

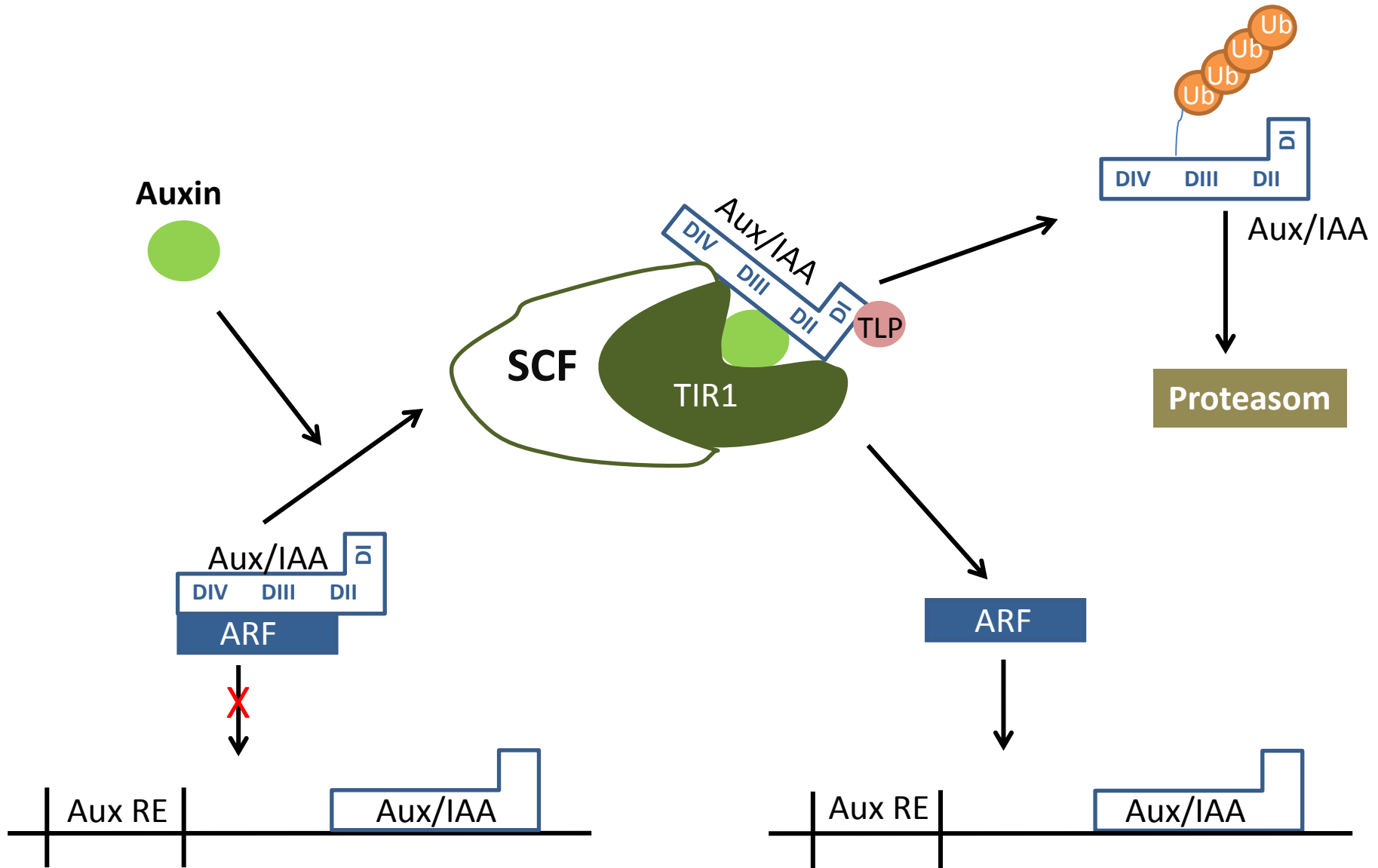
A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin

Luz Irina A. Calderón Villalobos^{1,6}, Sarah Lee⁹, Cesar De Oliveira³, Anthony Ivetac³, Wolfgang Brandt⁴, Lynne Armitage⁵, Laura B. Sheard^{2,10}, Xu Tan^{2,7}, Geraint Parry^{1,8}, Haibin Mao², Ning Zheng², Richard Napier⁹, Stefan Kepinski⁵, and Mark Estelle^{1,*}

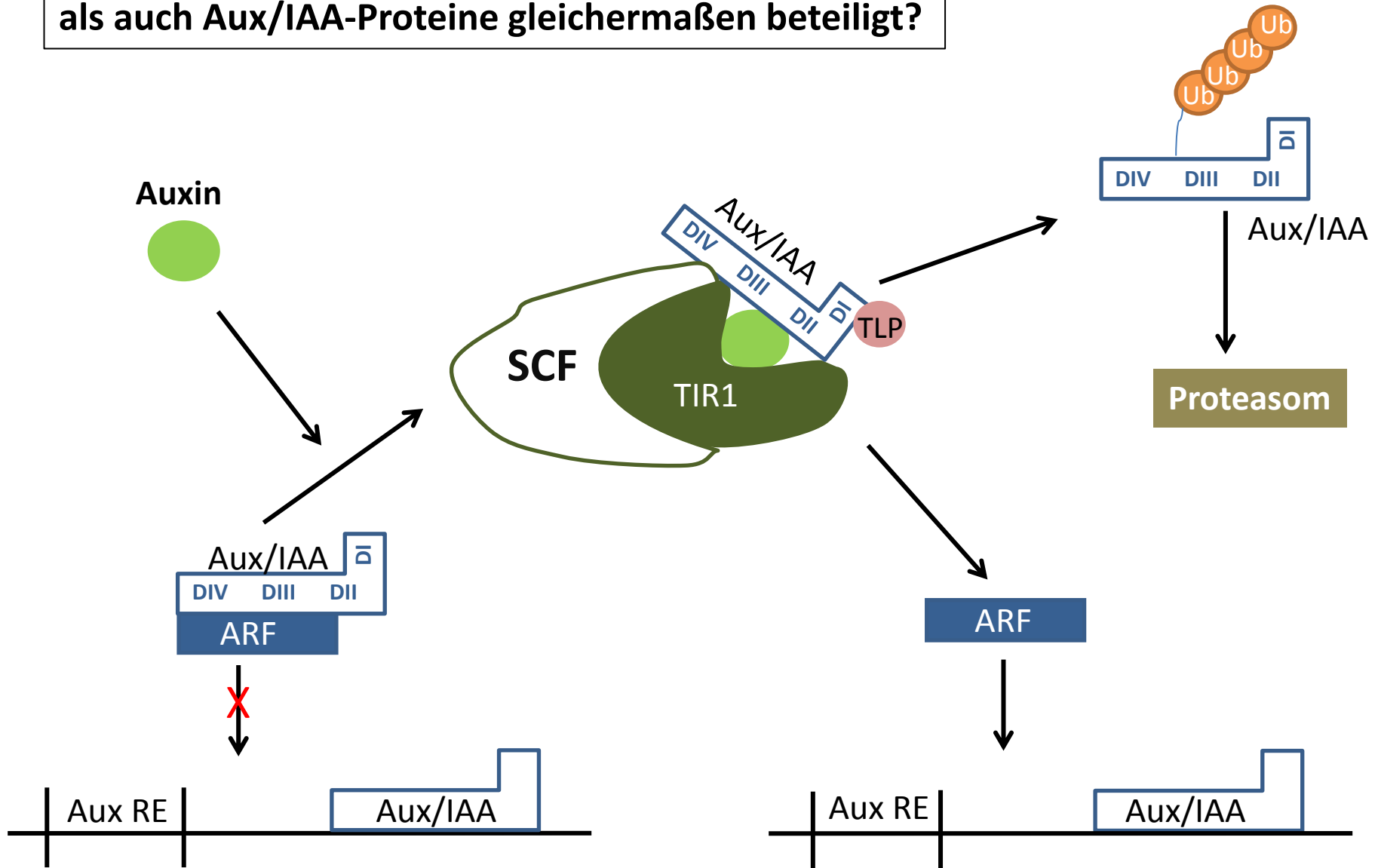
Nat Chem Biol. November 2012

Franziska Daamen & Corinna Popp

Was war bisher bekannt?

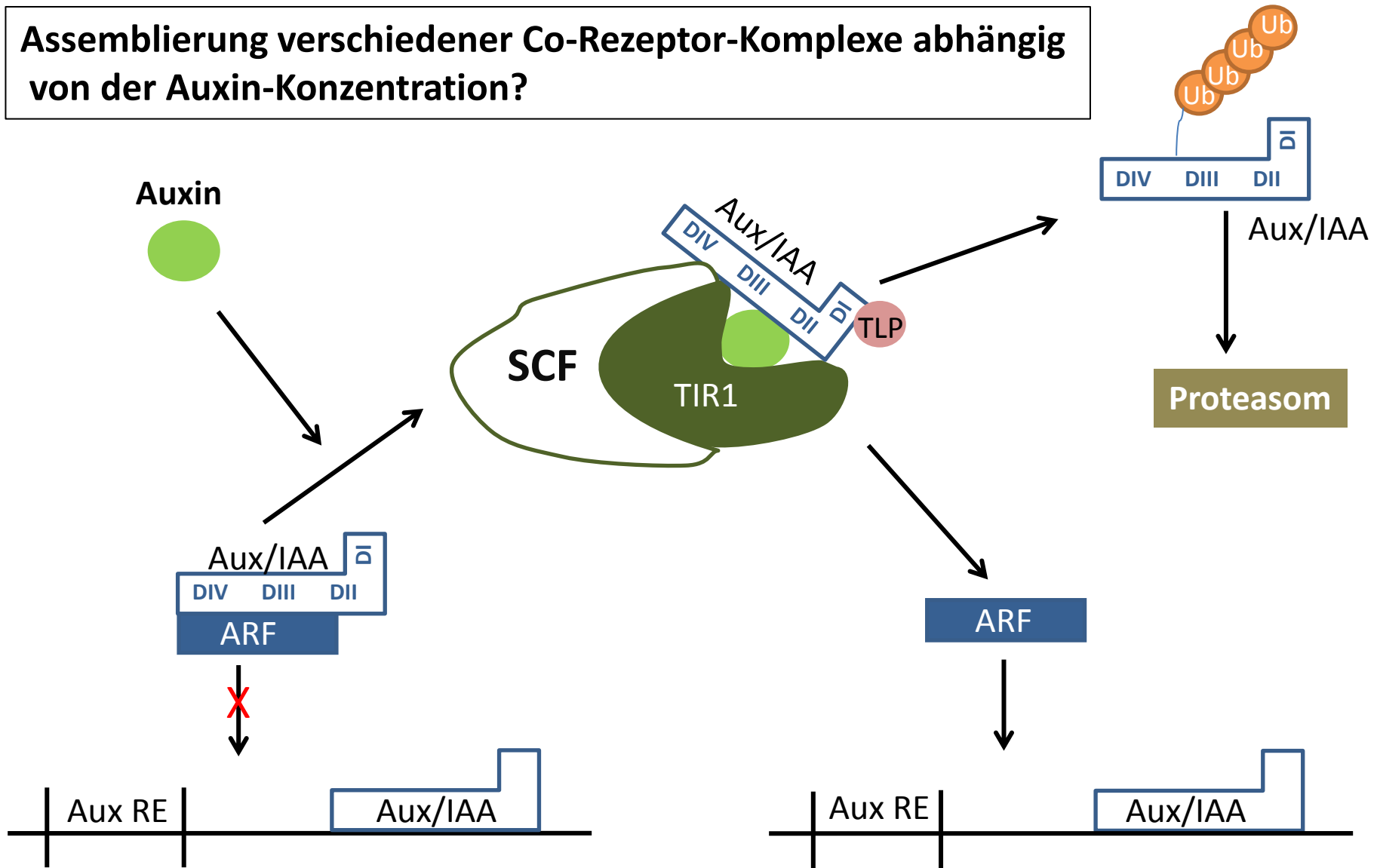


I. Sind an der Auxinbindung sowohl TIR1/ABF-,
als auch Aux/IAA-Proteine gleichermaßen beteiligt?



II. Rollenverteilung der F-box-Proteine im Auxinpathway durch Interaktion mit unterschiedlichen Aux/IAA-Proteinen?

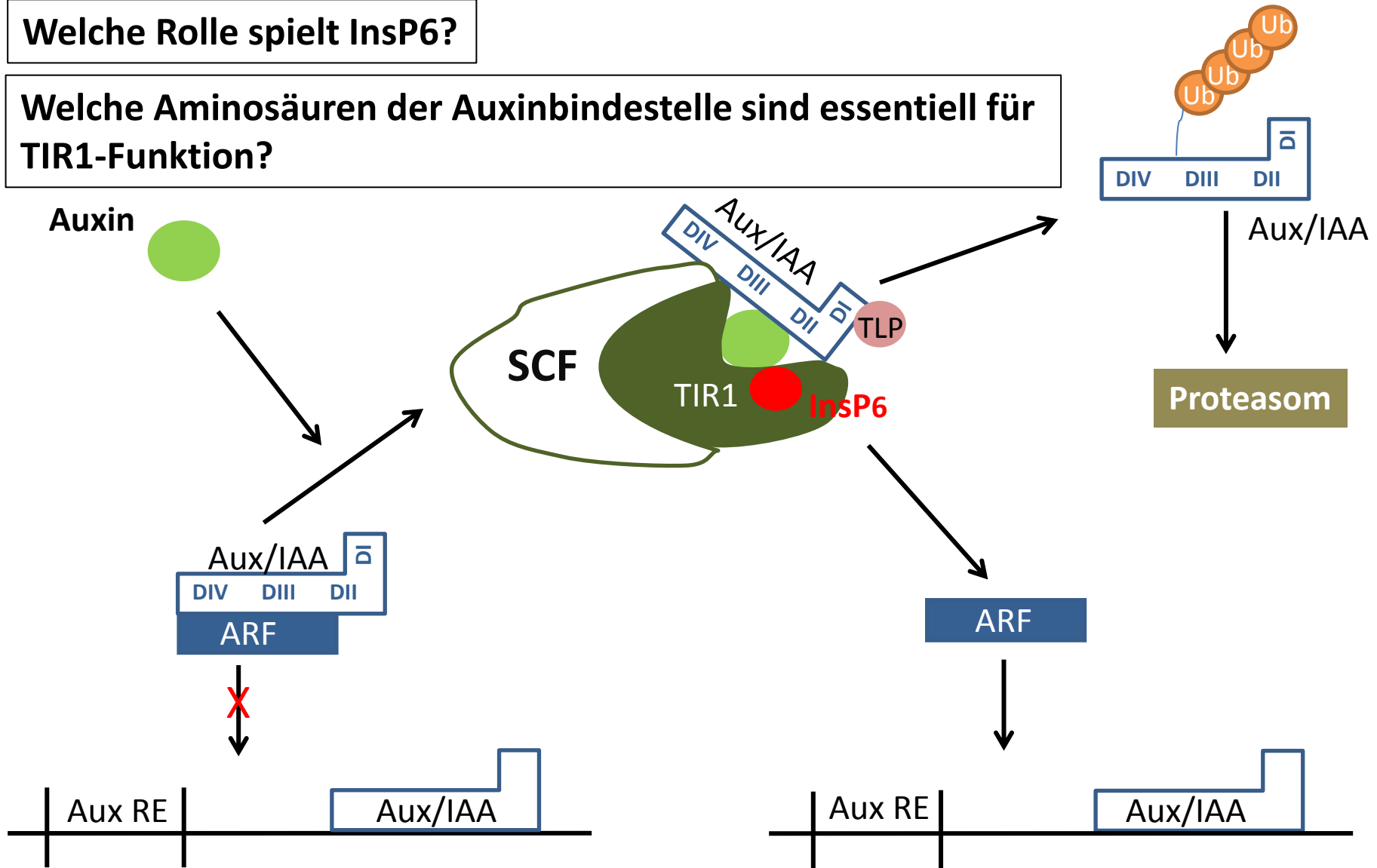
Assemblierung verschiedener Co-Rezeptor-Komplexe abhängig von der Auxin-Konzentration?



