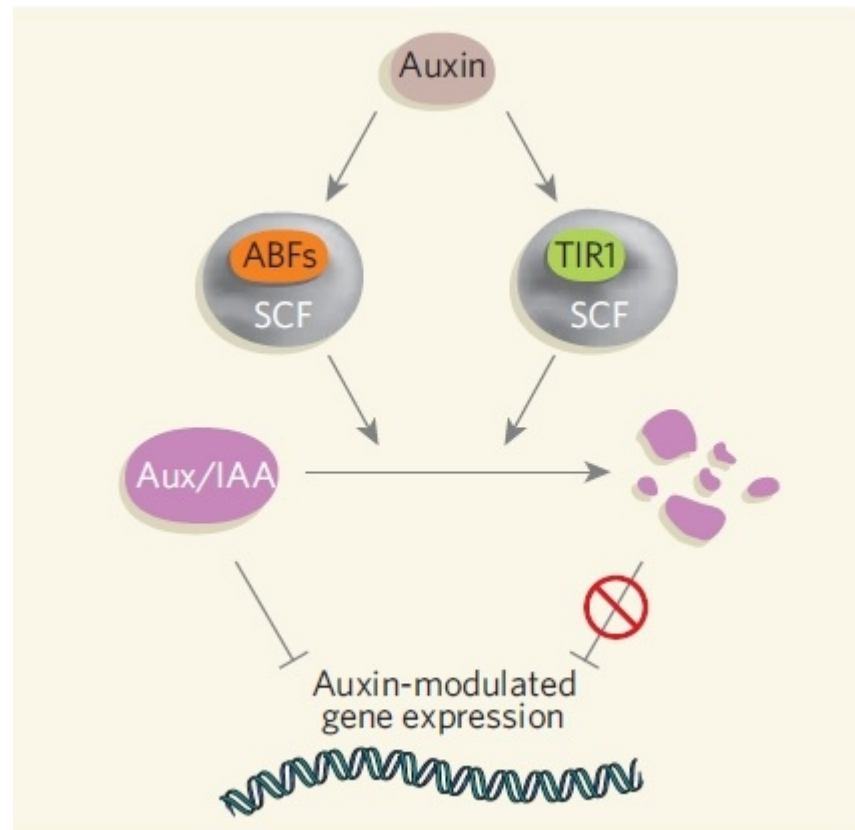
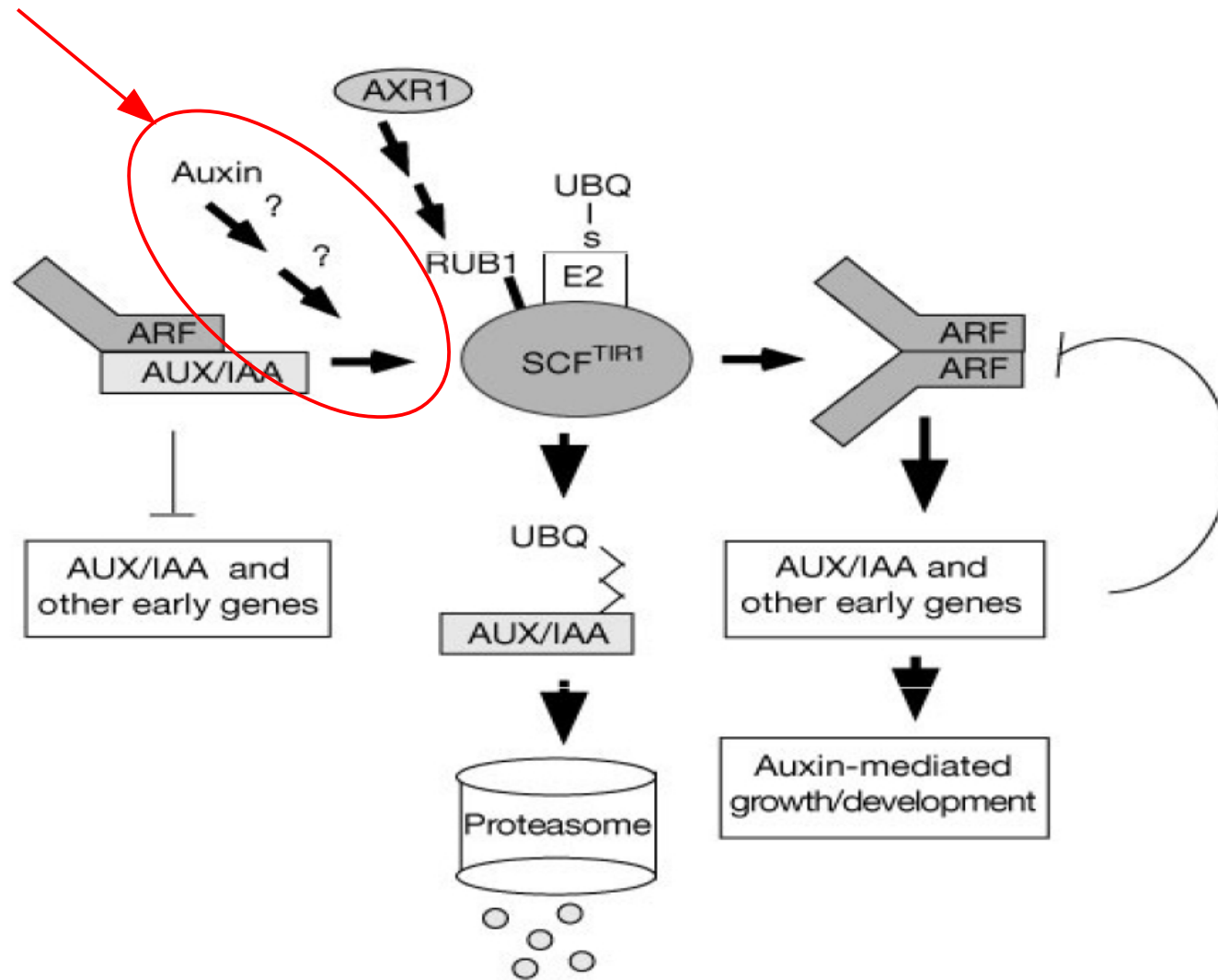


