

Auxin regulates SCF^{TIR1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins

William M. Gray^{*†}, Stefan Kepinski^{†‡}, Dean Rouse^{‡§}, Ottoline Leyser[‡] & Mark Estelle^{*}

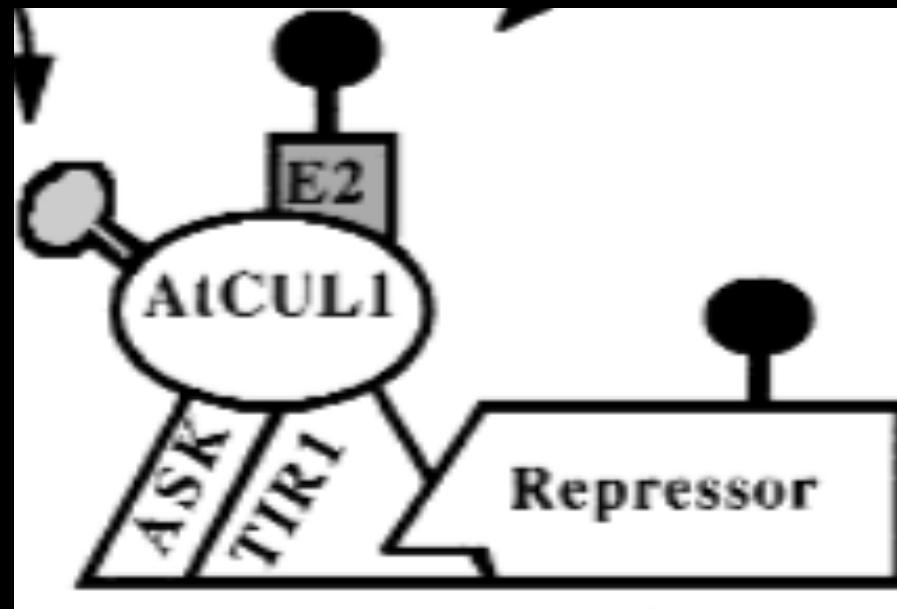
** The Institute for Cellular and Molecular Biology, The University of Texas at Austin, Austin, Texas 78712, USA*

‡ Department of Biology, University of York, Box 373, York YO10 5YW, UK

† These authors contributed equally to the work

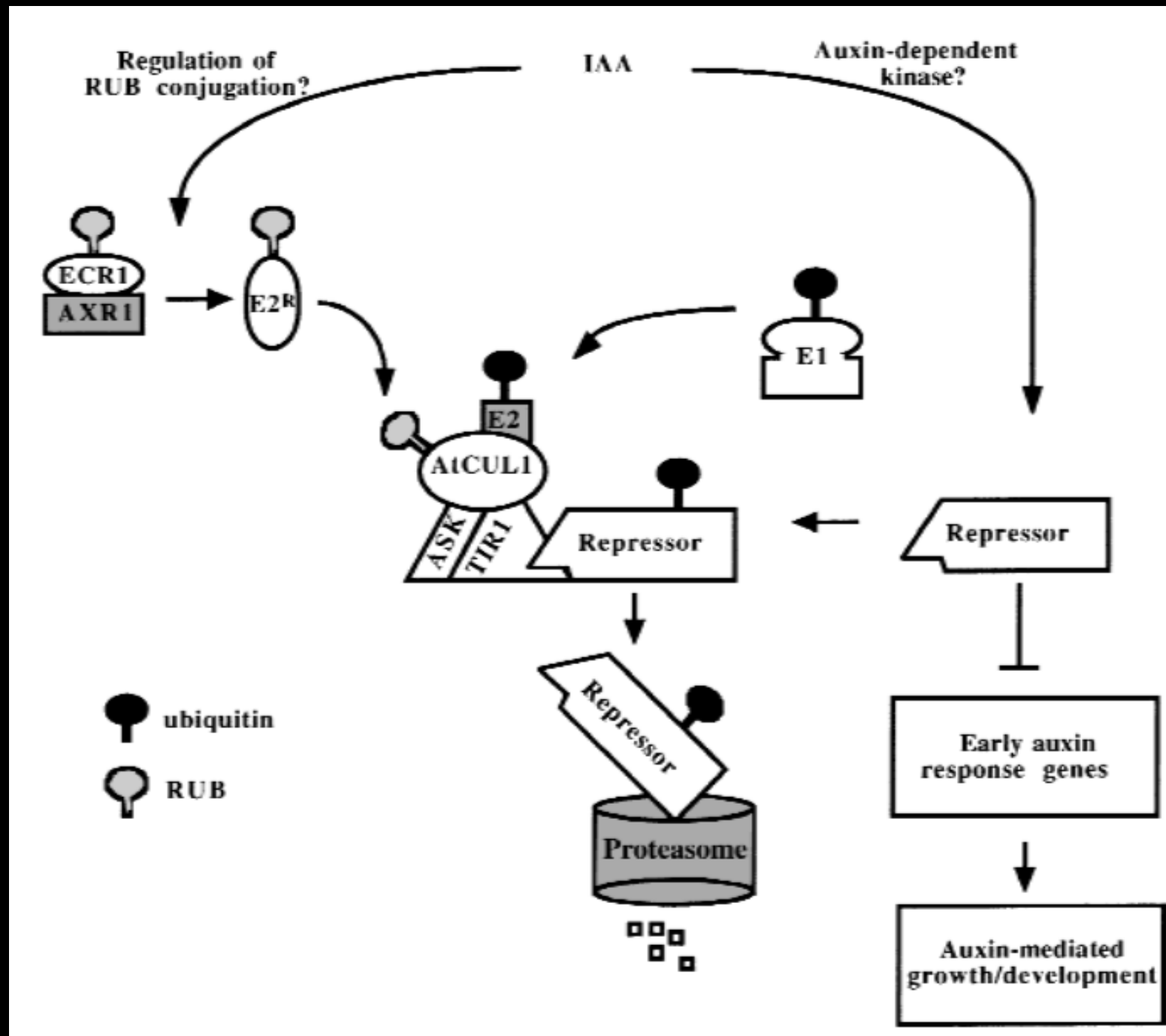
Ergebnisse der letzten Woche

- Auxin Antwort ist abhängig vom Ubiquitin-Ligase Komplex SCF^{TIR1}
- Komplex besteht aus ASK, AtCUL1 und dem F-box Protein TIR1
- Mutationen in ASK1 oder TIR1 resultieren in verminderter Auxin Antwort
- Überexpression in TIR1 fördert Auxin Antwort



Grey et al. 1999

Modell der letzten Woche



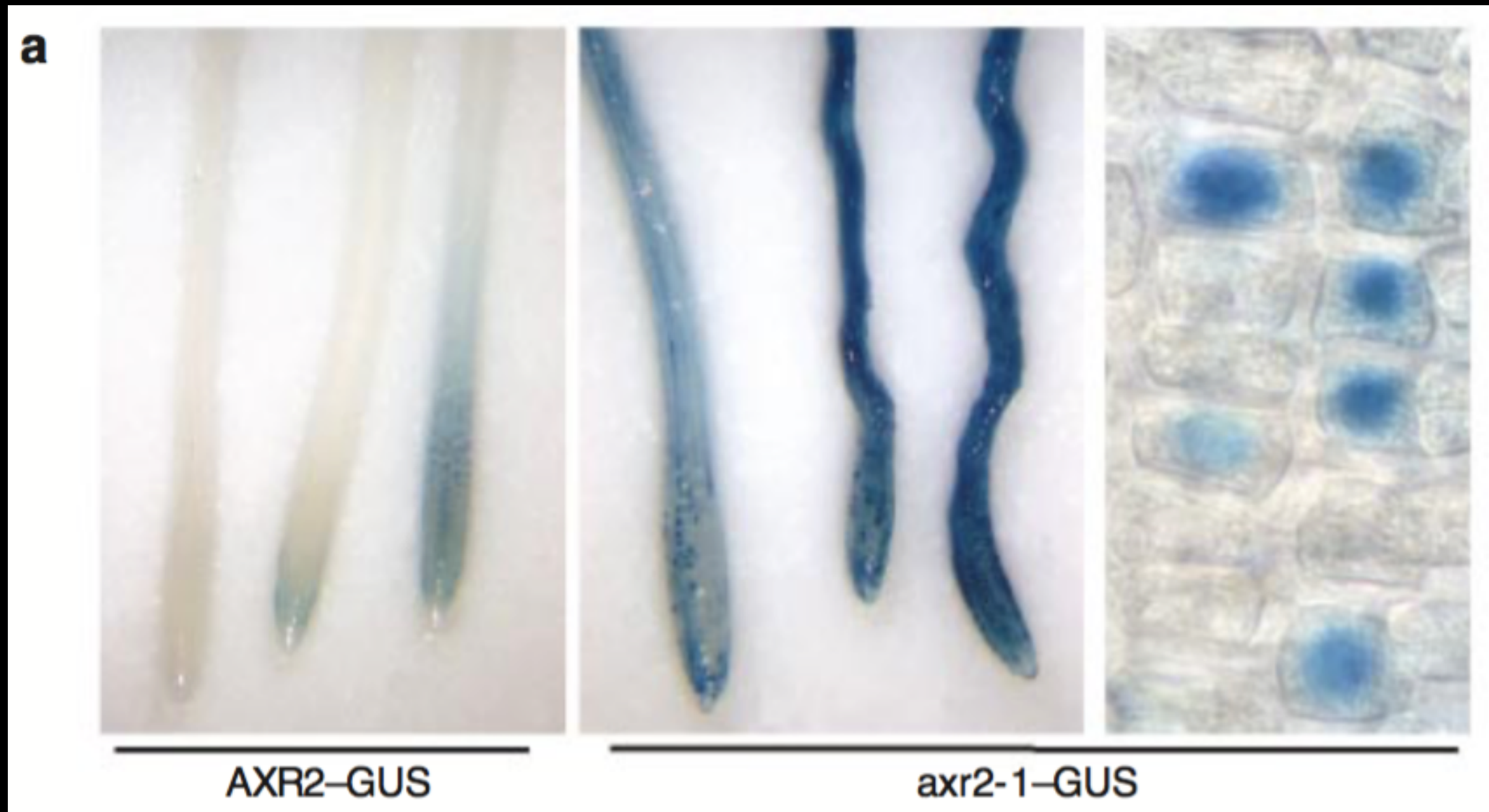
- Als Antwort auf Auxin ubiquitiniert SCF^{TIR1} Repressoren
- Ubiquitinierung erfordert AXR1-ECR1 vermittelte RUB Modifikation von AtCUL1
- dadurch dann Expression von Auxin abhängigen Genen