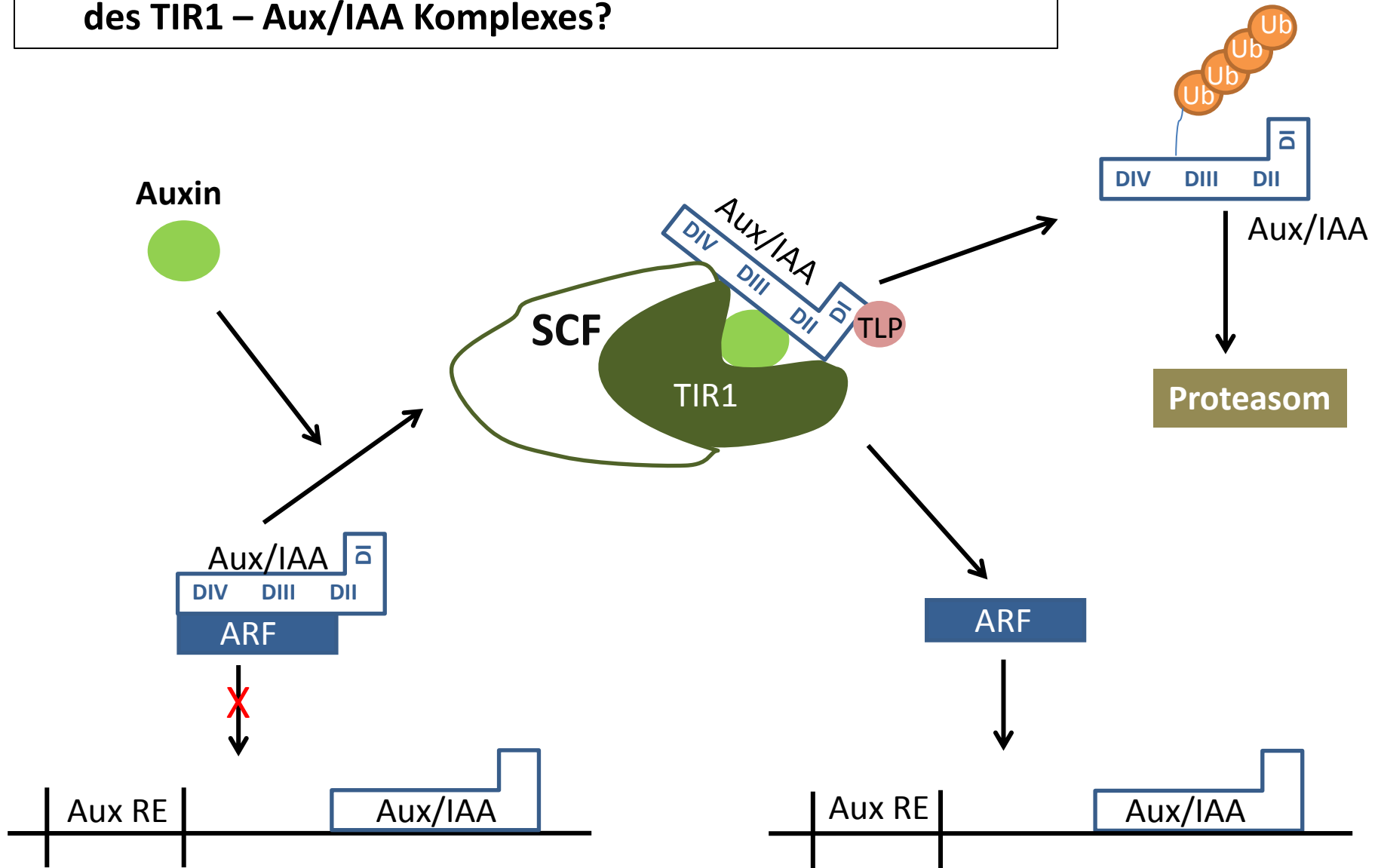
III. Welche Aminosäurereste sind essentiell für die Auxinbindung und TIR1-Aux/IAA Interaktion?

Welche Rolle spielt InsP6?

Welche Aminosäuren der Auxinbindestelle sind essentiell für TIR1-Funktion?

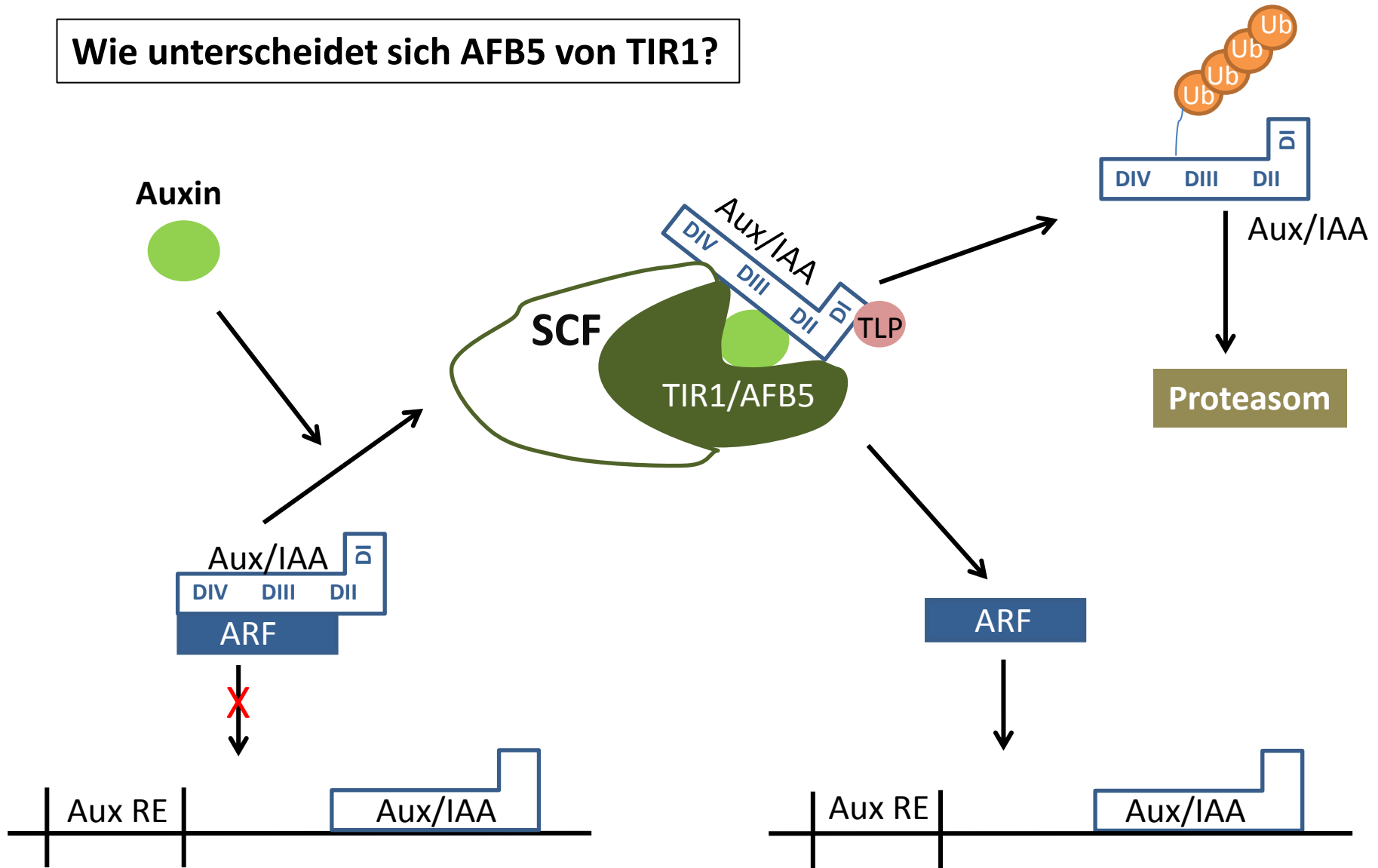


IV. Wie beeinflusst das Auxin Affinität und Dissoziationsrate des TIR1 – Aux/IAA Komplexes?



V. Welche Besonderheiten haben AFB4 und AFB5?

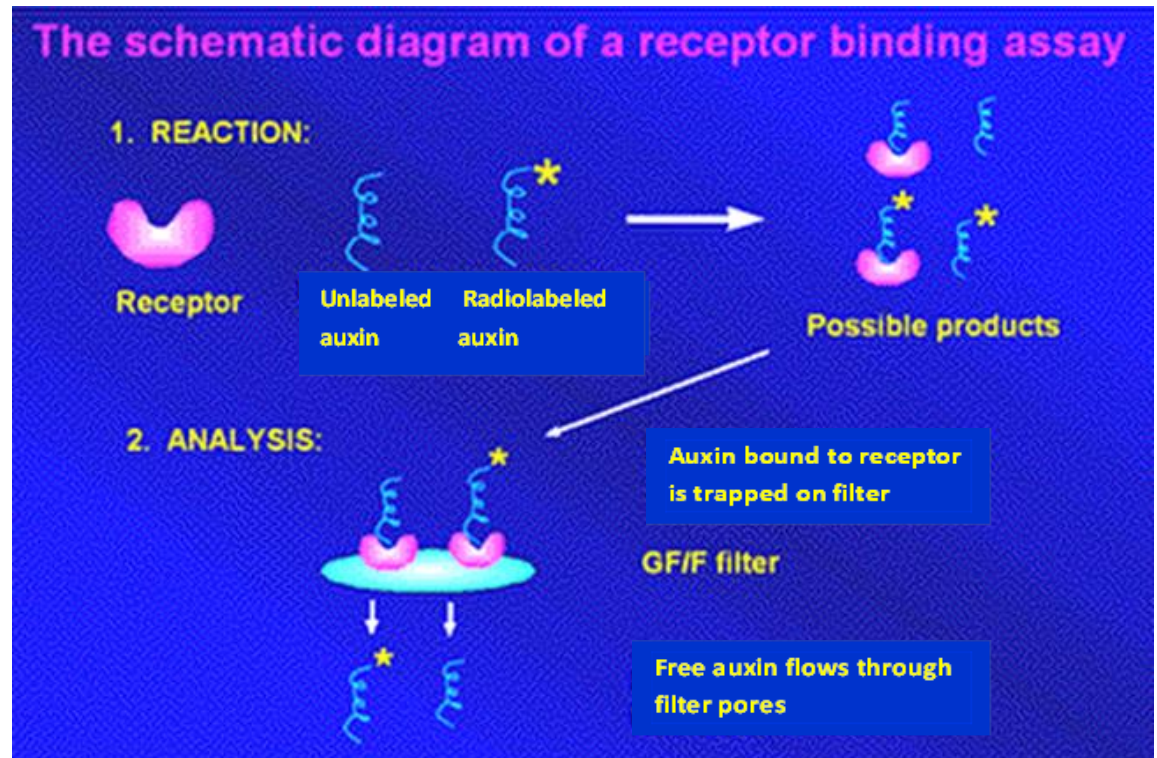
Wie unterscheidet sich AFB5 von TIR1?



- I. Sind an der Auxinbindung sowohl TIR1/ABF-, als auch Aux/IAA-Proteine gleichermaßen beteiligt?**

Methode: $[H^3]$ IAA-labeled binding assay

1. *In vitro*: Verschiedene Tubes mit aufgereinigtem Rezeptorprotein
2. Zugabe von radioaktiv markiertem Auxin ($[H^3]$ IAA) „hot“
3. Zugabe „kalten“ Auxins
4. Waschschritte
5. Filtration über Membranfilter
6. Messung verbleibenden radioaktiven Signals



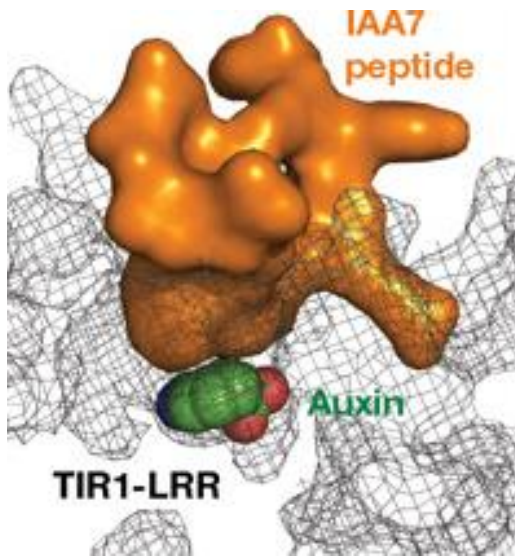
Interaktion von TIR1 und Aux/IAAs als Co-Rezeptor für Auxin

Methode:

[H³]-labeled Auxin binding assay

Ergebnis:

Stärkste Affinität durch TIR1/IAA7



Tan et al. (2007)

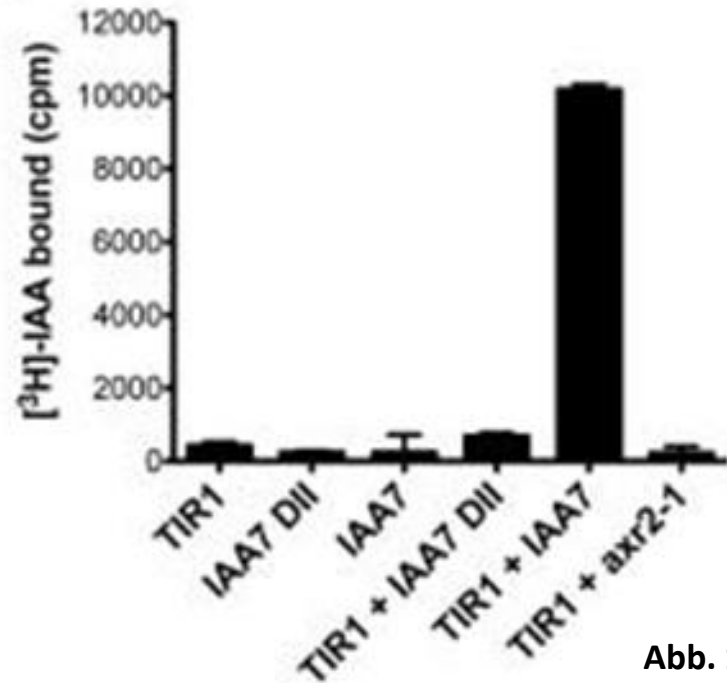


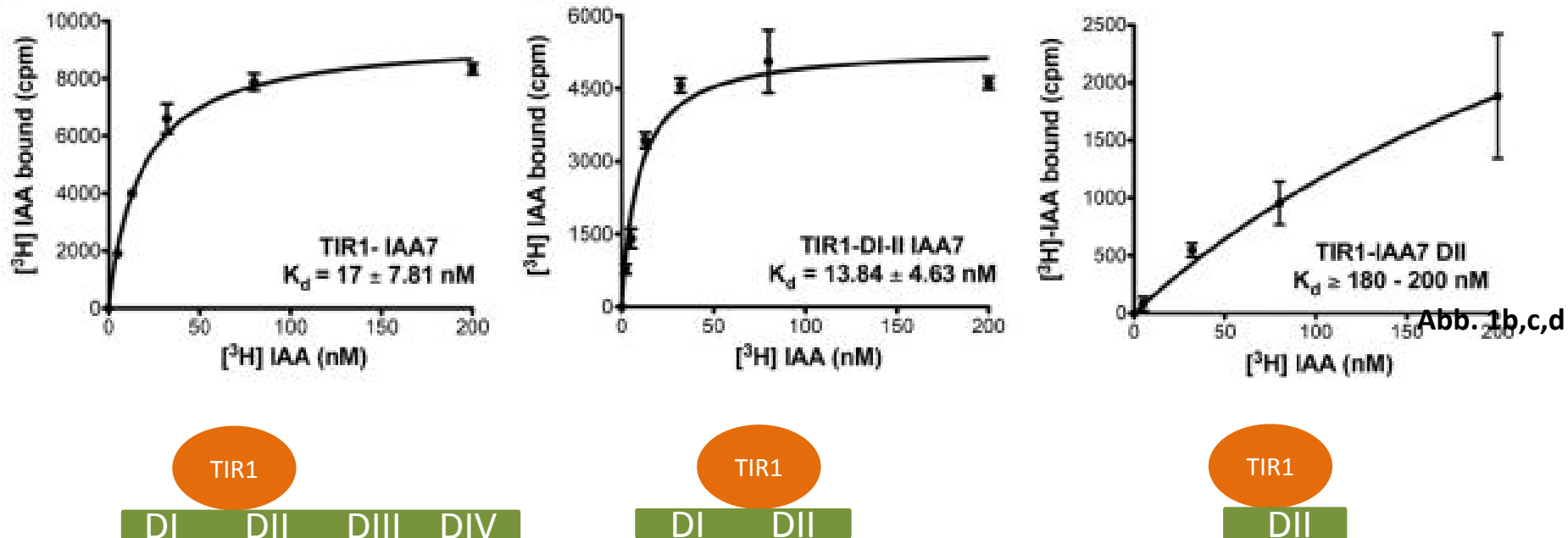
Abb. 1a

Folgerung:

- TIR1 und Aux/IAAs agieren als Co-Rezeptor
- Domäne II wichtig für Auxin-Bindung
- Auxin-Bindung zusätzlich von anderen Sequenzen abhängig

Degron (DII) ist notwendig aber nicht ausreichend für volle Auxinbindung des Co-Rezeptor-Komplexes

Methode: [^3H]IAA-labeled binding assay



Ergebnis:

TIR1-DI-DII-IAA7 ähnlich hohe IAA-Affinität wie TIR1-IAA7

Folgerung:

DI und DII Koexistenz wichtig für die Auxin-Bindung des Co-Rezeptor-Komplexes

Lys35-Arg36-Bindung zwischen DI und DII ausschlaggebend für Auxinbindung

Methode:

[H³]-labeled Auxin binding assay

Ergebnis:

Auxin-Bindung der Mutanten-Komplexe um 50%
reduziert gegenüber TIR1/IAA7 Komplex

Folgerung:

Intaktes KR motif zwischen DI und DII der Aux/IAAs
essentiell für Auxin-Bindung

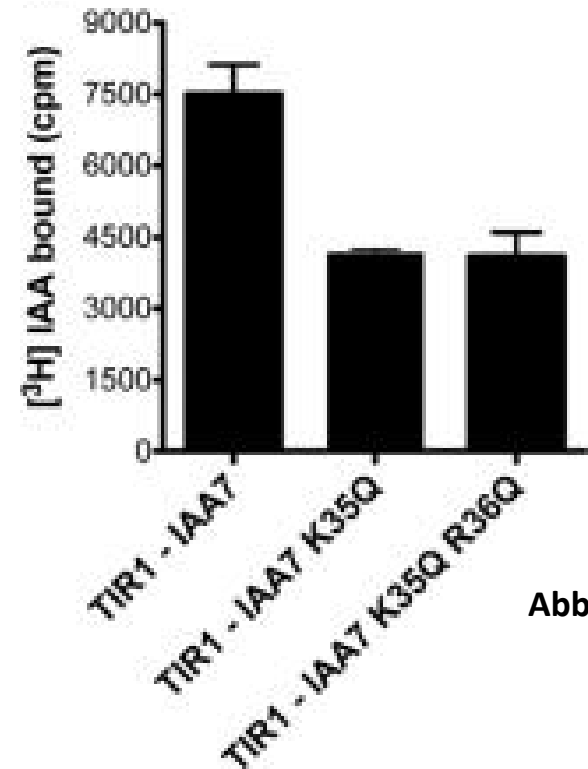
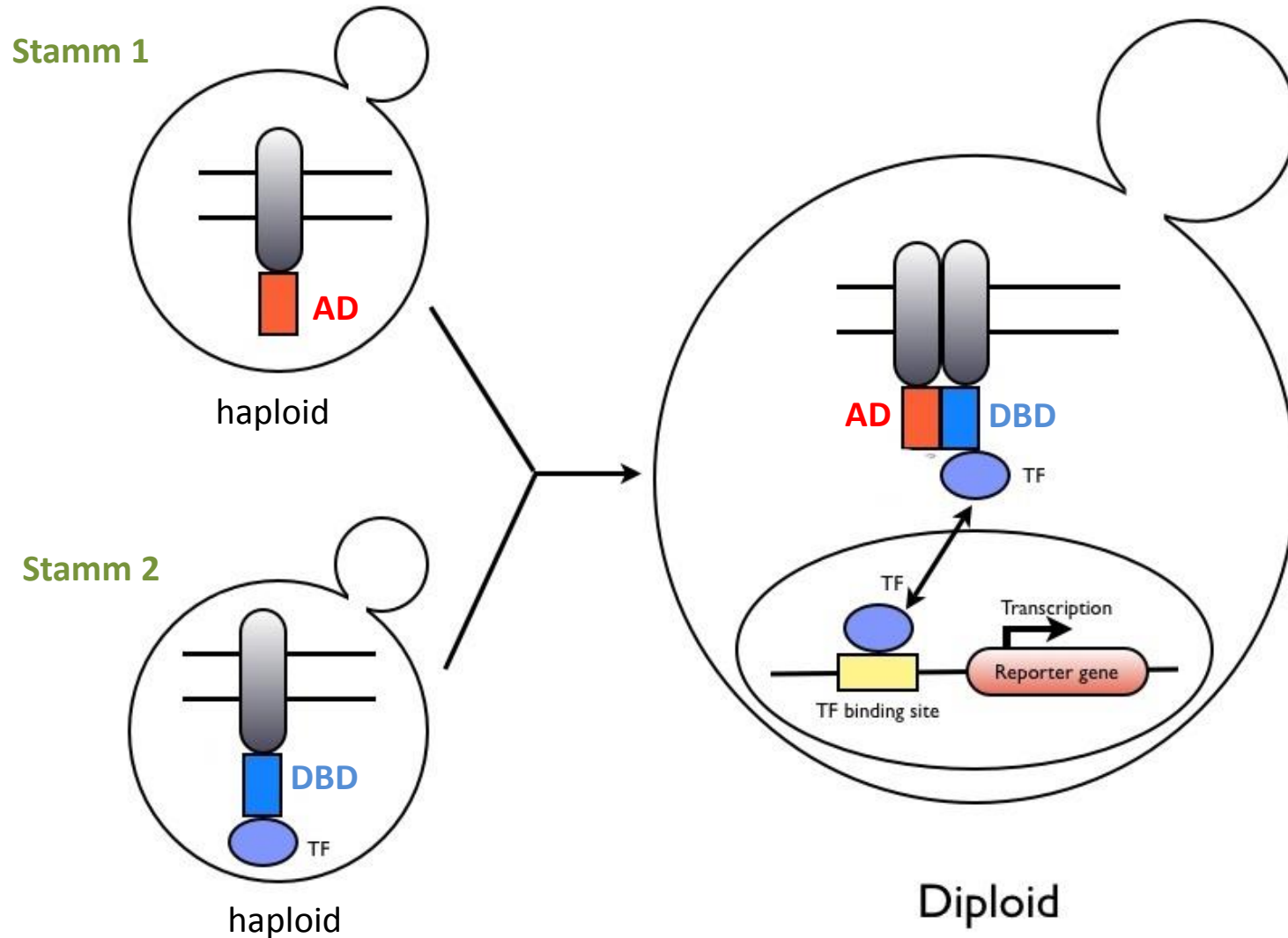


Abb. 1e

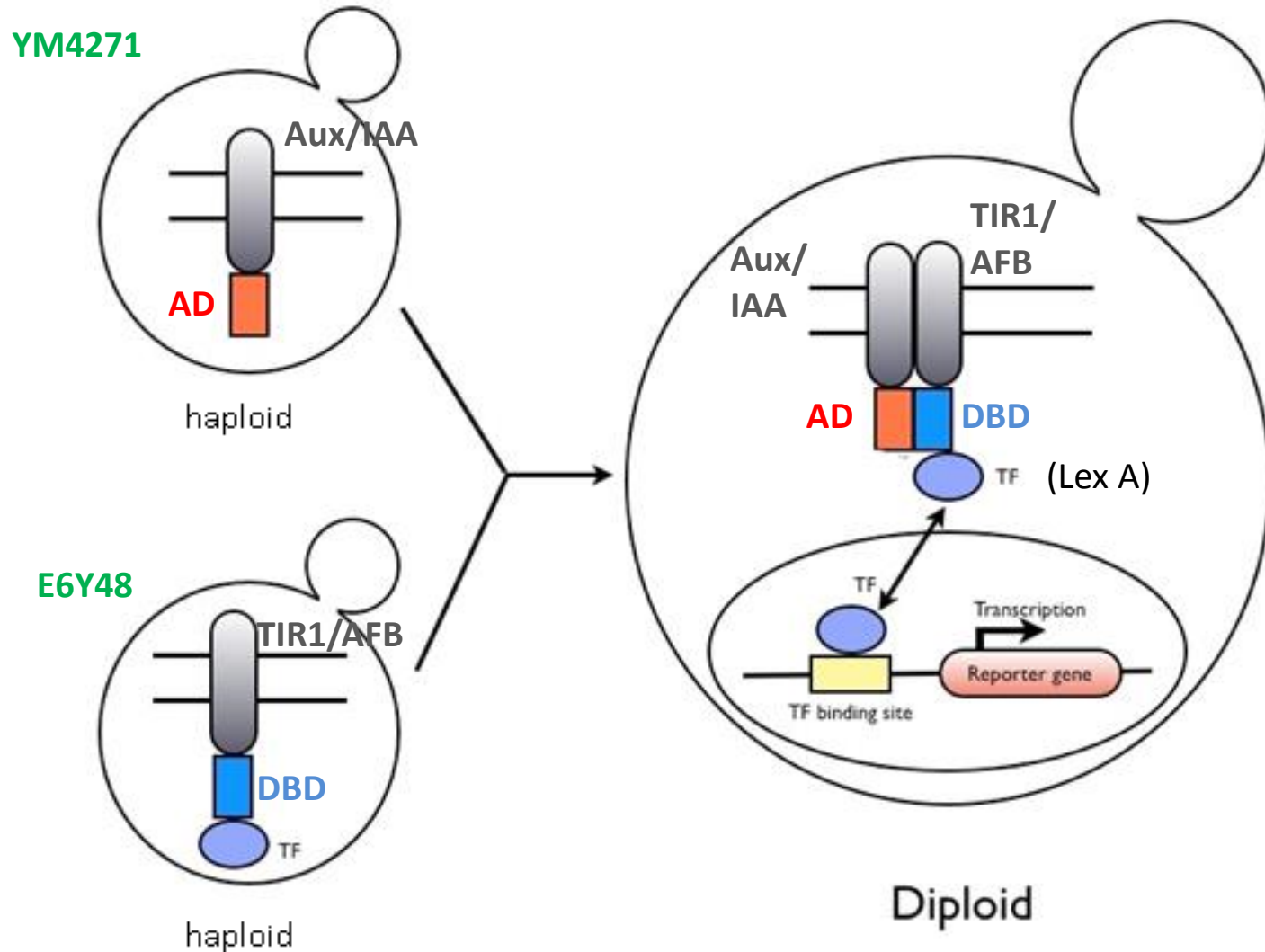
II. Rollenverteilung der F-box-Proteine im Auxinpathway durch Interaktion mit unterschiedlichen Aux/IAA-Proteinen?

Assemblierung verschiedener Co-Rezeptor-Komplexe abhängig von der Auxin Konzentration?

Methode: Yeast-two-hybrid (Y2H)



Ausbildung verschiedener Co-Rezeptor-Komplexe in Abhängigkeit der Auxin-Konzentration



Ausbildung verschiedener Co-Rezeptor-Komplexe in Abhängigkeit der Auxin-Konzentration

Ergebnis: (qualitativ)

- IAA3, IAA5, IAA7 und IAA8 generell bessere Substrate für TIR1/AFBs als IAA12, IAA28, IAA31
- Keine Interaktion bei IAA20
- Co-Rezeptor-Komplexbildung trotz identischer degron motif Sequenz bei unterschiedlichen Auxinkonzentrationen

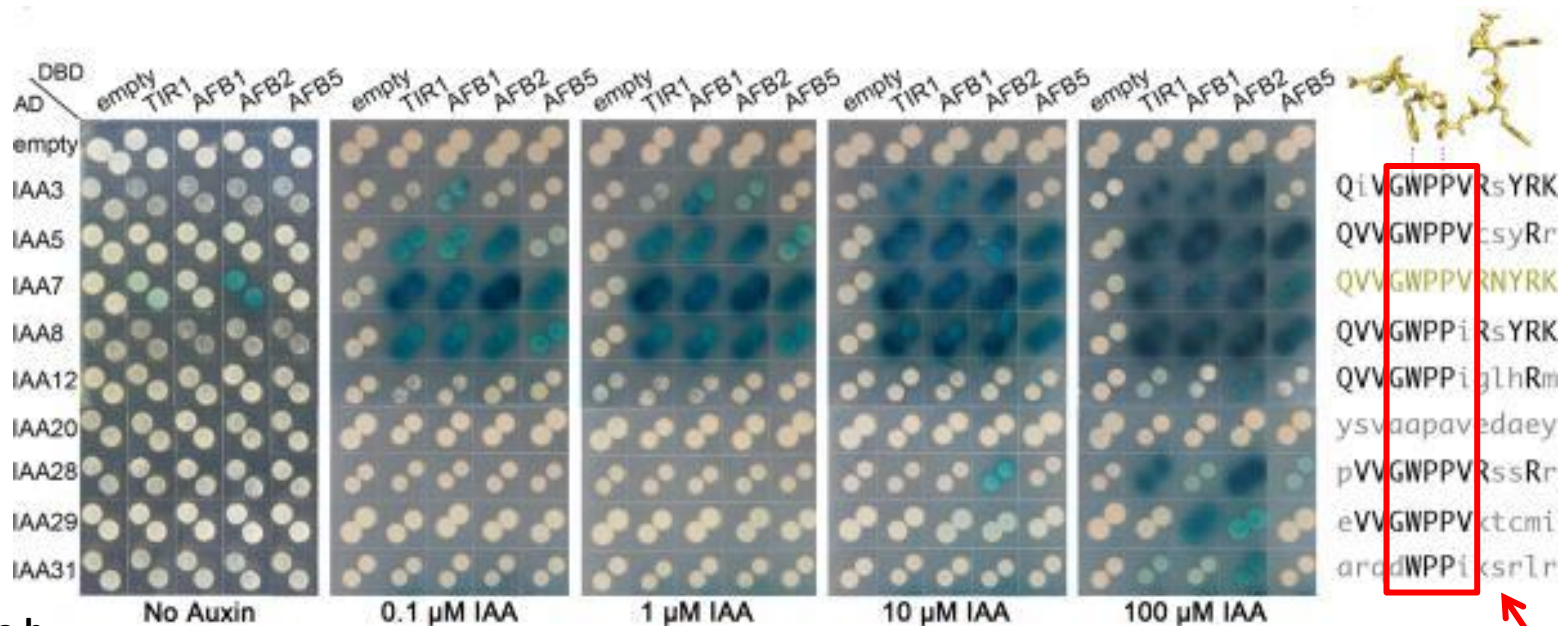


Abb. 2a,b

Folgerung:

- Degron motif essentiell für Co-Rezeptor-Zusammenlagerung
- Vermutlich noch andere Sequenzen an Komplexbildung beteiligt

Bildung unterschiedlicher Co-Rezeptoren erzeugt Affinitätsunterschiede gegenüber Auxin

Methode: [^3H]-IAA labeled binding assay

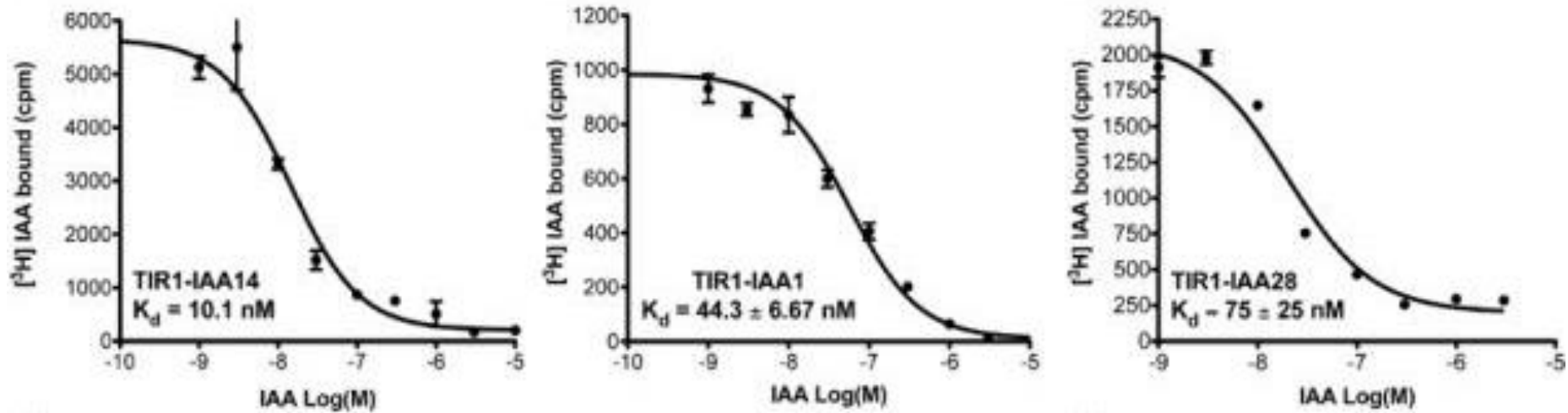


Abb. 3 a,b,c

Ergebnis:

- Die Bindeaffinität von IAA der Co-Rezeptor Komplexe variiert von 10 nM bis 1M Auxin
- IAA14, IAA7 ähnliche Affinität
- IAA3 schwächere Affinität; IAA28 schwächste Affinität

Folgerung:

- Instabile Aux/IAA-Proteine mit vollständiger degron motif Sequenz führen zu erhöhter Stabilität des Co-Rezeptorkomplexes und zu höherer Affinität zu IAA

Intaktes degron motif ist Determinante für Auxinaffinität der Co-Rezeptorkomplexe

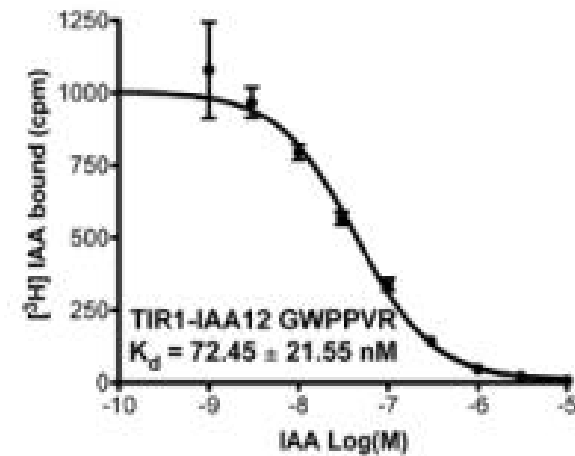
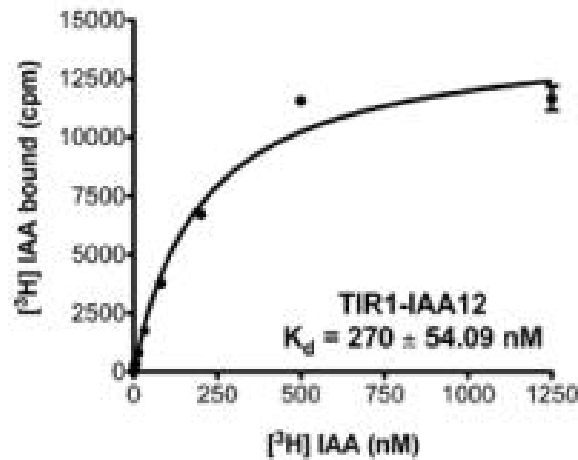
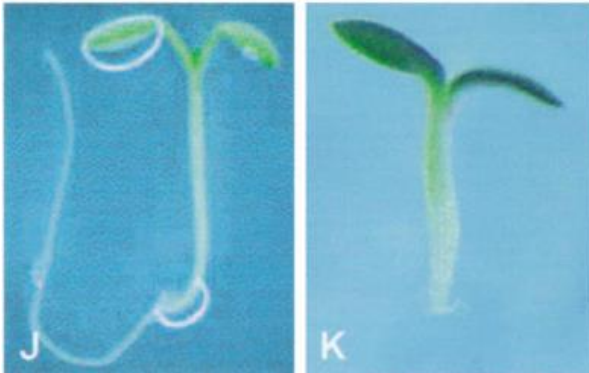


Abb. 3d

Notwendigkeit eines intakten „degron motifs“ für die Auxinantwort



Wildtyp

Bodenlosmutante

Abb.J,K: Thorsten Hamann et al

IAA 12 (bd1)	ssQVVGWSPiglhmrnslvn
IAA 3 (shy 2-2)	kaQVVGWSPvrstyrknnigs
IAA 7 (axr 2-1)	kaQVVGWSPvrnyrknnmtq

Abb. L: Thorsten Hamann et al

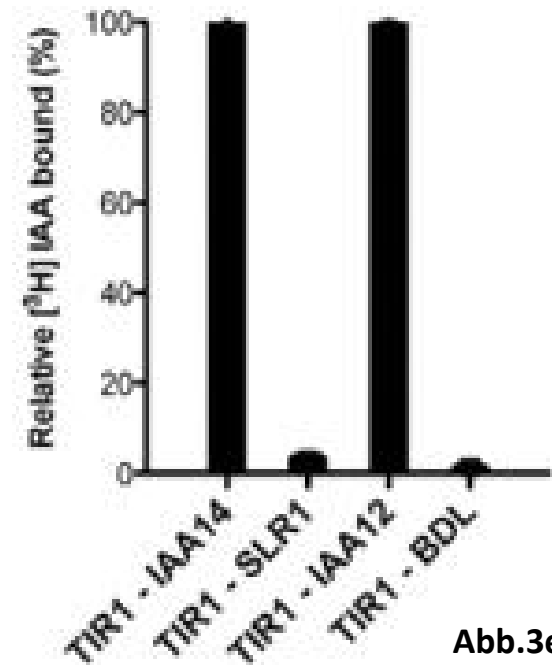


Abb.3e

Ergebnis: Die Inaktivierung des degron motifs durch Mutationen verhindern das Auxinsignal

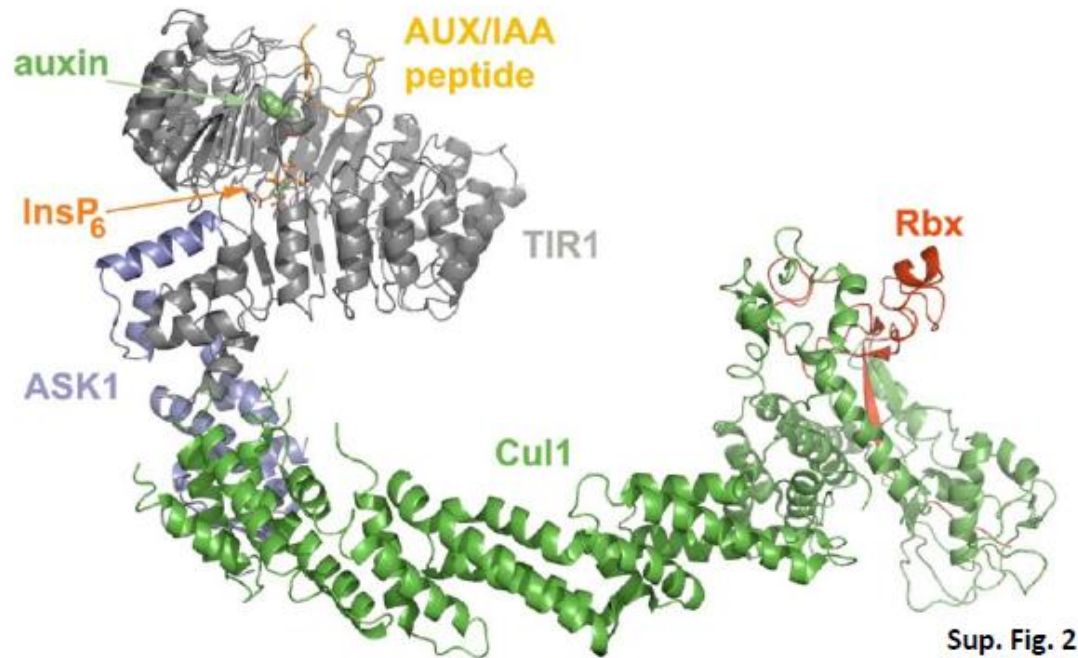
III. Welche Aminosäurereste sind essentiell für die Auxinbindung und Co-Rezeptor-Komplexbildung?

Welche Rolle spielt InsP_6 ?

Welche Aminosäuren der Auxinbindestelle sind essentiell für die TIR1-Funktion?

TIR1 Mutationen beeinflussen die Assemblierung des Co-Rezeptor-Komplexes

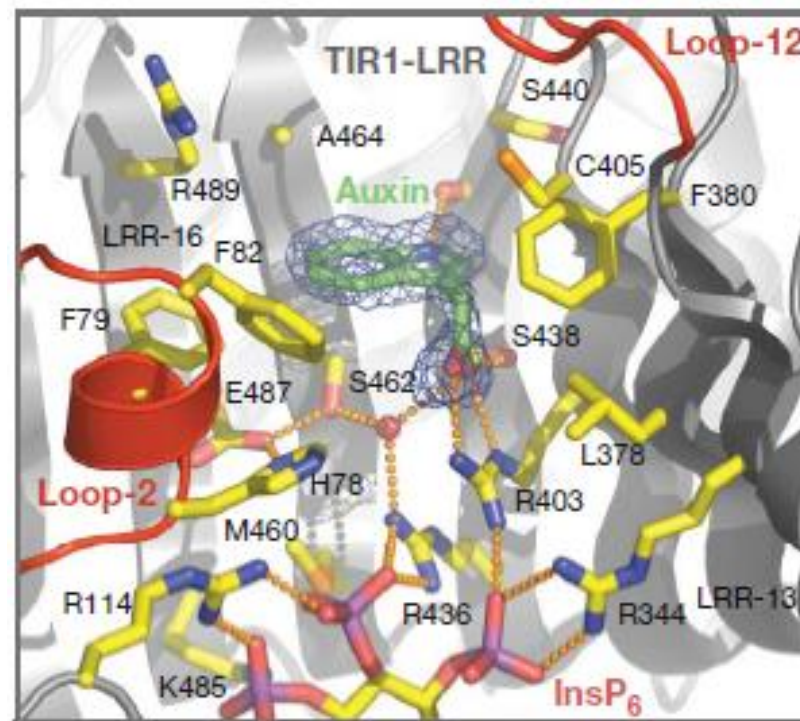
- Analyse der Funktion von key residues der Co-Rezeptor-Assemblierung und Auxinbindung



Tan et al. (2007)

TIR1 Mutationen beeinflussen die Assemblierung des Co-Rezeptor-Komplexes

- Analyse der Funktion von key residues der Co-Rezeptor-Assemblierung und Auxinbindung



Tan et al. (2007)

TIR1 Mutationen beeinflussen die Assemblierung des Co-Rezeptor-Komplexes

- Untersuchung der Interaktion mit ASK1 oder IAA7
- Methode: Y2H assays

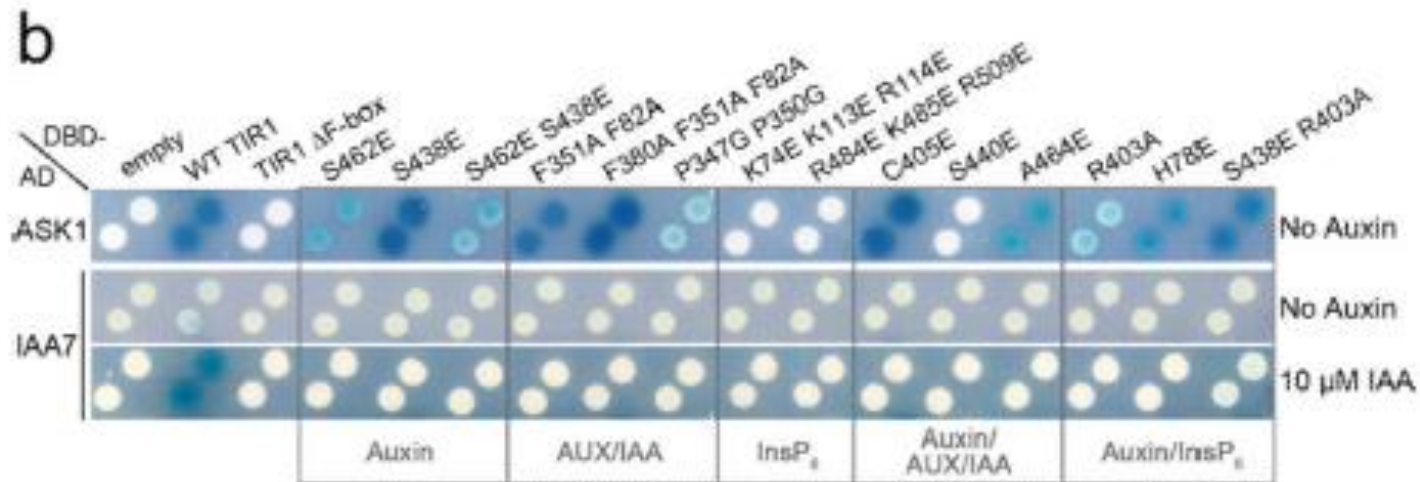
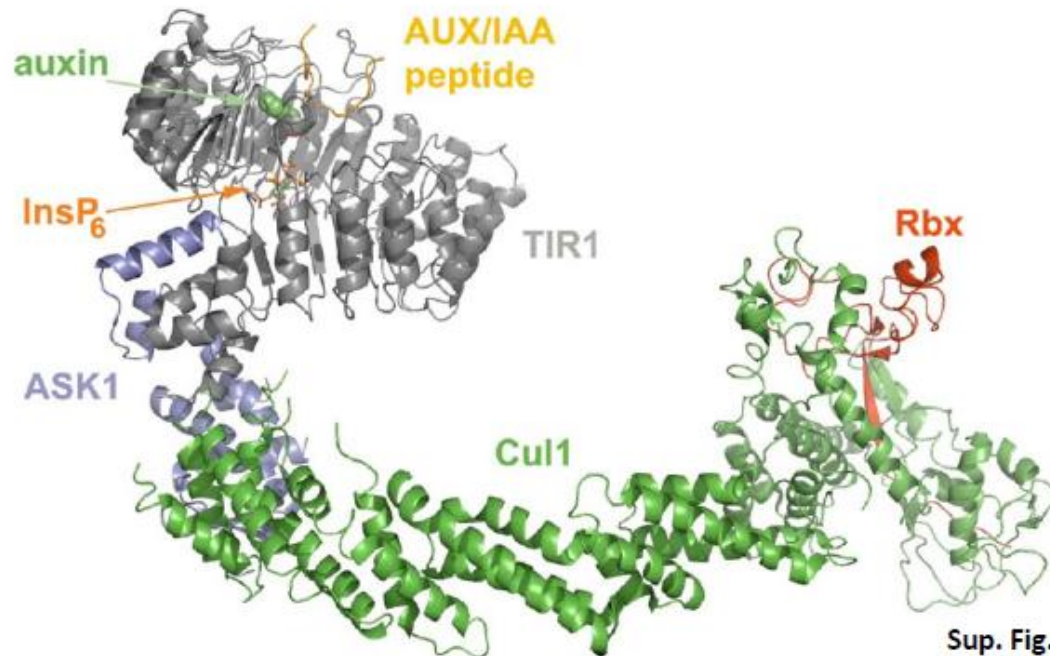


Fig. 4b

TIR1 Mutationen beeinflussen die Assemblierung des Co-Rezeptor-Komplexes

- Ergebnis:
 - Mutationen an den bekannten key residues für die Bindung von Auxin, Aux/IAA und InsP₆ verhindern die Bindung von IAA.
 - Mutationen in InsP₆ führen vermutlich zu starken strukturellen Veränderungen in TIR1.