The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor



Von Stefan Kepinski & Ottoline Leyser

Bekanntes Modell



Was war bekannt?

In der Zwischenzeit gefunden:

- ABP1 kann große Mengen Auxin binden und ist ER lokalisiert
- reguliert keine Genexpression bei Auxininduktion
- Rezeptor ist nicht in der Membran,

Degradation durch SCF:

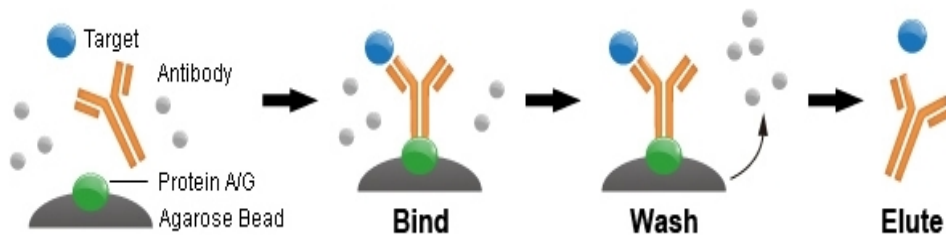
- AUX/IAA und ARF's bilden Dimere
- SCF ist für Abbau von AUX/IAA verantwortlich
- SCF aus TIR1(F-Box), ASK1,Cullen, RBX1
- Domäne II der AUX/IAA ist für Interaktion essentiell

Vermutung: TIR1 ist ein löslicher Auxin-Rezeptor ,der die Interaktionsfähigkeit von SCF und AUX/IAA beeinflusst.

Was hat man gemacht?

SCF-Komponente:

-Extraktion von SCF aus *tir1-1* Mutanten durch IP. TIR1 mit Myc getagged.



AUX/IAA-Komponente:

-Domäne II von AUX/IAA mit Biotin markiert in e.Coli expremiert

-an Agarose über Streptavidin gebunden

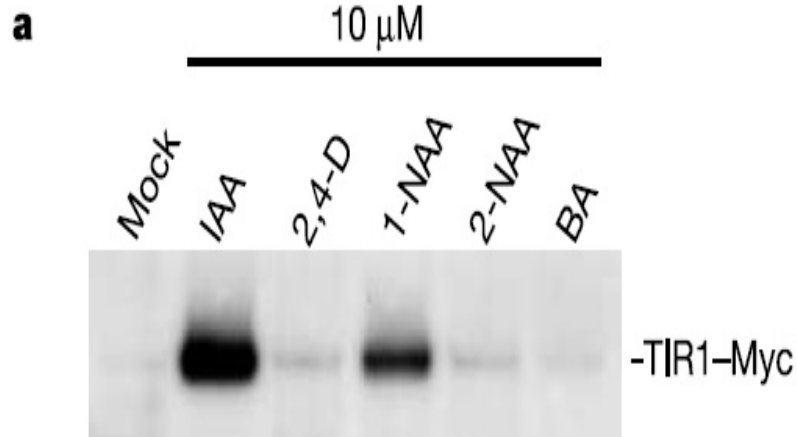


Pulldown-Assay:

