

# Das Paper von heute

## **Identification of an SCF ubiquitin–ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana***

William M. Gray, J. Carlos del Pozo, Loni Walker, et al.

*Genes Dev.* 1999 13: 1678-1691

Samuel Grimm & Jan Kemna

# Bisheriges Modell

Abel et al. PNAS 1994

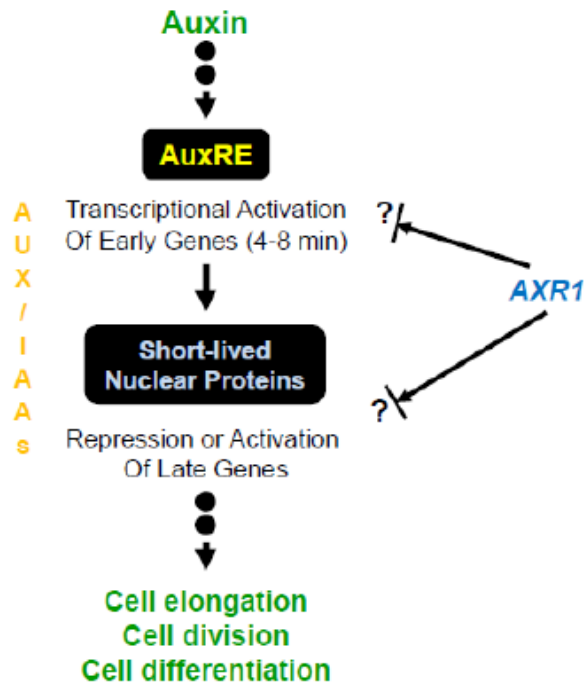
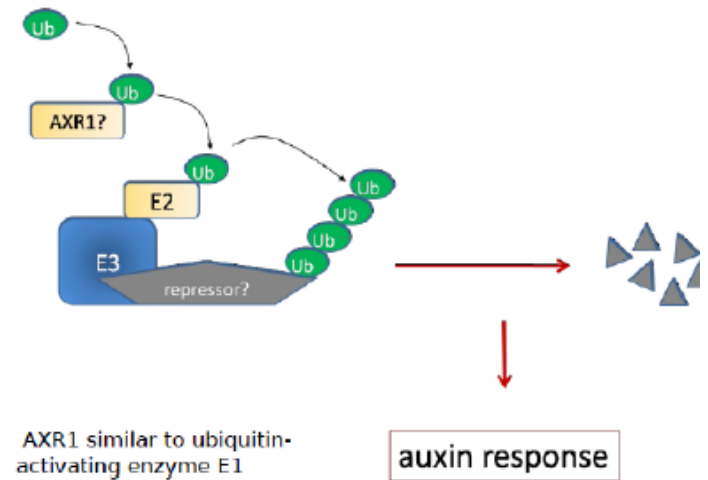


FIG. 5. Model for early auxin events



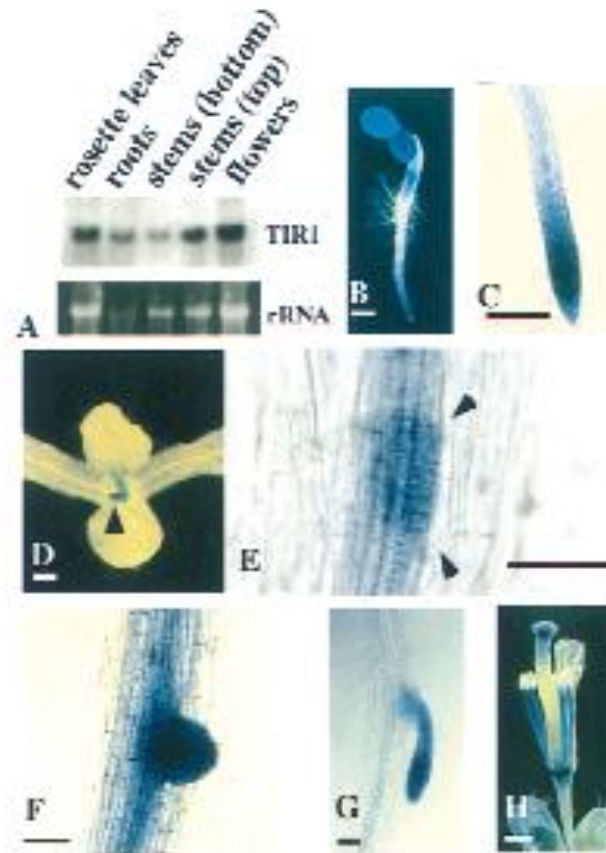
# Was bereits bekannt war

- TIR1 ist an Auxinantwort (Zellteilung, Elongation, Differenzierung) beteiligt, im selben Signalweg wie AXR1
- TIR1 enthält F-box
- In Hefe und Säugetieren bilden F-box Proteine zusammen mit Skp1 und Cdc53 SCF-Komplexe (Ubiquitin-Ligase-Komplex)
- AXR1 interagiert mit ECR1 und überträgt RUB (Pflanzen)
- Cdc53 in SCF-Komplex ist Zielprotein von RUB (Hefe)
- SAR1 Suppressor von axr1

# Wo wird TIR1 exprimiert?

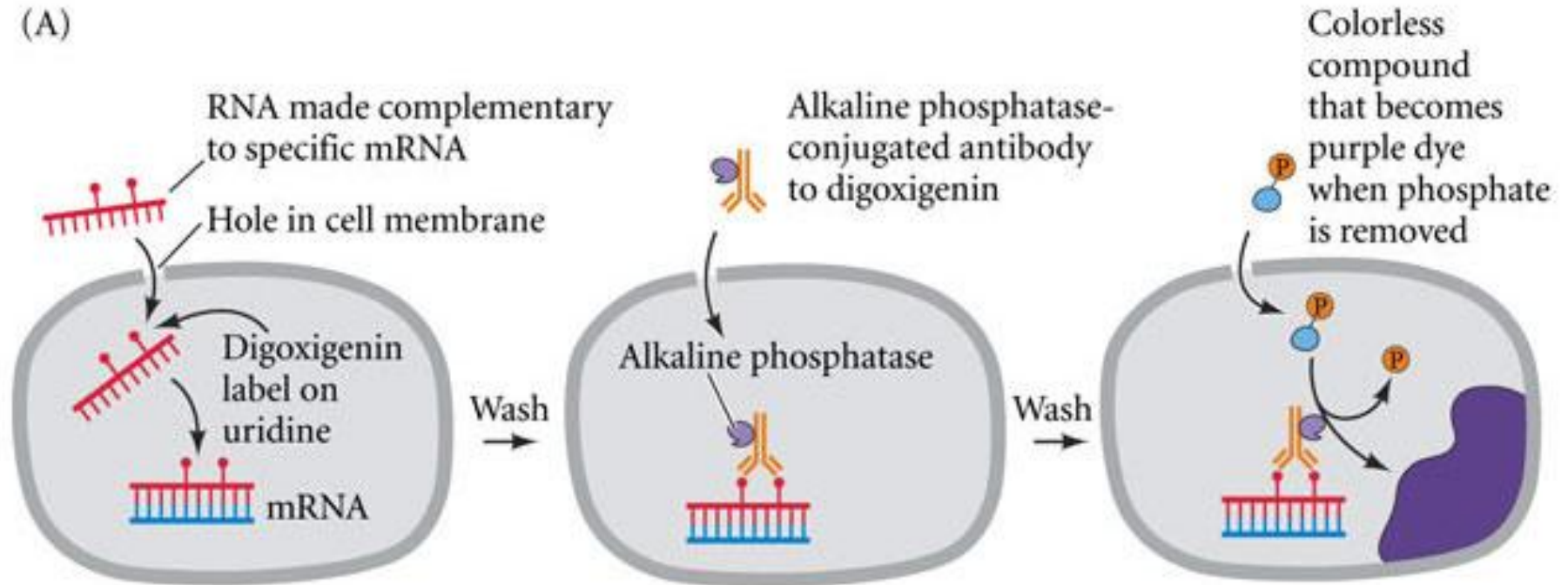
Methoden: Northern Blot (A), GUS-Reporterassay (B-H), RNA-in-situ-Hybridisierung (I-P)