Sup. Fig. 2

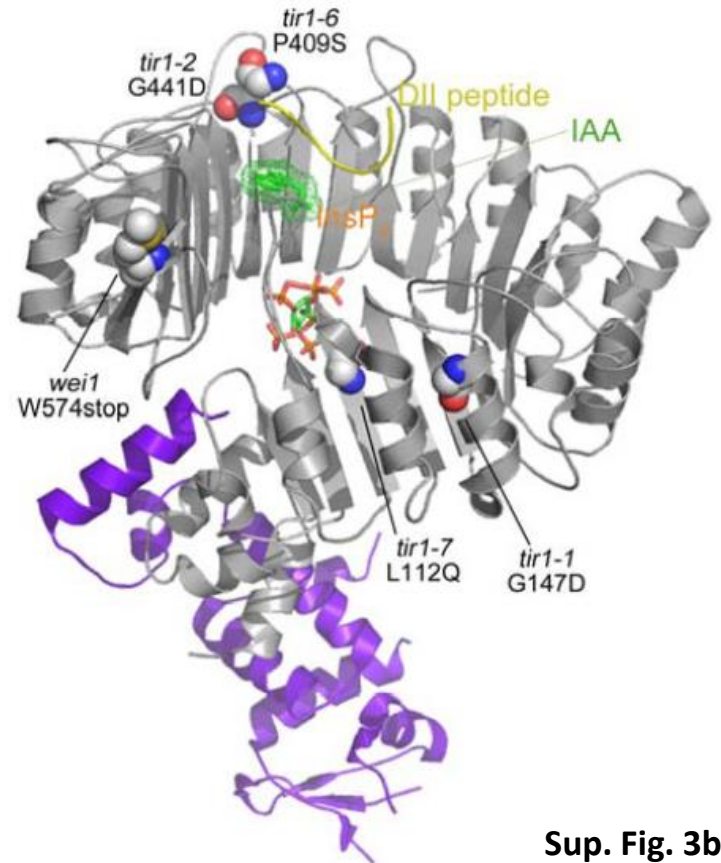
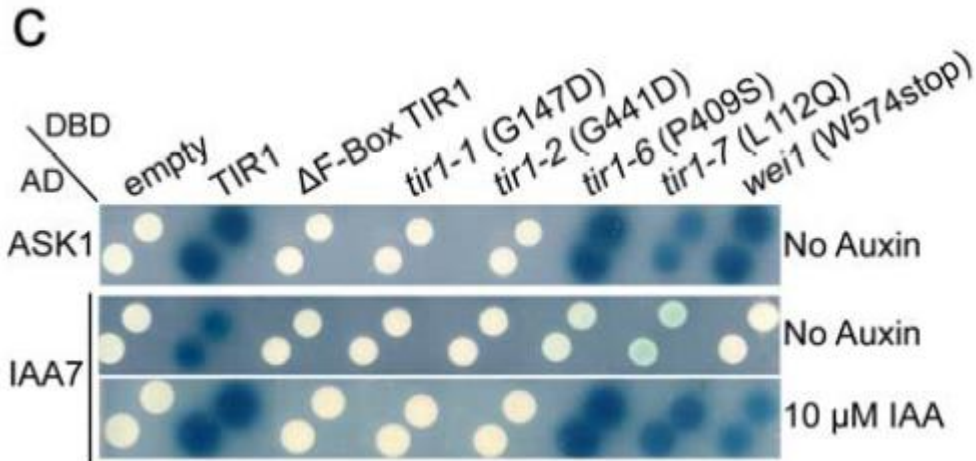
Tan et al. (2007)

TIR1 Mutationen beeinflussen die Assemblierung des Co-Rezeptor-Komplexes

- TIR1 und AFBs interagieren unabhängig von Auxin mit ASK1



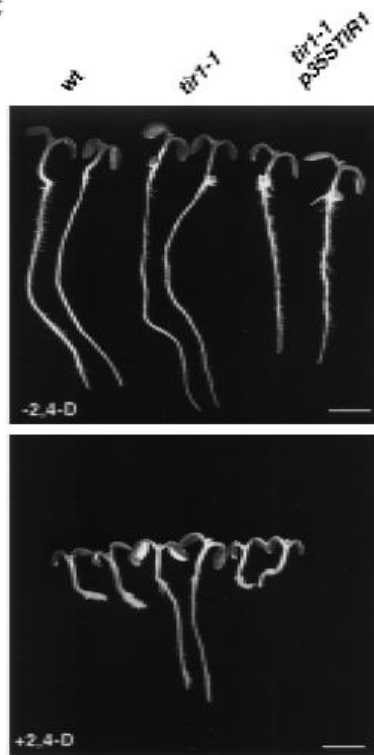
Sup. Fig. 3a



TIR1 Mutationen beeinflussen die Assemblierung des Co-Rezeptor-Komplexes

- Mutante TIR1-Gene werden unter Kontrolle des TIR1 Promotors in den Wildtyp und *tir1-1* Pflanzen gebracht

C



Ruegger et al. (1997)



Greenham et al. (2011)

TIR1 Mutationen beeinflussen die Assemblierung des Co-Rezeptor-Komplexes

- Mutante TIR1-Gene werden unter Kontrolle des TIR1 Promotors in den Wildtyp und *tir1-1* Pflanzen gebracht

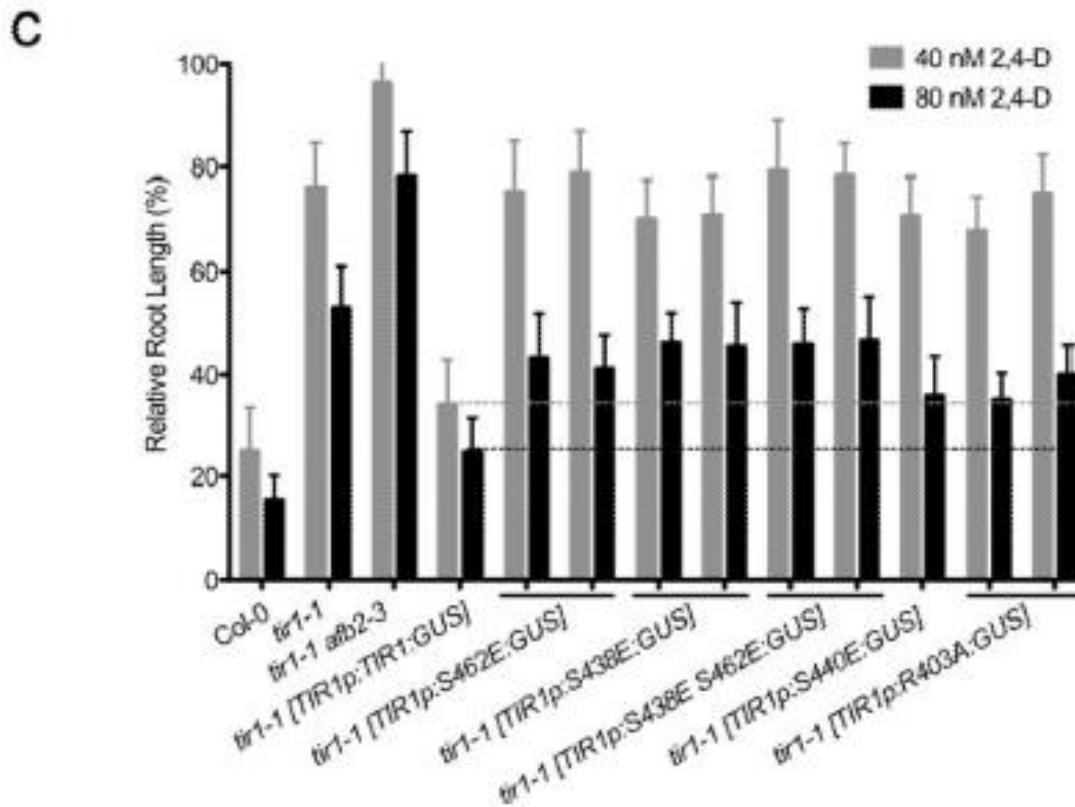


Fig. 4c

TIR1 Mutationen beeinflussen die Assemblierung des Co-Rezeptor-Komplexes

- Ergebnis:
 - kein transgener Organismus erlangte die Auxinsensitivität zurück.
 - Ser438, Ser462, Ser440 und Arg403 sind essentiell für die TIR1 Funktion
- Die Daten lassen vermuten, dass die TIR1-Aux/IAA Co-Rezeptor-Formierung und Interaktion mit ASK1 essentiell für die Auxinsensitivität sind.

IV. Wie beeinflusst das Auxin Affinität und Dissoziationsrate des TIR1 – Aux/IAA?

Auxin-Agonisten stabilisieren TIR1-Aux/IAA-Komplexe verschieden

- Frage: Fördern die synthetischen Auxine 1-NAA, 2,4-D und Picloram die TIR1-Aux/IAA Interaktion?

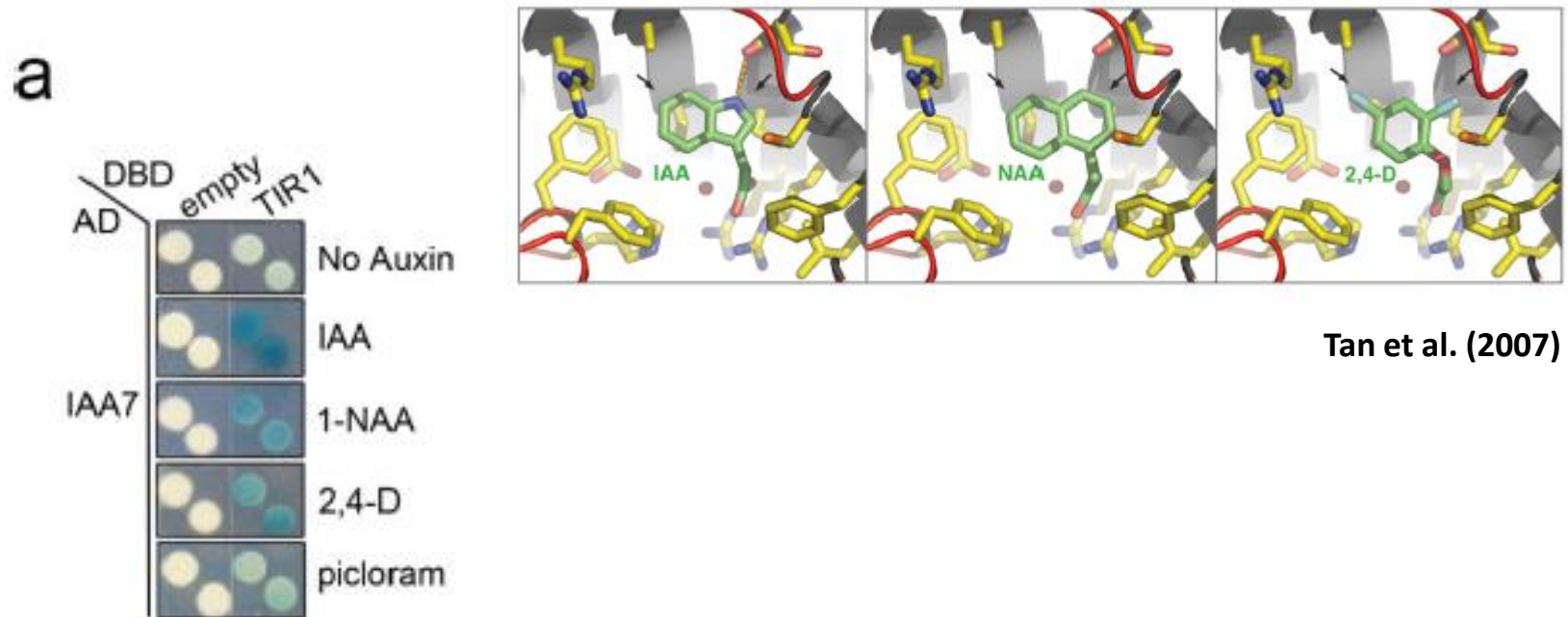
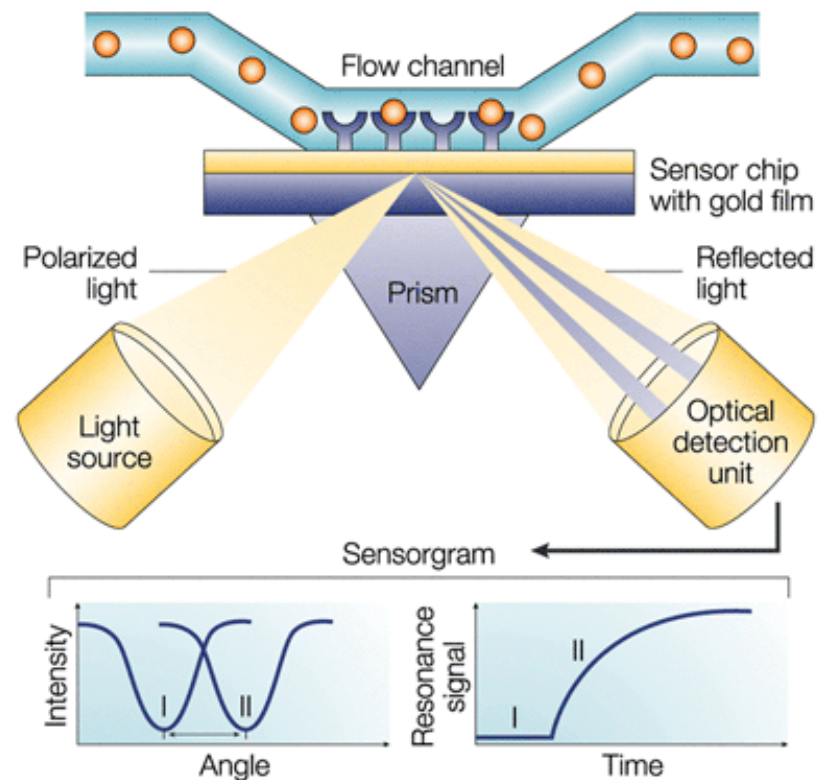


Fig. 5a

- Ergebnis: Die synthetischen Auxine sind weniger wirksam als IAA.