- gereinigte Komponenten kamen im Pulldown-Assay zusammen
- Verschiedene Auxine wurden zugegeben

Erwartung: Ist eine der Komponenten ein Auxin-Rezeptor, so kommt es nur in Anwesenheit von Auxin zu einer Interaktion von SCF und AUX/IAA

Interaktionsfähigkeit durch Auxin



Bei Zugabe von IAA und 1-NAA kam es zu Interaktionen

2,4-D ist ein schwaches Auxin

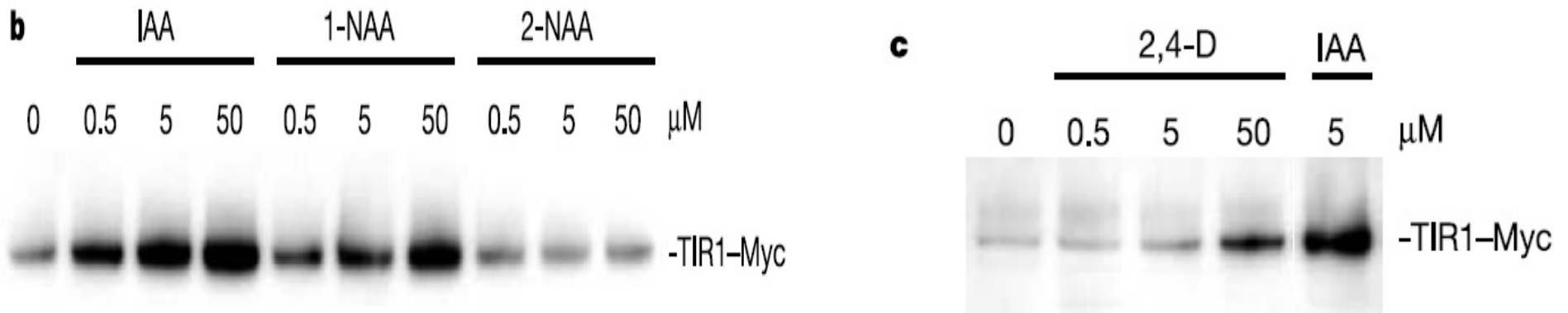
2-NAA ist eine inaktive Form von 1-NAA

BA = Benzoessäure

Frage: Ist die Interaktion von SCF und Domäne II durch Auxin konzentrationsabhängig?

