

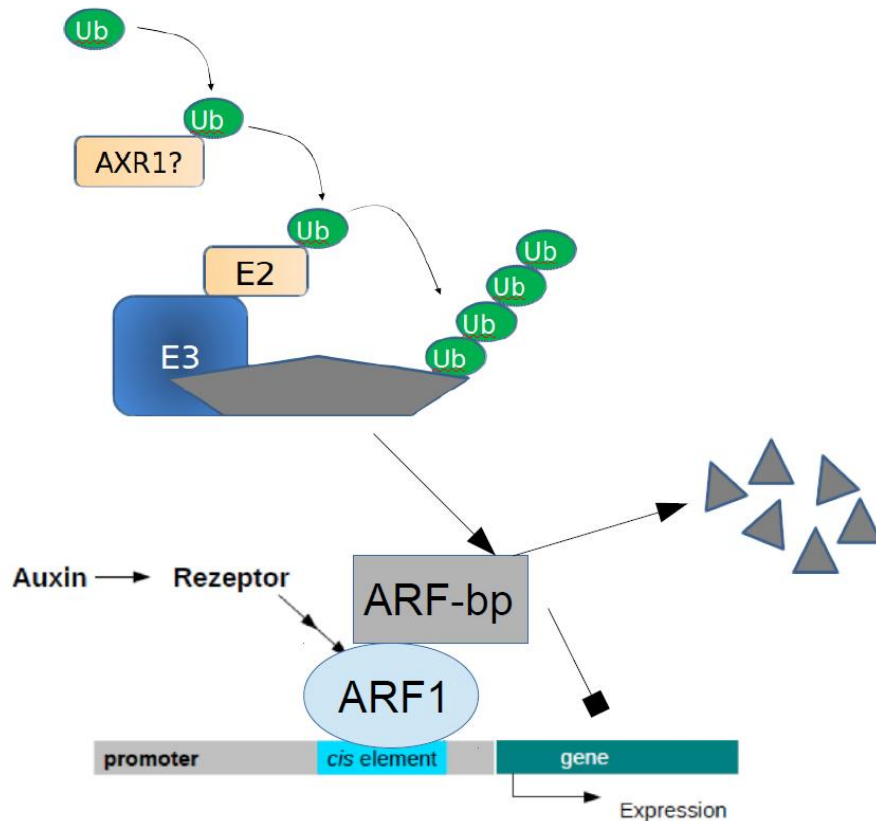
The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p

Max Ruegger,¹ Elizabeth Dewey, William M. Gray, Lawrence Hobbie,² Jocelyn Turner, and Mark Estelle³

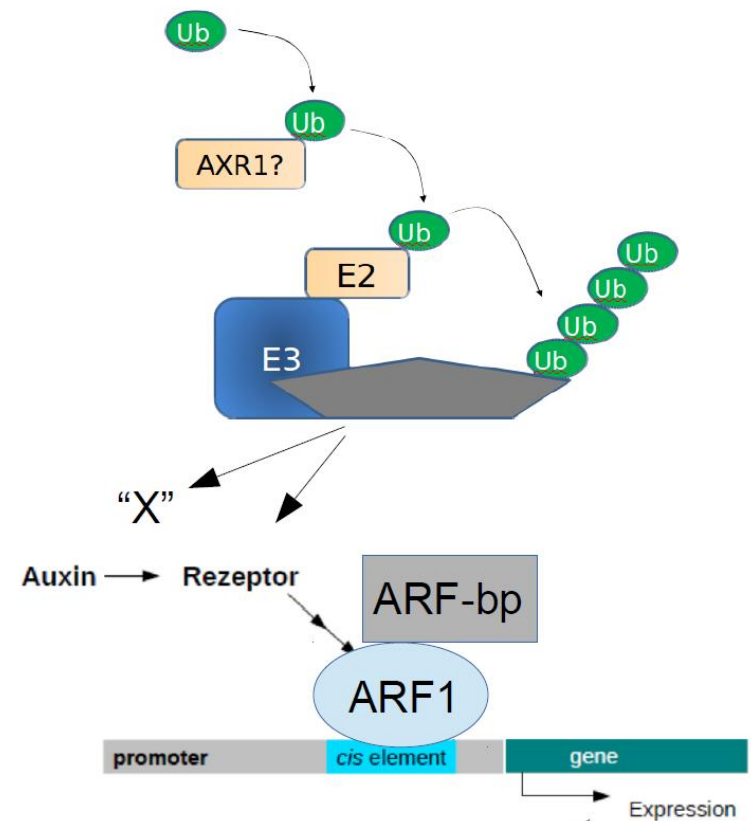
Department of Biology, Indiana University, Bloomington, Indiana 47405 USA