Ergebnisse:  
TIR1-Transkript in Wurzeln,  
Stamm, Blüten und Blattrosette



# RNA-in-situ-Hybridisierung

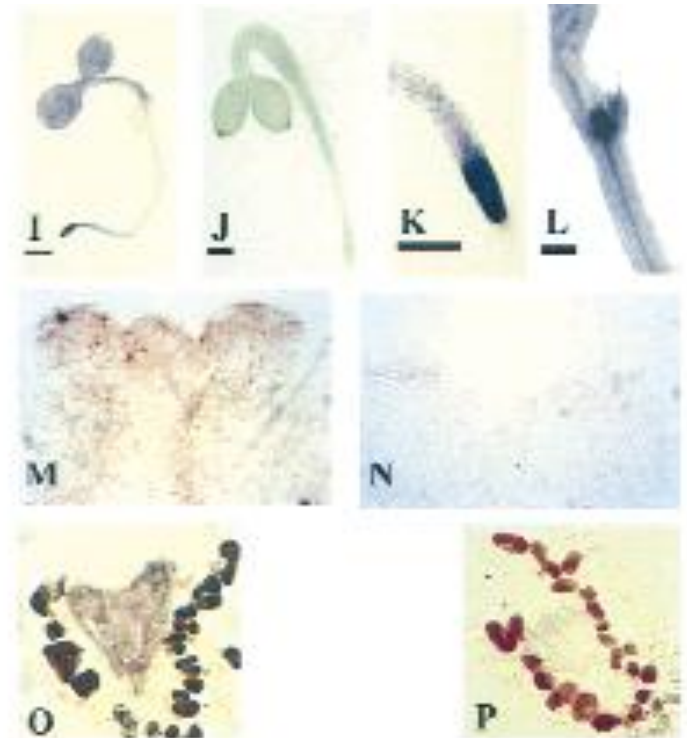
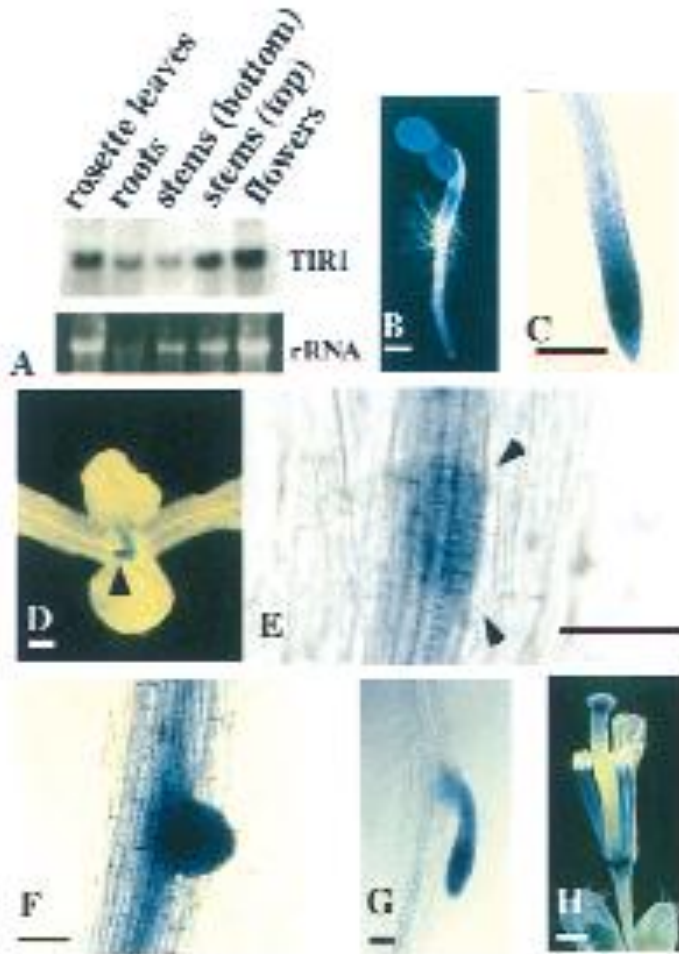
(A)



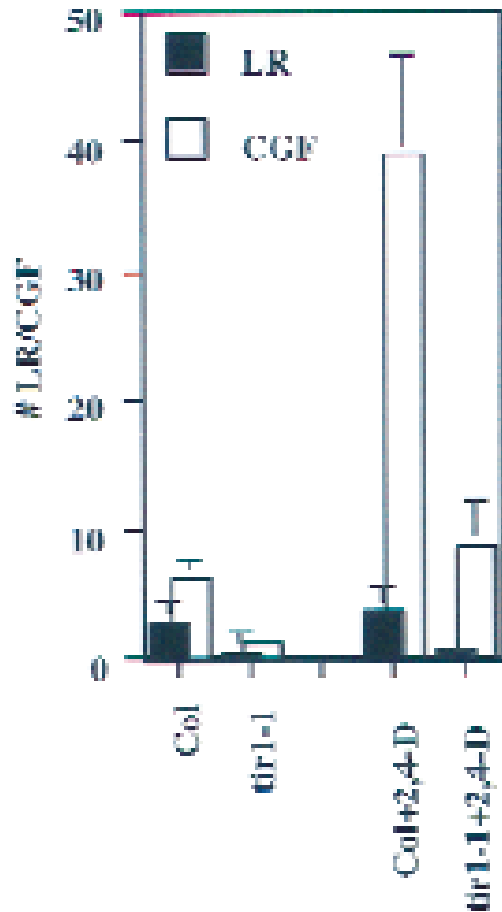
# Wo wird TIR1 exprimiert?