Grey et al. 1999

Hypothese

AUX/IAA Proteine werden vom SCF^{TIR}-Komplex
abgebaut

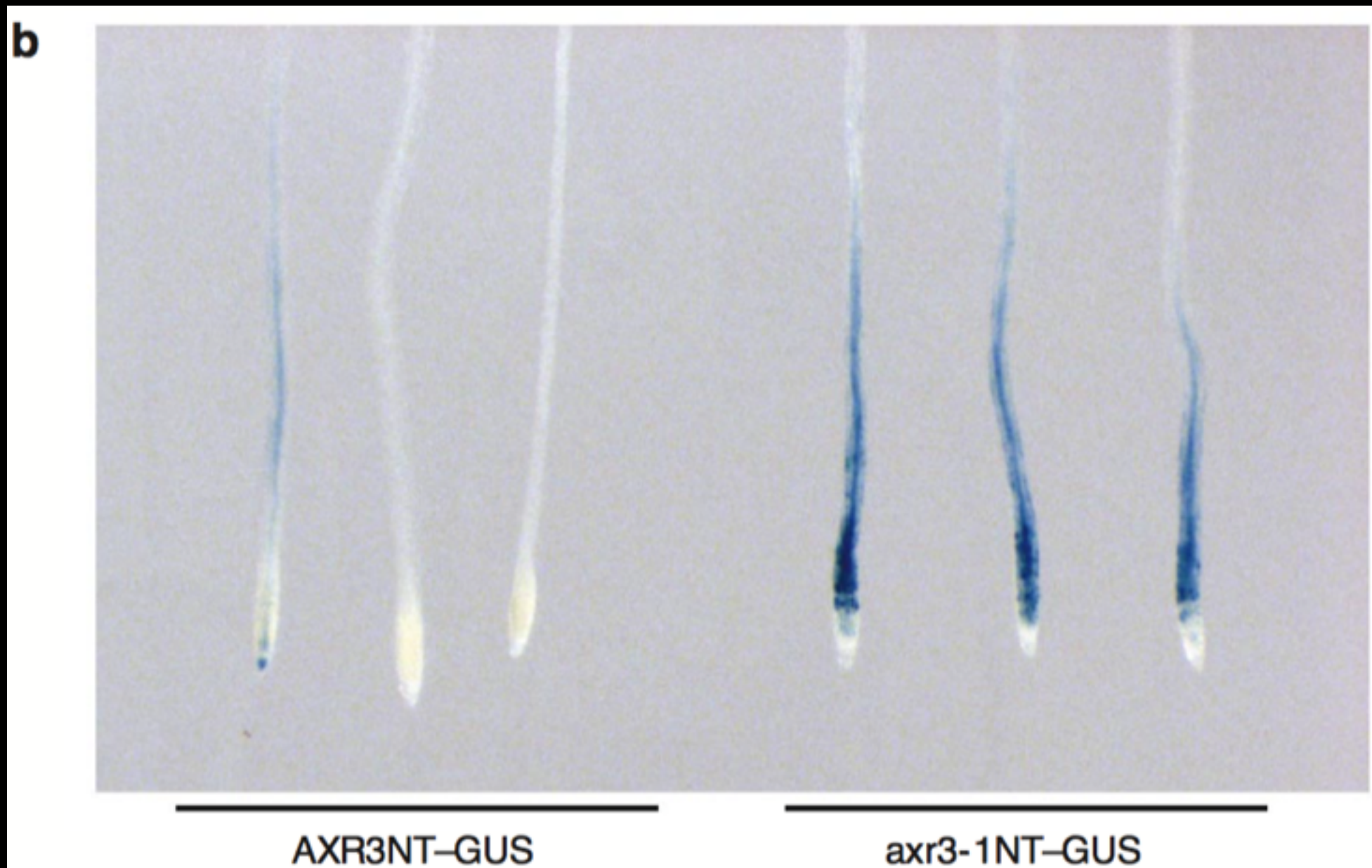
1. Analyse der AUX/IAA Stabilität



Mutante weist höhere Stabilität von AUX/IAA auf

1. Analyse der AUX/IAA Stabilität

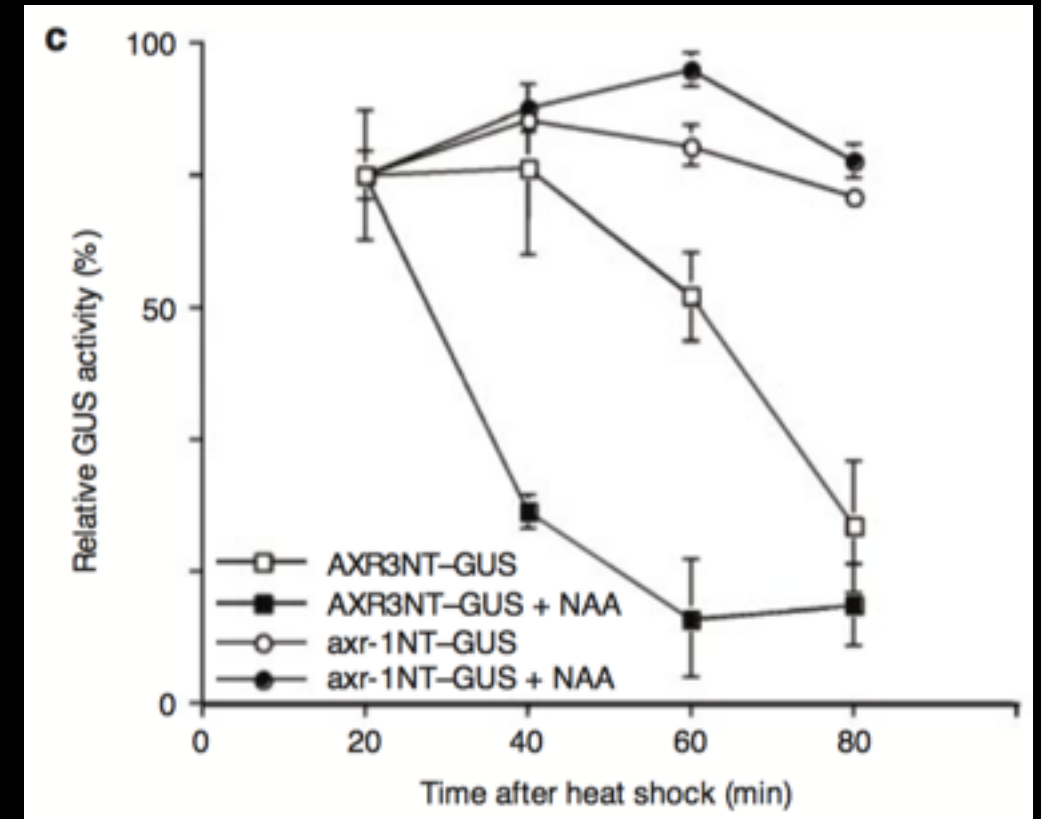
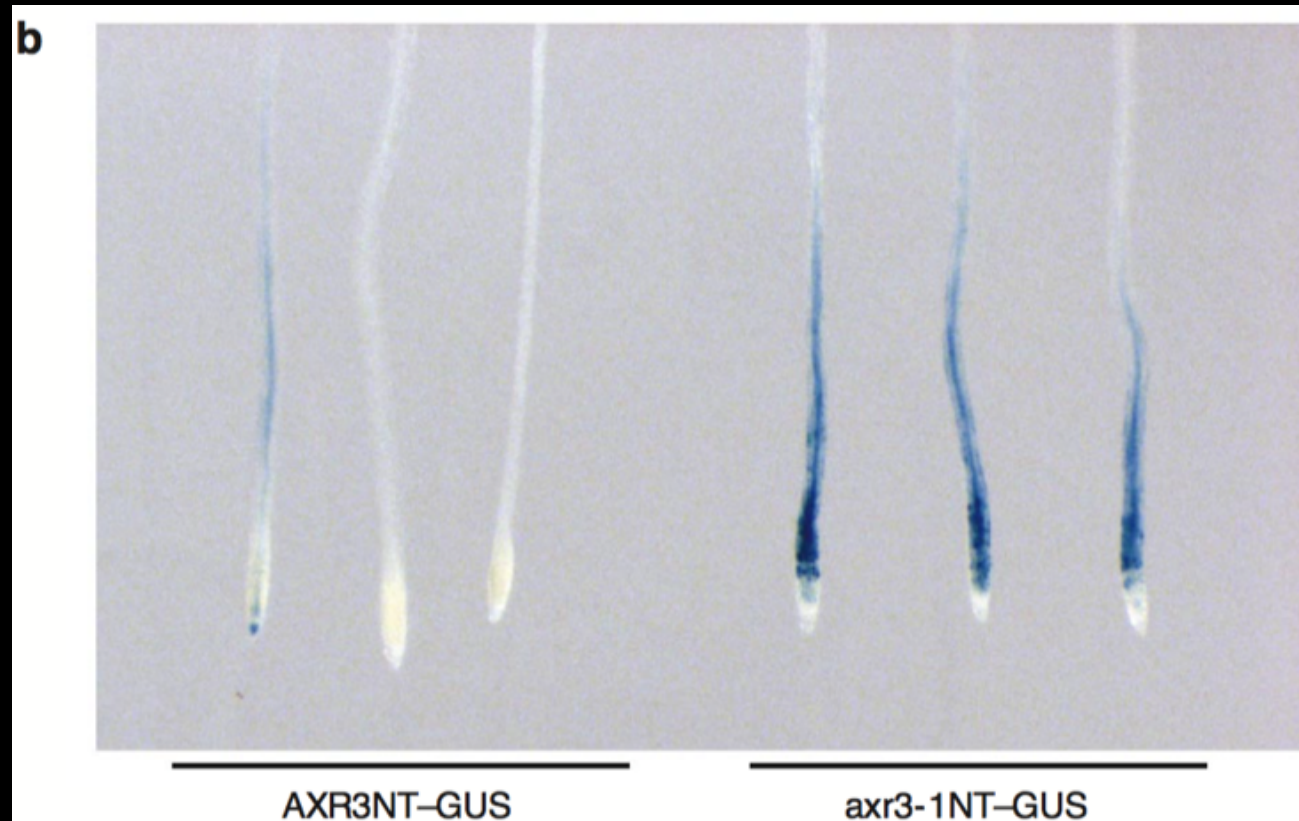
Konstrukt mit Hitzeschock Promotor