Präsentiert von Christina Staudigl

Was bisher geschah



var. 1: ARF-bp acts as repressor



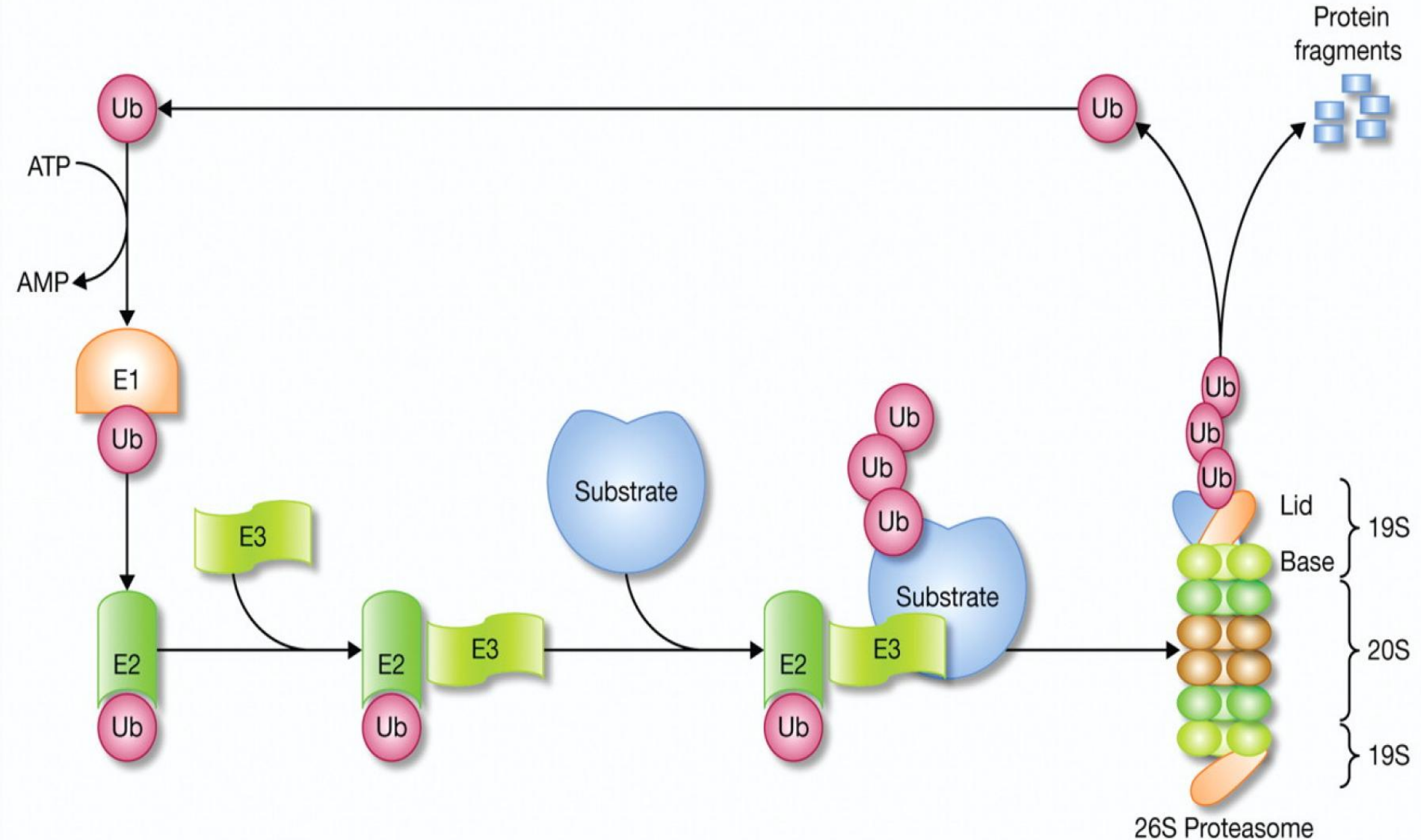
var. 2: ARF-bp acts as activator

auxin response

Was bisher geschah

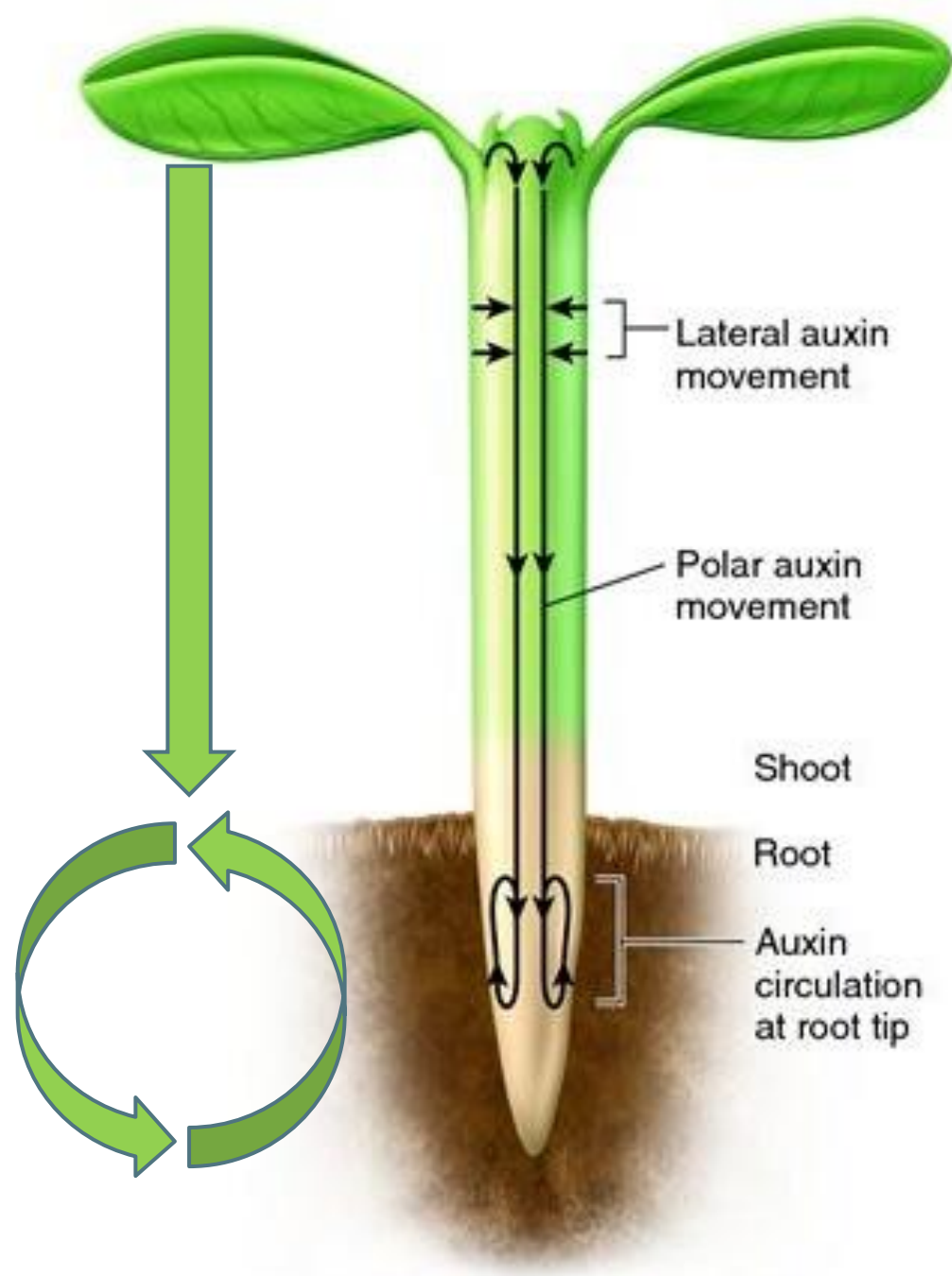
- Neues aus der Signaltransduktion? - nichts wirklich grundlegendes
- Aber: mehr ARFs gefunden (10x) mit leichten Unterschieden in der Bindespezifität zum AUXRE (TGTCTC) - Dimerisierung der ARFs als hypothetische differentielle Regulation der Auxinantwort
- weitere Mutanten identifiziert:
 - axr Mutanten (aus gleichem screen aber nicht allelisch zu axr1)
 - aux1 → putatives Transportprotein?
 - + tir mutant screen → Isolierung von Mutanten mit erhöhter Resistenz gegenüber Transportinhibitoren

Erinnerung: Ubiquitin-Proteasom-System



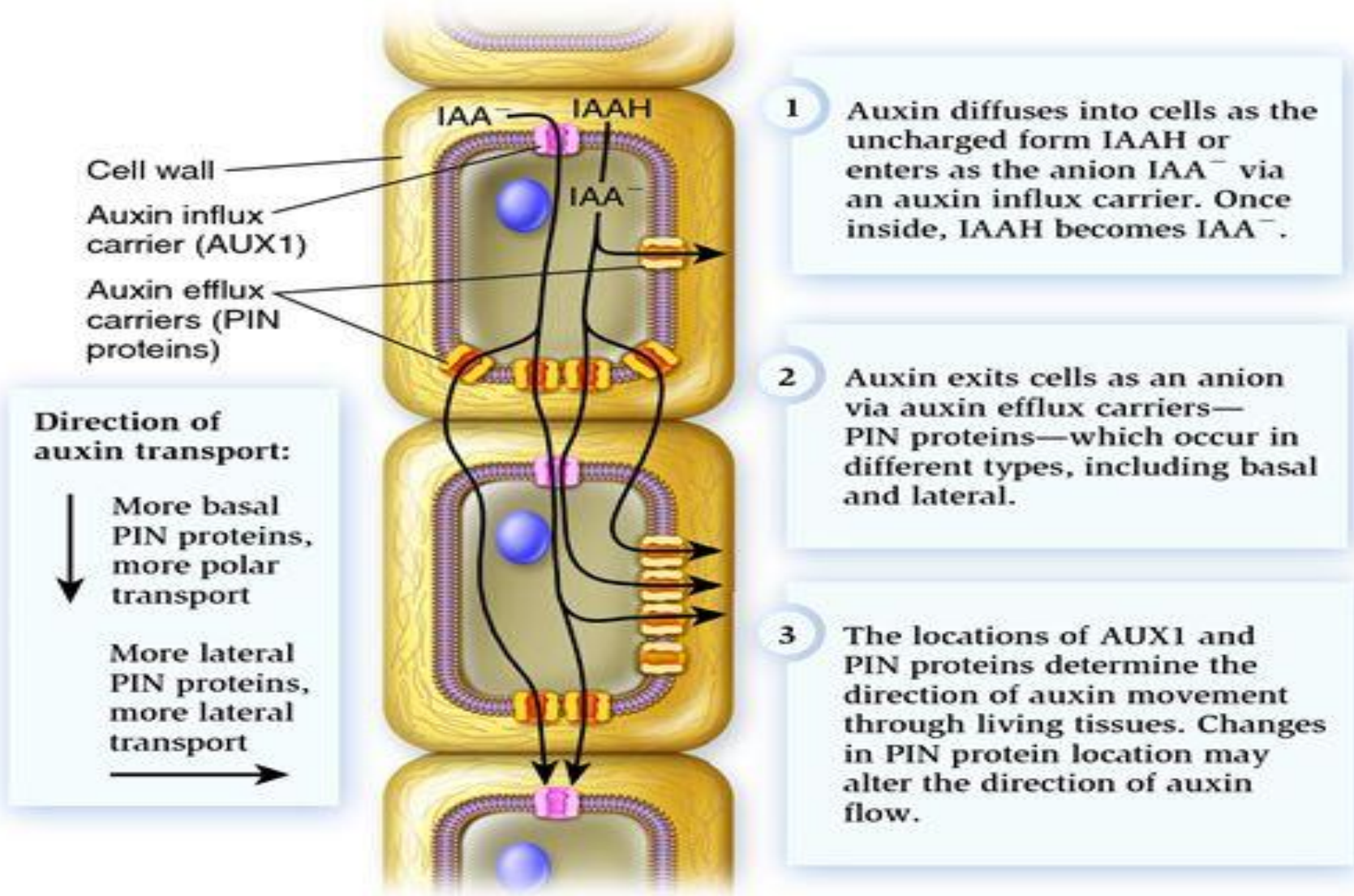
Erinnerung: Auxin Transport

● http://biology-forums.com/gallery/33_24_07_11_10_45_29.jpeg



(b) Auxin transport throughout a plant

Erinnerung: Auxin Transport



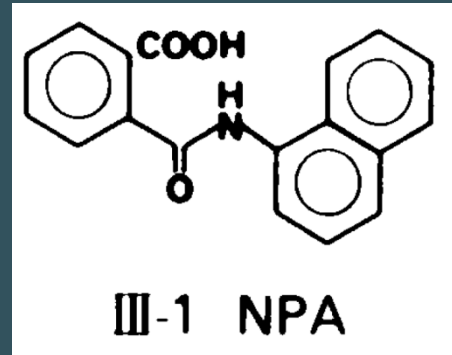
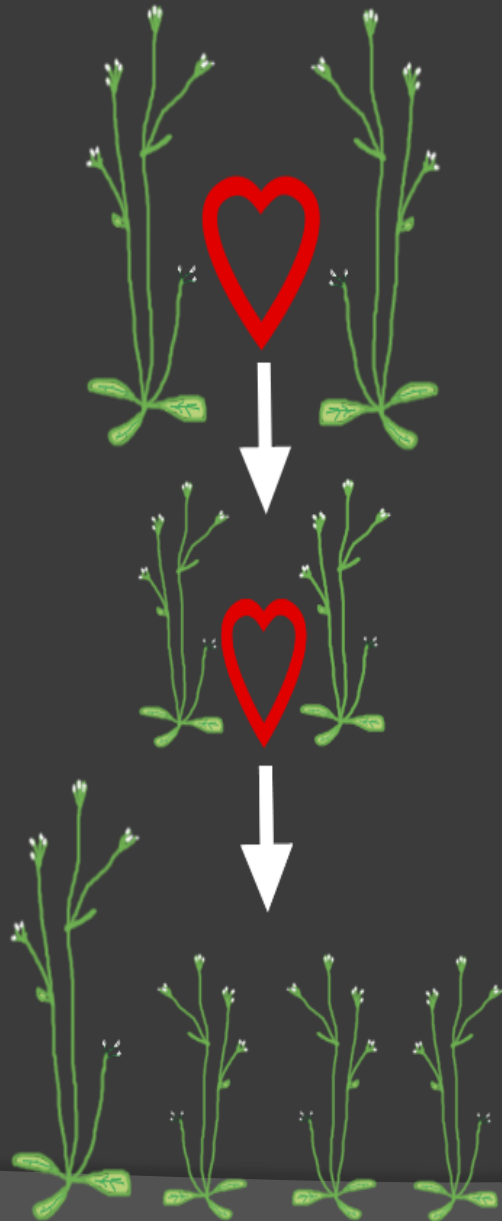
(a) Cellular mechanism of auxin transport

WT *tir1*

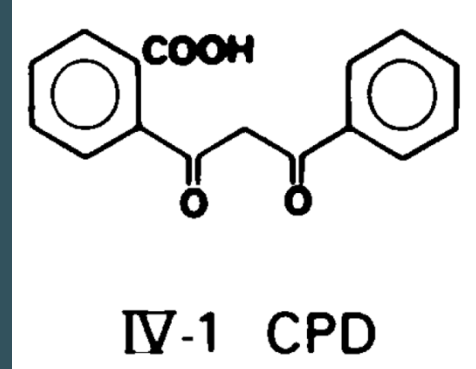
Ergebnisse: Genetische Charakterisierung der *tir1*-Mutanten

Methode:

- WT mit *tir*-Mutanten kreuzen
- F1, F2, F3 screenen mit Auxin-Transport-Inhibitor CPD
- Wurzellänge als Kriterium - längere Wurzel als WT heißt: resistent(er) gegen Auxin-Transport-Inhibitor



1-N-NAPHTHYLPHTHALAMIC ACID



Auxin Transport Inhibitors IV.
EVIDENCE OF A COMMON MODE OF ACTION FOR A PROPOSED [CLASS](#) OF AUXIN TRANSPORT INHIBITORS: THE PHYTOTROPINS
GERARD F. KATEKAR AND ART E. GEISSLER

Table 1. Segregation of CPD resistance in a *tir1-2* × wild-type *F*₂ population

F ₂ root length (mm)	F ₂ genotype ¹		
	<i>tir1/tir1</i> ²	<i>tir1/+</i> ²	<i>+/+</i> ²
17	2		
16	5		
15	1		

Table 2. CPD resistance in *tir* homozygous and heterozygous plants

Line	Root length (mm)	±S.E.	No.
<i>+/+</i>	7.8	0.1	32
<i>tir1-1/tir1-1</i>	15.7	0.3	33
<i>tir1-3/tir1-3</i>	15.8	0.4	34
<i>tir1-7/tir1-7</i>	13.0	0.5	33
<i>tir1-1/+</i>	10.9	0.3	15
<i>tir1-3/+</i>	12.5	0.3	17
<i>tir1-7/+</i>	12.6	0.2	17
Totals	8	27	14

¹Genotype determined by analyzing CPD resistance in *F*₃ plants.

