

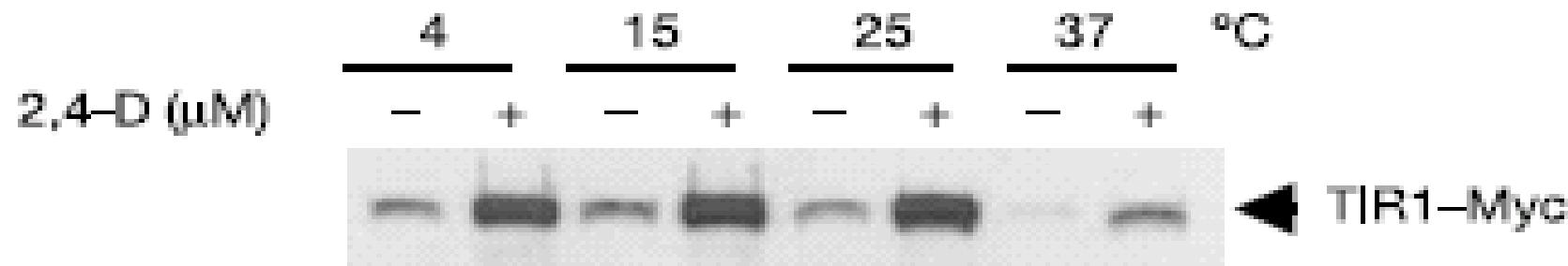
The F-Box protein TIR1 is an auxin receptor

Nihal Dharmasiri, Sunethra Dharmasiri
& Mark Estelle

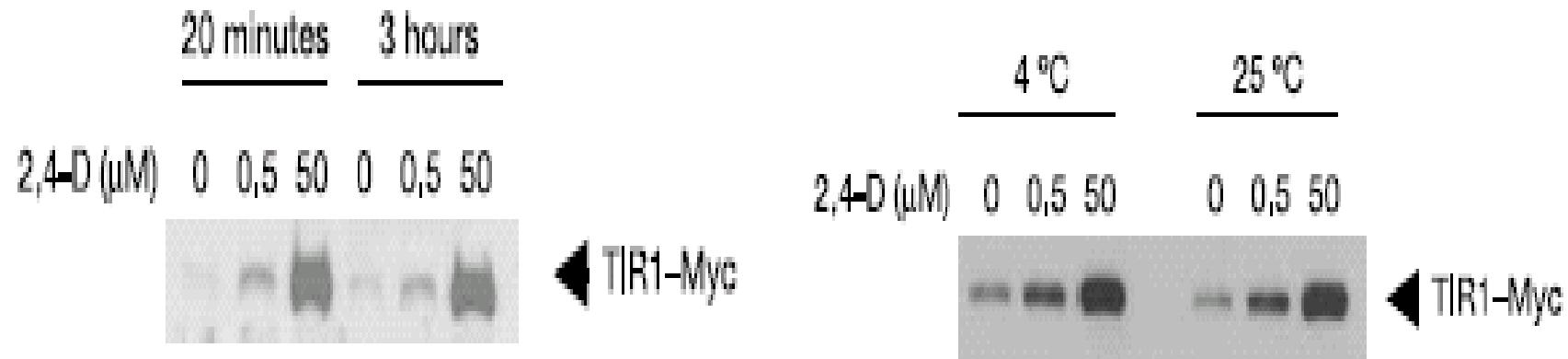
Department of Biology, Indiana University, USA

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?