Methoden: Northern Blot (A), GUS-Reporterassay (B-H), RNA-in-situ-Hybridisierung (I-P)

Ergebnisse: TIR1-Transkript in Wurzeln (Seitenwurzeln), Stamm, Blüten und Blattrosette → Meristeme



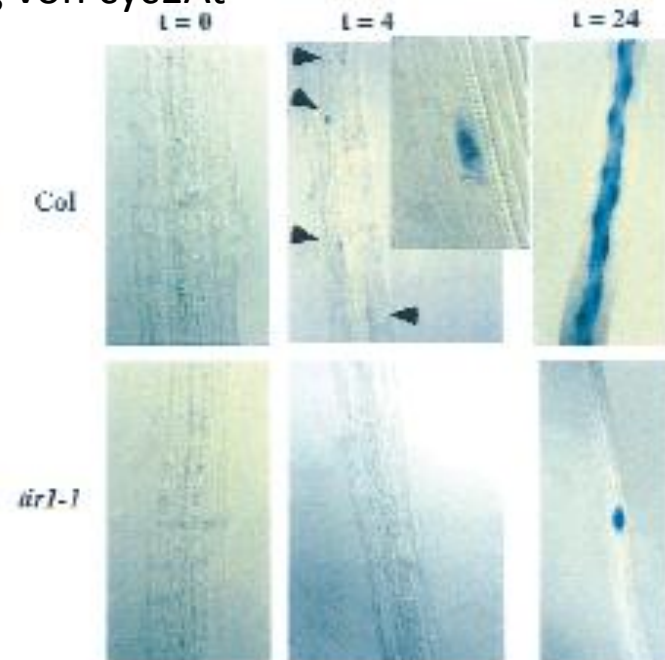
# Funktion von TIR1 bei der Bildung lateraler Wurzeln



Bildung lateraler Wurzeln in 2 Schritten:  
 1. Remeristematisierung von Perizykelzellen  
 2. Zellteilung

Methode: Gus-Reporterassay  
 - *cyc1At*(Cyclin)-Promotor + GUS-Gen

Ergebnis: TIR1 induziert Bildung von *cyc1At*  
 → Überwindung der G<sub>2</sub>-Phase,  
 Wurzelwachstum



# Mit welchen Proteinen interagiert TIR1?

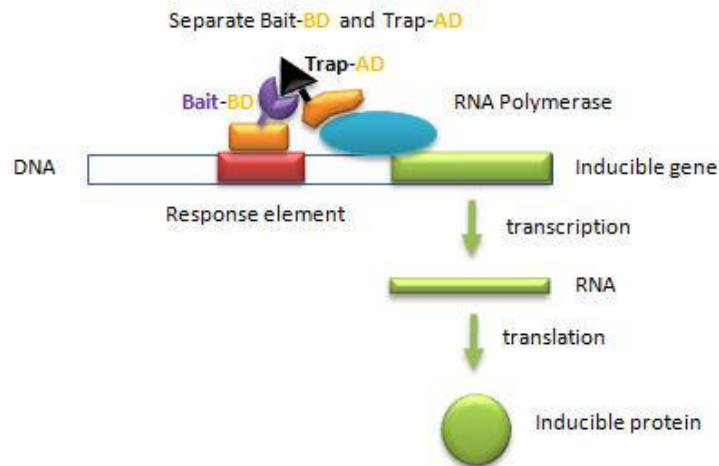
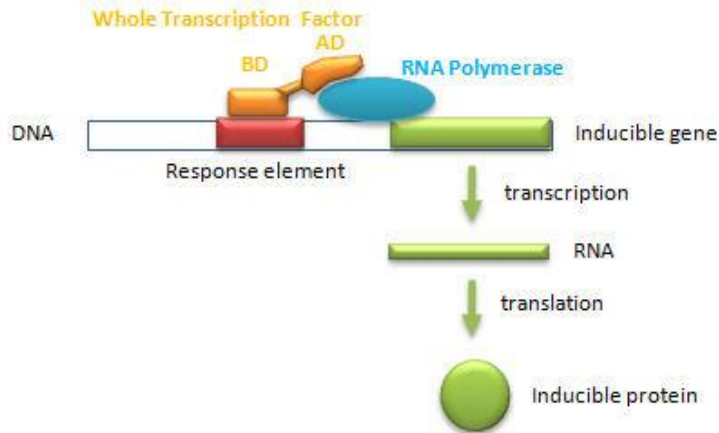
Zur Erinnerung:

- F-box-Proteine in Hefe und Säugern interagieren mit weiteren Proteine und bilden einen SCF-Komplex der als Ubiquitin-Ligase wirkt
- Womit interagiert TIR1?



# Yeast-two-Hybrid-Screen

## Yeast Two Hybrid Method



- YPB2-Hefestamm ohne funktionierenden Gal4-TF
  - Plasmidvektor mit 3-AT-Resistenz und Y2H-Konstrukt
  - cDNA-Bibliothek aus Arabidopsis in vier verschiedenen Entwicklungsstadien ( $7,5 \cdot 10^6$ )
- Y2H-Screen:
- Gal4-TF: besteht aus zwei Domänen
  - 1. Domäne bindet an DNA, wird mit TIR1 fusioniert (Bait)
  - 2. Domäne aktiviert DNA-Polymerase, wird mit verschiedenen Proteinen fusioniert (Prey)
  - Interaktion führt zur Expression des Reportergens
  - Selektion auf Histidinmangelmedium mit 3-AT  
→ induziert Histidinmangel

# Mit welchen Proteinen interagiert TIR1?

Methoden:

1. Yeast-two-Hybrid-Screen → interagierende Proteine finden
2. Restriktionsanalyse → Anzahl der verschiedenen interagierende Proteine
3. Sequenzanalyse → cDNA-Sequenz und AS-Sequenz der Proteine

Ergebnis:

ASK1 und ASK2

(*Arabidopsis* Skp-like)

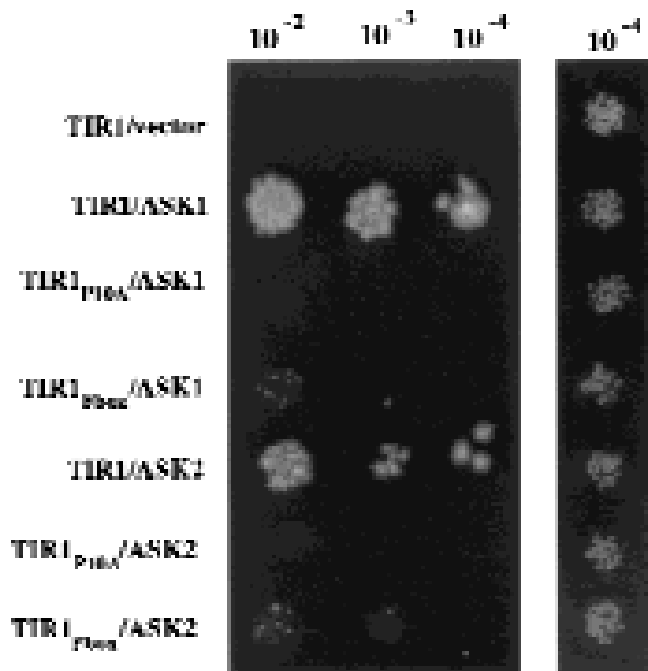
und weitere 8 ASKs

(ASK3-ASK10)

!Aber! Y2H kann falsch-positive Befunde liefern, daher Kontrolle mit anderer Methode nötig!



