



Caracterización funcional del factor de transcripción ZmZIM91 de maíz

Isabel Cristina Vélez Bermúdez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL FACTOR DE
TRANSCRIPCIÓN ZmZIM91 DE MAÍZ**

Isabel Cristina Vélez Bermúdez

Barcelona, Abril 2013



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

AVANZADA

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL FACTOR DE

TRANSCRIPCIÓN ZmZIM91 DE MAÍZ

Memoria presentada por Isabel Cristina Vélez Bermúdez para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona.

Trabajo realizado en el Departamento de Genética Molecular del Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG)

Directoras de tesis

Tutor de tesis

Doctoranda

Dra. Montserrat Pagès Torrens

Dr. Albert Ferrer

Isabel Cristina Vélez Bermúdez

Dra. Marta Riera

A mis padres
A mis hermanas
A Jorge

*Si siempre intentas ser
normal nunca descubrirás
lo extraordinario que puedes
llegar a ser*

- Maya Angelou

Agradecimientos

Y como dijo Newton...“si he logrado ver más lejos, ha sido porque he subido a hombros de gigantes”...y por eso quiero aprovechar este espacio para agradecer a todos aquellos gigantes que me han acompañado durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

En primer lugar quiero agradecer a mi directora de tesis la Dra. Montserrat Pagès. Gracias Montse, no solo por haberme dado la oportunidad de hacer esta tesis doctoral sino por haberme apoyado en los momentos más difíciles y por ayudarme a finalizar esta tesis.

A mi co-directora de tesis Marta Riera. Gracias Marta, por haberme iniciado en la vida de laboratorio, por orientarme y por haberme permitido desarrollar mis ideas, además por apoyarme, aconsejarme y entenderme durante todos estos años.

Quiero también dar las gracias a la Dra. Josefa Badía, por toda la ayuda que me ha brindado, ya que con esto ha hecho de mi paso por la Universidad de Barcelona una grata experiencia.

Gracias a la gente del servicio de invernaderos, de proteómica, genómica, secuenciación, imágenes y microscopia del CRAG, en especial a la Dra. Montse Amenós...gracias Montse por haber sido mi profesora de microscopia, por todo lo que has compartido conmigo durante todos estos años y por tu amistad, te echaré mucho de menos.

Agradezco también al Ministerio de Ciencia e Innovación de España por la beca FPI con la cual realicé esta tesis doctoral.

Gracias a mis compañeros de laboratorio. Agnese tan única, gracias por hacer que mis últimos días en el lab fueran tan divertidos. A Elena tan tierna y dulce, gracias Elen por todo el cariño y el apoyo que me has brindado. A Mic y Tommi, les doy gracias por hacer mis tardes divertidas en el lab, por los consejos, por ayudarme y tolerarme con paciencia durante todos estos años. Y a los que ya no están...Cris gracias por toda la ayuda que me brindaste al comienzo de esta tesis y Sami gracias por compartir conmigo tus conocimientos de proteómica, eres un hombre admirable, un luchador. A Eva, a Vicky, Adela y Lola muchas gracias por su apoyo durante todos estos años, aprendí mucho de cada una.

También quiero agradecer al Doctor Roberto Solano y a los chicos de su laboratorio. Gracias Roberto por haberme permitido trabajar contigo, fue muy corto pero lo necesario para darme cuenta de la gran calidad que tienes como científico y como persona. Quiero además agradecer en especial a los Doctores Andrea Chini y José Manuel Franco. Gracias Andrea por estar siempre dispuesto a compartir conmigo tus

conocimientos y por ayudarme en lo que he necesitado y muchas gracias José Manuel por haber orientado mi trabajo durante mi estancia en Madrid.

Extiendo mi agradecimiento al Doctor Erich Grotewold y a los miembros de su laboratorio. Muchas gracias Erich, eres un gran científico y un excelente ejemplo a seguir, gracias por la paciencia que me tuviste y por todos los aportes científicos y personales que me diste, puedo decir que soy una persona e investigadora antes y otra después de ti. I would also like to thank the members in the Erich lab!. I wish to express special thanks to Dr. Kengo Morohashi...thank you Kengo for always being there, to guide me and teach me many things, you are a good scientist and I consider myself fortunate to have been your student. Also thanks, to the Dr. Nobutaka Mitsuda...thank you so much Nobu for all your help during my stay in the Erich lab!. También quiero agradecer muy especialmente a Isa, Kathe, Andrés y Dani por toda la ayuda científica, el apoyo emocional y por las cálidas cenas con los otros miembros de la “gran familia Colombiana” en Columbus.

Quiero agradecer también al Doctor David Caparrós. Gracias David por el apoyo y los consejos. También a Silvia, Joan y Pedro por el aporte que hicieron a este trabajo.

Muchas gracias a los Doctores Jesús Herney Moreno y Oscar Arango. Gracias Dr. Moreno por todo el cariño, el soporte emocional y por compartir conmigo tu familia y las cenas en Topanga en mis visitas a Colombia. Oscar, te debo mucho, gracias por el apoyo institucional y emocional con el que me has respaldado durante todos estos años porque con esto me has ayudado a llegar hasta este punto.

A mis hermanos, no de sangre pero de vida... Belmiro, Anahit, Beatriz, Imen y Ana Isabel...tengo tanto que decirles a cada uno, son lo mejor de todo este final...un tesoro invaluable para mí... Bel, no te diré que eres un gran científico, o que eres muy listo o que tienes un corazón de oro porque todo eso ya lo sabes!...lo que si te diré es gracias por enseñarme que compartir es importante, que tener gustos diferentes o particulares no hace a las personas anormales sino únicas y especiales, que Pessoa no era un poeta, sino un gran poeta, que en Portugal no solo nacen portugueses sino grandes amigos. Anahit, my Lady...eres única en tu “especie”, mi amiga...mi hermana, te debo tanto que no tengo palabras suficientes para expresar todo mi agradecimiento, que suerte tengo por haberte conocido, gracias por estar siempre a mi lado en las buenas y en las malas, te quiero muchísimo. Bea, mi chuli tierna y encantadora, eres para mí un ser muy importante, muchas gracias por haber hecho de mi vida algo especial, por haberme ayudado y enseñado tantas cosas...agradezco la oportunidad de ser tu amiga. Imen, mi dulce e incondicional amiga, no sé por dónde empezar...gracias por existir!, eres una excelente persona, mi ángel...gracias por enseñarme, ayudarme y orientarme en el laboratorio, pero sobre todo gracias por ser mi amiga...mi hermana!, por compartir conmigo a tu familia y toda tu vida. Anita, tú ya sabes que eres parte de mi vida, nos conocemos hace tanto que da igual que estemos lejos físicamente, porque nunca lo

estaremos espiritualmente. Gracias por estar conmigo en los momentos más importantes y por apoyarme y regañarme cuando lo he merecido.

A Inecita y María...mis amigas hermosas, qué haría yo sin ustedes chicas?, gracias por escucharme, animarme, cuidar de mi en tiempos difíciles, espero conservarlas en mi vida siempre porque las dos son muy valiosas para mí.

Gracias a los demás miembros de mi familia en Barcelona... A Mary Paz, muchas gracias Mary!...por tus consejos, ánimos y por ayudarme cuando más lo he necesitado. A Mina, mi mamá en Barcelona...Gracias por cuidar de mi durante todos estos años, eres estupenda y que conste que te quiero muchísimo y que espero siempre tenerte presente en mi vida. A Nuri, Maite, María José Alarcón, Thilia, Nata, Ester, Helen, Adrian, Nahuel, Juan Cruz, Ana, Merce, Pep, Norma, Kostas, Irina, Reinhard, Guio, Jud, Briardo, Nina, Eli, Águila, Rosa, Cata, Pablo Pulido, Jordi "heavy", Silvia, Asier, Abe, Laura, Albert, Mariana, Matt, Luis, Pablo "Bufalo", Wei, Jin, Lucio, Cris, Nico, Marçal y a todos los demás...gracias...por haber hecho de Barcelona mi segundo hogar...con un excelente reparto de amigos!

A la familia de Jorge...mi segunda familia...gracias a Amanda, Margarita, y Bellita por ser parte importante de mi vida, por llenar mis días de cariño y entusiasmo y en especial a Myriam, por todo el cuidado que me ha brindado durante tantos años, por la comprensión y por ser más que mi suegra, mi amiga. También quiero agradecer a Doña Trinidad (q.e.d), que aunque no alcanzo a estar presente en la finalización de este gran objetivo, siempre le voy a estar agradecida por haber cuidado de mi como si fuera su nieta, por sus rezos por mi bienestar y sus palabras de aliento.

A mis hermanas...Gloria y Paty...Gloris gracias por ser mi segunda mamá, por cuidarme, quererme incondicionalmente y velar por mi siempre en cada momento de mi vida. Paty, siempre fuiste mi ejemplo a seguir, te debo todo lo que soy y más, gracias por hacerme tan feliz con mi sobrino y por compartir conmigo este gran momento de tu vida, siempre seremos una en dos. Las amo demasiado a las dos!. Gracias también a Dani y a Fabi por cuidar de mis hermanas en mi ausencia y por ayudarme siempre en lo que he necesitado.

A mis papás...mami, gracias por enseñarme que emprender es más que una palabra, que amor es igual a incondicional, que las mujeres duras existen, que tesón se escribe con esfuerzo y sobre todo por demostrarme con tu ejemplo que cada día podemos ser mejores. Papi, siempre dicen que el alumno supera al maestro, pero en mi caso no es así, siempre serás mi maestro, agradezco a la vida cada día que me permite compartir contigo, así sea desde la distancia. Gracias a los dos por confiar en mí, por apoyar mis proyectos y mis locuras, por cuidar de mis perros, por estar siempre presentes durante todas las etapas de mi vida, por inculcarme valores y por motivarme cada instante a ser una mejor persona. Me siento muy orgullosa de ser su hija y nunca me cansaré de darles

las gracias a los dos por todo lo que hacen cada día por mí, solo me resta decirles que los amo mucho.

...Y eran una... y eran una... y eran una sola sombra larga... y eran una sola sombra larga... y eran una sola sombra larga...como decía nuestro poeta José Asunción Silva...eso somos nosotros Jorge... eres mi complemento, parte de mi, hemos crecido juntos y aprendido muchas cosas juntos, además no puedes negar que somos un gran equipo!. Gracias por emprender conmigo este reto, por cuidarme, por amarme incondicionalmente, por ser mi amigo leal, por sacar siempre lo mejor de mí, en pocas palabras por hacer de mi mundo un lugar mejor.

En fin...a todos aquellos que han hecho de mi vida durante estos años en Barcelona un lugar de aprendizaje...de cosas buenas y malas, que han enriquecido mi vida personal y laboral...MUCHAS GRACIAS!!

Tabla de contenido

1. Introducción.....	26
1.1 Percepción y señalización por jasmonato	30
1.2 La familia TIFY en plantas	32
1.3 Regulación de factores de transcripción mediante fosforilación	43
1.4 Regulación transcripcional.....	47
2. Objetivos	50
Capítulo I.....	52
3. Caracterización molecular de la proteína ZmZIM91 de maíz.....	52
3.1 Resultados.....	52
3.1.1 Obtención del cDNA completo de <i>ZmZIM91</i>	52
3.1.2 Localización subcelular de ZmZIM91	52
3.1.3 ZmZIM91 pertenece a la subfamilia ZML de maíz	54
3.1.4 Dominios proteicos de ZmZIM91	56
3.1.5 ZmZIM91 se degrada en presencia de metil jasmonato por la vía del proteasoma 26S	64
3.1.6. Identificación del consenso <i>in vitro</i> de unión a ADN para las proteínas ZmZIM91 de maíz y AtZIM de <i>Arabidopsis</i> mediante la técnica <i>protein-binding microarray</i> (PBM11).....	68
3.1.7 Regulación de ZmZIM91 por la proteína quinasa CK2 de maíz	70
3.1.7.1 Interacción de ZmZIM91 con las subunidades reguladoras CK2 β 1, CK2 β 2, CK2 β 3 y la catalítica CK2 α 1	70
3.1.7.2 CK2 β 1 y CK2 β 2 son capaces de relocalizar a ZmZIM91 en gránulos en el núcleo	71
3.1.7.3 La subunidad catalítica CK2 α 1 no puede relocalizar a la proteína ZmZIM91	75
3.1.7.4 El holoenzima CK2 α 1 β 1 afecta la localización subcelular de la proteína ZmZIM91	75
3.1.7.5 ZmZIM91 es sustrato <i>in vitro</i> de la proteína quinasa CK2 de maíz.....	78
3.1.7.6 La fosforilación <i>in vivo</i> de ZmZIM91 por la proteína quinasa CK2 de maíz es afectada mediante tratamientos con MeJA.....	79
3.2 Discusión de resultados	82
3.2.1 El dominio ZIM/TIFY en ZmZIM91	82
3.2.2 La proteína ZmZIM91 se degrada en presencia de MeJA	83