Methode: Surface Plasmon Resonance

- spektroskopisch
- IAA7 DII Peptide auf einem Chip immobilisiert
- gereinigte ASK1-TIR1 oder ASK1-AFB5 Proteine werden mit Auxin über die Membran geleitet



Auxin-Agonisten stabilisieren TIR1-Aux/IAA-Komplexe verschieden

- Analyse der Kinetik der Co-Rezeptor-Komplex-Formierung
- Abbildung: auxinabhängige Resonanzanalyse von TIR1-IAA7 (DII)

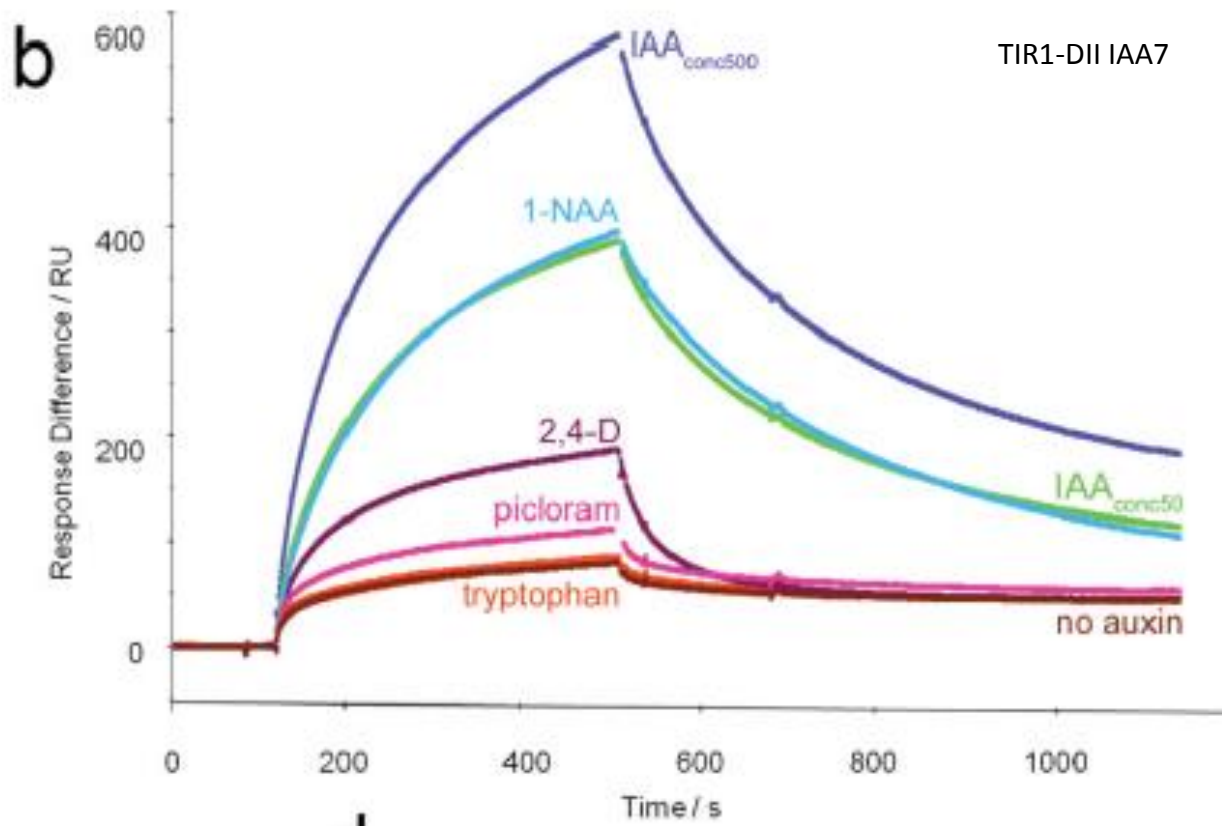


Fig. 5b

Auxin-Agonisten stabilisieren TIR1-Aux/IAA-Komplexe verschieden

- Competitive binding assays von 1-NAA und 2,4-D

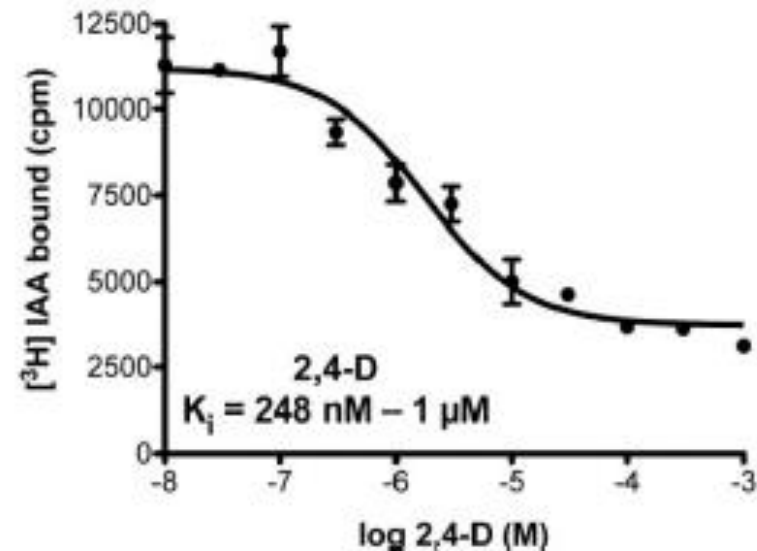
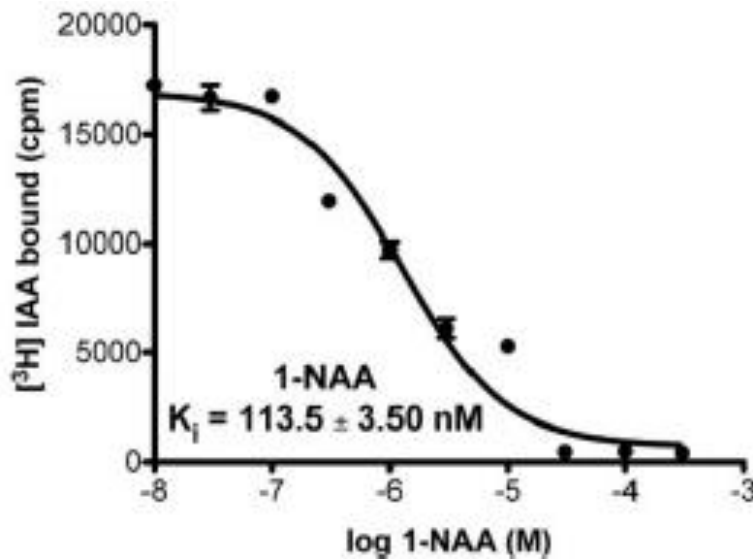


Fig. 5c, 5d

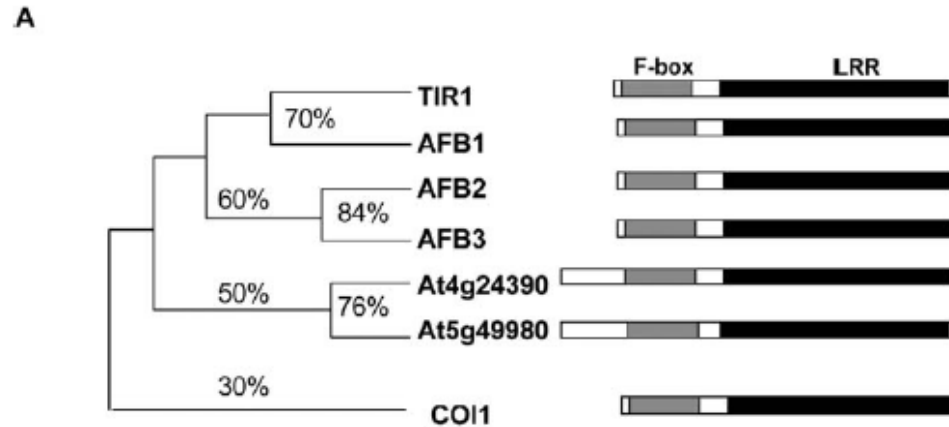
- Ergebnis:
 - Verschiedene Auxine stabilisieren den TIR1-IAA7-Komplex unterschiedlich.
 - IAA ist das effektivste Auxin, da es optimal in die Bindungstasche passt.

V. Welche Besonderheiten haben AFB4 und AFB5?

Wie unterscheidet sich AFB5 von TIR1?

Der AFB5-IAA7 Co-Rezeptor-Komplex bindet Picloram

- Vermutung: AFB5 ist selektiv für verschiedene Auxin-Agonisten.

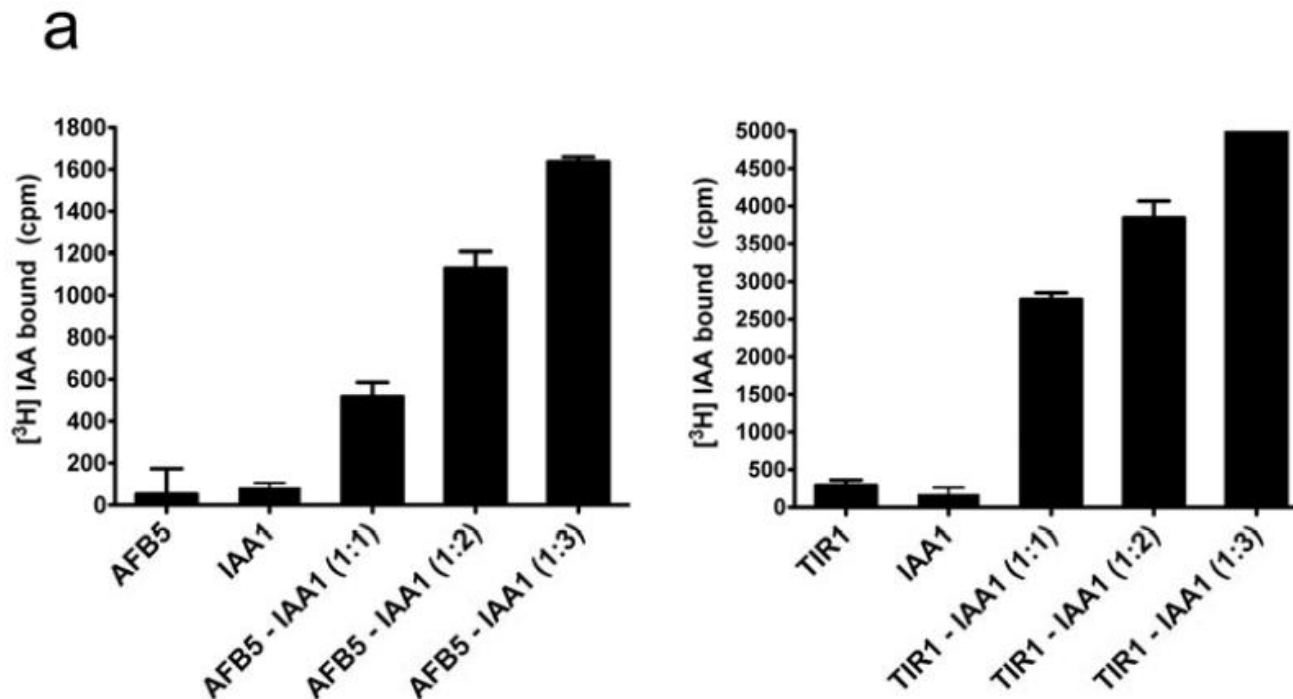


Dharmasiri et al. (2005)

- Ansatz: Vergleich der Auxinbindungsaffinität von AFB5-IAA7 und TIR1-IAA7 mithilfe von „competitive binding assays“

Der AFB5-IAA7 Co-Rezeptor-Komplex bindet Picloram

- Vergleich der Affinität von TIR1 und AFB5 für IAA1



Sup. Fig. 4a

Der AFB5-IAA7 Co-Rezeptor-Komplex bindet Picloram

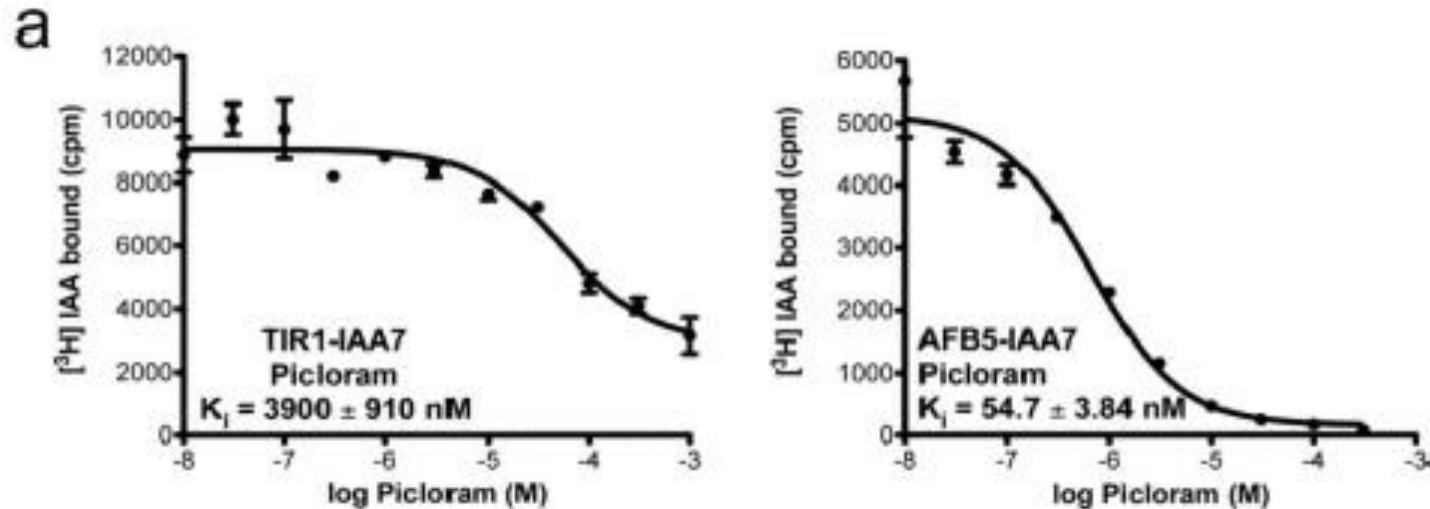


Fig. 6a

- Ergebnis:
 - Beweis der Selektivität von AFB5
 - Erklärung für die Resistenz von afb4 und afb5 Mutanten gegen Picloram

Der AFB5-IAA7 Co-Rezeptor-Komplex bindet Picloram

- Resonanzanalyse von TIR1-IAA7 (DII) und AFB5-IAA7 (DII)

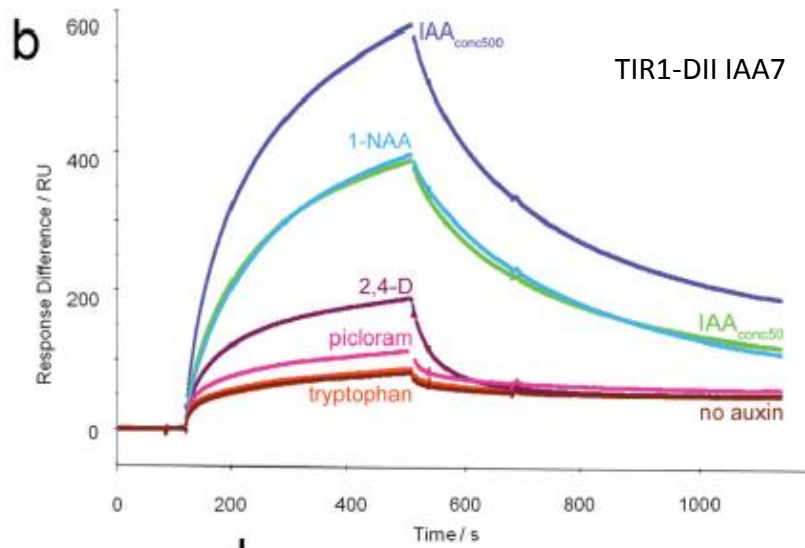
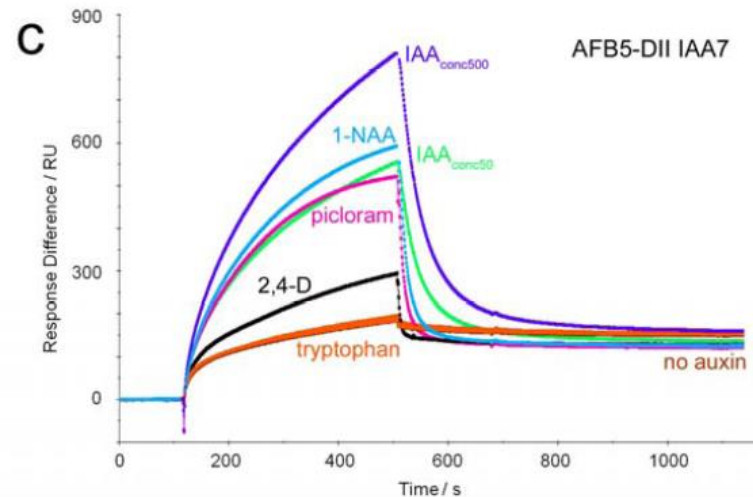


