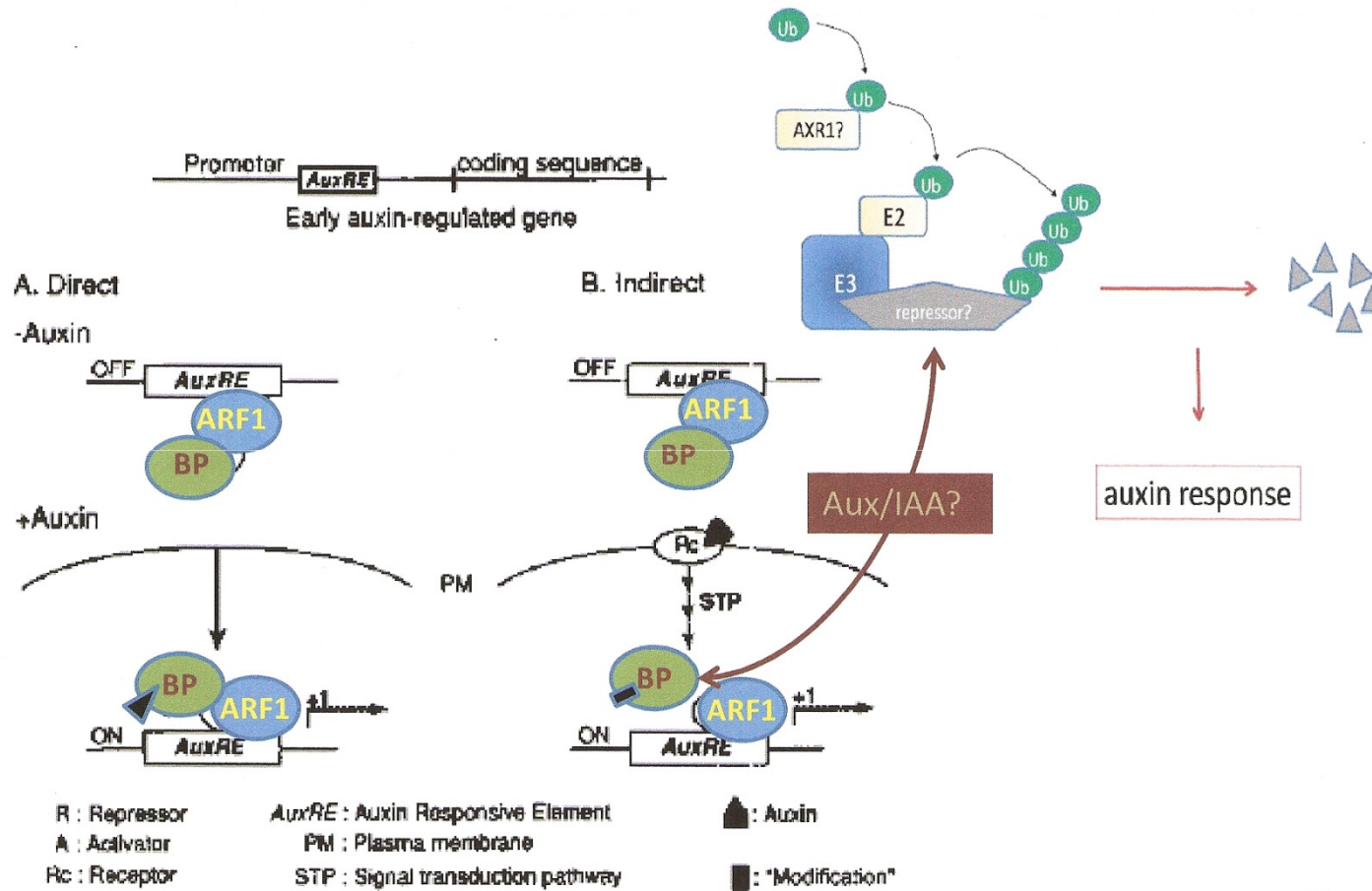


Hypothetische Modelle



Heutiges Paper

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

- **Vorgehensweise:**
- Screening nach neuen Mutanten mit neuen Phänotyp
- Neuer Phänotyp: CPD, NPA- Resistenz
(CPD, NPA: Wachstumshemmung durch Inhibierung des Auxin-Transport in der Wurzel)

Charakterisierung der *tir1* Mutanten

- Durch Screening mittels CPD 16 Mutanten mit gleichem Phänotyp erhalten
- Komplementationsanalyse:
5 Mutanten haben verschiedene Allele des selben Gens (*TIR1*)
- *tir1* = transport inhibitor response 1

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		
14			
13			
12		1	
11		6	
10		6	
9		7	6
8		3	4
7		2	4
6			
5			
4		1	
3		1	
Totals	8	27	14

¹Genotype determined by analyzing CPD resistance in F₃ plants.

²Number of seedlings.