- Weiteres Vorgehen:
 - Pulldown-Assay mit verschiedenen Konzentrationen

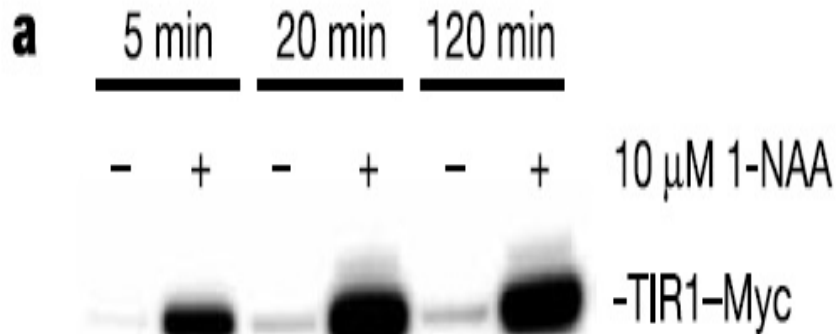
Konzentrationsabhängigkeit



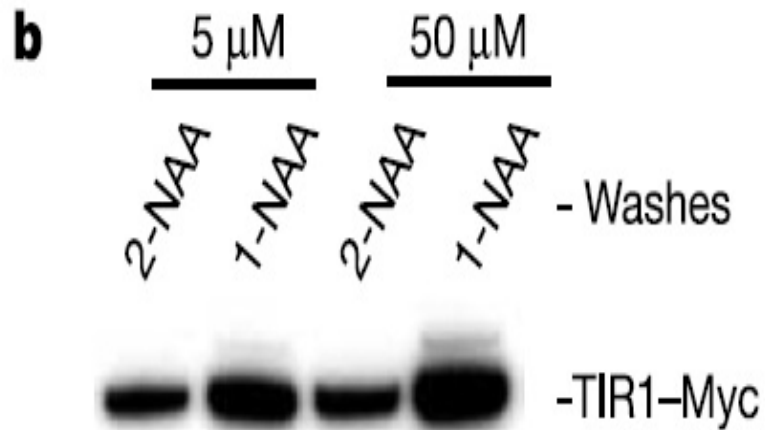
Ergebnis:

- Die Bindefähigkeit ist konzentrationsabhängig, wobei IAA das stärkste Auxin und 2,4-D das schwächste ist.
- Der Rezeptor ist spezifisch
- → Wie ist die Bindung charakterisiert?
- Vorgehen:
- Pulldown mit verschiedenen Zeiten und Waschschritten

Zeitabhängigkeit und Bindungsstärke



- Der Assay wurde für verschiedene Zeiten mit 1-NAA versetzt
- → die Bindung erfolgt sehr schnell und kann gesättigt werden

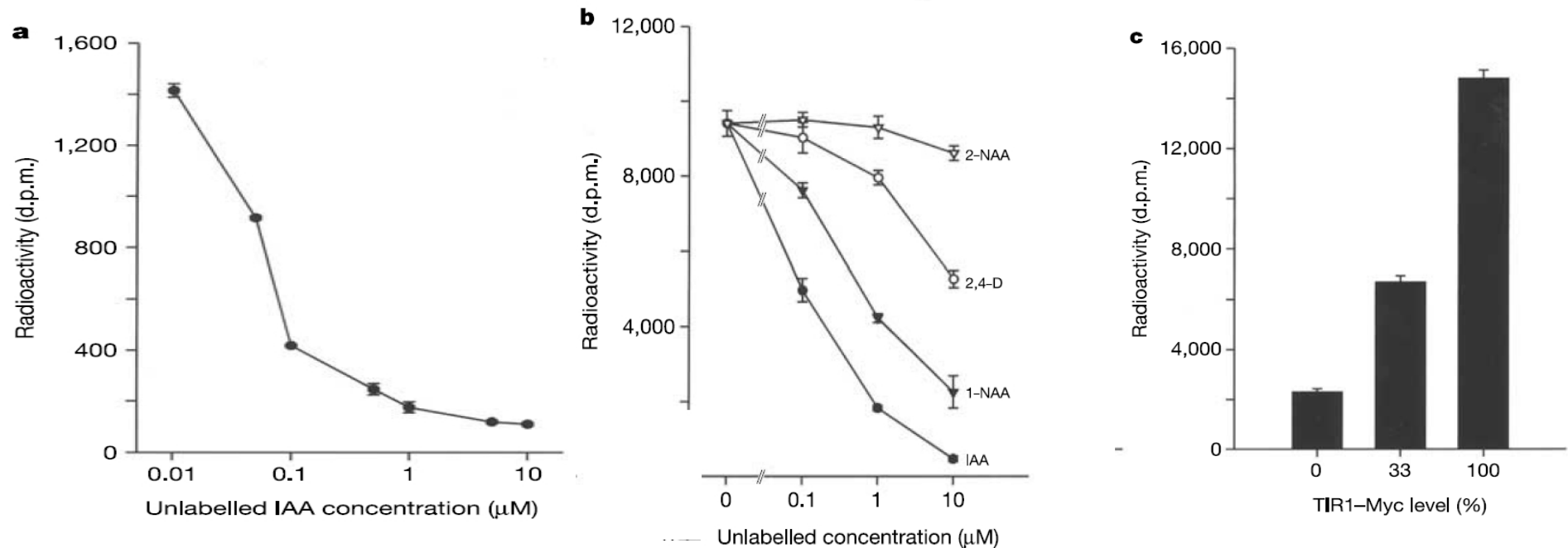


- Der Assay wurde mit aktiven oder inaktiven Auxin bei verschiedenen Konzentrationen gewaschen
- → aktives Auxin kann Interaktion fördern
- → inaktives Auxin kann Interaktion abschwächen