²Number of seedlings.

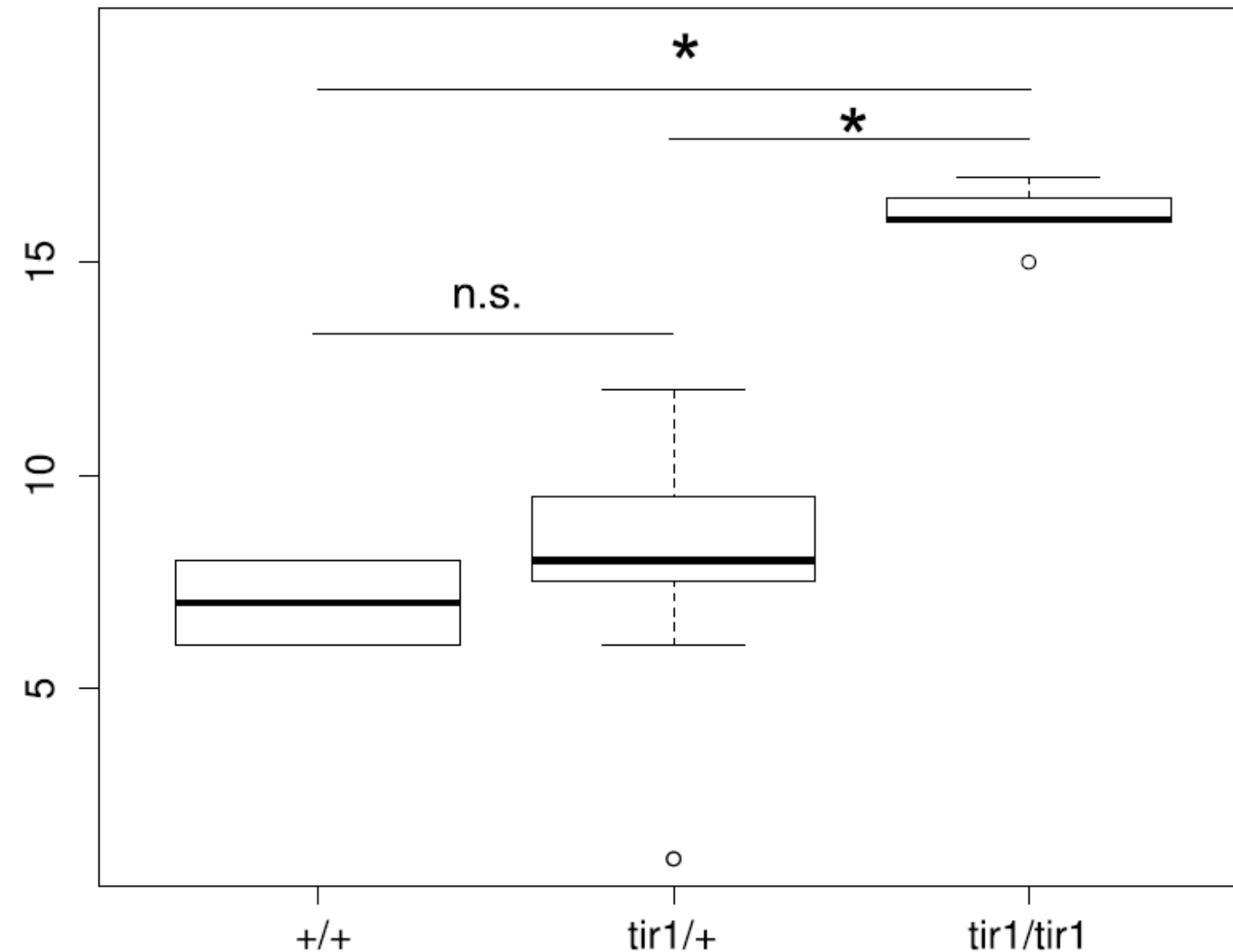
Ergebnisse: Genetische Charakterisierung der *tir1*-Mutanten

Schlussfolgerung der Arbeitsgruppe:

- Heterozygote sind etwas resistent
- Homozygote sind vollresistent
- Verschiedene Allele oder Kombinationen von Allelen ergeben verschiedene Resistenzgrade

=> *TIR1* wird „semidominant“ vererbt (?)

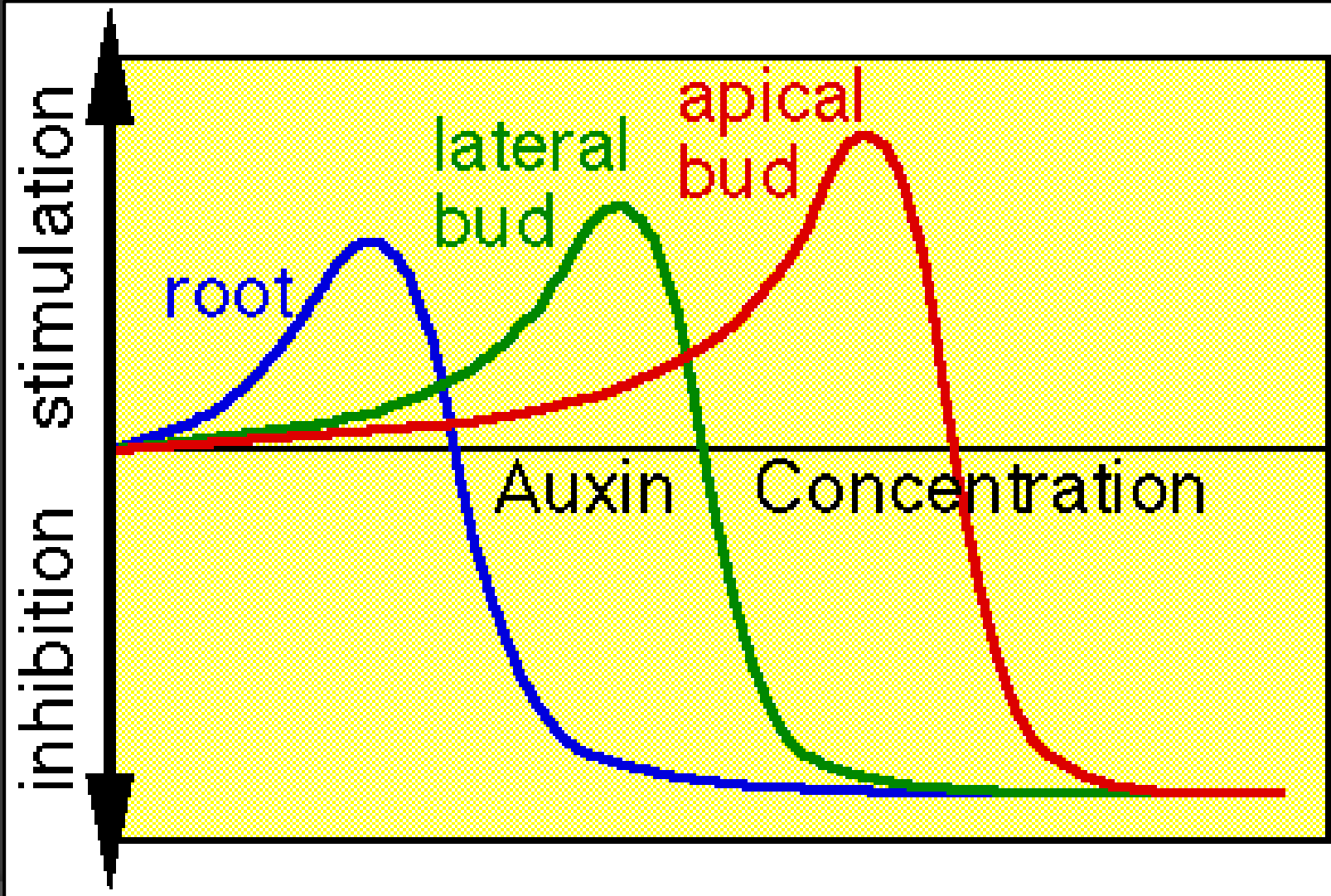
Ergebnisse: Genetische Charakterisierung der tir1-Mutanten



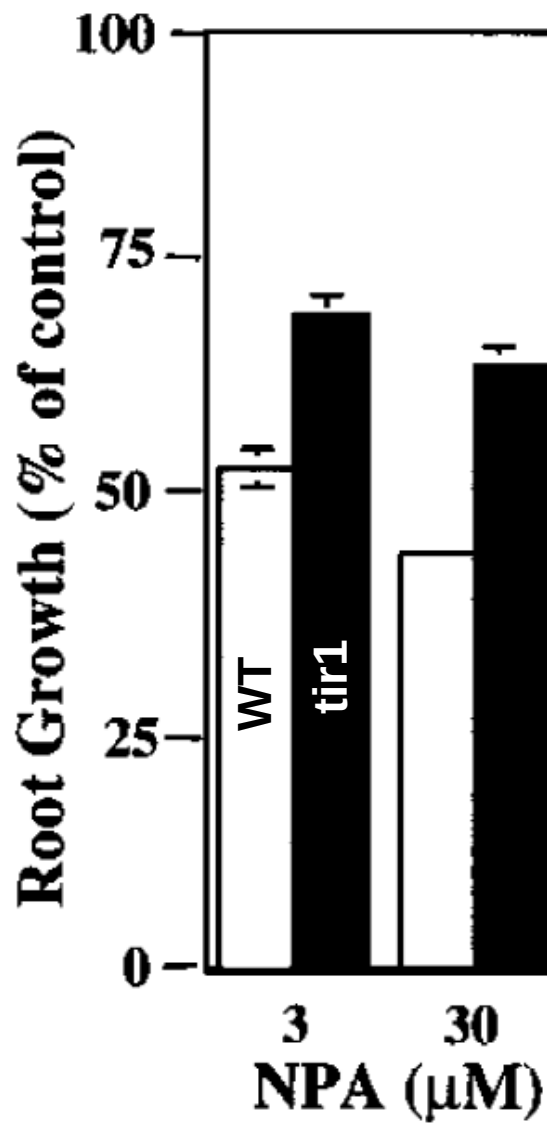
Dieselben Daten in einem Boxplot zeigen: Heterozygote zeigen Wildtyp-Phänotyp. => Also in Wirklichkeit: dominant-rezessive Vererbung