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

Charakterisierung der *tir1* Mutanten

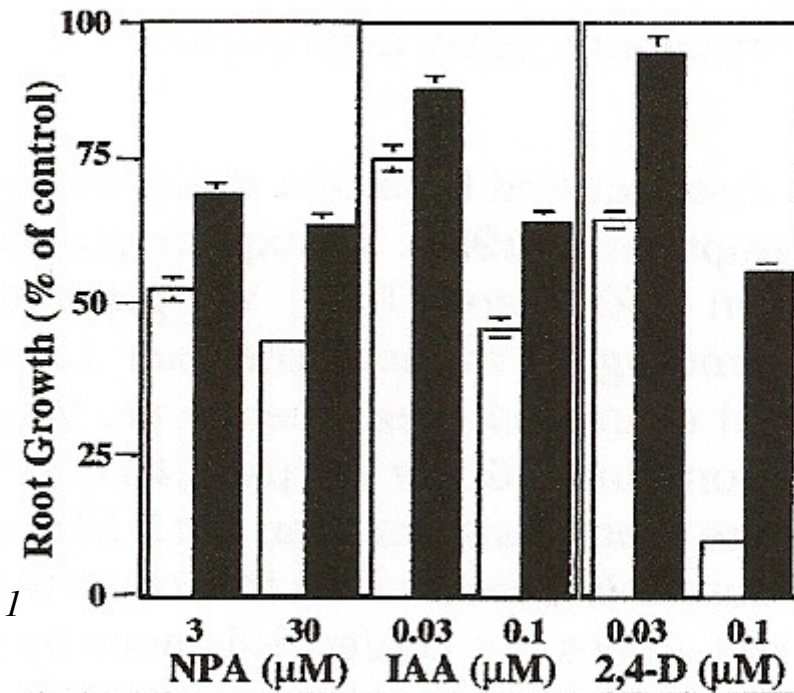
- **Ergebnisse:**
- Partielle Dominanz (Semidominanz)
- CPD inhibiert Transport oder Signal

transport vs. signaling effect

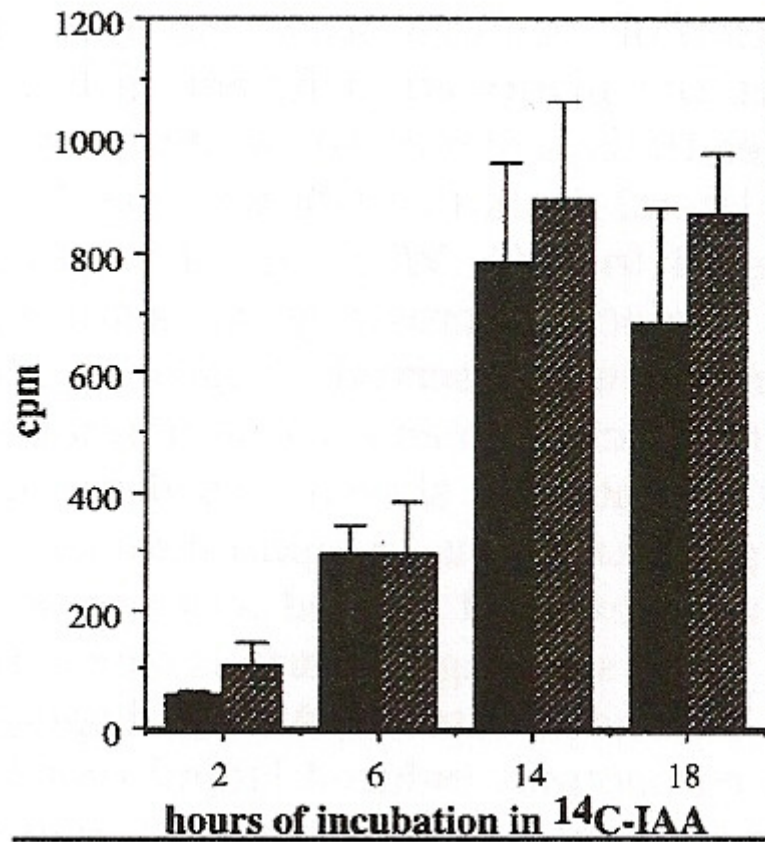
- **Ziel:**
- Ausschluss von spezifischen Reaktionen mit CPD
- Ist die Wachstumsinhibierung signalbedingt oder transportbedingt?

weißer Balken: WT

schwarze Balken: *tir1-1*



polar IAA transport



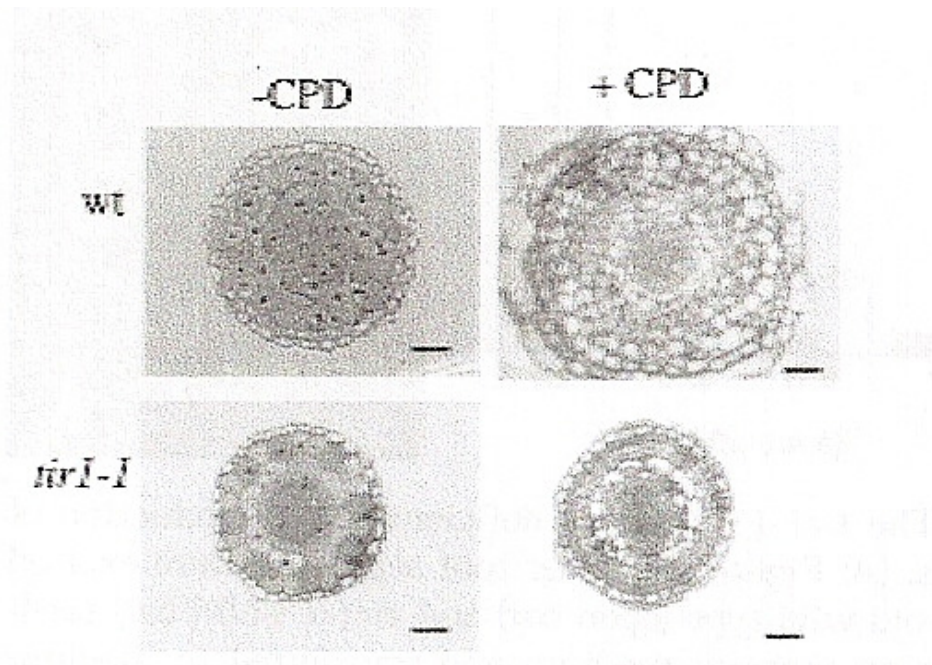
schwarze Balken: WT

gepunktete Balken: *tir1-1*

Ergebnis: kein Transporteffekt

Zellproliferation

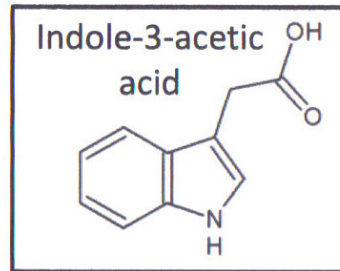
Neues phänotypisches Merkmal: Schwellung



