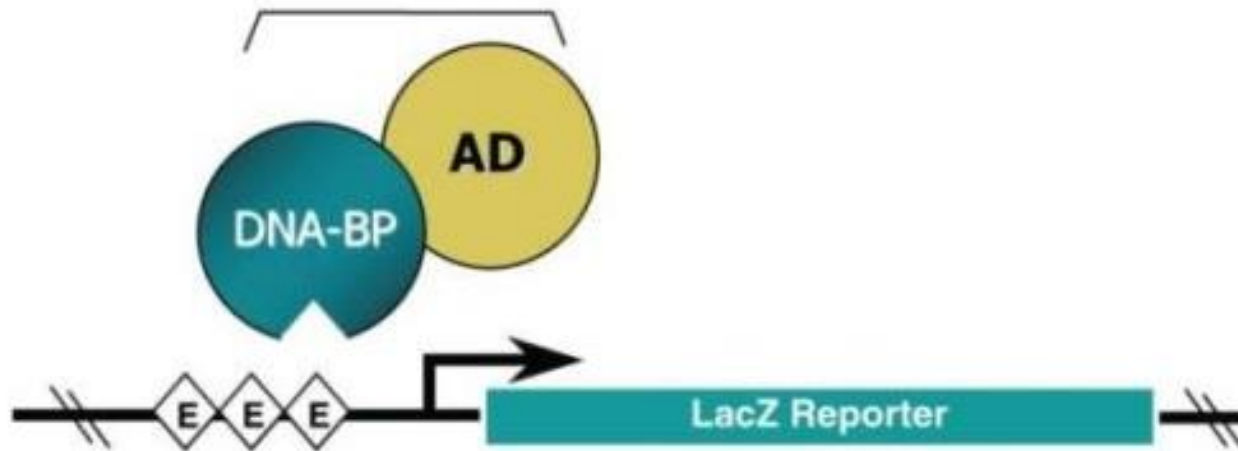
Promotor des cauliflower mosaic virus
Ein AuxRE des GH3 Promotors
Vollständiger GH3 Promotor
Künstliche palindromische Sequenz
Mutierte Palindromische Sequenz

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

YEAST-ONE-HYBRID SYSTEM

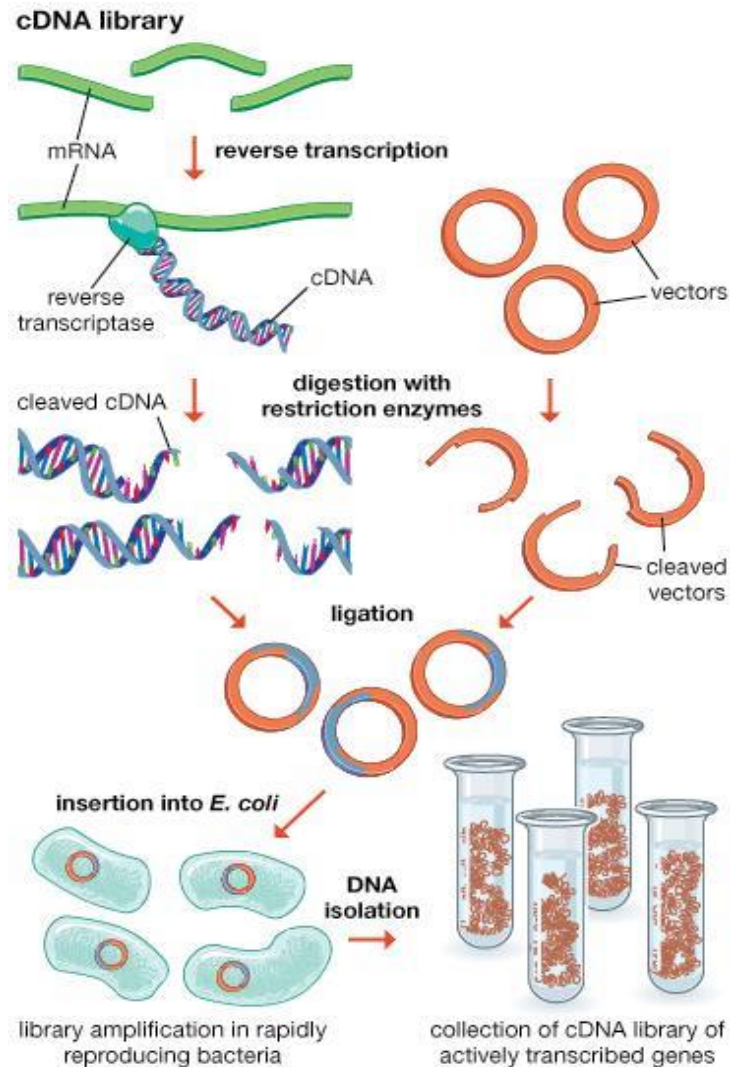
Identifizierung von Proteinen, die an das AuxRE binden können

1. cDNA expression library (jeweiliges Protein wird mit einer Aktivierungsdomäne verbunden)
2. AuxRE wird mit einem LacZ reporter verbunden



bindet ein Protein (aus der cDNA expression library) an das AuxRE, kommt es zur Aktivierung der LacZ Expression und die entsprechenden Hefezellen werden je nach Reportergen blau oder können auf einem Minimalmedium wachsen, auf dem ohne Expression des Reporters kein Wachstum möglich ist

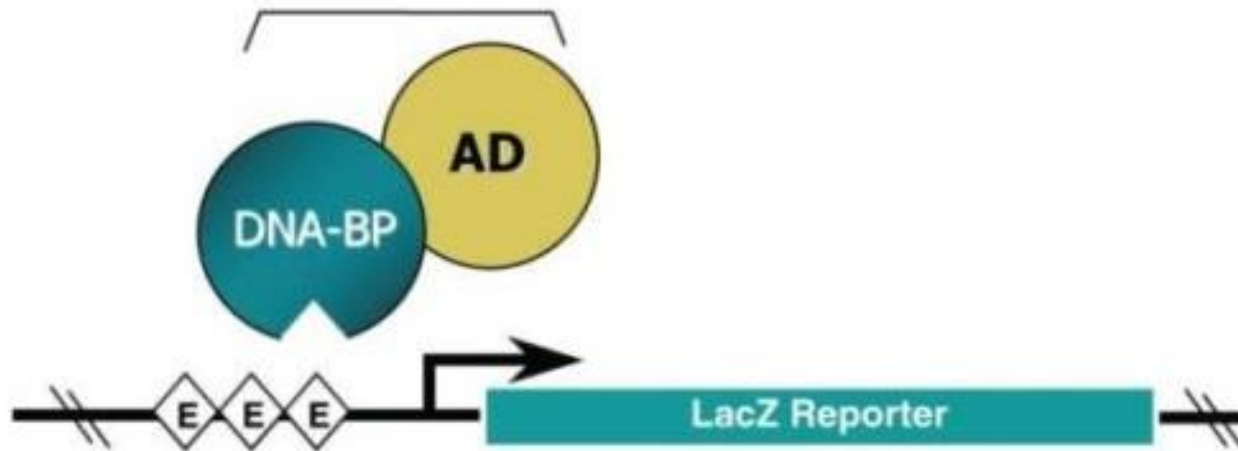
CDNA-LIBRARY



YEAST-ONE-HYBRID SYSTEM

Identifizierung von Proteinen, die an das AuxRE binden können

1. cDNA expression library (jeweiliges Protein wird mit einer Aktivierungsdomäne verbunden)
2. AuxRE wird mit einem LacZ reporter verbunden



bindet ein Protein (aus der cDNA expression library) an das AuxRE, kommt es zur Aktivierung der LacZ Expression und die entsprechenden Hefezellen werden je nach Reportergen blau oder können auf einem Minimalmedium wachsen auf dem ohne Expression des Reporters kein Wachstum möglich ist

