

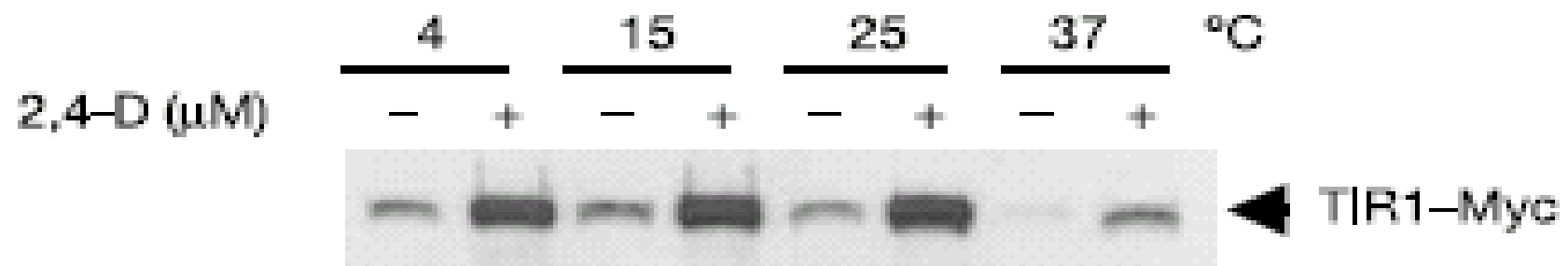
The F-Box protein TIR1 is an auxin receptor

Nihal Dharmasiri, Sunethra Dharmasiri
& Mark Estelle

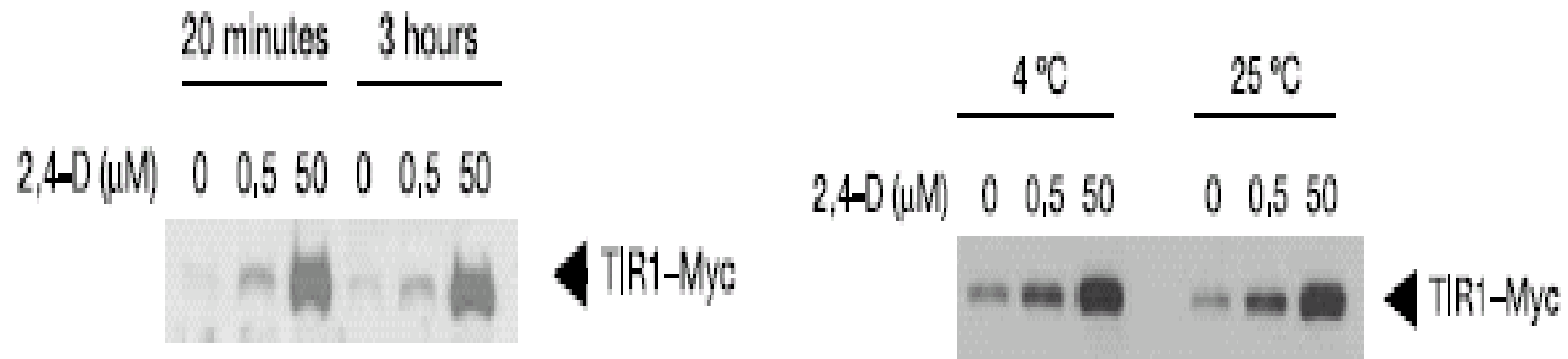
Department of Biology, Indiana University, USA

Hypothese : Substrat-Erkennung durch die E3 Ligase benötigt eine Auxin-abhängige stabile Modifikation von TIR1 oder assoziierten Proteinen

- Frage : Ist die Aux/IAA – SCF^{TIR1} Protein Interaktion Temperaturabhängig?