3.2.3 La variación de la secuencia en el N-terminal del dominio Jas de ZmZIM91 interviene en la interacción con COI1	84
3.2.4 Señales de Localización Nuclear (NLS) y de Exportación Nuclear (NES) de la proteína ZmZIM91	85
3.2.5 La proteína ZmZIM91 puede unir ADN	86
3.2.6 Modelos hipotéticos de regulación por MeJA de ZmZIM91	87
3.2.7 La proteína ZmZIM91 interacciona y es fosforilada por la proteína quinasa CK2	88
3.2.8 La fosforilación de ZmZIM91 por la proteína quinasa CK2 es regulada por estrés biótico y abiótico.....	89
Capítulo II.....	92
4. Caracterización funcional de la proteína ZmZIM91 de maíz.....	92
4.1 Resultados.....	92
4.1.1 ChIP-Seq de ZmZIM91 a partir de protoplastos de maíz transfectados	92
4.1.1.1 Elaboración de ChIP utilizando protoplastos de maíz que sobre-expresaban 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::GFP.....	92
4.1.1.2 Construcción de librerías a partir del ChIP de protoplastos de maíz usando la tecnología de <i>ILLUMINA-SOLEXA</i>	95
4.1.1.3 Mapeo de datos de lecturas cortas en el genoma de maíz e identificación de picos.....	97
4.1.1.4 Información y localización de sitios de unión obtenidos a partir de los análisis estadísticos del ChIP-Seq proveniente de protoplastos de maíz.....	98
4.1.1.5 Localización de los picos en el genoma de maíz.....	100
4.1.1.6 Clasificación y anotación de genes diana seleccionados.....	101
4.1.1.7 Validación de genes diana de ZmZIM91 identificados en el ChIP-Seq proveniente de protoplastos de maíz	104
4.1.1.8 Construcción de nuevas librerías de ChIP de ZmZIM91 a partir de protoplastos de maíz	113
4.1.2 Identificación de genes diana de ZmZIM91 en el genoma de maíz usando ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de hojas de plantas de maíz de 9 días.....	115
4.1.2.1 Preparación y control de calidad de librerías de ChIP de ZmZIM91 a partir de hojas de plantas maíz	115
4.1.2.2 Análisis de datos de ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de hojas de plantas de maíz de 9 días	116
4.1.2.3 Identificación de genes diana <i>in vivo</i> de ZmZIM91	117
4.1.2.4 ZmZIM91 interactúa con el promotor del gen <i>ZmCOMT in vivo</i>	119
4.1.2.5 ZmZIM91 reprime al promotor del gen de maíz <i>ZmCOMT in vivo</i>	120

4.1.2.6	ZmZIM91 se une al promotor del gen <i>ZmA1 in vivo</i>	121
4.1.2.7	ZmZIM91 reprime al promotor del gen de maíz <i>ZmA1 in vivo</i>	122
4.1.2.8	La interacción <i>in vivo</i> entre ZmZIM91 y los promotores de <i>ZmCOMT</i> y de <i>ZmA1</i> se reduce en presencia de MeJA	123
4.1.3	Identificación de otras proteínas que interactúan con ZmZIM91	124
4.2	Discusión de resultados	127
4.2.1	Identificación de genes diana de ZmZIM91 mediante la técnica de ChIP-Seq de protoplastos de maíz	127
4.2.2	Identificación de genes diana de ZmZIM91 mediante la técnica de ChIP-Seq de hojas de maíz	128
4.2.3	Diferencias entre las técnicas de ChIP-Seq empleadas.....	135
4.2.4	Hipótesis de la existencia de un módulo regulatorio entre ZmZIM91, ZmMYB31 y ZmMYB42.....	137
5.	Conclusiones	142
6.	Materiales y métodos.....	144
6.1	Cepas de bacterias y levaduras	144
6.1.1	Cepas bacterianas	144
6.1.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	144
6.2	Plásmidos y construcciones	145
6.2.1	Plásmidos	145
6.2.2	Construcciones	147
6.2.3	Cebadores.....	151
6.3	Métodos	154
6.3.1	Técnicas empleadas para el clonaje de ADN.....	154
6.3.2	Preparación de células competentes.....	154
6.3.2.1	Obtención de células competentes por choque térmico de <i>Escherichia coli</i>	154
6.3.2.2	Obtención de células competentes por choque térmico de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	154
6.3.2.3	Transformación de células competentes de <i>Escherichia Coli</i> por choque térmico.....	155
6.3.2.4	Transformación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> por choque térmico	155
6.3.3	Obtención de ADN plasmídico	156
6.3.4	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	156

6.3.5 Digestión enzimática del ADN plasmídico	158
6.3.6 Electroforesis de fragmentos de ADN y ARN en gel de agarosa	158
6.3.7 Extracción y purificación de fragmentos de ADN, reacción de ligación y recombinaciones.....	159
6.3.8 Cuantificación de ácidos nucleicos	159
6.3.9 Extracción y purificación de ARN de maíz	159
6.3.10 Elaboración de cDNA	160
6.3.11 Transformación transiente en protoplastos de maíz.....	160
6.3.12 Transformación transitoria por biolística en epidermis de cebolla	162
6.3.13 Transformación transitoria de hojas de tabaco mediante infiltración de <i>Agrobacterium</i>	163
6.3.14 Obtención de proteínas recombinantes	163
6.3.14.1 Sobreexpresión de proteínas recombinantes fusionadas a His o GST en <i>E.Coli</i> BL21	163
6.3.14.1.1 Extracción y purificación de proteínas recombinantes fusionadas a His o GST y sobreexpresadas en <i>E.Coli</i> BL21	164
6.3.14.1.2 Obtención de proteínas recombinantes fusionadas a His.....	164
6.3.14.1.3 Obtención de proteínas recombinantes fusionadas a GST.....	165
6.3.15 Obtención de anticuerpos policlonales contra la proteína ZmZIM91	166
6.3.16 Purificación de anticuerpos policlonales contra la proteína ZmZIM91	166
6.3.17 Análisis de proteínas mediante <i>western blot</i>	167
6.3.17.1 Obtención de extractos proteicos vegetales.....	168
6.3.17.2 Cuantificación de proteínas	168
6.3.17.3 Electroforesis de proteínas en gel SDS-PAGE y tinción de <i>comassie</i>	168
6.3.17.4 Visualización de las proteínas por tinción de <i>coomassie</i>	169
6.3.17.5 Transferencia de proteínas y tinción de <i>ponceau</i>	169
6.3.17.6 Hibridación e inmunodetección mediante ECL.....	170
6.3.18 Ensayos de fosforilación	170
6.3.18.1 Ensayo quinasa <i>in vitro</i>	171
6.3.18.2 Ensayo quinasa en gel	171
6.3.18.2.1 Preparación del gel SDS-PAGE copolimerizado con ZmZIM91 .	172
6.3.18.2.2 Renaturalización y reacción de fosforilación.....	173
6.3.18.2.3 Tratamiento de geles quinasa en gel con DRB	173
6.3.19 Ensayos de interacción proteína-proteína	174

6.3.19.1 Sistema de doble híbrido	174
6.3.19.2 Complementación Bimolecular	174
6.3.19.3 Ensayo de interacción ‘ <i>TnT pull-down</i> ’	174
6.3.20 Determinación de motivos de unión a ADN mediante la técnica unión de proteínas a un microarray de ADN (PBM11)	176
6.3.21 Experimentos de Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	177
6.3.21.1 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) a partir de protoplastos transfectados con 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::GFP. Versión 1.0	177
6.3.21.2 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) a partir de protoplastos transfectados con 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::GFP. Versión 2.0	179
6.3.21.3 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) a partir de hojas de plantas de maíz de 9 días de la variedad B73	182
6.3.22 Test de enriquecimiento y análisis por PCR semi-cuantitativa y cuantitativa de ChIP	184
6.3.23 Preparación de ChIP-Seq para la plataforma <i>Solexa-Illumina</i>	186
6.3.24 Ensayo de Luciferasa usando protoplastos de maíz transformados transientemente	191
6.3.25 Captura de imágenes fluorescente mediante Microscopia Confocal	191
6.3.26 Procesamiento y análisis de datos	192
6.3.26.1 Análisis de secuencias de nucleótidos	192
6.3.26.2 Árbol filogenético	192
6.3.26.3 Cuantificación de GFP de las imágenes obtenidas mediante microscopia confocal	193
6.3.26.4 Procesamiento y análisis de datos de ChIP-Seq	193
6.3.26.5 Procesamiento de datos de PCR cuantitativa de ChIP de protoplastos de maíz	194
6.3.26.6 Procesamiento de datos de PCR cuantitativa de ChIP de hojas de plantas de maíz de 9 días (Fluidigm)	194
6.3.26.7 Procesamiento de datos de PCR cuantitativa de ChIP de hojas de plantas de maíz de 9 días tratadas con MeJA	194
6.3.26.8 Procesamiento de datos de Luciferasa	195
6.3.26.9 Identificación de cajas GATA y GATC en promotores	195
6.3.26.10 Procesamiento y análisis de datos de regiones enriquecidas en elementos reguladores en <i>cis</i> CRERs	196
7. Bibliografía	198
Anexo I. ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz	

Anexo II. ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de hojas de plantas de maíz

Anexo III. Publicaciones

Lista de Tablas

Tabla 1-1. Lista del número de genes de la familia TIFY.

Tabla 4-1. Picos que interceptan entre las librerías de ZmZIM91_anti91 y de ZmZIM91_antiGFP.

Tabla 4-2. Picos que interceptan entre las librerías de ZmZIM91_anti91 y de ZmZIM91_antiGFP.

Tabla 4-3. Resultados de los ChIP-Seq de tres réplicas biológicas de ZmZIM91 provenientes de hojas de plantas de maíz.

Tabla 4-4. Identificación de genes diana de ZmZIM91 mediante ChIP-Seq.

Tabla 6-1. Plásmidos Usados.

Tabla 6-2. Construcciones utilizadas.

Tabla 6-3. Cebadores de ADN usados para realizar los clones en este estudio.

Tabla 6-4. Cebadores utilizados para la validación por PCR semi-cuantitativa de los picos identificados en el ChIP-Seq proveniente de protoplastos de maíz.

Tabla 6-5. Cebadores utilizados para la validación por PCR cuantitativa de los picos identificados en el ChIP-Seq proveniente de protoplastos de maíz.

Tabla 6-6. Cebadores utilizados para la validación por PCR cuantitativa de los picos identificados en el ChIP-Seq proveniente de hojas de plantas de maíz.

Tabla 6-7. Condiciones generales de PCR.

Tabla 6-8. Condiciones de la reacción de PCR.

Tabla 6-9. Reacción de PCR para validación de muestras de ChIP.

Tabla 6-10. Resultados obtenidos empleando el *software* DNA-pattern de motivos de unión a ADN GATA y GATC en los picos 8, 14 y 21 identificados en el ChIP-Seq de protoplastos de maíz.

Lista de Tablas Anexo I

Tabla SII. Picos seleccionados para validación del ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Lista de Figuras

Figura 1-1. El papel de las hormonas de plantas en la regulación de la interacción entre estrés biótico y abiótico.

Figura 1-2. Representación esquemática de la ruta de los octadecanoides para la biosíntesis de ácido jasmónico (JA) y conjugados bioactivos de JA.

Figura 1-3. Arquitectura de las proteínas que conforman la familia TIFY.

Figura 1-4. Modelo de la degradación mediada por JA-Ile vía proteasoma 26S.

Figura 1-5A. Modelos de inhibición de respuestas a ácido jasmónico (JA) por interacción de proteínas JAZ con otras proteínas.

Figura 1-5B. Modelos de actuación del jasmonato en la regulación de los genes MYC.

Figura 1-6. Distribución del núcleo del motivo “TIFYXG”.

Figura 1-7. Modelo de actuación de la proteína quinasa CK2.

Figura 1-8. Identificación de ZmZIM91 por medio de un ensayo de doble híbrido utilizando la subunidad reguladora β 1 de la proteína quinasa CK2 de maíz.

Figura 3-1. Secuencia de ZmZIM91 en aminoácidos y cDNA.

Figura 3-2. Localización subcelular de ZmZIM91 en protoplastos de maíz.

Figura 3-3. Árbol filogenético de la subfamilia ZML en maíz y *Arabidopsis*.

Figura 3-4. Expresión de las proteínas ZML de maíz en hojas de 9 días de la variedad B73.

Figura 3-5. Aminoácidos correspondientes a los dominios conservados de ZmZIM91.

Figura 3-6. Alineamiento entre las proteínas ZIM de *Arabidopsis* y ZML de maíz.

Figura 3-7. Identificación de motivos de represión putativos en el dominio TIFY de las proteínas ZML de maíz.

Figura 3-8. ZmZIM91 es capaz de formar dímeros.

Figura 3-9. Alineamiento entre los dominios Jas de las proteínas AtJAI3, AtJAZ1, AtZML2 y ZmZIM91.

Figura 3-10. Estudio de las interacciones entre las proteínas ZML, JAZ1, JAI3, JAZ9 y COI1 de *Arabidopsis*.

Figura 3-11. Localización de N-terminal de ZmZIM91 en células de cebolla y tabaco.

Figura 3-12. Ensayo de degradación por metil jasmonato en protoplastos de maíz de ZmZIM91_C-GFP.

Figura 3-13. Formación de gránulos después de la aplicación de MeJA en protoplastos de maíz sobre expresando la proteína ZmZIM91 fusionada a GFP (60X).

Figura 3-14. Células de tabaco conteniendo la proteína ZmZIM91 fusionada a GFP y tratadas con 100 μ M de MeJA a una hora.

Figura 3-15. Datos de RNA-Seq encontrados para ZmZIM91 y usados para la selección del tejido para el análisis de la proteína por *western blot*.

Figura 3-16. Respuesta en plantas silvestres de ZmZIM91 a tratamientos con metil jasmonato y metil jasmonato e inhibidor del proteasoma 26S (MG132).

Figura 3-17. Identificación de los motivos *in vitro* de unión a ADN de AtZIM y ZmZIM91.

Figura 3-18. ZmZIM91 interacciona con la proteína quinasa CK2 de maíz.

Figura 3-19A. CK β 1 y CK β 2 son capaces de relocalizar eficientemente en el núcleo a ZmZIM91.

