

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

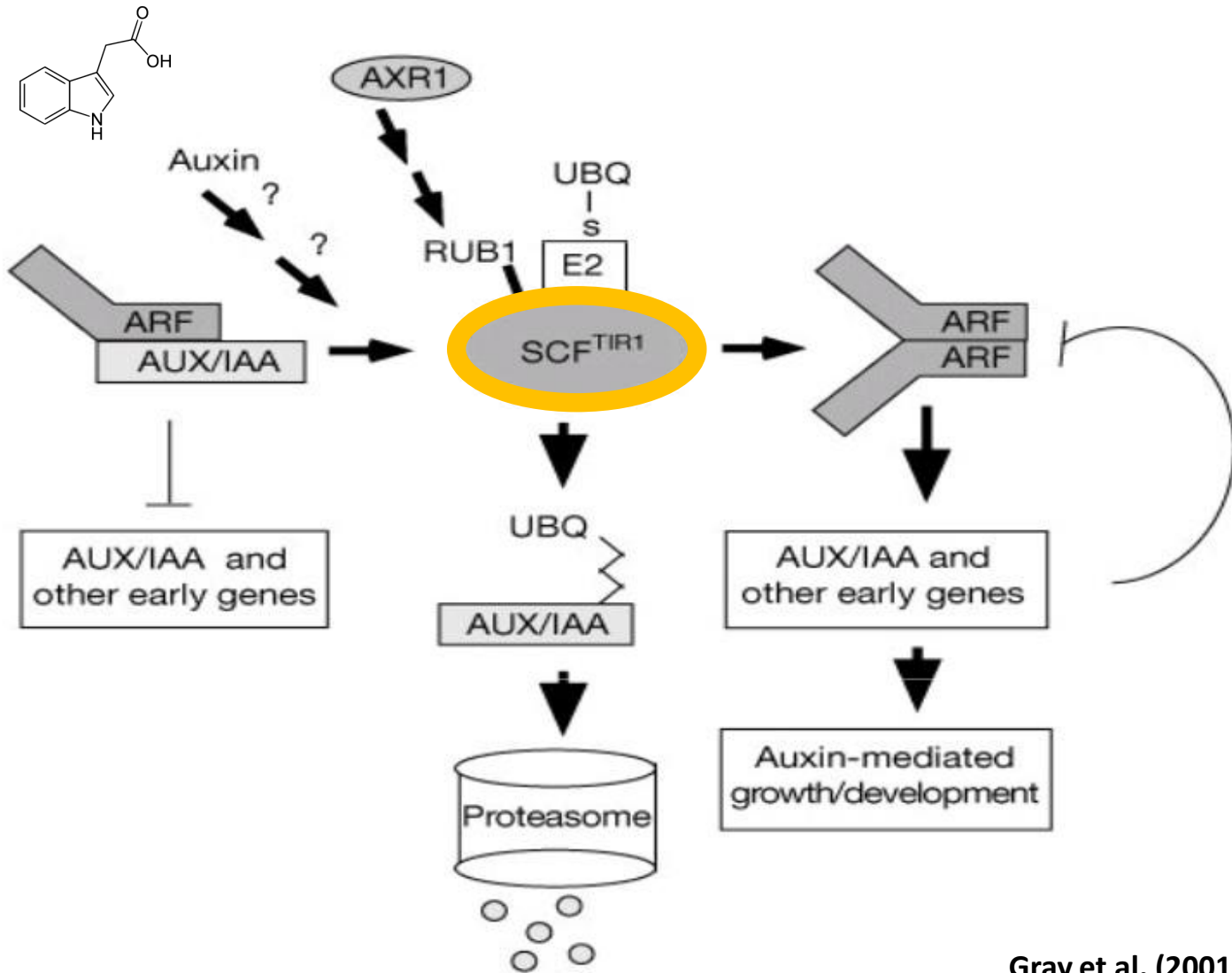
Michelle Kammel

David Speck

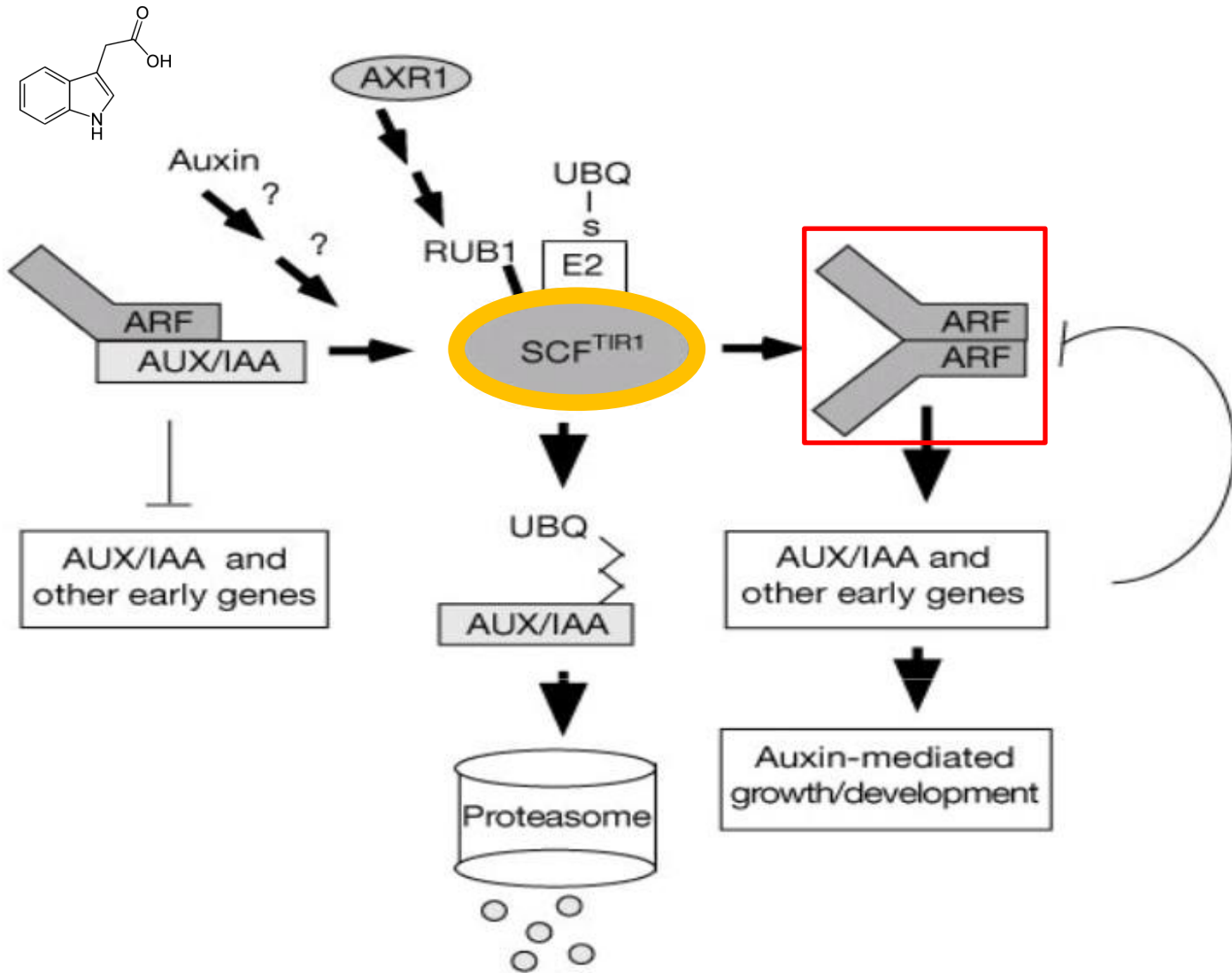
10.07.2013

Was ist bisher bekannt?

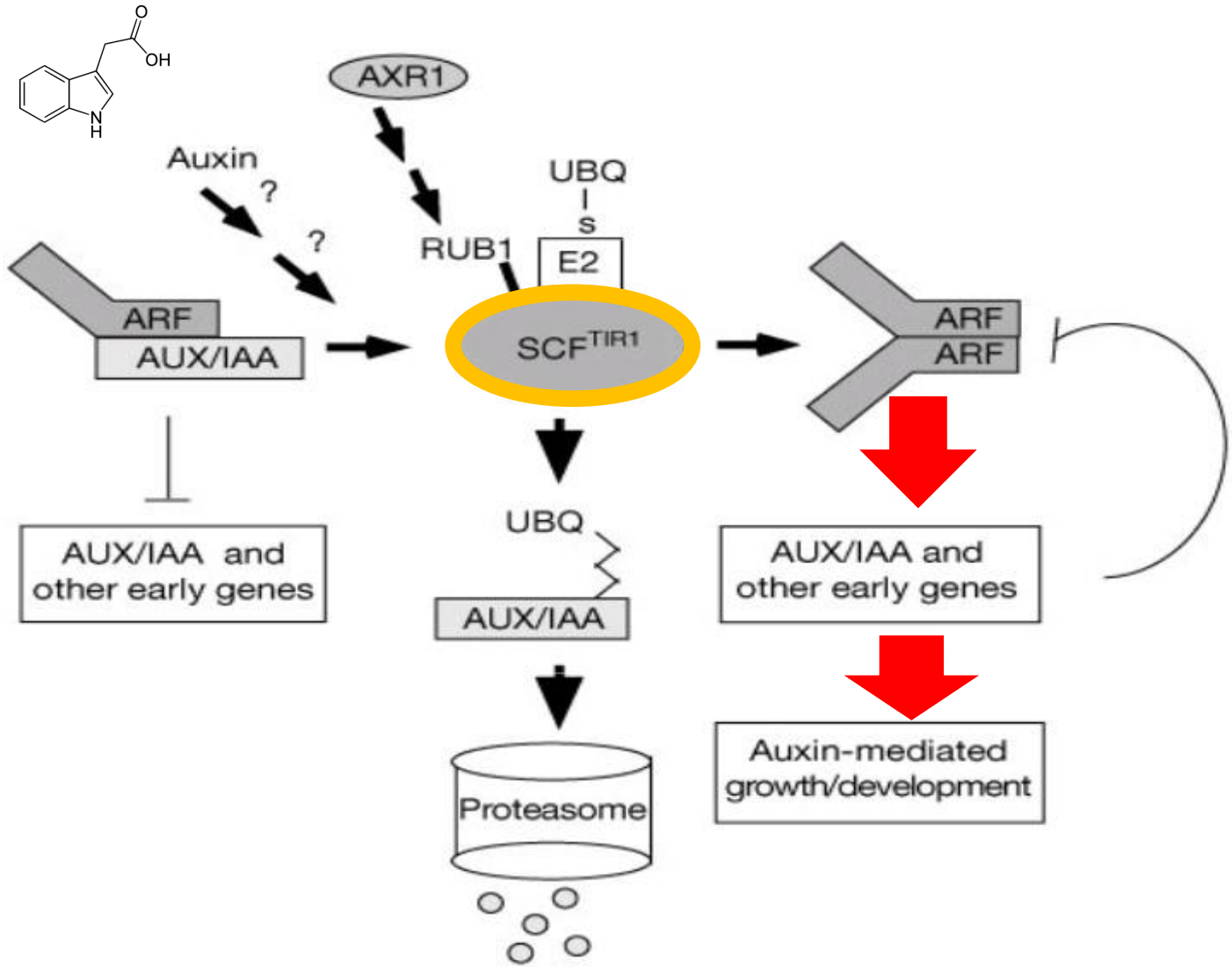
Zentrum des Signalwegs ist der Ubiquitin Ligase SCF^{TIR1} Komplex



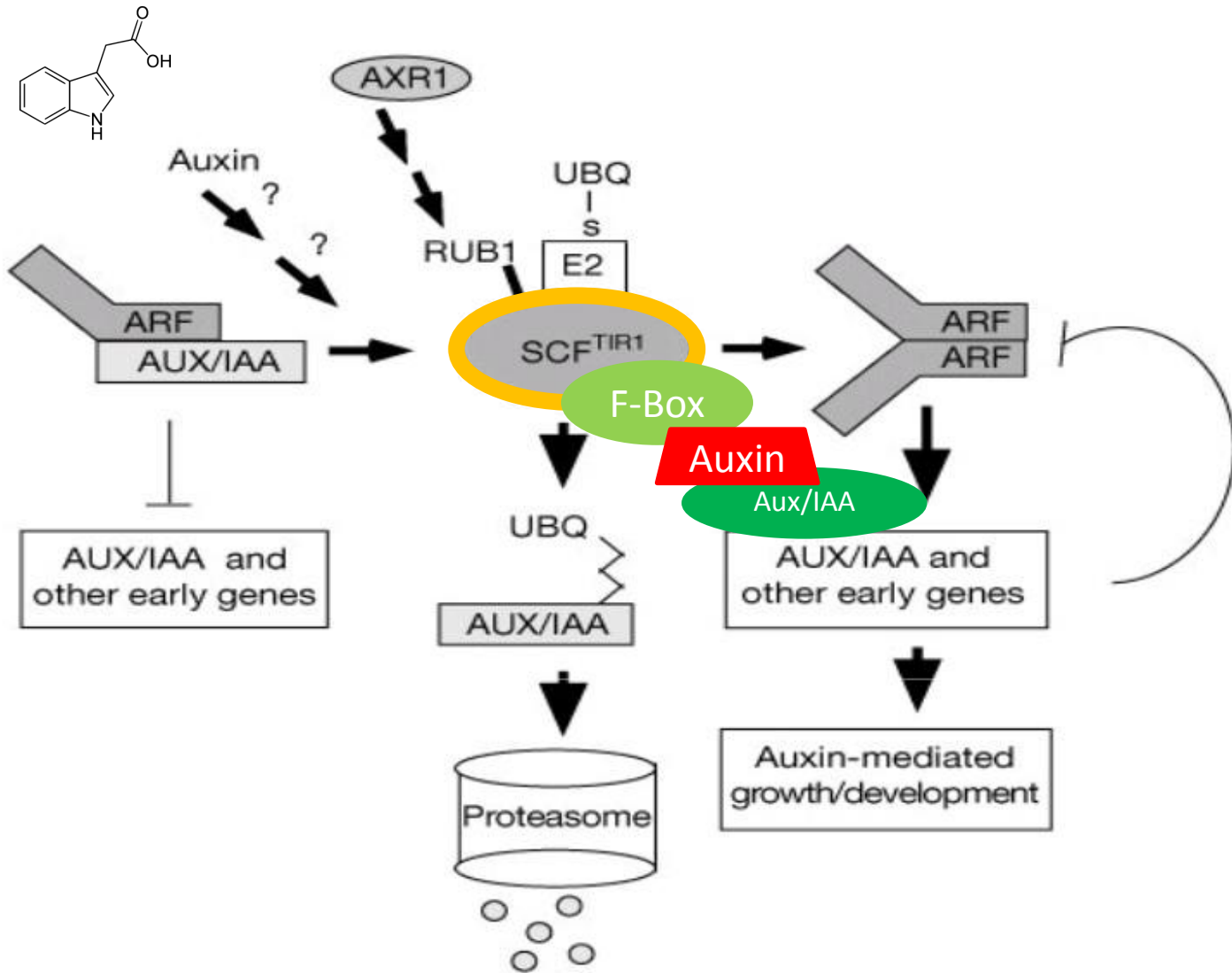
Abbau der Aux/IAA aktiviert Transkriptionsfaktoren (ARFs)