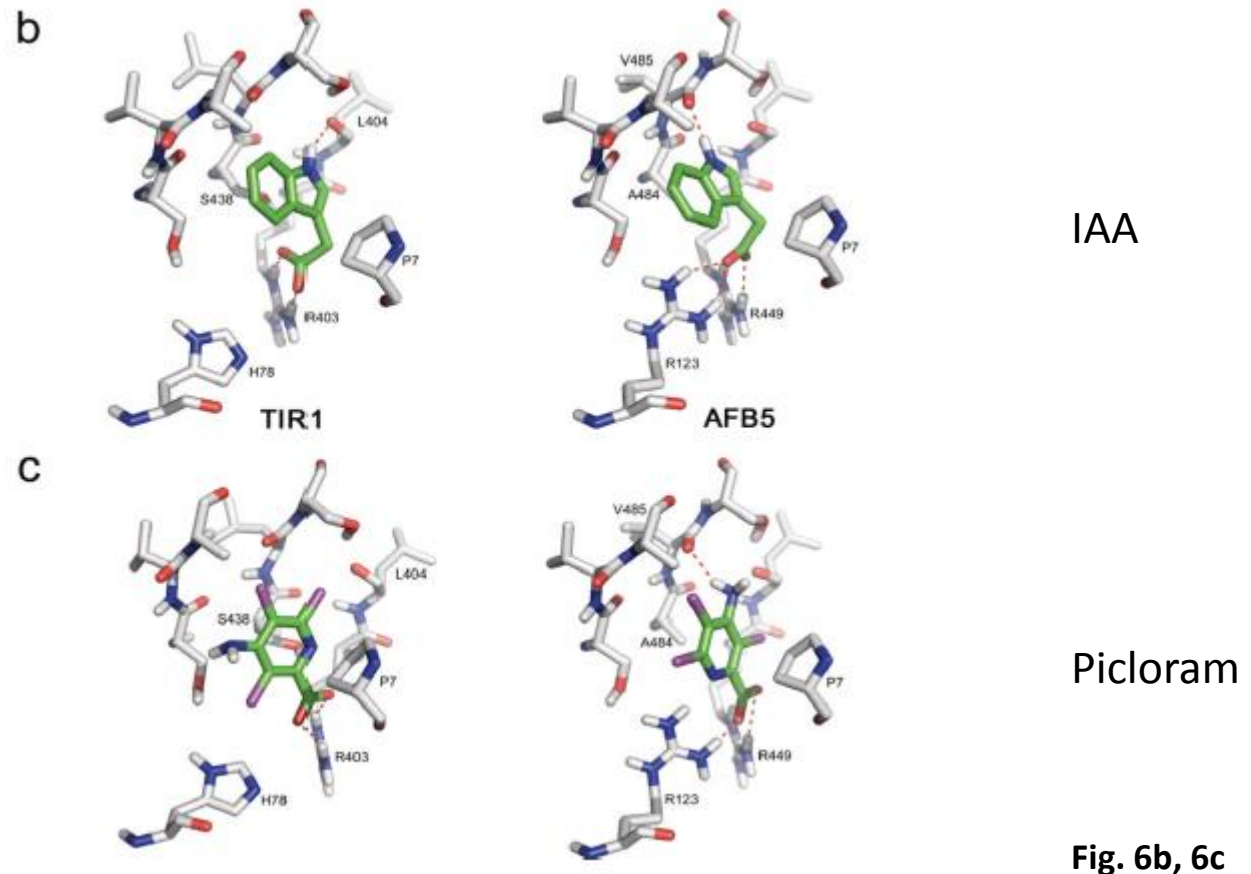
Fig. 5b



Sup. Fig. 4c

Die erhöhte Affinität von AFB5-IAA7 für Picloram hängt nur von Arg123 und Arg449 in AFB5 ab

- IAA und Picloram in den Bindungstaschen von TIR1 und AFB5



Zusammenfassung

1. Co-Rezeptor-Komplexierung verschiedener Proteinpartner ist abhängig von der Auxinkonzentration.
2. Essentiell für die Auxinbindung sind:
 - die Auxinbindestelle im SCF^{TIR1/AFB}-Komplex
 - Aux/IAA-Proteine
 - ein intaktes degron motif
 - InsP₆

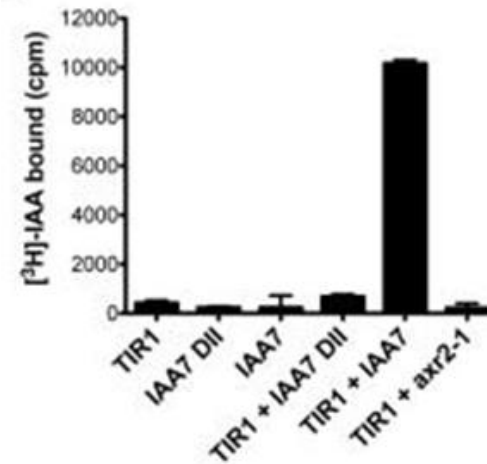


Fig. 1a

Zusammenfassung

3. Co-Rezeptor-Paare variieren in ihren Eigenschaften.

- Verschiedene Co-Rezeptor-Paare haben unterschiedliche Affinitäten für die Auxinbindung.
- Instabile Aux/IAAs bilden Co-Rezeptor-Komplexe, die eine höhere Affinität für Auxin haben.

4. IAA ist das wirksamste Auxin.

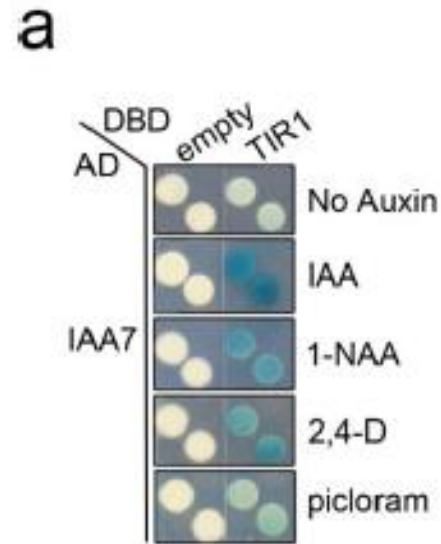


Fig. 5a

Zusammenfassung

- Die IAA-Affinität des Co-Rezeptors scheint (mit einigen Ausnahmen) vor allem durch das Aux/IAA-Protein und nicht durch das F-Box-Protein bestimmt zu werden.

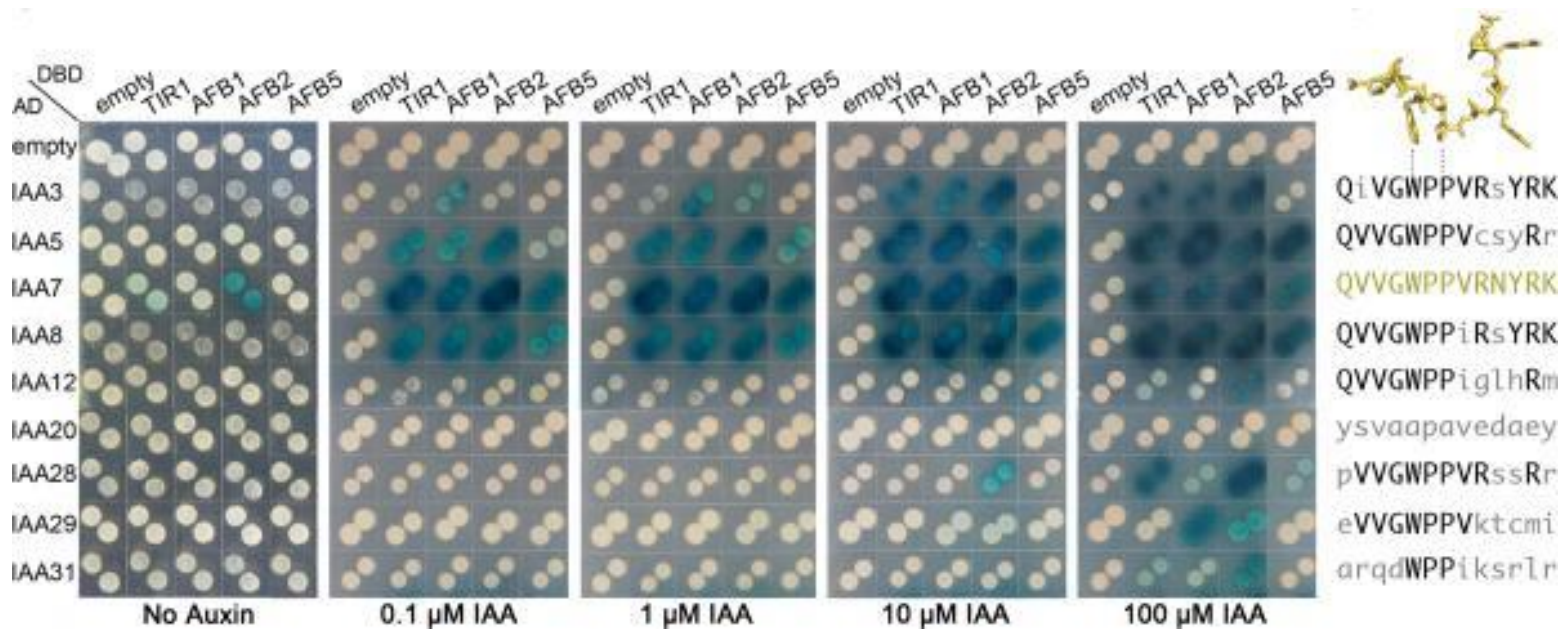
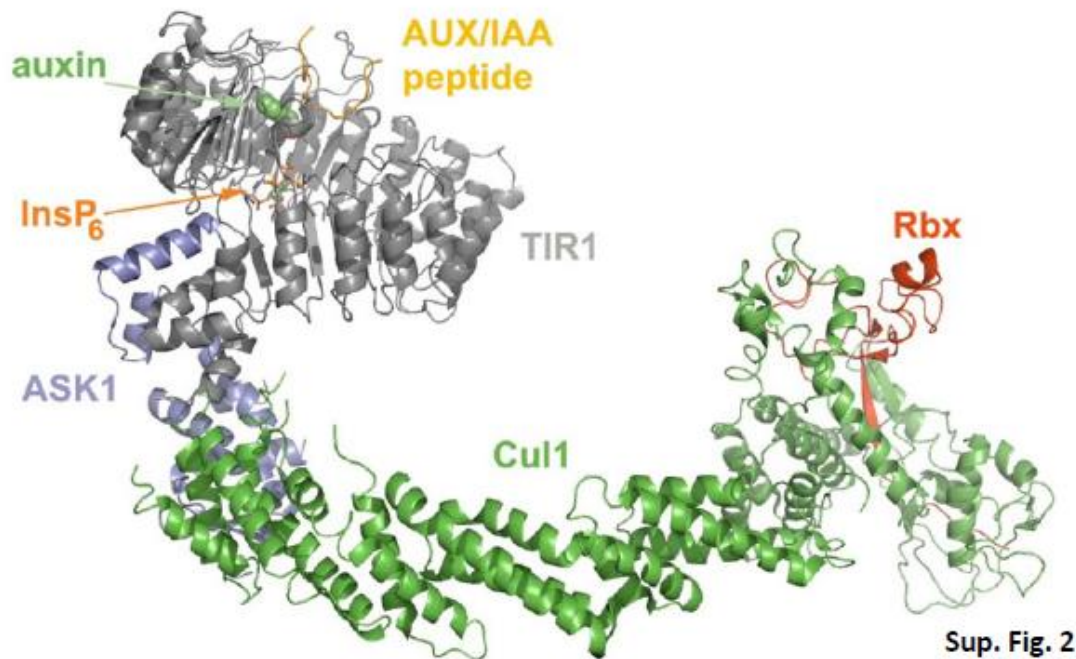


Fig. 2

Zusammenfassung

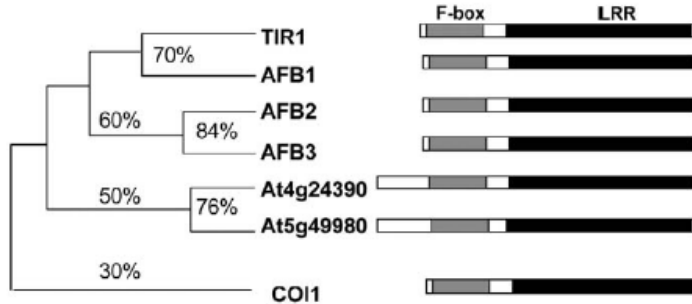
6. InsP₆ ist essentiell für die Struktur des SCF^{TIR1}-Komplex.
7. Auxin bindet an TIR1 und Aux/IAA und stabilisiert den SCF^{TIR1}-Aux/IAA-Komplex.



Zusammenfassung

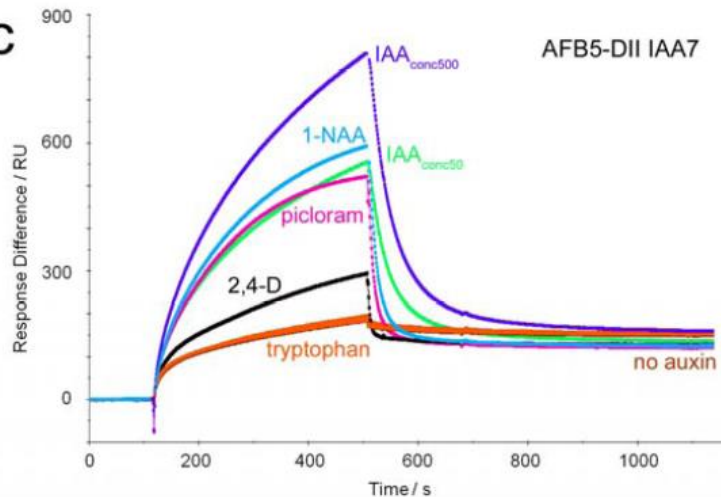
8. AFB4 und AFB5 unterscheiden sich von den anderen F-Box-Proteinen. Sie sind affiner für Picloram.