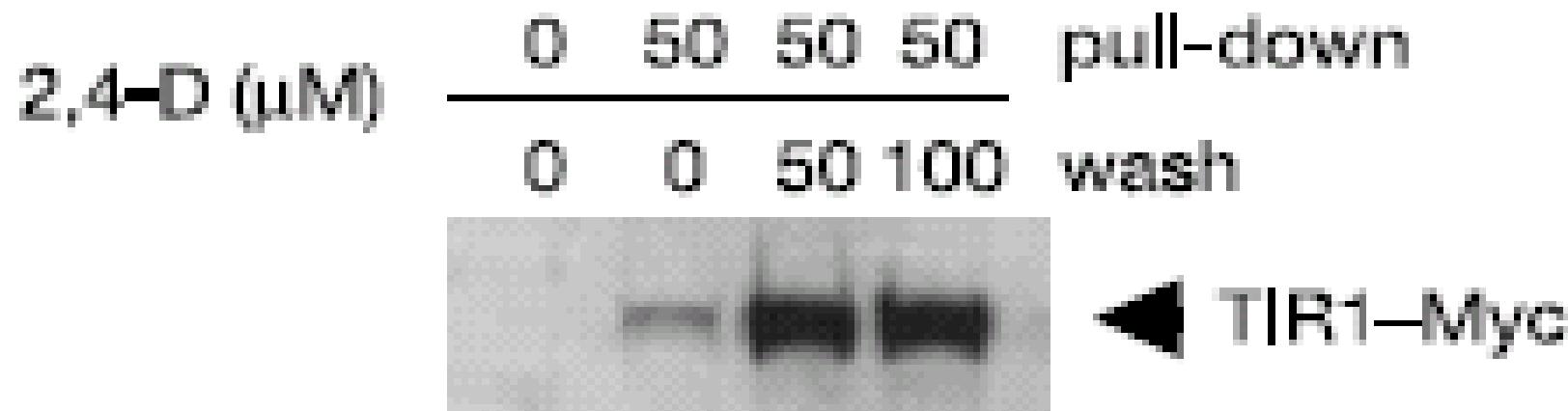


Immunoblots der pull down Reaktion



- 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



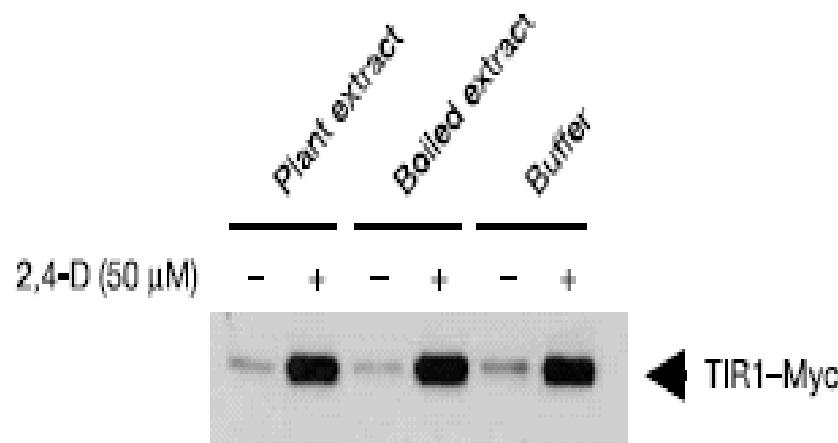
- Fazit : Auxin im Waschpuffer erhöht stark die Detektion von TIR1-Myc

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

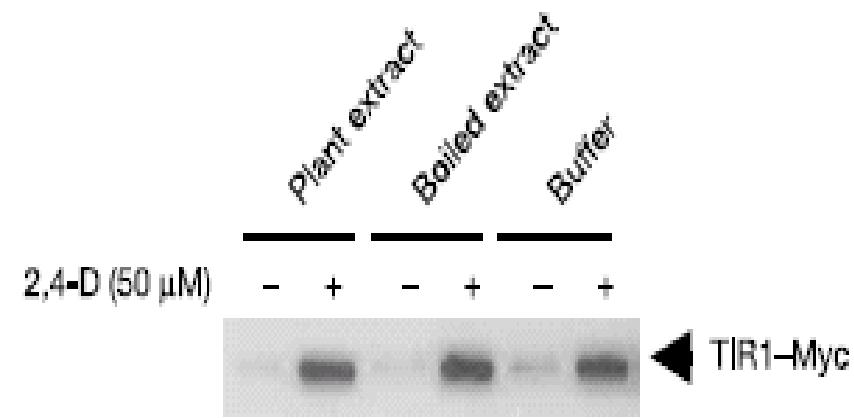
Auxin-induzierte Interaktion zwischen Aux/IAA und SCF^{TIR1} ist **abhängig** von der **Auxinkonzentration** und **unabhängig** von der **Temperatur!**

