

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

Institut für Biowissenschaften

Fachgebiet: *Plant Physiology*

Betreuer: Jun.-Prof. Andreas Richter

Name: Gali Estopare Araguirang

(e-mail: gearaguirang@icloud.com)

When plants paint their leaves purple: Spliceosomal complex components regulate acclimation responses during high light in Arabidopsis

Deutsche Zusammenfassung

Die Akklimatisierung ist entscheidend für das Überleben und die Produktivität von Pflanzen, da sie ihnen ermöglicht, effektiv auf Umweltstressoren wie hohe Lichtintensität, extreme Temperaturen, Trockenheit und Nährstoffschwankungen zu reagieren. Um sich anzupassen, entwickeln Pflanzen spezielle Mechanismen, darunter die Akkumulation von Anthocyanen, die helfen, Schäden zu minimieren und das metabolische Gleichgewicht aufrechtzuerhalten.

Durch einen forward-genetischen Screen zur Identifizierung neuer Faktoren in der Anthocyan-Biosynthese konnte Increased Level of Polyploidy1 (ILP1) isoliert werden – ein bisher wenig charakterisiertes Protein, das stromaufwärts dieses Signalwegs agiert. Trotz seines potenziellen Einflusses wurden nur wenige Studien zu ILP1 durchgeführt, wodurch seine Rolle in der Akklimatisierung und im Stoffwechsel weitgehend unbekannt blieb.

Um diese Wissenslücke zu schließen, wurde ein multidisziplinärer Ansatz angewandt, der umfassende genetische, transkriptomische, metabolische, zellbiologische und physiologische Analysen kombinierte. Eine zeitaufgelöste Transkriptomanalyse unter hoher Lichtintensität zeigte, dass der Stärke- und Zuckermetabolismus in der *ilp1-1*-Mutante gestört ist. Die biochemische Quantifizierung von Stärke, zytosolischen Zuckern (Saccharose, Fruktose und Glukose) sowie phosphorylierten Zuckern (wie Trehalose-6-phosphat und Saccharose-6-phosphat) in *ilp1-1* zeigte eine signifikante Akkumulation unter hoher Lichtintensität.

Darüber hinaus zeigte eine zeitaufgelöste metabolische Kartierung von *ilp1-1* unter hoher Lichtintensität, dass die meisten Aminosäuren während der Akklimatisierung in verringerten Mengen vorlagen. Dies deutet auf ein erhebliches Ungleichgewicht zwischen Kohlenstoff- und Stickstoffpools hin, da gleichzeitig die Zuckerkonzentration anstieg und der Aminosäuregehalt sank.

Um die Funktion von ILP1 weiter zu untersuchen, erzeugte ich Überexpressions- und komplementäre Zur weiteren Untersuchung der *ILP1*-Funktion wurden Überexpressions- und genetische Komplementationslinien von *ILP1* generiert.

Interessanterweise unterdrückte die Überexpression von *ILP1* die Produktion löslicher Zucker unter hoher Lichtintensität, was auf eine regulatorische Rolle im Zuckerstoffwechsel hinweist. Zusätzlich wurden stabile *ILP1* Trunkierungsmutanten erzeugt und charakterisiert, um die funktionellen Rollen der einzelnen Domänen zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigten, dass *ILP1*, insbesondere seine GC-reiche DNA-Bindedomäne, die Zuckerakkumulation unterdrückt und somit einen zentralen molekularen Mechanismus in der metabolischen Regulation darstellt.

Angesichts der zusätzlichen Rolle von *ILP1* in der Funktion des Spleißosoms und der MikroRNA-Biogenese wurde eine systematische Untersuchung anderer Mutanten innerhalb dieses Komplexes sowie aus verschiedenen Phasen des Spleißzyklus durchgeführt. Dazu gehörten *NTC-RELATED PROTEIN1 (NTR1)*, *PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS1 (PRL1)* und *PRE-mRNA PROCESSING8 (PRP8)* sowie *SERRATE1 (SE1)*, das in der miRNA-Prozessierung eine Rolle spielt. Auffällig war, dass die Mutanten von *NTR1*, *PRL1* und *PRP8*, jedoch nicht *SE1*, ähnliche Akklimatisierungsphänotypen wie *ilp1-1* zeigten. Diese waren gekennzeichnet durch eine übermäßige Anthocyanin-Akkumulation, erhöhte zytosolische Zuckerwerte und verringerte Aminosäuregehalte unter Hochlichtbedingungen. Dies deutet darauf hin, dass diese Spleißosomen-Mutanten eine unverzichtbare Rolle in der metabolischen Regulation der Akklimatisierungsreaktion spielen.