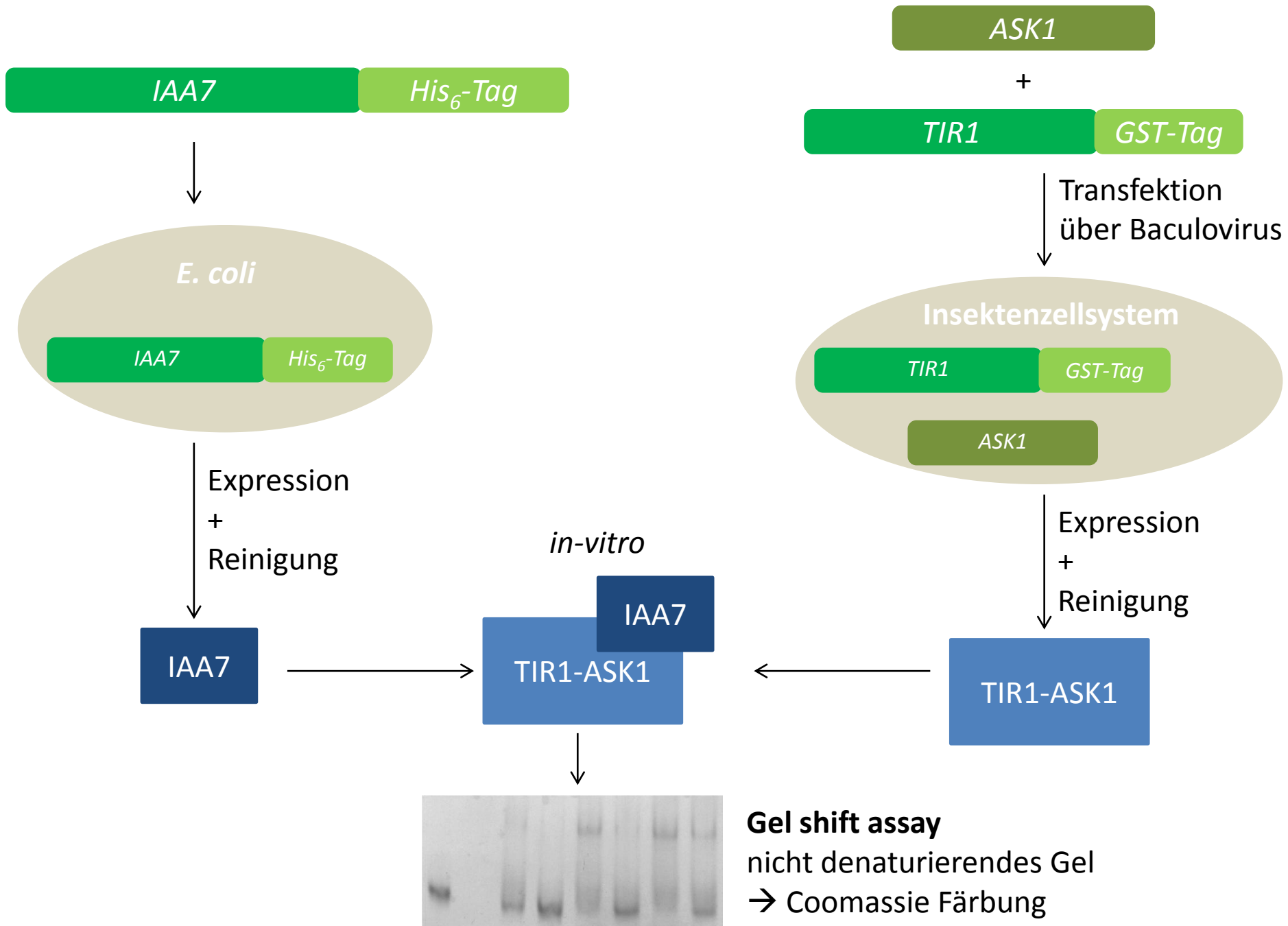
ARFs lösen Auxin Antwort aus



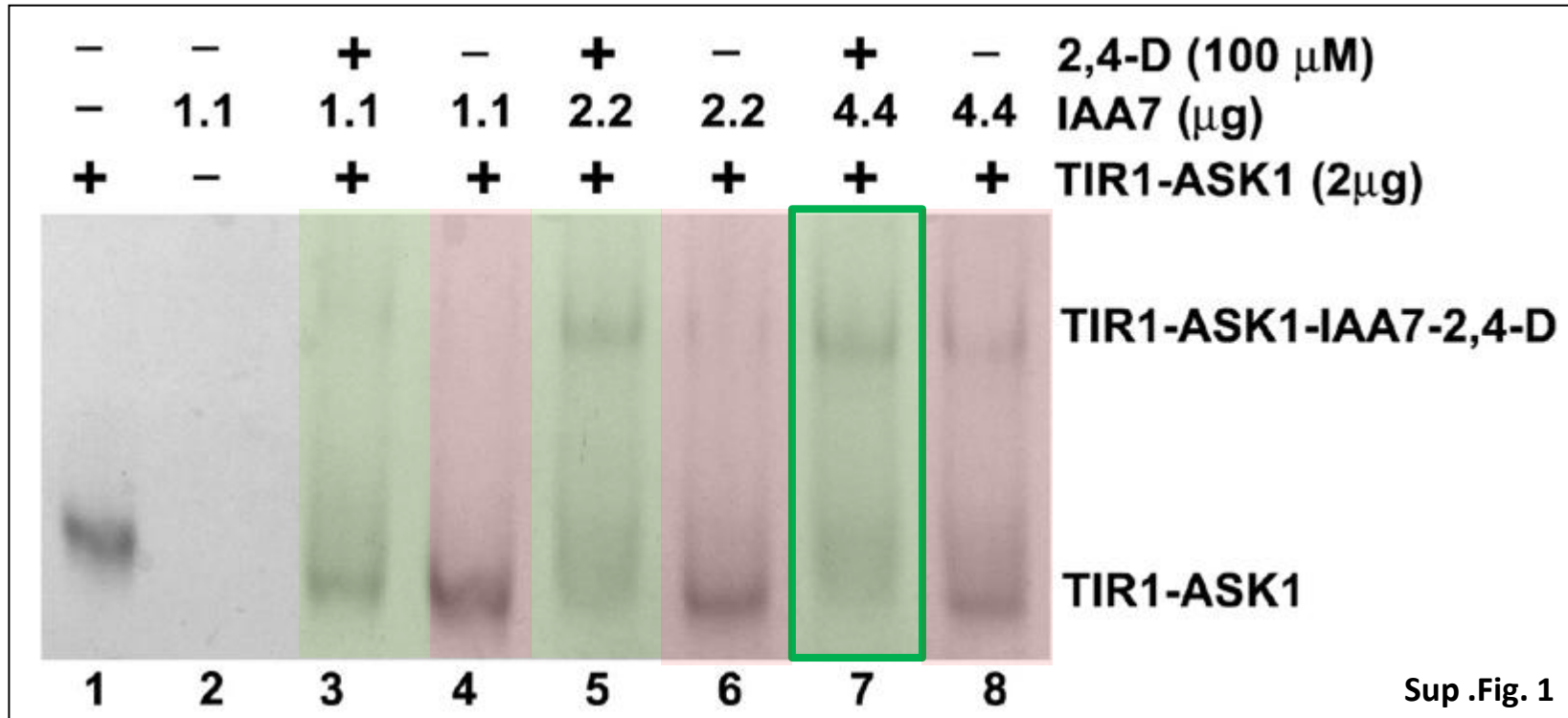
Auxin notwendig für Interaktion zwischen TIR1 und Aux/IAA



Wie wird Auxin von TIR1
wahrgenommen?



Auxin verstärkt TIR1-IAA7 Interaktion



- Auxin (2,4-D) ermöglicht direkte Interaktion zwischen Aux/IAA und TIR1-ASK1
- Je höher die Konzentration an IAA7, desto vollständiger ist die Komplexbildung

Fragestellung

Wie geschieht diese Interaktion?

Hypothesen

1. Auxin bindet in allosterische Bindungsstelle →
dadurch Konformationsänderung von TIR1
2. Erhöhung der Bindungsfläche zwischen TIR1 und
Aux/IAA

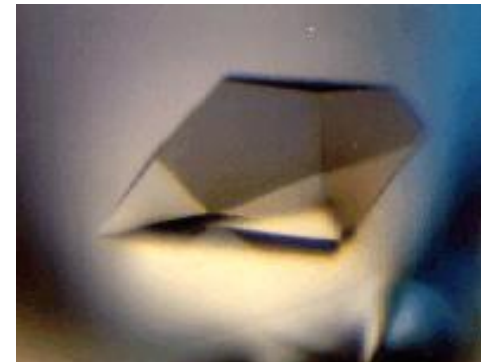
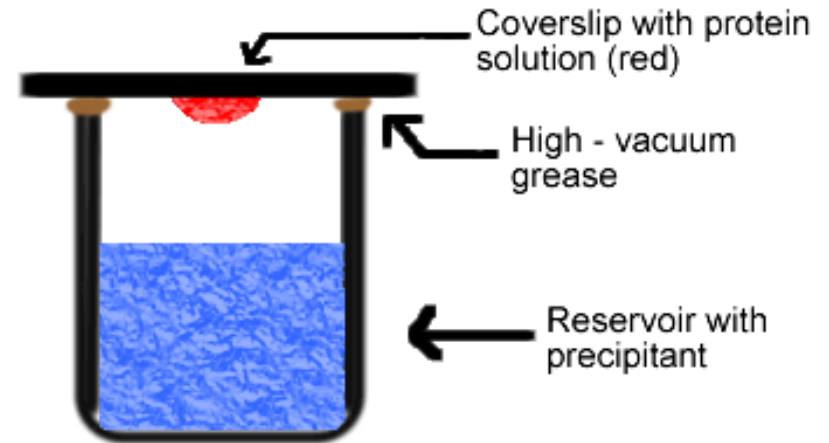
Strategie

Struktur-Wirkungsprinzip

→ Kristallografische Untersuchung nötig

Kristallografie

1. Expression des Proteins
2. Isolierung und Reinigung des Proteins
3. Kristallisation des Proteinkomplexes
 - hanging-drop vapour diffusion
 - Dampfdiffusion sorgt für Ausgleich des Konzentrationsgradienten
 - Aufkonzentration des Proteins im Tropfen
 - schonende Auskristallisation des Proteins
4. Kristallstrukturanalyse
 - Röntgenkristallstrukturanalyse



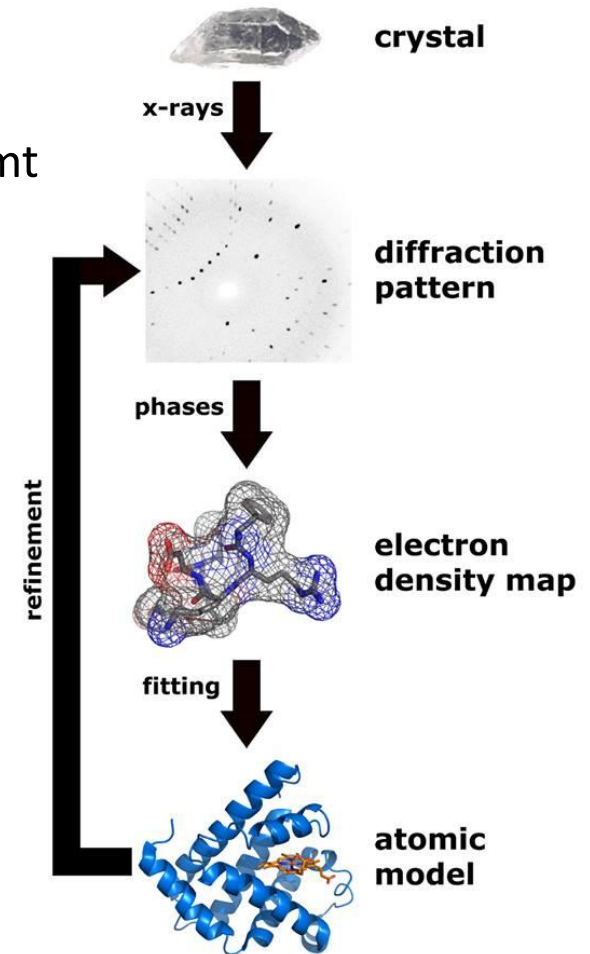
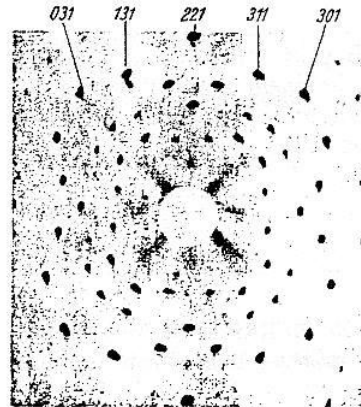
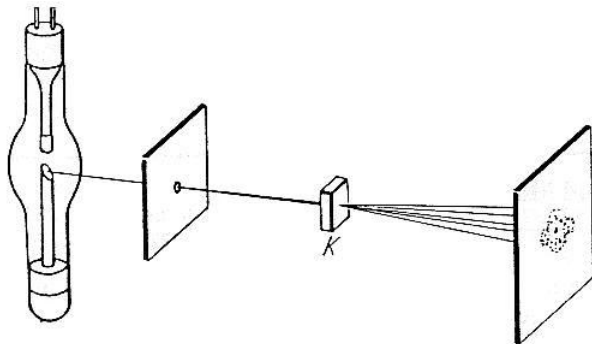
Röntgenkristallstrukturanalyse

Beschuss des Proteinkristalls mit Röntgenstrahlung

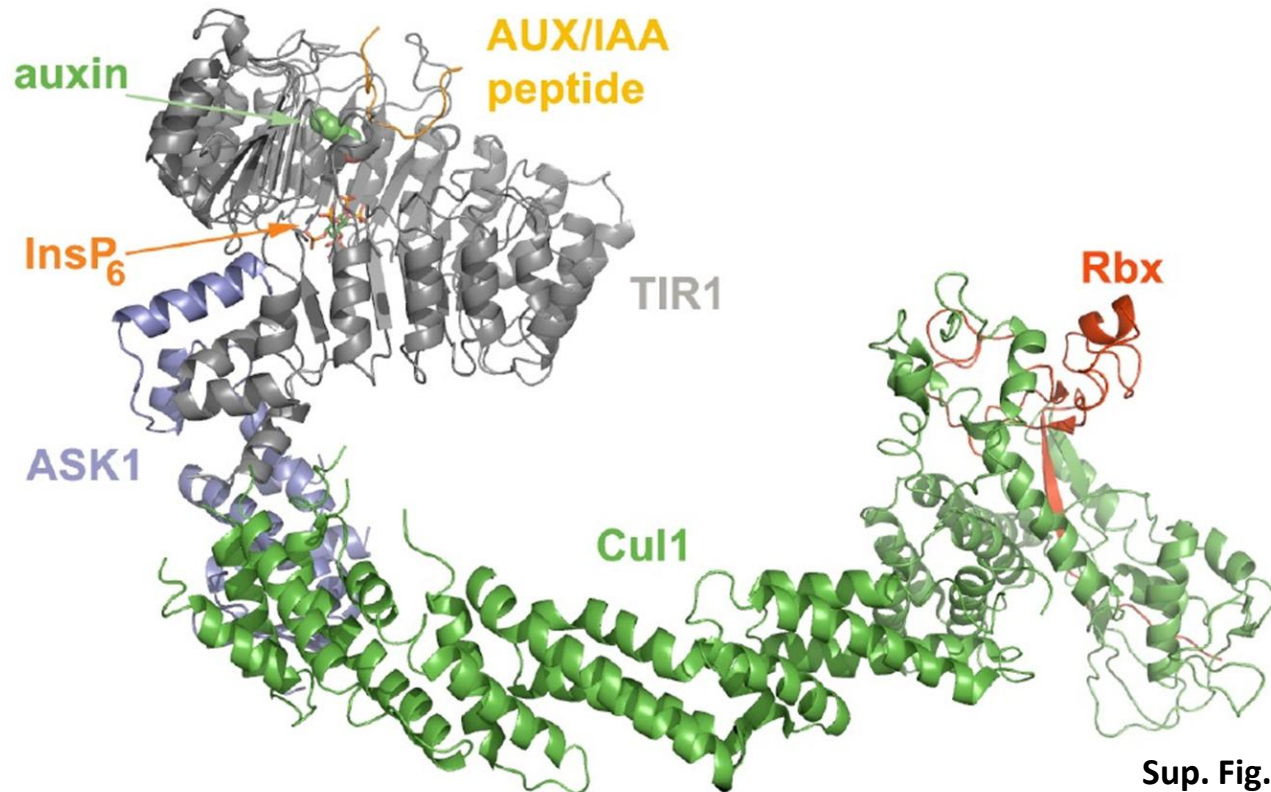
→ charakteristisches Beugungsmuster

→ Verteilung der Elektronen in Elementarzelle wird bestimmt

→ Ableitung der AS-Sequenz und Raumstruktur



Allgemeine Struktur SCF^{TIR1}



SCF^{TIR1} Model aus *Arabidopsis* TIR1-ASK1-Auxin-Aux /IAA und zusammen modelliert mit Teil des humanen Skp1-F-Box^{Skp2} Komplexes