DIE AMINOSÄURESEQUENZ VON ARF1

A

```
1  MAASNHSSGK PGGVLSDALC RELWHACAGP LVTLPREGER VYYPPEGHME
51  QLEASMHQGL EQQMPSFNLP SKILCKVINI QRRAPETDE VYAQITLLPE
101 LDQSEPTSPD APVQEPEKCT VHSFCKTLTA SDTSTHGCGS VLRRHADDCL
151 PFLDMSQQPF WOELVATDLH NSEWHFRHIF RGQPRRHILT TGMSVEFVSSK
201 KLVAGDAFIF LAGENEELRV GVERHMROQT NIPSSVISSH SMHIGVLATA
251 AHAIITGTIF SVFYKPRTSR SEFIVSVNRY LEAKTQKLSV GMRFKMRFEG
301 EEAPFKRFSG TIVGVQENKS SVMHDSEWRS LKVQWDEPSS VFRPERVSPW
351 ELEPLVANST PSSQPQPPQR NKRPRPPGLP SPATGPSGPV TPDGVWKSPA
401 DTPSSVPLFS PPAKAATFGH GGNKSPGVSI GSAPWPTNAD SAAESFASAF
451 NNESTEKKQT NGNVCLPLGF ELVENVMVDE CFSAAVSOGA VAVDQPVPSN
501 EFDGGQQSEP LNINQSDIPS GSGDPEKSSL RSPQESQSRQ IRSCTKVHMQ
551 GSAVGRAIDL TRSECYEDLF KKLEEMEDIK GELLESTKKN QVVTDDDD
601 MMGVGDDPWN EFCGMVRKIF IYTPREVKKL SPKNKLAVNA RMQLKADAE
651 NGNTEGRSSS MAGSR
```

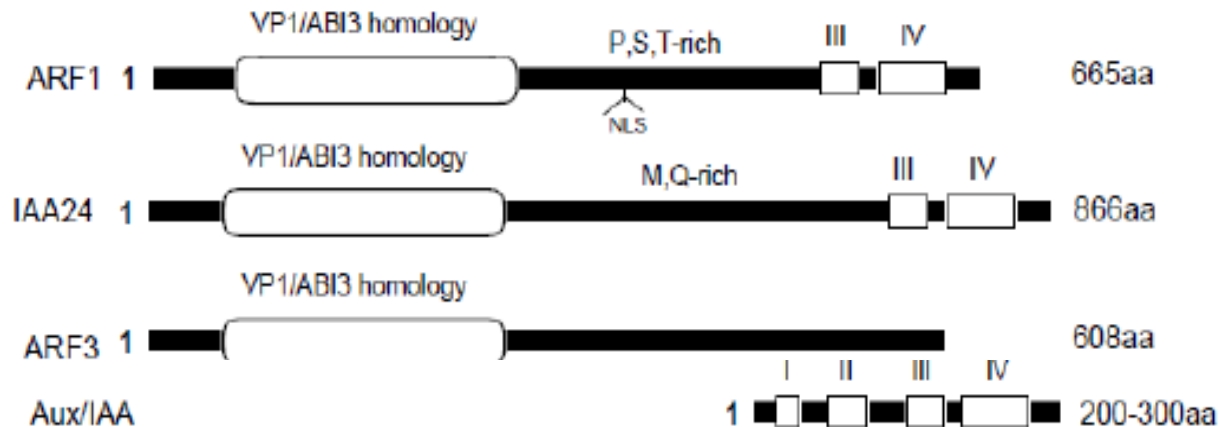
Homologien:

Unterstrichen – VP1 (Mais), ABI 3 (Arabidopsis)

doppelt unterstrichen - Box III + IV in Aux/IAA Proteinen

Gestrichelt - NLS

SEQUENZHOMOLOGIEN UND IHRE BEDEUTUNG



- ARF 1 und IAA 24 enthalten im Gegensatz zu anderen Aux/IAA Proteinen nur Box III + IV
- Analysen zur Voraussage von Faltungen in Proteinen sagen voraus, dass Box III sich zum amphiphilen $\alpha\beta\beta$ -motif faltet
- Vergleich zu letzter Woche: $\alpha\beta\beta$ -motif steht in Verdacht DNA Bindedomäne zu sein

Frage:

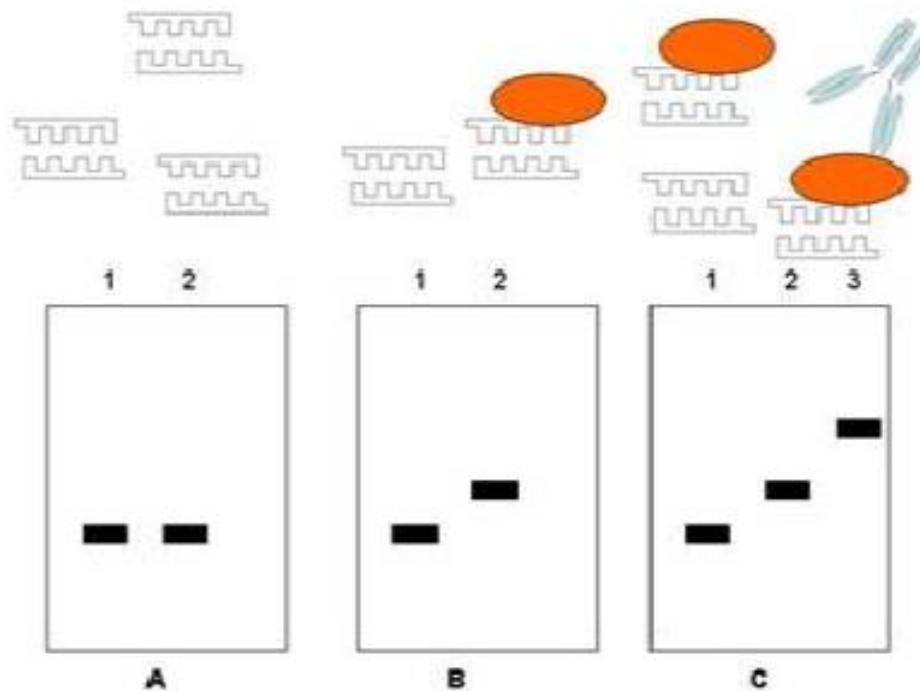
Bindet das Protein an die DNA und welche Region ist essentiell für die Bindung ?



