

# Functional and biochemical study of SPA1 and SPA2 proteins in *Arabidopsis thaliana*

## Abstract

Light regulates a number of developmental processes and growth in plants, for instance photomorphogenesis, anthocyanin biosynthesis and flowering. A central repressor, the COP1/SPA E3 ubiquitin ligase, negatively regulates these events in the dark by ubiquitinating important transcription factors which are responsible for promoting these processes. In the light, the COP1/SPA complex is repressed by photoreceptors via several mechanisms. Inactivation of the complex results in the promotion of light responses such as photomorphogenesis. Four SPA proteins are present in *Arabidopsis thaliana*, which have overlapping and distinct functions regarding the regulation of photomorphogenesis. SPA1 and SPA2 are necessary to repress photomorphogenesis in the dark, while SPA3 and SPA4 only have minor contributions in darkness. However, light inactivates SPA2 much stronger than SPA1. As a consequence, SPA2 is no longer able to repress photomorphogenesis in the light whereas SPA1 is still functioning. Two mechanisms for the differential inactivation of SPA1 and SPA2 function in the light have been proposed: first, light triggers the degradation of SPA1 and SPA2 proteins at different levels; second, the activities of these proteins are differently regulated by unknown mechanisms.

In the first part of this thesis, I investigated the potential mechanisms that trigger the degradation of the SPA2 protein in the light. First of all, the duration and fluence of light that is required for SPA2 protein turnover was determined. I found that the degradation happens only 5 min after light irradiation and it only requires very low fluence of light. Subsequently, phyA was identified as a photoreceptor that promotes SPA2 degradation in red, far-red and blue light. In addition, phyB was shown to be responsible for the SPA2 degradation in red light. I could also show that cryptochromes are not involved in the degradation of SPA2 in short-term blue light. The light-dependent SPA2 de-stabilization was shown to require COP1, implying that the processes is likely an auto-ubiquitination-dependent event. In the end, I could show that the N-terminal and coiled-coil domains are both required for SPA2 degradation in the light.

In the second part of this thesis, I examined the contributions of different domains of SPA1 and SPA2 to their functional divergence in the light. Analysis of domain swap constructs in

transgenic plants revealed that the N-terminal kinase-like domain and the C-terminal WD40 repeats both contribute to the diverged function of SPA1 and SPA2 in repressing photomorphogenesis in the light. Both domains were also found to be involved in the differences in SPA1/SPA2 protein stability. The beginnings of the N-termini which are less conserved between SPA1 and SPA2 were further identified as the regions that are responsible for the divergence. Weak light could not inhibit the COP1-SPA interactions for both SPA proteins. Furthermore, the association between SPA2 and cryptochromes was not stronger than the SPA1-CRYs association, indicating that the different activity of two proteins cannot be explained by the differential inactivation of the COP1/SPA complexes by cryptochromes. The function of SPA1 and SPA2 N-termini were revealed to be different for repressing photomorphogenesis, but similar for de-stabilizing SPA proteins in the light.

# Zusammenfassung

Licht reguliert viele Entwicklungsprozesse während des Pflanzenwachstums, zum Beispiel die Photomorphogenese, die Anthocyanin-Biosynthese und die Blühinduktion. Ein zentraler Repressor, die COP1/SPA-E3-Ubiquitinligase, unterdrückt diese Prozesse in Dunkelheit durch die Ubiquitinierung wichtiger Transkriptionsfaktoren, welche für die Förderung dieser Prozesse verantwortlich sind. Im Licht wird der COP1/SPA-Komplex von Photorezeptoren mittels mehrerer Mechanismen inhibiert. Die Inaktivierung des Komplexes resultiert dann in der Förderung von Lichtantworten wie der Photomorphogenese.

Arabidopsis besitzt vier SPA-Proteine, welche gemeinsame, aber auch unterschiedliche Funktionen hinsichtlich der Photomorphogenese besitzen. SPA1 und SPA2 sind notwendig für die Unterdrückung der Photomorphogenese in Dunkelheit während SPA3 und SPA4 nur geringfügig dazu beitragen. Licht inaktiviert SPA2 allerdings deutlich stärker als SPA1, weshalb SPA2, im Gegensatz zu SPA1, nicht in der Lage ist, Photomorphogenese im Licht zu unterdrücken. Zwei Mechanismen sind für die differenzielle Inaktivierung von SPA1 und SPA2 im Licht verantwortlich: Zum einen induziert Licht die Degradation von SPA1 und SPA2 in unterschiedlichem Maße; zum anderen wird die Aktivität der beiden Proteine im Licht durch einen bisher unbekanntem Mechanismus unterschiedlich reguliert.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit habe ich die möglichen Mechanismen, welche den Abbau von SPA2 im Licht auslösen, untersucht. Zunächst wurden Dauer und Photonenfluss des Lichtes bestimmt, die für den Abbau von SPA2 benötigt wurden. Die Degradation erfolgt 5 min nach Belichtung und benötigt nur einen sehr geringen Photonenfluss. In der Folge wurde phyA als der Photorezeptor identifiziert, welcher die SPA2-Degradation in Rot-, Dunkelrot- und Blaulicht induziert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass phyB ebenfalls für die SPA2-Degradation im Rotlicht verantwortlich ist. Es wurde außerdem gezeigt, dass die Cryptochrome nicht an der Degradation von SPA2 unter kurzzeitiger Belichtung mit Blaulicht beteiligt sind. Die

lichtabhängige Destabilisierung von SPA2 benötigt COP1, was darauf hinweist, dass der Prozess wahrscheinlich von Auto-Ubiquitinierung abhängt. Letztlich konnte ich zeigen, dass die N-terminale und die coiled-coil-Domäne von SPA2 beide für die lichtabhängige SPA2-Degradierung benötigt werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit habe ich den Beitrag der verschiedenen Domänen von SPA1 und SPA2 zu ihrer funktionalen Divergenz im Licht untersucht. Die Analyse von Domänenaustausch-Konstrukten in transgenen Pflanzen offenbarte, dass die N-terminale kinase-ähnliche Domäne und die C-terminalen WD40-Repeats zur divergenten Funktion von SPA1 und SPA2 in Bezug auf die Unterdrückung der Photomorphogenese im Licht beitragen. Beide Domänen sind außerdem an der unterschiedlichen Proteinstabilität von SPA1 und SPA2 beteiligt. Die wenig konservierten Anfänge der beiden N-Termini wurden anschließend als die Regionen identifiziert, die für die Divergenz der Proteinfunktion hauptverantwortlich sind. Schwachlicht konnte die Interaktion beider SPA-Proteine mit COP1 nicht inhibieren. Darüber hinaus war die Assoziation von SPA2 mit Cryptochromen nicht stärker als die von SPA1, was darauf hinweist, dass die unterschiedliche Aktivität der beiden Proteine nicht mit einer unterschiedlichen Inaktivierung der entsprechenden COP1/SPA-Komplexe durch die Cryptochrome erklärt werden kann. Die Funktionen der SPA1- und SPA2-N-Termini unterscheiden sich hinsichtlich der Unterdrückung der Photomorphogenese, ähneln sich jedoch bezüglich ihres Effekts auf die SPA-Proteinstabilität im Licht.