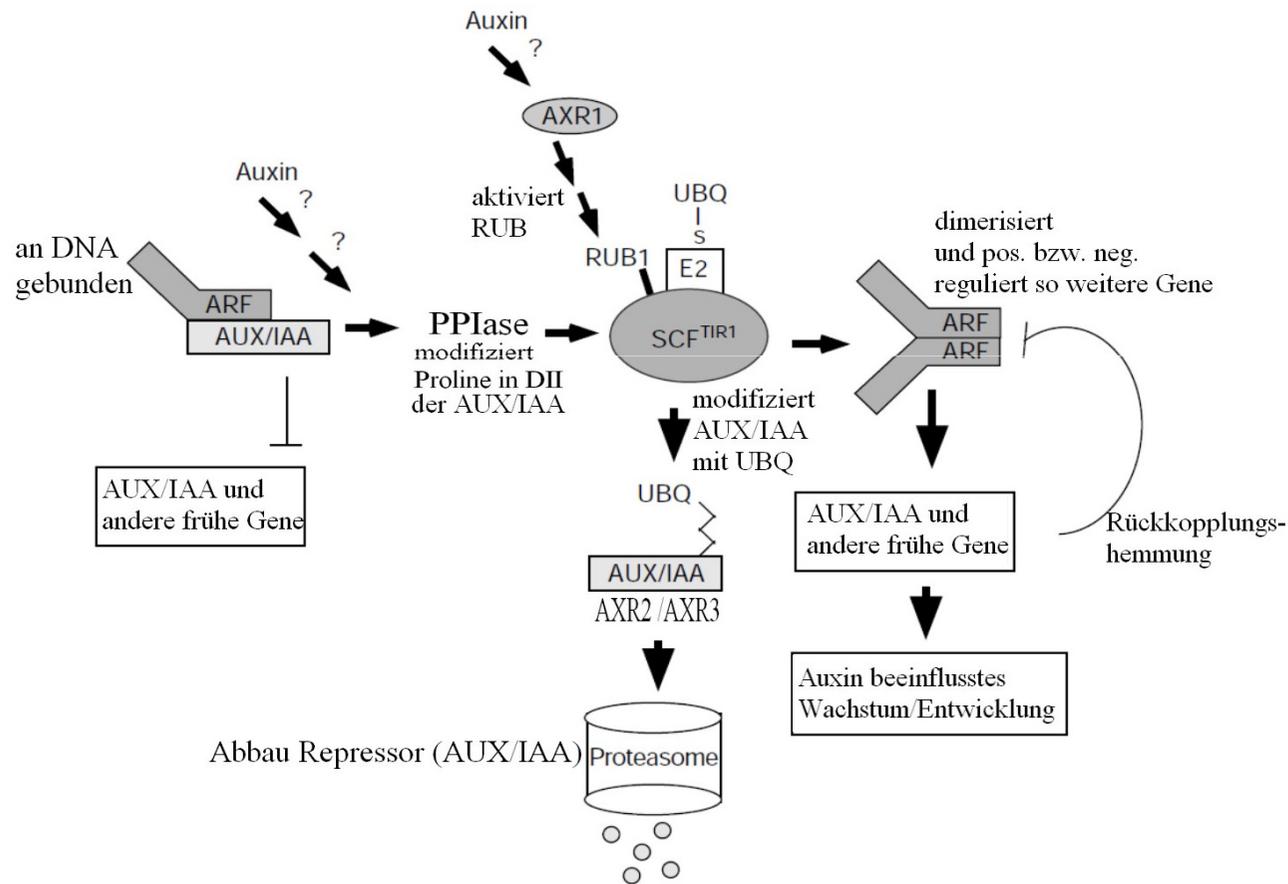


Hypothetisches Modell



Das Heutige Paper

The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor

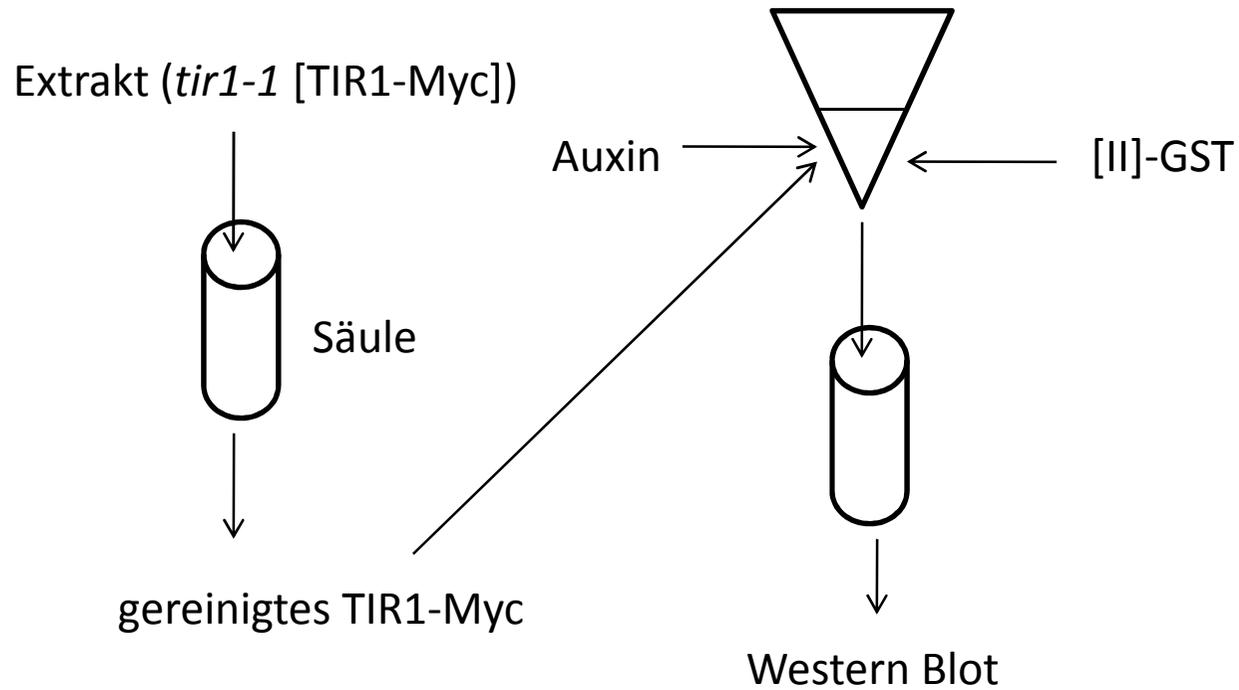
Stefan Kepinski^{1,2} & Ottoline Leyser¹