TIR1-ASK1 Komplex hat eine pilzförmige Grundstruktur

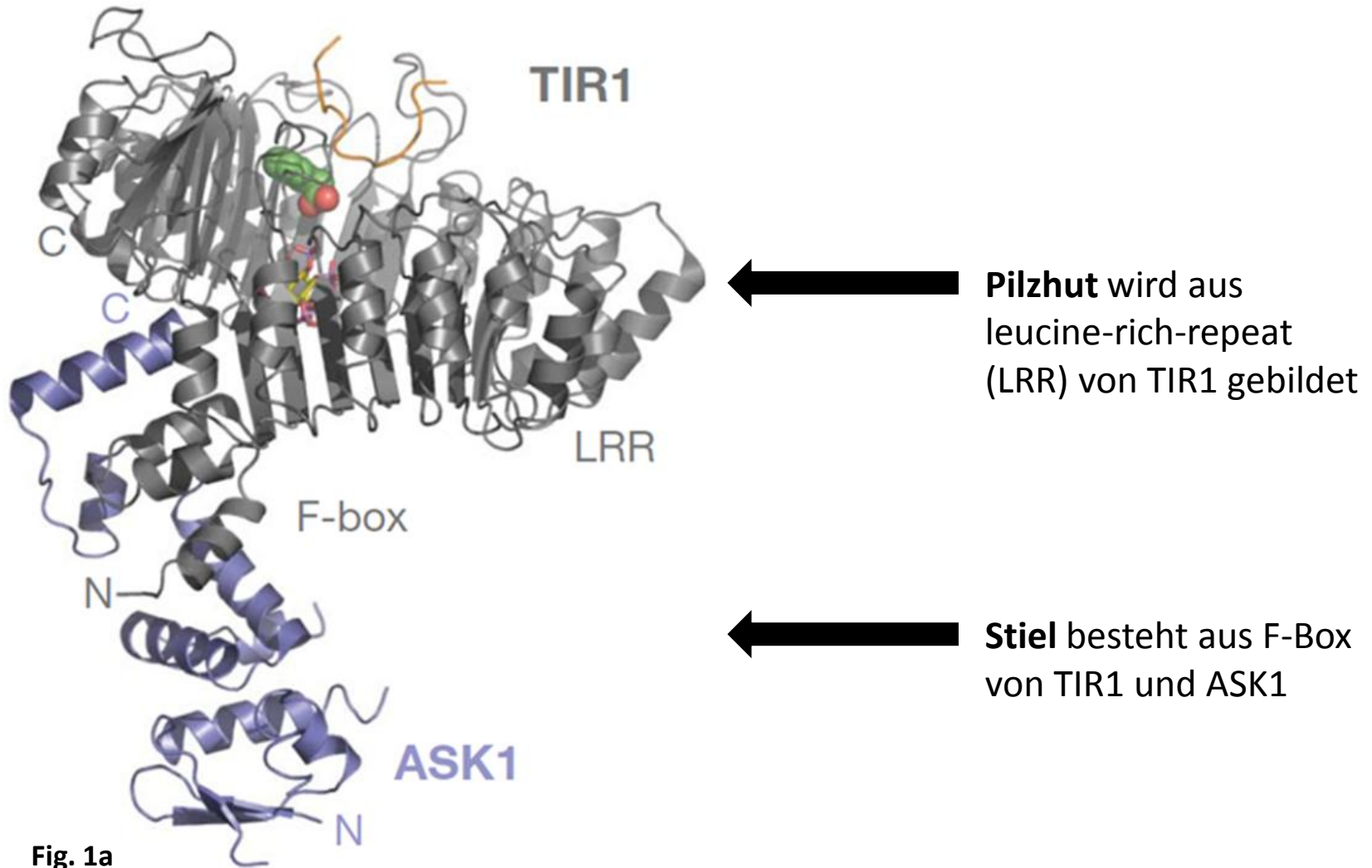
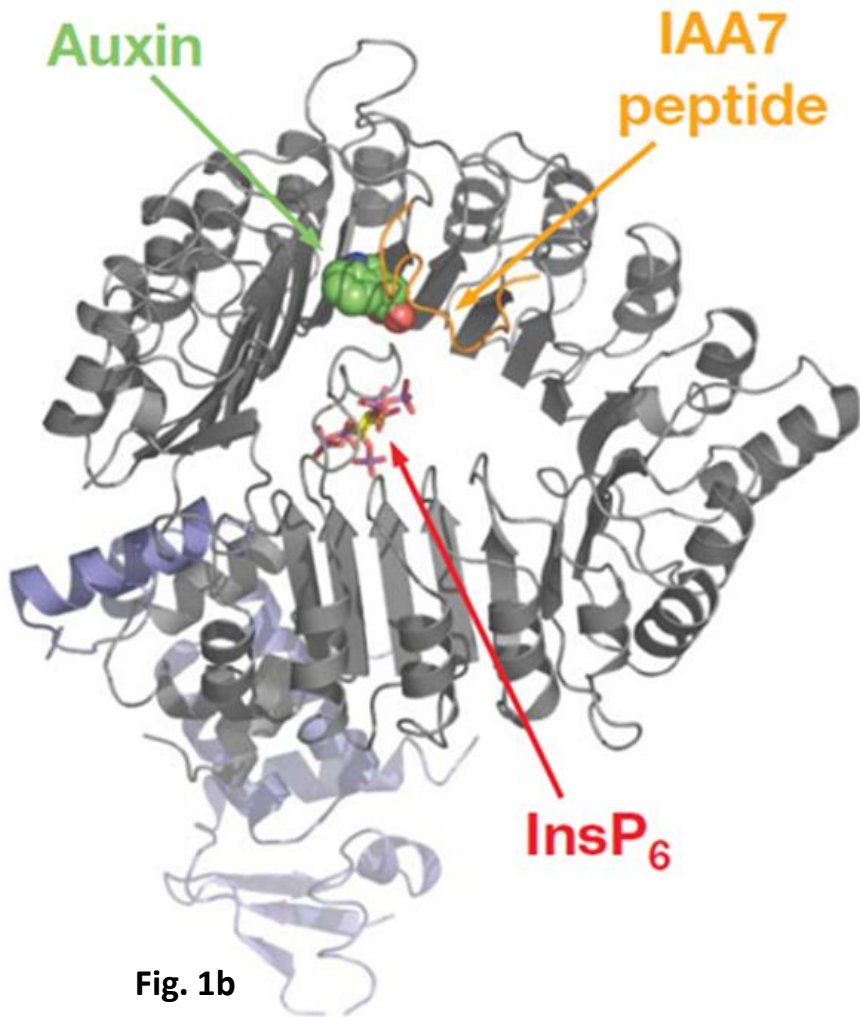


Fig. 1a

TIR1-LRR hat hufeneisenförmige Spiralstruktur



- einzelne Bindungstasche (TIR1-LRR) nimmt Auxin wahr und rekrutiert IAA7
→ aber keine Konformationsänderung von TIR1-LRR
- InsP₆ ist in räumlicher Nähe zur Auxin Bindungstasche lokalisiert

Fig. 1b

Allgemeine Struktur der TIR1-LRR

- Grundstruktur hufeisen- bis ringförmig
- 18 LRR + C-terminaler cap aus 3 antiparallelen β -Faltblättern (schließt Ring \rightarrow Federring Struktur)
- Knick bei LRR-8
- α -Helices bilden konvexe Oberfläche, β -Faltblätter konkave
- Jedes LRR besteht aus einer α -Helix und einem β -Faltblatt

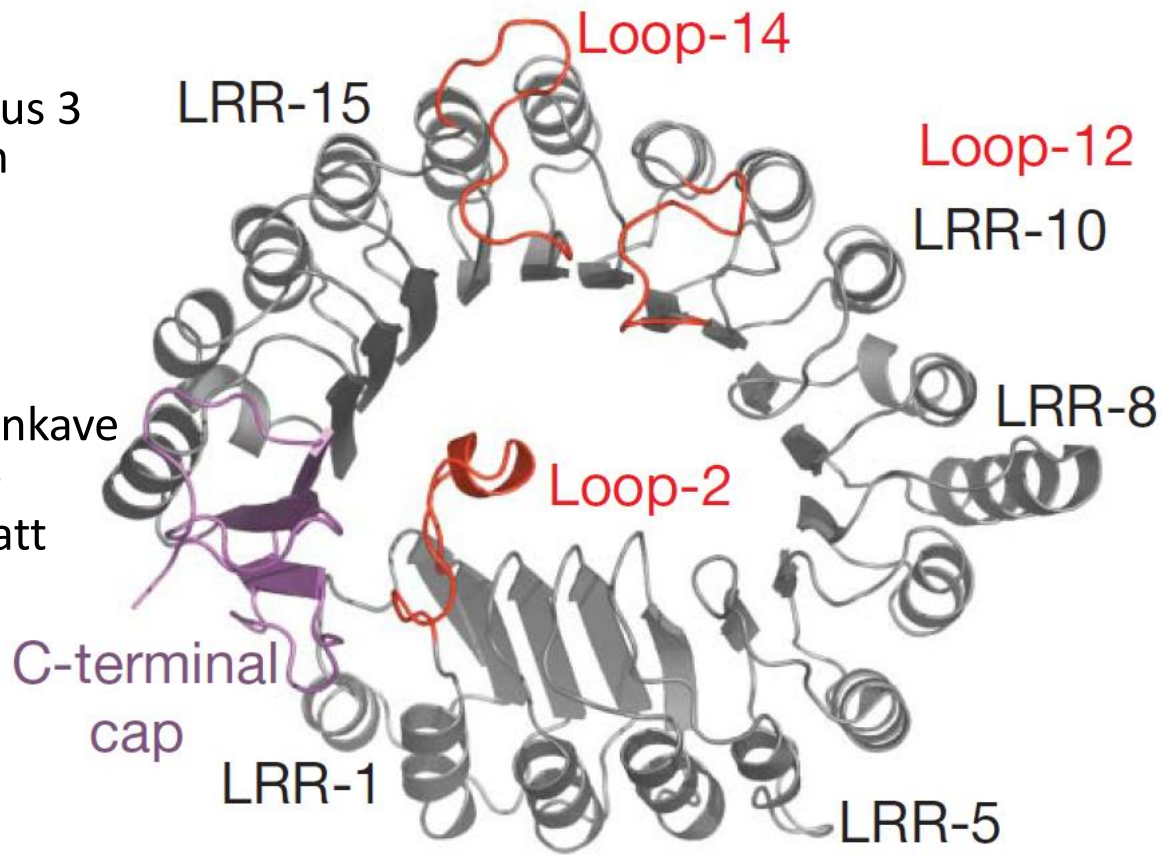


Fig. 2a

Loops 2,12, 14 bilden Auxin Bindungstasche aus

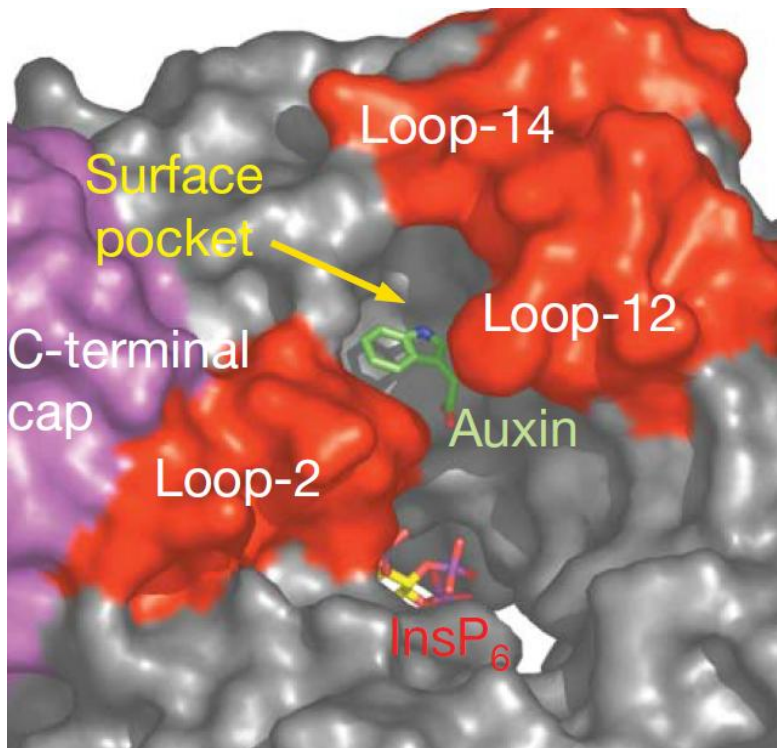


Fig. 2c

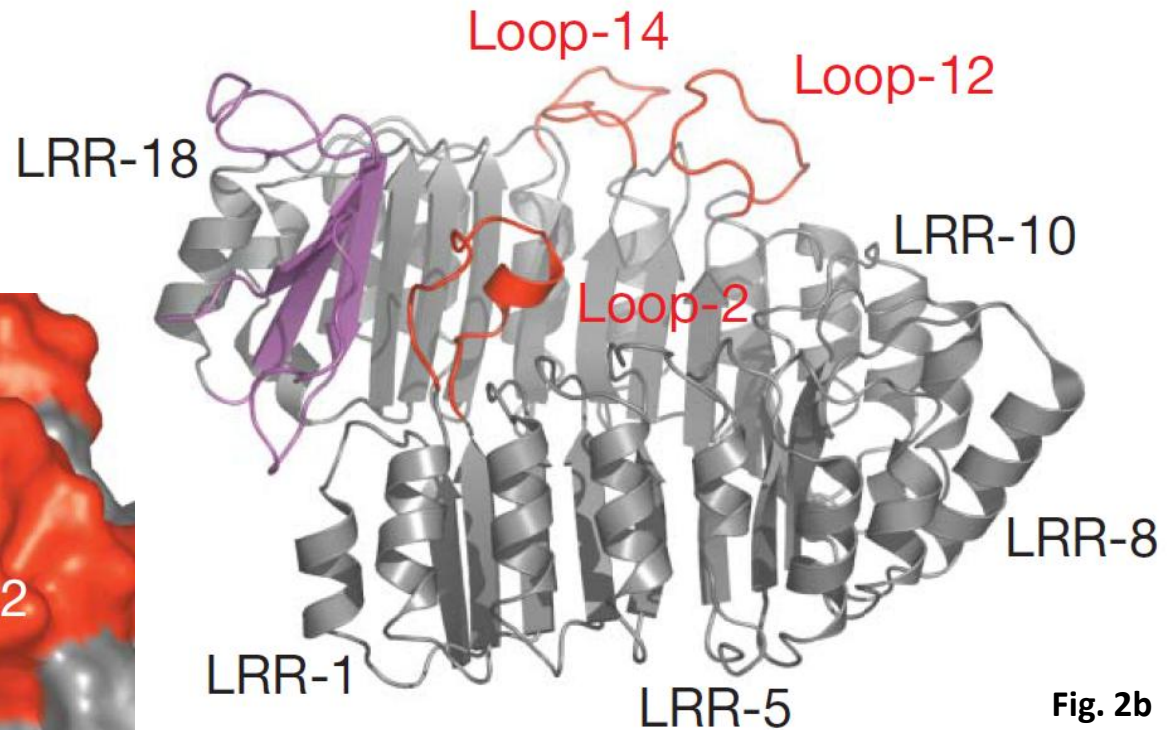


Fig. 2b

Loop 2 spielt Schlüsselrolle und interagiert mit konkavem Teil

Identifikation von InsP_6 in TIR1

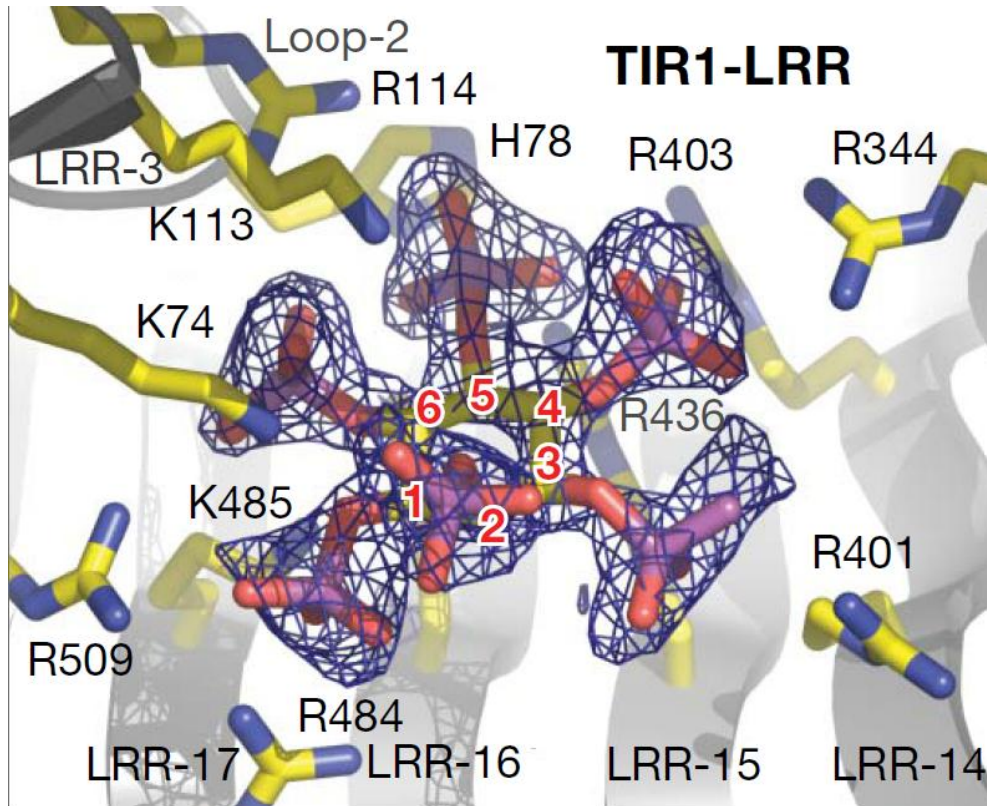


Fig. 3a

- Elektronendichteverteilung zeigt 6 „Äste“ die um einen zentralen Körper angeordnet sind
→ Hinweis auf InsP_6