Figura 3-19B. Localización subcelular de las subunidades reguladoras CK β 1, CK β 2 y CK β 3 y de ZmZIM91 con el vector vacío con un *tag* MYC.

Figura 3-20. La subunidad catalítica CK2 α 1 no puede relocalizar a la proteína ZmZIM91.

Figura 3-21. El holoenzima CK2 α 1 β 1 puede relocalizar a la proteína ZmZIM91.

Figura 3-22. La subunidad reguladora CK2 β 1 cambia la localización subcelular de las proteínas CK2 α 1 y ZmZIM91.

Figura 3-23. ZmZIM91 es sustrato *in vitro* de CK2 α 1 y el holoenzima CK2 α 1 β 1.

Figura 3-24. ZmZIM91 es sustrato *in vivo* de la proteína quinasa CK2 y es regulada por esta quinasa bajo tratamiento con MeJA.

Figura 3-25. ZmZIM91 no es capaz de interactuar con COI1 de *Arabidopsis*.

Figura 3-26. Diagrama de caja de puntajes (E-scores) de todos los 8-*mers* posibles conteniendo los consensos de 6-*mer* indicados y reconocidos por AtZIM y ZmZIM91.

Figura 3-27. ZmZIM91 es sustrato *in vivo* de la proteína quinasa CK2 y es regulada por esta quinasa en sequía.

Figura 4-1. Validación mediante PCR semi-cuantitativa de las condiciones óptimas para la preparación de ChIP de protoplastos de maíz que sobre-expresaban 35S::GFP.

Figura 4-2. Validación de la técnica de ChIP de protoplastos mediante PCR semi-cuantitativa.

Figura 4-3. Diagrama representando la construcción de la librería de ChIP de protoplastos de maíz usando la tecnología Illumina/Solexa.

Figura 4-4. Control de la calidad y cuantificación de las muestras de las librerías de ChIP de protoplastos de maíz, usando *Bioanalyzer*.

Figura 4-5. Análisis de los datos de las librerías de protoplastos de maíz usando BOWTIE y MACS.

Figura 4-6. Gráfico de la intersección entre los picos de ZmZIM91_anti91 y ZmZIM91_antiGFP.

Figura 4-7. Distribución de picos relativa a la coordenada de inicio de los genes ubicados en la vecindad y porcentaje de picos localizados en las zonas adyacentes a los genes cercanos.

Figura 4-8. Localización de picos en cada cromosoma del genoma de maíz.

Figura 4-9. Ejemplo de diseño de cebadores para PCR semi-cuantitativa de picos que interceptaban entre las librerías de ZmZIM91_antiGFP y las de ZmZIM91_anti91.

Figura 4-10. Genes seleccionados para la validación por PCR cuantitativa de ChIP de protoplastos de maíz de ZmZIM91.

Figura 4-11. Pico 8 detectado en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Figura 4-12. Pico 14 detectado en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Figura 4-13. Pico 14 detectado en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Figura 4-14. Pico 21 detectado en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Figura 4-15. Validación del pico 8 utilizando PCR semi-cuantitativa y PCR cuantitativa de muestras de ChIP de protoplastos de maíz.

Figura 4-16. Validación del pico 14 utilizando PCR semi-cuantitativa y PCR cuantitativa de muestras de ChIP de protoplastos de maíz.

Figura 4-17. Validación utilizando PCR semi-cuantitativa y PCR cuantitativa de muestras de ChIP de protoplastos de maíz del pico 21.

Figura 4-18. Localización en los picos 8, 14 y 21, de los motivos de unión a ADN GATA y GATC identificados *in vitro* para el factor de transcripción ZmZIM91.

Figura 4-19. Librerías de ChIP de ZmZIM91 a partir de protoplastos de maíz.

Figura 4-20. Librerías de ChIP de ZmZIM91 a partir de hoja de maíz.

Figura 4-21. Pico detectado en las tres réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 que flanquea el promotor del gen *ZmCOMT*.

Figura 4-22. Validación por PCR cuantitativa en tiempo real del promotor de *ZmCOMT* en muestras de ChIP de ZmZIM91 a partir de hojas de plantas de maíz.

Figura 4-23. ZmZIM91 reprime el promotor del gen de *ZmCOMT*.

Figura 4-24. Validación por PCR cuantitativa en tiempo real del promotor de *ZmA1* en muestras de ChIP de ZmZIM91 a partir de hojas de plantas de maíz.

Figura 4-25. ZmZIM91 reprime el promotor del gen de *ZmA1*.

Figura 4-26. La interacción *in vivo* entre ZmZIM91 y los promotores de *ZmCOMT* y de *ZmA1* se reduce en presencia de MeJA.

Figura 4-27. Interacción por Complementación Bimolecular entre ZmZIM91 y ZmMYB31, y entre ZmZIM91 y ZmMYB42.

Figura 4-28. El módulo regulador putativo AC-GATA en el promotor del gen de *COMT* está conservado en las gramíneas.

Figura 4-29. Respuesta de ZmZIM91 a tratamiento de herida en hojas de plantas silvestres de maíz.

Figura 4-30. La represión del promotor de *ZmCOMT* por ZmZIM91 puede tener un impacto significativo en la reducción del contenido de lignina en maíz.

Figura 4-31. Modelo propuesto de regulación del promotor de *ZmCOMT* por el factor de transcripción ZmZIM91 de maíz.

Figura 4-32. Validación utilizando PCR semi-cuantitativa y PCR cuantitativa de muestras de ChIP de hojas de plantas de maíz del pico 14.

Figura 4-33. Modelo hipotético de módulo regulatorio entre ZmZIM91 y ZmMYB31 o ZmMYB42.

Figura 6-1. Puesta a punto de condiciones óptimas de PCR para la obtención del clon de *ZmZIM91*.

Figura 6-2. Pasos realizados para la detección de motivos de unión de ADN de factores de transcripción mediante la técnica Unión de proteínas a un microarreglo de ADN (PBM11).

Figura 6-3. Procedimiento de elaboración de librerías de ChIP de protoplastos de maíz sobre expresando 35S::*ZmZIM91*:GFP y 35S::*GFP*.

Figura 6-4. Procedimiento de elaboración de librerías de ChIP de hojas de plantas de maíz de 9 días.

Lista de Figuras Anexo I

Figura SI1. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Figura SI2. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Figura SI3. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Figura SI4. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Figura SI5. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Figura SI6. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Figura SI7. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Figura SI8. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Figura SI9. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Figura SI10. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Figura SI11. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Figura SI12. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Figura SI13. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Figura SI14. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Figura SI15. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Figura SI16. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Figura SI17. PCRs semi-cuantitativas de picos identificados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz.

Lista de Figuras Anexo II

Figura SII1. Pico detectado en dos réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz.

Figura SII2. Pico detectado en dos réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz.

Figura SII3. Pico detectado en tres réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz.

Figura SII4. Pico detectado en tres réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz.

Figura SII5. Pico detectado en tres réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz.

Figura SII6. Pico detectado en dos réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz.

Figura SII7. Pico detectado en dos réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz.

Figura SII8. Pico detectado en dos réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz.

Figura SII9. Pico detectado en tres réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz.

Figura SII10. Pico detectado en dos réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz.

Figura SII11. Pico detectado en tres réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz.

Figura SII12. Pico detectado en tres réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz.

Figura SII13. Pico detectado en dos réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz.

Figura SII14. Pico detectado en dos réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz.

Figura SII15. Pico detectado en dos réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz.

Figura SII16. Pico detectado en dos réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz.

Abreviaturas

aa:	Aminoácido
ABA:	Ácido abscísico
ADN:	Ácido desoxiribonucleico
APS:	Amonio persulfato
ATP:	Adenosina-5'-trifosfato
BiFC:	Complementación bimolecular de la fluorescencia
BSA:	Albúmina sérica bovina
°C:	Grados centígrados
CaMV 35S:	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
cDNA:	DNA complementario
CK2:	Proteína quinasa CKII
ChIP:	Inmunoprecipitación de cromatina
ChIP-Seq:	Inmunoprecipitación de cromatina seguida de secuenciación masiva paralela
CRERs	Regiones enriquecidas en elementos reguladores <i>cis</i>
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DRB:	5,6-dicloro-1-β-D-ribofuranosil-1H-benzimidazol
DTT:	Ditiotreitol
<i>E.coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	Ácido etilendiamino tetraacético
EGTA:	Ácido etilenglicol tetraacético
FTs:	Factores de Transcripción
g:	Gramo
GFP:	Proteína verde fluorescente
GST:	Glutation-S-transferasa
HEPES:	Ácido 4(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
IPTG:	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
JA:	Ácido jasmónico
kDA:	Kilodalton
l:	Litro
LUC:	Luciferasa
MeJA:	Metil jasmonato
MES:	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
mg:	Miligramo
ml:	Mililitro
MS medium:	Murashige and Skoog medium
<i>N. benthamiana</i> :	<i>Nicotiana benthamiana</i>
ng:	Nanogramo
NGS:	Nuevas tecnologías de secuenciación
NLS	Señal de localización nuclear
PAGE:	Gel de electroforesis de poliacrilamida
pb:	Pares de bases
PBM11:	Unión de proteínas a un microarreglo de ADN
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG:	Polyethylene glycol
Pfu:	Unidades formadoras de placas

PMSF:	Fenilmetanosulfonil fluoruro
Q-PCR:	PCR cuantitativa en tiempo real
ARN:	Ácido ribonucleico
SDS:	Dodecilsulfato sódico
TCA:	Ácido tricloroacético
TEMED:	Tetrametiletilenediamina
TSS:	Sitio de inicio de la transcripción
µg:	Microgramo
µl:	Microlitro
YFP:	Proteína amarilla fluorescente
γ ³³ P-ATP:	Gama-Fosforo-33 Adenosina-5'-Trifosfato

Introducción

Introducción

Las plantas viven en entornos ambientales donde frecuentemente están expuestas a diferentes condiciones de estrés, por lo que han desarrollado mecanismos específicos que les permiten adaptarse a los cambios que enfrentan, minimizando el daño mientras conservan recursos valiosos para crecer y reproducirse. Las plantas activan respuestas a estrés únicas o específicas dependiendo de si son sometidas a uno o varios tipos de estrés, respectivamente (Rizhsky *et al.*, 2004). Las estrategias adaptativas de la planta al estrés están coordinadas con el crecimiento, el desarrollo y las actividades celulares y moleculares (Atkinson y Urwin, 2012), en este contexto es clave mencionar que las hormonas juegan un papel importante en la regulación de estos procesos (Howe y Jander, 2008).

En la planta, las hormonas forman parte de una compleja red de regulación. Las interacciones entre las distintas hormonas pueden ser moduladas por una multitud de estímulos originados como parte del desarrollo o de señales medioambientales que conducen a que éstas actúen de un modo aditivo o antagónico (Lackman *et al.*, 2011). La integración de los estímulos y señales define la amplitud y especificidad de respuestas en diferentes contextos celulares (Kuppusamy *et al.*, 2009; Pauwels *et al.*, 2009). La señalización de las diferentes rutas metabólicas por hormonas controla la interacción de estrés biótico y abiótico (Figura 1-1). Las respuestas a estrés abiótico están controladas en mayor parte por la fitohormona ácido abscísico (ABA), mientras que la defensa frente a diferentes estreses bióticos es regulada por el antagonismo entre las rutas de señalización del ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA)/Etileno (Atkinson y Urwin, 2012).

Por otro lado, los eventos de reconocimiento molecular que causan la inmunidad de la planta a insectos herbívoros han sido poco estudiados. Sin embargo, las plantas parecen usar múltiples sistemas de vigilancia para reconocer insectos con un amplio rango de estilos de vida y comportamiento alimenticio. Por tanto, el conocimiento detallado acerca de la inmunidad de las plantas en respuesta a patógenos puede proveer nuevos enfoques para el mejoramiento y la protección de cultivos (Howe y Jander, 2008).