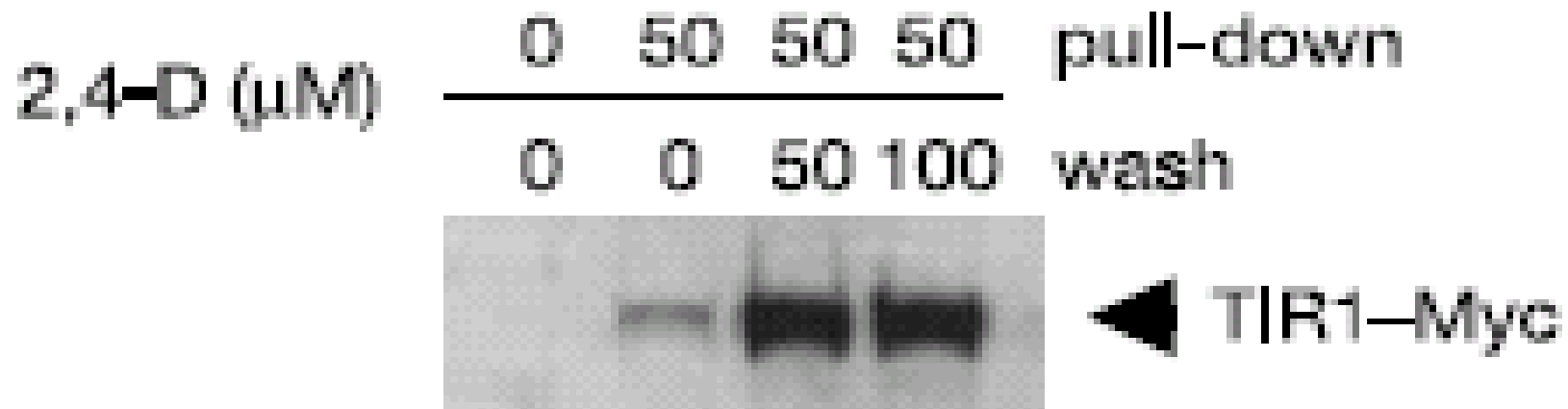


Immunoblots der pull down Reaktion



- Fazit : Auxinwirkung ist weitestgehend Temperatur-unabhängig
→ keine Enzym-basierende stabile Modifikation von TIR1 oder assoziierten Proteinen

Hypothese : Die Aux/IAA – SCF^{TIR1} Protein
Interaktion ist vielleicht
abhängig von einer kontinuierlicher
Auxinpräsenz



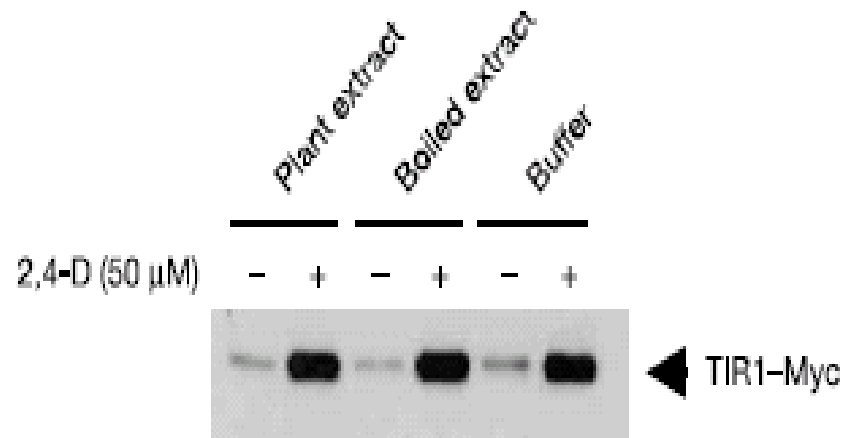
- Fazit : Auxin im Waschpuffer erhöht stark die Detektion von TIR1-Myc

- Auxin stabilisiert die Interaktion zwischen TIR1 und den Aux/IAA Proteinen
- Auxin ist kontinuierlich nötig für diesen Effekt

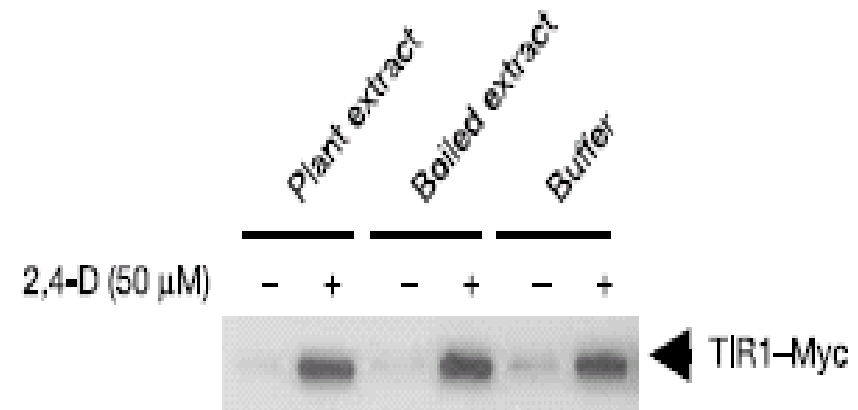
Auxin-induzierte Interaktion zwischen Aux/IAA und SCF^{TIR1} ist abhängig von der Auxinkonzentration und unabhängig von der Temperatur!