# Welche Rolle spielt die F-Box bei der Interaktion?



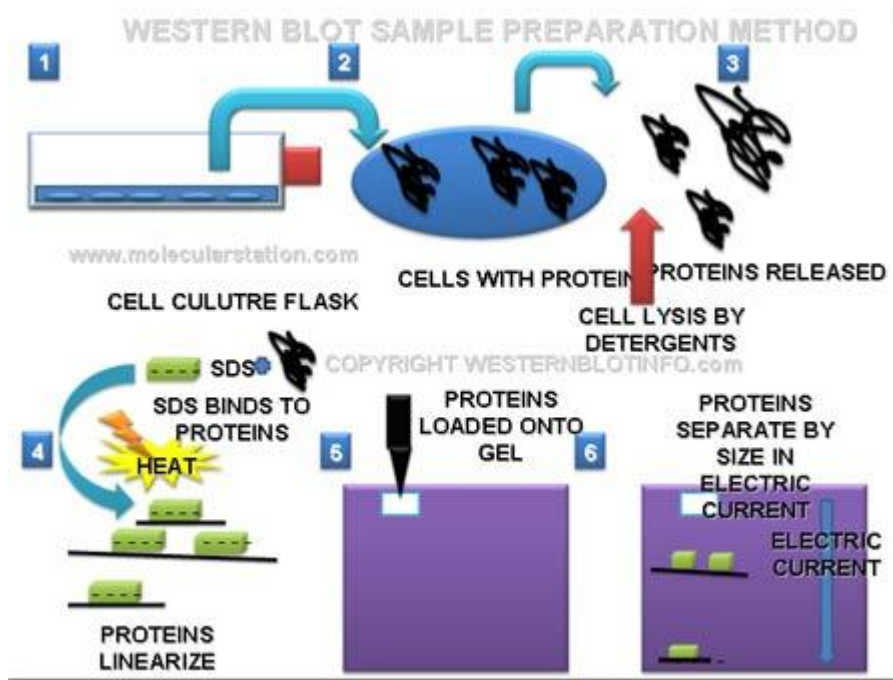
Methode: Yeast-two-Hybridization mit

1. WT-F-box
2. Mutierter F-box
3. Nur F-box

Ergebnis:

F-box ist notwendig aber zusätzlich weitere Sequenzen erforderlich

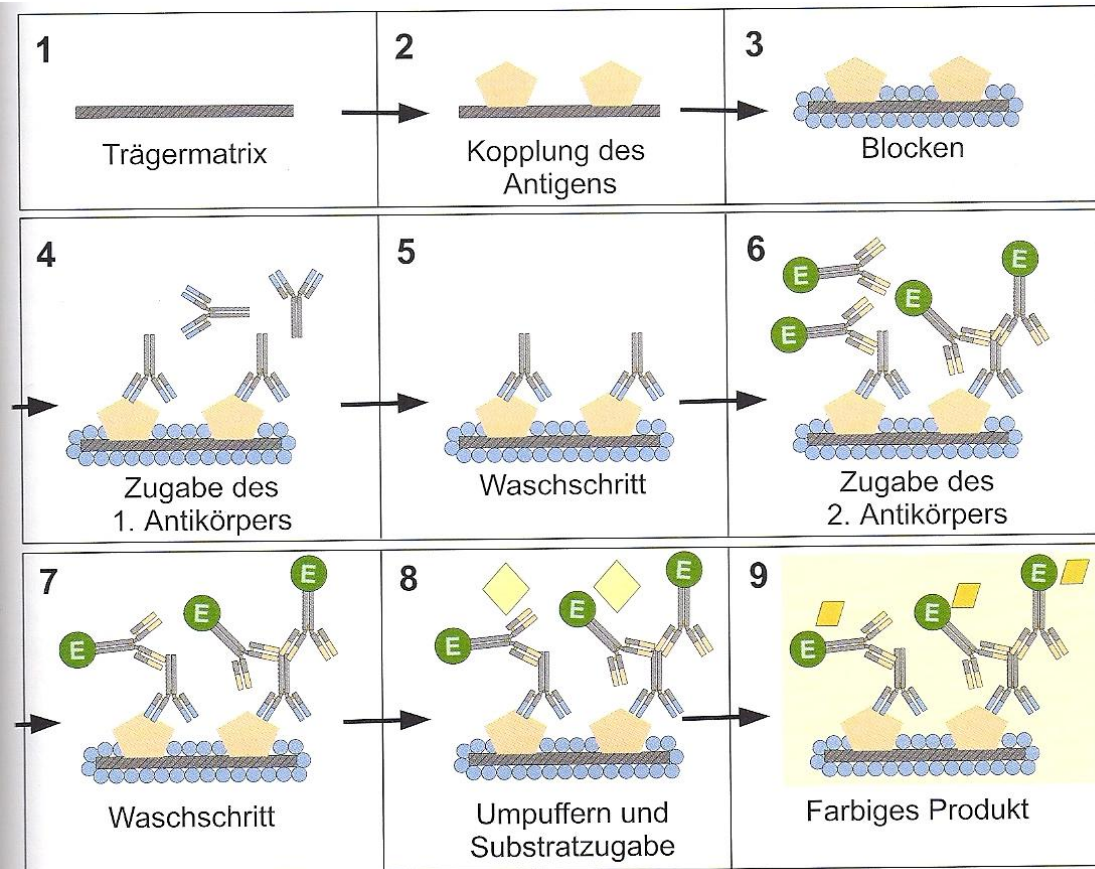
# Western Blot mit Immunopräzipitation (IP)



Western Blot :

1. Roh-Proteinextraktion aus Zellen  
7-Tage alter Arabidopsis Keimlinge
2. Proteine werden durch SDS linearisiert und negativ geladen.
3. Auftrennen der Proteine nach Größe mittels Gelelektrophorese
4. Übertragung auf Membran (Blot)

# Western Blot mit IP



IP:

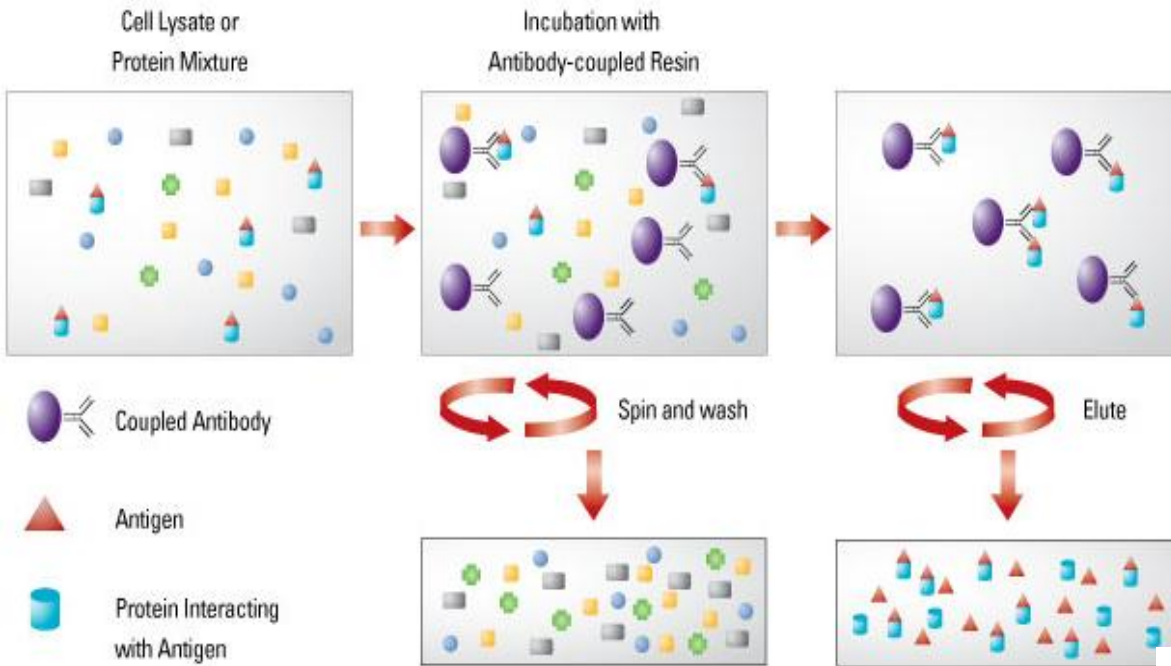
1-3 Proteinübertragung auf Trägermatrix (Western Blot)