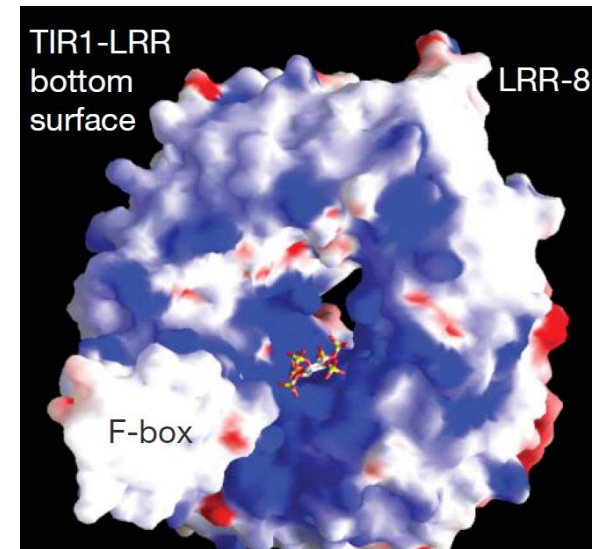
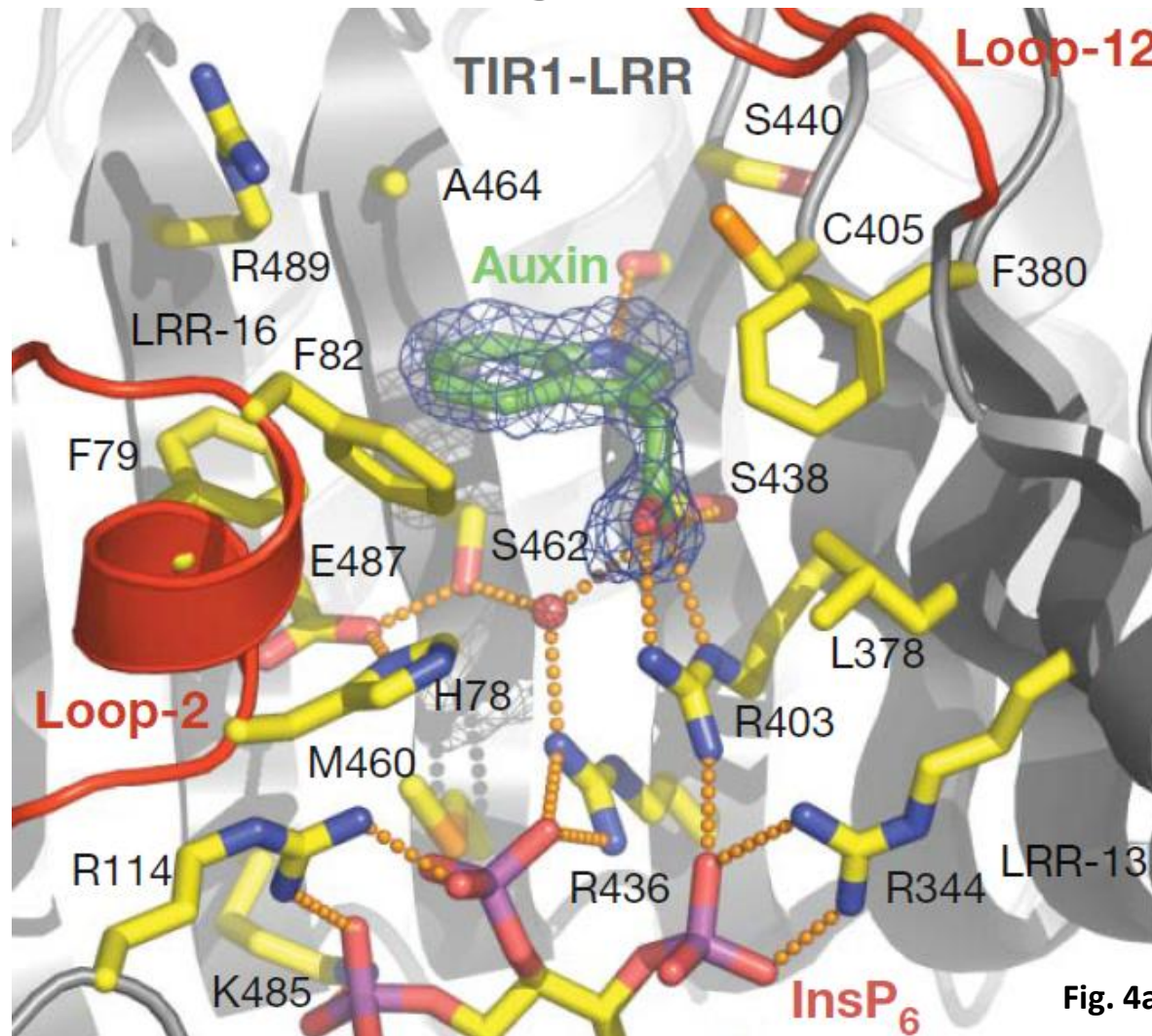


Fig. 3b

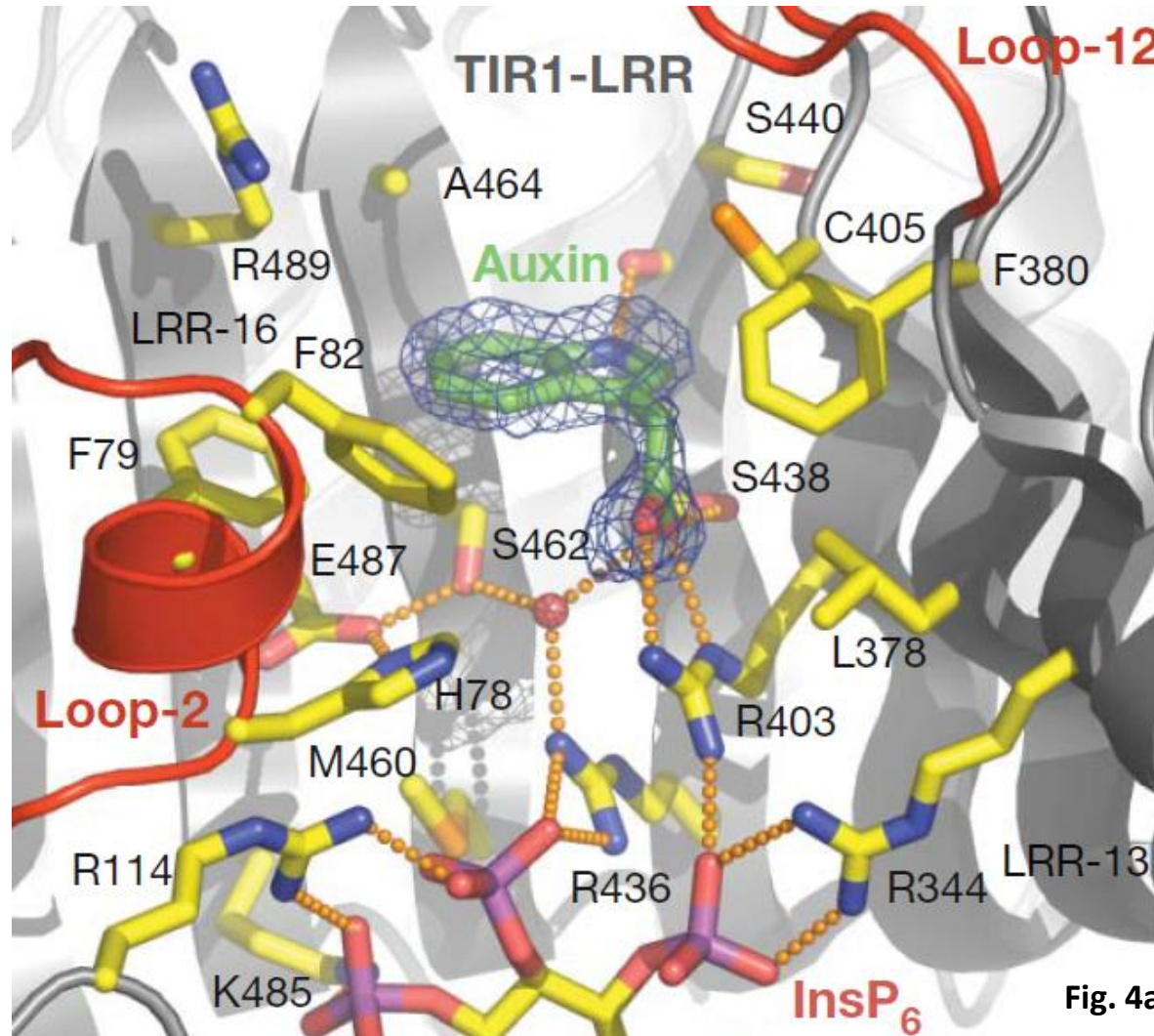
- Untersuchungen der Elektronendichte zeigte Anomalie in der Loop 2 Region

Die TIR1-Auxin-Bindungstasche – eine offene Box



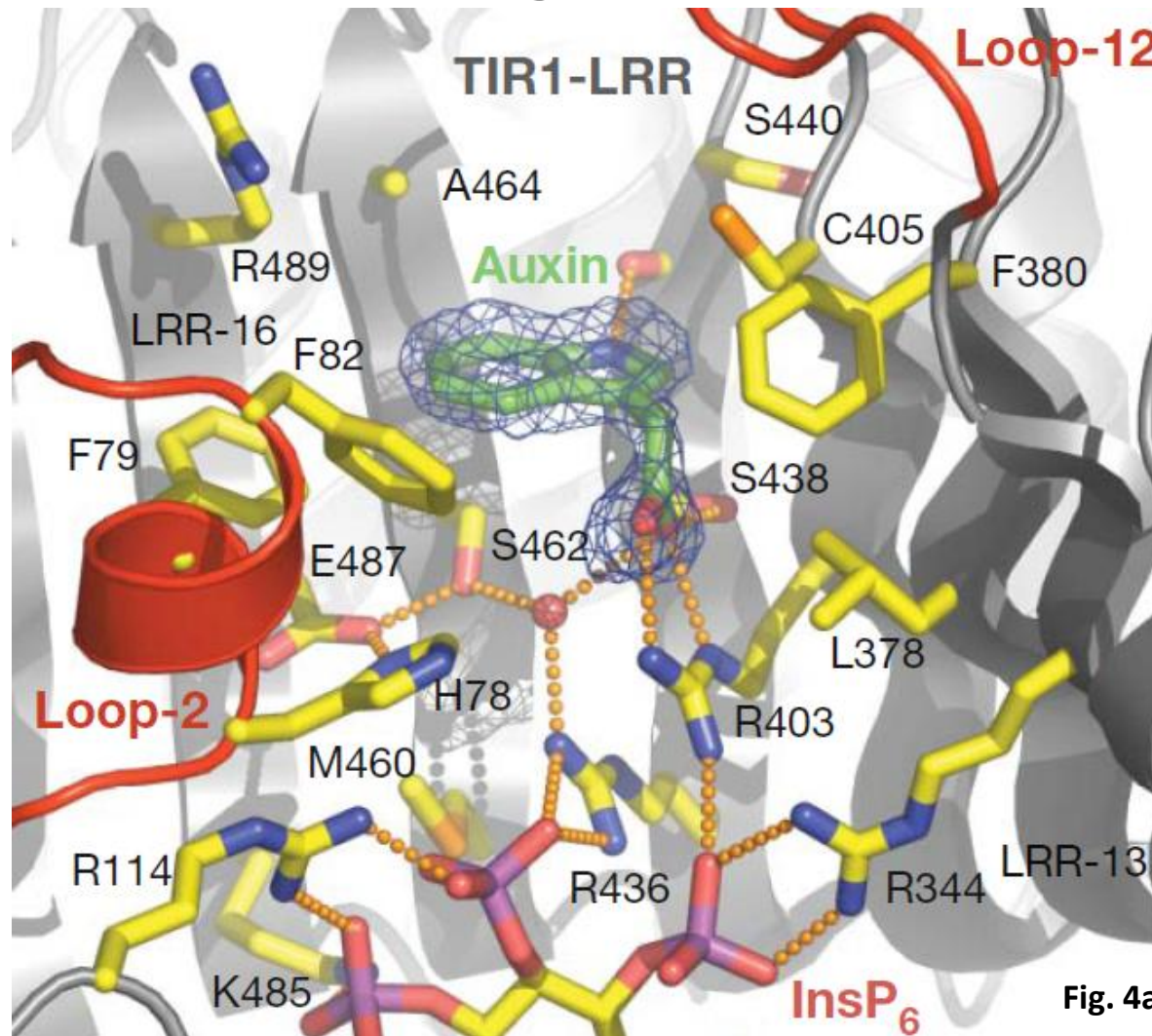
Wände werden von konkaver Innenseite und den LRR 2,12-16 gebildet

Die TIR1-Auxin-Bindungstasche – eine offene Box



Boden besteht aus LRR 2 Resten, der konkaven Oberfläche (His 78, Arg 403, Ser 438, Ser 462, Glu 487) und einem eingelagerten H₂O Molekül in der Mitte

Die TIR1-Auxin-Bindungstasche – eine offene Box



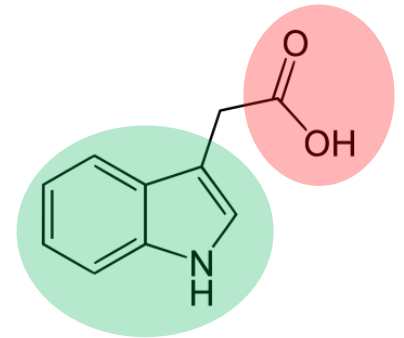
Ins P₆ bindet an Oberfläche des Taschenbodens (Interaktion mit hydrophoben und basischen AS)

Auxin-Bindungstaschen Interaktion

Strukturmerkmal der Auxine

1. Carboxylgruppe

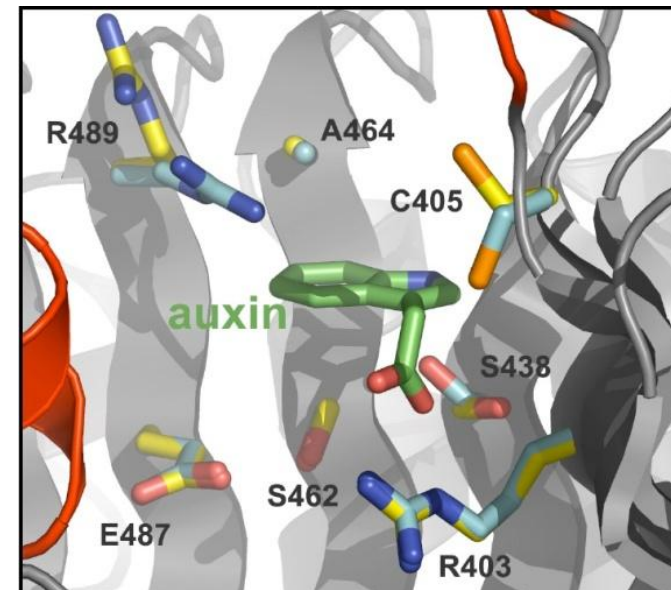
- Interaktion mit dem Taschenboden (Arg 403, Ser438 → Essenziell für Substratbindung) über zwei H-Brückenbindungen und Salzbrücke



2. planare Ringstruktur

- Van-der-Waals Kräfte und hydrophobe Interaktionen mit den zwei Schichten
- hydrophober AS halten die Ringstruktur in der Bindungstasche

→ IAA, 2,4-D, 1-NAA interagieren mit kleineren Abweichungen ähnlich



Sup. Fig. 5

Auxin-Bindungstaschen Interaktion

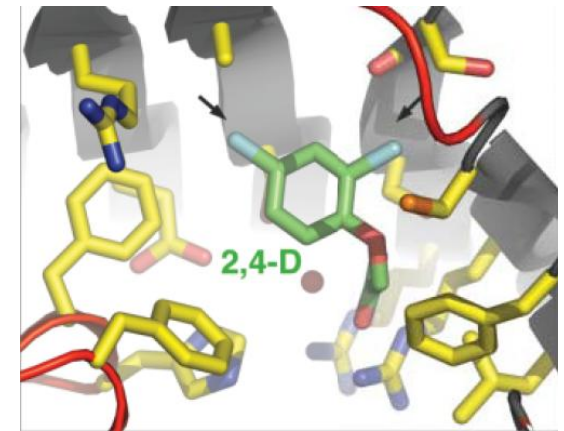
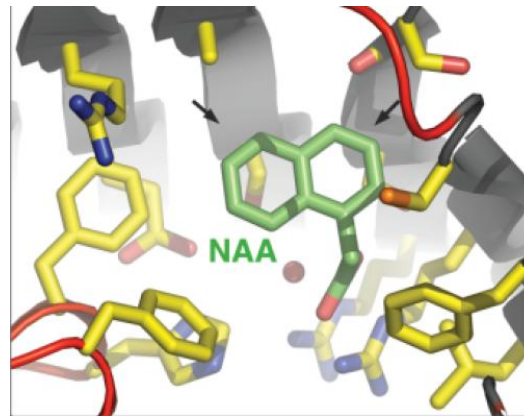
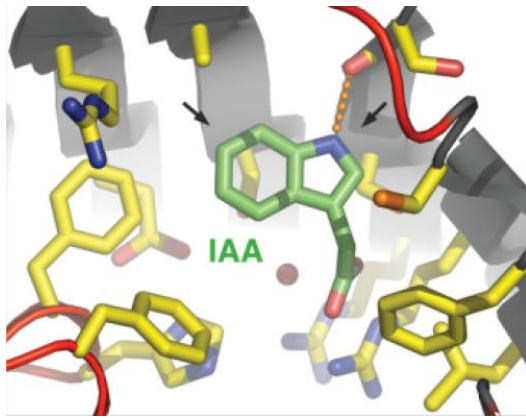
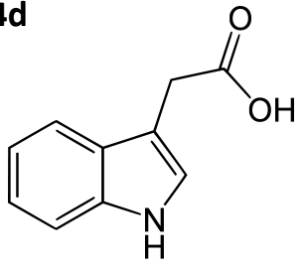
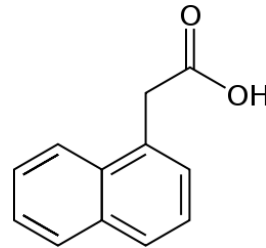


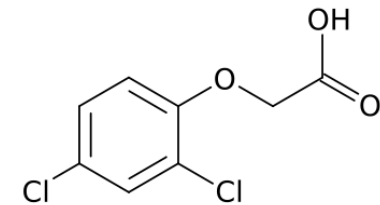
Fig. 4d



H-Brückenbindung zwischen NH aus Indolring mit Carbonylgruppe von β -Faltblatt des Rückrates von TIR1



Ringsystem etwas größer als bei IAA ansonsten analog ohne Ausbildung einer H-Brücke



durch Chloratome Vortäuschung einer Doppelringstruktur, größer als IAA und NAA, ansonsten analog zu NAA

→ Bindungstasche ist für Auxine wenig selektiv und relativ starr

TIR1-Substrat Peptid Interaktion über konserviertes GWPPV- Motiv

- Loops 2,12, 14 umgeben Öffnung der Bindungstasche
- Konserviertes zentrales Motiv GWPPV (an der Oberseite der Bindungstasche) interagiert mit Auxin