Frage : Ist einzeln aufgereinigtes TIR1-Myc in der Lage mit GST-IAA7 zu interagieren?

- TIR1-Myc aus Rohextrakt mit Myc - AK immunopräzipitiert
- gereinigtes TIR1-Myc in pull-down assay mit GST-IAA7 eingesetzt



→ immunopräzipitiertes TIR1-Myc interagiert mit GST-IAA7 ähnlich wie im Rohextrakt

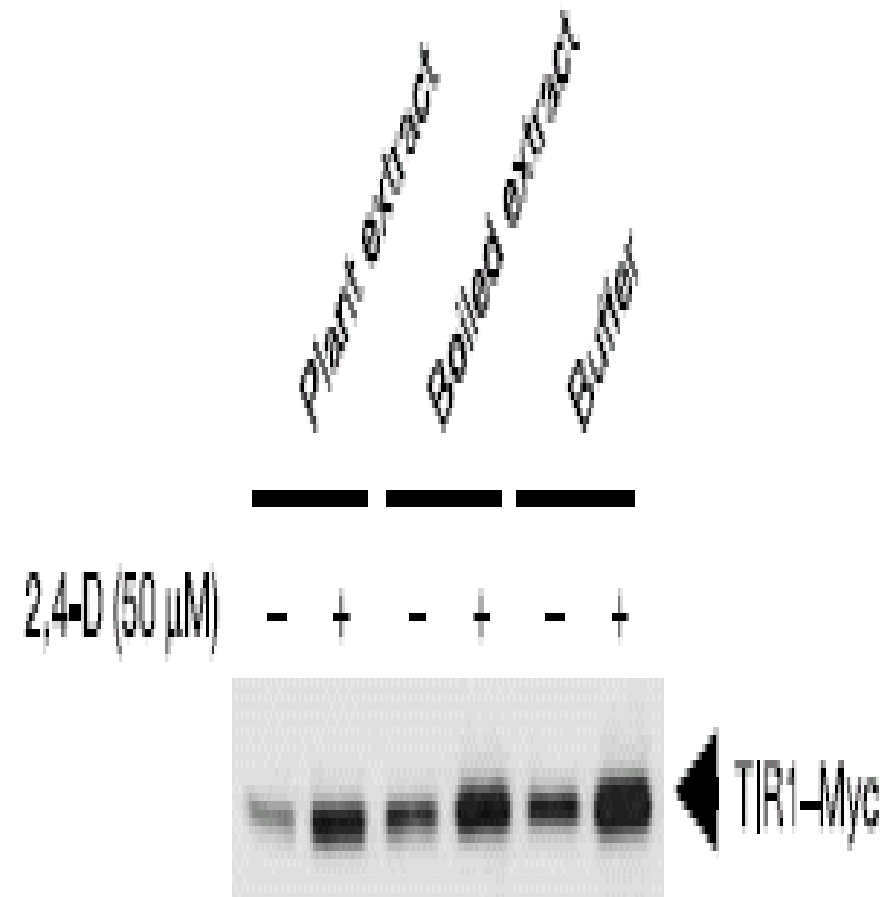


→ Vorbehandlung mit Auxin hat keinen Effekt auf die Proteininteraktion

Frage : Ist es möglich TIR1-Myc über seine
Bindung an GST-IAA7 zu isolieren?

