

## Study of components and regulatory roles of TFIIH-associated CDKF;1 protein kinase in Arabidopsis

**Keywords:** cyclin dependent kinase CDKF;1, RNA polymerase II, general transcription factor TFIIH, Casein kinase, Elongated hypocotyl 5

**Abstract:** The RNA polymerase II (RNAPII) general transcription factor TFIIH plays a central role in the regulation of transcription, DNA repair and activation of cyclin-dependent kinases (CDKs) involved in cell cycle control. TFIIH is composed of kinase and DNA repair subcomplexes. In plants, three cyclin H-dependent CDKD homologs of human CDK7 form TFIIH complexes that activate the cell cycle kinase CDKA by T-loop phosphorylation and regulate transcription by phosphorylating serine 5 residues of C-terminal Y<sub>1</sub>S<sub>2</sub>P<sub>3</sub>T<sub>4</sub>S<sub>5</sub>P<sub>6</sub>S<sub>7</sub> heptapeptide repeats (CTD) of the RNAPII largest subunit. Through phosphorylation of their T-loops, the activity of CDKDs is regulated by their cyclin-independent upstream activating kinase CDKF;1, which modulates transcription and small RNA processing by phosphorylation of serine 7 residues of RNAPII CTD. How the activity of CDKF;1 is regulated by upstream cellular growth hormone and environmental signalling pathways is currently unknown. For identification of novel CDKF;1 interacting partners, we used a BAC (Bacterial Artificial Chromosome) recombineering technology, which facilitates simple modification of plant genes with coding sequences of green (GFP) and mCherry fluorescence proteins for cellular co-localization studies and affinity purification of corresponding tagged proteins. LC/MS analysis of GFP-tagged CDKD;2 confirmed its *in vivo* interaction with CDKF;1 and identified the conserved cyclin H, MAT1, XPD, p62, p53 and p44 TFIIH subunits. Inactivation of CDKF;1 abolished nuclear localization of CDKD;2. CDKF;1 was also identified in complex with the cyclin L-dependent CDKG;1 and 2 kinases, which are involved in the control of transcription elongation and co-transcriptional assembly of the spliceosome. CDKF;1 was found to function as upstream activating kinase that phosphorylates the T-loop of CDKG;2. CDKG levels are reduced by the *cdkf;1* mutation. Inactivation of CDKGs results in lethality, whereas individual *cdkg* mutations confer enhanced salt tolerance and delayed flowering. CDKF;1 is co-localized in nuclei with CDKDs and CDKGs, but also detected in the cytoplasm and around the plasma membranes. Casein kinase-like 3 (CKL3) implicated in blue light signalling was found to interact with CDKF;1 in the cytoplasm and punctate membrane-associated structures. CKL3 and its close homolog CKL4 are reported to phosphorylate and destabilize the blue light receptor CRY2, whereas their inactivation is suggested to enhance inhibition of hypocotyl elongation by HY5, the central bZIP transcription activator of blue light responses. Our data show that CDKF;1 phosphorylates the COP1-binding domain of HY5 *in vitro*. Short hypocotyl and anthocyanin overproduction phenotypes of the *cdkf;1* mutant suggest that HY5 is destabilized by CDKF;1-mediated phosphorylation. CKL3 phosphorylates CDKF;1 by inhibiting its activity *in vitro*. Further studies are required to confirm whether alleviation of CKL3-mediated phosphorylation of Cry2 blue light receptor in the darkness indeed leads to HY5 destabilization by CDKF;1-mediated phosphorylation, in contrast to blue light

induced activation of Cry2 and inhibition of CDKF;1 by CKL3-mediated phosphorylation. CDKF;1 and CKL3 were detected in association with membrane targeted CDK-related protein kinases (CDKRs/PKs) that carry conserved myristoylation motives. Co-localization of CDKF1 with these kinases and T-loop phosphorylation of CDKF;1 by PK2C indicates that membrane-associated CDKRs/PKs represent upstream activating kinases of CDKF;1. Further study of identified upstream regulators of CDKF;1 is expected to provide a deeper insight into how external hormonal and light stimuli modulate the function of CDKF;1 as an activator of CDKD and CDKG kinases controlling transcription, DNA repair and cell division in plants.