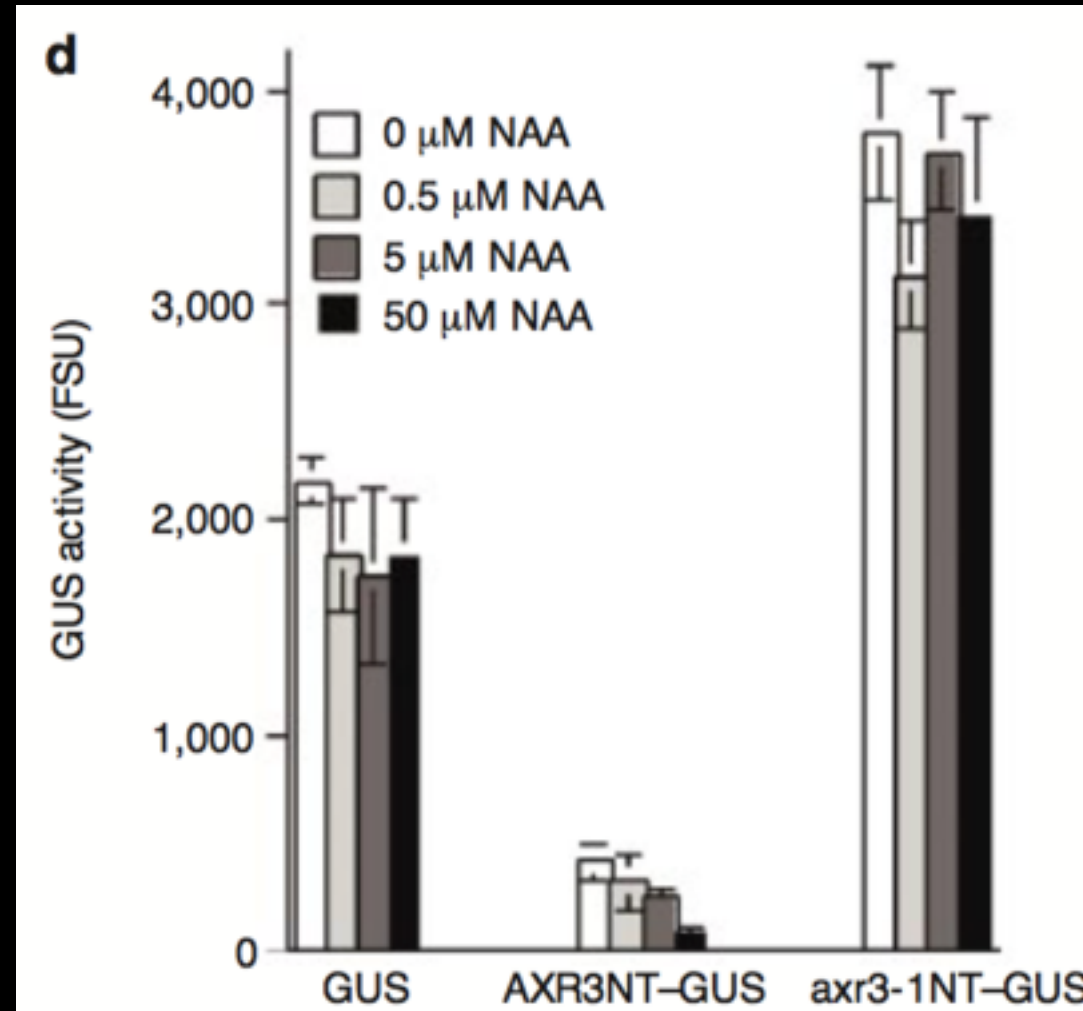
60 Minuten nach Hitzeschock erfolgte Untersuchung

Mutante ebenfalls höhere Protein Stabilität

1. Analyse der AUX/IAA Stabilität



1. Analyse der AUX/IAA Stabilität



Erkenntnisse

1. Auxin hat einen destabilisierenden Effekt auf AUX/IAA Proteine

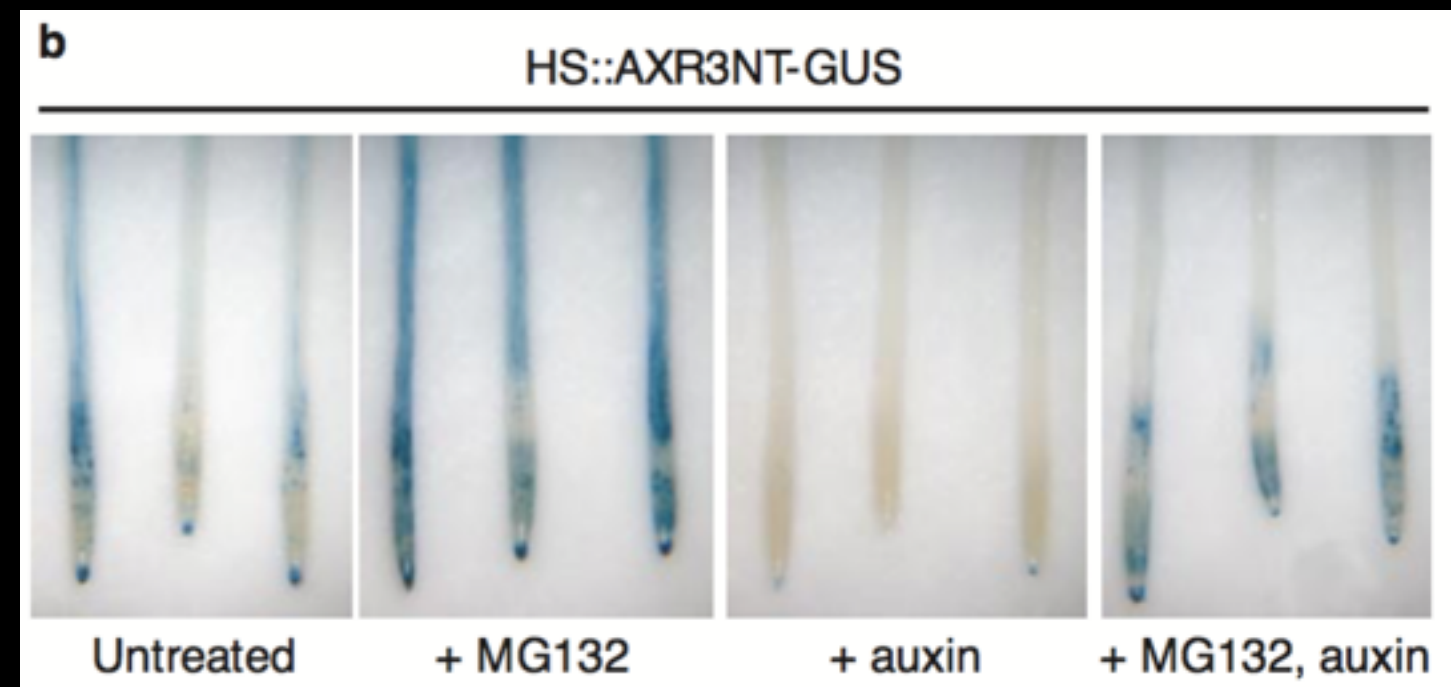
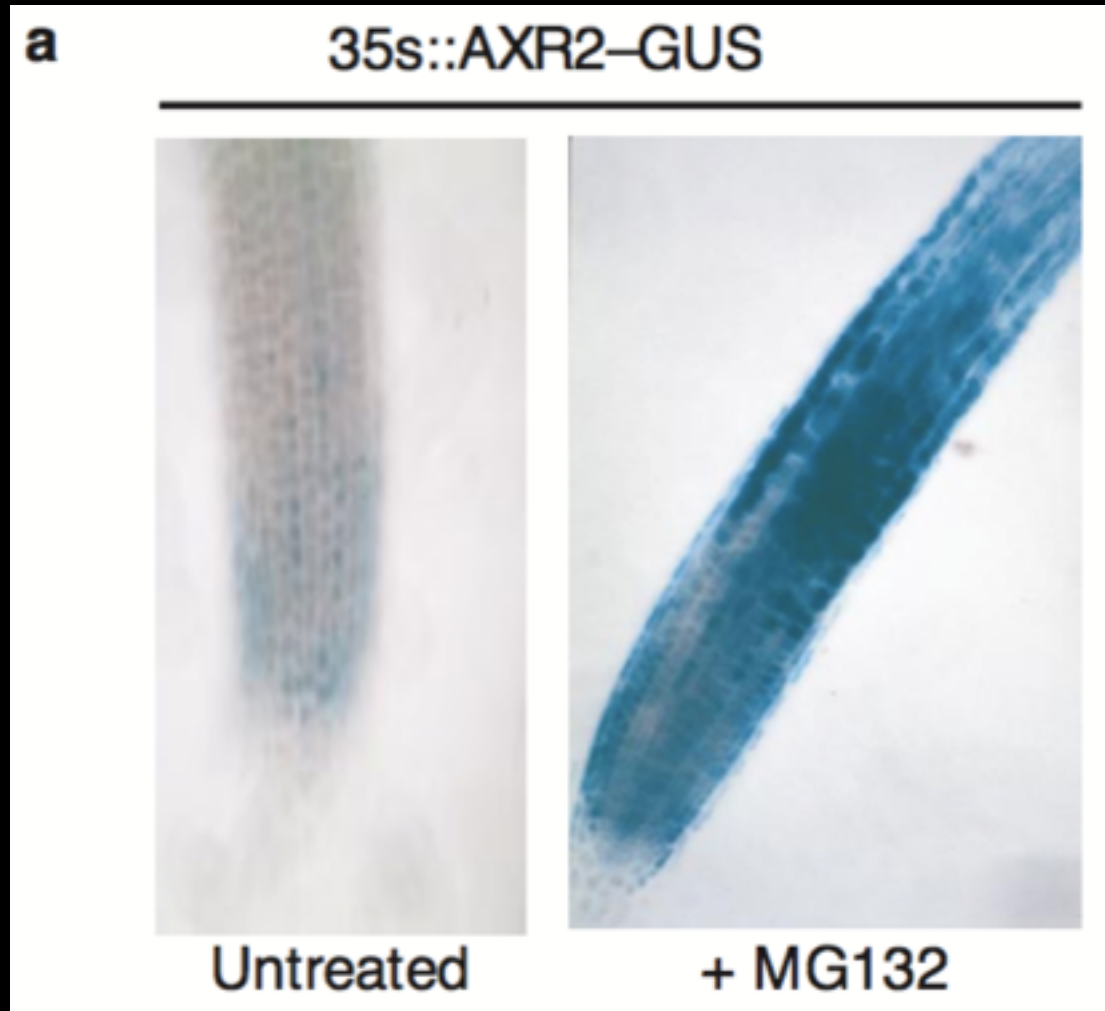
→ Konzentration und Zeitabhängig