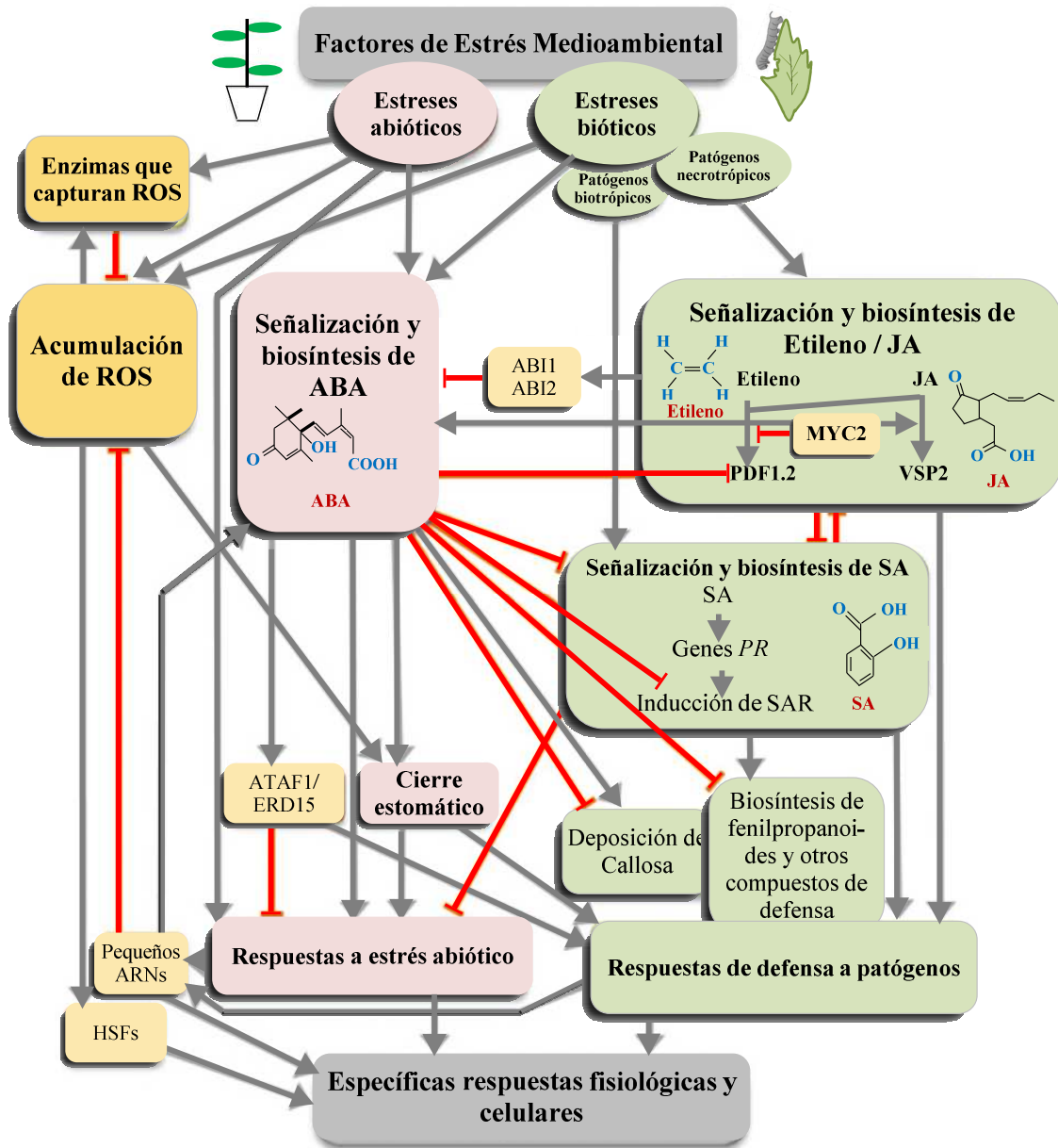


Figura1-1. El papel de las hormonas de plantas en la regulación de la interacción entre estrés biótico y abiótico. El diagrama esquemático muestra la interacción o “*crosstalk*” que ocurre entre hormonas, factores de transcripción y otros componentes reguladores, cuando están presentes tanto el estrés biótico como el abiótico. Esta red compleja de interacciones le permite a la planta responder de manera específica a diferentes tipos de estrés. Las flechas grises muestran inducción o regulación positiva, mientras que las barras rojas indican inhibición o represión. Los eventos característicos de respuesta a estrés abiótico se muestran en rosa y los de respuesta a estrés biótico en verde. Los factores de transcripción y otros genes reguladores están representados dentro de dos cuadros de color naranja. Especies reactivas a oxígeno (ROS); ácido abscísico (ABA); ácido jasmónico (JA); ácido salicílico (SA); relativos a patogénesis (PR); resistencia sistémica adquirida (SAR), factores de choque térmico (HSF). Dentro de la figura se muestra la fórmula química de las fitohormonas ABA, JA y SA (Adaptado de Atkinson y Urwin, 2012).

Los jasmonatos se destacan por su papel relevante y universal en la regulación del metabolismo de la planta, ya que inducen la biosíntesis de metabolitos secundarios cuando la planta se somete a estreses medioambientales como la herida mecánica, el ataque de insectos y la infección por patógenos (Pauwels *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2005; Browse, 2009; McConn y Browse, 1996; McConn *et al.*, 1997; Staswick *et al.*, 1998; Vijayan *et al.*, 1998). El trauma por herida infligido por el daño mecánico o los insectos da lugar a la acumulación rápida de ácido jasmónico (JA) (<30 min) en el lugar de la herida. Por lo tanto el JA y los compuestos relativos a la señalización (colectivamente referidos como jasmonatos), son señales ubicuas para el tejido dañado y para la subsecuente activación de la respuesta a defensa (Howe y Jander, 2008).

Adicionalmente, los jasmonatos regulan aspectos de desarrollo, tales como crecimiento de la raíz, desarrollo de estambres, polen, y senescencia. En general, la hormona promueve los procesos reproductivos y la defensa mientras inhibe el crecimiento y la fotosíntesis de tejidos vegetativos (Devoto y Turner, 2005; Giri *et al.*, 2006).

En plantas superiores, los JAs son fitohormonas derivadas de oxipilinas que son sintetizados vía la ruta de los octadecanoides (Figura 1-2) (Howe y Jander, 2008). Originalmente los JAs fueron identificados como metabolitos secundarios presentes en el perfume de las flores de jazmín (*Jasminum spp.*). Actualmente, se ha descubierto que actúan como elicitores de la producción de metabolitos secundarios a través del reino vegetal, desde las angiospermas hasta las gimnospermas (Wasternack, 2007; Zhao *et al.*, 2005). Las tres principales clases de metabolitos secundarios pueden ser definidos como los terpenoides, los alcaloides y los fenilpropanoides; sin embargo, existen más. Los JAs pueden inducir la síntesis de todas estas clases de metabolitos secundarios (Pauwels *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2005).

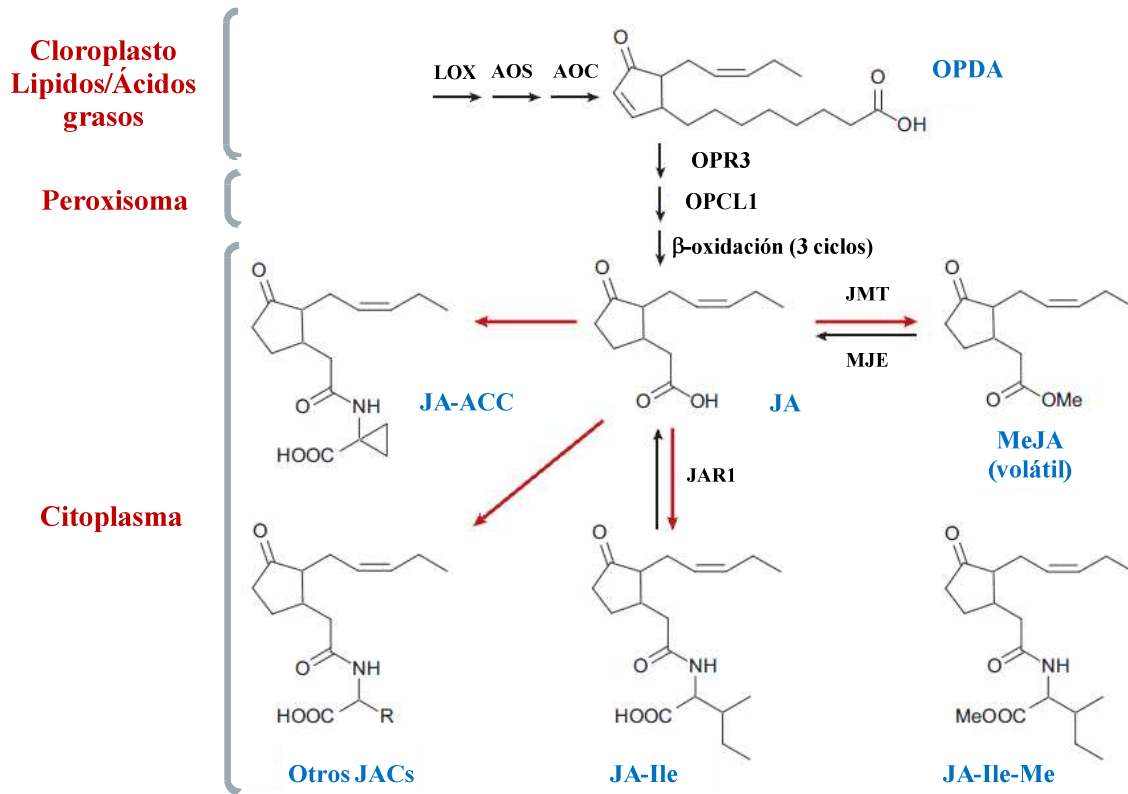


Figura 1-2. Representación esquemática de la ruta de los octadecanoides para la biosíntesis de ácido jasmónico (JA) y conjugados bioactivos de JA. Las enzimas principales de la biosíntesis de JA están localizadas en dos compartimentos subcelulares diferentes. La síntesis de JA es iniciada en los cloroplastos, donde el ácido linoleico es convertido a ácido 12-oxo fitodienoico (OPDA) por la acción secuencial de la lipoxigenasa (LOX), aleno óxido sintasa (AOS), y aleno óxido ciclasa (AOC). La segunda parte de la ruta ocurre en los peroxisomas. El OPDA es transportado desde los cloroplastos a los peroxisomas donde este es reducido por el OPDA reductor (OPR3) para dar lugar al 3-oxo-2(2'[Z]-pentenil)-ciclopentano-1-ácido octanoico (OPC:8), seguido por tres rondas de beta oxidación para producir (+)-7-iso-JA. Subsecuentemente, el JA puede ser metabolizado en el citoplasma para la producción de diversos derivados biológicamente activos (Flechas rojas). El JA carboxilo metiltransferasa (JMT) convierte al JA en el compuesto volátil MeJA. La reacción reversa es catalizada por MeJA esterasa (MJE). La conjugación de JA a Isoleucina (Ile) por el *RESISTENTE A JASMONATO 1* (JAR1) produce JA-Ile, el cual promueve la interacción del *INSENSIBLE A CORONATINA 1* (COI1) con las proteínas represoras JAZ. El JA-Ile puede ser metilado para producir JA-Ile-Me (Hause et al., 2000). El JA puede ser conjugado por otras enzimas para producir varios aminoácidos conjugados JA (JACs) y JA-ACC conjugado por una enzima de JA a ACC (1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico, un intermediario biosintético del etileno) (Adaptado de Howe y Jander, 2008; Zhang y Turner, 2008).

1.1 Percepción y señalización por jasmonato

El mutante *insensible a coronatina 1* (*coronatine insensitive1 - coi1*) fue aislado en un cribado de mutantes de *Arabidopsis* insensibles a la inhibición del crecimiento de la raíz por coronatina. El mutante *coi1* es también insensible a MeJA (Feys *et al.*, 1994), es susceptible al ataque de ciertos insectos y patógenos y no expresa genes regulados por JA (Benedetti *et al.*, 1995; McConn *et al.*, 1997; Thomma *et al.*, 1998). El gen *COI1* codifica para una proteína F-box (Xie *et al.*, 1998). *COI1* es estructuralmente cercano a al receptor de auxinas *INHIBIDOR DE RESPUESTA A TRANSPORTE 1* (*TIR1*; At3g62980) (Kepinski y Leyser, 2005; Dharmasiri *et al.*, 2005), sin embargo, *COI1* no está relacionado con la percepción de auxinas.

La proteína F-box *INSENSIBLE A CORONATINA 1* (*CORONATINE INSENSITIVE 1 - COI1*) es esencial en el núcleo del módulo de señalización por JA en plantas y forma parte del complejo tipo E3 ubiquitina ligasa Skp–Culina–F-box (SCF^{COI1}) (Devoto *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002). Por lo tanto, el requerimiento de *COI1* en respuestas dependientes de JA indica que la degradación proteica mediante ubiquitinación está involucrada en la señalización por JA. Las plantas que eran deficientes en otros componentes o reguladores del complejo SCF, incluyendo *AXR1*, *COP9* y *SGT1b*, también mostraron incapacidad para responder al JA (Feng *et al.*, 2003; Lorenzo y Solano, 2005; Tiryaki y Staswick, 2002). La existencia de una función *COI1* que esta conservada en otras especies diferentes a *Arabidopsis* fue demostrada por la identificación de un homólogo de *COI1* en tomate (*LeCOI1*; Li *et al.*, 2004). *COI1* es un componente específico de la vía de JA, mientras que otras proteínas del complejo como *SGT1b* y *AXR1* son compartidas por otras rutas de señalización (Gray *et al.*, 2003; Tiryaki y Staswick, 2002; Xu *et al.*, 2002).

Las mutaciones en *SGT1b* y *AXR1* tienen efectos pleiotrópicos que deterioran las respuestas de la planta no sólo a JA sino también a auxinas y patógenos, sugiriendo que las proteína *AXR1* y *SGT1b* son reguladoras del complejo SCF y están involucradas en diferentes vías de señalización (Austin *et al.*, 2002; Azevedo *et al.*, 2002; Gray *et al.*, 2003). La proteína *AXR1* es también un regulador positivo de respuestas a auxinas y modula la actividad de SCF^{TIR1} por modificación de la culina a través de la adición de la proteína *ubiquitin-like* Nedd8/Rub1 (del Pozo *et al.*, 2002; Schwechheimer *et al.*, 2002).

Por otra parte, la función conservada de SGT1 como mediadora del complejo SCF, está respaldada por un estudio donde se mostró que la mutación del gen *sgt1* de levadura podía ser complementada con dos genes altamente homólogos al gen *SGT1* de *Arabidopsis* y por una investigación donde se demostró que las proteínas SGT1, HvSGT1 y NbSGT1 co-inmunoprecipitaban con las subunidades SCF en extractos de cebada (*Hordeum vulgare*) y tabaco (*Nicotiana benthamiana*) respectivamente (Azevedo *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002).