Gel mobility shift assay

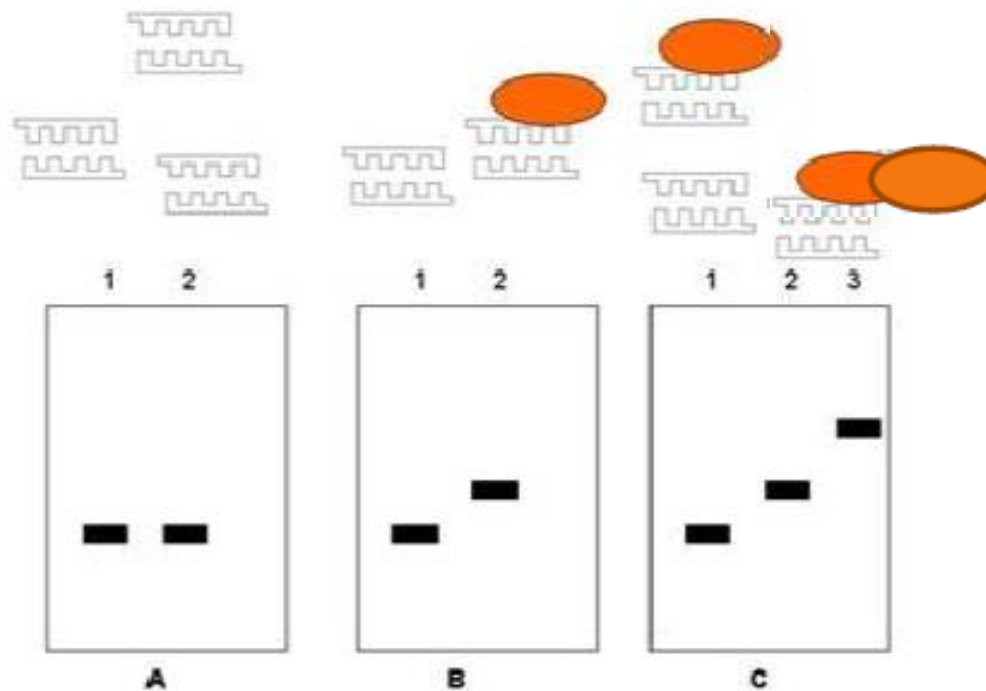
GEL MOBILITY SHIFT ASSAY

- Nachweis der Bindung eines Proteins an DNA
- DNA-Fragmente, an die ein Protein gebunden ist, bewegen sich langsamer im Gel als freie DNA Stücke (im Agarosegel abhängig von Größe und Ladung des DNA-Protein-Komplex)

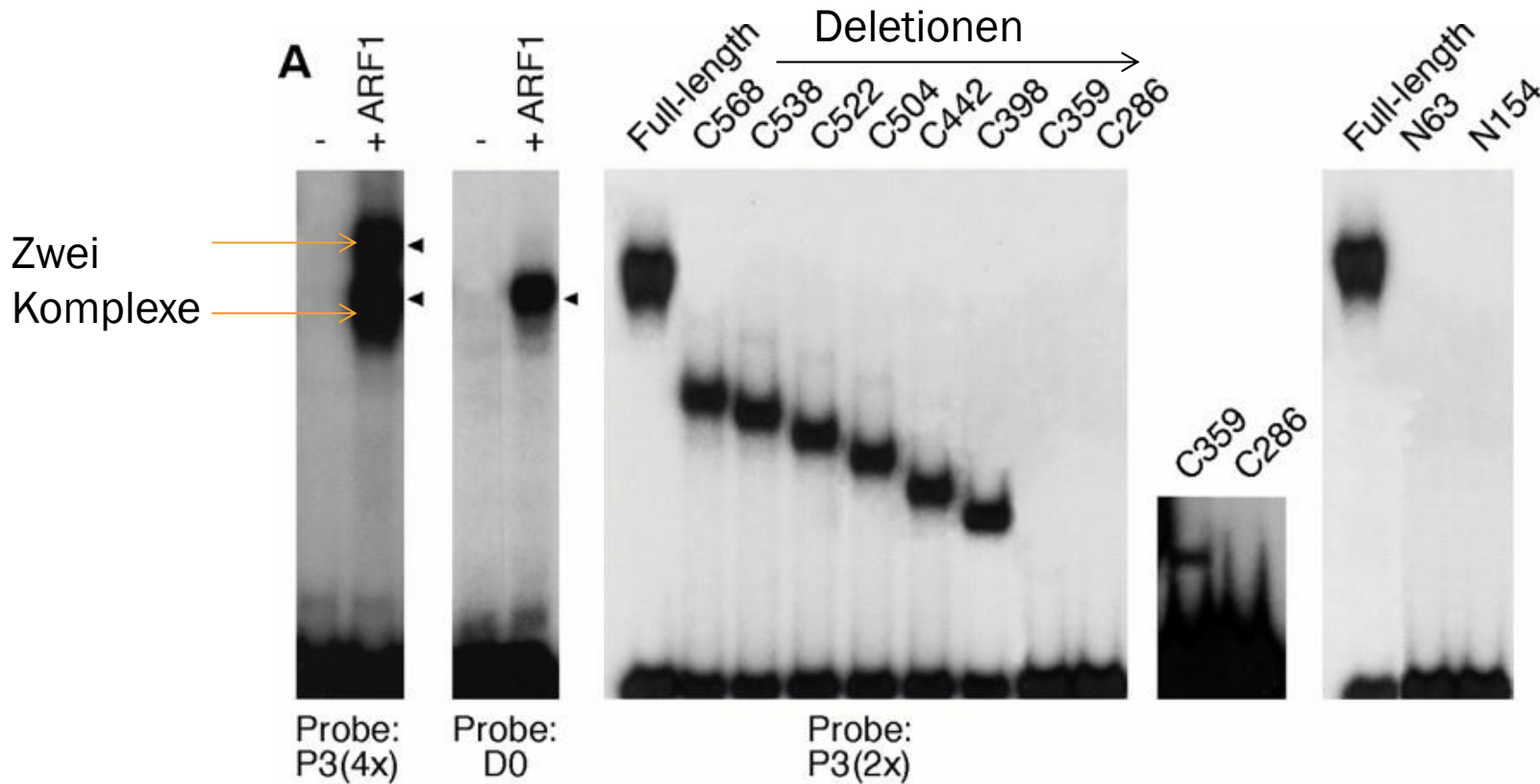


GEL MOBILITY SHIFT ASSAY

- Nachweis der Bindung eines Proteins an DNA
- DNA-Fragmente, an die ein Protein gebunden ist, bewegen sich langsamer im Gel als freie DNA Stücke (im Agarosegel abhängig von Größe und Ladung des DNA-Protein-Komplex)