Zusammenfassend erweitert diese Dissertation das aktuelle Wissen über die Rolle von *ILP1* über die transkriptionelle Repression hinaus und liefert neuartige Einblicke in seine umfassendere Funktion bei der metabolischen Homöostase während der Akklimatisierungsreaktion. Darüber hinaus stellt diese Studie ein grundlegendes Konzept bereit und schafft eine fundamentale Grundlage für das Verständnis, wie Spleißosomen-Komponenten, oder in größerem Umfang das gesamte Spleißosom, als Akklimatisierungsmarker fungieren und adaptive Reaktionen in Pflanzen unter Hochlichtbedingungen regulieren.

Englisch Zusammenfassung

Acclimation is essential for plant survival and productivity, enabling them to respond effectively to environmental stressors such as high light intensity, extreme temperatures, drought, or nutrient fluctuations. To adapt to these changing environments, plants develop specialized mechanisms, including the accumulation of anthocyanins, which help mitigate damage and maintain metabolic balance.

Through a forward genetic screen aimed at identifying new factors involved in anthocyanin biosynthesis, Increased Level of Polyploidy1 (*ILP1*), a previously elusive protein that functions upstream of this pathway, was isolated. Despite its

potential significance, only a handful of studies had characterized ILP1, leaving its role in acclimation and metabolism largely unknown.

To bridge this knowledge gap, a multidisciplinary approach incorporating extensive genetics, transcriptomics, metabolomics, cell biology, and physiological assays was employed. A time-resolved transcriptomic analysis during high light exposure revealed that starch and sugar metabolism are disrupted in the *ilp1-1* mutant. Biochemical quantification of starch, cytosolic sugars (sucrose, fructose, and glucose), and phosphorylated sugars (such as trehalose-6-phosphate and sucrose-6-phosphate) in *ilp1-1* showed significant accumulation during high light conditions.

Moreover, a time-resolved metabolic map of *ilp1-1* under high light exposure demonstrated that most amino acids exhibited reduced levels during acclimation. This suggests a striking imbalance in carbon-to-nitrogen pools, given the concurrent increase in sugar levels and decrease in amino acid content.

To further investigate ILP1's function, overexpression and genetic complementation lines of *ILP1* were generated. Interestingly, *ILP1* overexpression suppressed soluble sugar production under high light, indicating a regulatory role in sugar metabolism. Stable truncation mutants of ILP1 were also established and characterized to dissect the functional roles of its different domains. The results revealed that ILP1, particularly its GC-rich DNA-binding domain, represses sugar accumulation, highlighting a key molecular mechanism in metabolic regulation.

Given ILP1's additional implications in spliceosomal function and microRNA biogenesis, a systematic screen was conducted on other mutants within this complex and from different stages of the splicing cycle, including *NTC-RELATED PROTEIN1 (NTR1)*, *PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS1 (PRL1)*, and *PRE-mRNA PROCESSING8 (PRP8)*, and *SERRATE1 (SE1)* from miRNA processing. Notably, *NTR1*, *PRL1*, and *PRP8* mutants, but not *SE1*, exhibited similar acclimation phenotypes to *ilp1-1*, characterized by anthocyanin overaccumulation, increased cytosolic sugars, and reduced amino acid levels under high light conditions. This indicates that these spliceosomal mutants are indispensable in the metabolic regulation of acclimation response.

Taken together, this dissertation further expands the current knowledge on ILP1's role beyond transcriptional repression, providing unprecedented insights on its broader function in metabolic homeostasis during acclimation response. Additionally, this study clearly provides an initial framework and a fundamental understanding of how spliceosomal components, or to a larger extent, the whole spliceosome, act as acclimation markers and regulate adaptive responses in plants during high light.