- Pull down assay
- TIR-Myc über Gluthation beads gereinigt
- Eluiertes TIR1-Myc in 2. pull down assay eingesetzt

→ über GST-IAA7-
Bindung gereinigtes
TIR1-Myc ist immer
noch responsiv zu
Auxin

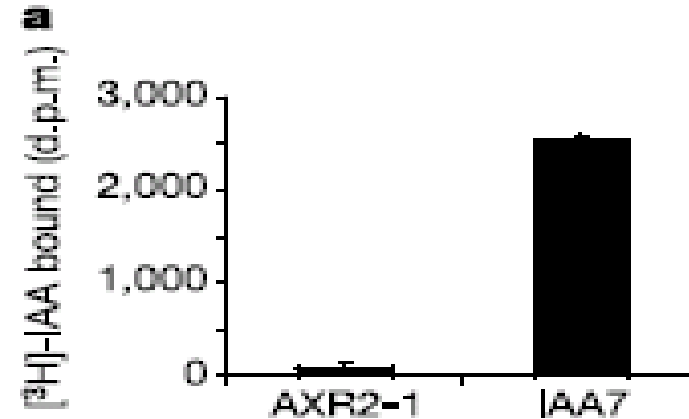


Fazit

- Vorbehandlung mit Auxin keinen Effekt
 - Auxin verursacht keine stabilen Modifikationen an TIR1 oder assoziierten Proteinen
- immunopräzipitiertes TIR1-Myc interagiert mit GST-IAA7 wie im Rohextrakt
 - alle nötigen Faktoren für eine Auxin-induzierte Proteininteraktion, auch der Rezeptor, befinden sich im anti-Myc Immunopräzipitat

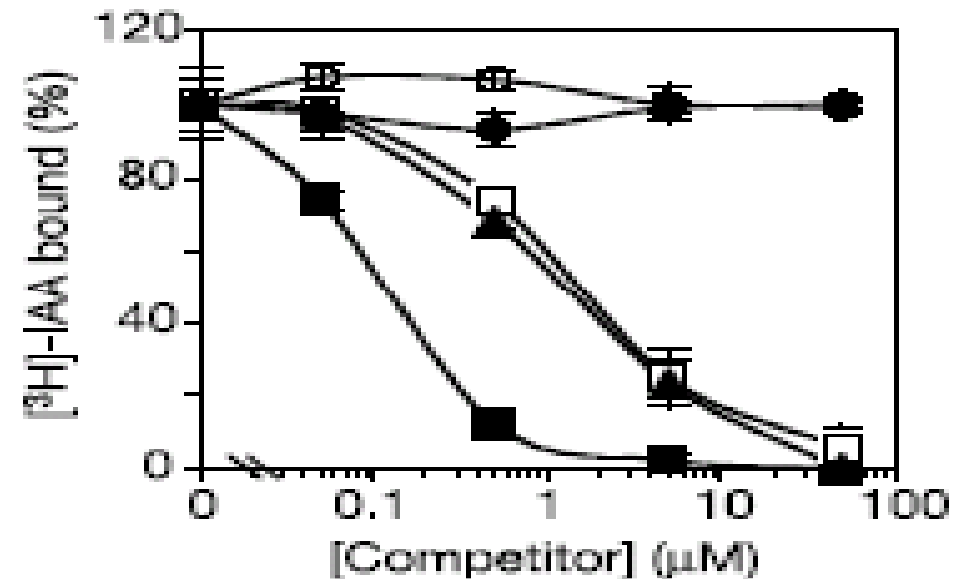
Hypothese : Auxin bindet direkt an den SCF^{TIR} Komplex

- Pull down assay mit GST-IAA7 und Rohextrakt in Gegenwart von [³H]-IAA
→ WT-Protein ist radioaktiv



- Kompetitive Bindeexperimente
→ aktive Auxine sind kompetitiv, inaktive Auxine nicht