2. Domäne II der AUX/IAA Proteine wichtig für deren Abbau

Nächste Fragestellung:

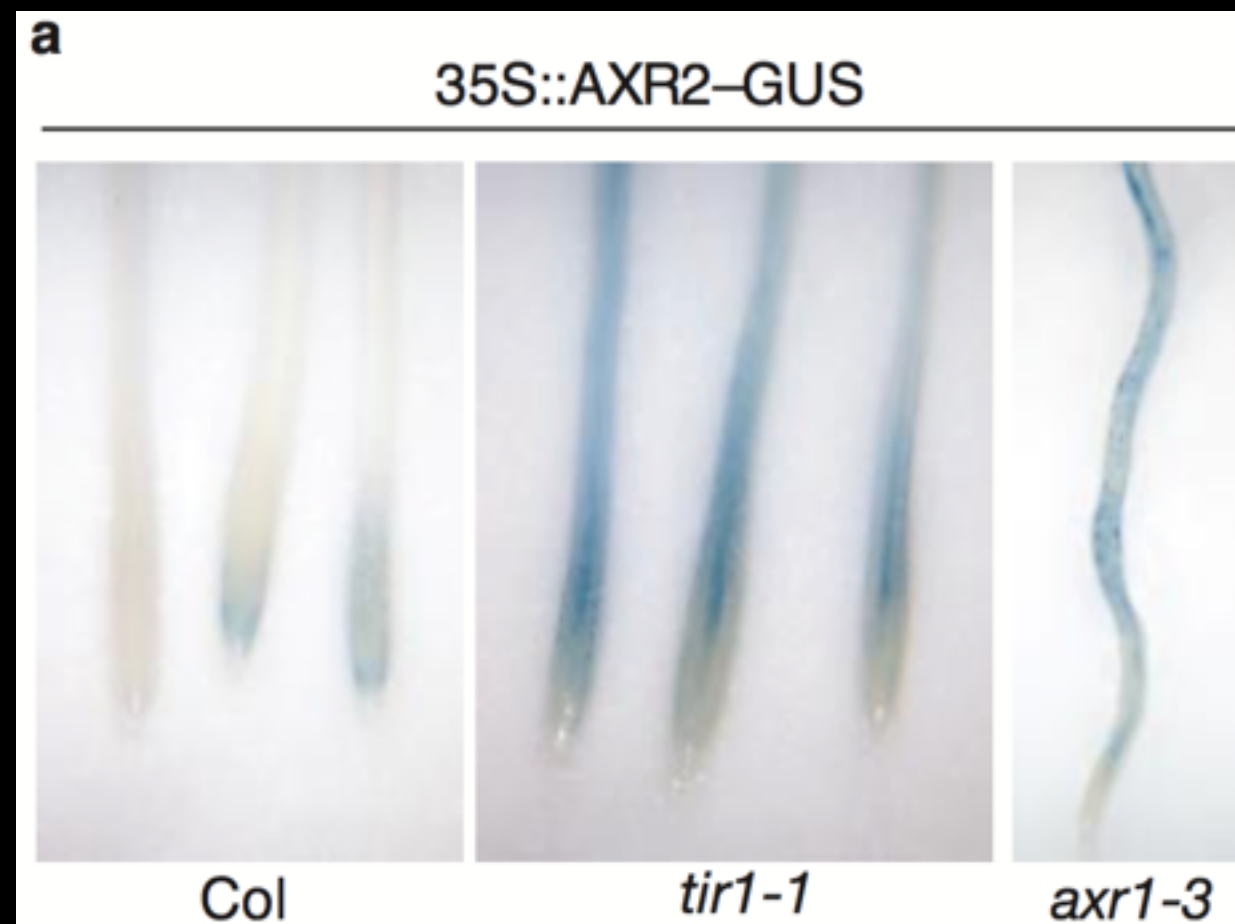
Ist der Abbau von AUX/IAA vom SCF^{TIR1} Komplex abhängig?

2. Ist der Abbau von AUX/IAA vom SCF^{TIR1} Komplex abhängig?

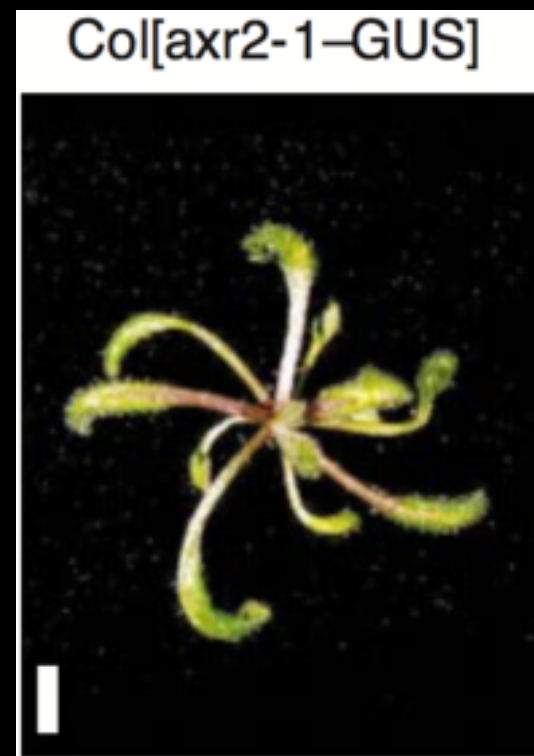
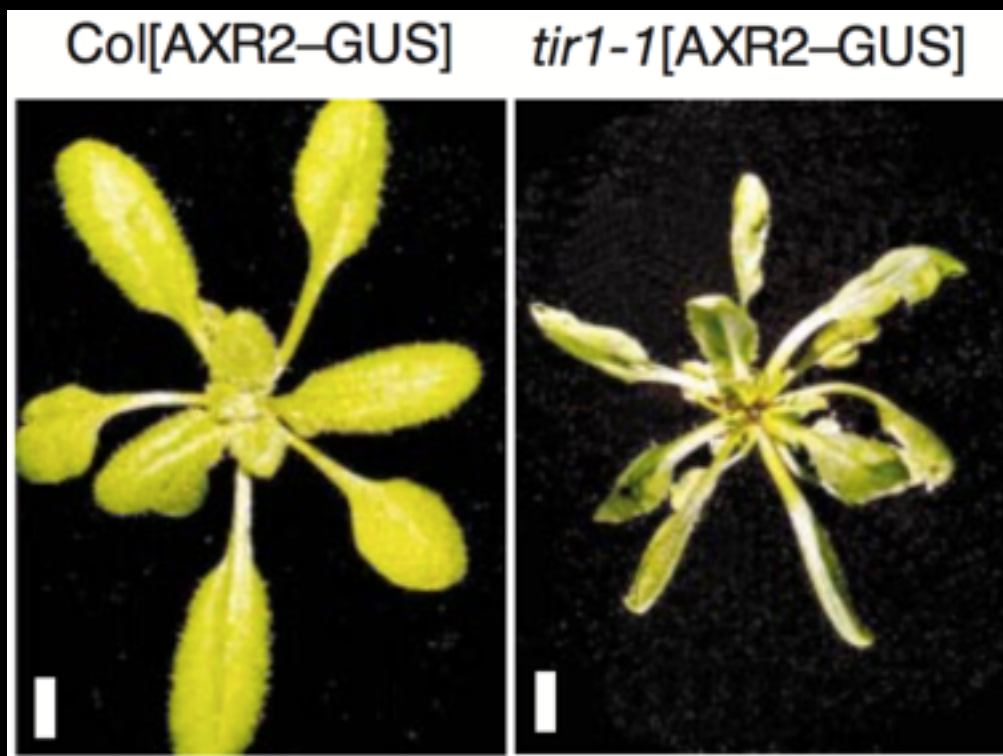