Inhalt:

- SCF bindet Auxin direkt
- TIR1 ist ein Auxin Rezeptor
- Auxin bindet direkt an TIR1, es sind keine zusätzlichen Komponenten nötig

Methode

Normales Pull down Assay wie sonst auch, aber es gibt einen feinen Unterschied

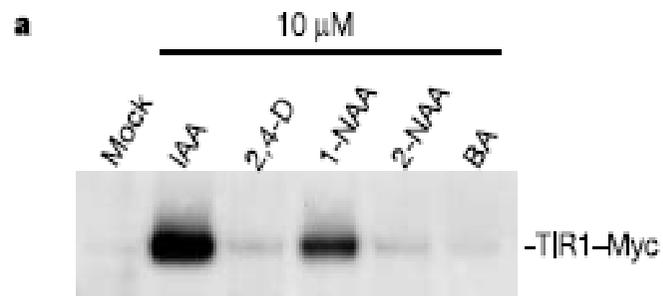


TIR1 ist ein Auxin-Rezeptor

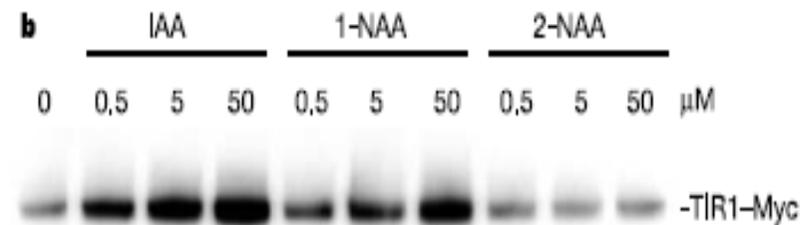
Wie beeinflusst Auxin SCF^{TIR1}?

→ Immunpräzipitation von SCF aus *tir1-1* Pflanzen

→ Pull down Assay



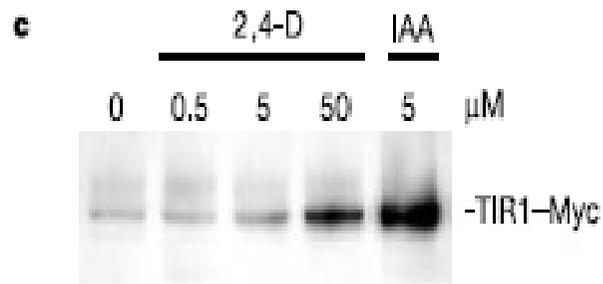
Signal → Interaktion von TIR1-Myc
mit Aux/IAA Domäne II Peptid



→ Aktivität ist konzentrationsabhängig

TIR1 ist ein Auxin-Rezeptor

Wie beeinflusst Auxin SCF^{TIR1}?



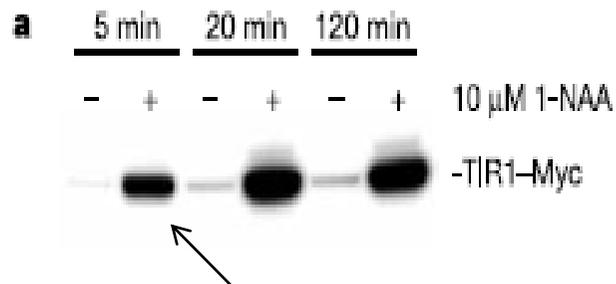
→ 2,4-D induziert die Bindung von TIR-1 an die Aux/IAA Domäne erst bei hoher Konzentration



- Auxin verstärkt die Interaktion von SCF^{TIR1} und Aux/IAA
- Immunopräzipitat muss den Auxin-Rezeptor für die Antwort enthalten

TIR1 ist ein Auxin-Rezeptor

Wie beeinflusst Auxin SCF^{TIR1}?