→ **der Auxinrezeptor ist im SCF^{TIR1} Komplex**

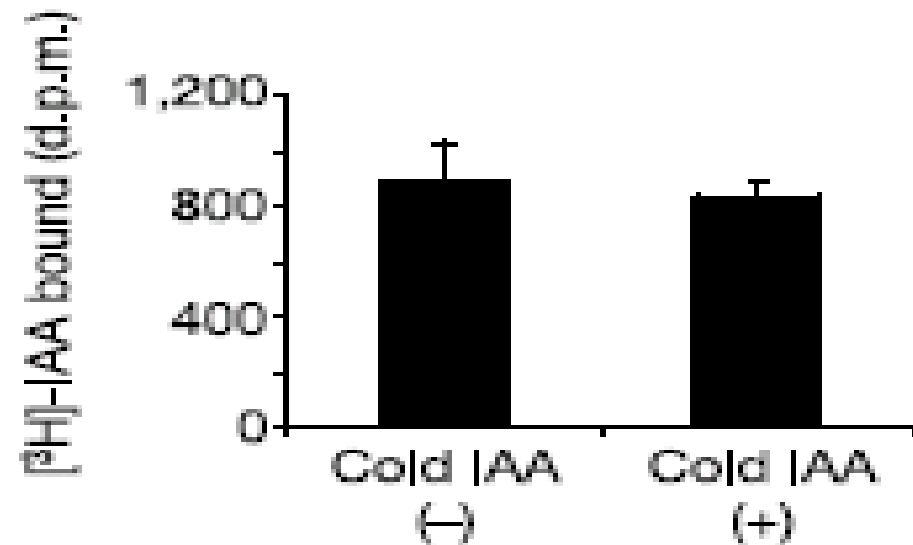


Frage : Interagiert GST-IAA7 allein mit [^3H]-IAA?

- GST-IAA7 mit [^3H]-IAA in Puffer inkubiert
- +/- kaltem IAA

Fazit : Bindung ist nicht - spezifisch

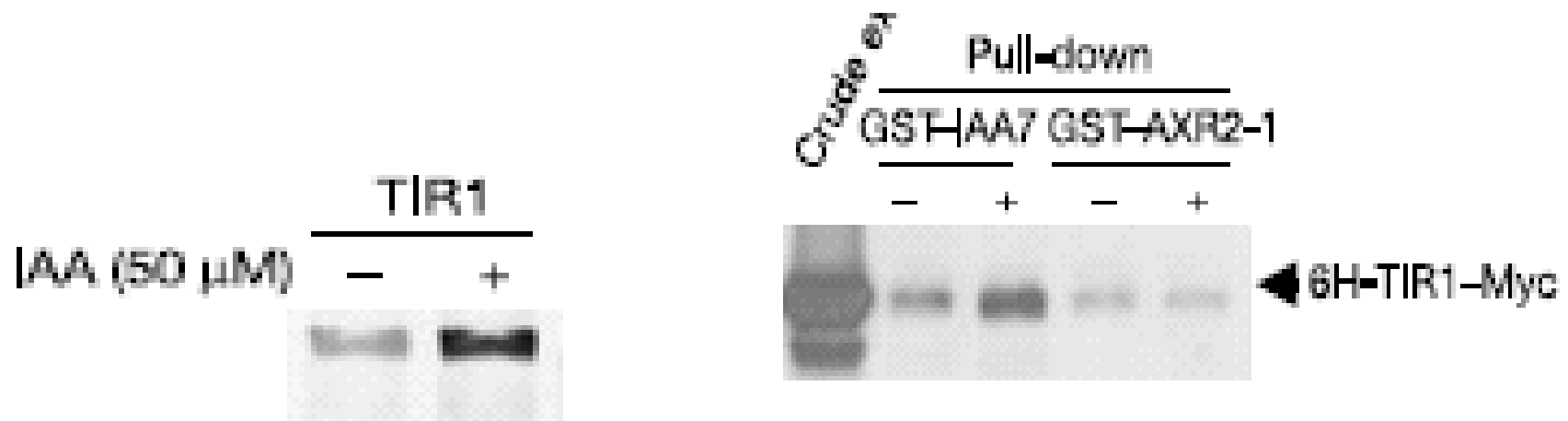
→ **Aux/IAA Proteine
sind keine
Auxinrezeptoren**



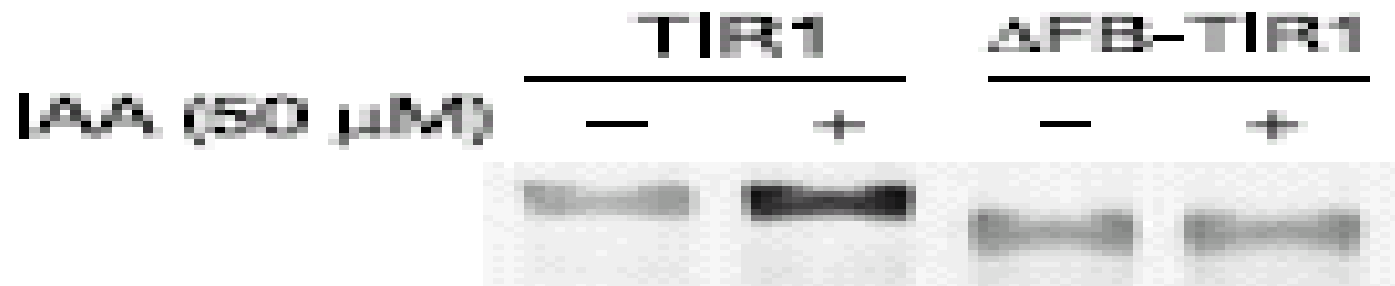
Hypothese : Auxin bindet direkt an TIR1 oder
an ein eng an TIR1 assoziiertes
Protein