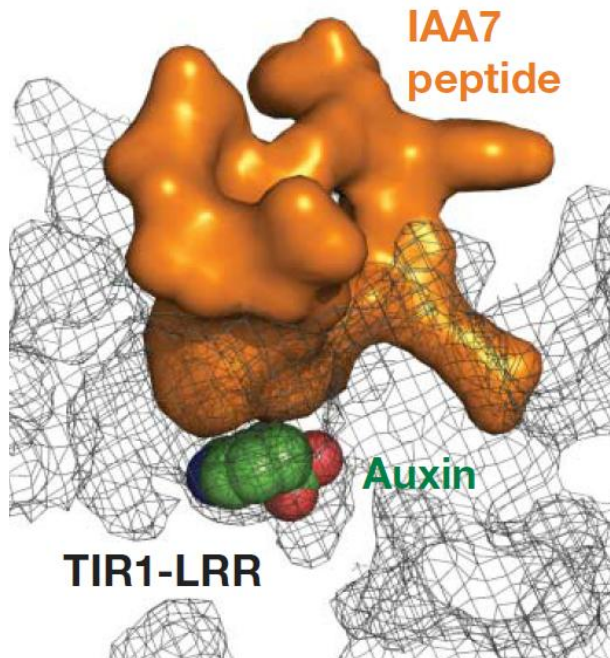


Fig. 5c

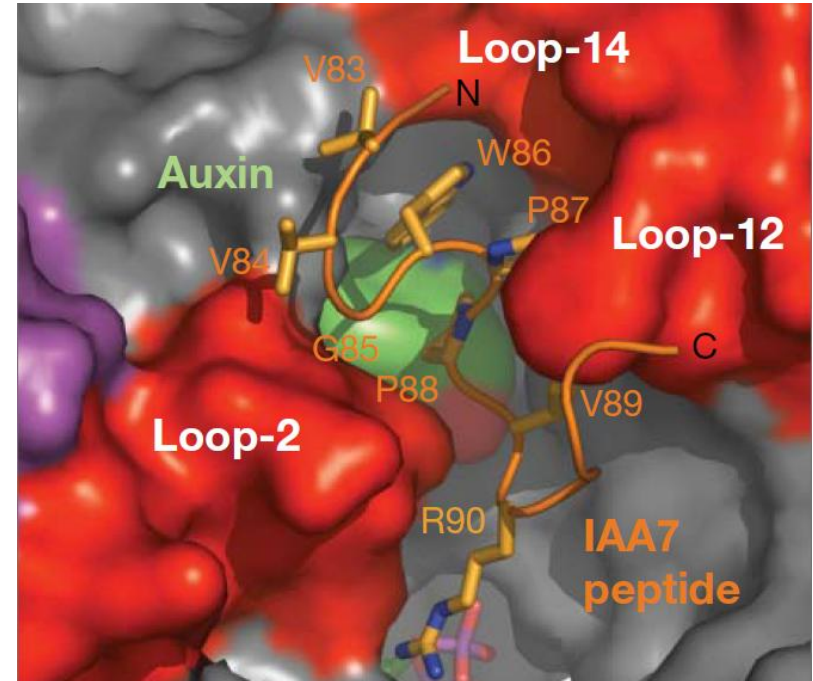
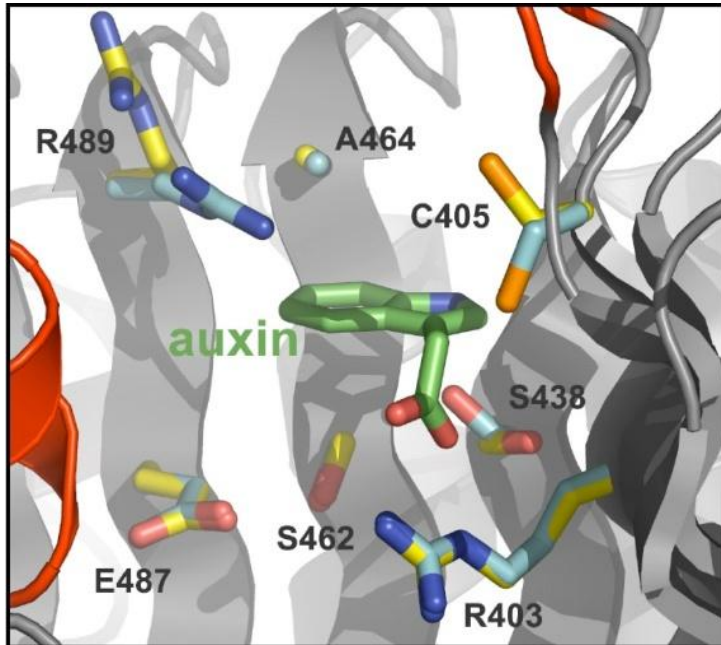


Fig. 5a

- IAA7 (Degron) deckt in gewundener Form vollständig die Öffnung der Bindungstasche ab
→ IAA7 verhindert das Auxin den Komplex vorzeitig verlässt

Mutationen in der TIR1 Bindungstasche verringern die Bildung des TIR1-IAA7 Komplexes



Sup. Fig. 5

S462E → Mutation im Taschenboden

A464E → Mutation an der Oberseite der Bindungstasche

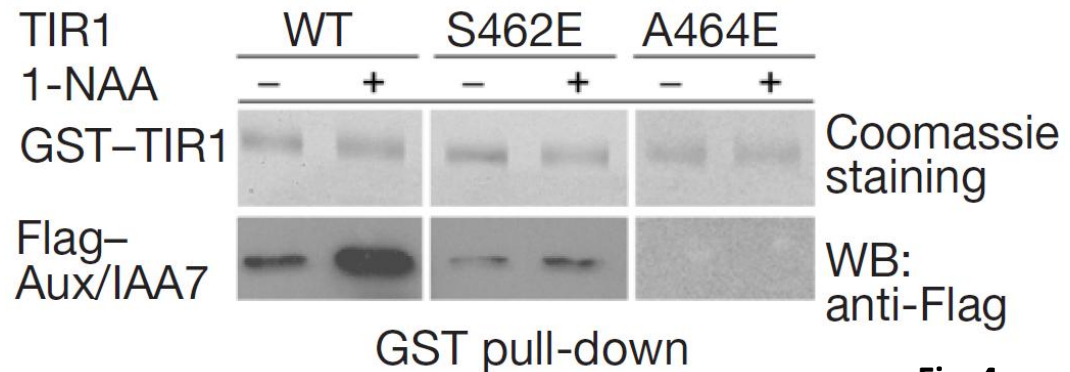


Fig. 4c

- Bei S462E bleibt eine basale Aktivität erhalten (AS für Auxinbindung nicht essentiell)
- Bei A464E verschwindet basale Aktivität komplett (AS für Auxinbindung essentiell)

Bindungsregulation von TIR1-Aux/IAA durch Auxin – Wirkung als „molecular glue“

Untersuchung verschiedener Kristallstrukturen (mit und ohne gebundene Liganden)
→ Auxin ist kein allosterischer Regulator von SCF^{TIR1} (keine Konformationsänderung)

→ Bestätigung der Hypothese, dass Auxin Substratbindeaktivität zwischen TIR1 und ASK1 bzw. Aux/IAA fördert (da Vergrößerung der Wirkoberfläche)

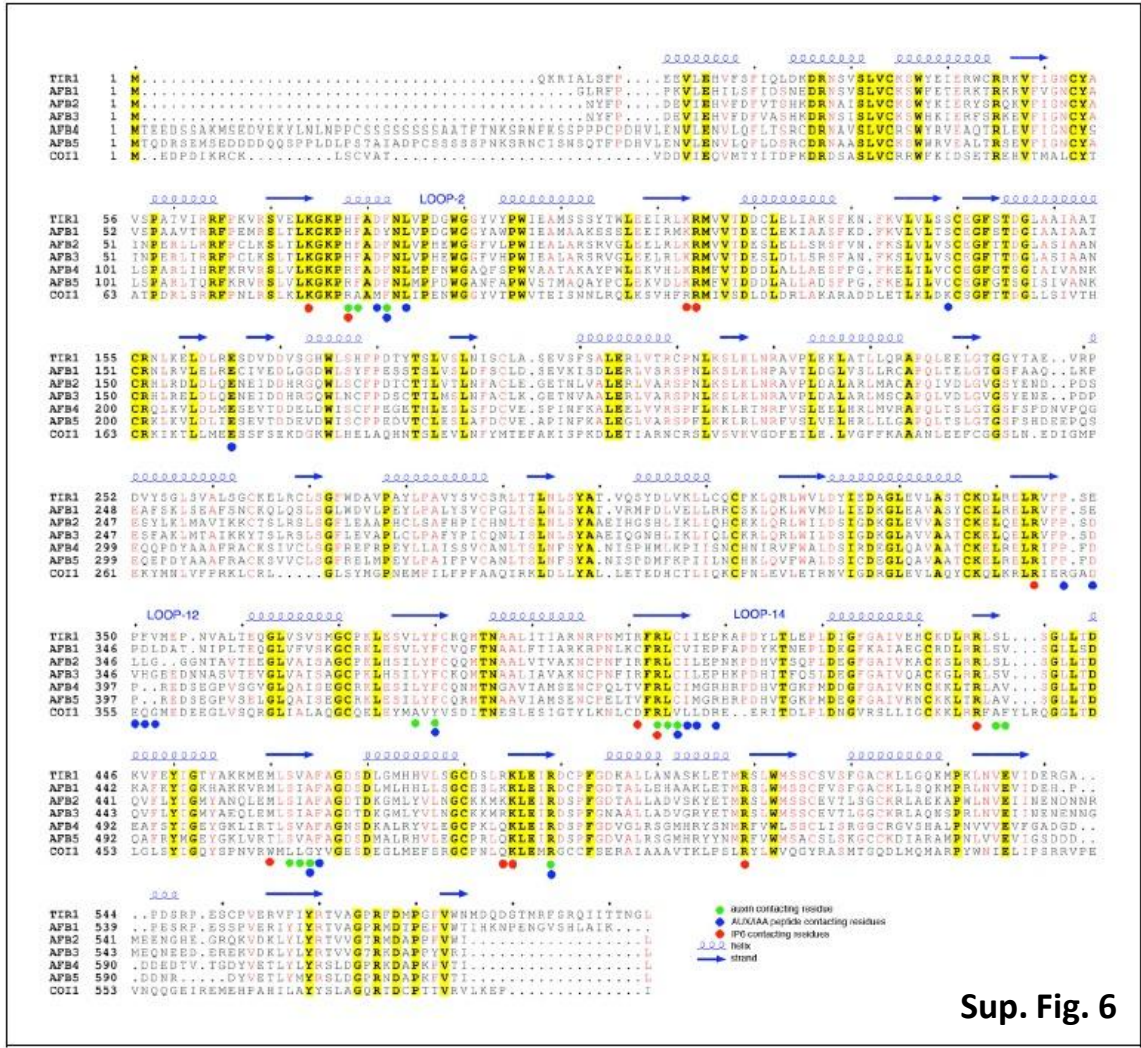


Fig. 6

→ Auxin als „molecular glue“ ermöglicht die Interaktion mit Aux/IAA und TIR1

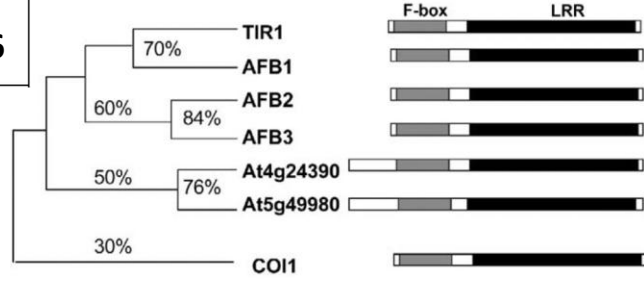
Zusammenfassung

Es gibt insgesamt 6 Auxin Rezeptoren (TIR1 und AFB1-5)

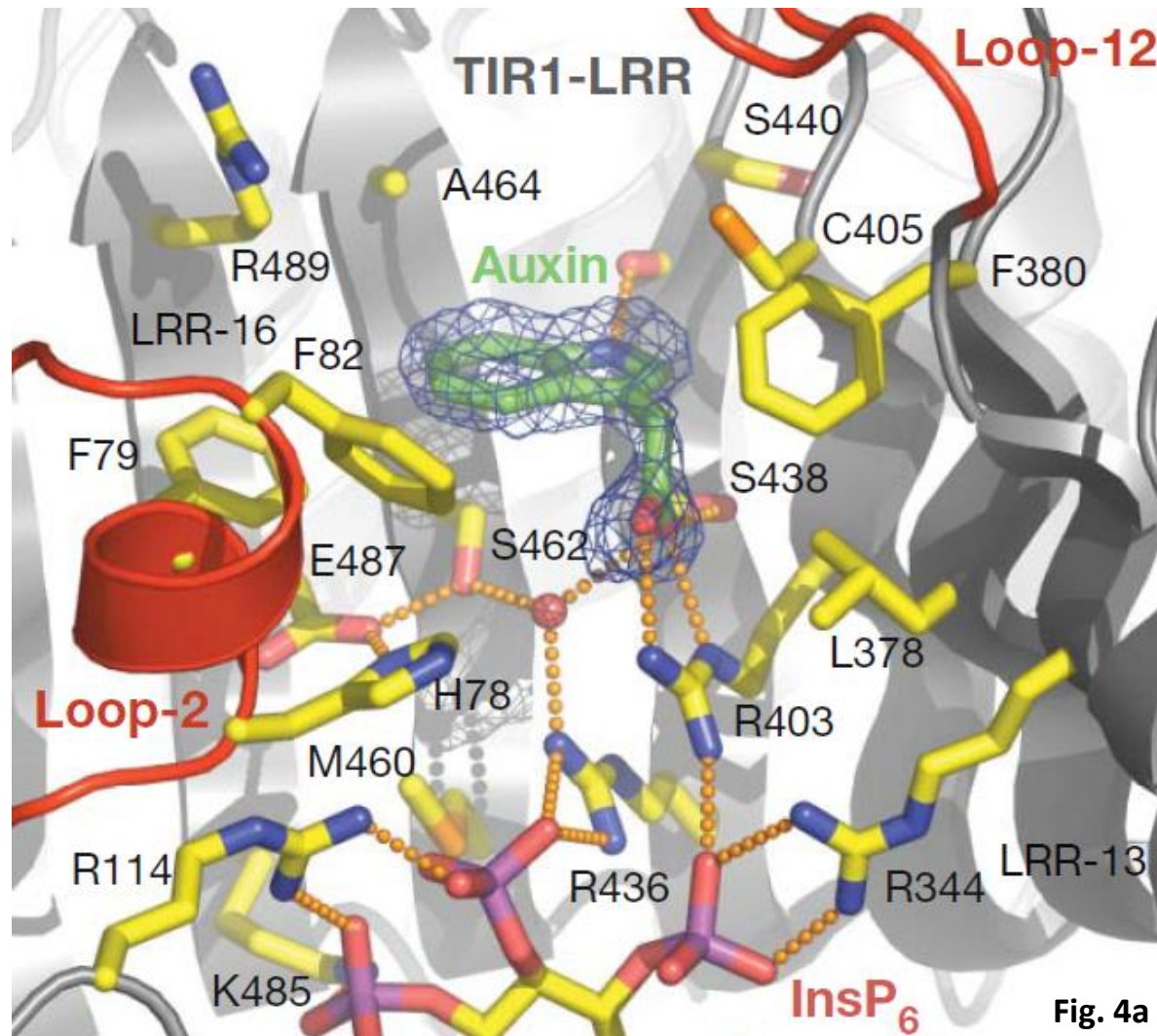


Sup. Fig. 6

Dharmasiri et al. (2005)



Auxinbindungstasche im TIR1-LRR (unbeweglich) lokalisiert



Verschiedene Auxine können über hydrophobe u.a. Wechselwirkungen in der Bindungstasche (teilweise aus hochkonservierter AS-Sequenz bestehend) assoziieren

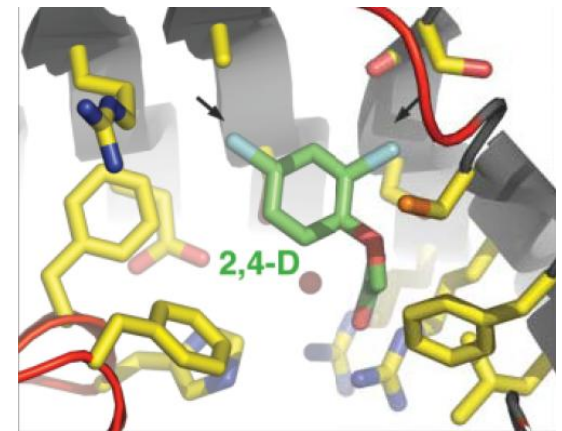
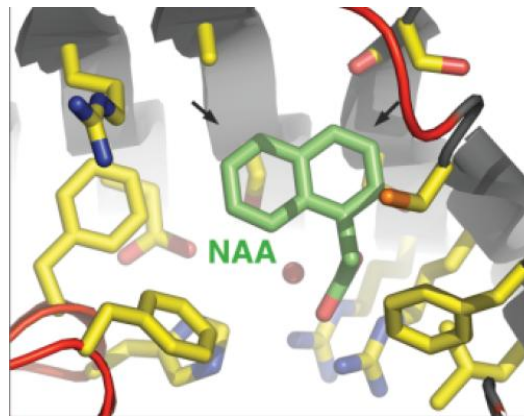
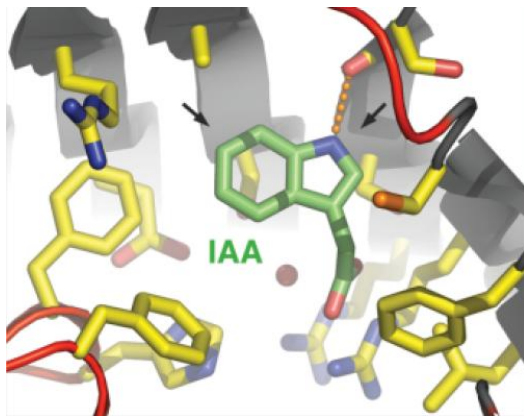