Schon nach 5 Minuten ein eindeutiges Signal

→ Signaltransduktionsweg ist schnell

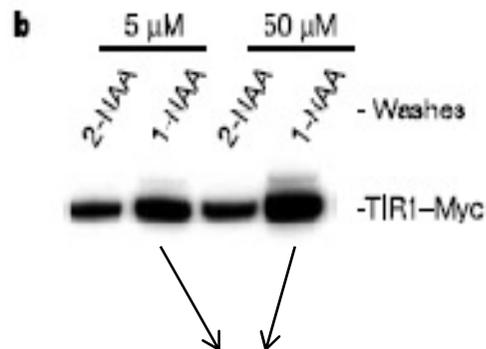
TIR1 ist ein Auxin-Rezeptor

Wie beeinflusst Auxin SCF^{TIR1}?

Beruhete die gezeigte Interaktion auf einer kontinuierlichen Präsenz von Auxin?

→ Normale Immunpräzipitation

→ Aber! Waschen mit dem Puffer erfolgte einmal mit und ohne Auxin



→ 1-NAA = aktives Auxin

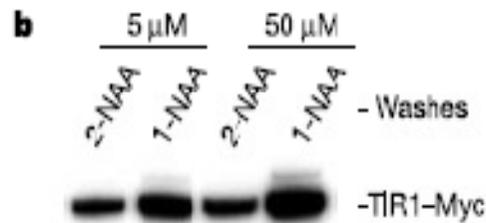
→ 2-NAA = inaktives Auxin

Besseres Signal als bei 1-NAA → JA, Auxin ist kontinuierlich anwesend

TIR1 ist ein Auxin-Rezeptor

Wie beeinflusst Auxin SCF^{TIR1}?

Beruhete die gezeigte Interaktion auf einer kontinuierlichen Präsenz von Auxin?



→ JA , Auxin ist kontinuierlich anwesend

→ unterstützt keine kovalente Modifikation

→ Auxin bindet wahrscheinlich direkt an SCF
oder an eng assoziiertes Protein

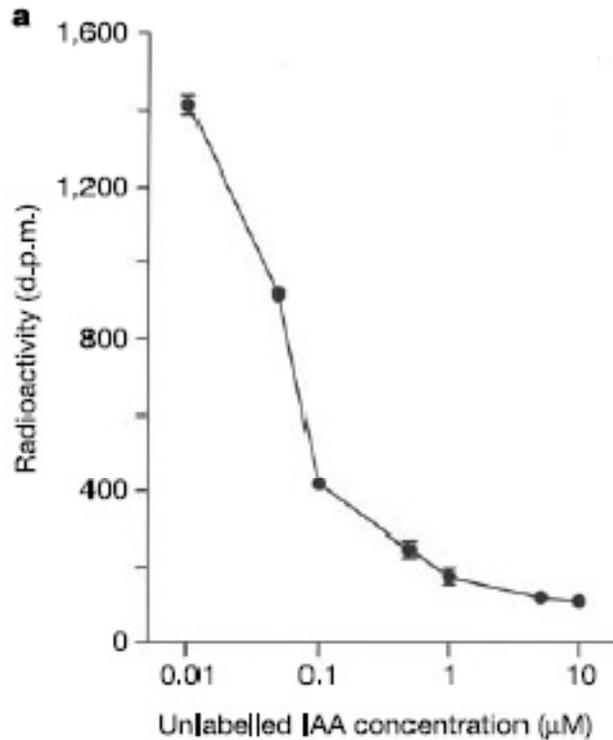
TIR1 ist ein Auxin-Rezeptor

Bindet SCF^{TIR1} Auxin direkt?

- Pull down Assay von TIR1-Myc Pflanzenextrakten mit radioaktivmarkiertem Auxin
- Verfolgung der Radioaktivität bei verschiedenen Konzentration von nicht markiertem Auxin
- tritt in Konkurrenz mit dem radioaktivmarkiertem Auxin

TIR1 ist ein Auxin-Rezeptor

Bindet SCF^{TIR1} Auxin direkt?



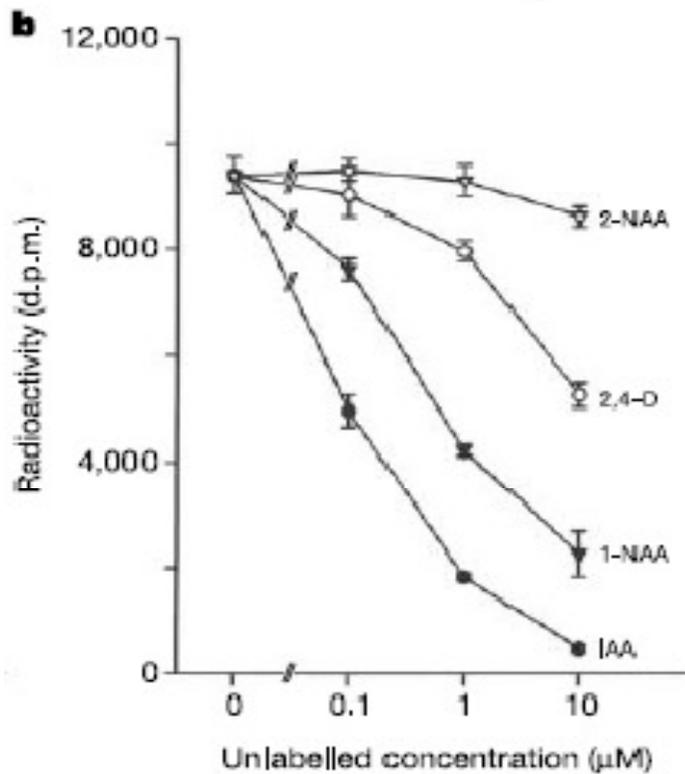
→ Radioaktivität sinkt bei steigender IAA Konzentration