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

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



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

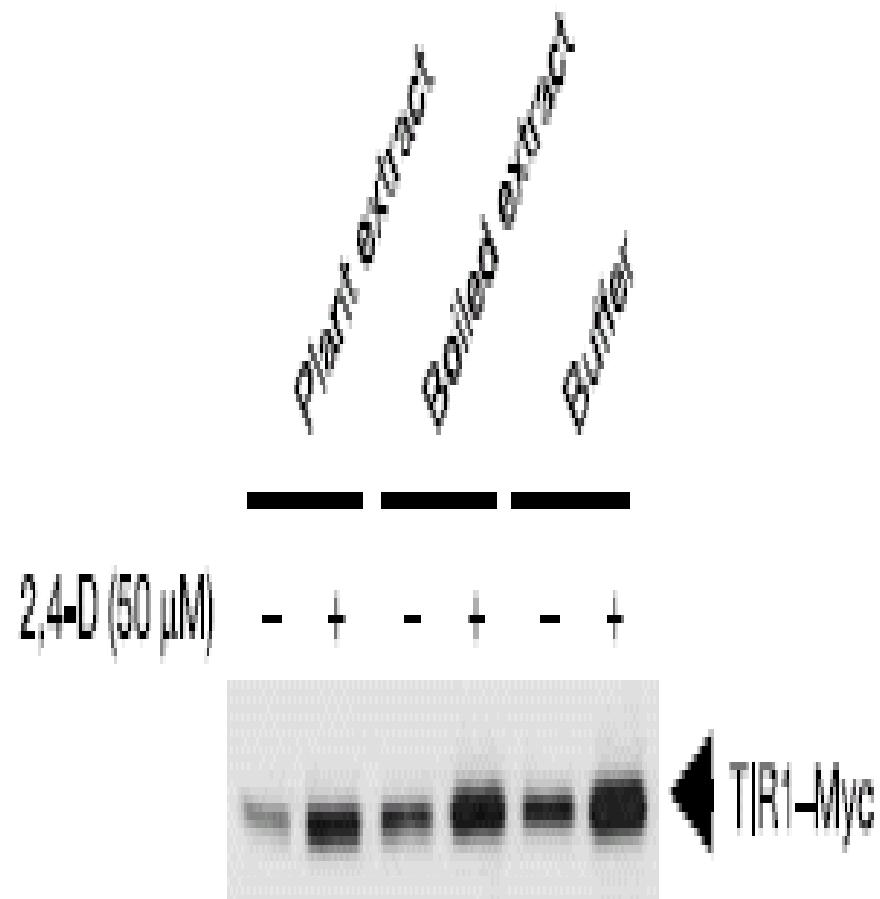


→ Vorbehandlung mit Auxin hat keinen Effekt auf die Proteininteraktion

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

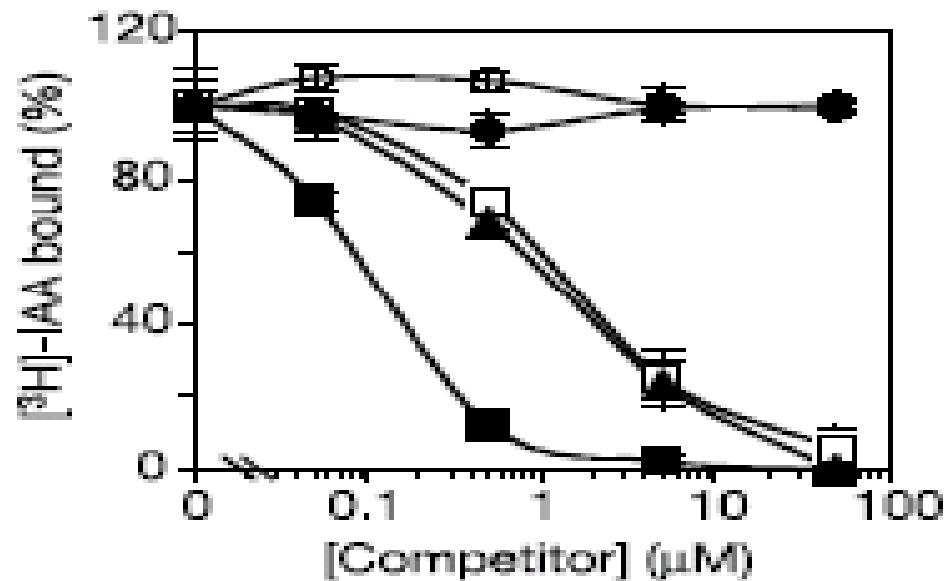
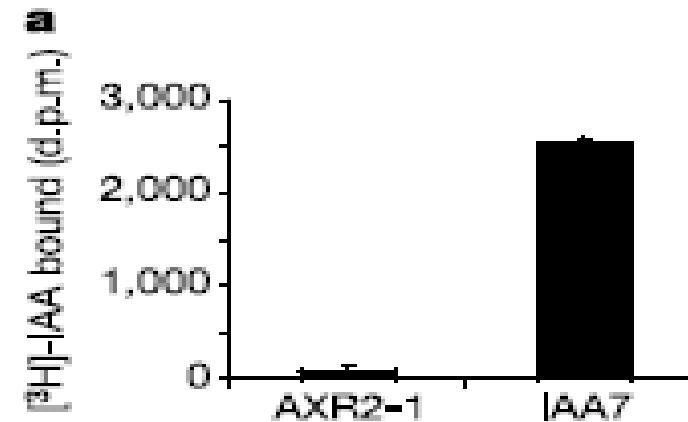