Fig. 4d

Auxin fungiert als „molecular glue“ zwischen TIR1 und Aux/ IAA
→ aktiver Komplex

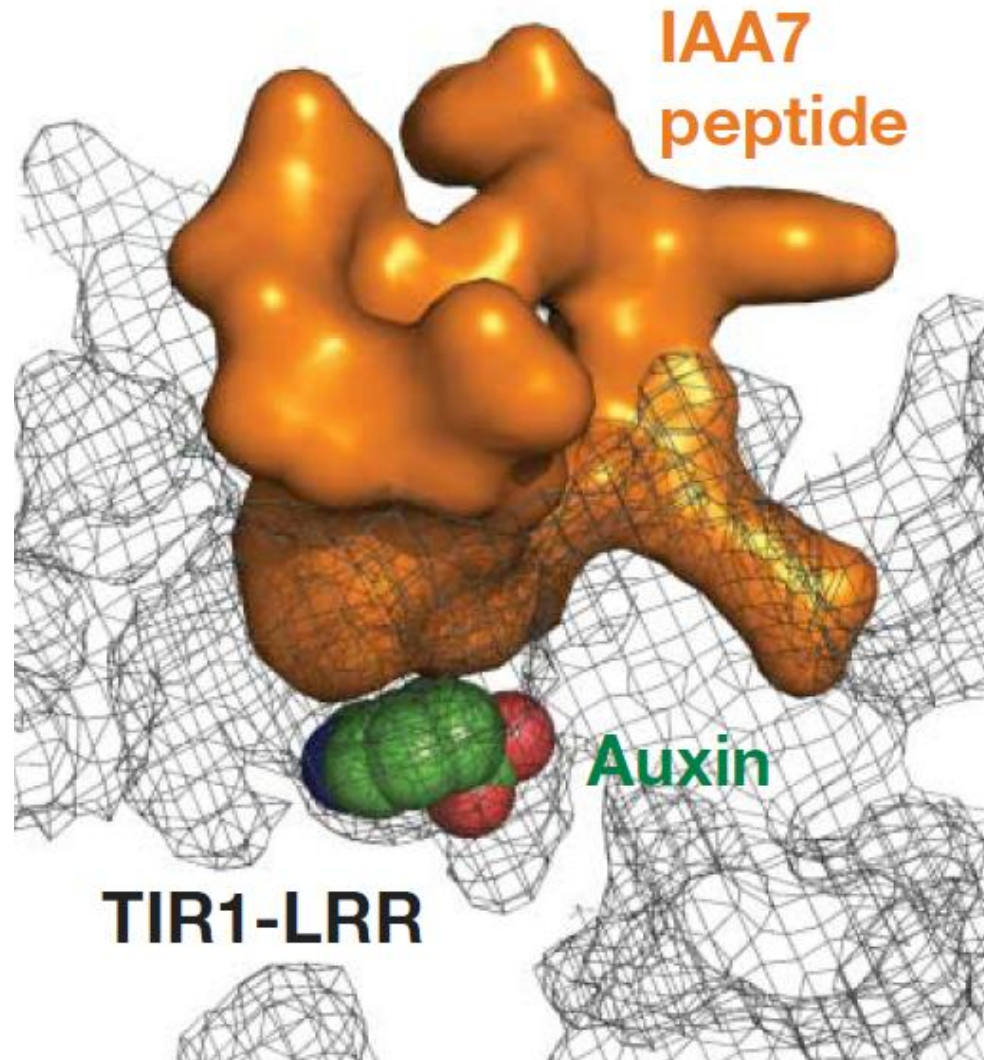


Fig. 5c

InsP₆ sehr wahrscheinlich Co-Faktor

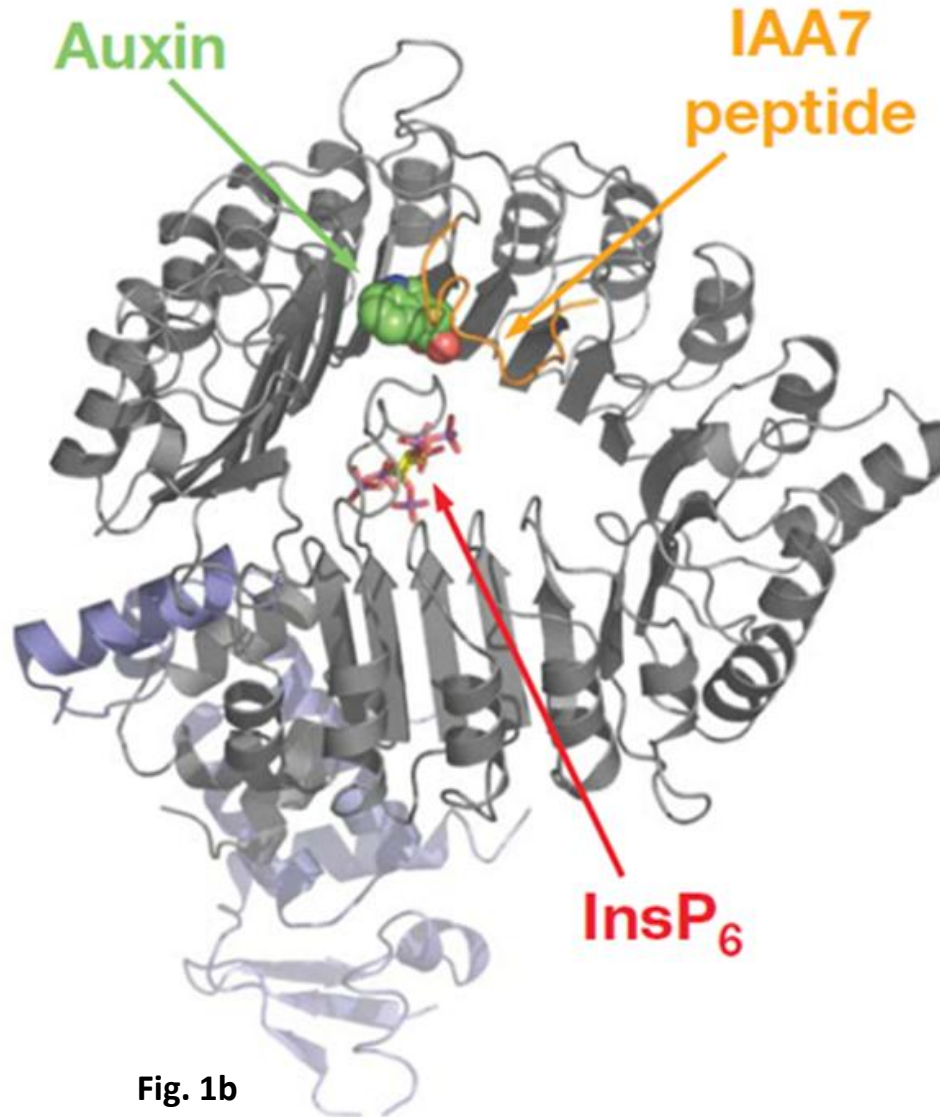
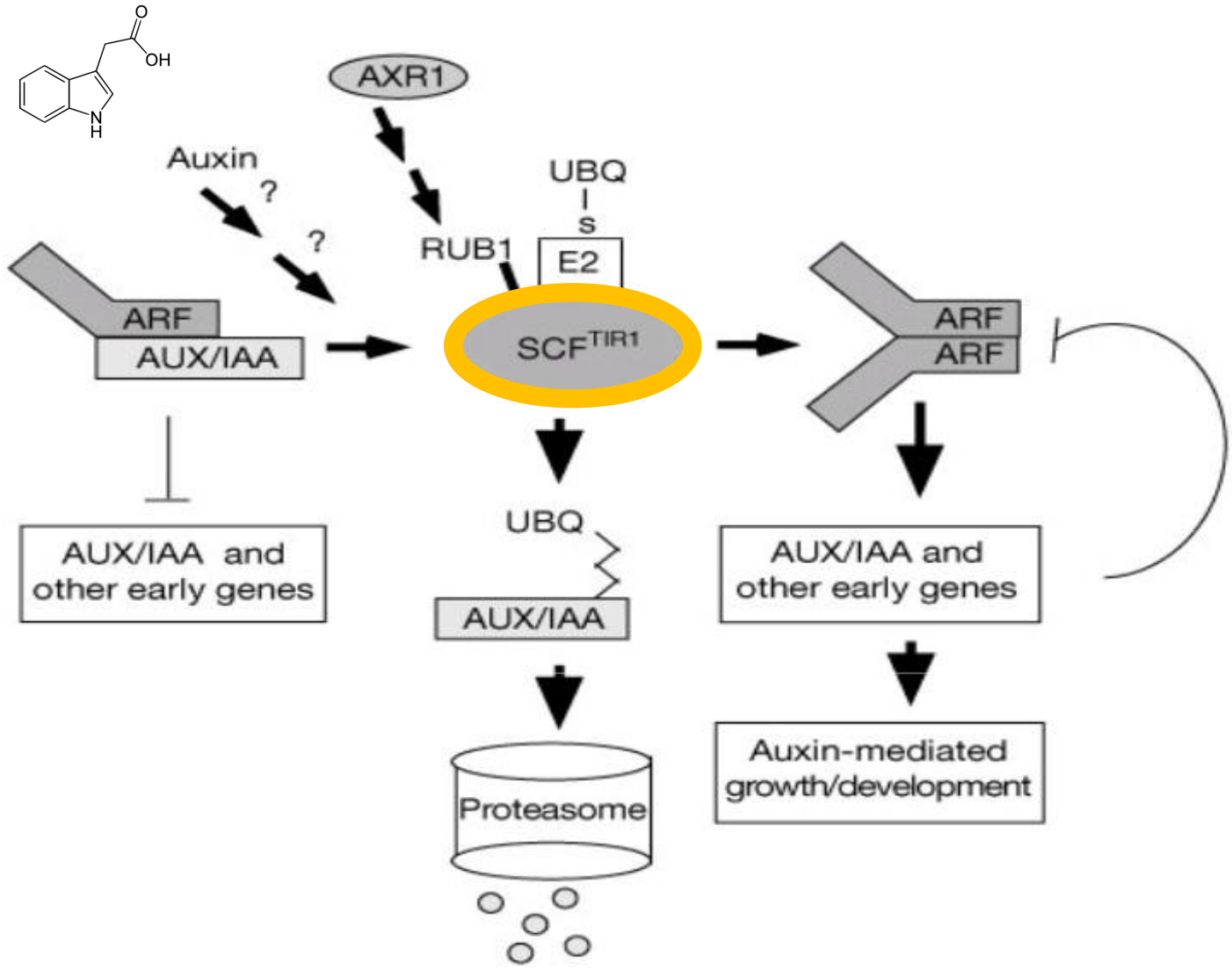
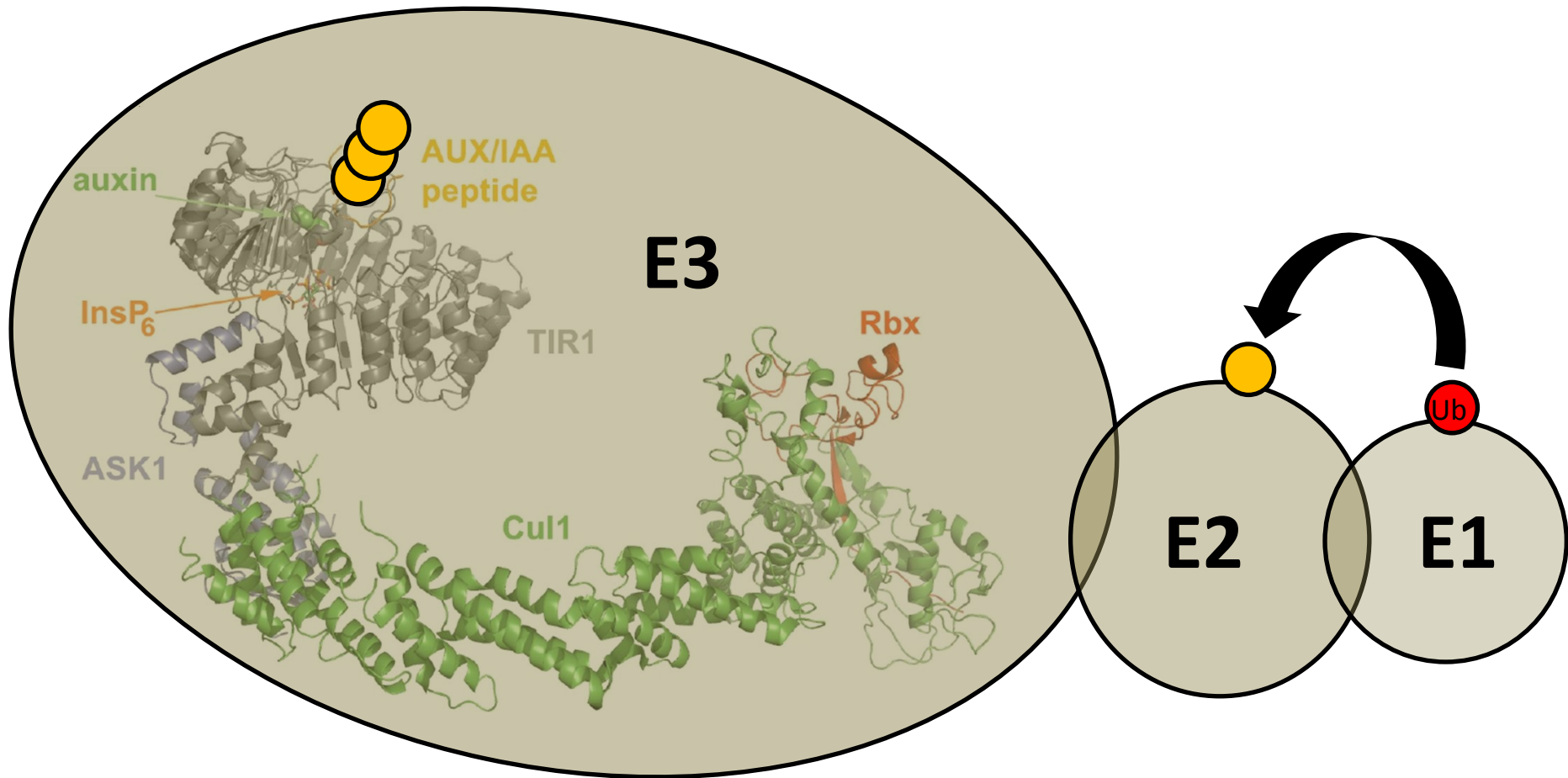


Fig. 1b

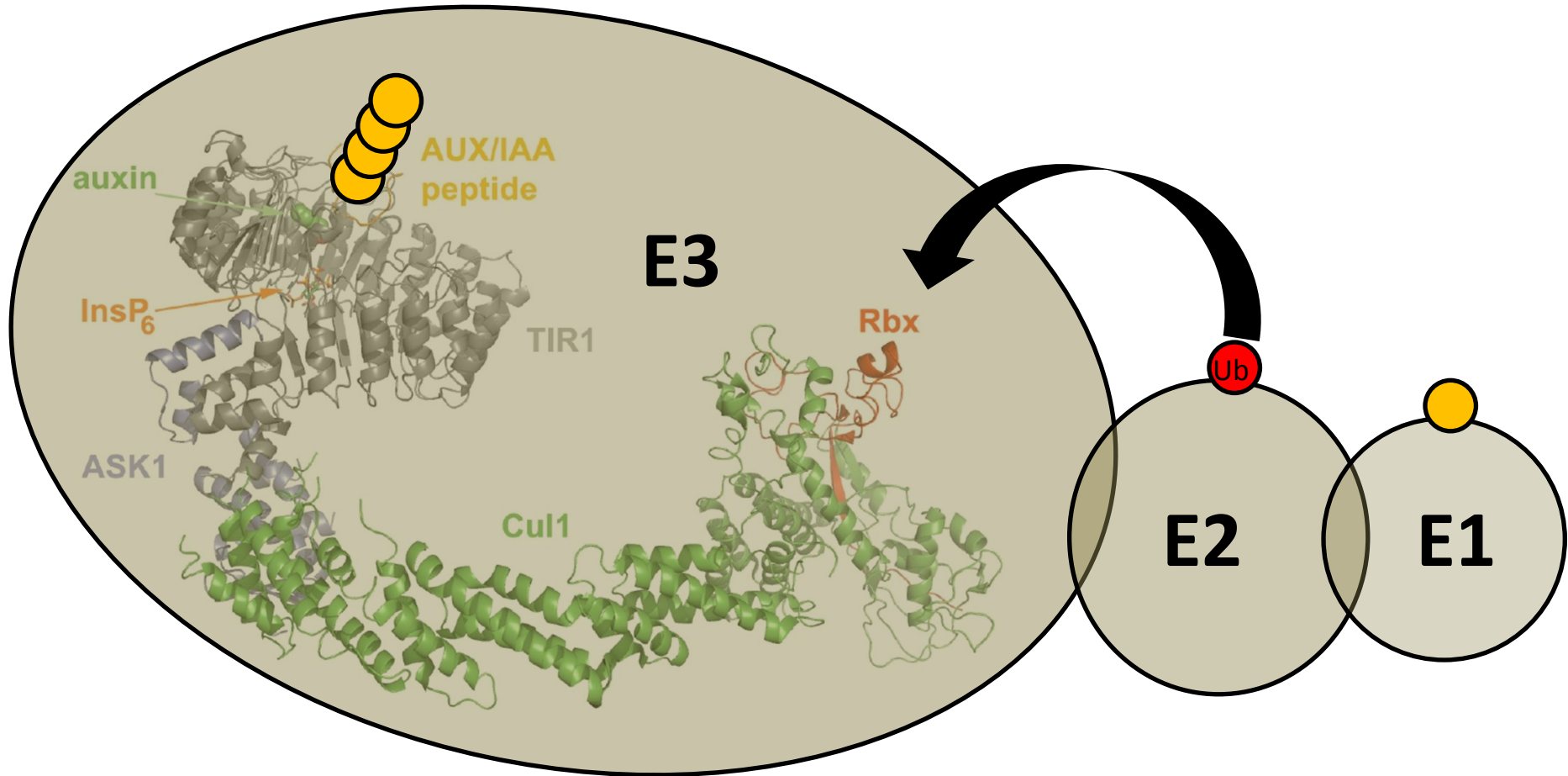
Durch Entdeckung dieses neuen Wirkmechanismus (Protein-Protein Interaktion vermittelt durch kleine Signalmoleküle) ist eine pharmakologische Anwendung denkbar