→ nicht markiertes IAA verdrängt das markierte Auxin

→ Auxin wird direkt an den SCF-Komplex gebunden

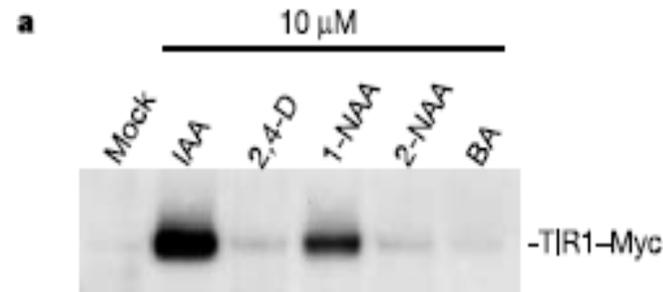
TIR1 ist ein Auxin-Rezeptor

Bindet SCF^{TIR1} Auxin direkt?



→ 2-NAA hat keinen Einfluss auf die Radioaktivität

→ IAA, 1-NAA und 2,4-D verstärken die Interaktion von SCF^{TIR1} an Aux/IAA



TIR1 ist ein Auxin-Rezeptor

Bindet SCF^{TIR1} Auxin direkt?

→ keine spezifische Bindung von [³H]IAA wurde bei Kontroll-Assays gefunden

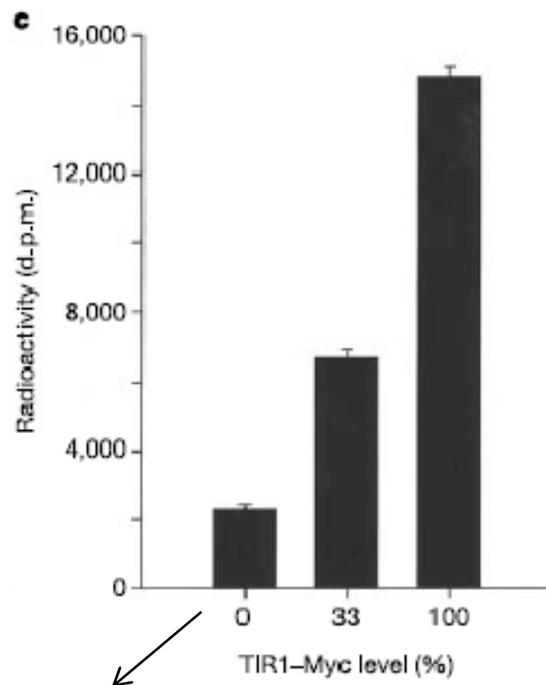
→ wurde ohne Samenextrakt durchgeführt

→ keine Daten dazu im Paper

→ zeigt, dass Auxin eher an den SCF-Komplex bindet als an Aux/IAA

TIR1 ist ein Auxin-Rezeptor

Bindet SCF^{TIR1} Auxin direkt?



→ zusätzliches TIR1-Myc wurde zu den *tir1-1* Extrakten dazugegeben

→ Pull down Assay mit [³H]IAA

→ erhöhtes Level an TIR1-Myc bewirkt erhöhte Auxin-Bindekapazität

→ SCF bindet Auxin

Aktivität auf Grund von funktionalen TIR1-Homologen in *Arabidopsis*

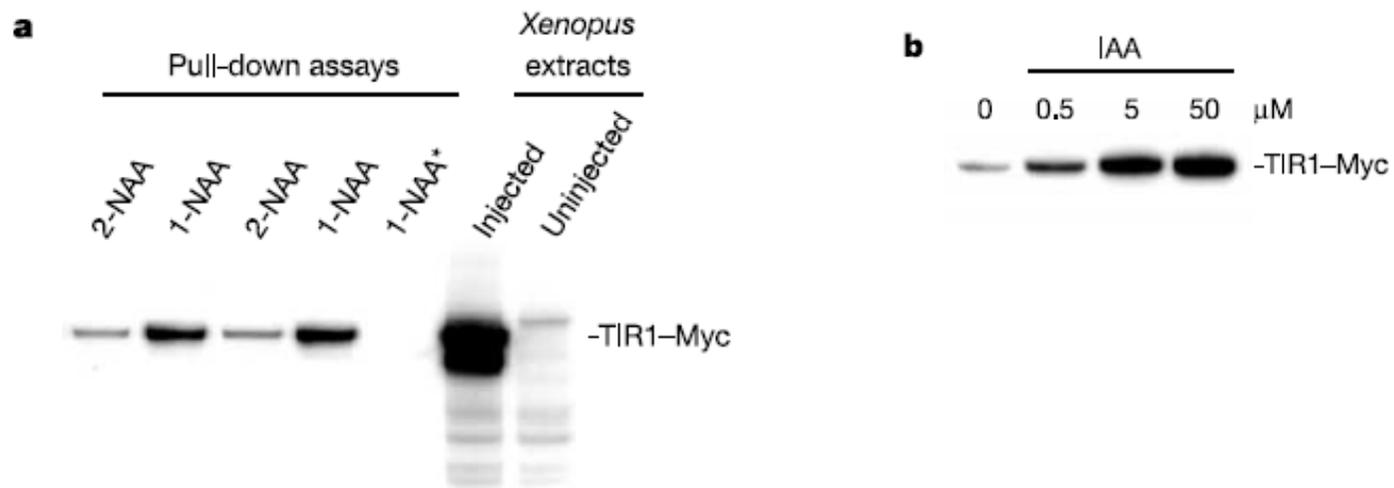
TIR1 ist ein Auxin-Rezeptor

Was wissen wir bis jetzt?