- **Ergebnisse:**
- *tir1-1* hat keine Auxinwahrnehmung mehr
- CPD wirkt wachstumsreduzierend auf die Wurzel

IAA induziert laterale Wurzel- Bildung

Auxin regulates plant development

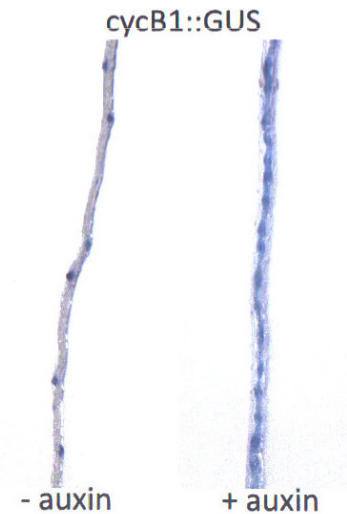


Embryonic patterning

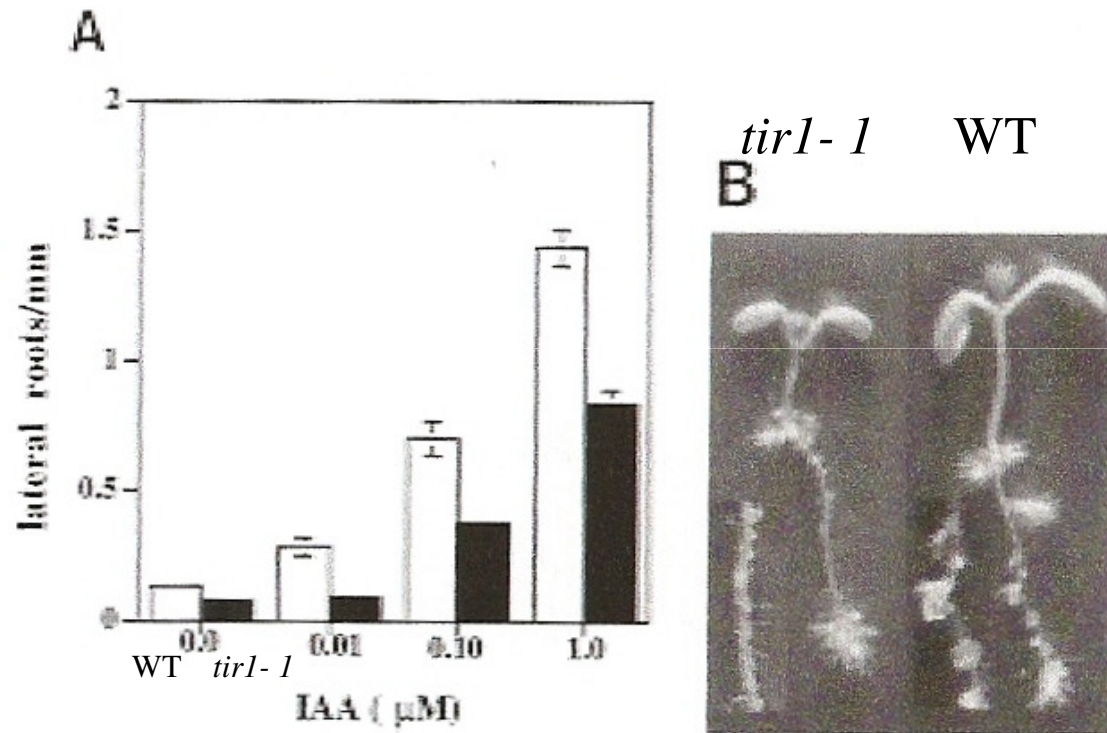
Growth & Apical dominance

➔ Root development

Tropic growth responses



TIR1 Gen ist involviert in der lateralen Wurzel- Bildung



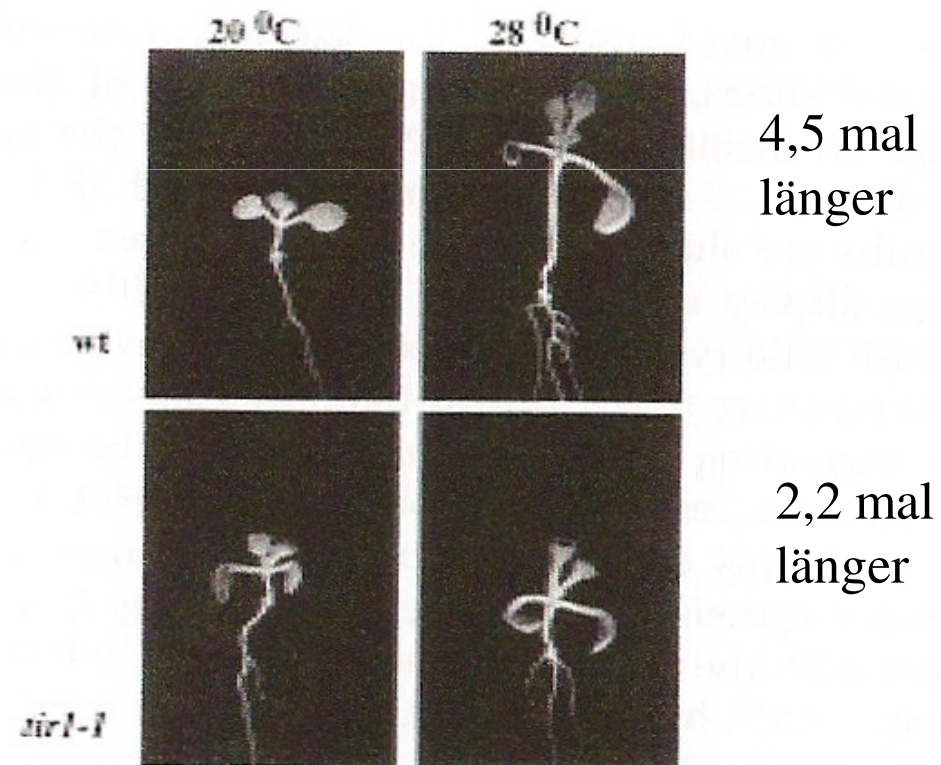
kleiner, aber feiner Fehler im Paper