1-faktorieller ANOVA + Tukey HSD-Test

Erinnerung zu: Die Auxin-Antwort von *tir1*-Mutanten ist verändert

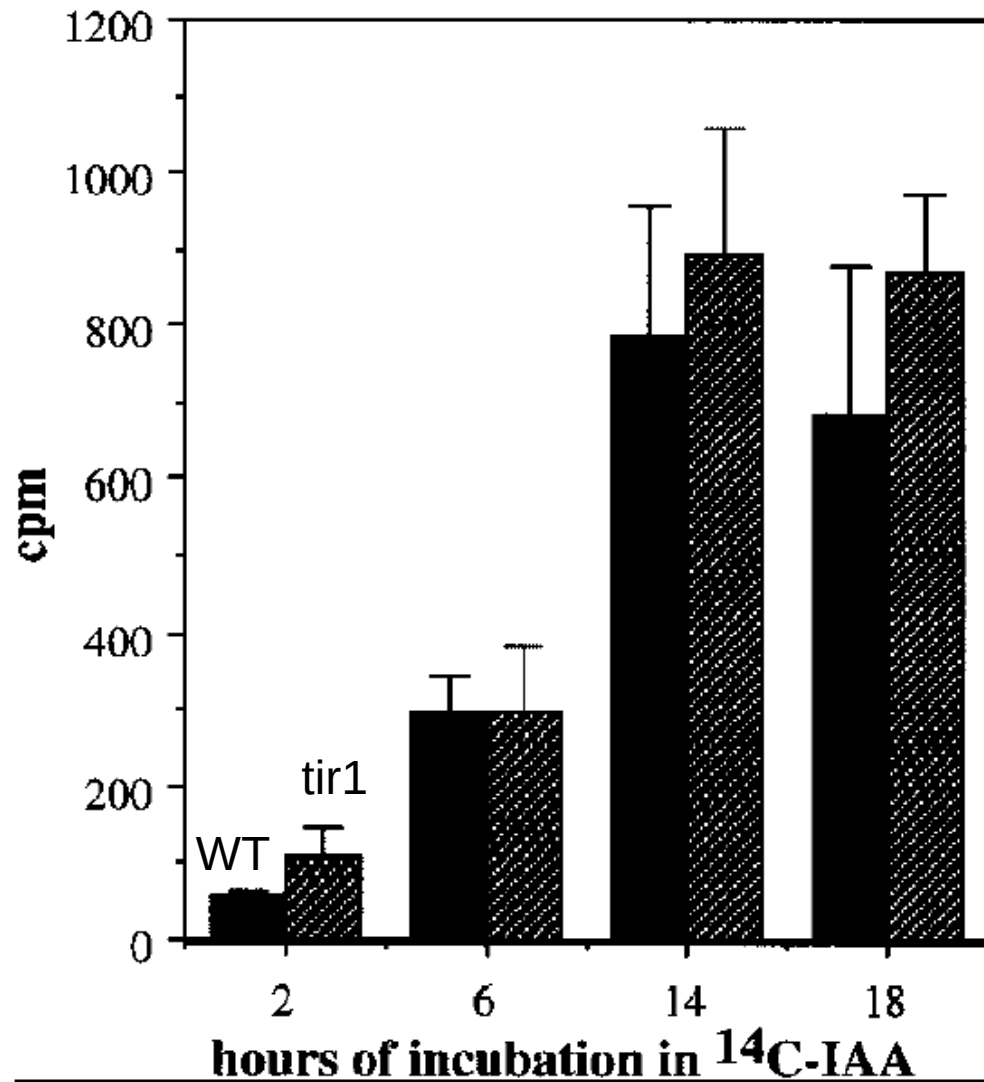
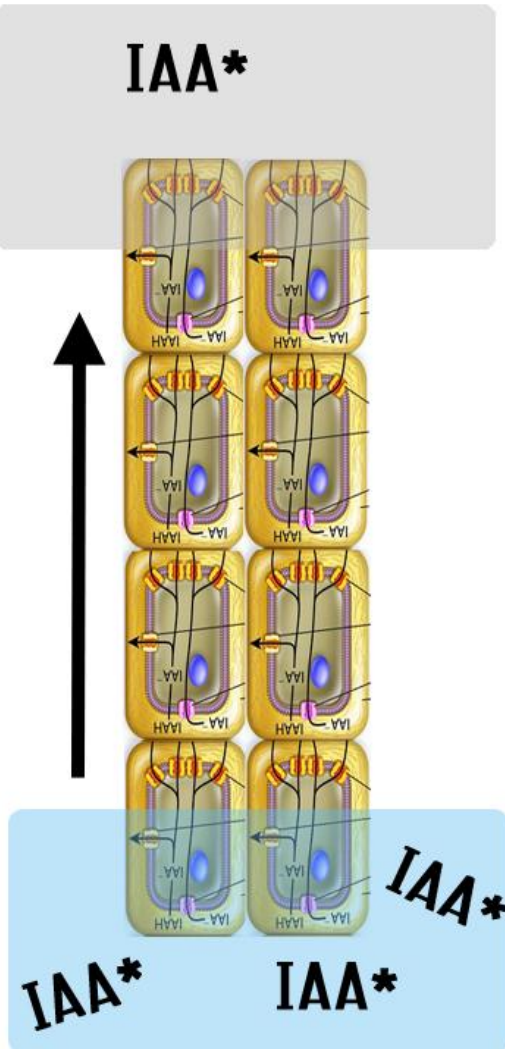


Ergebnisse: Die Auxin-Antwort von *tir1*-Mutanten ist verändert



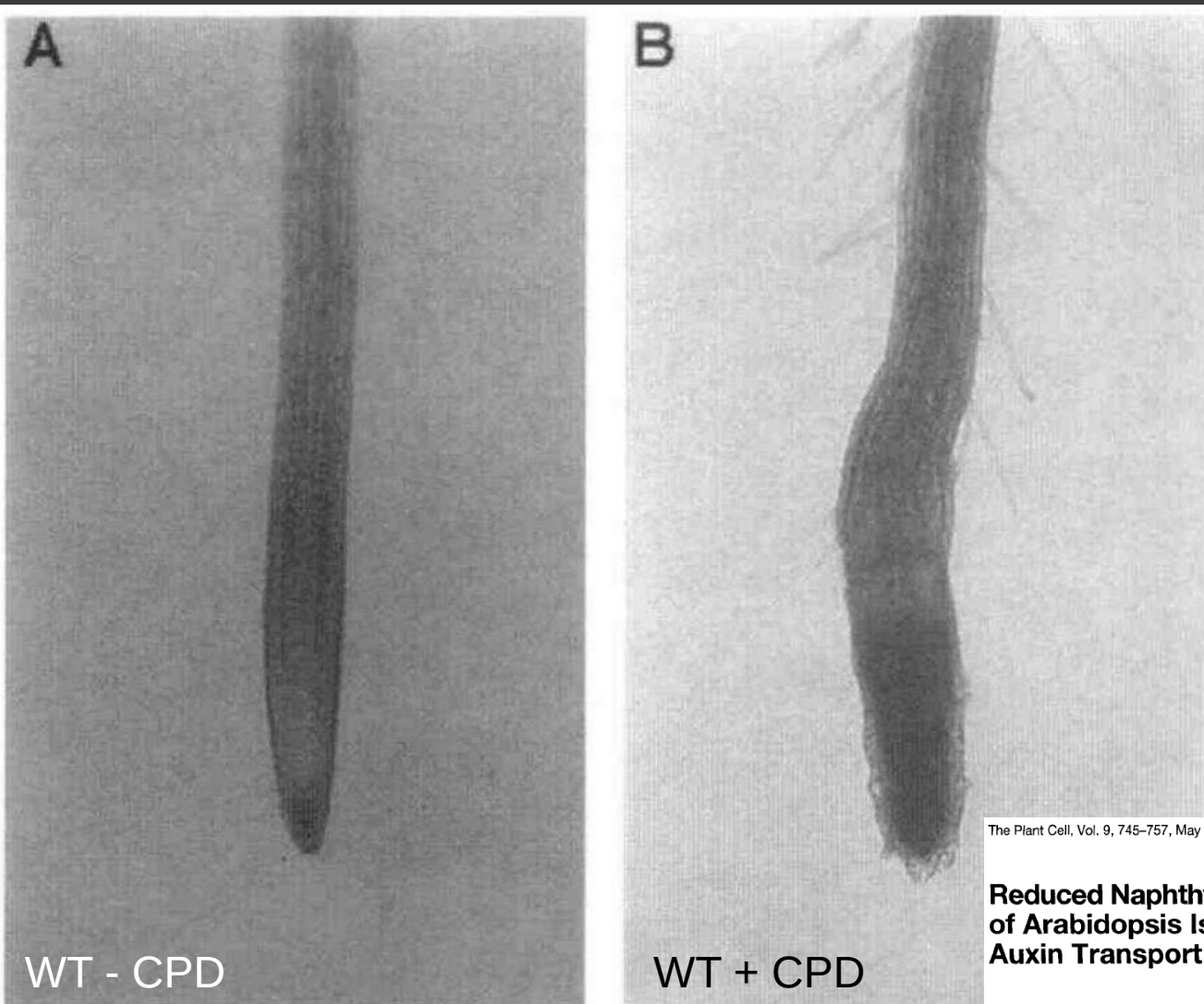
- NPA: *tir1* zeigt ~25% mehr Wurzelwachstum
- IAA/2,4-D: *tir1* weniger sensitiv zu Wachstumsinhibierung im Vergleich zu WT