Vorgehen zur Quantifizierung und Bestimmung der regulierten Komponente

- Quantifizierung:
 - Pulldown-Assay wurde mit radioaktiv-markiertem IAA durchgeführt.
 - Es wurde mit kaltem IAA in verschiedenen Konzentrationen gewaschen.
 - Versuch wurde für 1-NAA, 2,4-D und 2-NAA wiederholt.
 - Radioaktivität des Pulldowns wurde gemessen und ein Graph erstellt.
- Bestimmung der regulierten Komponente:
 - Unterschiedliche TIR1-Myc Konzentrationen wurden zu dem Mutanten-Rohextrakt gegeben
 - Assay wurde mit radioaktivem IAA versetzt
 - Radioaktivität der Pulldowns wurden gemessen und ein Graph erstellt.

Quantifizierung und Bestimmung der Komponente

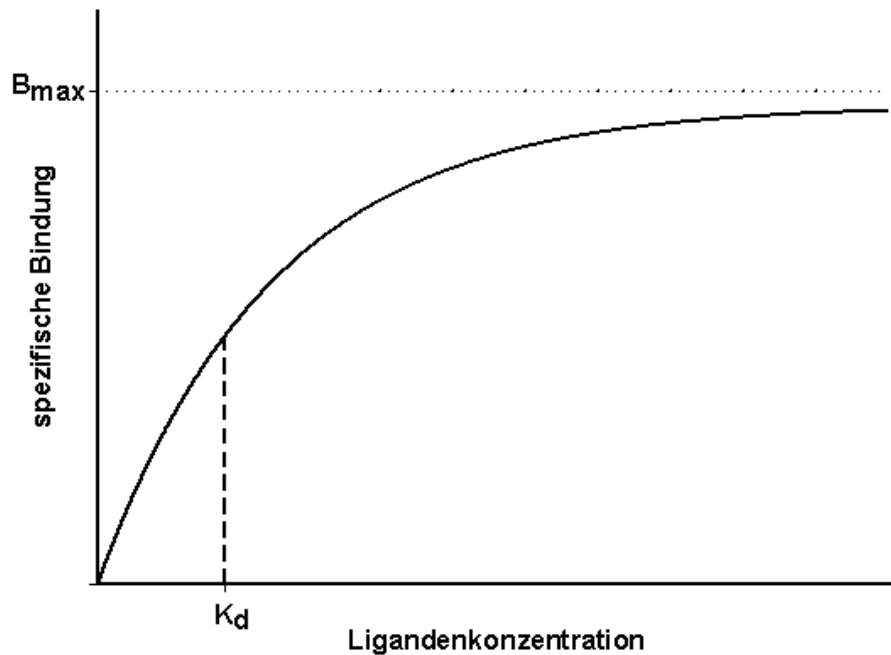


- → bereits kleine Mengen kaltes IAA können Radioaktivität auswaschen

- → Rezeptor ist hoch selektiv mit größter Affinität zu IAA

- → mit steigender TIR1-Myc-Konzentration steigt auch die Radioaktivität
- → TIR1 oder assoziierte Proteine sind Auxin-Rezeptoren

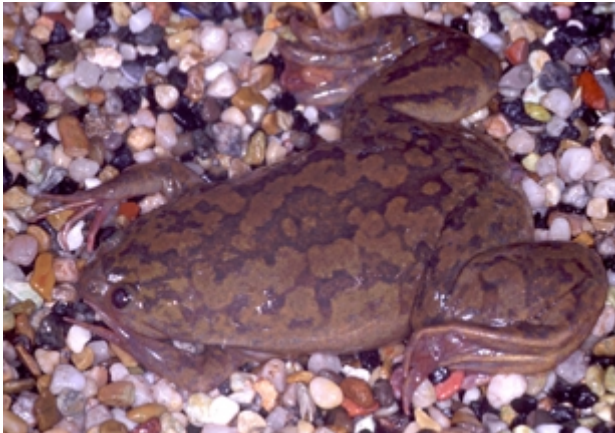
Der Kd-Wert

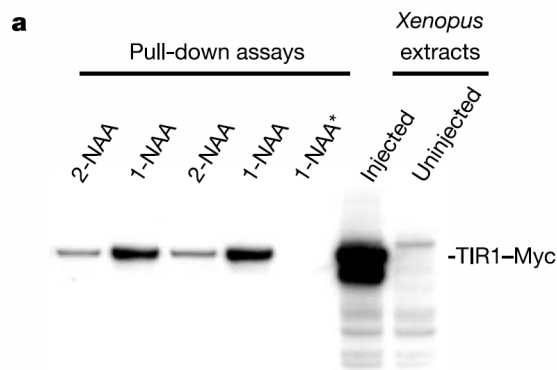


- K_d von IAA bei 25 nM
- → Rezeptor ist sehr anfällig für Konzentrationsveränderungen
- Ein geringer K_d -Wert spricht für eine große Affinität des Rezeptors
- Gleichgewicht liegt auf Seite der gebundenen Liganden