MG132 = Proteasom Inhibitor

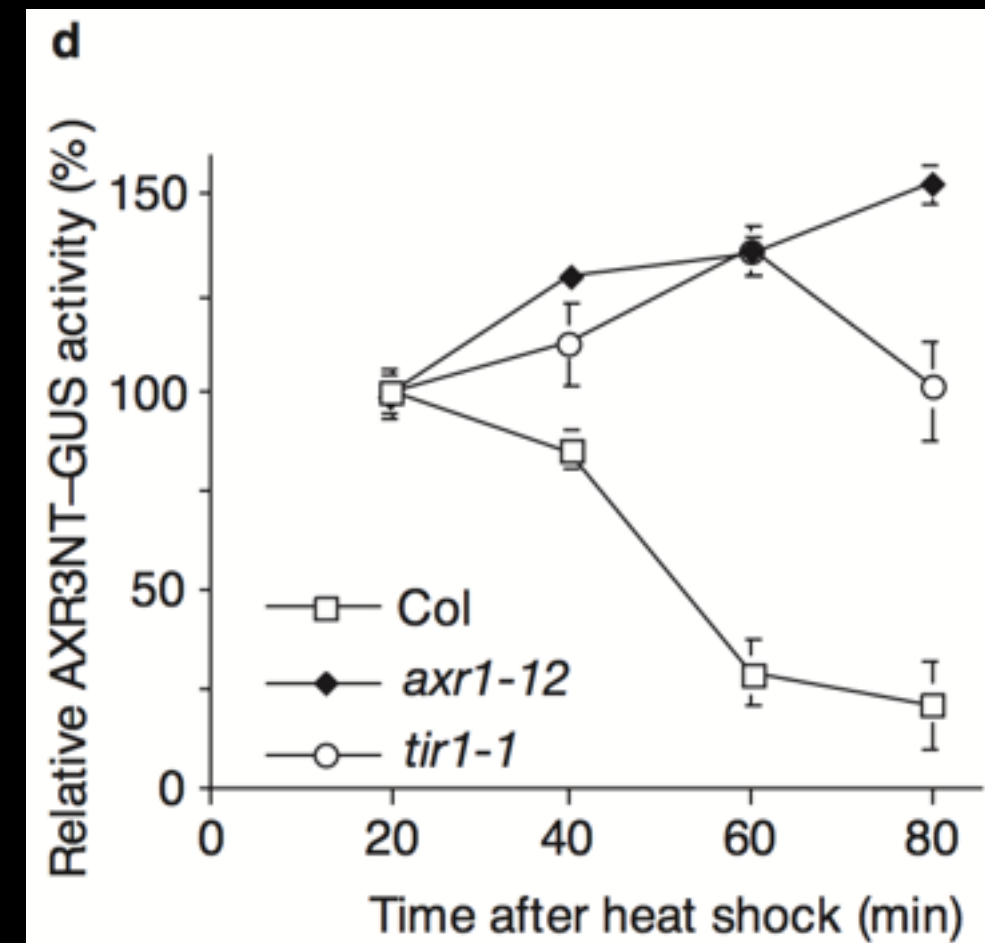
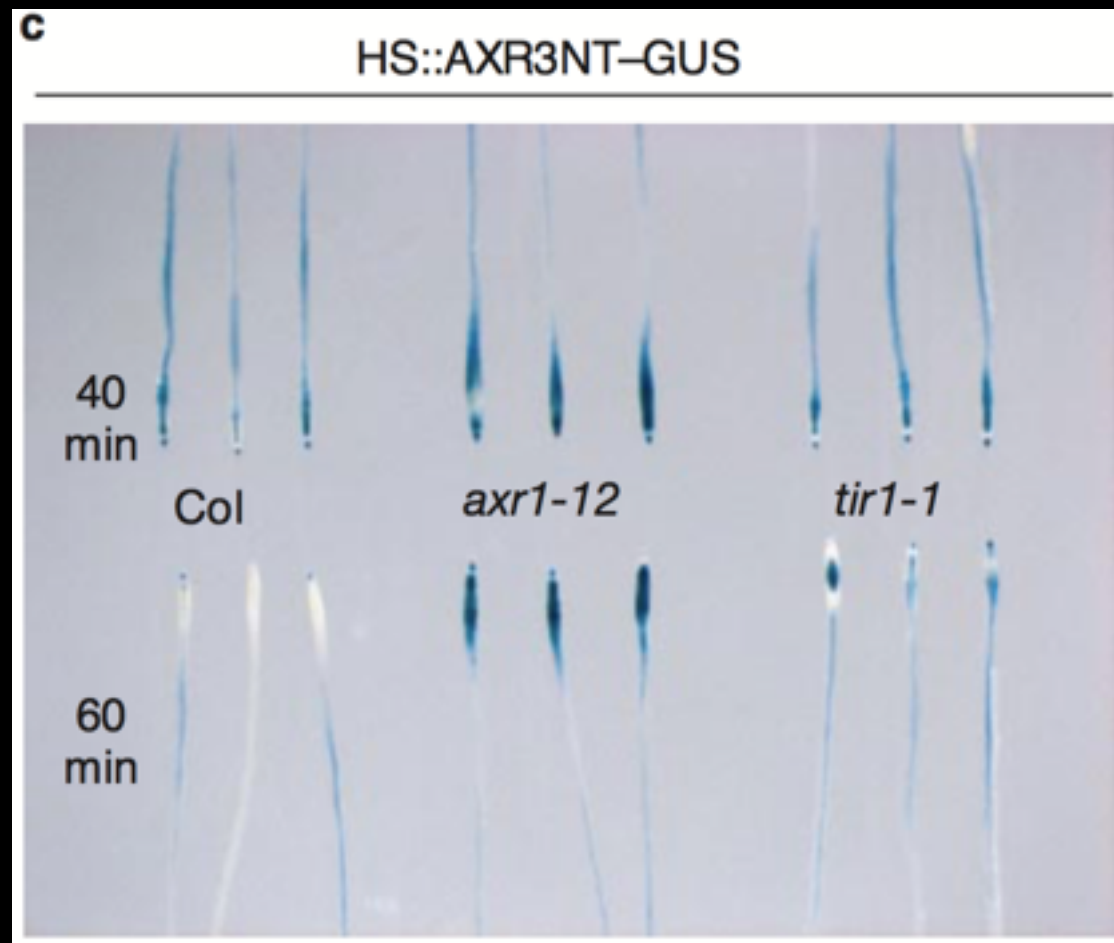
2. Ist der Abbau von AUX/IAA vom SCF^{TIR1} Komplex abhängig?



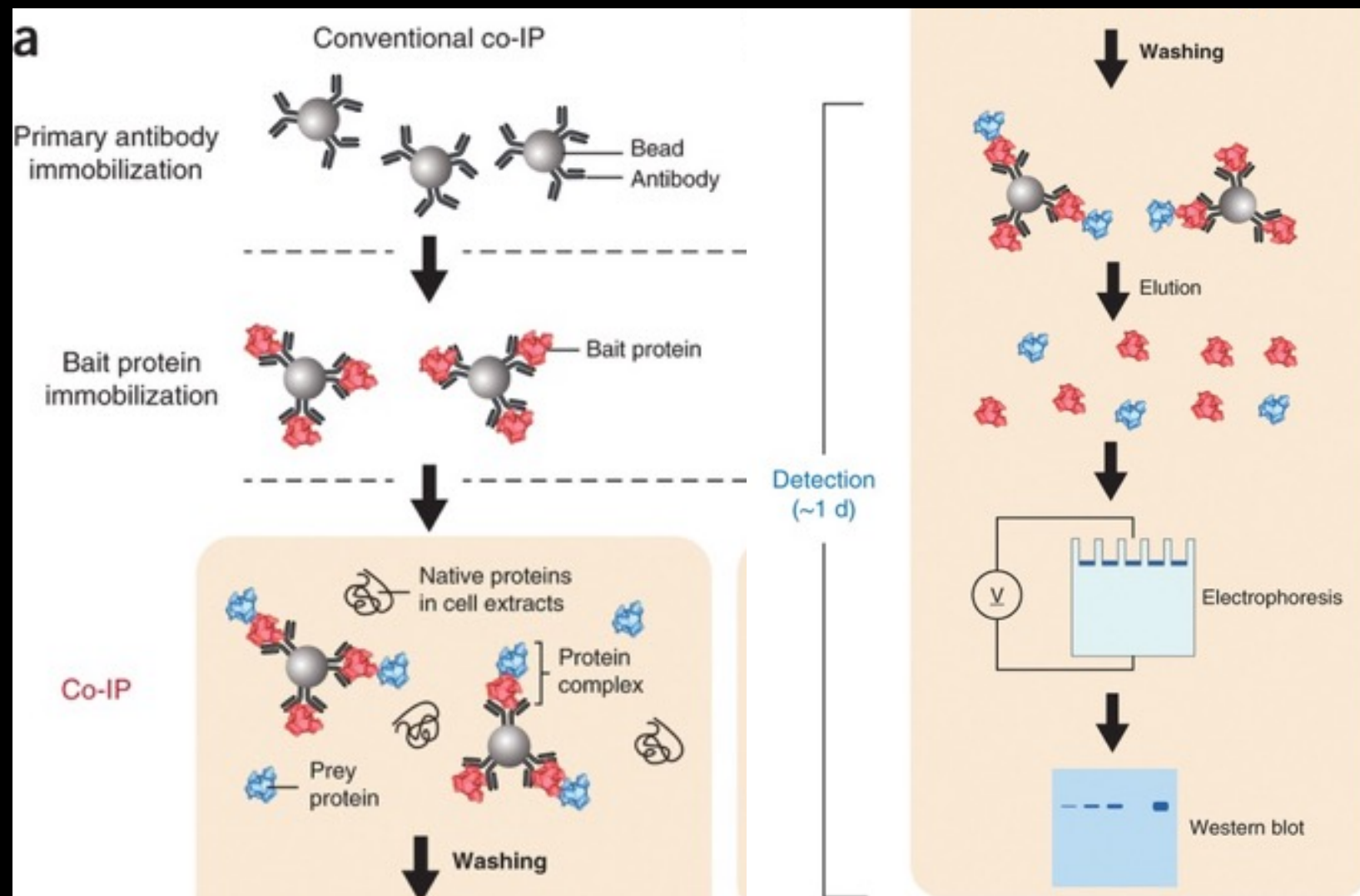
2. Ist der Abbau von AUX/IAA vom SCF^{TIR1} Komplex abhängig?