Ergebnisse: Die Auxin-Antwort von *tir1*-Mutanten ist verändert



=> *tir1* ist nicht am Auxin-Transport beteiligt

Ergebnisse: Die Auxin-Antwort von *tir1*-Mutanten ist verändert



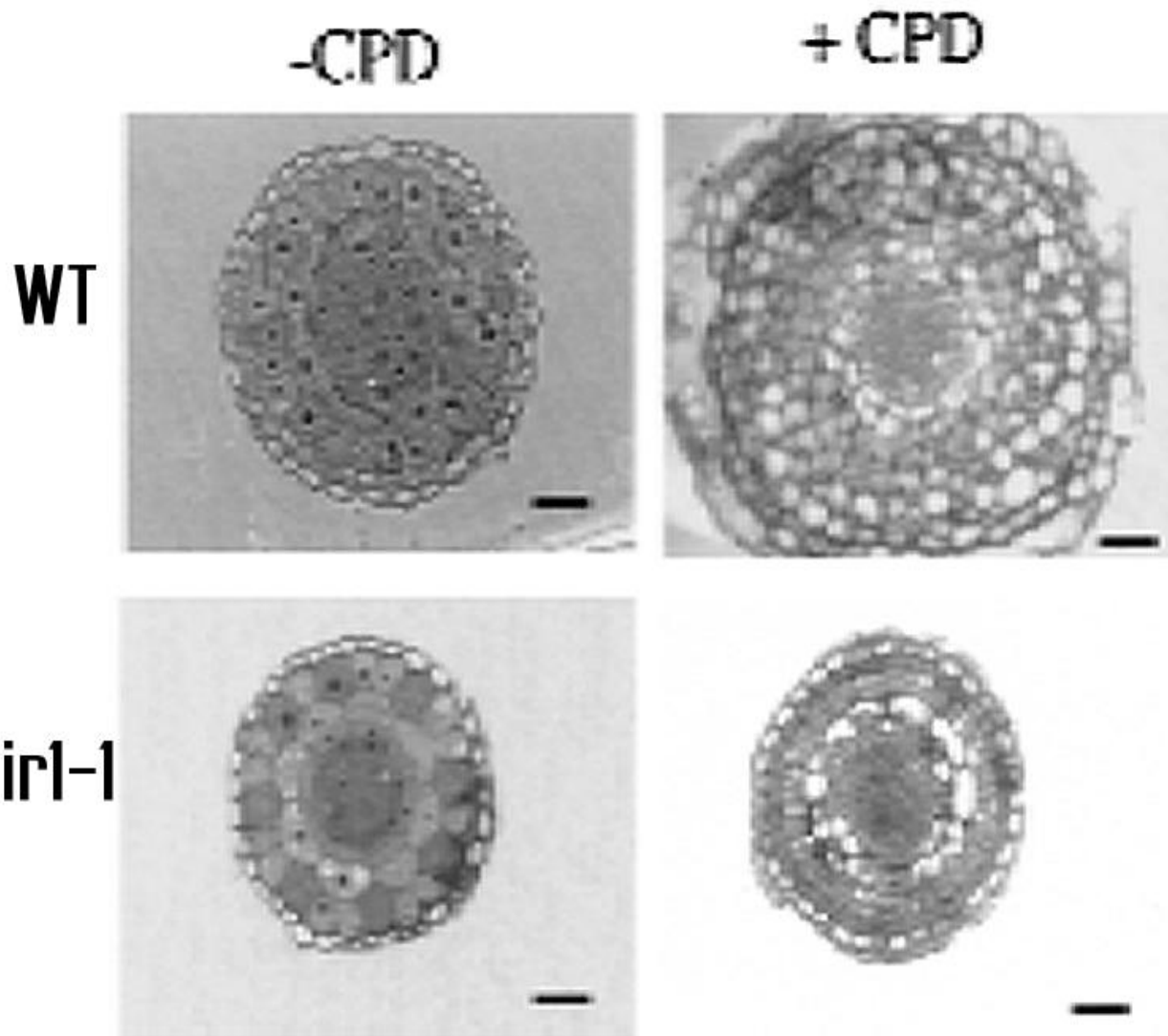
Bei *tir1* keine Schwellung, Wurzel wächst weiter in die Länge.
Mögliche Ursachen:
a) Veränderter Auxintransport
b) Veränderte Auxinantwort

The Plant Cell, Vol. 9, 745-757, May 1997 © 1997 American Society of Plant Physiologists

Reduced Naphthylphthalamic Acid Binding in the *tir3* Mutant of Arabidopsis Is Associated with a Reduction in Polar Auxin Transport and Diverse Morphological Defects

Max Ruegger,^{a,1} Elizabeth Dewey,^a Lawrence Hobbie,^{a,2} Dana Brown,^b Paul Bernasconi,^c Jocelyn Turner,^a Gloria Muday,^b and Mark Estelle^{a,3}

Ergebnisse: *tir1* zeigt verminderte Zellvermehrung auf Auxin-Transport-Inhibitoren

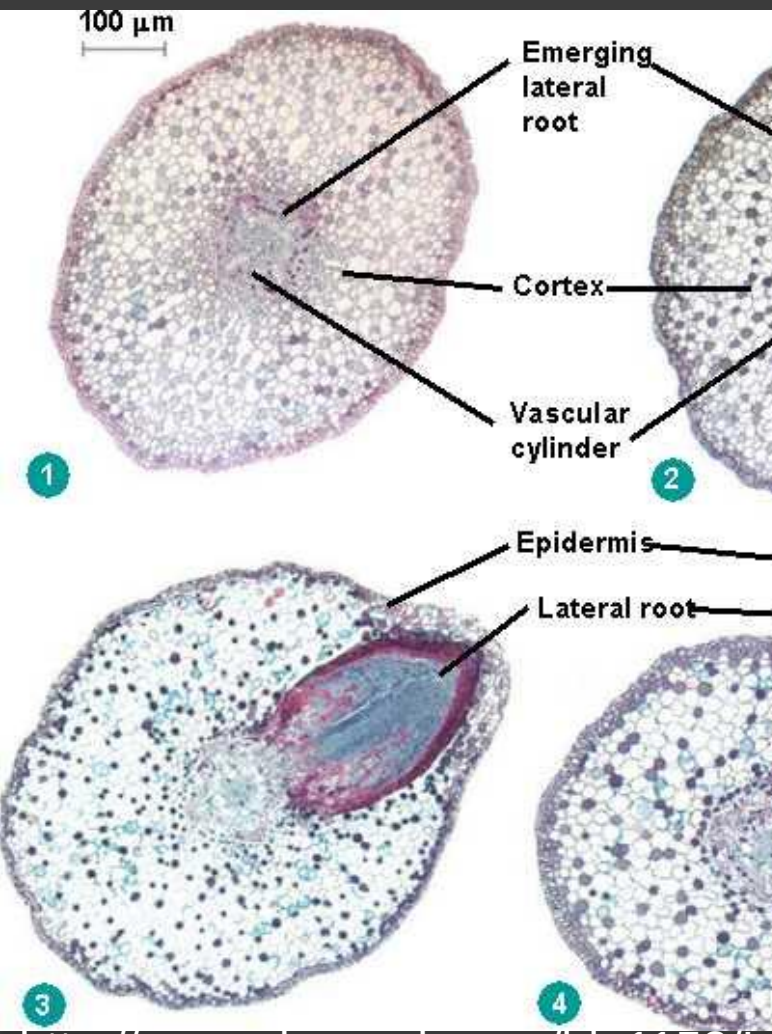


300 μm oberhalb der Wurzelspitze wurden Querschnitte angefertigt.

- WT: Deutlicher Anstieg der Zellzahl/Zellgröße

- *tir1*: Etwas, aber wenig Reaktion auf lokale Anreicherung von Auxin.

