

Post-Translational Regulation of CONSTANS Protein in the Photoperiod Pathway of *Arabidopsis thaliana*

ABSTRACT

In many plant species day length regulates the transition from vegetative to reproductive phase in response to the changing seasons. In *Arabidopsis thaliana*, the *CONSTANS* (*CO*) gene acts at the core of the photoperiod pathway that promotes the flowering response to long days. The circadian clock and light perception combine to confer day-length regulation of *CO* activity at both the transcriptional and the post-translational levels. *CO* mRNA oscillates under long day (LD) and short day (SD), but under LDs is increased in abundance at the end of the day and at that time, post-translational regulation also increases the stability of *CO* protein. The ubiquitin ligase CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) and its interacting protein SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME A 1 (SPA1) reduce the abundance of *CO* during the night, but in the afternoon of LDs their activity is antagonized by the photoreceptors PHYTOCHROME A (PHYA), CRYPTOCHROME 1 (CRY1) and CRYPTOCHROME 2 (CRY2) allowing *CO* levels to increase. An increasing body of evidence points towards a key role of post-translational regulation of *CO* as an essential mechanism in the photoperiod control of flowering. However, the full implication of post-translational modifications in the modulation of *CO* protein abundance and activity as well as the functional characteristics of *CO* domains has yet to be investigated. In this study, phosphorylation of *CO* was found to occur both in light and dark and this post-translational modification renders the protein susceptible to 26S proteasome-mediated degradation. Genetic and biochemical approaches confirmed that PHYA, CRY1 and CRY2 promote *CO* stability and activity via suppression of COP1, even though they probably do not participate directly in *CO* phosphorylation. The significance of conserved domains in *CO* was evaluated using various transgenic lines expressing mutated or truncated forms of *CO* protein. This analysis emphasized that the integrity of VP motifs is essential for controlled proteolysis of the protein and that the C-terminal part of *CO* confers

phosphorylation and dark-mediated degradation. Although CO contains a putative recognition site for Casein Kinase 2, genetic and inhibitor studies suggest that it might not be the kinase responsible for CO phosphorylation. The findings in this research indicate that phosphorylation is a key regulator of CO post-translational control. CO phosphorylation is proposed to sensitize the protein and target it for ubiquitination thereby initiating active degradation through the proteasome. Although further investigation is needed in order to answer how CO phosphorylation influences its activity, the findings presented in this study provide new insights into the mechanism of CO post-translational regulation in the context of the photoperiodic flowering pathway.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Länge des Tages reguliert den Übergang von der vegetativen zur reproduktiven Phase in vielen Pflanzenarten. In *Arabidopsis thaliana* steht das Gen *CONSTANS (CO)* an einer Schlüsselstelle des photoperiodischen Signalweges um Blühen unter Langtag Bedingungen einzuleiten. Die zirkadiane Uhr und Licht als Signal kombiniert regulieren die Aktivität von CO in Abhängigkeit der Tageszeit, sowohl transkriptionell als auch post-transkriptionell. CO mRNA oszilliert in Langtag und Kurztag, aber unter Langtagbedingungen gibt es ein Maximum am Ende des Tages, zu einer Zeit wenn post-translationale Regulation die Stabilität von CO Protein zusätzlich erhöht. Die Ubiquitin Ligase CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) und das interagierende Protein SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME A 1 (SPA1) reduzieren die Menge von CO in der Nacht, am Nachmittag eines Langtages dagegen wird deren Aktivität durch die Photorezeptoren PHYTOCHROME A (PHY A), CRYPTOCHROME 1 (CRY 1) und CRYPTOCHROME 2 (CRY2) aufgehoben, was zu steigenden CO Protein führt. Immer mehr Ergebnisse weisen darauf hin, dass die post-translationale Regulation von CO Protein essentiellen Einfluss auf photoperiodische reguliertes Blühen hat. Allerdings wurde der Einfluss von post-translationalen Mechanismen auf die Menge und Aktivität von CO Protein und die funktionellen Eigenschaften der einzelnen CO Domänen bisher noch nicht vollständig untersucht. In dieser Studie wird gezeigt, dass Phosphorylierung von CO Protein sowohl in Licht als auch in Dunkelheit auftritt und dass diese post-translationale Modifikation das Protein empfänglich für den Abbau über das 26S Proteasome macht. Genetische und biochemische Experimente bestätigen, dass PHYA, CRY1 and CRY2 die Stabilität und Aktivität von CO durch Unterdrückung von COP1 fördern, auch wenn sie wahrscheinlich nicht direkt an der Phosphorylierung von CO beteiligt sind. Die Wichtigkeit der konservierten Domänen von CO wurde mit Hilfe von verschiedenen transgenen Linien, welche mutierte oder gekürzte Versionen von CO produzieren, erforscht. Diese Analyse unterstreicht, dass die Unversehrtheit von sogenannten VP Motiven für die kontrollierte Proteolyse des Proteins essentiell ist und dass der C-terminale Teil von CO dem Protein die Möglichkeit von Phosphorylierung und Abbau im Dunkeln verleiht. Obwohl CO eine mögliche Erkennungsstelle für Casein Kinase 2 besitzt zeigen genetische und chemisch inhibitorische Methoden, dass diese wahrscheinlich nicht für die Phosphorylierung von CO zuständig ist. Wie diese Studie herausstellt ist die Phosphorylierung ein Schlüsselschritt in der post-translationalen Regulation von CO. Es ist möglich, dass die Phosphorylierung von CO das Protein sensibilisiert und damit den aktiven Abbau über das 26S Proteasome einleitet. Obwohl weitere Untersuchungen nötig sind um zu

beantworten wie die Phosphorylierung von CO dessen Aktivität beeinflusst, zeigt diese Studie doch neue Einblicke in die Mechanismen, welche die post-translationale Regulation im Kontext des photoperiodischen Signalwegs steuern.