- Auxin verstärkt die Interaktion von SCF^{TIR1} und Aux/IAA
- Es herrscht ein schneller Signaltransduktionsweg
- SCF bindet Auxin direkt

TIR1 ist ein Auxin-Rezeptor

- Test, ob Ausbildung von TIR1 in heterologem, nicht-auxin-responsiven System genügt, für die auxinregulierte Wechselwirkung mit AUX/IAA -> *Xenopus laevis*

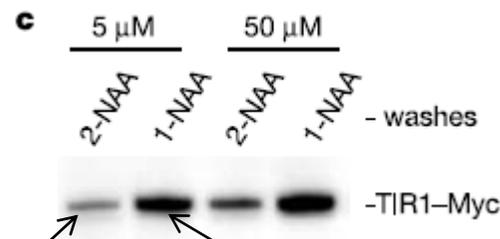


TIR1-Myc interagiert mit AUX/IAA
Domäne II Peptid; auxinreguliert und

konzentrationsabhängig

TIR1 ist ein Auxin-Rezeptor

- Waschschrift mit 1-NAA und 2-NAA



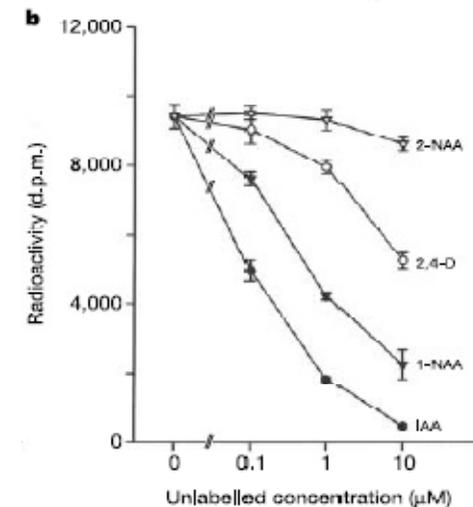
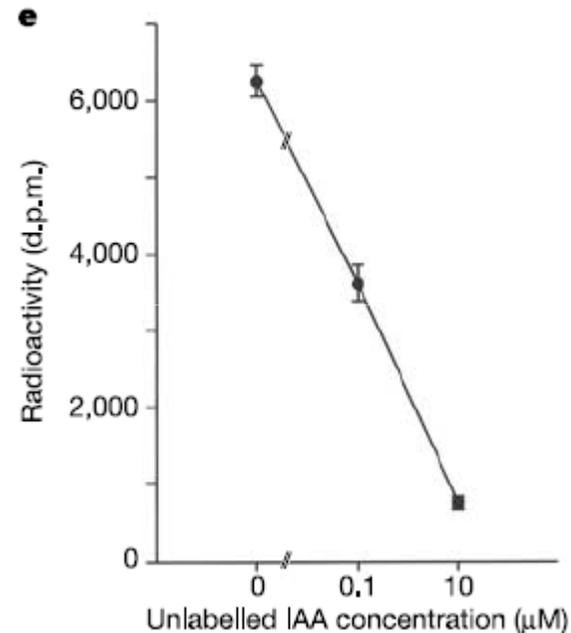
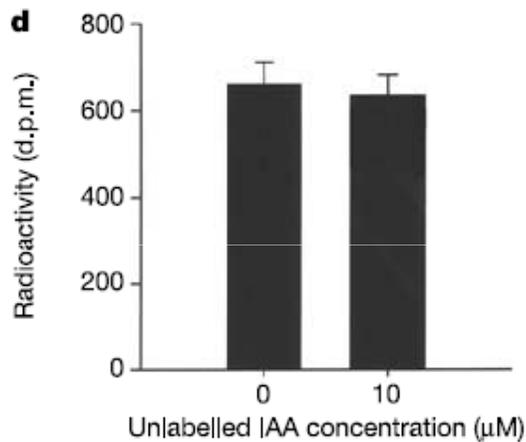
Inaktives Auxin: nur geringe Interaktion von TIR1 mit AUX/IAA Domäne II Peptid

Aktives Auxin: erhöhte Anzahl an Interaktionen zwischen TIR1 und AUX/IAA Domäne II Peptid

- In Kombination mit früherer Beobachtung, dass Auxin SCF TIR1 modifiziert, zeigt dieses Ergebnis, dass TIR1 der Auxinrezeptor für diese Antwort ist