2. Ist der Abbau von AUX/IAA vom SCF^{TIR1} Komplex abhängig?

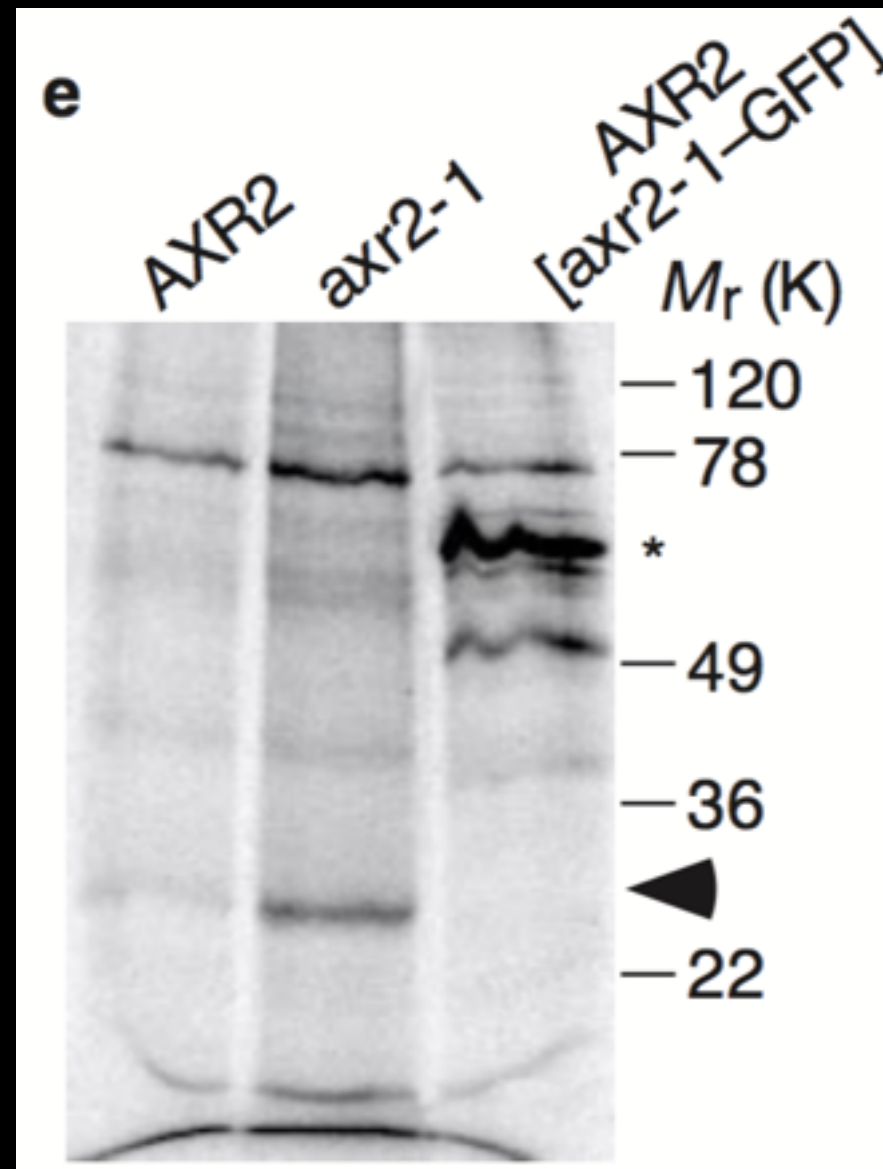


Erinnerung: Immunopräzipitation



<http://www.nature.com/nprot/journal/v8/n10/images/nprot.2013.116-F1.jpg>

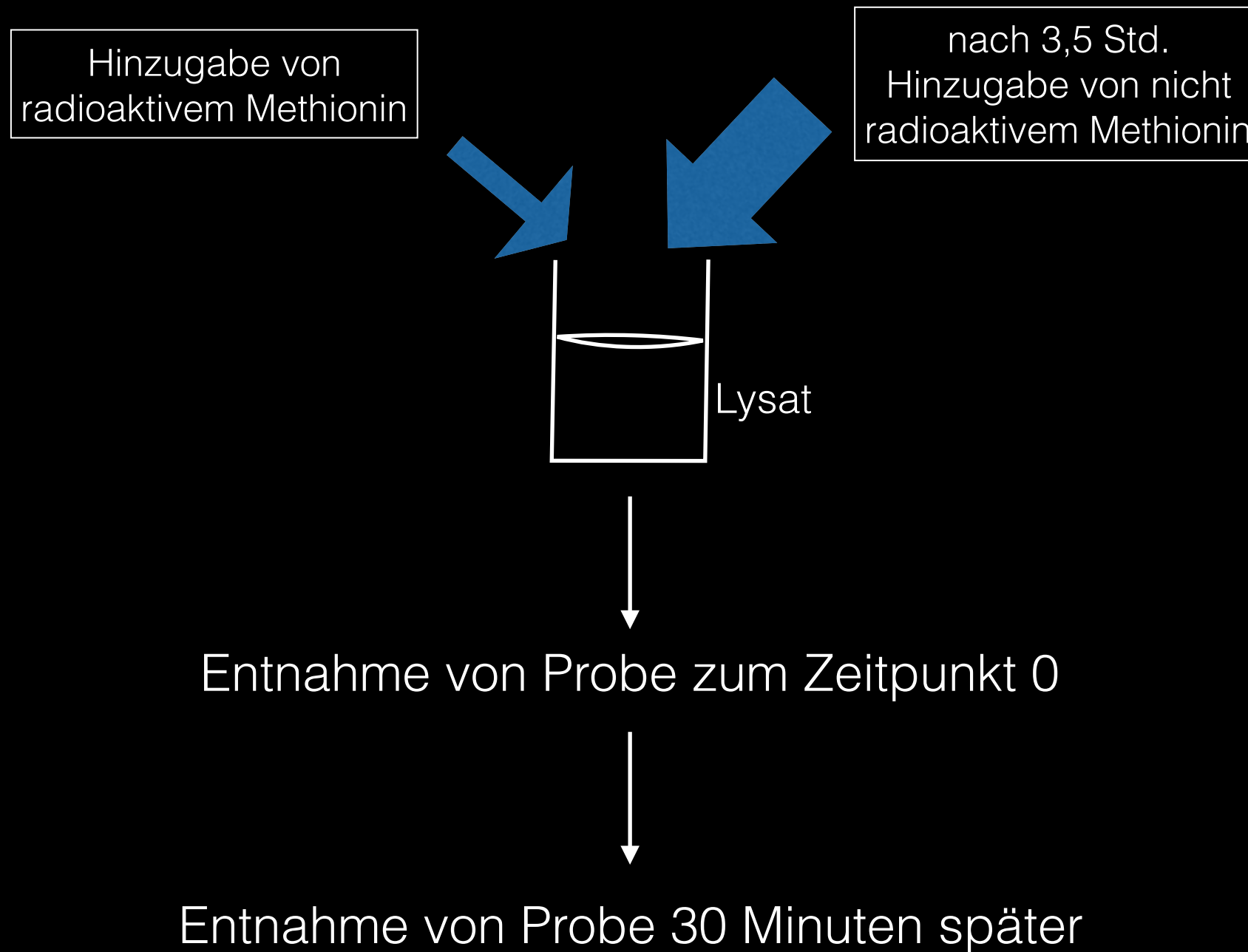
2. Ist der Abbau von AUX/IAA vom SCF^{TIR1} Komplex abhängig?



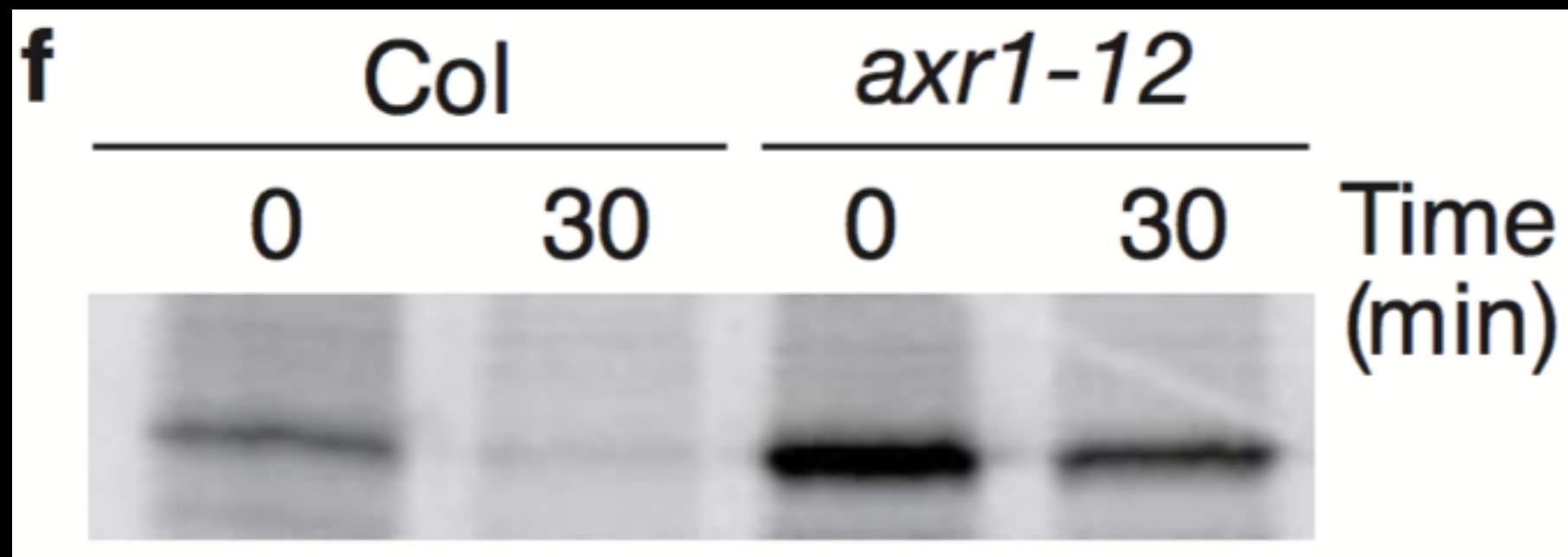
gelabelt mit [³⁵S]-Methionin

2. Ist der Abbau von AUX/IAA vom SCF^{TIR1} Komplex abhängig?

Pulse Chase



2. Ist der Abbau von AUX/IAA vom SCF^{TIR1} Komplex abhängig?



Immunopräzipitiert mit AXR2 Antikörper

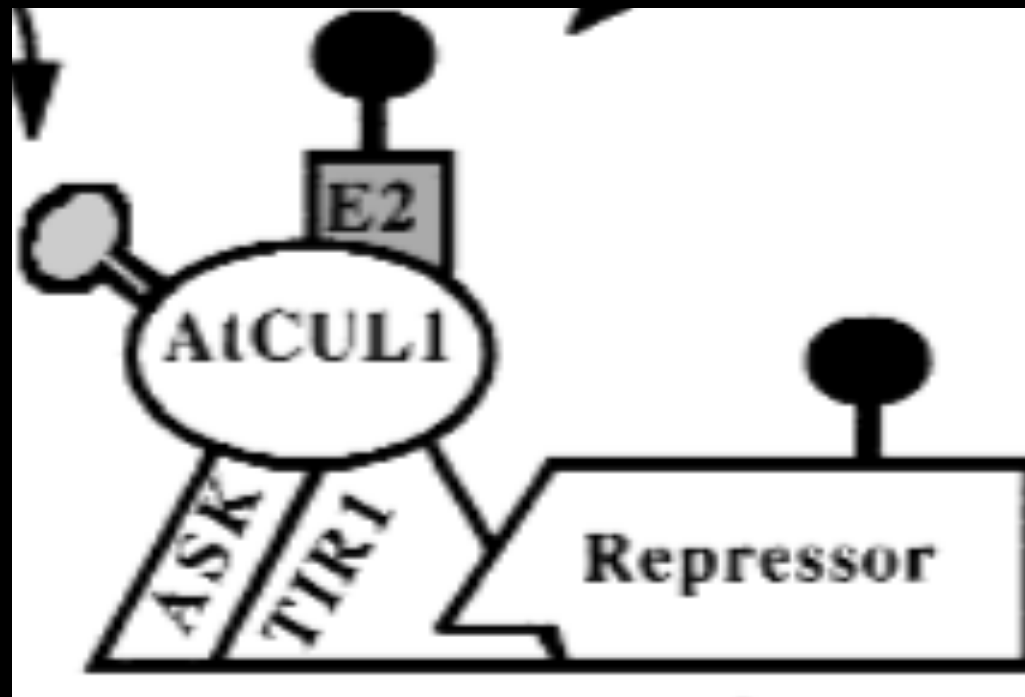
Erkenntnisse

SCF^{TIR1} ist in den Abbau von AUX/IAA Proteinen involviert

Nächste Fragestellung:

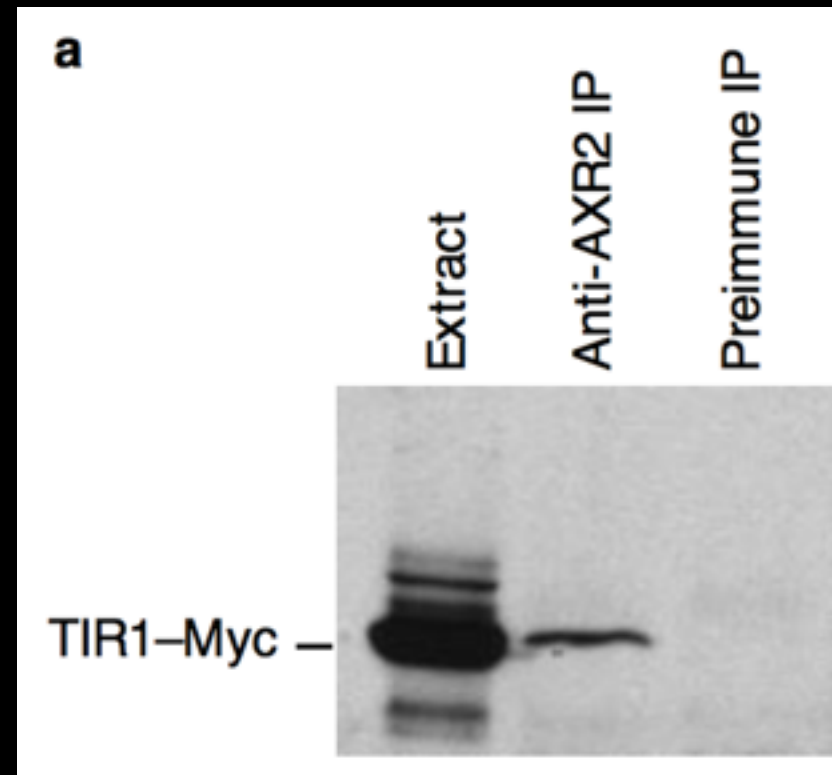
Interagiert SCF^{TIR1} Komplex mit AUX/IAA Proteinen?