GEL MOBILITY SHIFT ASSAY



- Fazit:
1. Aminosäuresequenz ab C359 ist essentiell für DNA Bindung
 2. DNA Bindungsdomäne liegt am N-terminus

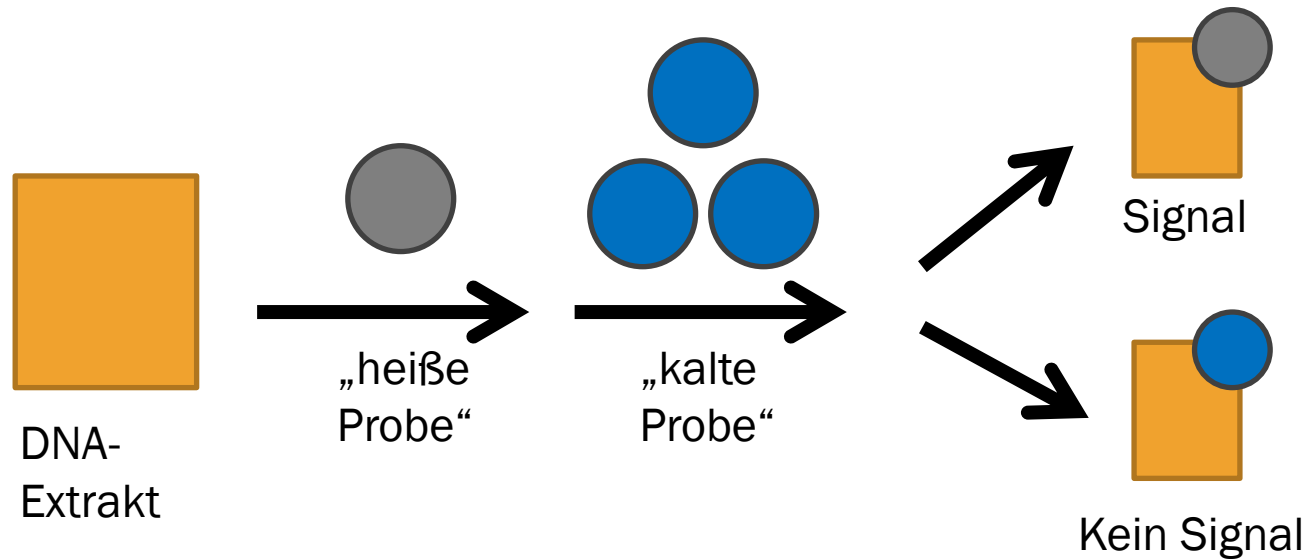
Frage:

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



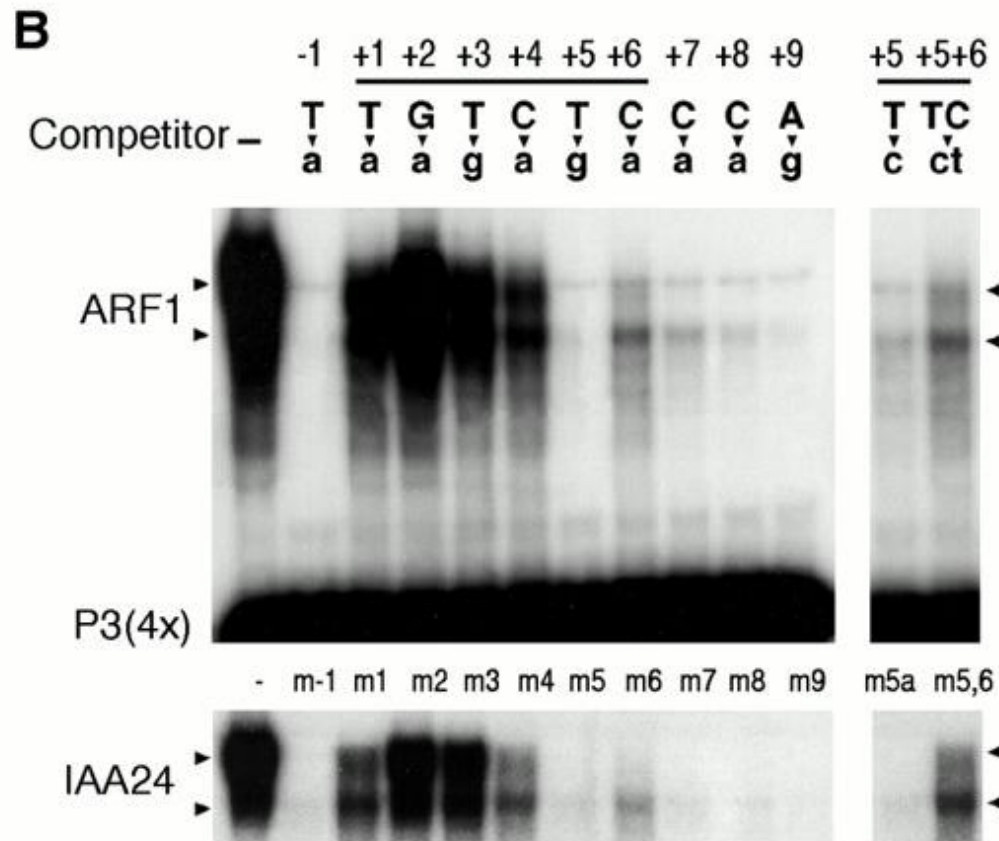
Competition assay
und quantitativer GUS assay