TIR1 ist ein Auxin-Rezeptor

- weiterer Test mit radioaktiv markiertem [³H]IAA mit *Xenopus* Extrakt



- Test, ob *Xenopus* Extrakt eine Auxin-bindende Aktivität besitzt

- Pull-down Assay mit Embryoextrakt, injiziert mit TIR1-Myc mRNA (ähnlich wie 3b)

TIR1 ist ein Auxin-Rezeptor

Ergebnisse:

- In *Xenopus* exprimiertes TIR1-Myc interagiert mit AUX/IAA Domäne II Peptid in auxinreguliertem und konzentrationsabhängigem Weg
- TIR1 ist der Auxinrezeptor
- Heterolog exprimiertes und *Arabidopsis* exprimiertes TIR1 Protein möglicherweise ähnliche IAA Bindecharakteristiken besitzen

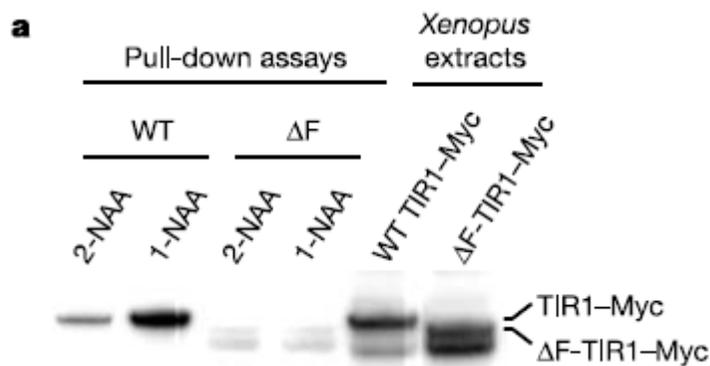
Auxin-induzierte TIR1-AUX/IAA Bindung benötigt die TIR1 F-box

Fragen:

- Interagiert TIR1 mit endogenen SCF^{Tir1}-Komponenten in *Xenopus*?
- Ist diese Assoziation verantwortlich für die Auxin-regulierte Interaktion mit dem Domäne II-Peptid?

Auxin-induzierte TIR1-AUX/IAA Bindung benötigt die TIR1 F-box

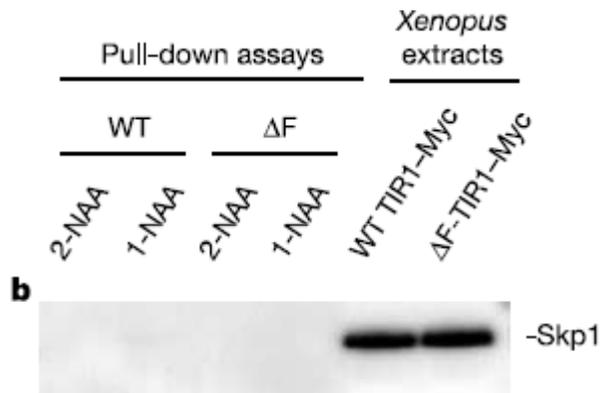
- Man erwartet, dass TIR1 F-box mit *Xenopus* Skp 1 interagiert
->ist die F- box für die Auxin- stimulierte TIR 1 Domäne II Peptid Interaktion erforderlich?
- Expression von TIR1-Myc ohne F-box, ersten 47 Aminosäuren werden weggelassen (Δ F-TIR1-Myc) in *Xenopus* Embryonen
 - Vergleich mit den Ergebnissen von TIR1-Myc in Domäne II Peptid Pull- down Assay



Das Fehlen der F-box hebt die Auxin-Stimulierte Interaktion zwischen TIR1-Myc Und Domäne II Peptid auf.