TIR1 Gen ist involviert in der lateralen Wurzel- Bildung

- **Ergebnisse:**
- Auxin fördert die Ausbildung von lateralen Wurzeln
- *tir1* Mutanten nicht komplett Auxin „blind“ (reagieren auf Auxinkonzentration)
- *tir1* Mutante hat wenig laterale Wurzeln

Zell- Elongation

- **Test:** temperaturabhängiges Wachstum des Hyperkotyls von WT und *tir1-1*
- (Primäre Auxinabhängigkeit, Giberellin und Ethylen haben in der Regel keine Auswirkung)

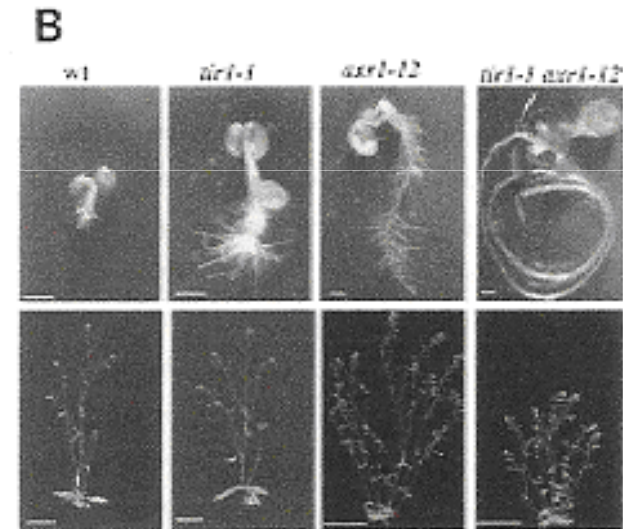
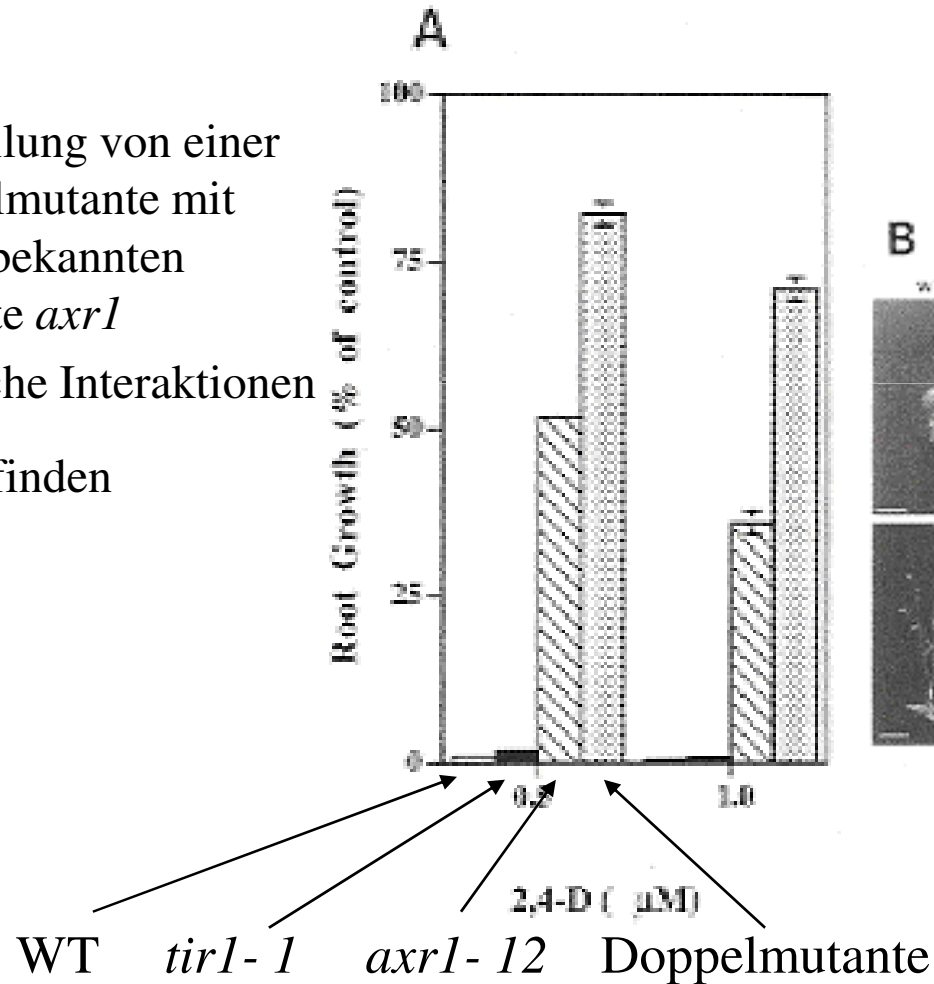