**Zusammenfassung** : Der allgemeine Transkriptionsfaktor TFIIH der RNA-Polymerase II (RNAPII) spielt eine zentrale Rolle bei der Regulierung der Transkription, der DNA-Reparatur und der Aktivierung von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), die an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind. TFIIH besteht aus Kinase- und DNA-Reparatur-Subkomplexen. In Pflanzen werden TFIIH-Komplexe von drei cyclin-H-abhängigen CDKD-Homologen der menschlichen CDK7 gebildet, welche die Zellzyklus-Kinase CDKA durch T-Loop-Phosphorylierung aktivieren und Transkription durch Phosphorylierung von Serin-5-Resten der Y<sub>1</sub>S<sub>2</sub>P<sub>3</sub>T<sub>4</sub>S<sub>4</sub>S<sub>5</sub>P<sub>6</sub>S<sub>7</sub> Heptapeptid-Wiederholungen (CTD) am C-terminalen Ende der RNAPII größten Untereinheit regulieren. Durch die Phosphorylierung der T-Schleifen wird die Aktivität der CDKDs durch ihre cyclinunabhängige, stromaufwärts aktivierende Kinase CDKF;1 reguliert, die die Transkription und kleine-RNA-Verarbeitung mittels der Phosphorylierung von Serin-7-Resten der RNAPII CTD moduliert. Inwiefern die Aktivität von CDKF;1 durch vorgeschaltete zelluläre Wachstumshormon- und Umweltsignalwege reguliert wird, ist derzeit unbekannt. Zur Identifizierung neuartiger CDKF;1 interagierender Partner haben wir eine BAC (Bacterial Artificial Chromosome) Rekombinationstechnologie verwendet, die eine einfache Modifikation von Pflanzengenomen mit kodierenden Sequenzen von grünen (GFP) und mCherry Fluoreszenzproteinen für zelluläre Co-Lokalisierungsstudien und Affinitätsreinigung entsprechender markierter Proteine ermöglicht. LC/MS-Analyse von GFP-markiertem CDKD;2 bestätigte die in vivo Interaktion mit CDKF;1 und identifizierte die konservierte Cyclin H, MAT1, XPD, p62, p53 und p44 TFIIH Untereinheiten. Durch die Inaktivierung von CDKF;1 verlor CDKD;2 seine nukleare Lokalisierung. CDKF; 1 wurde auch in Komplex mit den Cyclin L-abhängigen CDKG;1 und CDKG;2 Kinasen identifiziert, die an der Kontrolle der Transkriptionsverlängerung und des co-transkriptionalen Zusammenbaus des Spleißosoms beteiligt sind. CDKF;1 funktioniert als stromaufwärts aktivierende Kinase, die den T-Loop von CDKG;2 phosphoryliert. Die cdkf;1-Mutation führt zu einem gesenkten CDKG-Gehalt und die Inaktivierung von CDKGs zu Letalität, während einzelne cdkg-Mutationen zu einer erhöhten Salztoleranz und verzögerter Blüte führen. CDKF;1 co-

lokalisiert im Zellkern mit CDKDs und CDKGs. Jedoch wurde CDKF;1 auch im Zytoplasma und um die Plasmamembranen herum nachgewiesen. Casein kinase-like 3 (CKL3), welches an der Signaltransduktion von Blaulicht beteiligt ist, interagiert mit CDKF;1 im Zytoplasma und in punktierten membranassoziierten Strukturen. Es wird berichtet, dass CKL3 und sein nahes Homolog CKL4 den Blaulicht-Rezeptor CRY2 phosphorylieren und destabilisieren, wohingegen ihre Inaktivierung vermutlich die Hemmung der Hypokotylverlängerung durch HY5, den zentralen bZIP-Transkriptionsaktivator von Blaulichtantworten, verstärkt. Unsere Daten zeigen, dass CDKF;1 die COP1-bindende Domäne von HY5 *in vitro* phosphoryliert. Der Phänotyp von *cdkf;1* Mutanten wird durch einen kurzen Hypokotyl und eine Anthocyaninüberproduktion charakterisiert, welches auf eine Destabilisierung von HY5 durch CDKF;1 vermittelte Phosphorylierung hinweist. CKL3-phosphoryliert CDKF;1 durch Hemmung seiner Aktivität *in vitro*. Weitere Studien sind erforderlich, um zu bestätigen, ob die Reduzierung der CKL3-vermittelten Phosphorylierung des Cry2-Blaulichtrezeptors in Dunkelheit tatsächlich zu einer HY5-Destabilisierung durch CDKF;1-vermittelte Phosphorylierung führt, im Gegensatz zur blaulicht-induzierten Aktivierung von Cry2 und Hemmung von CDKF;1 durch CKL3-vermittelte Phosphorylierung. CDKF;1 und CKL3 wurden in Verbindung mit membrangerichteten CDK-verwandten Proteinkinasen (CDKRs/PKs) nachgewiesen, welche konservierte Myristoylierungsmotive tragen. Die Co-Lokalisierung von CDKF1 mit diesen Kinasen und die T-Schleifen-Phosphorylierung von CDKF;1 durch PK2C deuten darauf hin, dass membranassoziierte CDKRs/PKs stromaufwärts aktivierende Kinasen von CDKF;1 darstellen. Weitere Studien über identifizierte Upstream-Regulatoren von CDKF;1 sollen einen tieferen Einblick in die Funktionsweise von CDKF;1 als Aktivator von CDKD- und CDKG-Kinasen liefern, die Transkription, DNA-Reparatur und Zellteilung in Pflanzen steuern.