Para identificar componentes moleculares de la señal de transducción de jasmonato, se seleccionaron mutantes que eran insensibles a MeJA o coronatina o que mostraban una respuesta constitutiva a jasmonato (Lorenzo y Solano, 2005). En el cribado realizado para mutantes afectados en la inhibición del crecimiento de la raíz inducida por JA en un fondo *insensible a etileno 3* (*ethylene insensitive 3 – ein 3*) se encontraron 5 grupos de complementación, identificando 5 loci llamados *insensible a JA* (JAI) 1-5. El locus JAI1 corresponde al gen *AtMYC2* (Lorenzo *et al.*, 2004). El locus JAI2 corresponde al gen previamente caracterizado *JAR1* (Staswick *et al.*, 1992; Staswick y Tiryaki, 2004). El locus JAI4 corresponde al gen *SGT1b* (Lorenzo y Solano, 2005). El locus JAI5 corresponde al gen *COI1* (Lorenzo *et al.*, 2004). Finalmente, se identificó el gen *JAI3* que codifica para una proteína con un motivo TIFY (Chini *et al.*, 2007).

La proteína JAI3 pertenece a la familia génica llamada TIFY (Vanholme *et al.*, 2007). Dentro de esta familia, los miembros que son inducidos a nivel de expresión génica por JA son llamados *dominio jasmonato ZIM* (*Jasmonate ZIM domain - JAZ*) (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007). En el mutante *jai3* la proteína JAI3 tenía una delección de un dominio conservado en el C-terminal de las proteínas JAZ. La proteína JAI3 endógena se degradó rápidamente en respuesta a JA de manera dependiente de COI1, mientras la proteína del mutante *jai3* permaneció estable. La proteína JAI3 interactúa *in vitro* y en levadura con COI1 pero solo en presencia de la hormona conjugada JA-Ile. Además, también interacciona con *AtMYC2* y se postula que JAI3 es un represor de *AtMYC2*, y que por lo tanto cuando es degradada en respuesta a JA, deja libre a *AtMYC2* para cumplir sus funciones (Chini *et al.*, 2007).

Los mecanismos implicados en la autorregulación del bucle de JA han sido estudiados principalmente en *Arabidopsis*, pero parece ser que este fenómeno se conserva a lo largo de todas las especies de plantas (De Geyter *et al.*, 2012).

Una inducción fuerte y rápida de metabolitos secundarios estimulada por JA es vital para la planta durante la respuesta a defensa. La señal de JA debe persistir o incluso intensificarse durante el tiempo en que la planta está bajo ataque. Como consecuencia, las plantas han desarrollado un sistema de retroalimentación positiva denominado bucle autoregulador de JA (*'autoregulatory JA loop'*). Este bucle funciona tomando primero un punto de control que se sitúa en los genes que son inducibles por JA y controlados por factores de transcripción sensibles a dicha hormona y resulta en la síntesis bioactiva de JA. Posteriormente, los genes que codifican para factores de transcripción implicados en la respuesta primaria a JA, se inducen rápidamente, configurando de este modo la retroalimentación positiva. Adicionalmente, otros conjuntos de reguladores pueden influir positivamente en la biosíntesis de JA en un contexto de desarrollo (De Geyter *et al.*, 2012).

Además de los bucles positivos, la retroalimentación negativa también es requerida para parar las respuestas de defensa y estrés de las plantas cuando no son necesarias. Múltiples mecanismos de regulación han sido desarrollados para mantener esas respuestas silenciadas en condiciones normales. Como resultado, los reguladores negativos son los componentes claves en el control de la expresión de los genes relacionados con el estrés (De Geyter *et al.*, 2012).

1.2 La familia TIFY en plantas

La familia TIFY ha sido involucrada en respuestas a diversas hormonas como JA y ABA. Recientemente fueron analizados los perfiles de expresión de 11 genes *TIFY* de uva en respuesta a varias condiciones de estrés biótico, abiótico y bajo tratamientos con hormonas, y se encontró que estos genes al parecer no juegan un papel principal en la defensa contra patógenos o virus, sin embargo, algunos genes *TIFY* respondieron a JA y/o ABA, pero no a SA o etileno. Adicionalmente, también fueron identificados genes de esta familia que podían potencialmente estar involucrados en la tolerancia a estrés abiótico (Zhang *et al.*, 2012).

Las proteínas TIFY están comprendidas dentro de una familia de factores de transcripción putativos, exclusiva de plantas, de la que se ha descrito que algunos de sus miembros juegan un papel importante dentro de la vía de señalización del ácido jasmónico, la respuesta a estrés y la regulación del desarrollo (Vanholme *et al.*, 2007).

Esta familia debe su propio nombre al dominio conservado (TIF[F/Y]XG) localizado aproximadamente entre los 36 aminoácidos a lo largo del dominio ZIM o TIFY (Vanholme *et al.*, 2007). El dominio ZIM fue originalmente identificado en *Arabidopsis* en la proteína *Zinc-Finger expresada en Inflorescencia del Meristemo*: ZIM (BAA97679; *Zinc-finger protein expressed in Inflorescence Meristem*) (Nishii *et al.*, 2000). Desde entonces se ha encontrado en otras proteínas que están agrupadas dentro de esta familia (Vanholme *et al.*, 2007).

Debido a la incongruencia de la clasificación en las bases de datos de los genes pertenecientes a esta familia, Vanholme *et al.* (2007) propusieron cambiar el nombre tanto del dominio como el de la familia ZIM por el de TIFY, de acuerdo con los cuatro aminoácidos conservados dentro del dominio TIFY en los miembros de esta familia.

Mediante un análisis filogenético y estructural de catorce especies que contenían el dominio TIFY (Tabla 1-1) se definieron cuatro subfamilias que se clasificaron como TIFY, PPD, JAZ y ZML (dominios que las constituyen, Figura 1-3) (Bai *et al.*, 2011).

Subfamilia	Briófitas ^a	Licopodiofitas ^a	Eudicotiledóneas ^a						Monocotiledóneas ^a			
	Pp	Sm	Mg	At	Pt	Vv	Gm	Mt ^b	Os	Bd	Sb	Zm
TIFY	3	2	1	1	3	2	3	2	1	0	0	1
PPD	0	4	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
JAZ	9	8	9	12	12	7	20	14	15	15	16	23
ZML	4	4	1	3	8	4	9	5	4	6	3	3

Tabla 1-1. Lista del número de genes de la familia TIFY. ^a Fuentes de datos del genoma: *Physcomitrella patens* (Pp), *Selaginella moellendorffii* (Sm), *Mimulus guttatus* (Mg), *Populus trichocarpa* (Pt), *Brachypodium distachyon* (Bd), *Sorghum bicolor* (Sb) desde DOE Joint Genome Institute (LGI, <http://genome.jgi-psf.org>); *Arabidopsis thaliana* (At) desde TAIR (<http://www.Arabidopsis.org>); *Oryza sativa* (Os) desde TIGR (<http://rice.plantbiology.msu.edu>); *Medicago trunculata* (Mt) desde (<http://www.medicago.org>); *Vitis vinifera* (Vv) desde Genoscope (<http://www.cns.fr>); *Glycine max* (Gm) desde Phytozome (<http://www.phytozome.net>); *Zea Mays* (Zm) desde (<http://www.maizesequence.org>). ^b La anotación del genoma de *Medicago trunculata* está incompleta (Bai *et al.*, 2011).

FAMILIA TIFY EN ARABIDOPSIS

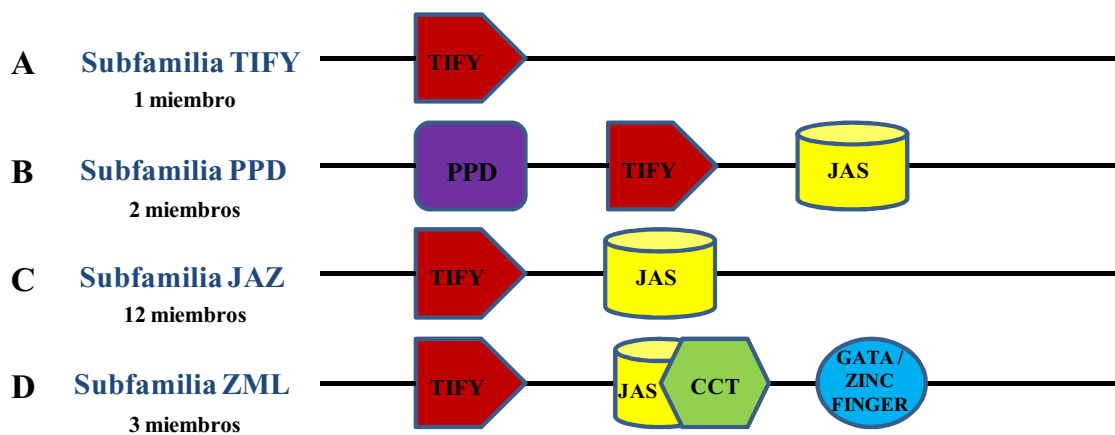


Figura 1-3. Arquitectura de las proteínas que conforman la familia TIFY. En los esquemas se observa los dominios conservados que conforman cada subfamilia. En rojo se enmarca el dominio TIFY, en lila el dominio PPD, en amarillo el dominio Jas, en verde el dominio CCT y en azul el dominio GATA-Zinc Finger, además (A) corresponde a la estructura de las proteínas de la subfamilia TIFY, (B) a la subfamilia PPD, (C) a la subfamilia ZML y (D) a la subfamilia JAZ.

Existe muy poca información acerca de los miembros de la subfamilia TIFY que poseen un dominio TIFY.

La subfamilia PEAPOD (PPD) la conforman proteínas que poseen 3 dominios: un único dominio PPD en su N-terminal, un dominio TIFY y un motivo Jas divergente que carece de un PY conservado en su C-terminal (Chung *et al.*, 2009). Previamente fueron identificados dos dominios adicionales TIFY contenidos en las proteínas de *Arabidopsis* PEAPOD1 y PEAPOD2 (PPD1 y PPD2) que codifican para AT4G14713 y AT4G14720, respectivamente (White, 2006). Las PEAPODs difieren de las proteínas ZML por la ausencia del dominio GATA (Vanholme *et al.*, 2007). Los genes *AtTIFY4a* (PPD1) y *AtTIFY4b* (PPD2) están involucrados en la coordinación del crecimiento de la hoja. Ambas proteínas PPD han sido caracterizadas como reguladoras del ciclo celular (Bai *et al.*, 2011). En una investigación previa, fueron estudiados dos genes *PPD* en *Vitis vinifera*. Se encontró que VvPPD2 respondía a estrés osmótico mientras que VvPPD1 no lo hacía. Por otra parte, durante un tratamiento con hormonas en cultivos de células en suspensión, VvPPD1 aumentó su expresión bajo tratamientos con JA y MeJA, mientras que VvPPD2 solo tuvo un ligero aumento de expresión con tratamientos de JA y ninguno con MeJA (Zhang *et al.*, 2012).

De los cuatro subgrupos de proteínas contenidas en la familia TIFY, la subfamilia JAZ de *Arabidopsis* ha sido la mejor caracterizada hasta el momento. Las proteínas JAZ presentan dos dominios principales, el TIFY y el Jas. El dominio Jas media la interacción entre las proteínas represoras transcripcionales JAZ y la proteína receptora COI1. La interacción directa entre los JAZ y COI1 ha sido demostrada para JAZ1 (At1g19180), JAZ2 (At1g74950), JAZ3 (At3g17860), JAZ6 (At1g72450), JAZ9 (At1g70700), y JAZ10 (At5g13220) (Thines *et al.*, 2007; Melotto *et al.*, 2008; Chini *et al.*, 2009; Chung y Howe, 2009; Yan *et al.*, 2009; Sheard *et al.*, 2010).

Las proteínas JAZ fueron identificadas como represoras de la vía de señalización del ácido jasmónico, dependientes de la degradación por JA mediante la vía del proteasoma 26S (Chini *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2007). Las proteínas JAZ son consideradas dianas del complejo SCF^{COI1}. Estas proteínas y COI1 interactúan directamente en presencia del conjugado bioactivo JA-isoleucina (JA-Ile) para formar un complejo correceptor. En

Arabidopsis, el factor *basic helix-loop-helix* (bHLH) MYC2 es el gen diana mejor conocido de las proteínas JAZ (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que MYC2 está involucrado directa e indirectamente con la inducción de metabolitos secundarios y que puede actuar como un activador o como un represor. Por ejemplo, es un regulador positivo de la inhibición del crecimiento de raíces primarias, la biosíntesis de antocianinas y la tolerancia a estrés oxidativo mediado por JA, pero por otra parte, es un regulador negativo de la resistencia a hongos necrotróficos y biosíntesis de triptófano (Trp) mediado por JA (Lorenzo *et al.*, 2004; Dombrecht *et al.*, 2007). Sin embargo, MYC2 no puede funcionar como un activador transcripcional cuando se une a un promotor diana heterólogo (Pauwels y Goossens, 2008).

El dominio Jas está presente en todas las proteínas JAZ, pero JAZ7 (At2g34600) y JAZ8 (At1g30135) no poseen los aminoácidos conservados en la posición 205 y 206 como JAZ1, los cuales se demostró que son esenciales para la interacción con COI1. La secuencia de aminoácidos mínimos suficientes para la unión de la fitotoxina coronatina (COR) fue localizada en una parte del N-terminal del dominio Jas extendido con dos aminoácidos no conservados, creando una estructura bipartita consistente de un bucle y una α -hélice anfifática. El bucle formado por la secuencia ELPIARR en JAZ1, permite que JAZ se una a JA-Ile y COI1. Mientras el α -hélice une a COI1 cerca del sitio de unión de JA-Ile, y su interacción es necesaria para la función co-receptora (Sheard *et al.*, 2010). La hormona probablemente es percibida por un complejo co-receptor que está conformado por una proteína JAZ y COI1 (Figura 1-4).