Erinnerung zu: *tir1* spielt eine Rolle bei der Seitenwurzelbildung



cycB1::GUS

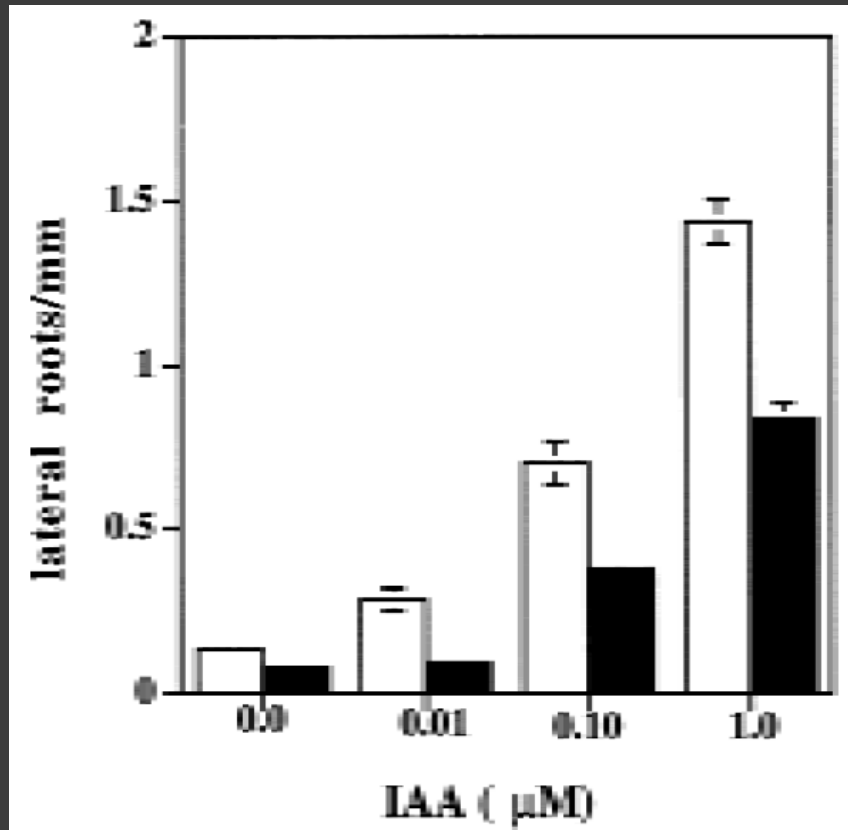


- auxin



+ auxin

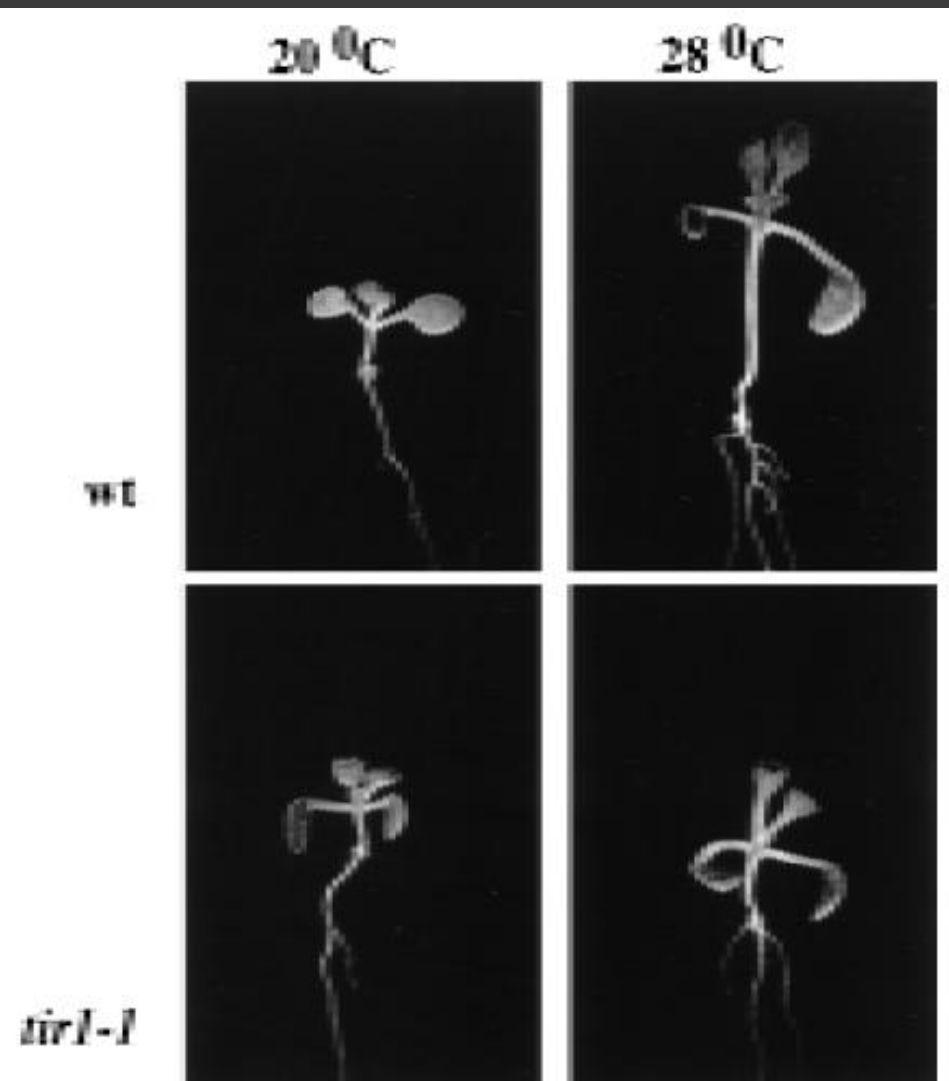
Ergebnisse: *tir1* spielt eine Rolle bei der Seitenwurzelbildung



Seitenwurzeln /
Gesamtlänge Wurzel

Frage: Who is who?

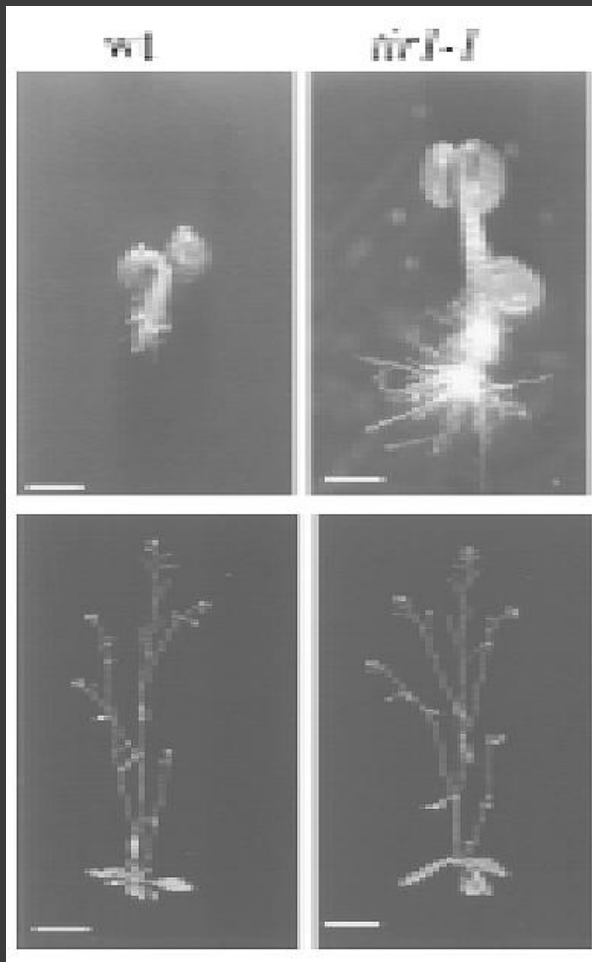
Ergebnisse: *tir1* ist in der Zell-Längenwachstumsantwort gestört



Unter Mäßig-Licht-Bedingungen und im Vergleich 20°C zu 28°C zeigt *tir1* eine stark verringerte Reaktion im Vergleich zum Wildtyp.

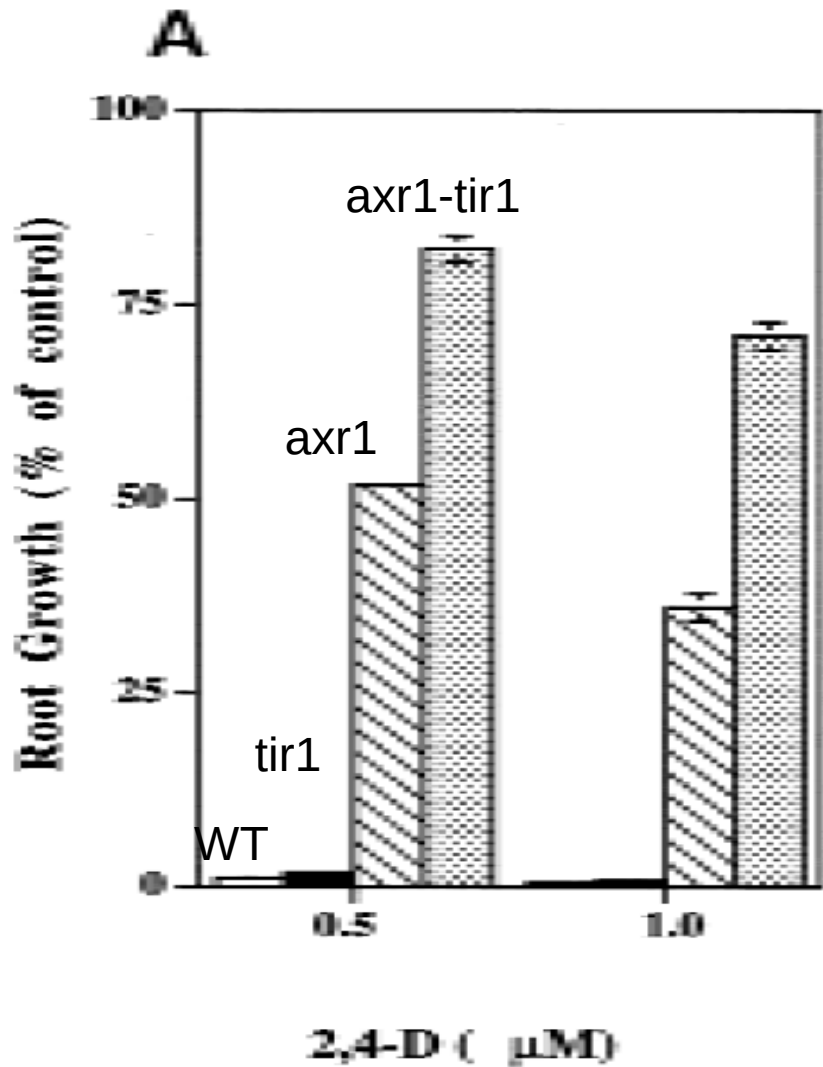
28°C	WT	Tir1
Hypokotyl	3,7 x	2,6 x
Zellen	4,5 x	2,2 x

Ergebnisse: *tir1-axr1*-Doppelmутanten zeigen additive Interaktion



- WT und *tir1* zeigen +- denselben Phänotyp
- *axr1* zeigt typisch buschigen, kleineren Phänotyp
- *axr1-tir1* sind ähnlich *axr1*, aber kleiner

Ergebnisse: *tir1*-*axr1*-Doppelmутanten zeigen additive Interaktion

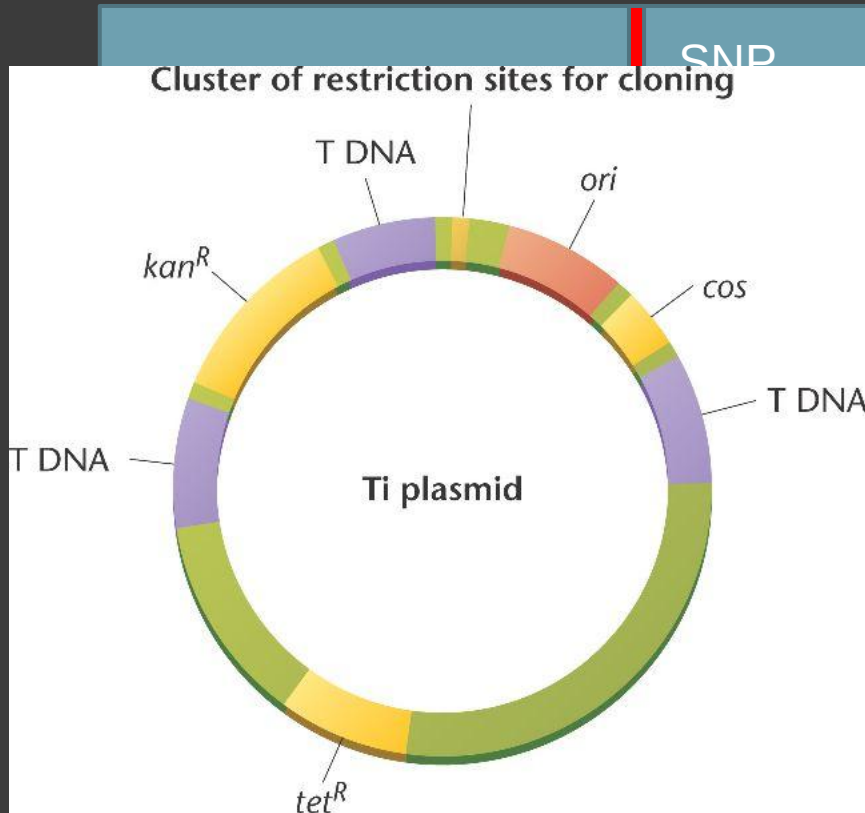


- *tir1* alleine reagiert wie WT
- *tir1* und *axr1* zusammen zeigen eine stärkere Reaktion als *axr1* alleine
- Kritik: Keine geringere Konzentration getestet

