

Abstract

Plants, as photoautotrophic organisms, are highly dependent on the quantity and quality of the available light. To monitor their light environment and to optimally adjust their growth and development accordingly, plants have evolved a highly complex and interconnected light signaling network, which allows the perception and conversion of light signals into morphological adaptations throughout the entire lifecycle. In *Arabidopsis thaliana*, the COP1/SPA complex plays within this network a central role as a key negative regulator of light signaling in the dark. While its function in Arabidopsis light signaling is well understood, its evolutionary origin is still largely unknown. Since SPA genes are plant-specific, a function of the COP1/SPA complex in light signaling might have been a prerequisite of one of the most remarkable events in plant evolution – the conquest of land – that was accompanied by dramatically changed light conditions.

In this study, I extensively analyzed the role of the COP1/SPA complex in the moss *Physcomitrium patens* to understand its evolution and, furthermore, to infer whether COP1/SPA-mediated light signaling might have been a prerequisite for plant terrestrialization. Thus, I first generated a *Ppcop1_9x* mutant with mutations in all nine *PpCOP1* genes via CRISPR/Cas9. Phenotypic analysis revealed that PpCOP1s and PpSPAs are indeed involved in the negative regulation of several light responses in darkness, such as the control of side-branching and chloroplast development. Since several phenotypes were more pronounced in *Ppcop1_9x*, PpCOP1s might play a more important role than PpSPAs. On the other hand, the etiolation of dark-grown gametophores is only slightly affected by PpCOP1s and PpSPAs, indicating that there are also important differences between the COP1/SPA complex in *Physcomitrium* and *Arabidopsis*. RNAseq analysis further supported the hypothesis of an involvement of the PpCOP1/SPA complex in the repression of photomorphogenic development in the dark. Furthermore, *in vivo* protein-protein interaction analyses with the blue-light photoreceptor PpCRY1b as well as with the putative target TF PpHY5b indicated a conserved mechanism of interaction with both PpCOP1a and PpSPAa. Finally, the genetic interaction between the PpHY5 and the PpCOP1/SPA complex was analyzed by introducing mutations in *PpHY5a* and *PpHY5b* into *Ppcop1_9x* and *Ppspa_ab* mutants. Here, I could show that PpCOP1/SPA and PpHY5 proteins antagonistically regulate gametophore growth in light and that the PpCOP1/SPA-mediated repression of light signaling likely does not occur via PpHY5s.

Zusammenfassung

Pflanzen sind als photoautotrophe Organismen stark von der Quantität und Qualität des verfügbaren Lichts abhängig. Um das Licht in ihrer Umgebung zu detektieren und ihr Wachstum sowie ihre Entwicklung optimal darauf abzustimmen, haben Pflanzen ein hochkomplexes und vernetztes Lichtsignalnetzwerk entwickelt, das die Wahrnehmung und Umsetzung von Lichtsignalen in morphologische Anpassungen während des gesamten Lebenszyklus ermöglicht. In *A. thaliana* spielt der COP1/SPA-Komplex innerhalb dieses Netzwerks als Hauptrepressor der Lichtsignaltransduktion im Dunkeln eine zentrale Rolle. Während seine Funktion in Arabidopsis gut erforscht ist, ist sein evolutionärer Ursprung noch weitgehend unbekannt. Da SPA Gene pflanzenspezifisch sind, könnte eine Funktion des COP1/SPA-Komplexes in der Lichtsignaltransduktion eine Voraussetzung für eines der bedeutendsten Ereignisse in der Pflanzenevolution gewesen sein – der Terrestrialisierung – welche mit dramatisch veränderten Lichtverhältnissen einherging.

In dieser Arbeit habe ich die Rolle des COP1/SPA-Komplexes im Moos *Physcomitrium patens* intensiv analysiert, um dessen Evolution zu verstehen und darüber hinaus abzuleiten, ob COP1/SPA-vermittelte Lichtsignale eine Voraussetzung für die Terrestrialisierung von Pflanzen gewesen sein könnten. Daher habe ich zunächst mittels CRISPR/Cas9 eine *Ppcop1_9x* Mutante mit Mutationen in allen neun *PpCOP1* Genen erzeugt. Die phänotypische Analyse zeigte, dass PpCOP1s und PpSPAs tatsächlich an der negativen Regulierung mehrerer Lichtantworten im Dunkeln beteiligt sind, wie z. B. an der Kontrolle der Verzweigung von protonemalen Filamenten und der Chloroplastenentwicklung. Da mehrere Phänotypen in *Ppcop1_9x* Mutanten stärker ausgeprägt waren, könnten PpCOP1s eine wichtigere Rolle spielen als PpSPAs. Andererseits wird die Etiolierungsantwort von Gametophoren nur geringfügig von PpCOP1s und PpSPAs beeinflusst, was darauf hindeutet, dass es auch wesentliche Unterschiede zwischen dem COP1/SPA-Komplex in *Physcomitrium* und *Arabidopsis* gibt. Die Hypothese, dass der PpCOP1/SPA-Komplex an der Unterdrückung der Photomorphogenese im Dunkeln beteiligt ist, wurde mittels RNAseq-Analyse weiter bestärkt. Darüber hinaus zeigten *in vivo* Protein-Protein Interaktionsanalysen mit dem Blaulicht-Photorezeptor PpCRY1b sowie mit dem potenziellen Substrat TF PpHY5b einen konservierten Interaktionsmechanismus mit

PpCOP1a sowie mit PpSPAA. Schließlich wurde die genetische Interaktion zwischen PpHY5 und dem PpCOP1/SPA-Komplex analysiert, indem zunächst Mutationen in *PpHY5a* und *PpHY5b* in *Ppcop1_9x* und *Ppspa_ab* Mutanten eingeführt wurden. Hier konnte ich zeigen, dass PpCOP1/SPA- und PpHY5-Proteine das Wachstum von Gametophoren im Licht antagonistisch regulieren und dass die PpCOP1/SPA-vermittelte Unterdrückung der Lichtsignaltransduktion wahrscheinlich nicht über PpHY5s erfolgt.