Zell- Elongation

- **Ergebnisse:**
- Wildtyp hat bei 28°C 4,5 mal längeres Hyperkotyl als bei 20 °C
- *tir1- 1* hat bei 28 °C nur 2,2 mal längeres Hyperkotyl
- Weitere Bestätigung, das *tir1* eine Störung im Auxinsignaling hat

tir1 und *axr1* haben eine synergistische Interaktion

- **Ziel:**
- Herstellung von einer Doppelmutante mit schon bekannten Mutante *axr1*
- Mögliche Interaktionen herausfinden



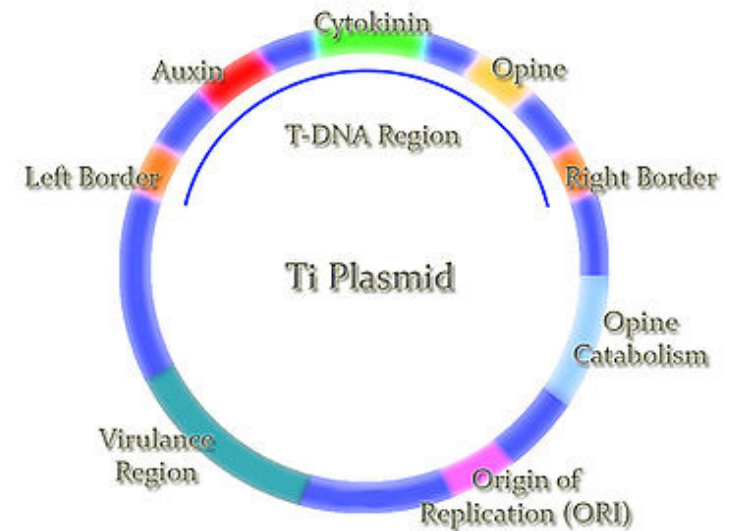
tir1 und *axr1* haben eine synergistische Interaktion

- **Ergebnisse:**
- Die Doppelmutante mit *axr1- 12* und *tir1- 1* ist sehr resistent gegen die hohe Konzentration von 2,4- D
- die Doppelmutantenwurzel ist länger als *tir1- 1* allein
- Phänotyp im Habitus (laterale Wurzeln, buschig)
- Schlussfolgerung: *tir1* und *axr1* interagieren synergistisch miteinander (evtl. im selben pathway)

Isolierung des *TIR1* Gens mittels T- DNA Insertion

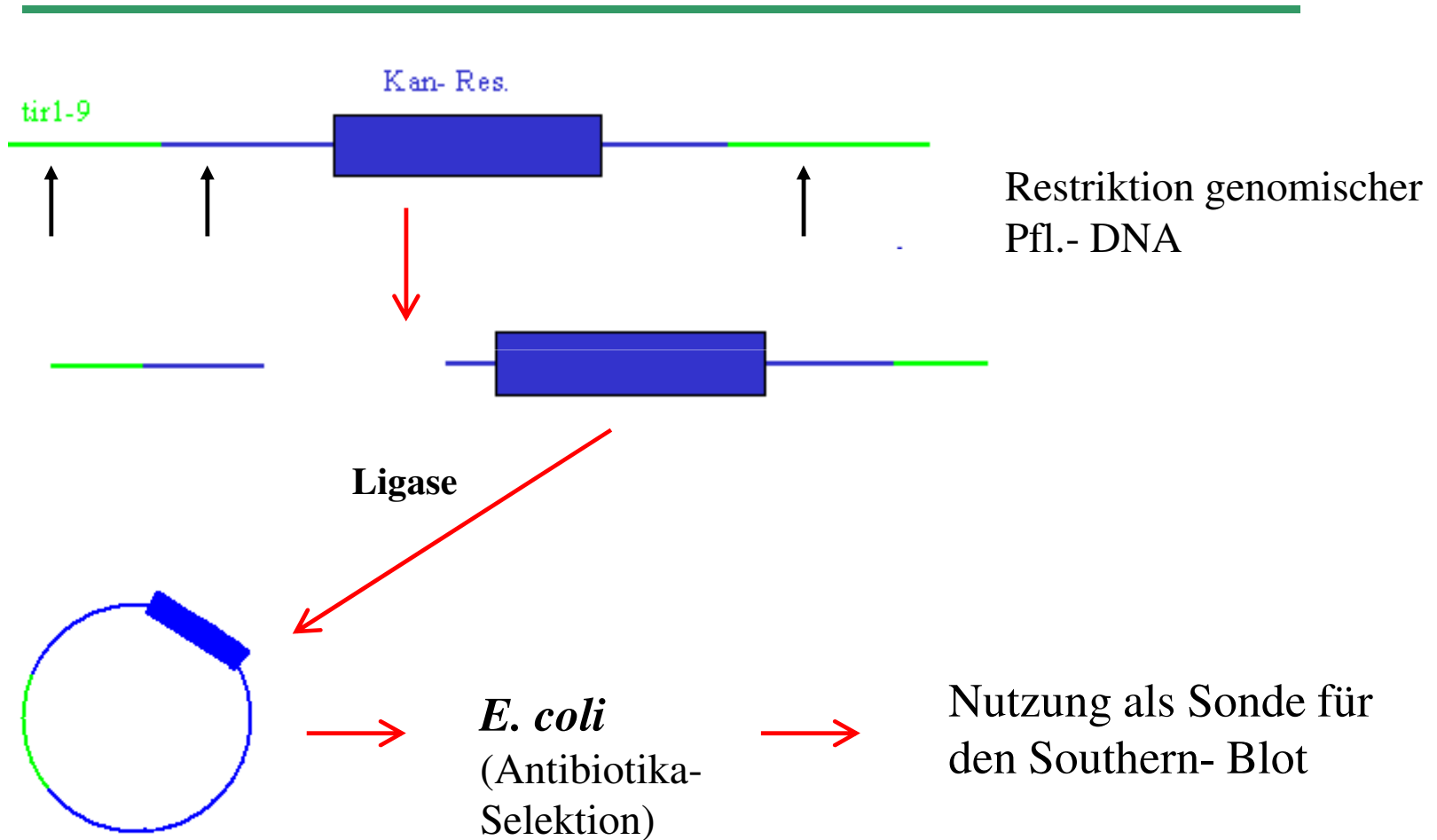
- Einbringen von DNA- Fragmenten durch *Agrobacterium tumefaciens*, zuvor Austausch des tumerinduzierenden Gens und anderen Genen durch Kanamycinresistenzgen als Marker
- Zufälliger Einbau in die genomische DNA des Wirtes
- Es existiert eine große T- DNA Datenbank