Fazit

- Vorbehandlung mit Auxin keinen Effekt
 - Auxin verursacht keine stabilen Modifikationen an TIR1 oder assoziierten Proteinen
- immunopräzipiertes 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 SCFTIR1 Komplex**

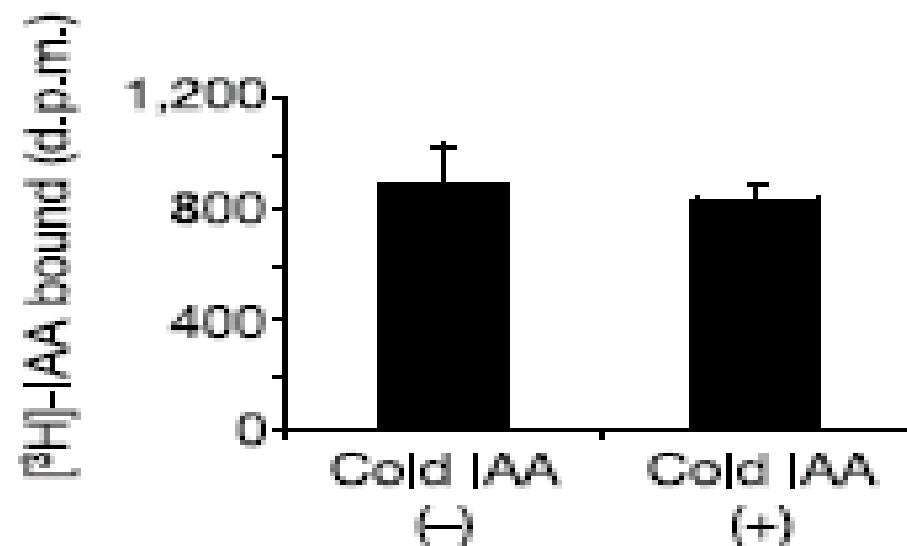


Frage : Interagiert GST-IAA7 allein mit [³H]-IAA?

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

Fazit : Bindung ist nicht - spezifisch

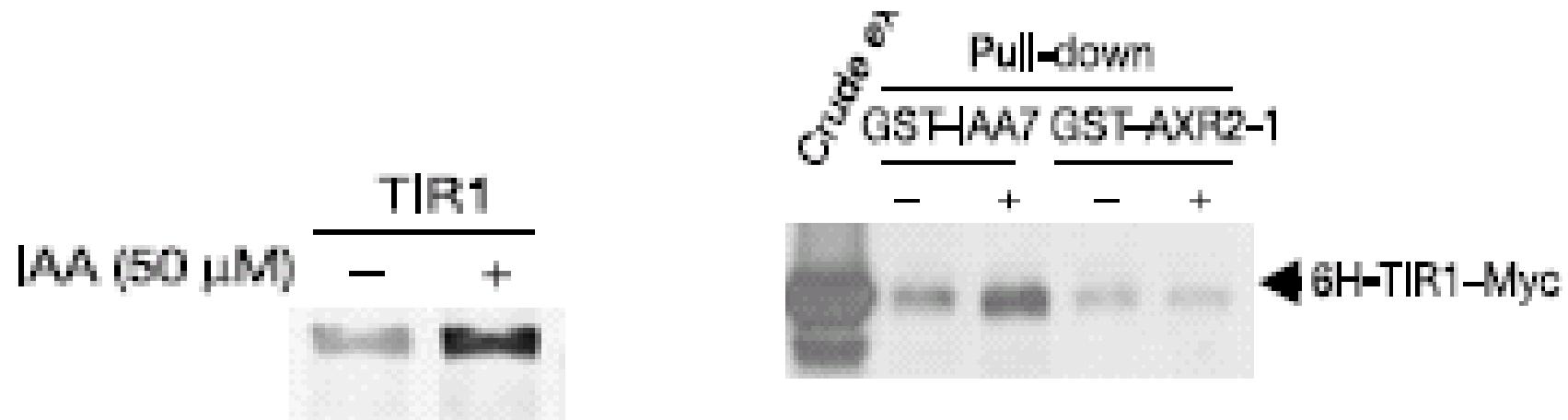
→ **Aux/IAA Proteine sind keine Auxinrezeptoren**