A



Dharmasiri et al. (2005)

C



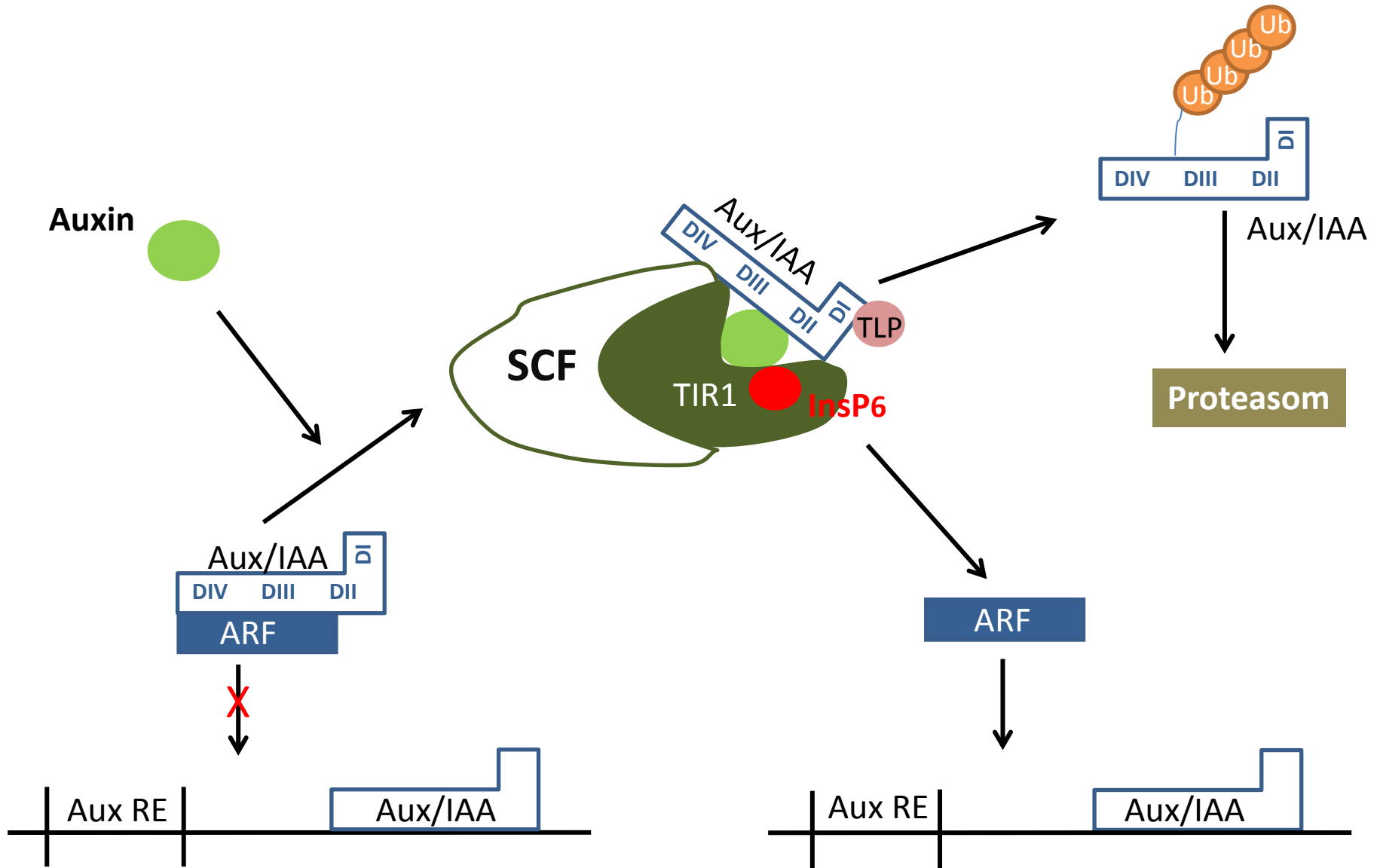
Sup. Fig. 4c

Bedeutung der Ergebnisse

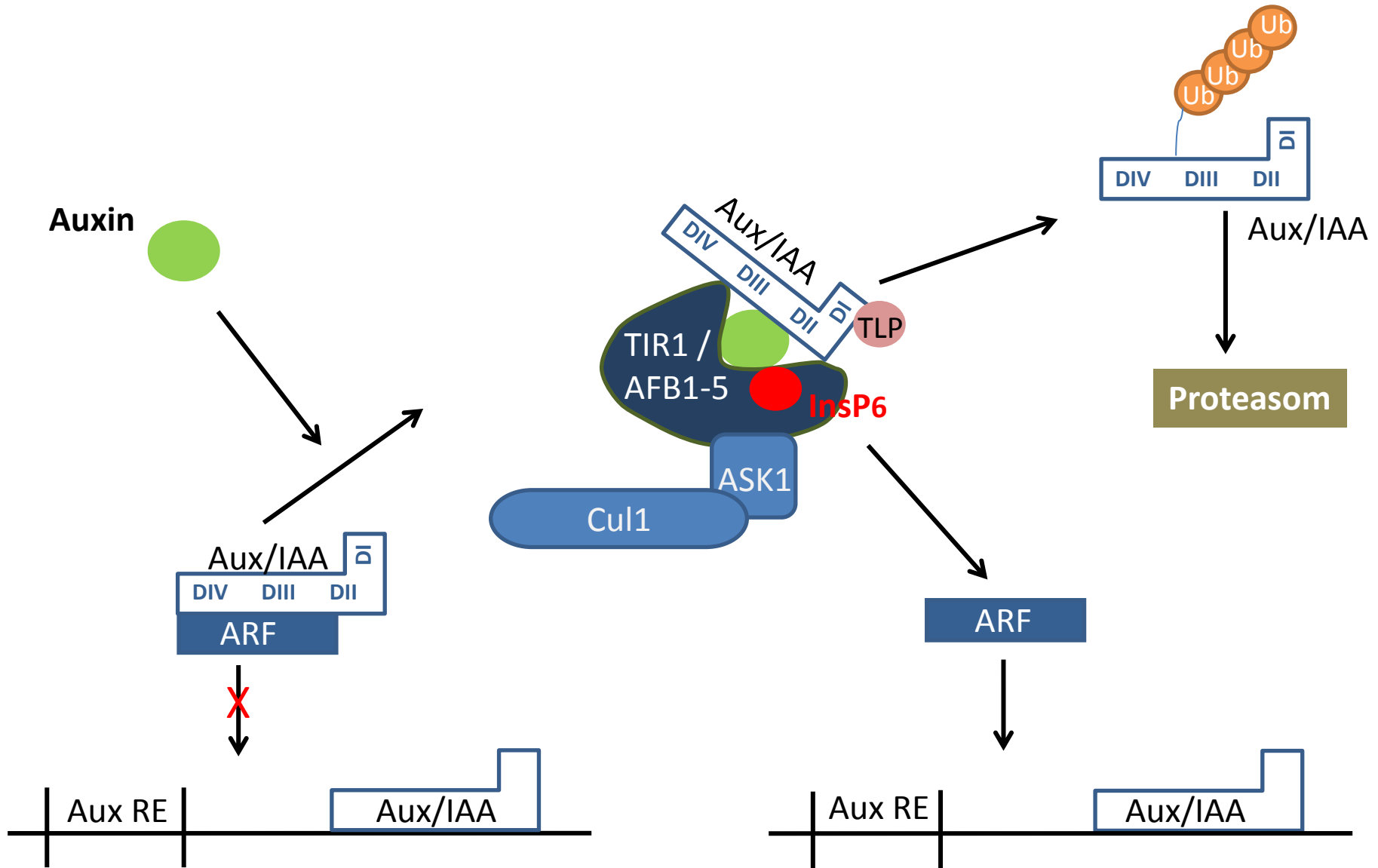
- Es gibt viele verschiedene Möglichkeiten, F-Box-Proteine mit Aux/IAA-Proteinen zu kombinieren.
- Jeder Komplex hat eine andere Affinität für Auxin.
- Homologe F-Box-Proteine könnten im Organismus anders lokalisiert sein.
- Durch die große Zahl an Möglichkeiten, verschiedene Co-Rezeptor-Komplexe mit variierenden Auxin-Affinitäten zu bilden, ergeben sich unzählige Möglichkeiten, Auxin in der Entwicklung und im Wachstum verschieden einzusetzen.

→ **SCF-Komplexe sind nicht vollständig redundant**

Was hat sich am Modell geändert?



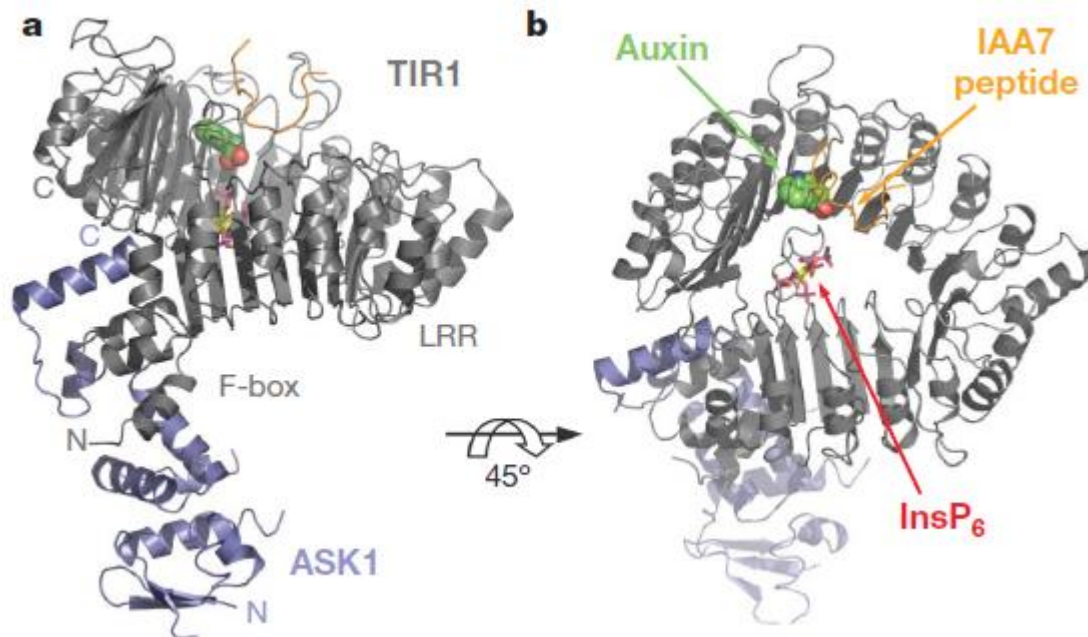
Was hat sich am Modell geändert?



Ausblick

Welche Fragen bleiben weiterhin ungeklärt?

- Ist InsP_6 ein Co-Faktor von TIR1? Welche Funktion hat er?



Tan et al. (2007)

Ausblick

Welche Fragen bleiben weiterhin ungeklärt?

- Welchen Einfluss hat die komplette Aux/IAA Struktur auf die TIR1-Aux/IAA Interaktion?

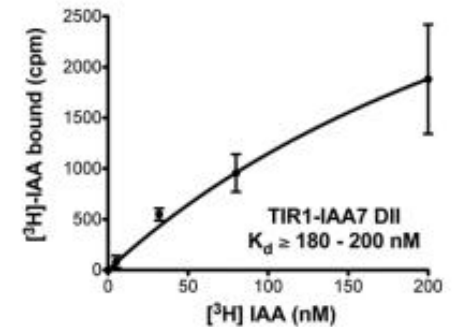
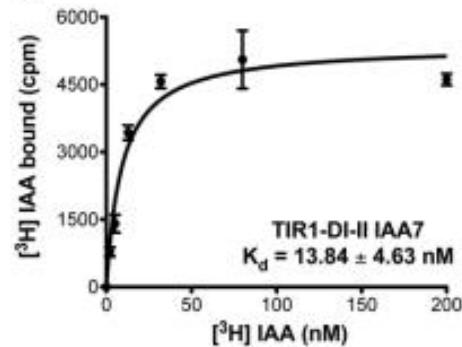
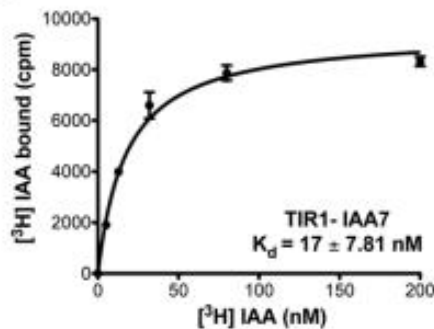


Fig. 1b, 1c

Ausblick

Welche Fragen bleiben weiterhin ungeklärt?

- Warum gibt es 29 Aux/IAAs und 23 ARFs und 6 verschiedene Rezeptoren? Welche Rolle spielt ihre Redundanz?

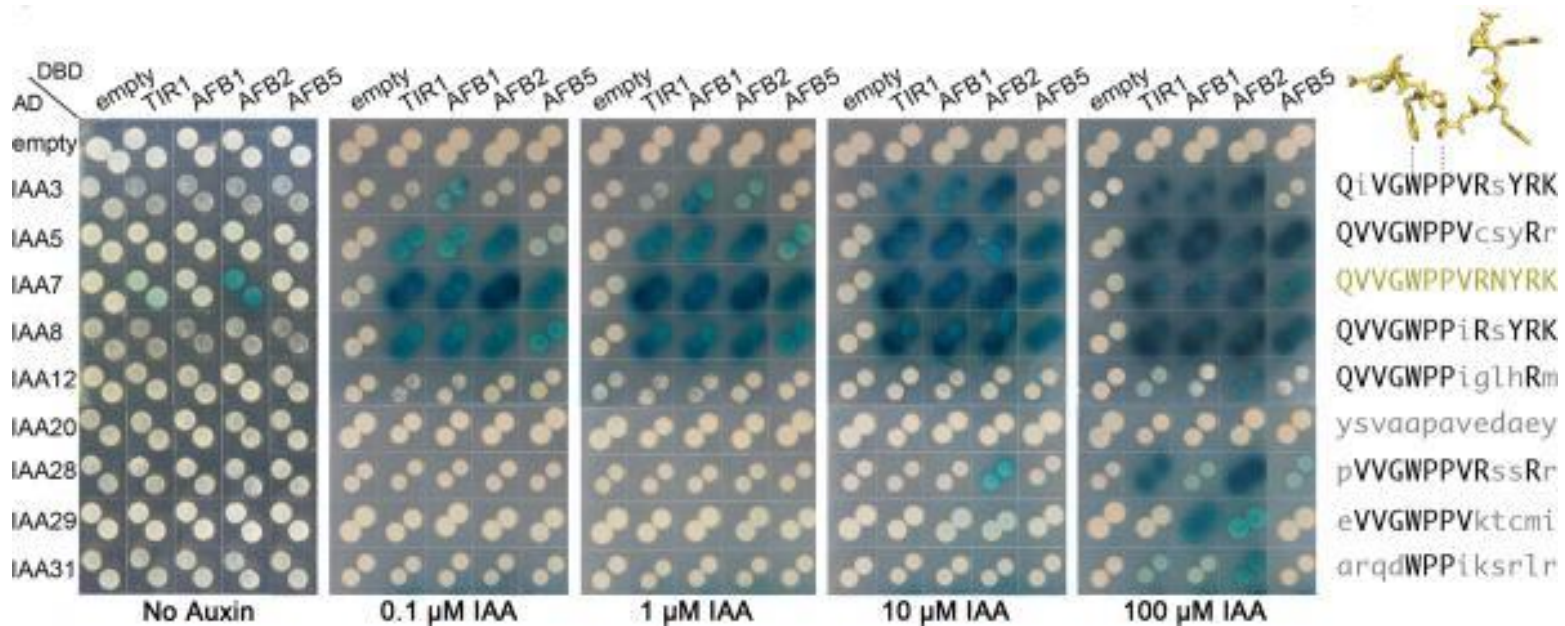


Fig. 2

Ausblick

Welche Fragen bleiben weiterhin ungeklärt?

- Mechanismus der Genregulation über ARFs
- Warum wirkt IAA ab einer bestimmten Konzentration hemmend auf das Wachstum? (Mechanismus des Umschaltens)
- Wie stark sind die Auxin-Aux/IAA, TIR1-Auxin, TIR1-Aux/IAA Bindungsstärken?
- Ist das Modell universell für andere Aux/IAA-Rezeptor-Interaktionen anwendbar?