COMPETITION ASSAY



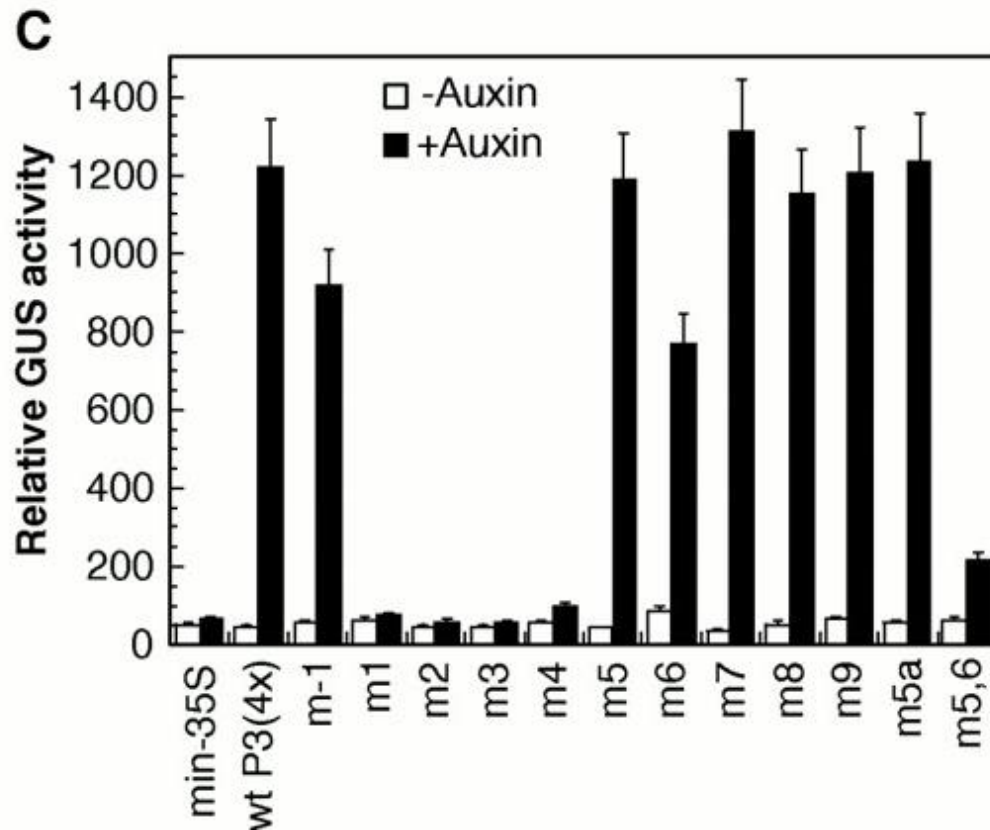
Im EMSA wurden frisch isolierte nukleare Extrakte der behandelten Zellen gewonnen und diese mit einer radioaktiv markierten spezifischen Sonde („heiße Sonde“) inkubiert. In die Probe wurde zusätzlich zur heißen Sonde eine sogenannte „kalte Sonde“ zugegeben, bei der es sich ebenfalls um die spezifische Sequenz, jedoch nicht radioaktiv markiert, handelte. Da sie im Überschuss zugegeben wurde, verdrängte sie beim Hybridisierungsvorgang die „heiße Sonde“, wodurch sich das Signal abschwächte.

COMPETITION ASSAY



Fazit: Bindspezifität von IAA 24 ist identisch mit der von ARF1

QUANTITATIVER GUS ASSAY



- Fazit:
1. Die Basen 1-4 sind essentiell für die Bindung
 2. 5 und 6 sind jeweils fakultativ

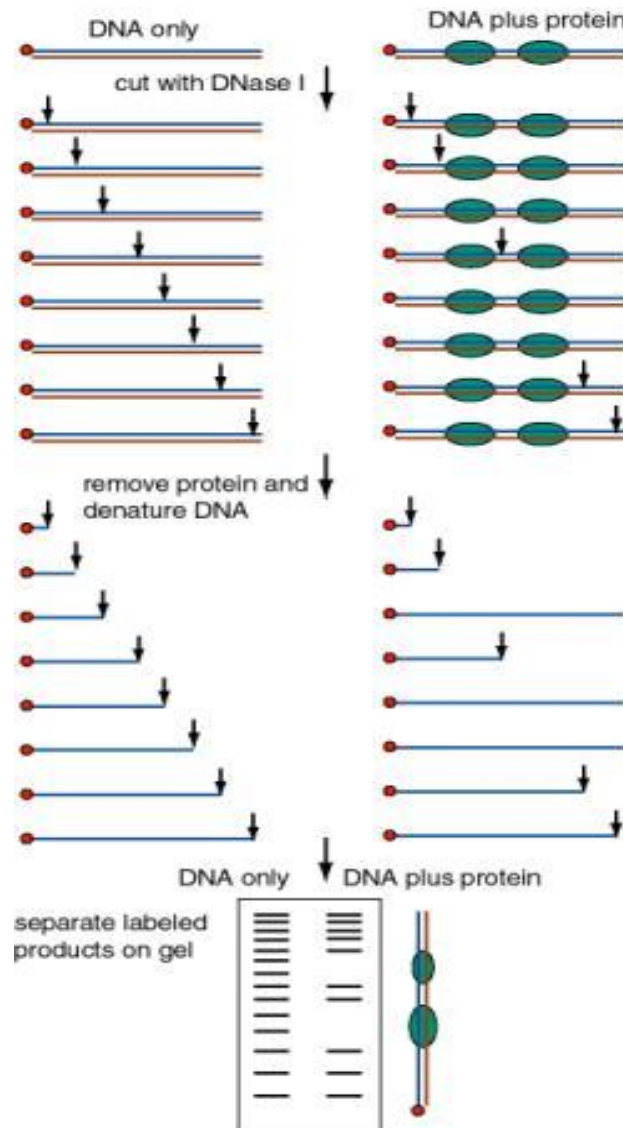
Frage:

Wie sieht die Struktur der ARF1 Bindestelle aus ?