4-5 Zugabe des 1. Antikörpers und Waschen

6-7 Zugabe des 2. AK und Waschen

8-9 Zugabe des Substrats und Bildung eines farbigen Produkts ermöglicht Erkennung

# Co-Immunopräzipitation (Co-IP)



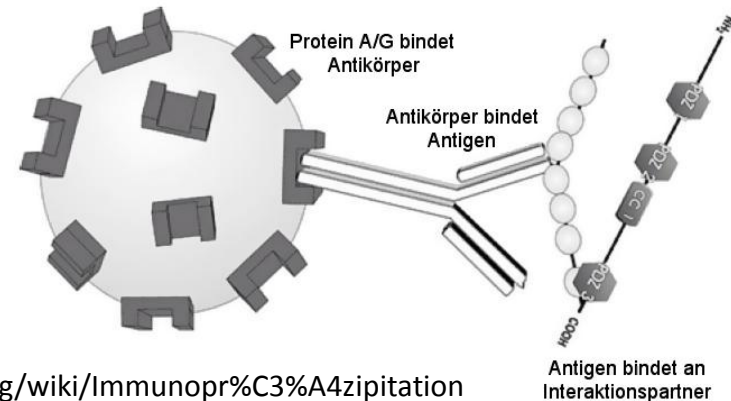
Co-IP wird noch vor dem Western Blot durchgeführt, „fischt“ die gesuchten Proteinkomplexe aus dem Rohextrakt

TIR1-myc Antikörper binden an TIR1-myc Antigen und an Agarose beads, dieser Komplex kann abzentrifugiert werden

Anschließend Western Blot mit IP

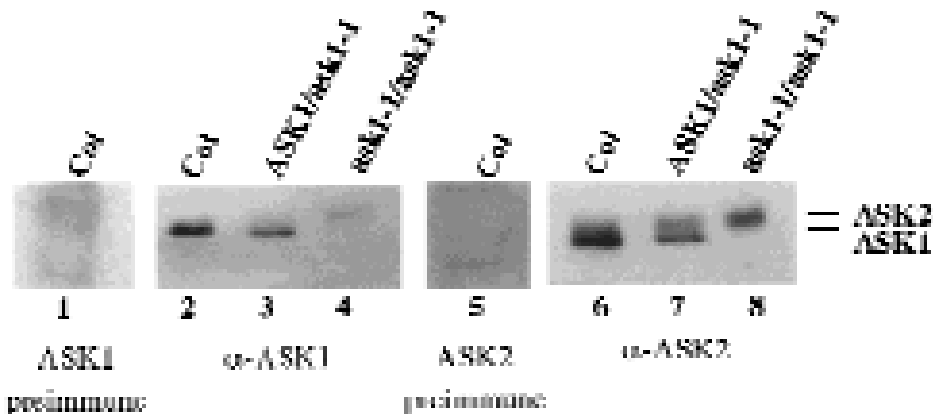
[www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=9C471132-0F72-4F39-8DF0-455FB515718F](http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=9C471132-0F72-4F39-8DF0-455FB515718F)

Analyze



[de.wikipedia.org/wiki/Immuno%C3%A4zipitation](http://de.wikipedia.org/wiki/Immuno%C3%A4zipitation)

# Kontrollversuch Teil 1



Methode:

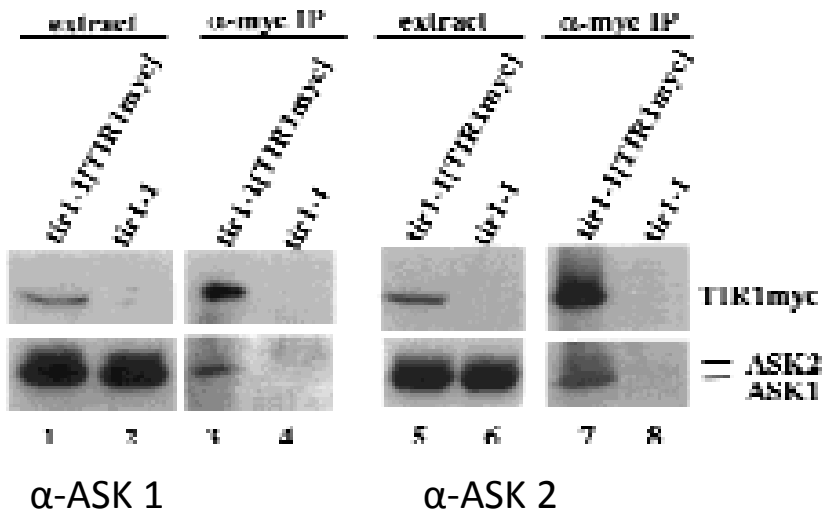
1. ASK 1 und 2 Proteine in E.coli produzieren
2. ASK1 und 2 in Kaninchen injizieren zur Antikörperbildung
3. Western Blot mit Proteinextrakten verschiedener Pflanzen (WT, ASK1/ask1-1, ask1-1/ask1-1) und IP mit  $\alpha$ -ASK 1 bzw.  $\alpha$ -ASK 2 Antisera

Ergebnis:

$\alpha$ -ASK 1 bindet spezifisch an ASK1-Protein

$\alpha$ -ASK 2 bindet an ASK1-Protein und an ein zweites Protein, vermutlich ASK2

# Kontrollversuch Teil 2



## Methode:

1. TIR1-Gen mit myc fusionieren
2. Mit myc-Antikörper SCF-Komplex aus Proteinextrakt isolieren (Co-IP)
3. Western Blot des gereinigten Extrakts (nur SCF-Komplexe!)
4. IP mit TIR1myc,  $\alpha$ -ASK 1 bzw.  $\alpha$ -ASK 2 Antisera