Ergebnisse: Isolation des *TIR1*-Gens

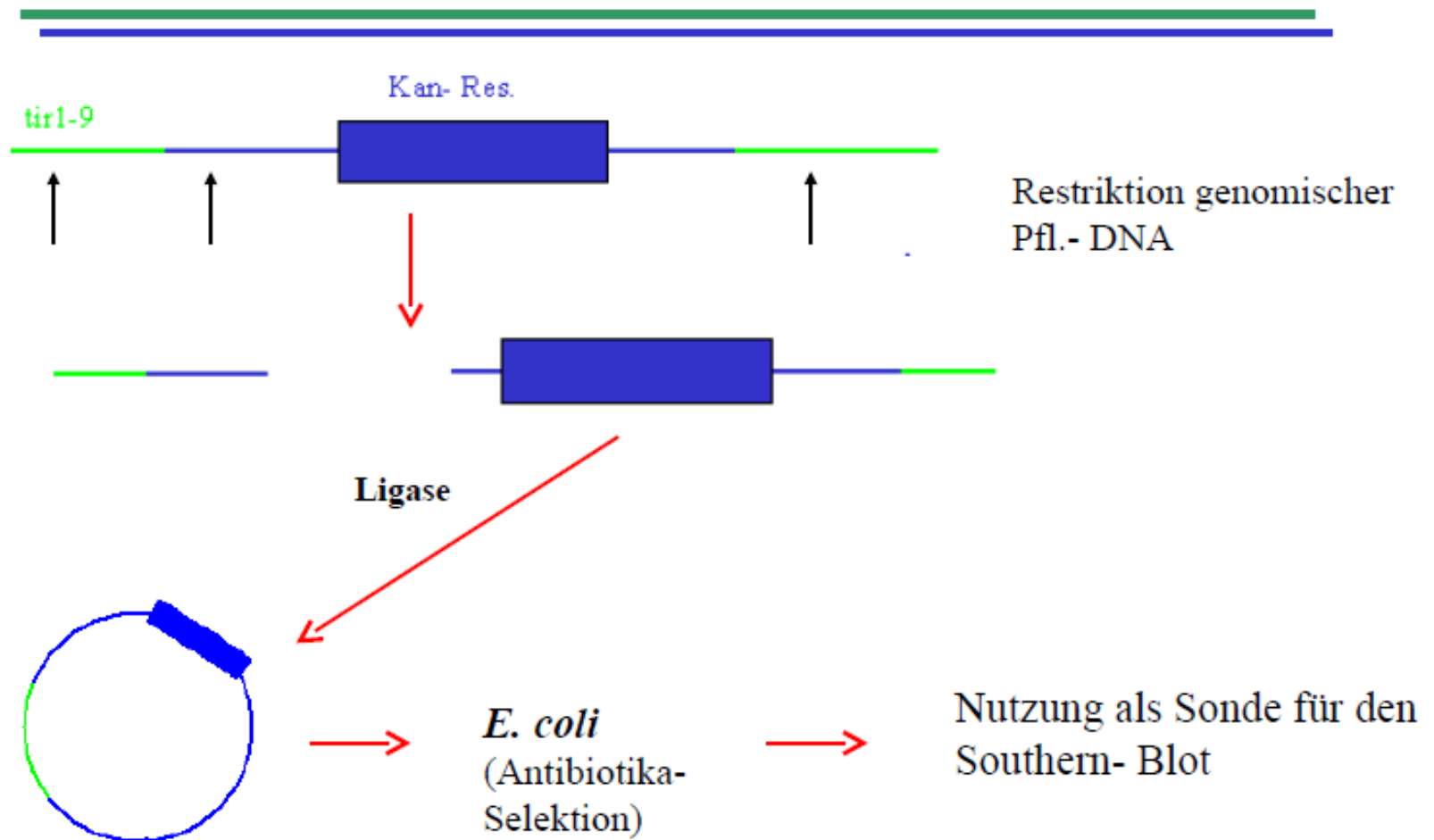
Methode:

- Bisher: EMS-Mutanten

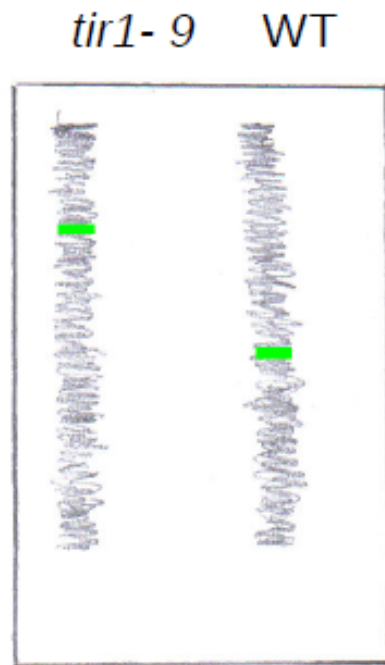


<http://2014.igem.org/Team:Hannover/Protocols/Transformation/Arabidopsis>

Isolierung des *TIR1* Gens mittels T- DNA Insertion



Isolierung des *TIR1* Gens mittels T- DNA Insertion



- dient als Kontrolle:
- Ergebnis: Längenpolymorphismus
- das bedeutet der Plasmid ist als Sonde geeignet
- das gleiche für cDNA- Bank (Nutzung der Sonde)
- bei der *E.coli* Kolonie bei der eine Bande auftritt ist das gesuchte Gen (cDNA)

Ergebnisse: Isolation des TIR1-Gens

Methode:

- Bisher: EMS-Mutanten = *tir1-1*



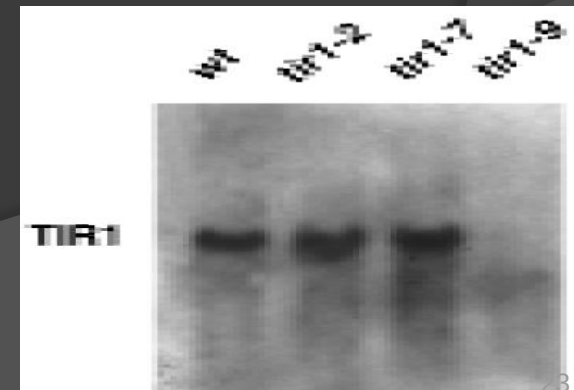
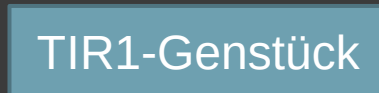
- Jetzt: T-DNA-Mutanten = *tir1-9*



- Plasmid rescue => 2,2kb Fragment von TIR1



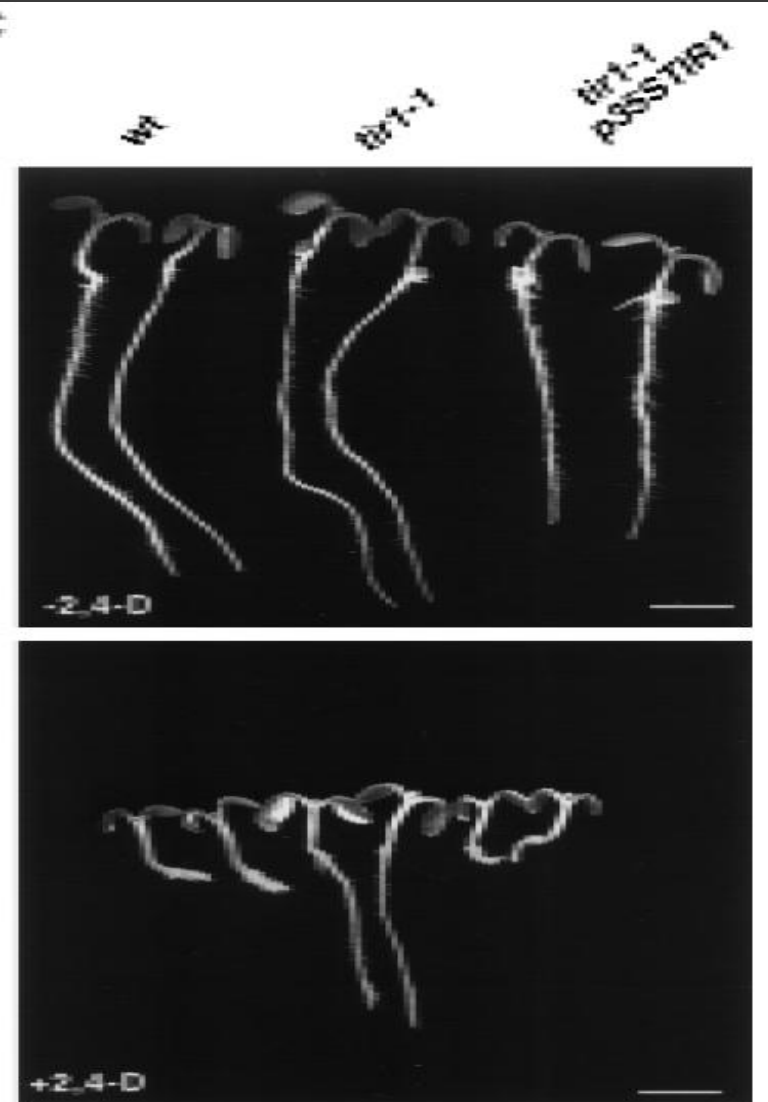
- RNA-Exktraktion aus *tir1-1*-,
blotten mit *tir1-9* Sonde



Ergebnisse: Isolation des *TIR1*-Gens

Methode:

- Komplementation von *tir1*-Mutant mit *TIR1*-cDNA und 35S-Promotor
- Normale Reaktion auf 2,4-D ist wiederhergestellt. Es wurde also das richtige Gen gefunden!