Las proteínas F-box pueden formar substratos adaptadores junto con las proteínas Skp1 que son reclutados por culina para completar el complejo SCF E3 ubiquitina ligasa únicamente cuando se unen a su diana. Es ampliamente aceptado que la unión con SCF^{COI1} está seguida por la poliubiquitinación de JAZ y la degradación por proteasoma (Pauwels y Goossens, 2011).

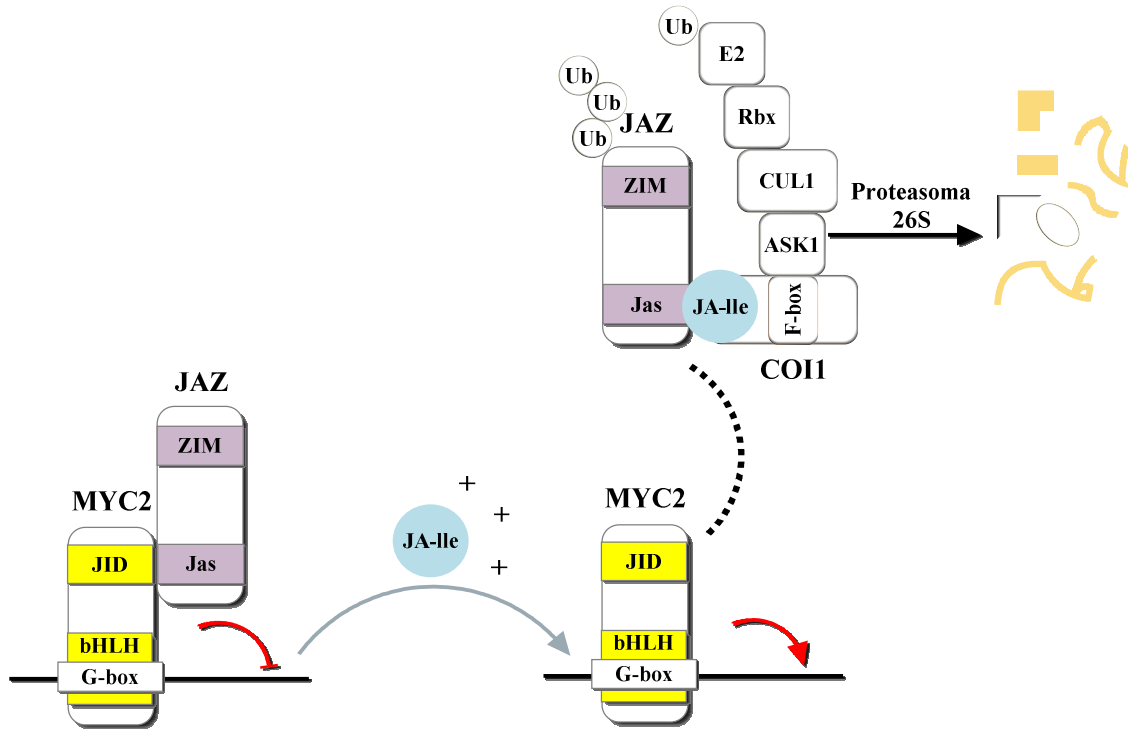


Figura 1-4. Modelo de la degradación mediada por JA-Ile vía proteasoma 26S. En ausencia de JA-Ile, JAZ está unido a MYC2 y reprime la expresión del gen. En presencia de JA-Ile, mientras MYC2 queda libre para realizar su función, COI1-SKP puede formar un sustrato adaptador que con JA-Ile e InsP5 como un cofactor, une el dominio Jas de las proteínas JAZ. Posteriormente cuando se forma el complejo ligasa SCF^{COI1} E3, JAZ es presumiblemente poliubiquitinado, marcado para su degradación por el proteasoma 26S (Adaptado de Pauwels y Goossens, 2011).

Los JAZ también regulan el complejo WD40/bHLH/MYB involucrado en la biosíntesis de antocianinas y en el desarrollo de tricomas. GL3, EGL3 y TT8 funcionan en un complejo, que por una parte está interconectado directamente con la proteína WD40 *TESTA TRANSPARENTE GLABRA1* (AT5G24520) y por otra, con diferentes proteínas MYB R2R3. El complejo GL3/EGL3/TT8 regula múltiples procesos, incluyendo desarrollo de tricomas y pelos de la raíz, biosíntesis de flavonoides (antocianinas y proantocianidinas), patrones estomáticos en hipocotilos y biosíntesis de mucílago (Zhang *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*, 2004; Broun, 2005; Serna y Martin, 2006; Gonzalez *et al.*, 2008; Ishida *et al.*, 2008; Balkunde *et al.*, 2010; Dubos *et al.*, 2010). La biosíntesis de antocianina y la iniciación de tricomas son inducibles por JAs (Feys *et al.*, 1994; Traw y Bergelson, 2003; Maes *et al.*, 2008). Esta inducción requiere el receptor de JA COI1 y las proteínas bHLH tipo GL3/EGL3/TT8 (Maes *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2011).

También se ha demostrado que el complejo MYC2/MYC3/MYC4 está involucrado en la inducción de la biosíntesis de antocianinas mediada por JA (Lorenzo *et al.*, 2004; Dombrecht *et al.*, 2007; Niu *et al.*, 2011), sin embargo la inducción de tricomas parece ser independiente de la presencia de MYC2 (Yoshida *et al.*, 2009).

Muchas proteínas JAZ interactúan directamente con proteínas MYB R2R3 como PAP1 PRODUCCIÓN DE PIGMENTO ANTOCIANINA1 (AT1G56650) y GL1 (AT3G27920), los cuales tienen papeles específicos en la síntesis de antocianinas y la iniciación de tricomas (Pauwels y Goossens, 2011).

Mediante un análisis de transcriptoma de estambres tratados con JA se identificaron dos proteínas MYB R2R3 (MYB21: AT3G27810 y MYB24: AT5G40350), que son reguladores clave de los procesos de maduración de estambres (Mandaokar *et al.*, 2006). Por otra parte, al menos JAZ1, JAZ3 y JAZ9 puede unir EIN3 y EIL1. La represión de EIN3/EIL1 media la interacción entre la señalización por etileno y JA que ocurre en muchos procesos relativos a desarrollo y defensa (Bari y Jones, 2009; Grant y Jones, 2009; Kuppusamy *et al.*, 2009; Pauwels *et al.*, 2009; Van der Ent *et al.*, 2009; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011) (Figura 1-5A).

Las proteínas JAZ contienen un motivo conservado TIFY dentro del dominio TIFY (Vanholme *et al.*, 2007) que media interacciones homo y heterodiméricas entre diferentes proteínas JAZ y otros factores de transcripción (Melotto *et al.*, 2008; Chung y Howe, 2009; Chini *et al.*, 2009). El dominio TIFY también tiene como función reclutar co-represores transcripcionales, tales como TOPLESS (TPL), a través de la proteína Nuevo Interactor de JAZ (NINJA) mediante el motivo EAR, todo esto ha permitido realizar un modelo más complejo y con más componentes de la percepción de JA y la vía de señalización del mismo. NINJA, el cual es un regulador negativo de la síntesis de JA, ha sido propuesto como un adaptador que media la unión entre las proteínas JAZ y el complejo represor TPL (Pauwels *et al.*, 2010). (Figura 1-5B).

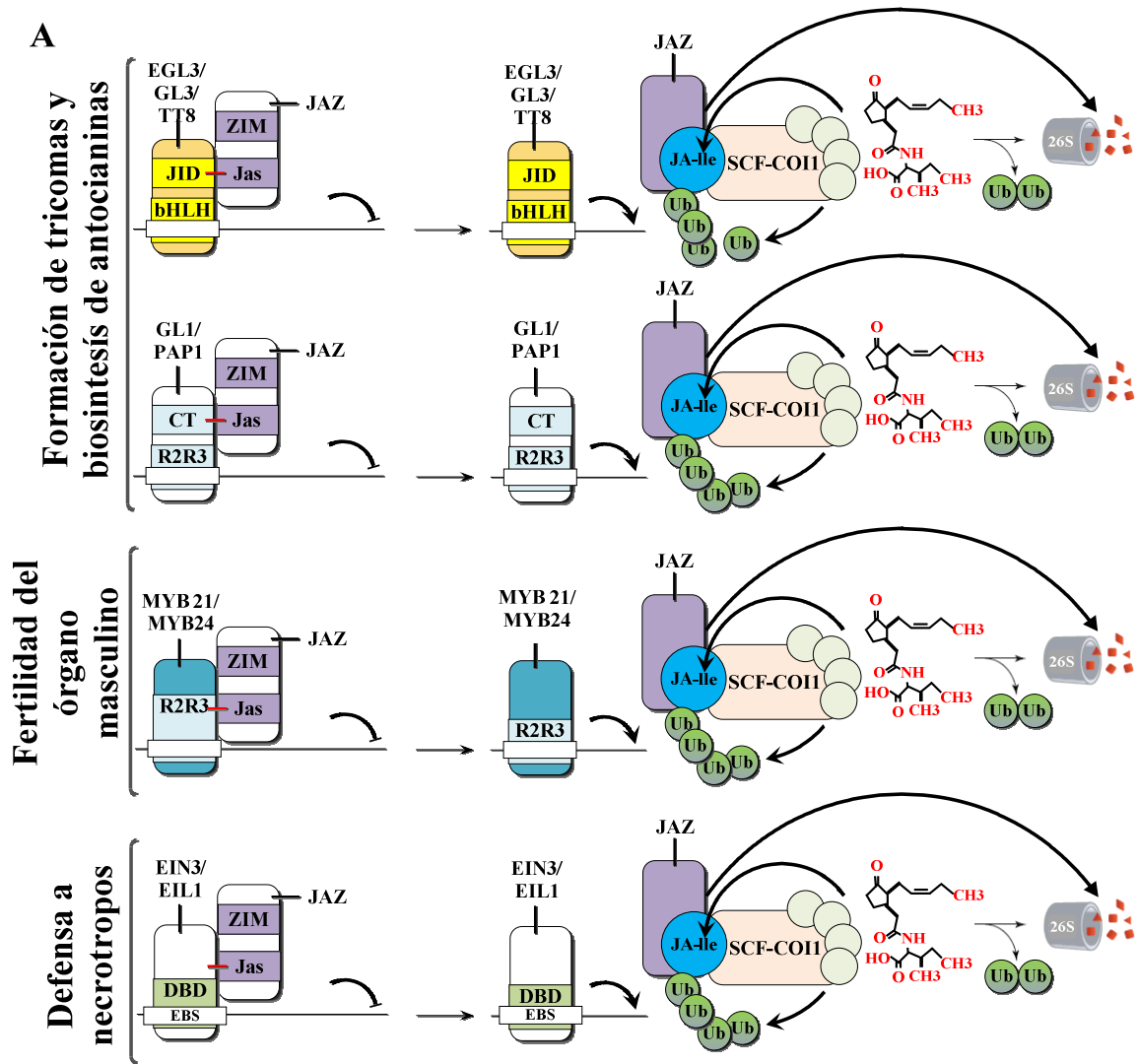


Figura 1-5A. Modelos de inhibición de respuestas a ácido jasmónico (JA) por interacción de proteínas JAZ con otras proteínas. Representación esquemática de diferentes combinaciones de Factores de transcripción interaccionando con los JAZ, donde se muestran las respuestas a JA más importantes controladas por los respectivos factores de transcripción (Adaptado de Pauwels y Goossens, 2011; De Geyter *et al.*, 2012).