## Ergebnisse:

ASK1 und ASK2

interagieren mit TIR1



# Gibt es analoge zu Cdc53?

AtCul1	-----	-----	HEEKEEGLD	QGVVQVCST	QKHTLQGL
MaCul-4A	-----	-----	EEEDLEED	QGVVQVCST	QKHTLQGL
MaCul-4B	-----	-----	EEEDLEED	QGVVQVCST	QKHTLQGL
AtCul1	-----	-----	HEEKEEGLD	QGVVQVCST	QKHTLQGL
MaCul-4A	-----	-----	EEEDLEED	QGVVQVCST	QKHTLQGL
MaCul-4B	-----	-----	EEEDLEED	QGVVQVCST	QKHTLQGL
ScFwt1	-----	-----	HEEKEEGLD	QGVVQVCST	QKHTLQGL
MaCul-4A	-----	-----	EEEDLEED	QGVVQVCST	QKHTLQGL
MaCul-4B	-----	-----	EEEDLEED	QGVVQVCST	QKHTLQGL
AtCul1	-----	-----	HEEKEEGLD	QGVVQVCST	QKHTLQGL
MaCul-4A	-----	-----	EEEDLEED	QGVVQVCST	QKHTLQGL
MaCul-4B	-----	-----	EEEDLEED	QGVVQVCST	QKHTLQGL
AtCul1	-----	-----	HEEKEEGLD	QGVVQVCST	QKHTLQGL
MaCul-4A	-----	-----	EEEDLEED	QGVVQVCST	QKHTLQGL
MaCul-4B	-----	-----	EEEDLEED	QGVVQVCST	QKHTLQGL
ScFwt1	-----	-----	HEEKEEGLD	QGVVQVCST	QKHTLQGL
MaCul-4A	-----	-----	EEEDLEED	QGVVQVCST	QKHTLQGL
MaCul-4B	-----	-----	EEEDLEED	QGVVQVCST	QKHTLQGL
AtCul1	-----	-----	HEEKEEGLD	QGVVQVCST	QKHTLQGL
MaCul-4A	-----	-----	EEEDLEED	QGVVQVCST	QKHTLQGL
MaCul-4B	-----	-----	EEEDLEED	QGVVQVCST	QKHTLQGL
ScFwt1	-----	-----	HEEKEEGLD	QGVVQVCST	QKHTLQGL
MaCul-4A	-----	-----	EEEDLEED	QGVVQVCST	QKHTLQGL
MaCul-4B	-----	-----	EEEDLEED	QGVVQVCST	QKHTLQGL
AtCul1	-----	-----	HEEKEEGLD	QGVVQVCST	QKHTLQGL
MaCul-4A	-----	-----	EEEDLEED	QGVVQVCST	QKHTLQGL
MaCul-4B	-----	-----	EEEDLEED	QGVVQVCST	QKHTLQGL

Erinnerung:

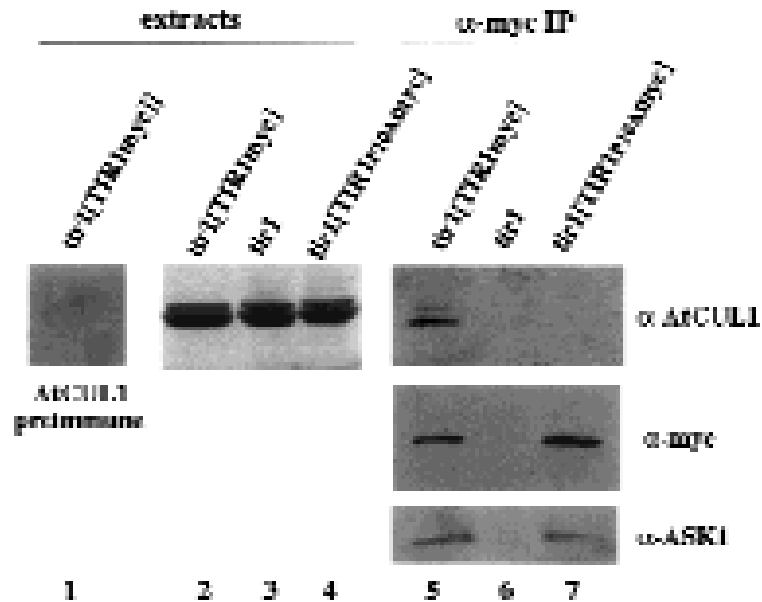
SCF-Komplex besteht aus F-box-Protein, Skp1 und Cdc53  
(Hefe und Säuger)

Analoge in Pflanzen:

F-box-Protein – TIR1  
Skp1 – ASK-Genfamilie  
Cdc53 – unbekannt

→ Screen nach ORF liefert AtCul1

# Gibt es analoge zu Cdc53?



Methode:

Wie bei ASK-Proteinen

Ergebnisse:

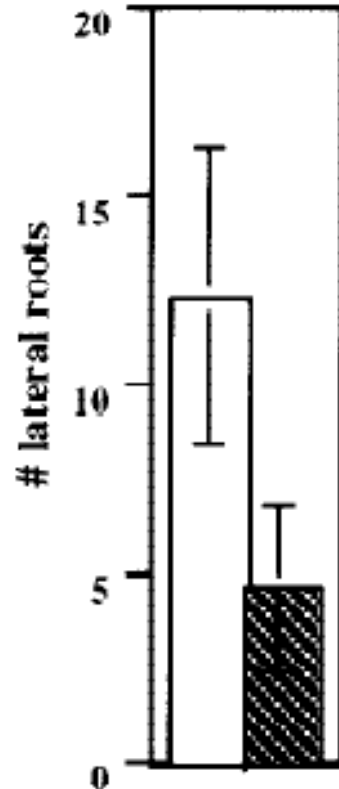
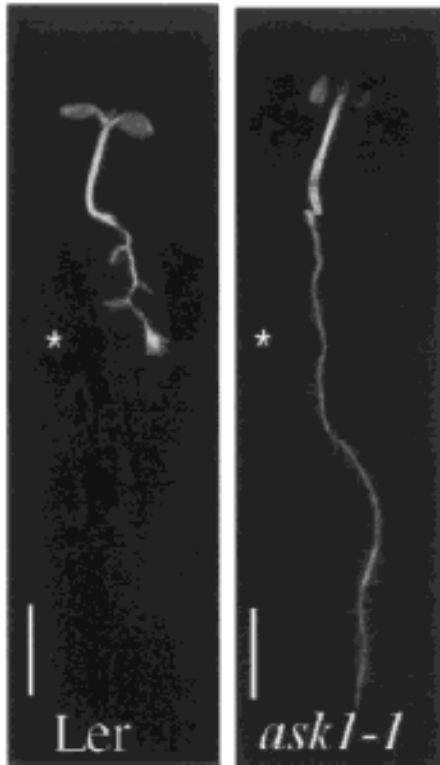
AtCUL1 am SCF-Komplex beteiligt.

F-box von TIR1 entscheidend für

Interaktion mit AtCUL1, aber **nicht**

für Interaktion mit ASK1.