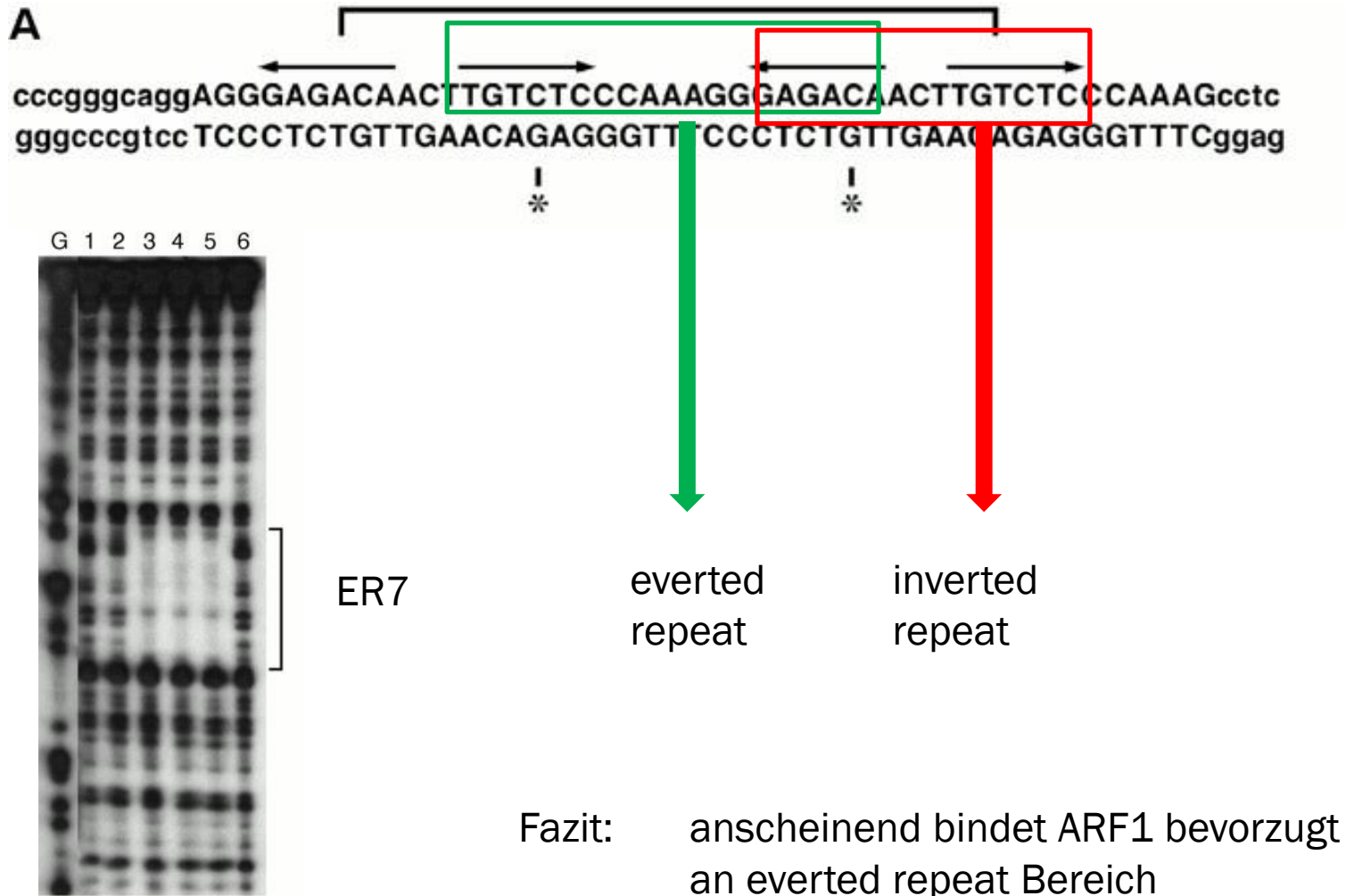
DNase footprinting
und gel mobility shift assay

DNASE FOOTPRINTING ASSAY



- Methode zum Aufspüren von DNA- Protein-Interaktionen
- DNA-Fragmente, an denen ein Protein gebunden ist, sind zu einem gewissen Grad vor enzymatischer Spaltung geschützt

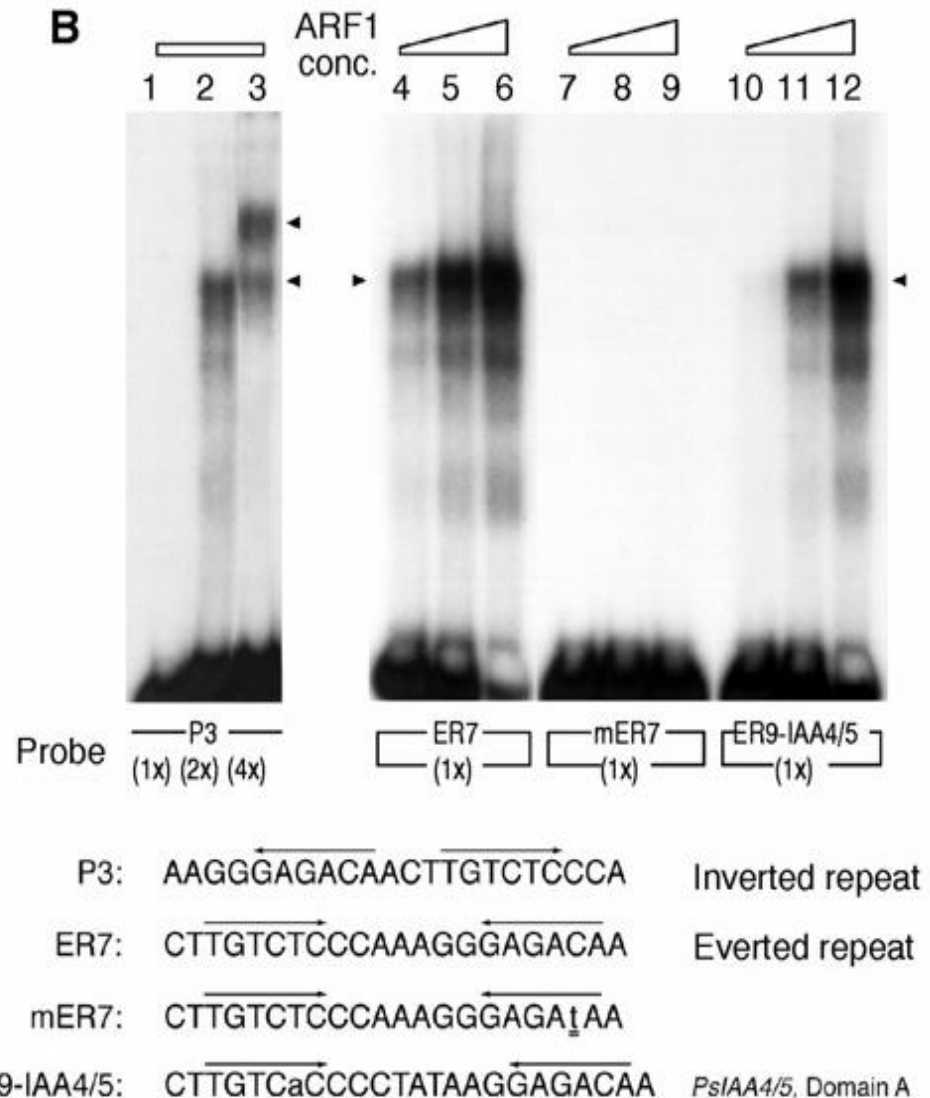
DNASE FOOTPRINTING ASSAY



GEL MOBILITY SHIFT ASSAY

Fazit:

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

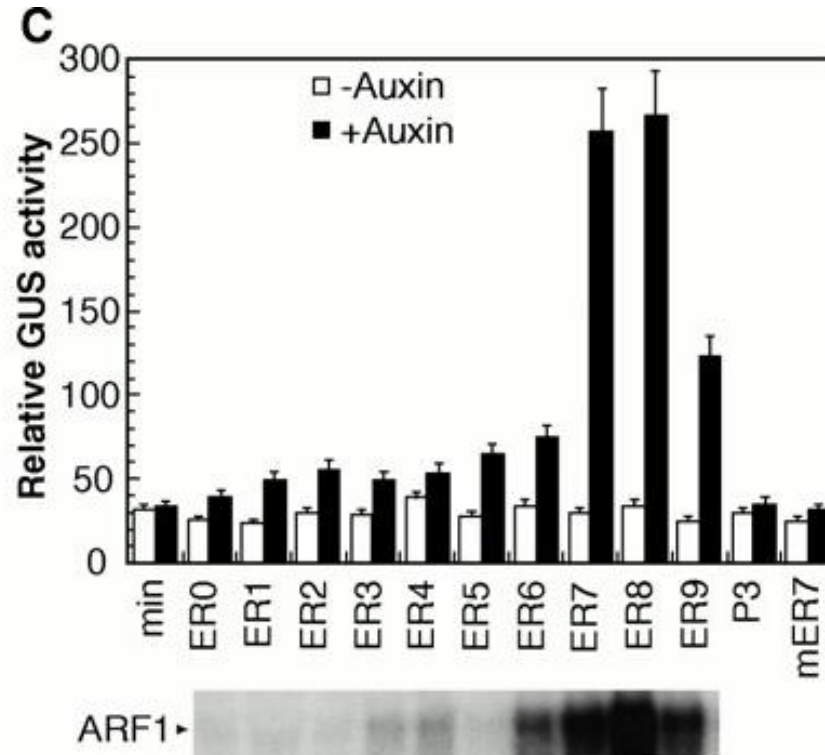


Frage:
Ist der Basenabstand von Bedeutung ?



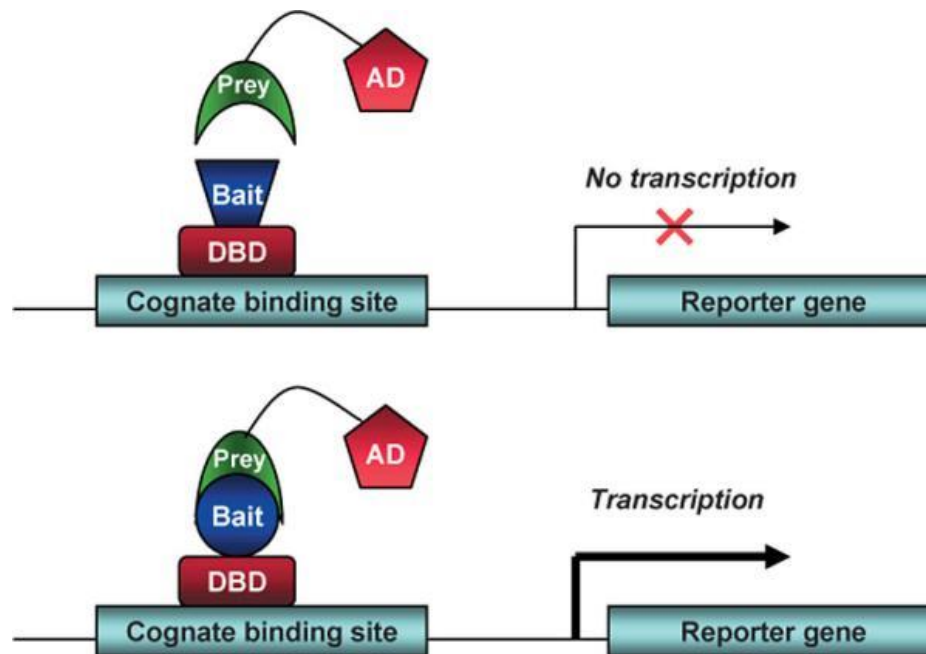
quantitativer GUS assay

QUANTITATIVER GUS ASSAY



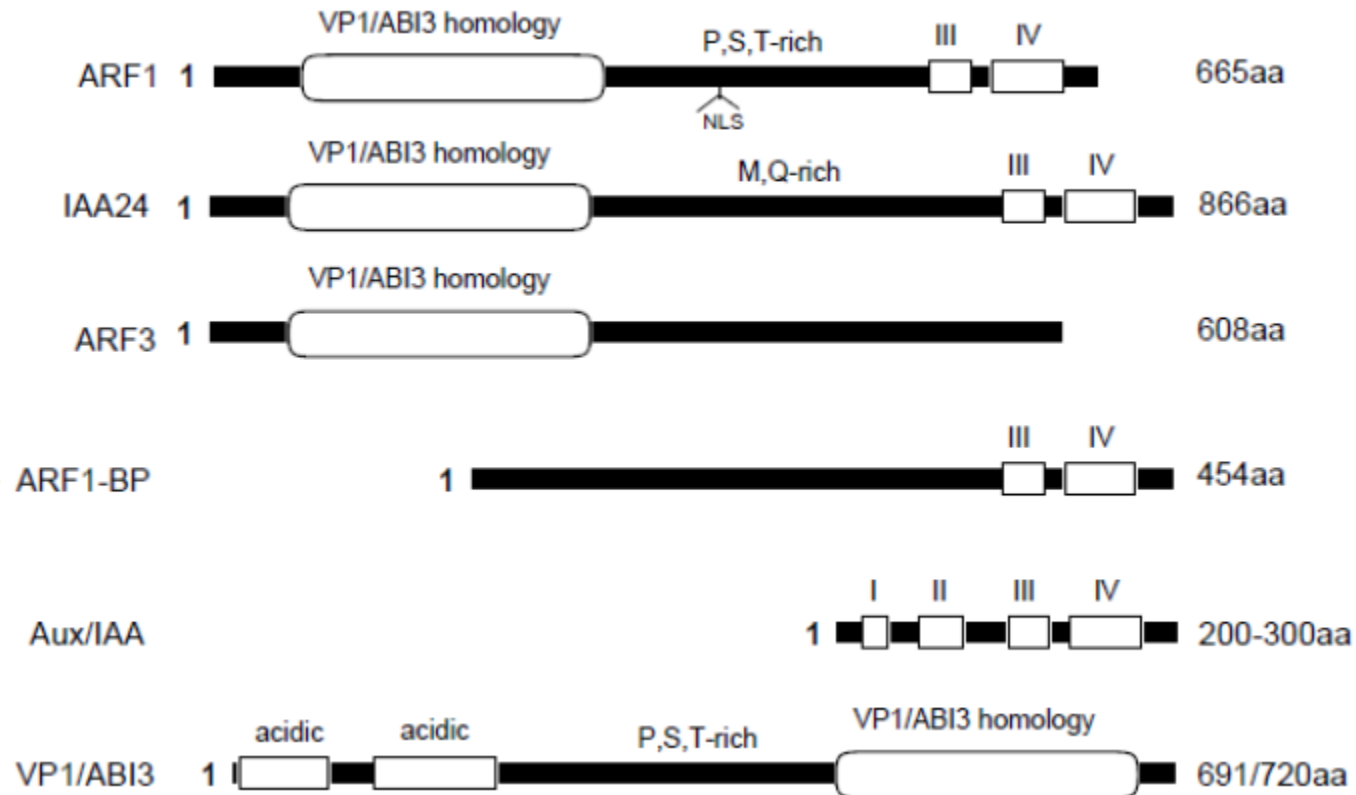
Fazit: Wenn der Abstand der ER's 7 bis 8 Basen beträgt, ist die Auxin response am stärksten → mögliche Dimerbildung?