↓
Screen auf
Auxin-Resistenz
←
tir1-9

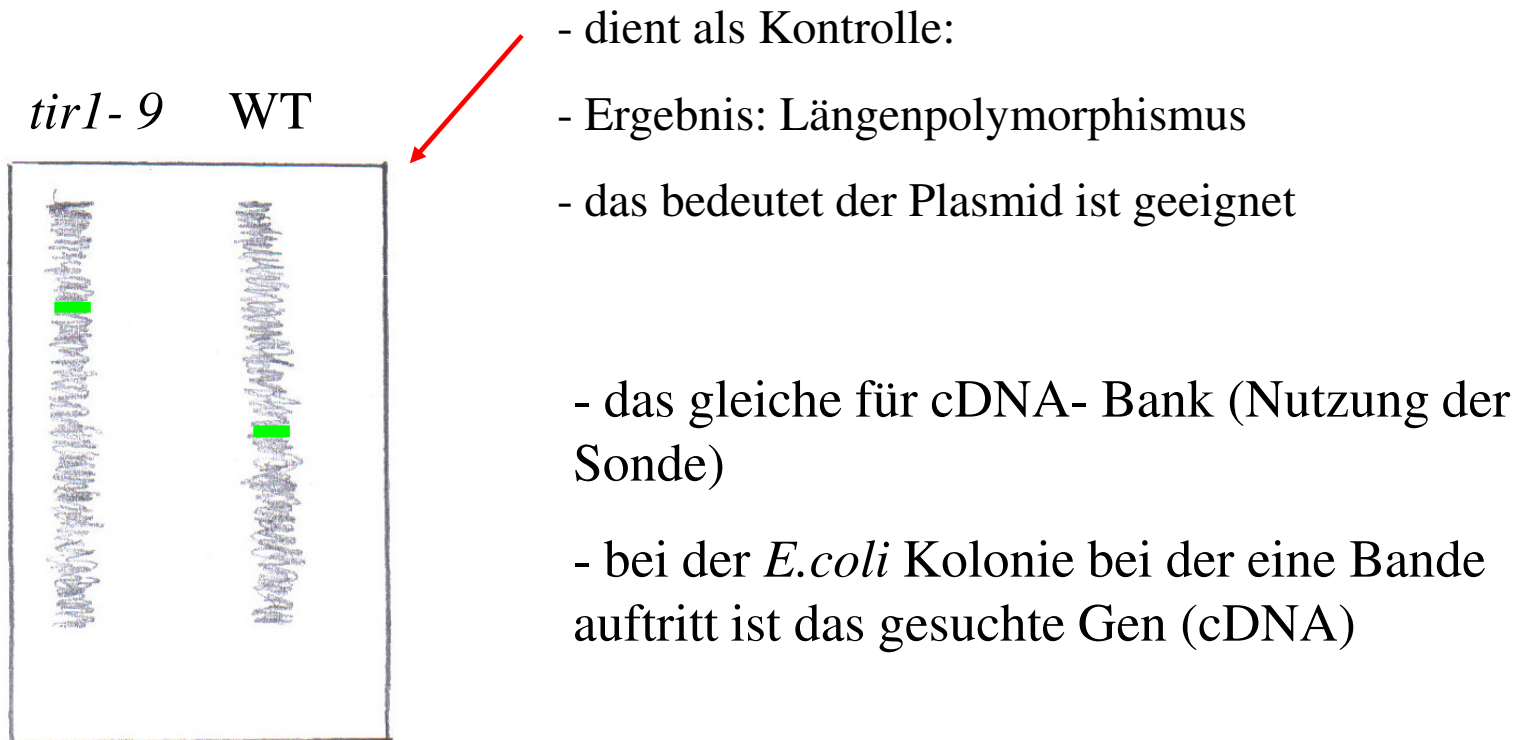


<http://de.wikipedia.org/wiki/Ti-Plasmid>

Isolierung des *TIR1* Gens mittels T-DNA Insertion

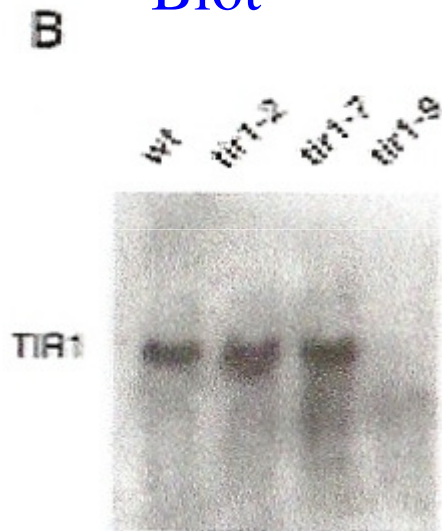


Isolierung des *TIR1* Gens mittels T-DNA Insertion



Isolierung des *TIR1* Gens mittels T-DNA Insertion

Northern- Blot



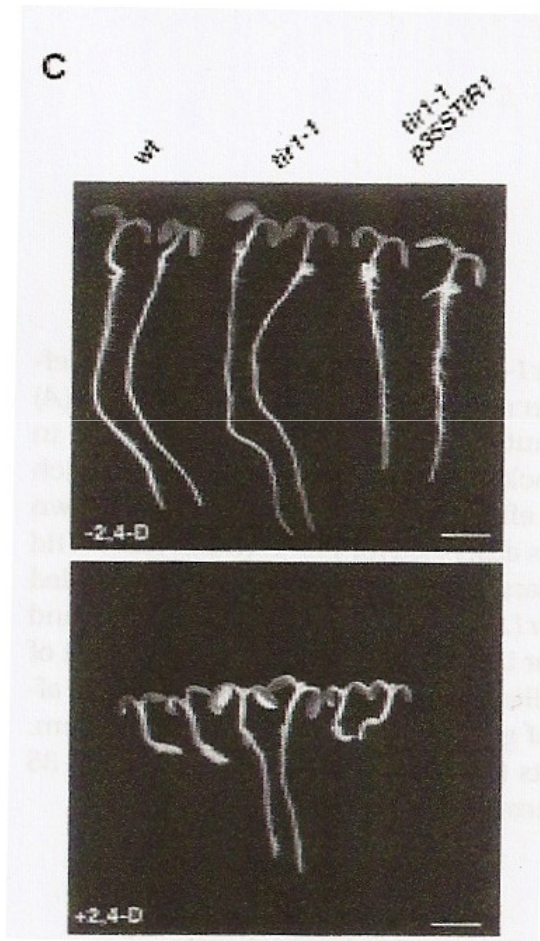
- Gen nachgewiesen,
TIR1 ist das gesuchte Gen

A Sequenzanalyse

1	MQERIALSFP	EEVLEHVFSF	IQLDKDRMSV	SLVCKSWYEI	ERWCRRKVFI
51	GNCYAVSPAT	VIRRFPKVRS	VELKGGPHFA	DFNLVPDGWG	GYVYPWIRAM (<i>tir1-1</i>)*
101	SSSYTWLEEI	RLKRMVVTDD	CLELIAKSPK	NFKVLVLSSC	EGFSTDGLAA
151	IAATCRNLKE	LDLRESDVDD	VSGHCLSHFP	DTYTSLVSLN	ISCLASEVSF
201	SALERLVTRC	PMLKSLKLNK	AVFLEKLATL	LQRAPQLEEL	GTGGYTAEVR
251	PDVYSGLSVA	LSGCKELRCL	SGFWDVAPAY	LPAVYSVCSR	LTTLNLSYAT
301	VQSYDLVKLL	CQCPKLQRLW	VDYIEDAGL	EVLASTCKTY	RELRVFPSEP