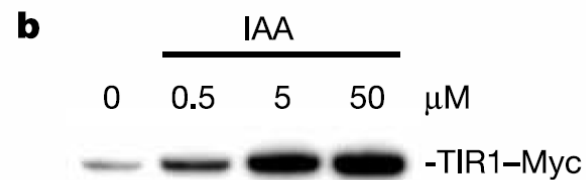
Wiederholung der Versuche im *Xaenopus laevis*

- Eukaryotischer Modellorganismus
- Verwendet, da keine Auxinantwort zu erwarten ist
- Im Zweizellstadium beidseitig beimpft mit TIR1-Myc mRNA
- Im 13. Stadium der Entwicklung „geerntet“
- → Pull-Down Assay (Extrakt aus *Xenopus* und aus *E.coli*)

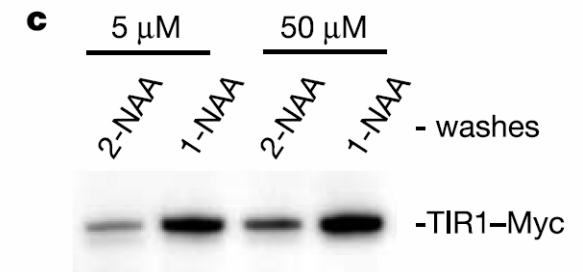




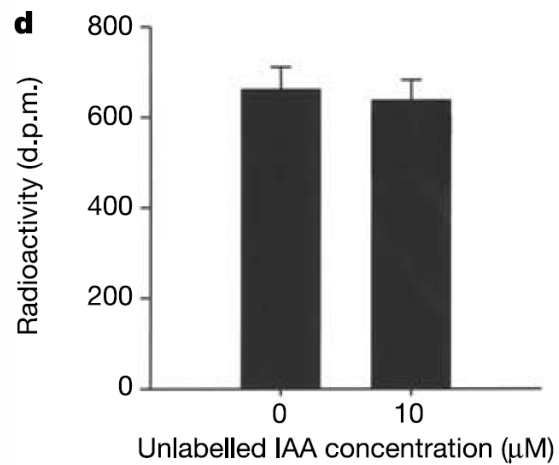
- TIR1 und DII (aus Aux/IAA) interagieren
- Unter Einfluss von 1-NAA höher, als bei 2-NAA



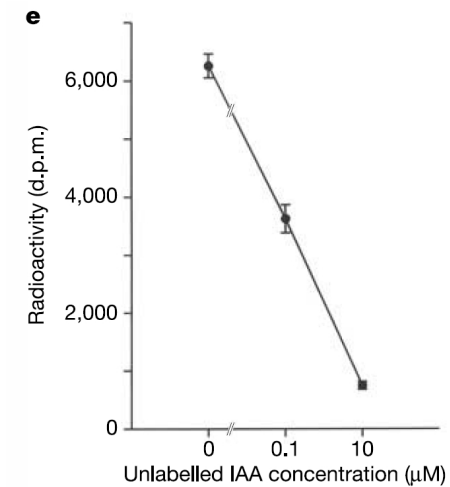
- Auch hier wieder: Interaktion ist Dosisabhängig und sättigbar



