

Abstract

A set of photoreceptors enables plants to sense temporal and spatial information from the surrounding light conditions. The intensity, wavelength and duration of the light cues are processed by the photoreceptors and the underlying molecular network, which coordinates growth development adaptations and reproduction strategies of the plant accordingly. In the angiosperm *Arabidopsis thaliana*, the AtSPA / AtCOP1 complex holds a central position in this molecular light signaling network as a repressor of photomorphogenesis in darkness and moreover also in the light with residual activity. Homologous genes of *AtSPA* and *AtCOP1* were identified in the bryophyte model plant *Physcomitrella patens* and were investigated in this work for their potential function in the light-signaling pathway of mosses, which is poorly understood. First, *Arabidopsis spa* mutant seedlings, expressing transgenic *PpSPAb* from *Physcomitrella patens*, were investigated for the functional complementation of *PpSPA* gene function in darkness. *PpSPAb* was not found to be functionally conserved, while *PpCOP1* was previously shown to be effective in the repression of photomorphogenesis of *Arabidopsis thaliana*. The activity of the E3 ubiquitin ligase AtCOP1 is positively stimulated by the binding of the AtSPA proteins that act in concert with AtCOP1 in order to polyubiquitinate transcription factors, which promote photomorphogenesis, for subsequent degradation by the 26S proteasome. The physical binding of AtSPAs to AtCOP1 and to their target proteins is crucial for the effectiveness of targeted proteolysis. In this work, the protein / protein interactions between PpCOP1 and PpSPAb, as well as with potential target proteins like PpHY5b or the PpCOLs were investigated. Furthermore, the fluorescence-tagged PpSPAb and PpCOP1 as well as the potential target proteins of *Physcomitrella patens* co-localized together in subnuclear foci in transient expressing epidermal onion cells and in *Physcomitrella patens* cells, indicating that the determined protein / protein interaction of these components is potentially also relevant *in planta*. The endogenous function of *PpSPAa* and *PpSPAb* genes was investigated by PEG-mediated targeted gene disruption of the respective *PpSPA* loci in *Physcomitrella patens*, which resulted in stably transformed *PpspaA PpspaB* double knockout lines. The gametophores of these *PpspaA PpspaB* double knockout lines exhibited a hypersensitivity to white light. A model is proposed that provides an explanation for the repression of photoreceptor light signaling by the *PpSPA* genes. Hence, the *PpSPAs* likely repress photomorphogenesis also in the moss *Physcomitrella patens*.

Zusammenfassung

Mehrere Photorezeptoren befähigen Pflanzen dazu sich durch die umgebenen Lichtbedingungen zeitliche und räumlich zu orientieren. Die Intensität, Wellenlänge und Zeitdauer der Lichtsignale werden durch Photorezeptoren und deren nachgeschalteten molekularen Netzwerken verarbeitet, sodass das Wachstum, die Entwicklung und die Fortpflanzungsstrategien der Pflanzen an die Lichtsignale entsprechend anpasst werden. In der Samenpflanze *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) nimmt der AtSPA / AtCOP1 Komplex eine zentrale Position in dem molekularen Netzwerk der Lichtsignalverarbeitung ein, wobei der Komplex der Photomorphogenese sowohl in der Dunkelheit, als auch vermindert im Licht entgegenwirkt. Homologe Gene zu *AtSPA* und *AtCOP1* wurden auch in der Moos Modelpflanze *Physcomitrella patens* (Kleines Blasenmützenmoos) identifiziert und in dieser Arbeit auf ihre Funktion im Lichtsignalweg der Moose hin untersucht, über den wenig bekannt ist. Dazu wurde zunächst das Transgen *PpSPAb* aus *Physcomitrella patens* in *Atspa*-mutanten Keimlingen expremiert und auf eine konservierte Funktion im Dunkeln hin untersucht. Die Untersuchung ergab, dass *PpSPAb* funktionell nicht konserviert ist, wobei sich zuvor *PpCOP1* als effektiv in der Hemmung der Photomorphogenese von *Arabidopsis thaliana* erwies. Durch die physikalische Bindung der AtSPA Proteine an die E3 Ubiquitin Ligase AtCOP1 wird deren Aktivität positiv stimuliert. Dabei wirken die AtSPA Proteine mit AtCOP1 zusammen um jene Transkriptionsfaktoren, welche die Photomorphogenese fördern, über das 26S-Proteasome mittels Poly-Ubiquitinierung abzubauen. Die physikalische Bindung zwischen AtSPA und AtCOP1, sowie zu deren Zielproteinen, ist für eine effektive und zielgerichtete Proteolyse entscheidend. In dieser Arbeit wurde die Protein / Protein Interaktion zwischen *PpCOP1* und *PpSPAb*, als auch mit deren potentiellen Zielproteinen *PpHY5b* und *PpCOLs*, gezeigt. Desweiteren waren die Fluoreszenz-markierte *PpSPAb* und *PpCOP1* Proteine, sowie deren potenzielle Zielproteine aus *Physcomitrella patens*, zueinander assoziiert in den Zellkernen von transient-expremierenden Epidermiszellen der Zwiebel sowie von *Physcomitrella* Zellen lokalisiert. Auf Grund dieser Daten vermutet man, dass die physikalische Interaktion zwischen *PpCOP1* und *PpSPAb* auch mit Hinblick auf deren räumliche Nähe innerhalb des Zellkerns eine Relevanz in der Pflanze hat. Die endogene Funktion der *PpSPA* Gene wurde mit Hilfe der PEG-vermittelten gerichteten Gen-Deletion beider *PpSPA* Loci in *Physcomitrella patens* untersucht. Hierbei wiesen die Gametophoren der *PpspaA PpspaB* Doppelmutanten eine Hypersensitivität gegenüber weißem Licht auf. In einem Model wird die Funktion der *PpSPA* Gene im Zusammenhang mit den Photorezeptor-induzierten Lichtsignalwegen erläutert. Demnach wird die Photomorphogenese in *Physcomitrella patens* ebenfalls durch die *SPA* Gene gehemmt.