Erinnerung: Aufbau des SCF^{TIR1}-Komplex



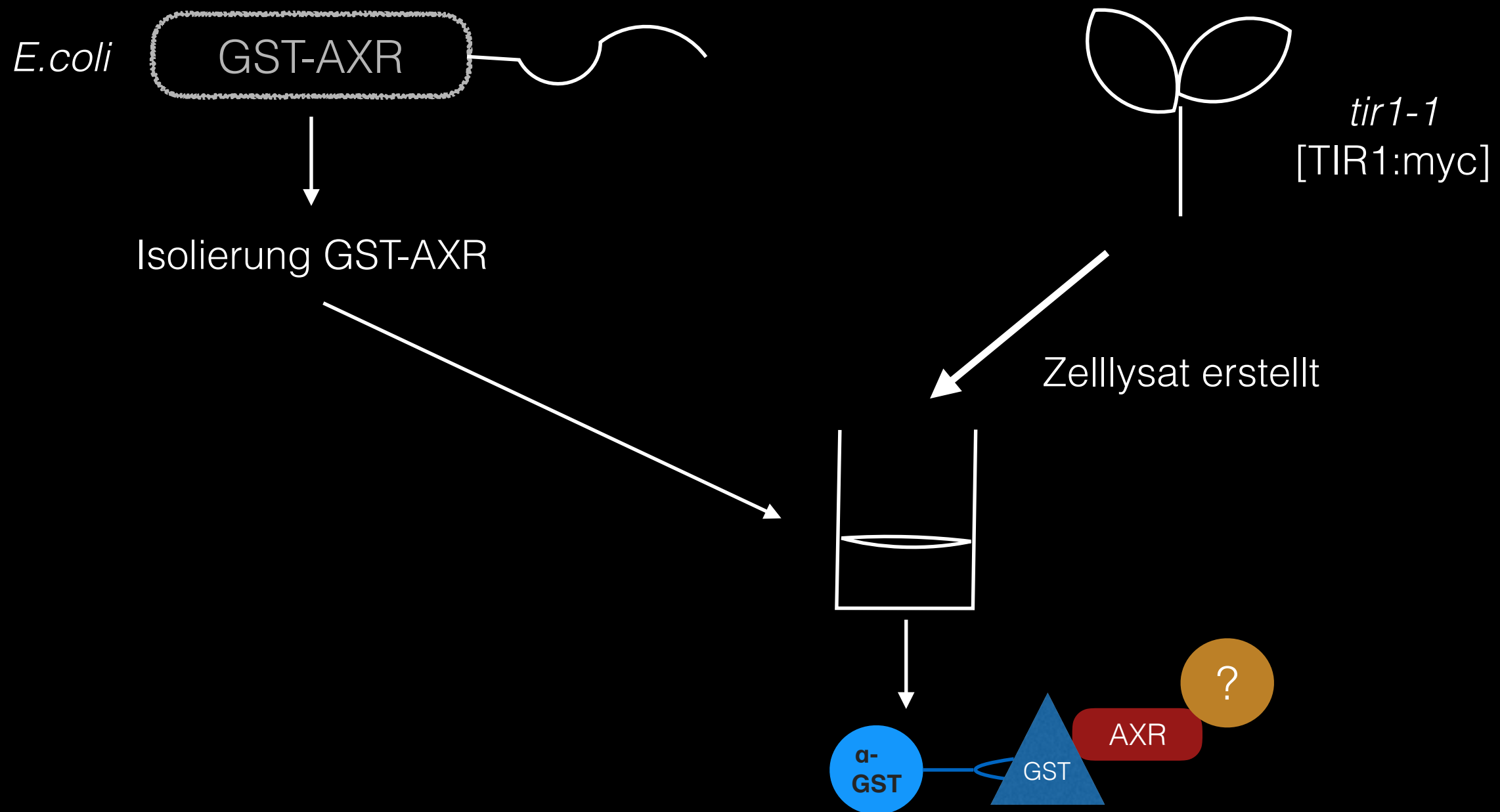
Grey et al. 1999

3. Interagiert SCF^{TIR1} Komplex mit AUX/IAA Proteinen?

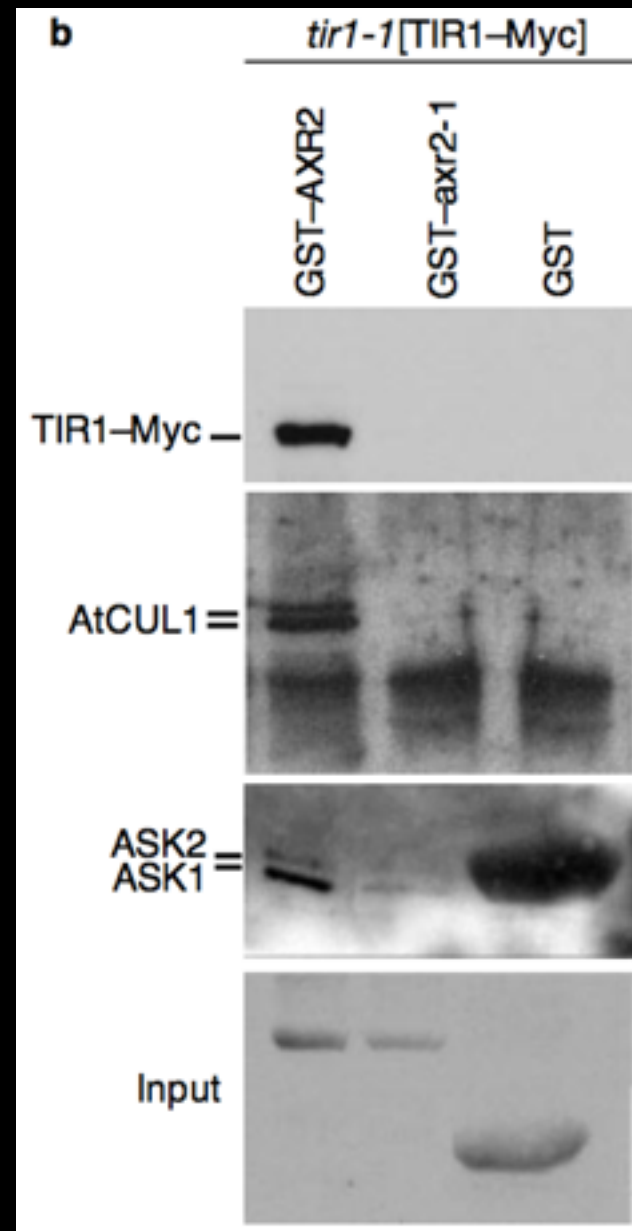


3. Interagiert SCF^{TIR1} Komplex mit AUX/IAA Proteinen?

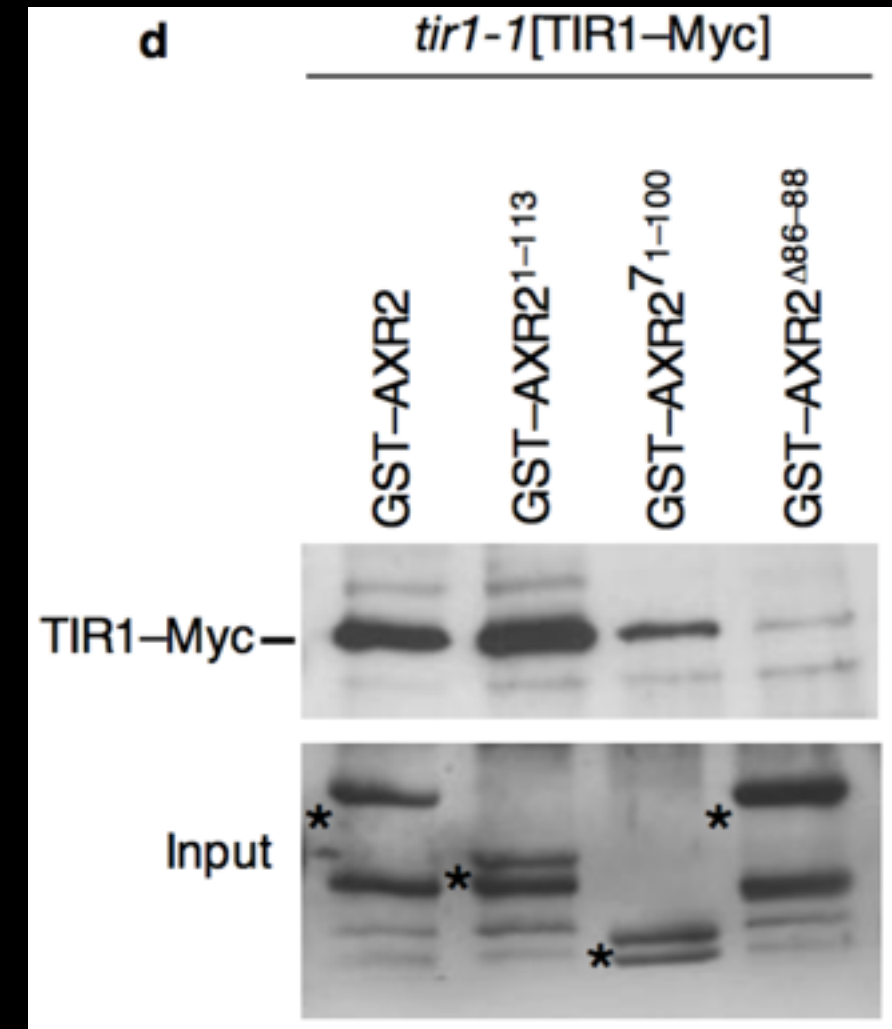
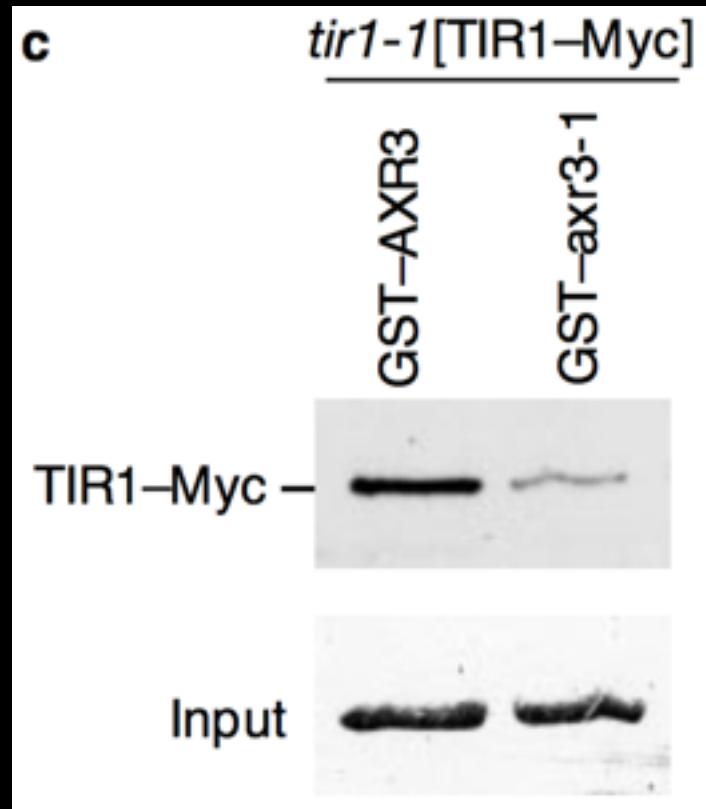
Herstellung GST getaggtter AXR Proteine



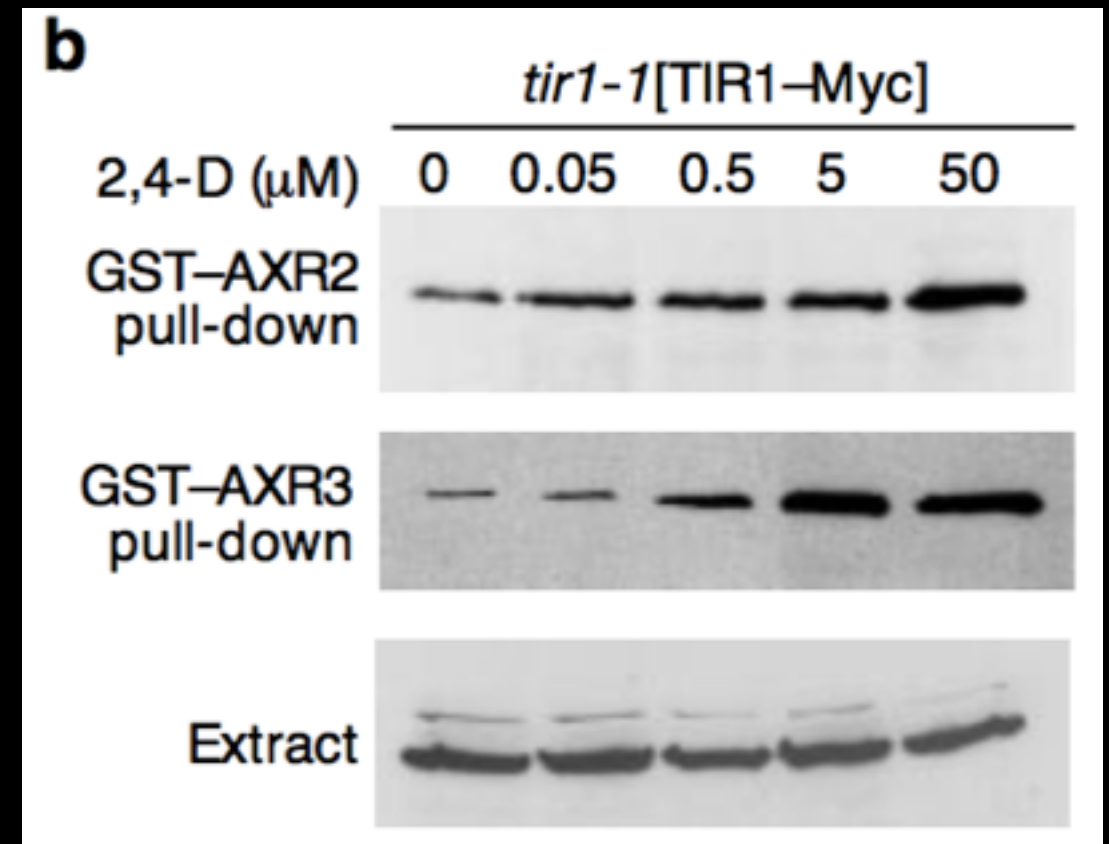
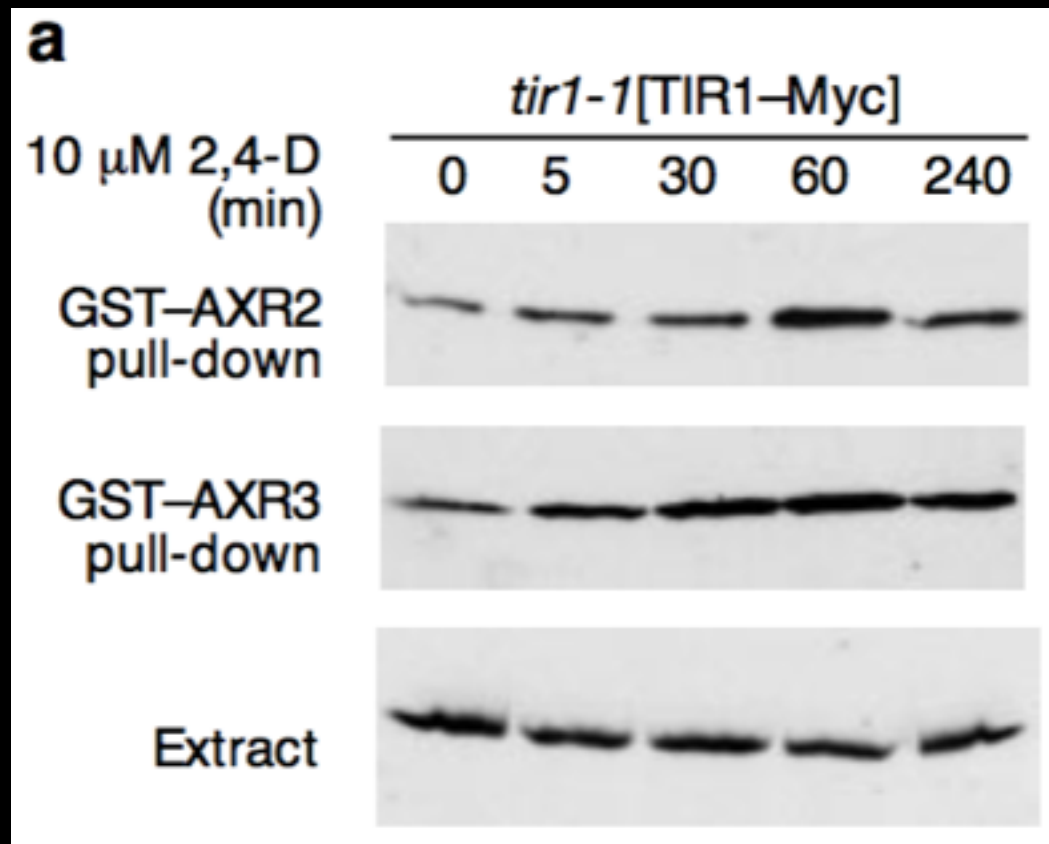
3. Interagiert SCF^{TIR1} Komplex mit AUX/IAA Proteinen?



3. Interagiert SCF^{TIR1} Komplex mit AUX/IAA Proteinen?



3. Interagiert SCF^{TIR1} Komplex mit AUX/IAA Proteinen?



Erkenntnisse

- AUX/IAA Proteine interagieren direkt mit SCF^{TIR1}-Komplex
- Auxin hat einen positiven Effekt auf die Interaktion
 - dieser Effekt ist Konzentrations- und Zeitabhängig

Aktualisiertes Modell