# Beteiligung von ASK1 an der Auxinantwort

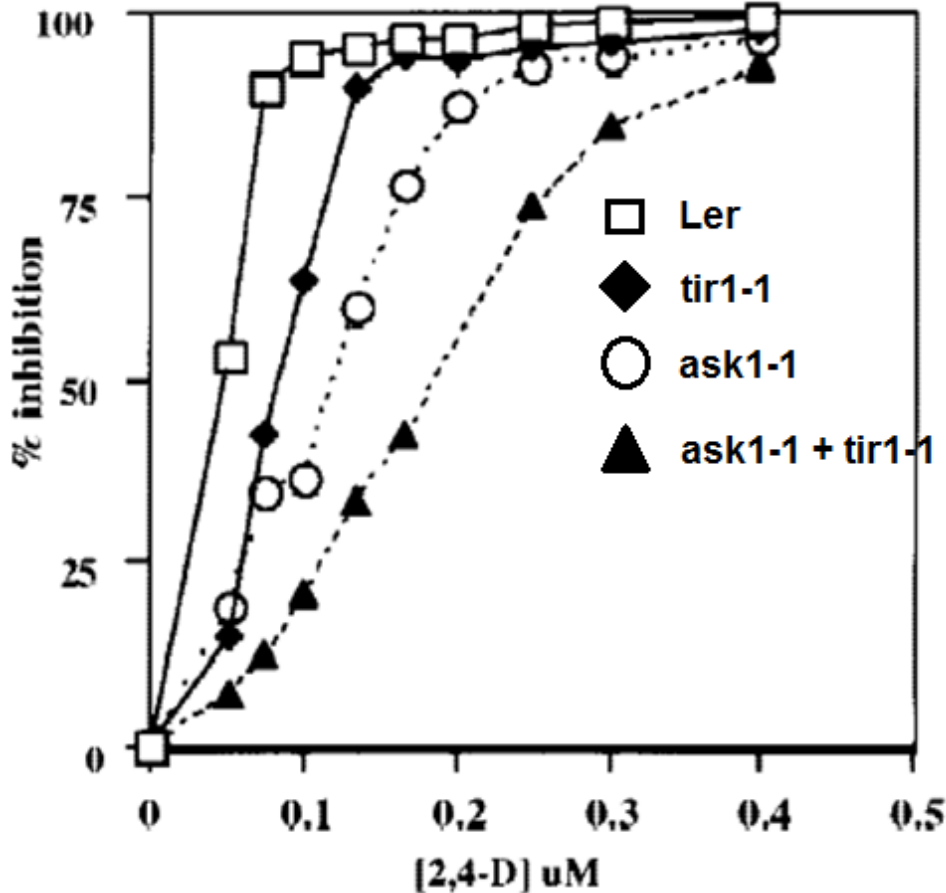


Pflanzenwachstum auf Normalmedium  
Übertragen der Pflanzen auf Medium mit  
2,4-D-Überschuss

Ergebnis:

ASK1 wird für natürliche Auxinantwort  
benötigt

# Beteiligung von ASK1 an der Auxinantwort



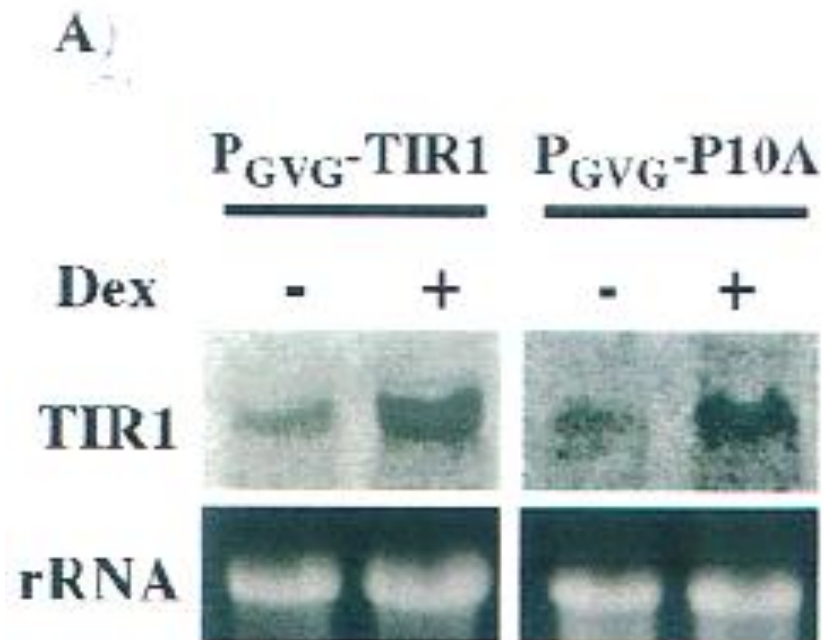
Resistenz verschiedener Arabidopsis-Mutanten auf Medien verschiedener 2,4-D-Konzentration

Ergebnis:

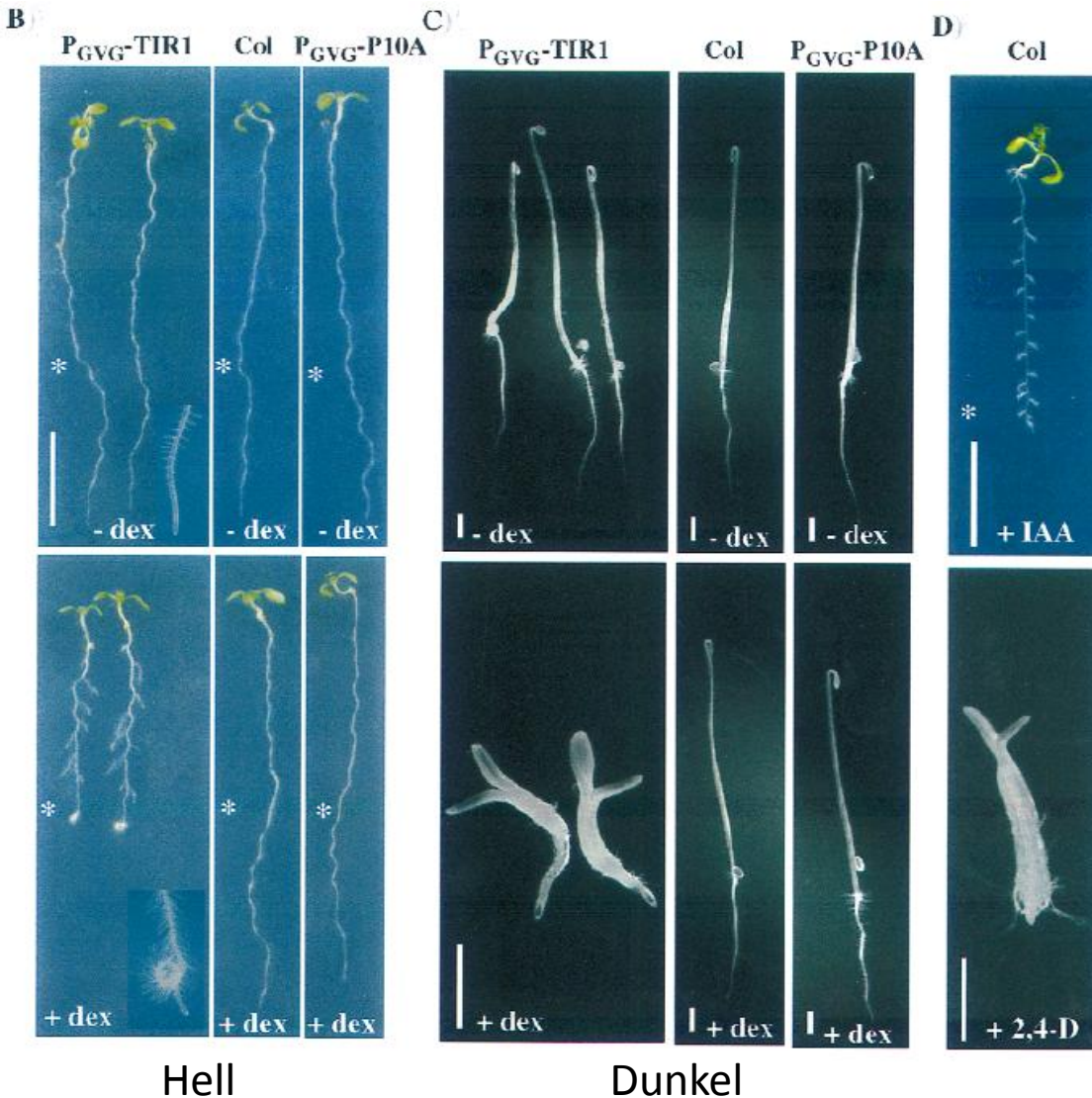
TIR1 und ASK1 Mutante haben einen additiven Effekt auf Phänotyp  
→ Liegen im selben Signalweg