- In vitro Translation von TIR1 in Weizenkeim Extrakt
- Frage : Beeinflußt endogenes Auxin im
Weizenkeimextrakt die Interaktion?

→ **Auxin bindet direkt an TIR1**



Immunoblot der Δ FB-TIR1 Mutante



- A) Deletierte Sequenz vermittelt direkt IAA und/oder Aux/IAA Bindung
- B) Deletierte Sequenz vermittelt Assemblierung von TIR1 an SCF
- C) Interaktion mit ASK1 ist nötig für TIR1 Funktion

Frage : Gibt es homologe Bereiche zwischen TIR1 und den AFB's

```

-----
TIR1 : -----MQRRIAGTPEVLEIVTFITOLDKRNVELUCKENWYIERGGRVIGSCYVGRATVIRRFPAVREWLKGEFFAATNLVPGWGGYVNP : 95
AFB1 : -----NGRPPFVLEIIEFIDHEHNRVELUCKENWYIERGGRVIGSCYVGRATVIRRFPAVREWLKGEFFAATNLVPGWGGYVNP : 91
AFB2 : -----LQYSPDEVIEITDFVASHDNRNVLUCKENWYIERGGRVIGSCYVGRATVIRRFPAVREWLKGEFFAATNLVPGWGGYVNP : 90
AFB3 : -----LQYSPDEVIEITDFVASHDNRNVLUCKENWYIERGGRVIGSCYVGRATVIRRFPAVREWLKGEFFAATNLVPGWGGYVNP : 90
COI1 : HEDFDIRCKLSCATVLTWISDQMTYIDPDRDPSLWCKWPKDSEKREVDHRLCYTATPDLIRRFPAVREWLKGEFFAATNLVPGWGGYVNP : 102

-----
TIR1 : MIEKMSSTWLEERIKSMVVIDDCLSIKASFAKRVIALSKGCFSTGDLAINATKRLKLEEDRSSDQDTKSWLSPDITKSLVRLNLSKAS : 196
AFB1 : MIEKMRKSSSLERIKSMVVIDDCLSIKASFAKRVIALSKGCFSTGDLAINATKRLKLEEDRSSDQDTKSWLSPDITKSLVRLNLSKAS : 192
AFB2 : MIEKMRKRVGLERIKSMVVIDDCLSIKASFAKRVIALSKGCFITGDLAINATKRLKLEEDRSSDQDTKSWLSPDITKSLVRLNLSKAS : 191
AFB3 : MIEKMRKRVGLERIKSMVVIDDCLSIKASFAKRVIALSKGCFITGDLAINATKRLKLEEDRSSDQDTKSWLSPDITKSLVRLNLSKAS : 191
COI1 : MVIDSSNHLRQKSHFPMVVIDDCLSIKASFAKRVIALSKGCFITGDLAINATKRLKLEEDRSSDQDTKSWLSPDITKSLVRLNLSKAS : 204

-----
TIR1 : -LQSTSLLEELATPHILSLKLSRAVELKSLTLLQRAPEHILGCGTATV-RDVTGGLSVVLGCKEELGSGMDATATTPAVTSVESLLELSL : 296
AFB1 : -LQSTSLLEELATPHILSLKLSRAVELKSLTLLQRAPEHILGCGTATV-KDAPGSLSEPTNHRGQGLSGMDATATTPAVTSVESLLELSL : 292
AFB2 : -LQSTSLLEELATPHILSLKLSRAVELKSLTLLQRAPEHILGCGTATV-LQSTSLLEELATPHILSLKLSRAVELKSLTLLQRAPEHILG : 291
AFB3 : -LQSTSLLEELATPHILSLKLSRAVELKSLTLLQRAPEHILGCGTATV-LQSTSLLEELATPHILSLKLSRAVELKSLTLLQRAPEHILG : 291
COI1 : AKSPKTLSTLARNERSLQVTVG-DKSLKLGKFKARHNRKFGGLMEDGMLKPMHLPFRRIER-----LQAVGMDATATTPAVTSVESLLELSL : 300