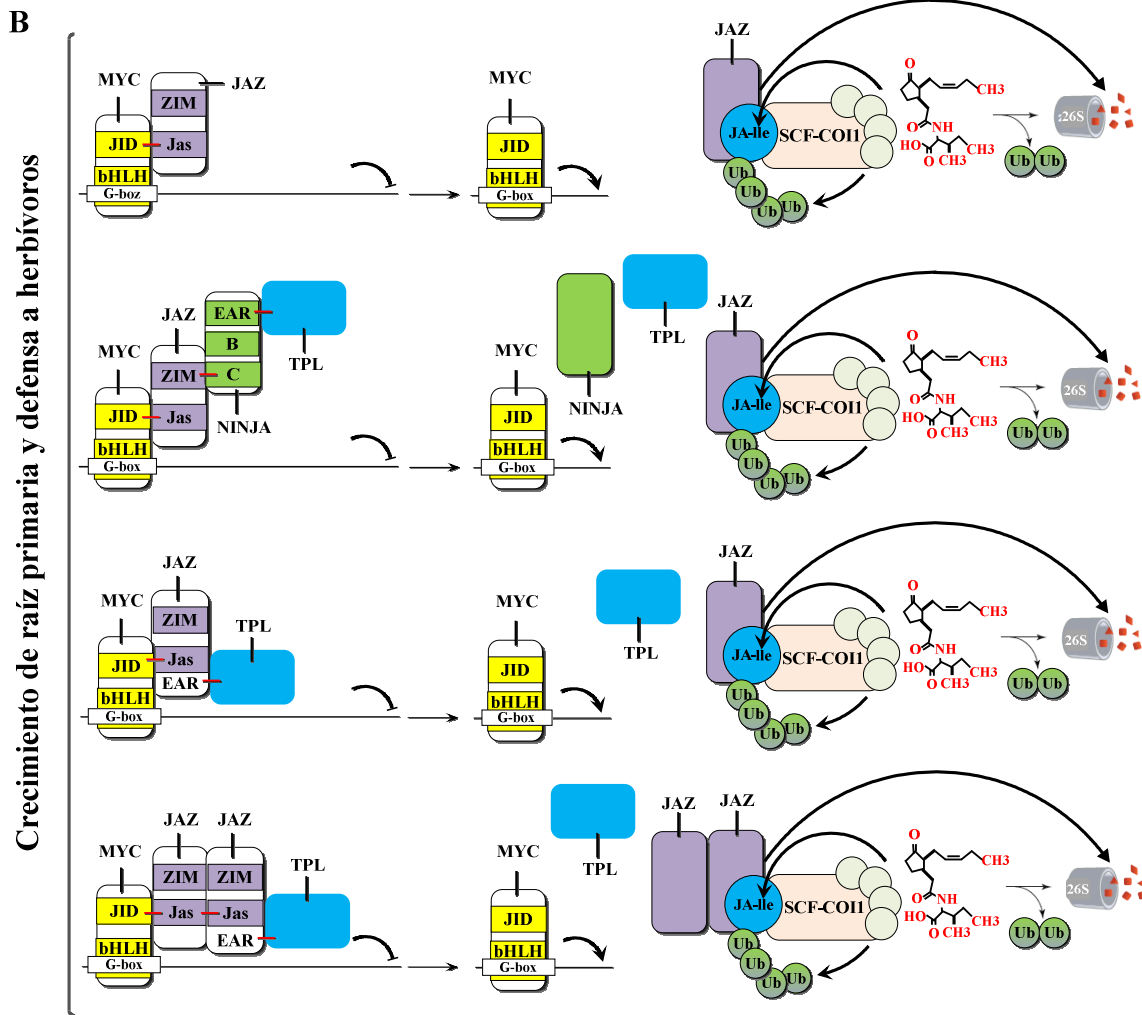


Figura 1-5B. Modelos de actuación del jasmonato en la regulación de los genes MYC. En ausencia de *JA-iso-leucina (JA-Ile)*, en el primer caso las proteínas JAZ inhiben la actividad de unión de ADN de MYC, en el segundo caso MYC es reprimido por el complejo co-represor que contienen el *Nuevo Interactor de JAZ (NINJA)* y TOPLESS y en el tercer caso se muestra la represión de MYC por el complejo JAZ (los que contienen un motivo EAR)/TOPLESS. Cuando hay señales de estrés o desarrollo los niveles de (+)-7-*iso-JAL-Ile* aumentan y se une al receptor *CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1)*, el cual forma parte del complejo E3 ubiquitin ligase Skp-Culina-F-box (SCFCOI1), de este modo recluta las proteínas JAZ, uniéndolas al complejo para su degradación por el proteasoma 26S, dejando a MYC libre para que pueda modular la expresión de los genes de respuesta a JA, crecimiento de raíz y respuesta a herbívoros, mientras NINJA y TOPLESS pueden intervenir en otras interacciones (Adaptado de Pauwels y Goossens, 2011; De Geyter *et al.*, 2012).

Por último, la subfamilia ZML está formada por tres miembros en *Arabidopsis* (ZIM, ZML1, y ZML2) que presentan los dominios TIFY, Jas, CCT y GATA-Zinc Finger. El primer estudio funcional llevado a cabo para un miembro de esta subfamilia fue realizado para el gen de *Arabidopsis thaliana*, AT4G24470, el cual estaba altamente

expresado en el tejido reproductivo. La correspondiente proteína, se describió como un factor de transcripción putativo, que contenía un dominio C2C2-GATA-*Zinc Finger* (C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C, donde X representa cualquier aminoácido) y de acuerdo con esto fue nombrada ZIM, por proteína *Zinc Finger* expresada en Inflorescencia del Meristemo (Nishii *et al.*, 2000). Diversos tipos de dominios GATA han sido estudiados en vertebrados, hongos y plantas. Originalmente en vertebrados fue identificado un motivo C-X₂-C-X₁₇-C-X₂-C que permitía a la proteína GATA-*Zinc Finger* unirse a la secuencia (A/T)GATA(A/G) (Evans y Felsenfeld, 1989), también fueron encontrados dos motivos de este subtipo el C-X₂-C-X₁₈-C-X₂-C y el C-X₂-C-X₁₉-C-X₂-C en hongos y plantas (Daniel-Vedele y Caboche, 1993; Teakle y Gilmartin, 1998).

Con el propósito de conocer si la proteína ZIM actuaba como un activador o como un represor, se efectuaron experimentos de expresión transiente en células de tabaco, en que los que se empleó como efector el dominio de unión a ADN GAL4 fusionado a la proteína ZIM o versiones truncadas de la misma y como reportero el gen que codifica para la luciferasa *FIREFLY* (LUC) controlado por un promotor que contenía el sitio de unión del GAL4 (6 x UAS), obteniendo como resultado que el ZIM de *Arabidopsis* se comportaba como un activador y que además el dominio que promovía la activación se encontraba en la región N-terminal de esta proteína (Shikata *et al.*, 2003).

Posteriormente, mediante la caracterización de plantas en *Arabidopsis* que sobreexpresaban la proteína ZIM bajo el control del promotor de CaMV 35S, se llevó a cabo un estudio funcional de la subfamilia ZIM de *Arabidopsis*. Las líneas sobreexpresantes ZIM-ox presentaban hipocotilos y peciolas elongados, este fenotipo no se modificó bajo tratamientos de diferentes tipos de luz (rojo, rojo lejano, luz blanca y azul), indicando que la sobreexpresión de ZIM afecta la regulación de la elongación y el posicionamiento de la hoja, así como la regulación de la señalización y respuesta a la luz. De igual modo, en presencia de brasinosteroides (BRs) o giberelinas (Gas), los mutantes ZIM-ox no presentaron ningún cambio, lo que sugiere que la elongación de la sobreexpresión de ZIM es independiente de BRs y GAs.

Por otra parte, cuando se llevaron a cabo experimentos de microarrays usando los mutantes de ZIM-ox, fueron identificados genes que estaban sobre-expresados como por ejemplo *XTH33* que se postula que tiene funciones en la modificación de la pared

celular, lo que podría estar influenciando el fenotipo de elongación. También se determinó que los genes *XTH* que presentaban mayor expresión estaban en la punta del tallo y la hoja, con lo cual se podría sugerir que la regulación transcripcional efectuada por ZIM y sus efectos están controlados espacialmente (Shikata *et al.*, 2004).

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* han sido identificados otros dos miembros de la subfamilia ZML (ZIM-like) que son AT3G21175 y AT1G51600, posteriormente mediante análisis de homología de secuencia han sido identificados miembros de esta subfamilia en otras especies (Tabla 1-1). Como se había mencionado anteriormente, además del dominio GATA y un dominio CCT (CONSTANS, CO-like, TOC1), las proteínas ZIM y ZML se caracterizan por contener un dominio llamado TIFY, que generalmente tiene el motivo conservado T[I/L]SFXG (pfam06200), sin embargo la subfamilia ZML no presenta una elevada conservación de este motivo (Figura 1-6) (Bai *et al.*, 2011).

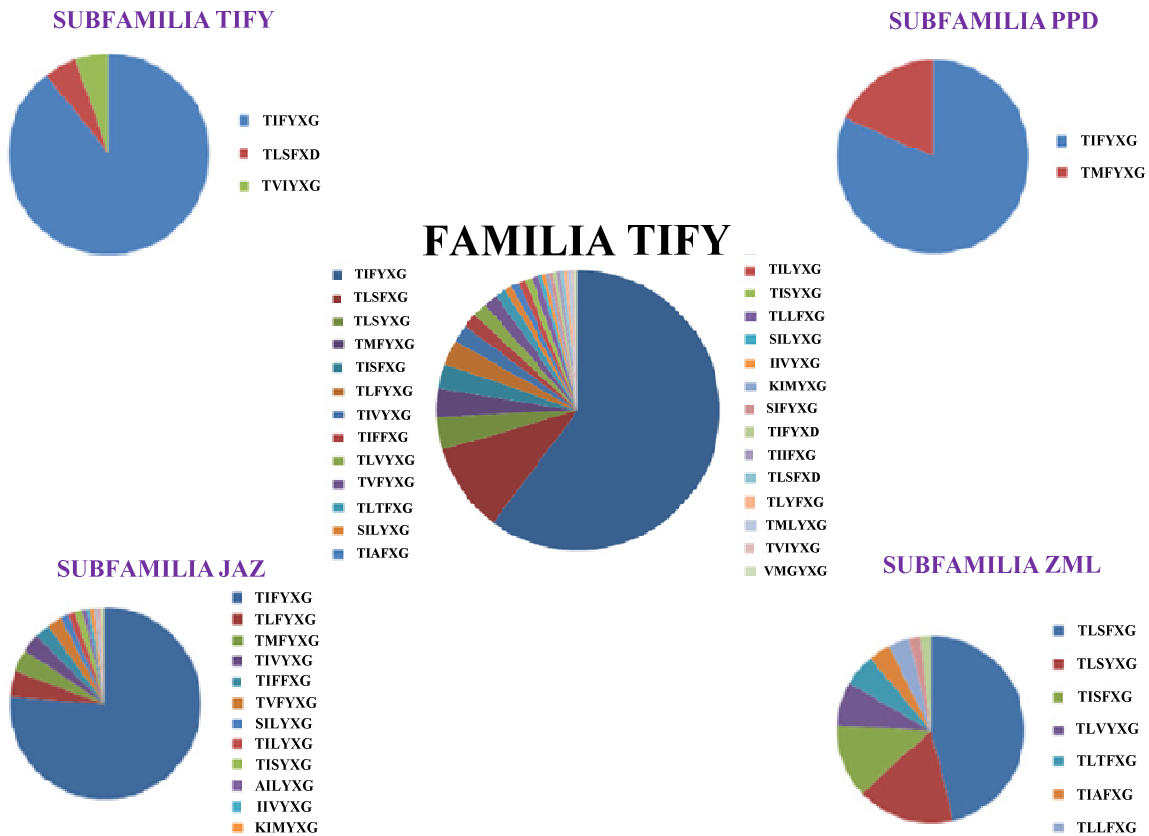


Figura 1-6. Distribución del núcleo del motivo “TIFYXG”. El motivo “TIFYXG” es un núcleo dominante del motivo en el dominio TIFY de la familia de factores de transcripción TIFY, excepto en la subfamilia ZML en la cual “TLS[F/Y]XG” es más prevalente (Adaptado de Bai *et al.*, 2011).

1.3 Regulación de factores de transcripción mediante fosforilación

Las redes de señalización de la célula permiten a la planta responder dinámicamente a cambios ambientales a través de reacciones bioquímicas y adaptaciones fisiológicas. La fosforilación reversible de proteínas a través de las proteínas quinasas y fosfatasa es uno de los usos más amplios del mecanismo bioquímico en la señalización celular y la respuesta enzimática (Tchieu *et al.*, 2003).

Las proteínas quinasas y fosfatasa constituyen cerca de un 5% de los genes en *Arabidopsis*, ambas son componentes críticos de muchas vías de señalización de plantas en respuesta a frío, sequía y concentraciones elevadas de sal (Chinnusamy *et al.*, 2004; Teige *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004), presencia de patógenos (Nurnberger *et al.*, 2004; Rowland *et al.*, 2005), ABA (Fan *et al.*, 2004), Etileno (Etheridge *et al.*, 2005),

percepción de luz (Chen *et al.*, 2004), requerimientos del desarrollo (Dievart y Clark, 2003), metabolismo del carbón (Rolland y Sheen, 2005) y ciclo celular (Koroleva *et al.*, 2004).

Numerosas vías de señalización están influenciadas por la ubicua Ser/Thr proteína quinasa CK2. En todas las eucariotas, el típico holoenzima es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades catalíticas (CK2 α y CK2 α') y dos subunidades reguladoras (CK2 β) (Figura 1-7). Una de las características distintivas de la CK2 de plantas es que presenta un gran número de genes que codifican para las subunidades CK2 α/β a diferencia de animales o levadura donde el número de genes que constituyen la familia CK2 es reducido. En *Arabidopsis* y maíz las subunidades CK2 α/β pertenecen a una familia multigénica compuesta por más de cuatro genes (Vélez-Bermúdez *et al.*, 2011).

La subunidad reguladora CK2 β tiene como funciones la estabilidad, actividad y especificidad del holoenzima CK2 $\alpha\beta$, pero también puede realizar funciones independientes del tetrámero CK2 (Riera *et al.*, 2011). Muchos de los sustratos de CK2 son proteínas conocidas por regular eventos transcripcionales (Lehnert *et al.*, 2008).

La proteína quinasa CK2 de plantas está involucrada en la respuesta a estrés abiótico y biótico (Ver Anexo III; *Specific Features of Plant CK2*, Riera *et al.*, 2013). Uno de los papeles de la CK2 de plantas en respuesta a estrés por sal fue demostrado usando un abordaje de complementación en levadura, donde la sobreexpresión de la subunidad CK2 α de la remolacha incrementó la tolerancia a NaCl en *S. cerevisiae* (Kanhonou *et al.*, 2001). Además, la sobre expresión de la CK2 β 1 de maíz en células de levadura que carecen de una isoforma de CK2 β , exhiben un fenotipo de incremento de sensibilidad a iones de sodio y litio (Riera *et al.*, 2001). Recientemente, el fenotipo del triple mutante de CK2 α 1 α 2 α 3 de *Arabidopsis* hiposensitivo a NaCl ha confirmando el papel de CK2 en respuesta a estrés salino en plantas (Mulekar *et al.*, 2012).

