Abstract

Light is a fundamental regulator of plant development, functioning both as an energy source and a critical signaling cue. Central to light-mediated responses is the COP1-SPA E3 ubiquitin ligase complex, a negative regulator of photomorphogenesis that targets light-responsive transcription factors for degradation in darkness. Photoreceptors inactivate this complex under illumination through multiple mechanisms, enabling light-dependent developmental processes such as photomorphogenesis and flowering. *Arabidopsis thaliana* employs four functionally specialized SPA proteins (SPA1-4) that exhibit both redundant and divergent roles in light signaling. While SPA1 and SPA2 predominantly mediate photomorphogenesis suppression in darkness, SPA3 and SPA4 primarily influence vegetative growth and flowering regulation. Notably, SPA2 demonstrates outstanding light sensitivity, undergoing rapid degradation upon brief illumination through phytochrome-mediated interactions and COP1-dependent ubiquitination. This instability leads to immediate COP1-SPA complex inactivation, contrasting with the sustained functionality of SPA3 and SPA4 under light conditions. Such differential regulation highlights the temporal and mechanistic specialization among SPA proteins in coordinating light-responsive developmental transitions.

This investigation focuses on elucidating the molecular determinants of protein stability regulation by analyzing light-dependent stabilization mechanisms of Arabidopsis SPA3 and SPA4 proteins. Protein stability analyses under varied illumination demonstrated that both SPA3 and SPA4 maintain light-independent stability, contrasting with the light-sensitive degradation of SPA2. Comparative sequence alignment identified maximal divergence in N-terminal domains across SPA proteins. Swap domain experiments revealed that the N-terminal domain between SPA2 and SPA3 determined the protein stability for SPA2 and SPA3, suggesting evolutionary divergence in the N-terminal domain-mediated stability regulation among SPA family members.

Protein interaction studies demonstrated that SPA2-NT associates with phytochrome A (phyA), facilitating far-red light-induced degradation. To test functional conservation, several assays evaluating SPA3-NT and SPA4-NT with phyA interactions were performed. Yeast two-hybrid and split-luciferase complementation assays demonstrated the inability of phyA to bind SPA3-NT or SPA4-NT, providing mechanistic insight into their light-stable phenotypes. This differential interaction capacity suggests the evolutionary specialization of N-terminal domains in mediating

photoreceptor-dependent stability control.

By refining SPA2-NT into three smaller regions via sequence similarity, the interaction domain with phyA was localized to the first 234 amino acids within the non-conserved region of SPA2-NT by Y2H assay. Functional analysis of deletion and insertion constructs in transgenic lines demonstrated that this region contributes to the divergent roles of SPA2 and SPA3 in repressing photomorphogenesis under light conditions. Additionally, the first 234 amino acids were implicated in differences in SPA2 and SPA3 protein stability. This study identifies the less conserved N-terminal region of SPA2 as a key factor in its functional divergence from SPA3. The findings establish that variations in N-terminal region determine SPA-specific stability regulation, with evolutionary differences in phyA-binding capacity driving functional specialization among SPA proteins. This mechanism enhances our understanding of how structural variation within conserved protein families enables precise environmental signal regulation of plant development.

Zusammenfassung

Licht ist ein grundlegender Regulator der Pflanzenentwicklung, der sowohl als Energiequelle als auch als wichtiger Signalgeber fungiert. Eine zentrale Rolle bei lichtvermittelten Reaktionen spielt der COP1-SPA E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex, ein negativer Regulator der Photomorphogenese, der auf Licht reagierende Transkriptionsfaktoren zum Abbau in der Dunkelheit ansteuert. Photorezeptoren inaktivieren diesen Komplex unter Beleuchtung durch mehrere Mechanismen und ermöglichen so lichtabhängige Entwicklungsprozesse wie Photomorphogenese und Blüte. *Arabidopsis thaliana* verfügt über vier funktionell spezialisierte SPA-Proteine (SPA1-4), die sowohl redundante als auch divergierende Funktionen bei der Lichtsignalgebung haben. Während SPA1 und SPA2 in erster Linie die Unterdrückung der Photomorphogenese bei Dunkelheit vermitteln, beeinflussen SPA3 und SPA4 in erster Linie das vegetative Wachstum und die Regulierung der Blüte. SPA2 ist besonders lichtempfindlich und wird bei kurzer Beleuchtung durch Phytochrom-vermittelte Interaktionen und COP1-abhängige Ubiquitinierung schnell abgebaut. Diese Instabilität führt zu einer sofortigen Inaktivierung des COP1-SPA-Komplexes, während SPA3 und SPA4 unter Lichtbedingungen ihre Funktionalität beibehalten. Diese unterschiedliche Regulierung unterstreicht die zeitliche und mechanistische Spezialisierung der SPA-Proteine bei der Koordinierung von lichtabhängigen Entwicklungsübergängen.