- Waschen mit Auxinen zeigt wieder, dass sie nicht kovalent gebunden werden



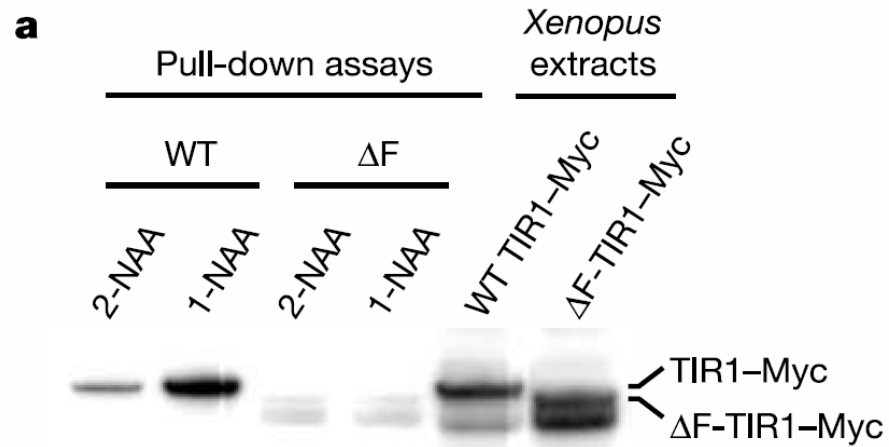
- Wiederholte Durchführung der Versuche mit radioaktiver Markierung
- Hier kein TIR1-Myc hinzugegeben
- → keine spezifische Bindung von $[^3\text{H}]\text{IAA}$



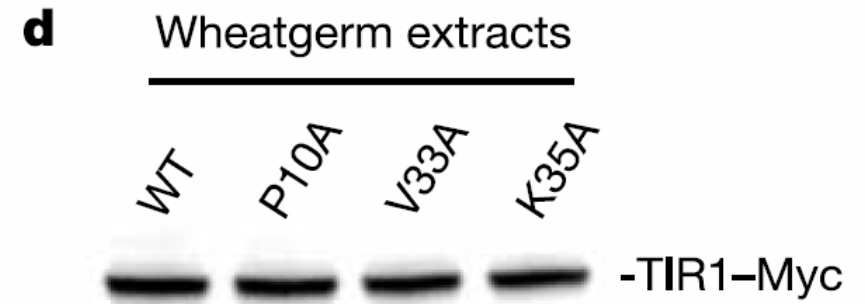
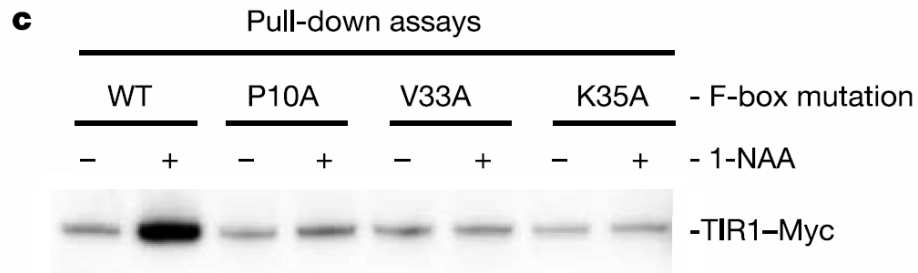
- Gleiches assay, doch mit TIR1-Myc
- → Bindung erfolgt schnell und nicht kovalent

Schlussfolgerungen

- Experimente zeigen, TIR1 ist der Auxin Rezeptor
- → zeigt, dass das verwendete System egal ist
- Vermutung: TIR1 interagiert mit Skp1(homolog zu ASK1 aus Arabidopsis) aus dem SCF Komplex
- Nächste Schritte: Deletion der F-Box in TIR1-Myc (47 Aminosäuren) und pull-down assay, dann western blot mit DII +/- Auxin



- F-Box des TIR1-Myc wurde deletiert
 - → Auxin stimuliert die Interaktion nicht
-
- Wirkt Skp1 mit TIR1-Myc zusammen?
 - Versuch zeigt → Nein
- => vielleicht ist Skp1 nicht homolog genug
- → es werden nur TIR1 und die F-Box benötigt



- Statt Deletion nur Punktmutationen, da Deletion Faltung von Protein verändert haben könnte
- Überall basale Interaktion feststellbar, nur im WT Auxin-induzierte Interaktion

- *In vitro* Transkription und Translation mit Weizenkeimextrakten
- IP zeigt, dass alle mutierten Gene exprimiert werden, und die Proteine stabil sind

Ergebnisse

- TIR1 ist ein Auxin-Rezeptor, der die Interaktion von AUX/IAA-Domäne II und TIR1 fördert
- Rezeptor kann zwischen Auxinen unterscheiden
- F-Box ist essentiell für die Induzierbarkeit der Interaktion
- Bindung erfolgt nicht kovalent, ist konzentrationsabhängig und sehr schnell
- TIR1 interagiert nicht mit SKP1
-
-
- Danke für eure „Aufmerksamkeit“! :)