351	FVMEPNVALT	EQGLVSVSMG	CPKLESVLYF	CRQMTNAALI	TIARNRPNMF (<i>tir1-2</i>)*
401	RFRLCIIEPK	APDYLTLEPL	DIGFGAIVFH	CKDLRRLSLS	GLLTDKVFEY
451	IGTYAKMEM	LSVAFAGDS	LGMHHVLSGC	DSLRLKLEIRD	CPFGDKALLA
501	NASKLETMRS	LWMSSCSVSF	GACKLLGQFM	PKLNVEVIDE	RGAPDSRPES
551	CPVERVFIYR	TVAGPRFDMF	GFVWNMDQDS	TMRFSRQIIT	TNGL

- Mutation scheint verantwortlich für
die Auxin- Resistenz

Komplementation



Transformation
des *p35S:TIR1*
Plasmids in *tir1-1*

- **Ergebnis:**
- Beweis, dass *TIR1* das gesuchte Gen ist
- *TIR1* Gen befindet sich an Position 128 im Chromosom 3, nahe nga 128

TIR1 Proteine bestehen aus einer F- Box und LRR

- F- Box und LRR homologe Proteine von TIR1:
Grr1p; SKP2; C02F5.7
- **F- Box:**
 - Homologe Proteine:
Säugetiere und Hefe: SKP2; Mensch: Cyclin F; Hefe: Cdc4 und Grr1
 - An die F- Box bindet SKP1, mit Cdc53 bilden diese den E3- Komplex (SCF)
- **LRR:** leucine rich repeats, (für Proteininteraktionen?)