# Welchen Einfluss hat die Konzentration von TIR1 im Auxin-Signalweg?

- TIR1-Gen mit glucocorticoid (DEX)-sensitiver Promotor fusioniert
- TIR1-Expression durch DEX induziert
- Pflanzenwachstum unter Normalbedingungen und bei Dunkelheit



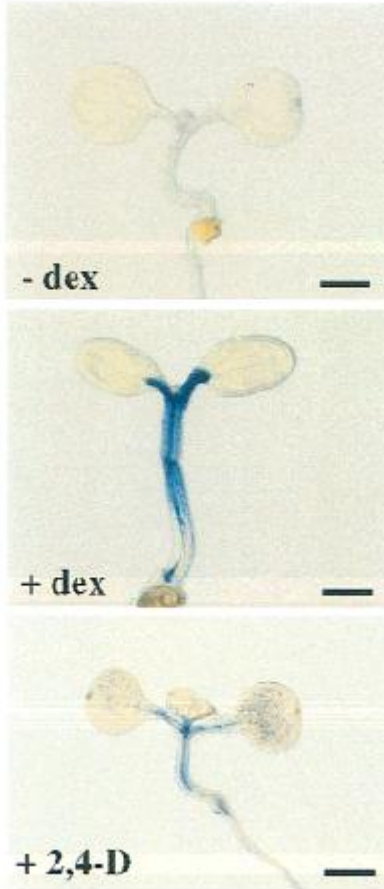
# Welchen Einfluss hat die Konzentration von TIR1 im Auxin-Signalweg?



Ergebnis:  
 Reaktion auf erhöhte  
 TIR1-Konzentration  
 Vergleichbar mit  
 Auxinantwort

# Welchen Einfluss hat die Konzentration von TIR1 im Auxin-Signalweg?

E)



$P_{GVG}$ -TIR1

Wildtyp

Methode:

Pflanzenstämme mit jeweils  
IAA-GUS

Ergebnis:

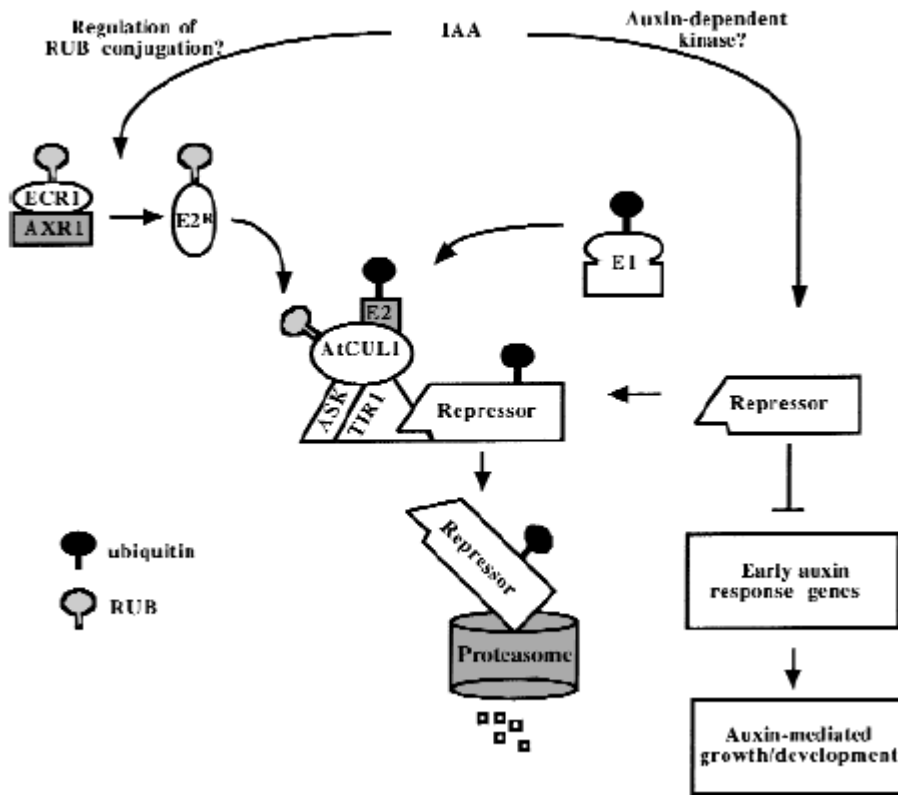
Zeigt das TIR1 limitierend  
für Auxinantwort ist

# Zusammenfassung

1. TIR1 wird früh bei Zellteilung exprimiert (in Wurzeln)
2. In Pflanzen bilden TIR1, ASK1 und AtCUL1 SCF-Komplex
3. TIR1 ist limitierend für Auxinantwort



# Modell



- SCF-Komplex dient als Ubiquitin-Ligase
- Abbau von Repressor der *early response genes*
- Komplex wird durch RUB modifiziert über AXR1/ECR1-Komplex

# Hypothesen

- TIR1 und ASK1 sind Mitglieder von größeren Genfamilien
- ähnliche SCF-Komplexe könnten Funktion übernehmen  
(LRF1 bindet schwach an ASK1)
- SCF<sup>TIR1</sup> ubiquitiniert mehrere Substrate (Beteiligung an Zellteilung und Elongation)
- IAA/AUX-Repressoren und/oder IAA/AUX selbst könnten Ziele sein
- IAA/AUX könnten selber als Aktivatoren oder Repressoren fungieren

# Fragen

- Wie reguliert Auxin den AXR1-SCF<sup>TIR1</sup>-Signalweg?
- Auxinrezeptor?
- Funktion der Modifizierung mit RUB?

# Im Anschluss

Tanja und Tina:

Auxin regulates SCF<sup>TIR1</sup>-dependent degradation of AUX/IAA proteins

(Gray et. al, 2001)