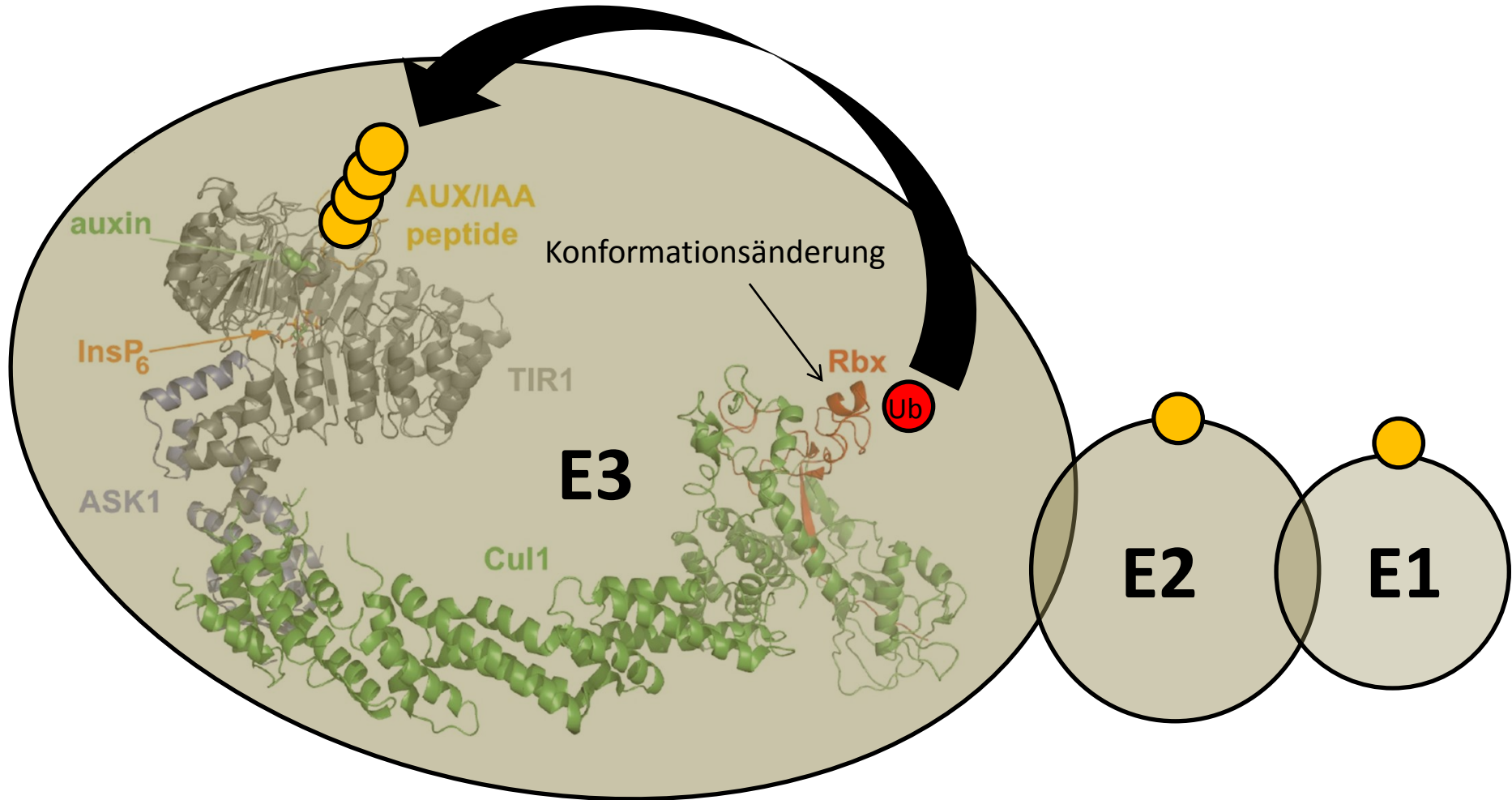
Ubiquitin-Ligase Komplex



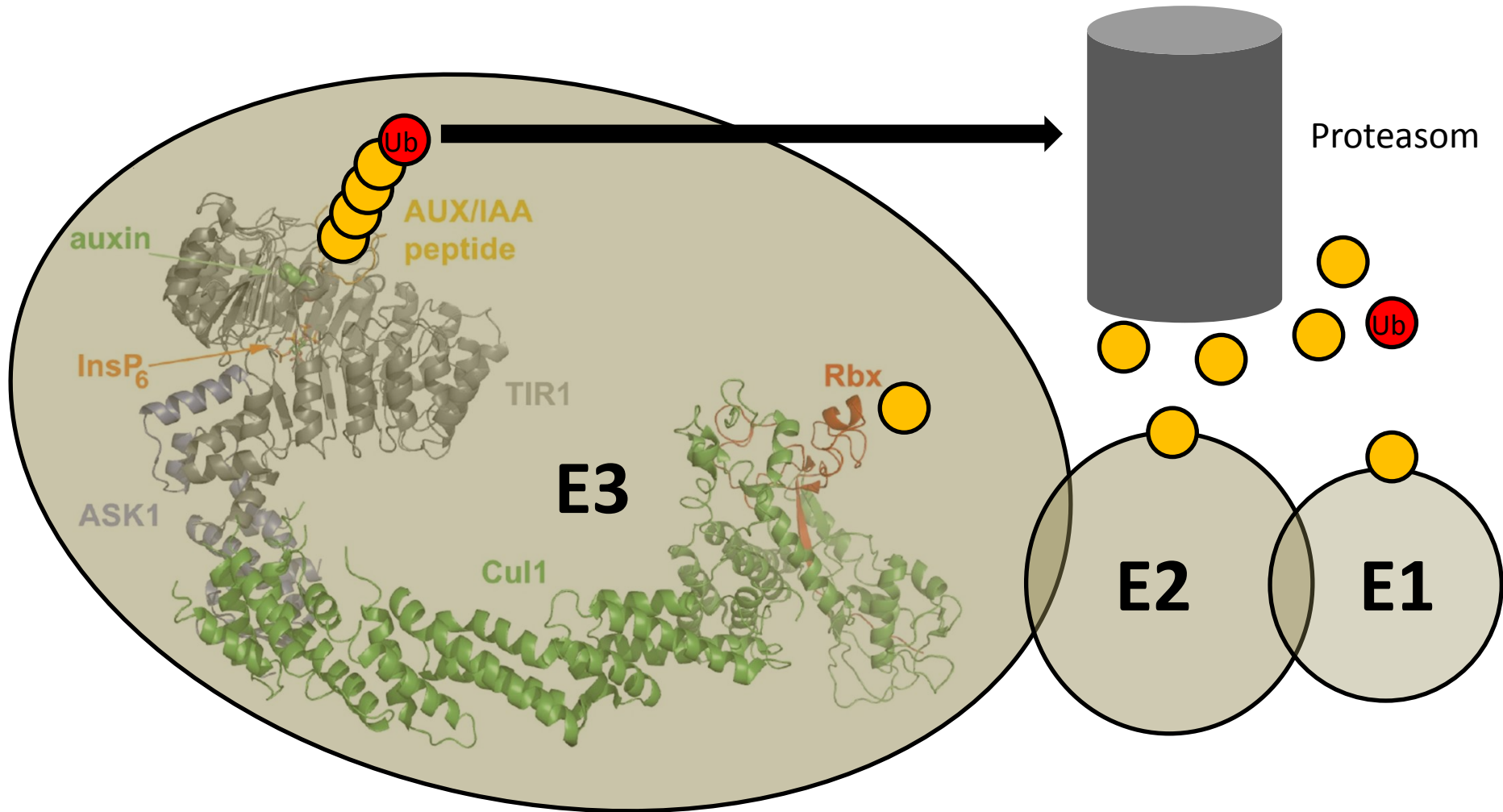
Ubiquitin-Ligase Komplex



Ubiquitin-Ligase Komplex

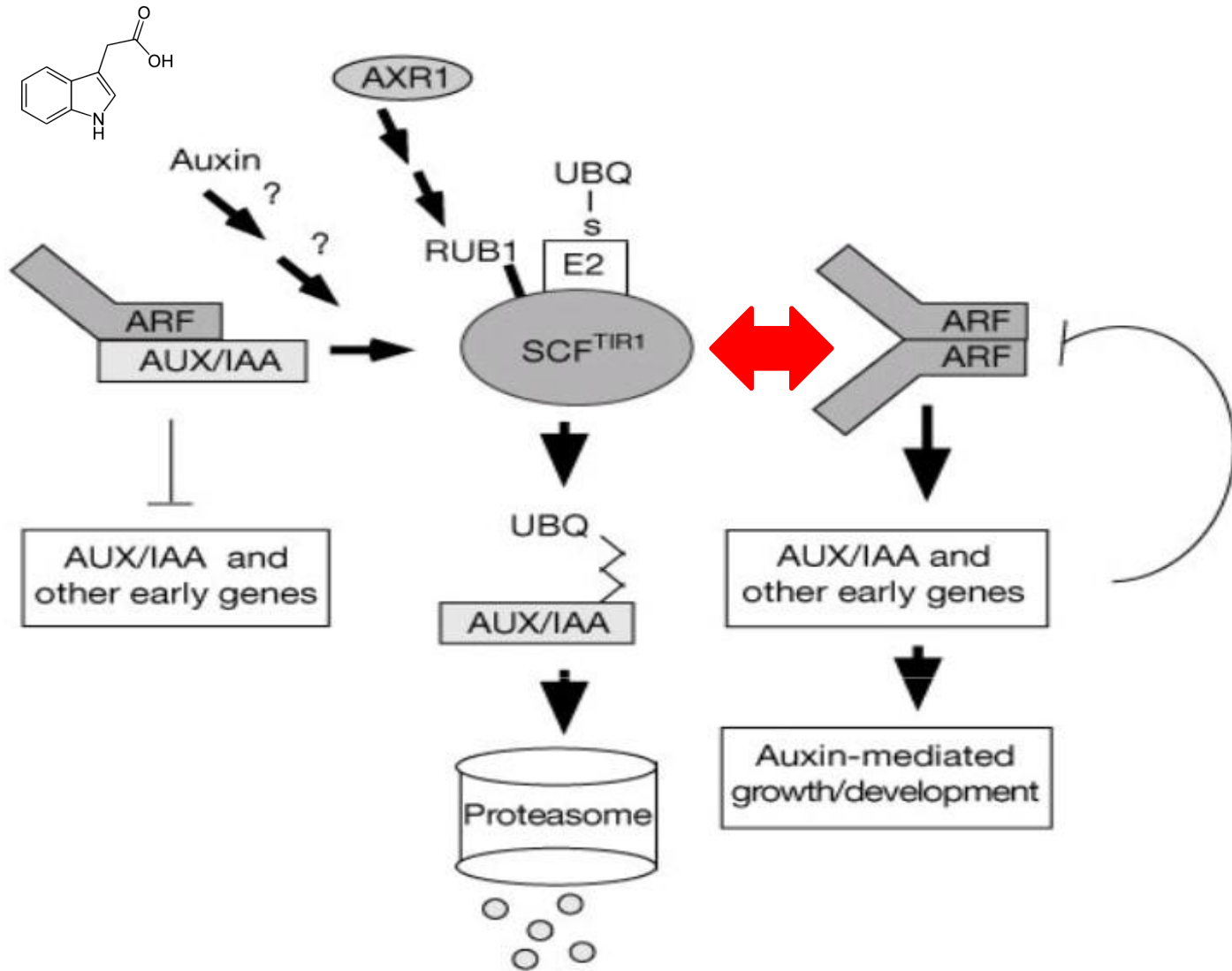


Ubiquitin-Ligase Komplex

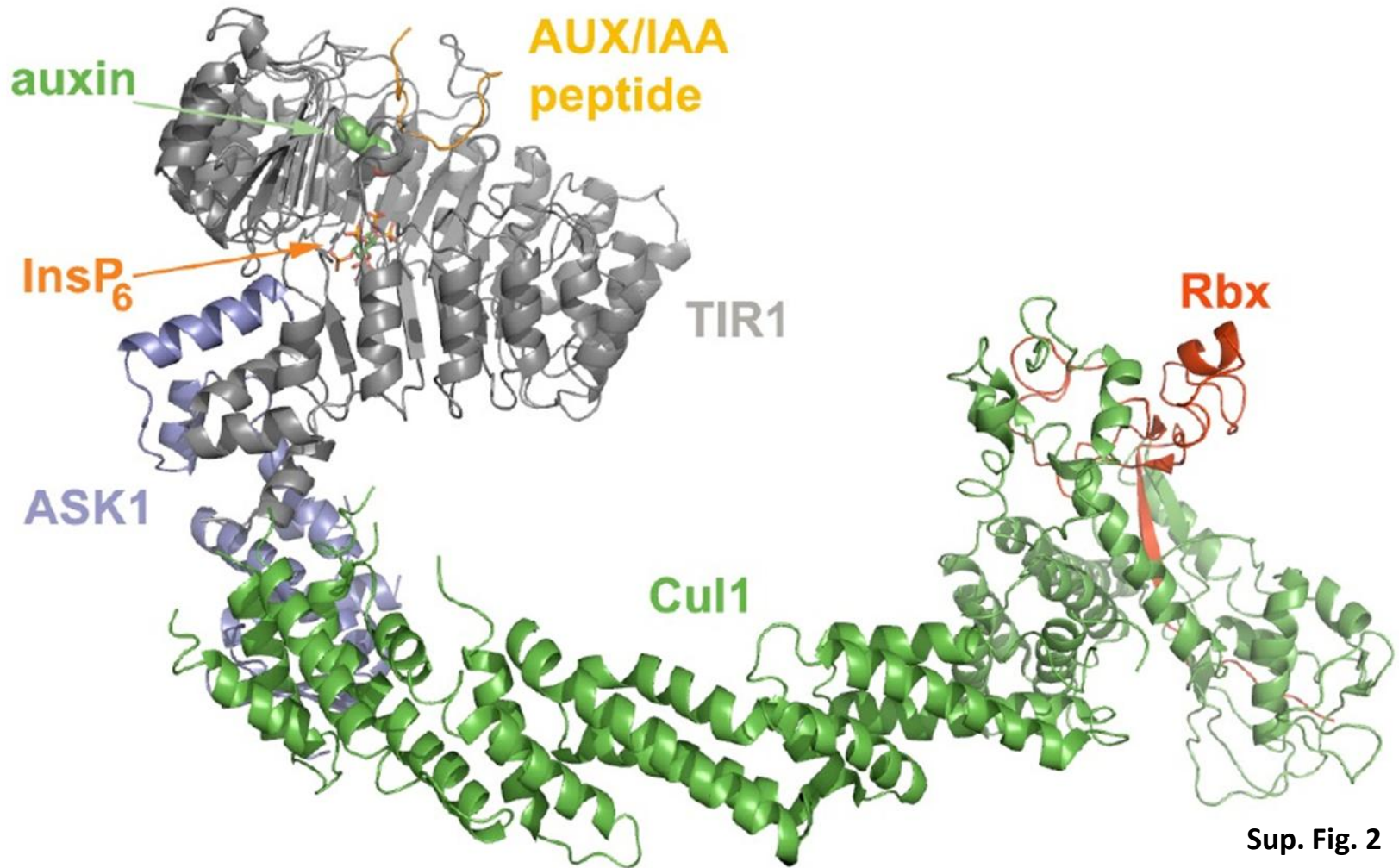


Welche Fragen sind noch ungeklärt?