YEAST-TWO-HYBRID SYSTEM

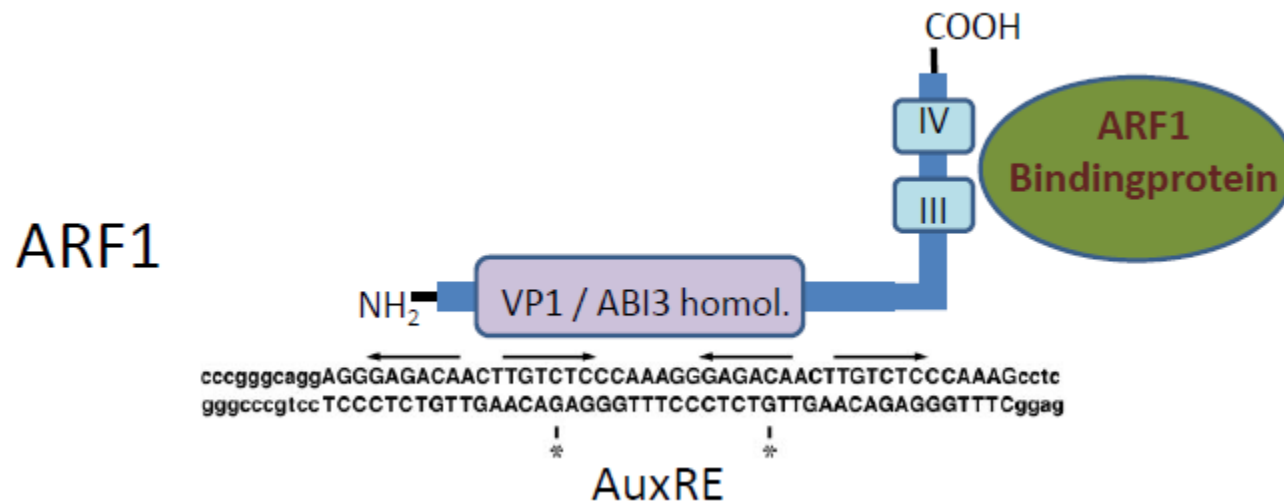


- In-vivo Methode zum Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen
- Das Bait-Fusionsprotein bindet an die GAL4 -Bindestelle vor einem Reportergen im Genom einer Hefezelle. Ein Prey bindet an das Bait-Fusionsprotein. Daraus resultiert eine Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors und die Expression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

DAS ARF1 BINDEPROTEIN



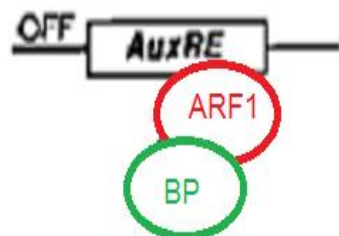
DAS ARF1 BINDEPROTEIN



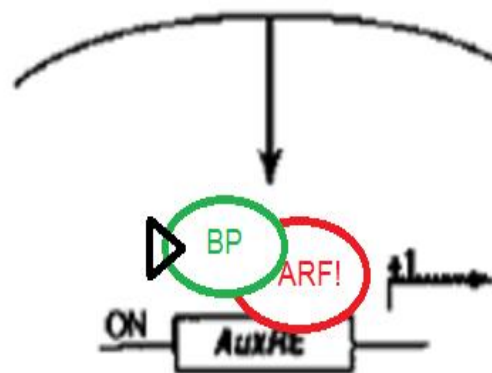


A. Direct

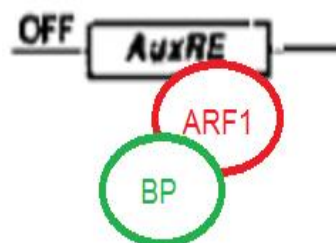
-Auxin



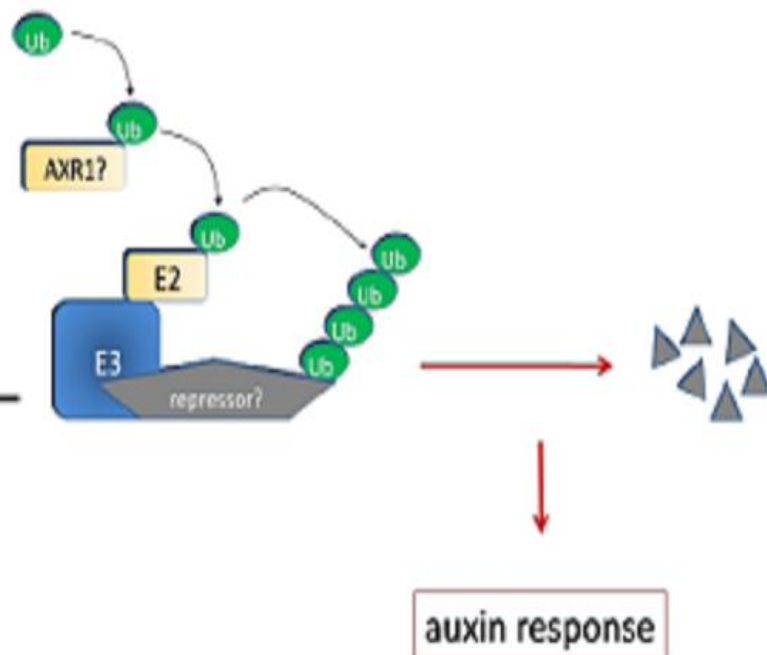
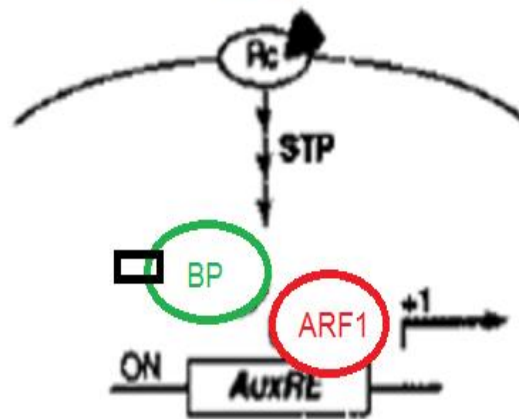
+Auxin



B. Indirect



PM



R : Repressor
A : Activator
Rc : Receptor

AuxRE : Auxin Responsive Element
PM : Plasma membrane
STP : Signal transduction pathway

▲ : Auxin
■ : "Modification"

ZUSAMMENFASSUNG

- Identifizierung und nähere Charakterisierung des Transkriptionsfaktors ARF1 (Aminosäuresequenz, Homologien zu anderen Proteinen)
- Nähere Strukturbestimmung der AuxREs (palindromischer Aufbau)
- Bindungsvoraussetzung für ARF1 sind ERs, 7-8bp Abstand
- Identifizierung des ARF1-BP (Sequenzhomologie Box III+IV)

Nächste Woche

Philipp und Bruno

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