-----
TIR1 : SYAT-DSYVLEVLIDQCCDQALNVIINTDASIEVLARICKETRETRVF-SEPFVH-EPVAITECHLVSTVACCPNTSAVITFGQNTWAATITAKH : 395
AFB1 : SYAT-DSYVLEVLIDQCCDQALNVIINTDASIEVLARICKETRETRVF-SEPFVH-EPVAITECHLVSTVACCPNTSAVITFGQNTWAATITAKH : 391
AFB2 : SYATDSYVLEVLIDQCCDQALNVIINTDASIEVLARICKETRETRVF-SEPFVH-EPVAITECHLVSTVACCPNTSAVITFGQNTWAATITAKH : 390
AFB3 : SYATDSYVLEVLIDQCCDQALNVIINTDASIEVLARICKETRETRVF-SEPFVH-EPVAITECHLVSTVACCPNTSAVITFGQNTWAATITAKH : 392
COI1 : LYAL-LSTEDHCTLCKSHULEVLETRVINDGLEVLAVTCKELGURIERGAGDQCHDEDECHVSCGLIALDQCCSELELQATVVSQNTWASLHICTV : 401

-----
TIR1 : KPNITFRILITIEKRPDSTLSPLETCGRITENCKLRRLSL-----GLTDOVLYIGKQKHEMLSPVSCSDQAMHVSIGCSLAKSLINDQVY : 494
AFB1 : KPNITFRILITIEKRPDSTLSPLETCGRITENCKLRRLSL-----GLTDOVLYIGKQKHEMLSPVSCSDQAMHVSIGCSLAKSLINDQVY : 490
AFB2 : QNPITFRILITIEKRPDSTLSPLETCGRITENCKLRRLSL-----GLTDOVLYIGKQKHEMLSPVSCSDQAMHVSIGCSLAKSLINDQVY : 489
AFB3 : QNPITFRILITIEKRPDSTLSPLETCGRITENCKLRRLSL-----GLTDOVLYIGKQKHEMLSPVSCSDQAMHVSIGCSLAKSLINDQVY : 491
COI1 : LKSTEDRLKSLD-----KPNITFRILITIEKRPDSTLSPLETCGRITENCKLRRLSPVSCSDQAMHVSIGCSLAKSLINDQVY : 501

-----
TIR1 : DTALLANAKMTMSKLNMSSTSPFCKELKQNPILNVEVIDQG-----APSKRP-ESCPGKVPVYTVGQDQDQGLVWQDQSTMRFSQIITV : 591
AFB1 : DTALLANAKMTMSKLNMSSTSPFCKELKQNPILNVEVIDQH-----PESKRP-ESCPGKVPVYTVGQDQDQGLVWQDQSTMRFSQIITV : 585
AFB2 : DTALLANAKMTMSKLNMSSTSPFCKELKQNPILNVEVIDQH-----PESKRP-ESCPGKVPVYTVGQDQDQGLVWQDQSTMRFSQIITV : 575
AFB3 : DTALLANAKMTMSKLNMSSTSPFCKELKQNPILNVEVIDQH-----PESKRP-ESCPGKVPVYTVGQDQDQGLVWQDQSTMRFSQIITV : 577
COI1 : ERATATVDFPRLNLMWQVVASSTQDQKALAKMTNIELPSPKVPVHQQGKIRKMPFALNVLKQDQDQSTMRFSQIITV : 592

```

Zusammenfassung

- Paper liefern Beweise, das TIR1 ein Auxinrezeptor ist, der :
 - die Degradation von Aux/IAA Proteinen vermittelt
 - einen Wechsel in der Genexpression von Auxin – induzierten Genen hervorruft
- Auxin bindet an TIR1 ► Konformationsänderung
oder
- Auxin bindet TIR1 und Aux/IAA
- Bindestelle von Auxin und TIR1 ist nicht bekannt
- auch extrazelluläre Auxinperzeption

Danke für Eure
Aufmerksamkeit