

# Abstract

Sulfur, as indispensable component of many metabolites, is a growth-limiting macronutrient for plants. It is taken up by roots as sulfate, reduced, and incorporated as organic thiol in the amino acids, cysteine and methionine and other metabolites. Thus, to successfully adapt to changing sulfur availability and environmental stress, sulfur metabolism requires strict regulation. During sulfur deficiency the acquisition and primary assimilation of sulfate are enhanced, whereas the secondary assimilation pathway into glucosinolates is repressed. This sulfur deficiency response helps the plants to cope with the limited supply. On transcriptional level this response is controlled by SLIM1, a member of the EIL transcription factor family.

Despite its similarity with the other EILs, which control ethylene signaling, SLIM1 function in the regulation of sulfur deficiency response seemed to be distinct within its family. Moreover, the underlying regulatory mechanisms of perception, signaling, and activation of the sulfur starvation response remained as major open question in the sulfur research. This study, therefore, aimed to test whether the other EIL transcription factors, namely EIL1, EIN3, EIL2, and EIL4, contribute to the control of sulfur deficiency response and to address the mechanisms of SLIM1 action in sulfur deficiency signaling. Gene expression and transcriptome analyses, in combination with metabolite analyses and isotope feeding experiments of different *Arabidopsis thaliana* mutants helped to answer these questions.

In this study we could identify EIL1 as a second transcriptional activator regulating the sulfur deficiency response, subordinate to SLIM1. Moreover, we could attribute EIN3, EIL2 and EIL4 to some parts of the -S response as well. Our comprehensive RNA-Seq analysis allowed for the first time to obtain a complete picture of the regulation of sulfate assimilation by sulfur starvation. With this we could contribute substantial new knowledge on the global function of SLIM1 and EIL1 within and beyond the sulfur deficiency response. Interestingly, SLIM1 has further function for, e.g., phytohormone and redox related processes also under normal conditions. Our data further point to SLIM1-independent ROS/redox burst most likely with onset of sulfur status perception. The sulfur deficiency response might be partly regulated by ROS signaling, directly or indirectly through SLIM1, which is supported by physiological experiments with glutathione homeostasis deficient mutants. Moreover, our data support the hypothesis that SLIM1 is at least partly controlled through ubiquitination by EBF proteins similar to EIN3 and EIL1 in ethylene signaling.

# Zusammenfassung

Schwefel ist durch seine unverzichtbare Funktion in vielen Pflanzenmetaboliten ein wachstumslimitierender Makronährstoff für Pflanzen. Es wird als Sulfat durch die Wurzeln aufgenommen, reduziert und als organisches Thiol in die Aminosäuren Cystein und Methionin, sowie in andere Metaboliten eingebaut. Um sich der stetig verändernden Schwefelverfügbarkeit und etwaigem Umweltstress anzupassen, bedarf der Schwefelmetabolismus einer strikten Regulation. Während Schwefelmangel wird die Aufnahme und die primäre Assimilation von Sulfat gefördert, wohingegen der sekundäre Assimilationsweg in Senfölglykoside reprimiert wird. Diese Schwefelmangelantwort hilft der Pflanze die Mangelbedingungen zu bewältigen. Auf Transkriptionsebene wird diese Antwort von SLIM1 kontrolliert, einem Mitglied der Familie von EIL Transkriptionsfaktoren.

Trotz der Ähnlichkeit zu anderen EIL Proteinen, die die Signalweiterleitung von Ethylen kontrollieren, schien SLIM1 eine eigenständige Rolle in der Regulation der Schwefelmangelantwort einzunehmen. Zudem waren die genauen molekularen Mechanismen der Signalerkennung, und -weiterleitung sowie die Aktivierung der Schwefelmangelantwort weithin unbekannt. Diese Studie hatte daher zur Zielsetzung, den Beitrag der anderen EILs, EIL1, EIN3, EIL2 und EIL4, zur Schwefelmangelantwort zu beleuchten, sowie die Mechanismen der SLIM1-Regulation herauszufinden. Transkriptom- und Expressionsanalysen, Metabolit-Analysen und Isotopenexperimente verschiedener *Arabidopsis* Mutanten wurden dazu herangezogen.

In dieser Studie konnten wir EIL1 als zweiten, untergeordneten Transkriptionsfaktor in der Regulation der Schwefelmangelantwort identifizieren. Auch EIN3, EIL2 und EIL4 konnten wir in Teilen eine Funktion in dieser Regulation nachweisen. Unsere RNA-Seq-Analyse von Wurzel- und Sprossgewebe komplettierte zudem zum ersten Mal das Bild über die Regulation der Schwefelmangelantwort. Somit konnten wir neue Erkenntnisse über die globale Funktion von SLIM1 und EIL1 für die Schwefelmangelantwort und darüber hinaus gewinnen. Interessanterweise besitzt SLIM1 noch weitere Funktionen in Redox- und Phytohormonprozessen unter Mangel- sowie Normalbedingungen. Unsere Transkriptomdaten legen zudem nahe, dass es zu einem ROS-Burst mit Einsetzen der Schwefel-Perzeption kommt. Das Mitwirken von ROS-Signalen konnten wir zudem in physiologischen Experimenten von GSH-Homöostase defizienten Mutanten nachweisen. Schließlich unterstützen unsere Daten die Hypothese, dass SLIM1 wenigstens in Teilen durch Ubiquitinierung durch EBF Proteine, ähnlich wie bei EIN3 und EIL1 im Ethylen-Signalweg, kontrolliert wird.