TIR1 Proteine bestehen aus einer F- Box und LRR

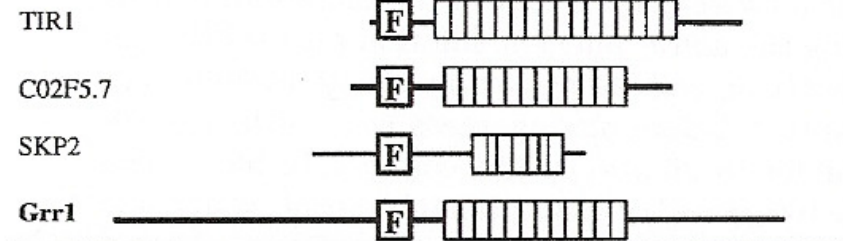
B

```

95  WIEAMSSSYTWEEIRIK
114  RM.VVTDDCLELIAKSEKNFKVLVLSSCEGFSTD
147  GLAATAATCRNKEKIDRESDVDDVSGH
175  WLSHEPDTYTSVSLNISCLASEVSFS
202  ALERLVTRCPNLSKIKINRAVPLEKLA
229  TLLQRAPQLEELGTGGYTAEVRPDVYS
256  GLSVALSGCKELRCLSGFWDVPA
280  YLPVYVSVCSRETTENLSYATVQSY
305  DLVKLLCQCPKLRQLWVLDYIEDA
329  GLEVLASTCKDLRELRFVFPSEPFVMEPNVALTEQ
363  GLVSVSMGCPKLESVLYFCRQMTNA
388  ALITTIARNRPNMTRFRLCIIEPKAPDYLTLEPLDI
423  GEGAIVEHCKDLRRLSLSGLLTDKVF
450  YIGTYAKMEMLSVAFAGDSDL
472  GMHHVLSGCDSLRLKLEIRDCPF
494  GDKALLANASKLETMRSLWMSSCS
  
```

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

C

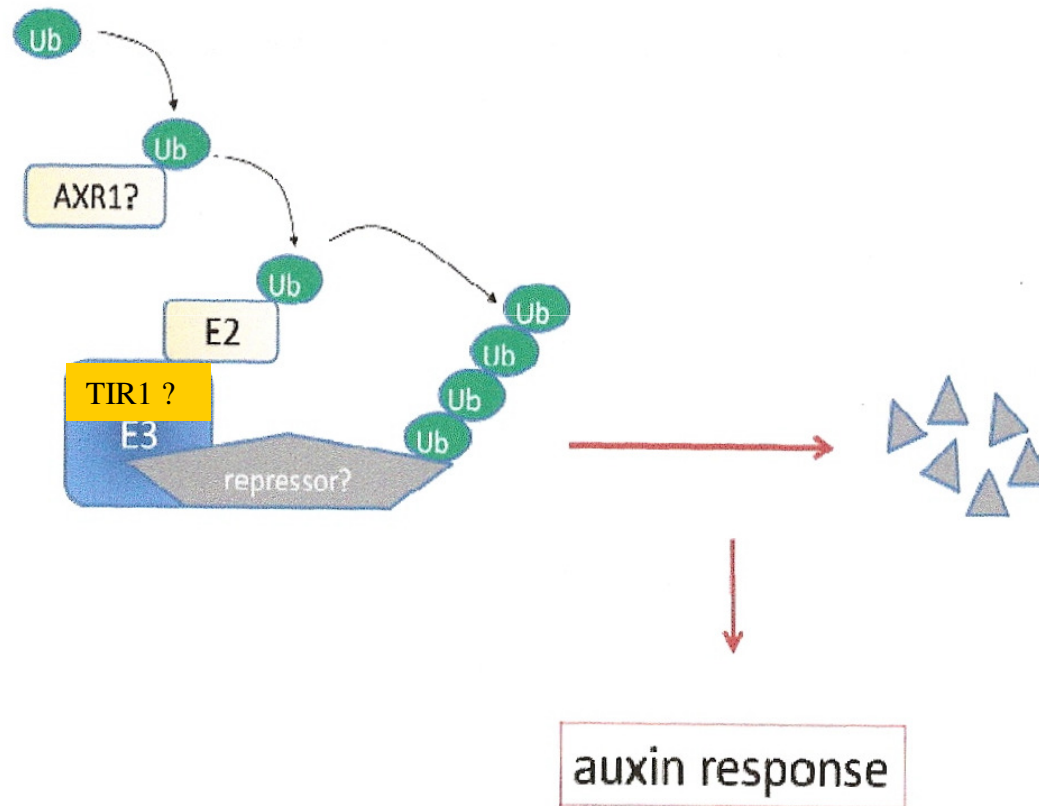


Zusammenfassung:

- Entdeckung neuer Mutanten (*tir*) über einen CPD und NPA- Assay
- 5 Mutanten (*tir1-1*, *tir1-2*, *tir1-3*, *tir1-6*, *tir1-7*)
- Resistenz gegenüber Auxin- Transportinhibition
- *tir1* Mutanten im Auxinsignaling gestört
- Lokalisierung des *TIR1* Gens
- Identifizierung des TIR1 Protein
- Vermutung das TIR1 Protein ein Bestandteil des SCF- Komplexes ist

Hypothese:

- TIR1 Protein ist ein Bestandteil des E3- Komplexes wie seine Homologen



Nächstes Paper



- Christian/Inga Romina
- Identification of an SCF ubiquitin–ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*
Gray et al. (**1999**)