Ergebnisse: TIR1 besitzt LRR- und F-Box-Domänen

TIR1	9	EPEEVLEHVESFIQLDKDRNSVLSVCKSTHEIERWCRRKVF
SKP2	112	LPDEHLLGLFSCCLCL.PEILKMSGVCKRHYRLA..SDESLW
Grr1	320	LPSEILHLIILDKLNQKYDIWKELTVSKLHAWIIV.KIL.YY
C02F5.7	60	LPKEVLLKVESFLDT.KALCRSAQVCRSHSILA..LDGSNW
UFO	50	LPP LLDRVIAFLPP.PAEFRTRCVCKRFYSLL..FSNTFL
FIM	47	LPQKLIDRIIACLPP.PAEFRSRVCKRHYSLI..FSTTFL
Cyclin F	35	LPEDVLFHILKWLSVE.DILAVRAVHSQLKDLDV.DNHASVW
Cdc4	278	LPFEISLKIENYLQFE.DIINELGVSQNKLR.KSTSLW
Consensus		LP-ELL--IF--L----Da--a--VCK-WY-La-----a-
		V VL R I
		I

- Ähnliche Proteine sind regulatorischer Natur und binden SKP1 mithilfe der sogenannten F-Box

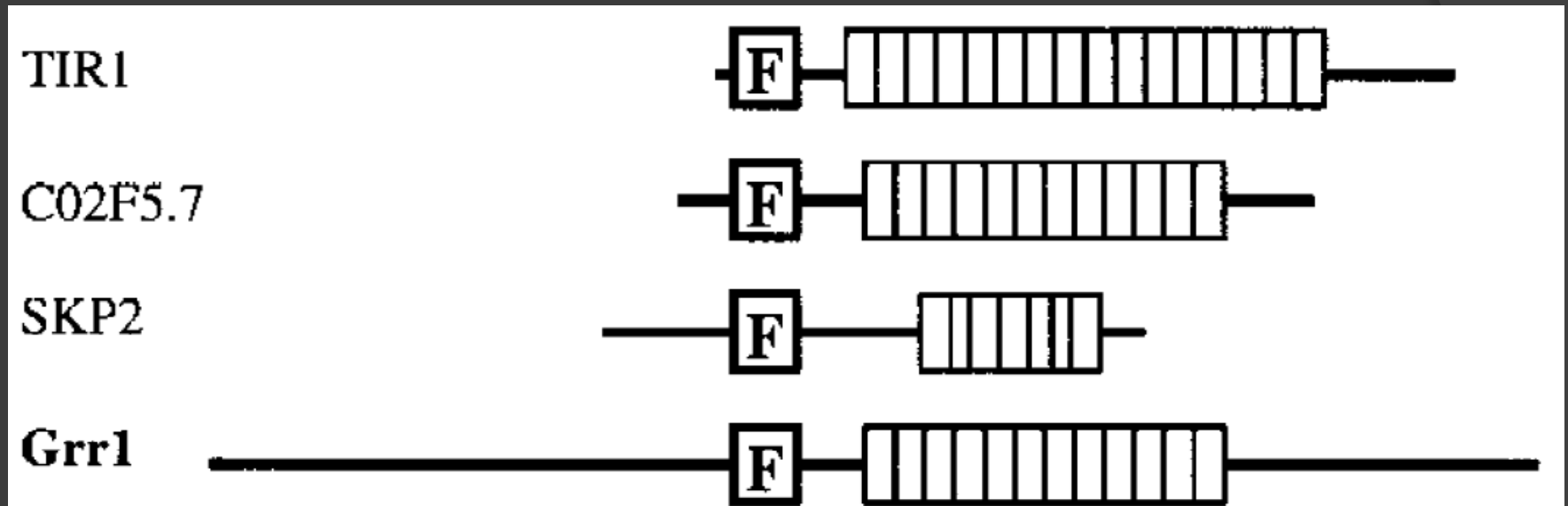
Ergebnisse: TIR1 besitzt LRR- und F-Box-Domänen

```
95  WIEAMSSSYTWLEETIRLK
114  RM.VVTDDCLELIAKSEKFNFKVLVLSSCEGFSTD
147  GLAAIAATCRNLKEEDLRESDVDDVSGH
175  WLSHF PDTYTSLVSLNISCLASEVSFS
202  ALERLVTRCPNLKSLKLNRAVPLEKLA
229  TLLQRAPQLEELGTGGYTAEV RPDVYS
256  GLSVÄLSGCKELRCLSGFWD AVPA
280  YLP AVYSVCSRLTTNL SYATVQSY
305  DLVKLLCQCPKLQRLWVLDYIEDA
329  GLEV LASTCKDLREL RVFPSEPFVMEPNVALTEQ
363  GLVSVSMGCPKLESVLYFCRQMTNA
388  ALIT IARNRPNMTRFRLCIIEPKAPDYLTLEPLDI
423  GFGAIVEHC KDLRRLSLSGLLTDKVFE
450  YIGTYAKKMEMLSVAFAGDSDL
472  GMHHVLSGCDSL RKLEIRDCPF
494  GDKALLANASKLETMRSLWMSSCS
```

Con: .L..a...C..L..L.a.....

- Unter Proteinen häufiges, durch seine Struktur spezifisches Motiv
- Tir1 hat 16 degenerierte Leucine-rich-repeats
- => weitere Recherche...

Ergebnisse: TIR1 besitzt LRR- und F-Box-Domänen



- Einige Proteine mit ähnlicher LRR-Domäne besitzen ebenfalls F-Boxen und sind fähig, einen Ubiquitin-Protein-Ligase-Complex namens SCF zu bilden.

The diagram illustrates the ubiquitin-proteasome pathway. Ubiquitin (Ub) is activated by E1 (ubiquitin-activating enzyme) using ATP, forming a Ub-E1 conjugate. This is then transferred to E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) to form a Ub-E2 conjugate. E2, along with E3 (ubiquitin-ligase), facilitates the transfer of Ub to a substrate protein. The process repeats, forming a polyubiquitin chain on the substrate. The ubiquitinated substrate is then degraded by the 26S proteasome, releasing protein fragments and regenerating Ub.

Zusammenfassung

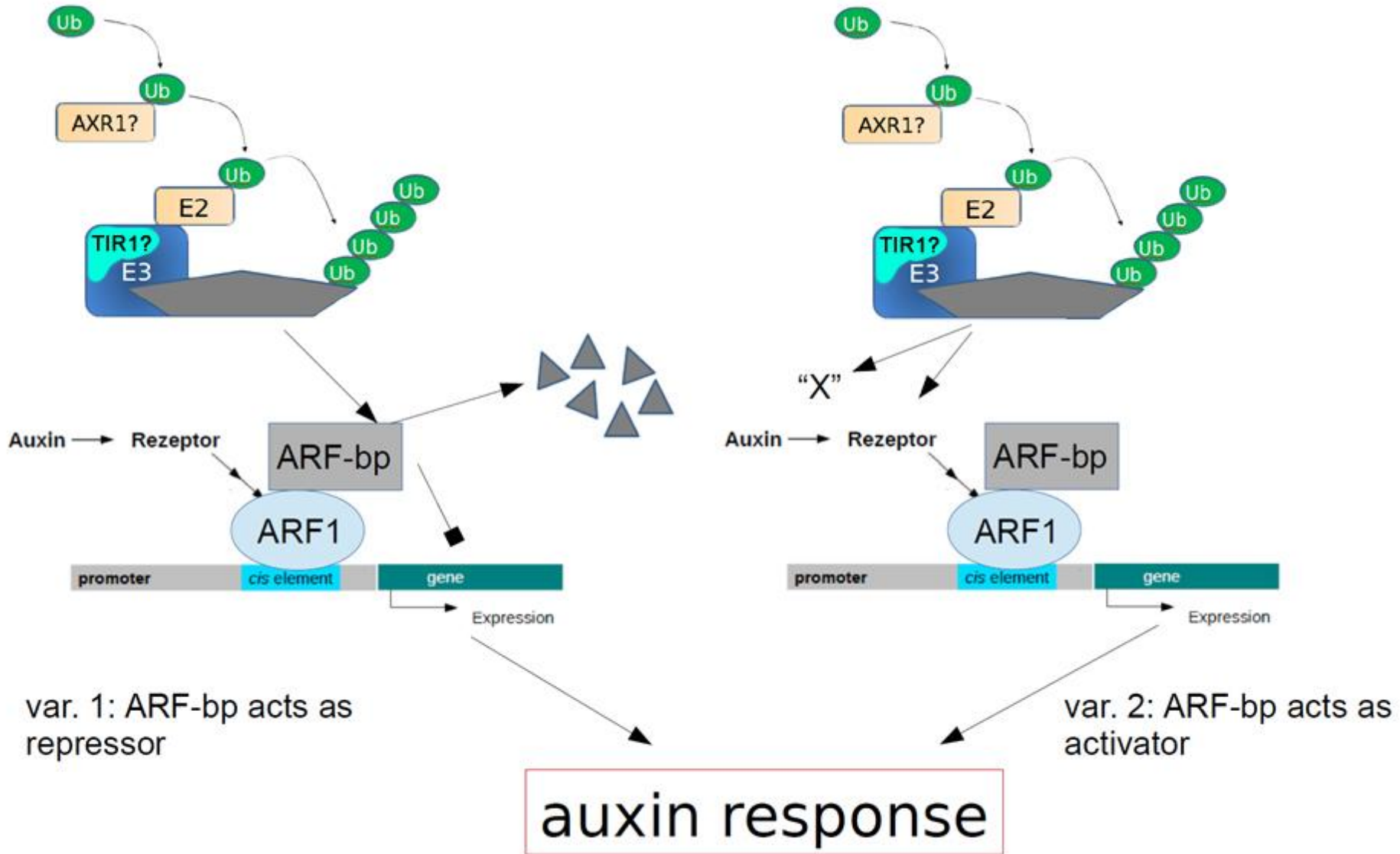
- ◎ Funktionelle Charakterisierung:
 - *tir1*-Mutanten zeigen verschiedene Beeinträchtigungen in der Auxin-Antwort
 - z.B. Seitenwurzelbildung, Zellproliferation, Zelllängenwachstum, Wachstumsregulation
 - *tir1-axr1*-Doppelmutanten zeigen eine additive/synergistische Interaktion
 - *TIR1* wird dominant-rezessiv vererbt und seine Funktion ist möglicherweise redundant

Zusammenfassung

⦿ Genetische Charakterisierung

- Lokalisiert auf Chromosom 3, Position 128
- Besitzt F-Box und LRR-Domäne
- Ist damit möglicherweise an einem Ubiquitin-Protein-Ligase-Complex beteiligt
- Weitere Verwandte in Arabidopsis und Reis (LRFs = Leucine-rich-repeats-F-Box)

Aktualisiertes Model



Vielen Dank für die Aufmerksamkeit!