Auxin-induzierte TIR1-AUX/IAA Bindung benötigt die TIR1 F-box

- Nächster Schritt: Test, ob Skp1 mit TIR 1-Myc in *Xenopus* Extrakt interagiert

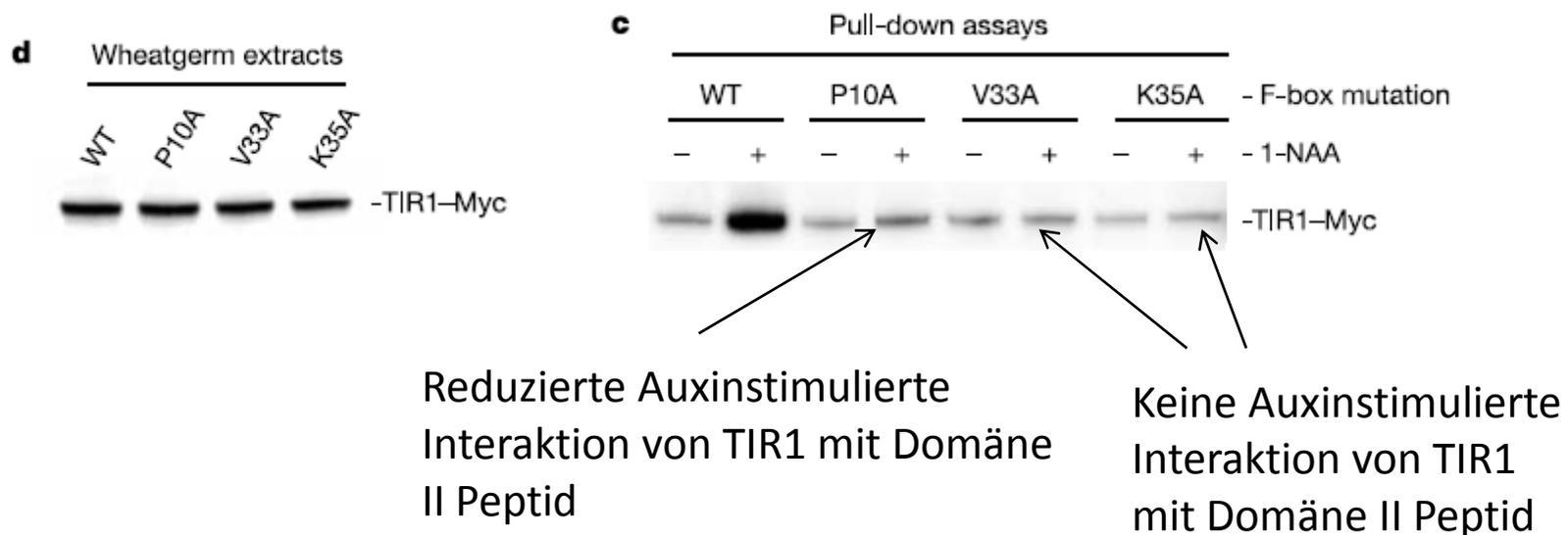


Obwohl Skp1 im Überfluss im *Xenopus* Extrakt detektiert wurde, erfolgt keine Interaktion mit TIR1

- Einlagerung von TIR1 in SCF muss nicht von Auxinbindung oder AUX/IAA Interaktion abhängen

Auxin-induziertes TIR1-AUX/IAA Bindung benötigt die TIR1 F-box

- Möglich, dass Mutation oder Deletion der TIR1 F-box die TIR1 Faltung in einem nicht-spezifischem Weg beeinträchtigt
- > Welchen Effekt haben Punktmutationen an drei konservierten Positionen auf die Auxin-stimulierte Interaktion mit dem Domäne II Peptid in Weizenkeimextrakten?
(Pro10->Ala; Val33->Ala; Lys35->Ala)