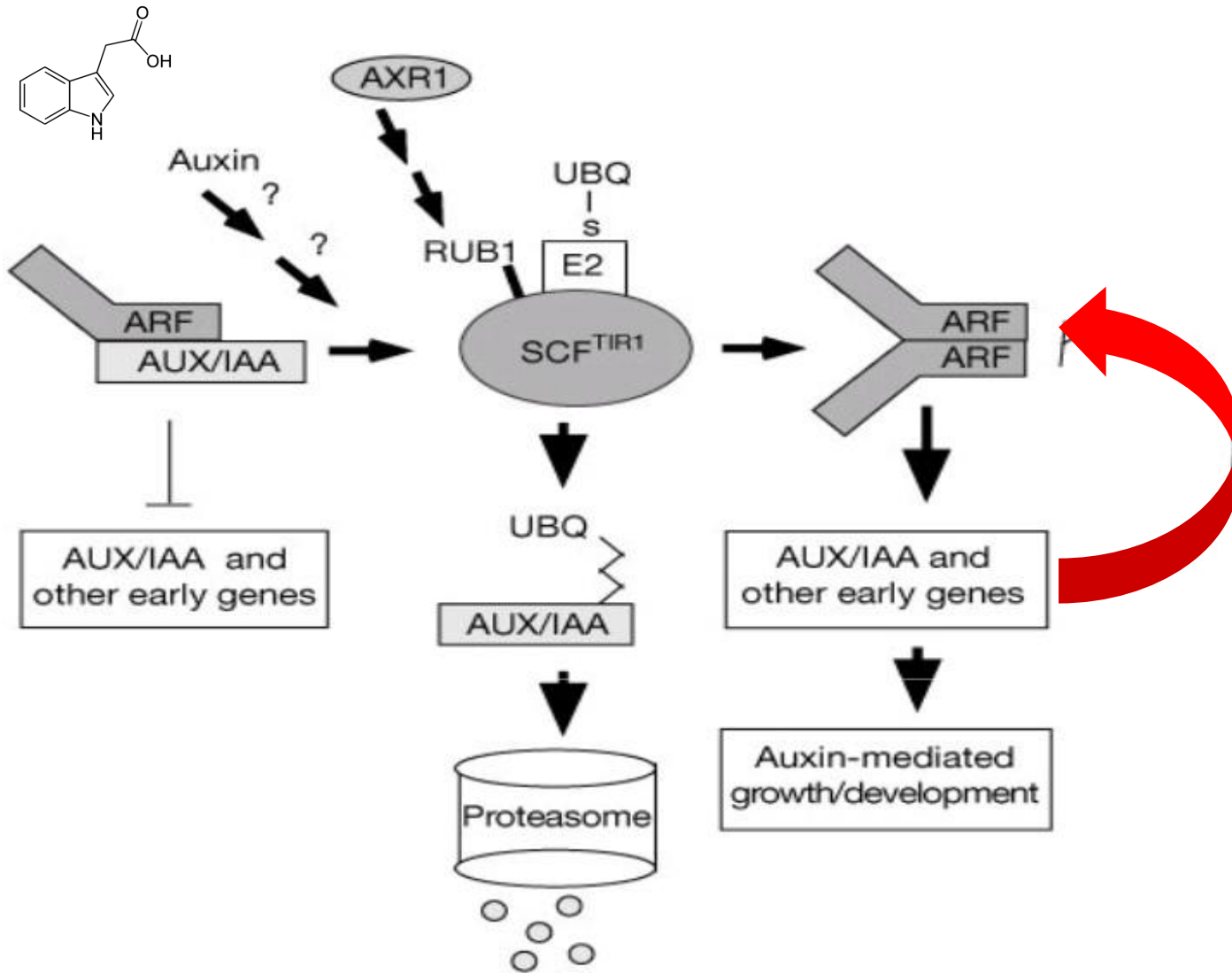
Mechanismus der Genregulation über ARFs?



Warum gibt es 29 Aux/ IAA s und 23 ARFs und 6 verschiedenen Rezeptoren?
(TIR1 und AFB1-5 → Welche Rolle spielt ihre Redundanz?)



Warum wirkt IAA ab einer bestimmten Konzentration hemmend auf das Pflanzenwachstum? (Mechanismus des Umschaltens)



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

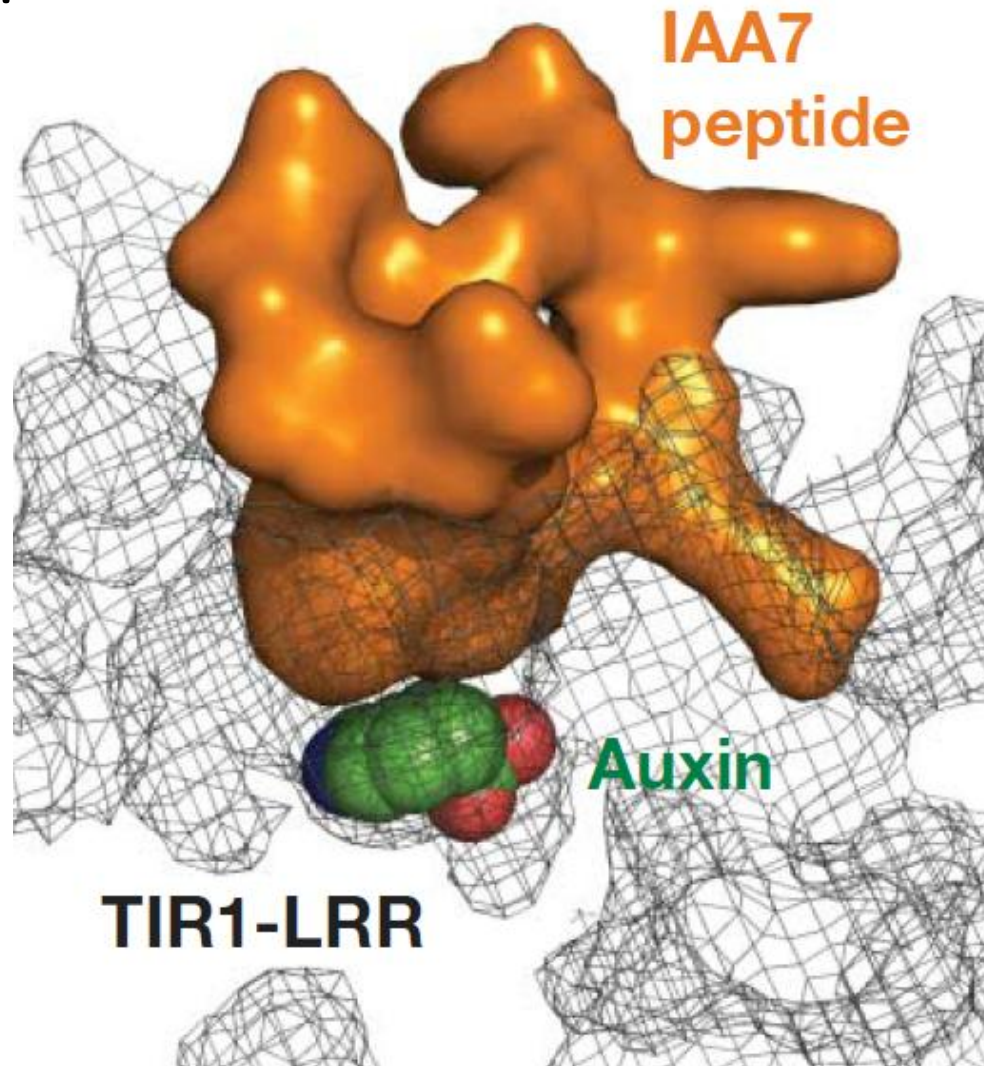


Fig. 5c

Wie stark sind die Auxin-Aux/IAA, TIR1-Auxin, TIR1-Aux/IAA Bindungsstärken?

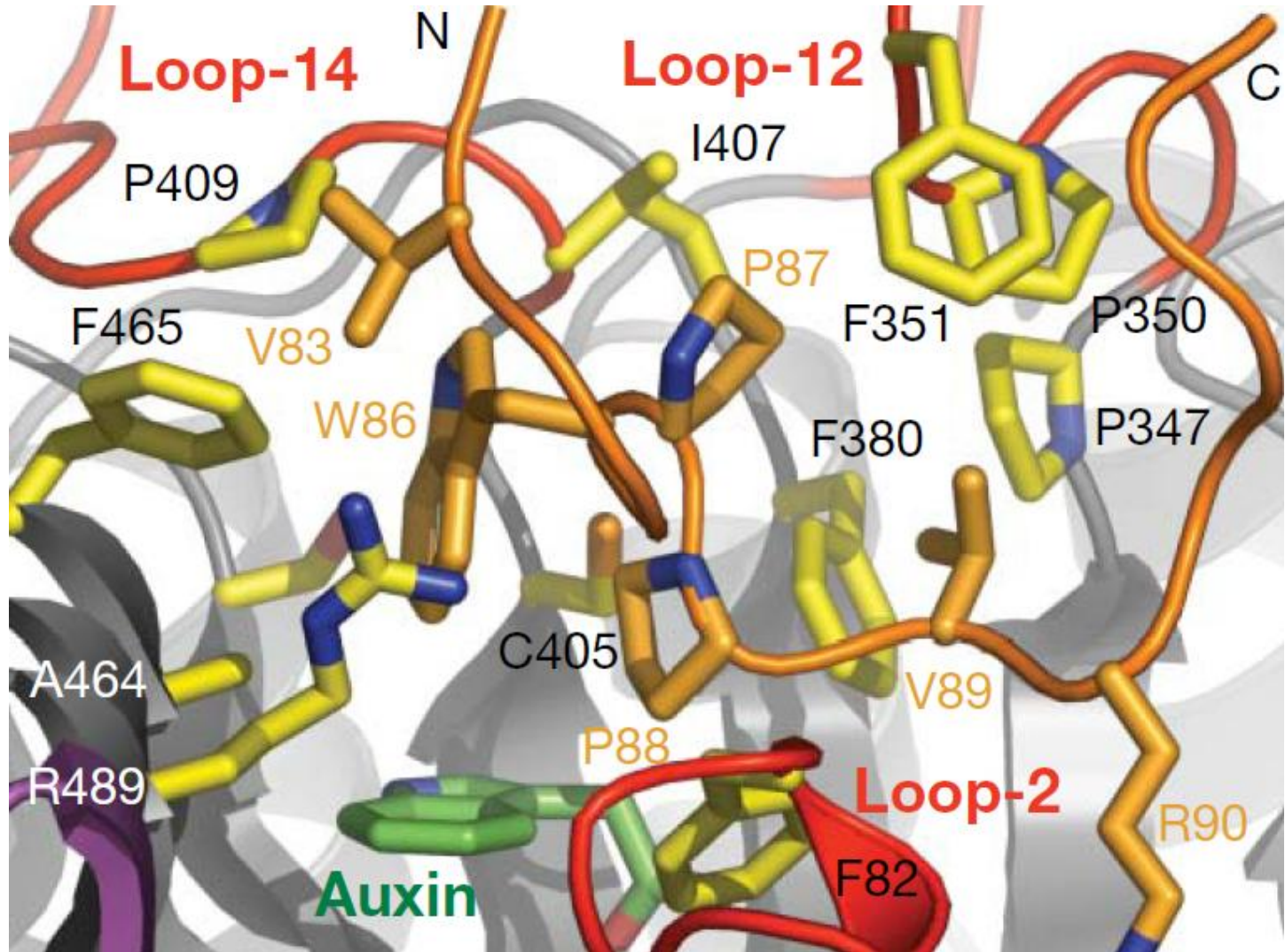


Fig. 5b

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

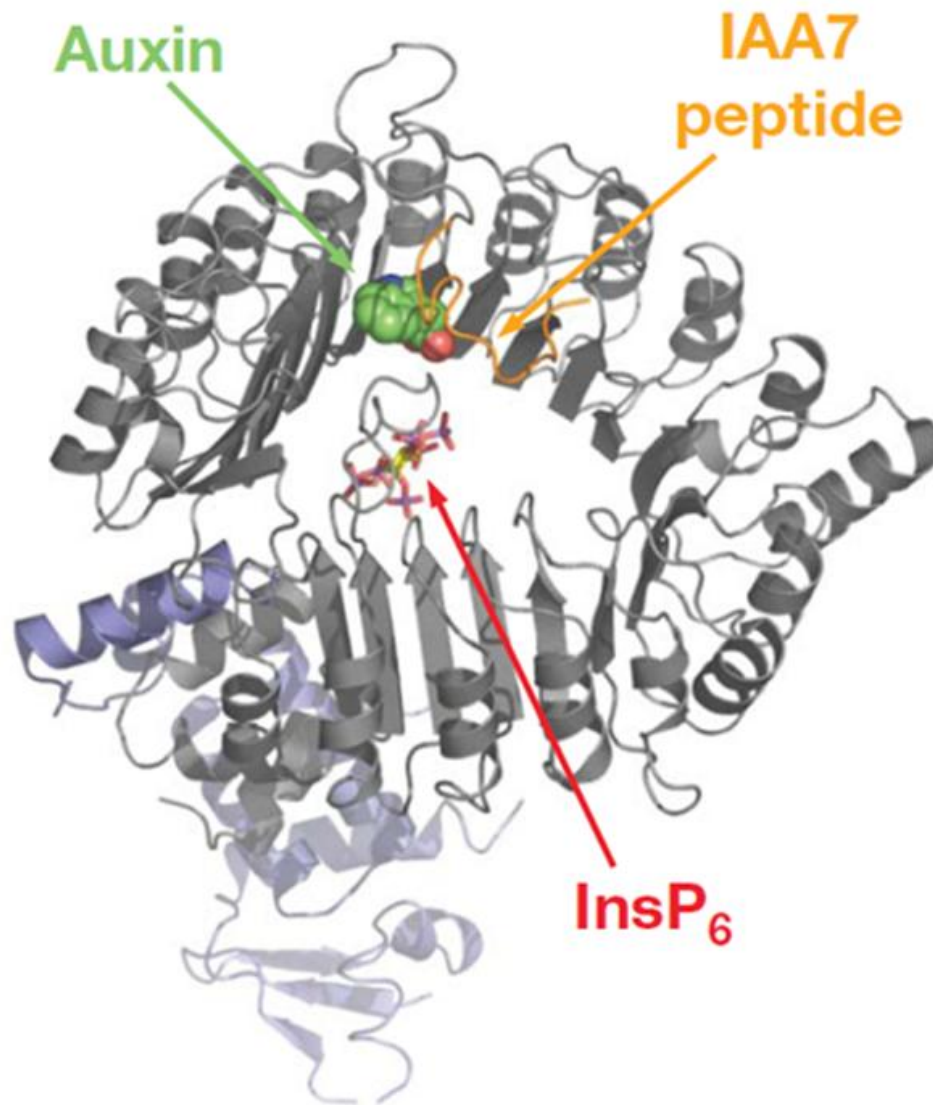
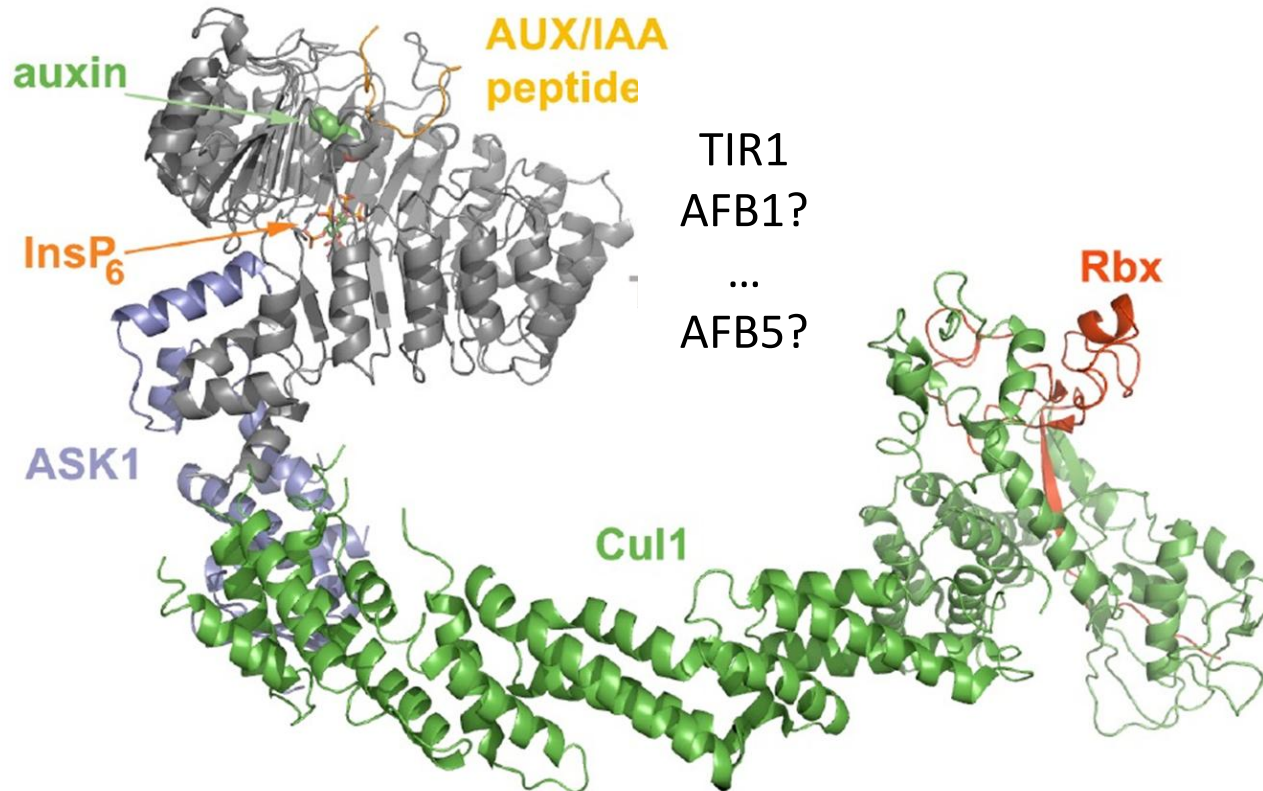


Fig. 1b

Ist das Modell universell für andere Aux/IAA-Rezeptor-Interaktionen anwendbar?



Sup. Fig. 2

Vielen Dank für eure Aufmerksamkeit!