Diese Untersuchung konzentriert sich auf die Aufklärung der molekularen Determinanten der Regulierung der Proteinstabilität durch die Analyse der lichtabhängigen Stabilisierungsmechanismen der Proteine SPA3 und SPA4 von *Arabidopsis*. Analysen der Proteinstabilität unter verschiedenen Beleuchtungsbedingungen zeigten, dass sowohl SPA3 als auch SPA4 eine lichtunabhängige Stabilität aufweisen, im Gegensatz zum lichtempfindlichen Abbau von SPA2. Ein vergleichender Sequenzabgleich ergab eine maximale Divergenz der N-terminalen Domänen der SPA-Proteine. Swap-Domain-Experimente ergaben, dass die N-terminale Domäne zwischen SPA2 und SPA3 die Proteinstabilität von SPA2 und SPA3 bestimmt, was auf eine evolutionäre Divergenz bei der durch die N-terminale Domäne vermittelten Stabilitätsregulierung unter den Mitgliedern der SPA-Familie hindeutet.

Proteininteraktionsstudien haben gezeigt, dass SPA2-NT mit Phytochrom A (phyA) assoziiert ist und den durch Rotlicht induzierten Abbau erleichtert. Um die funktionelle Erhaltung zu prüfen, wurden verschiedene Tests zur Bewertung der Interaktionen von SPA3-NT und SPA4-NT mit phyA durchgeführt. Yeast Two-Hybrid- und Split-Luciferase-Komplementierungstests zeigten, dass phyA

nicht in der Lage ist, SPA3-NT oder SPA4-NT zu binden, was einen mechanistischen Einblick in ihre lichtstabilen Phänotypen ermöglicht. Diese unterschiedliche Interaktionskapazität deutet auf eine evolutionäre Spezialisierung der N-terminalen Domänen bei der Vermittlung der Photorezeptor-abhängigen Stabilitätskontrolle hin

Durch die Aufteilung von SPA2-NT in drei kleinere Regionen mittels Sequenzähnlichkeit wurde die Interaktionsdomäne mit phyA mittels Y2H-Assay in den ersten 234 Aminosäuren innerhalb der nicht konservierten Region von SPA2-NT lokalisiert. Funktionelle Analysen von Deletions- und Insertionskonstrukten in transgenen Linien zeigten, dass diese Region zu den unterschiedlichen Rollen von SPA2 und SPA3 bei der Unterdrückung der Photomorphogenese unter Lichtbedingungen beiträgt. Darüber hinaus wurden die ersten 234 Aminosäuren mit den Unterschieden in der Proteininstabilität von SPA2 und SPA3 in Verbindung gebracht. Diese Studie identifiziert die weniger konservierte N-terminale Region von SPA2 als Schlüsselfaktor für die funktionelle Divergenz von SPA3. Die Ergebnisse belegen, dass Variationen in der N-terminalen Region die SPA-spezifische Stabilitätsregulierung bestimmen, wobei evolutionäre Unterschiede in der phyA-Bindungskapazität die funktionelle Spezialisierung der SPA-Proteine vorantreiben. Dieser Mechanismus verbessert unser Verständnis dafür, wie strukturelle Variationen innerhalb konservierter Proteinfamilien eine präzise Regulierung von Umweltsignalen in der Pflanzenentwicklung ermöglichen.