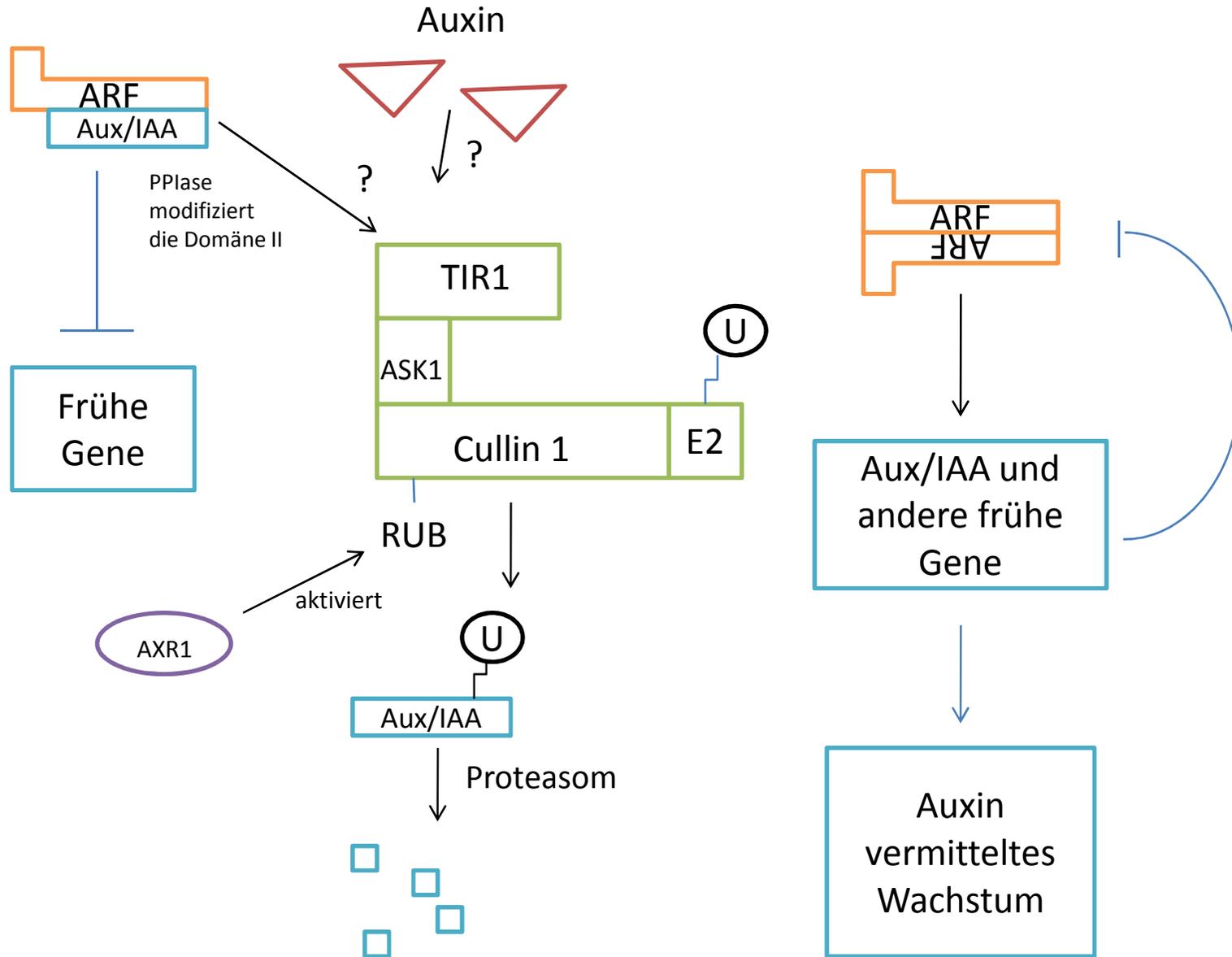


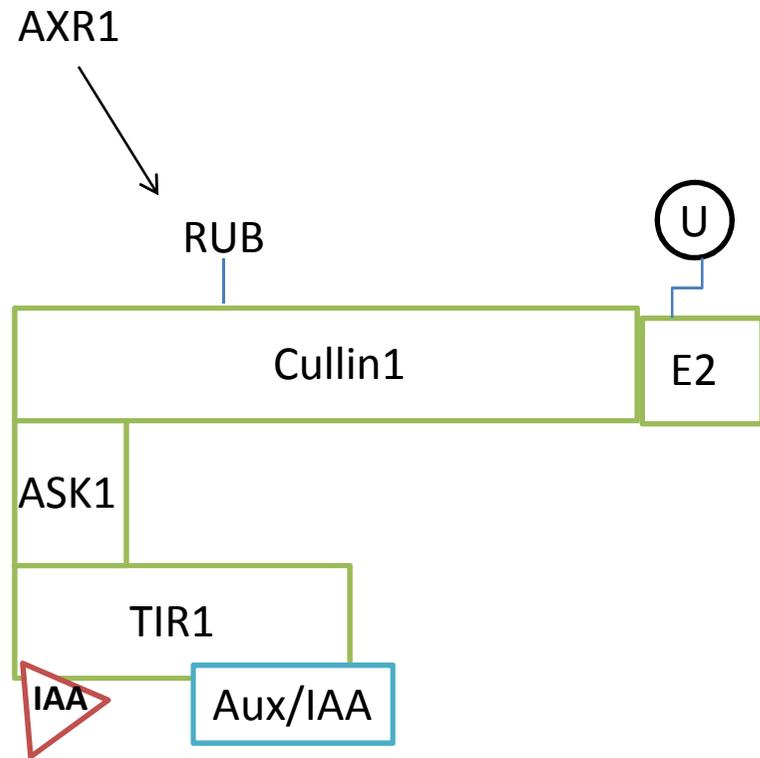
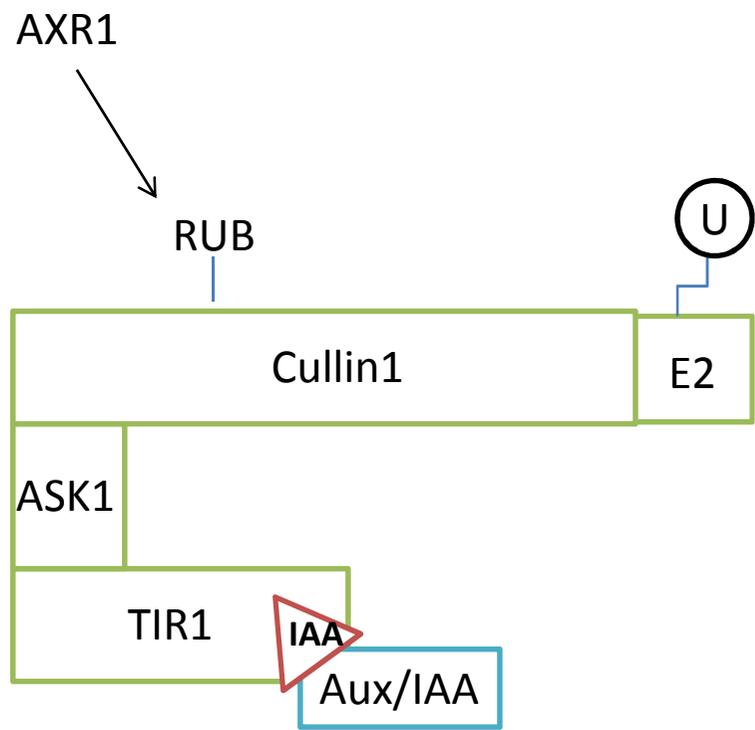
• Auxinabhängigkeit geht verloren!

Auxin-induziertes TIR1-AUX/IAA Bindung benötigt die TIR1 F-box

Ergebnisse:

- TIR1 F-box ist für die Auxin- stimulierte TIR 1 Domäne II Peptid Interaktion erforderlich
- Einlagerung von TIR1 in SCF muss nicht von Auxinbindung oder AUX/IAA Interaktion abhängen
- TIR1 F-box muss noch eine weiter spezifische Funktion besitzen neben der Bindung von SKP1, z.B. Auxin oder AUX/IAA Bindung





nächste Woche

Elisabeth & Robert

Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase

Xu Tan¹, Luz Irina A. Calderon-Villalobos², Michal Sharon³, Changxue Zheng¹, Carol V. Robinson³, Mark Estelle² & Ning Zheng¹