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	WVIAANSSGQVPLLEERIRKRRMFTVTDGGLLAAKAKS—PDKKQVLLVLSRGGCFSTGGLVADAVTCAKLLRGRVTRDSDQVDTGTTGCGGSLSPDITVYSLVLLHESRAS	196
SFBL1	WVIAANSSGQVPLLEERIRKRRMFTVTDGGLLAAKAKS—PDKKQVLLVLSRGGCFSTGGLVADAVTCAKLLRGRVTRDSDQVDTGTTGCGGSLSPDITVYSLVLLHESRAS	192
SFBL2	WVIAALRSGQVPLLEERIRKRRMFTVTDGGLLAAKAKS—PDKKQVLLVLSRGGCFSTGGLVADAVTCAKLLRGRVTRDSDQVDTGTTGCGGSLSPDITVYSLVLLHESRAS	191
SFBL3	WVIAALRSGVPLLEERIRKRRMFTVTDGGLLAAKAKS—PDKKQVLLVLSRGGCFSTGGLVADAVTCAKLLRGRVTRDSDQVDTGTTGCGGSLSPDITVYSLVLLHESRAS	191
COL1	WVIAVLSLQVPLLEERIRKRRMFTVTDGGLLAAKAKS—PDKKQVLLVLSRGGCFSTGGLVADAVTCAKLLRGRVTRDSDQVDTGTTGCGGSLSPDITVYSLVLLHESRAS	204

```

TIRI : -PNSPSGLLAVTCRPHLSLKLGRATVQKQDTRGQAPPLKLELCTGCTTAU-KDIDVYEGGLSVRIGSKELDCGCGMDAATGAAEAVTSVSDSPLRSLT- : 256
AFRI : -PNSPSGLLAVTCRPHLSLKLGRATVQKQDTRGQAPPLKLELCTGCTTAU-KDIDVYEGGLSVRIGSKELDCGCGMDAATGAAEAVTSVSDSPLRSLT- : 252
AFBZ : -PNSPSGLLAVTCRPHLSLKLGRATVQKQDTRGQAPPLKLELCTGCTTAU-KDIDVYEGGLSVRIGSKELDCGCGMDAATGAAEAVTSVSDSPLRSLT- : 271
PFBS : -PNSPSGLLAVTCRPHLSLKLGRATVQKQDTRGQAPPLKLELCTGCTTAU-KDIDVYEGGLSVRIGSKELDCGCGMDAATGAAEAVTSVSDSPLRSLT- : 291
COTI : KNSPSGLLAVTCRPHLSLKLGRATVQKQDTRGQAPPLKLELCTGCTTAU-KDIDVYEGGLSVRIGSKELDCGCGMDAATGAAEAVTSVSDSPLRSLT- : 360

```

TIR1	RQWVHDFHLLIIPERKFDVGLLFLDCCGRRDIDFVCLLRLSLIS--S	GLTIDQYVYIGRIGEAKMMLLEWFTGCGDLSWHEVACCGDLSLFLINRNGPS	454
ZFP81	RQWVHDFHLLIIPERKFDVGLLFLDCCGRRDIDFVCLLRLSLIS--S	GLTIDQYVYIGRIGEAKMMLLEWFTGCGDLSWHEVACCGDLSLFLINRNGPS	450
ZFP82	CPAFIFRFLHLLIIPERKFDVGLLFLDCCGRRDIDFVCLLRLSLIS--S	GLTIDQYVYIGRIGEAKMMLLEWFTGCGDLSWHEVACCGDLSLFLINRNGPS	450
ZFP83	CQWVHDFHLLIIPERKFDVGLLFLDCCGRRDIDFVCLLRLSLIS--S	GLTIDQYVYIGRIGEAKMMLLEWFTGCGDLSWHEVACCGDLSLFLINRNGPS	451
CCOL1	LEKSHDGFVLLVLL--S--KEDVLLDCCGRRDIDFVCLLRLSLIS--S	GLTIDQYVYIGRIGEAKMMLLEWFTGCGDLSWHEVACCGDLSLFLINRNGPS	561

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