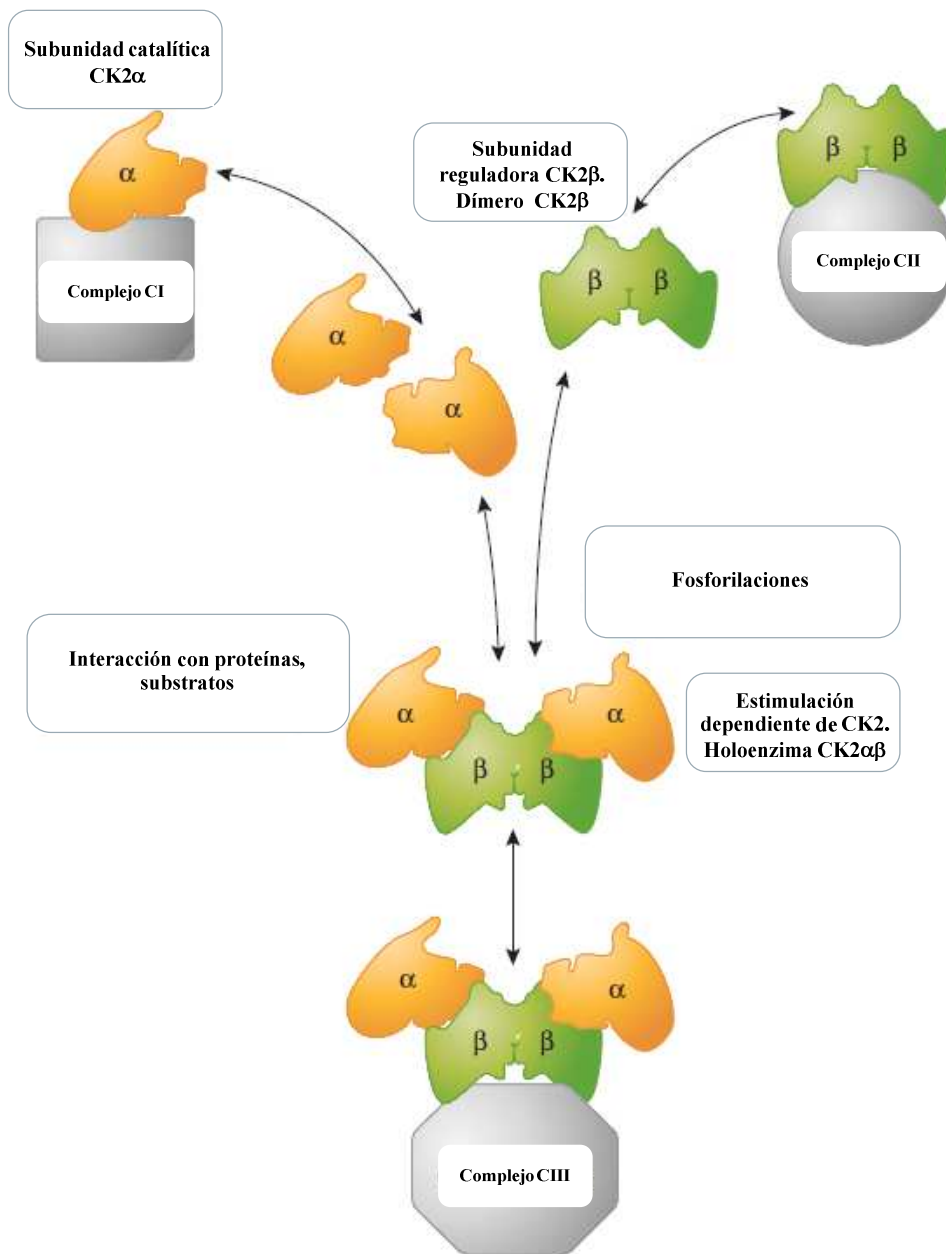


Figura 1-7. Modelo de actuación de la proteína quinasa CK2. Se muestran las subunidades independientes de la proteína quinasa CK2. Las subunidades catalíticas CK2α y las subunidades reguladoras CK2β, las cuales forman dímeros. Se puede observar que las subunidades que componen la CK2 pueden actuar de forma independiente o juntas formando el holoenzima CK₂α₂β₂. Las subunidades CK2β pueden estar cumpliendo funciones independientes de CK2 al interactuar con subunidades catalíticas de otras quinasas. Por otro lado, las subunidades reguladoras puede estar interactuando con otras proteínas no quinasas y además puede regular la estabilidad de sus proteínas interactoras. La presencia de las proteínas interactoras o sustratos y las modificaciones post-traduccionales dinámicas, tales como la fosforilación, puede ser el balance entre las diferentes formas de las subunidades CK2. CI y CII señalan la formación de complejos macromoleculares y CIII otros complejos donde el holoenzima es reclutado de manera reversible (Adaptado de Filhol *et al.*, 2004; Bolanos-Garcia *et al.*, 2006).

Muchas proteínas relacionadas con la respuesta a estrés son sustratos de CK2. Las proteínas abundantes en embriogénesis tardía (LEA)/Rab/dehidrinas están entre las más comunes de plantas, además están involucradas en la adaptación a agua o estrés osmótico. La proteína de maíz Rab17 es inducida por ácido abscísico (ABA) y fuertemente fosforilada por CK2 (Plana *et al.*, 1991). También fue demostrado que a través de la interacción y la fosforilación, la CK2 modula funciones del desarrollo de Rab17 en la germinación de semillas en respuesta a estrés osmótico (Riera *et al.*, 2004).

Adicionalmente, en maíz se determinó que la actividad de unión de los factores de transcripción bZIP, EmBP-2 y ZmBZ-1 es modulada por la fosforilación por CK2. Ambos factores son proteínas nucleares que unen a ABRE (Elementos de Respuesta a ABA) y activan la transcripción del gen inducible por ABA *rab28* (Nieva *et al.*, 2005). Hay pocos datos sobre la activación de CK2 por hormonas en plantas. El ácido salicílico (SA) es una importante fitohormona involucrada en la activación de las respuestas a defensa contra estrés biótico. En un trabajo previo, fue reportado que el SA incrementó la actividad nuclear de CK2 en plantas de tabaco (Hidalgo *et al.*, 2001). En *Arabidopsis*, los tratamientos de SA aumentan la fosforilación del factor de transcripción bZIP, TGA2, influenciando negativamente su habilidad de unión a ADN (Kang y Klessig, 2005). Recientemente, la co-chaperona *p23*, también involucrada en la señalización por SA, ha sido identificada como un nuevo sustrato para CK2 en *Arabidopsis* (Tosoni *et al.*, 2011). Además, se ha mostrado que la actividad de sintasa fitoquelatina (PCS), una proteína involucrada en estrés biótico y respuesta a metales pesados en plantas, esta incrementada después de la fosforilación por CK2 (Wang *et al.*, 2009).

La proteína quinasa CK2 también juega un papel importante en la fosforilación de proteínas involucradas en muchos procesos dependientes de ADN, tales como replicación de ADN, transcripción, translación, recombinación, reparación o biogénesis ribosomal (Riera *et al.*, 2013).

Una trabajo previo realizado en nuestro laboratorio permitió la identificación de un clon parcial de una proteína tipo GATA-Zinc Finger, a través de un cribado mediante doble híbrido de una librería de cDNA, construida a partir de mRNA de hoja de maíz joven sometida a tres horas de deshidratación, en el cual se había utilizado como anzuelo la subunidad reguladora CK2 β 1 de maíz (Figura 1-8). Este clon fue denominado 91 y

correspondía a una isoforma parcial, ya que carecía de la región N-terminal, sin embargo, incluía los dominios TIFY, Jas, CCT y GATA-Zinc Finger.

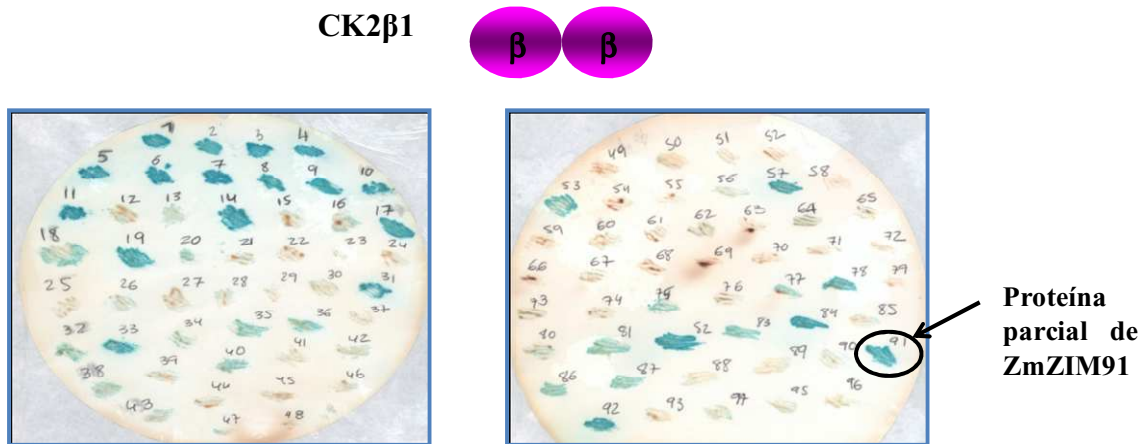


Figura 1-8. Identificación de ZmZIM91 por medio de un ensayo de doble híbrido utilizando la subunidad reguladora β 1 de la proteína quinasa CK2 de maíz. El experimento se realizó a partir de una librería de hoja joven de maíz estresada por sequía. En la parte superior, se observa el resultado total del experimento, en el círculo negro se encierra el clon correspondiente a la proteína parcial de ZmZIM91. En la parte inferior se muestra una gráfica de los resultados del ensayo, los cuales fueron que un 53% de los clones correspondían a subunidades tanto reguladoras como catalíticas α/β de CK2 y un 47% a factores de transcripción y proteínas de procesamiento de ARN.

1.4 Regulación transcripcional

La regulación es un proceso fundamental mediante el que los organismos multicelulares responden a estrés abiótico y biótico, al igual que modulan procesos de desarrollo. La maquinaria transcripcional de eucariotas consiste en dos componentes reguladores complementarios: los elementos en *cis* y las proteínas actuando en *trans*. Las secuencias de ADN en *cis* comprenden el promotor central proximal que incluye la caja TATA y elementos iniciadores así como elementos aguas abajo del promotor proximal y regiones regulatorias distales incluyendo aumentadores, represores y aisladores (Smale y Kadonaga, 2003). Las proteínas actuando en *trans* involucran la ARN polimerasa II, factores transcripcionales generales, factores transcripcionales de unión a secuencias específicas, cofactores que usualmente no contienen un dominio de unión a ADN y factores de modificación de la cromatina (Mannervik *et al.*, 1999).

A través de la modulación de los patrones de expresión de los genes, la diferenciación y función celular están altamente controladas. El encendido o apagado de la expresión específica de genes es uno de los principales mecanismos moduladores y se da principalmente a través de la asociación y disociación de los factores de transcripción con los promotores de sus genes diana. Por lo tanto, desvelar el mecanismo que usan los factores de transcripción para regular sus genes diana es esencial para entender procesos biológicos importantes. Se han desarrollado diversos métodos para identificar interacciones entre el factor de transcripción y el gen diana e investigar cómo y cuándo responden las células a diferentes señales (Wu *et al.*, 2010).

Uno de los métodos empleados es la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), en el que los fragmentos diana de una proteína son enriquecidos mediante la inmunoprecipitación. Posteriormente, con el fin de conocer el papel de un factor de transcripción a nivel genómico se desarrolló una técnica en la cual el ChIP es hibridado con un microarray de ADN, dando lugar a una técnica denominada ChIP-chip. Con este método solo pueden ser detectados los genes diana incluidos en el microarray.

El avance en los métodos de secuenciación dio lugar a las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS). Seguidamente, el ChIP fue fusionado con las NGS, originando una técnica llamada ChIP-Seq, que combina la inmunoprecipitación de la cromatina con la secuenciación en paralelo a gran escala. En esta técnica primero se realiza una inmunoprecipitación de ADN y seguidamente se efectúa una secuenciación masiva de los sitios enriquecidos para conocer a nivel genómico los fragmentos diana de una proteína o las modificaciones de las histonas. El ChIP-Seq provee una visión global de los elementos reguladores en *cis*, la función de factores de transcripción y de los procesos epigenéticos involucrados en el control de la transcripción génica (Kidder *et al.*, 2011).

Objetivos

2. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo es la caracterización funcional de un nuevo factor de transcripción de maíz el cual ha sido llamado ZmZIM91. La información que se logre obtener de esta proteína permitirá establecer cuál es el papel que desempeña dentro de la planta de maíz, definiendo el proceso biológico en el que está implicado y su importancia dentro del mismo. Para ello, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización molecular de ZmZIM91, que conlleva al desarrollo de los siguientes apartados:

1.1 Aislamiento del clon completo de ZmZIM91.

1.2 Caracterización de la respuesta de ZmZIM91 en presencia de la hormona MeJA.

1.3 Determinación del sitio de unión a ADN de ZmZIM91.

1.4 Estudio de la interacción y regulación de la proteína ZmZIM91 y la proteína quinasa CK2 de maíz.

2. Caracterización funcional de ZmZIM91, realizando:

2.1 Identificación de genes diana de ZmZIM91 *in vivo* mediante el uso de ChIP-Seq.

2.2 Análisis de la interacción de ZmZIM91 con otras proteínas que regulan los promotores de los genes diana de ZmZIM91 identificados mediante ChIP-Seq.

Capítulo I

Capítulo I

3. Caracterización molecular de la proteína ZmZIM91 de maíz

3.1 Resultados

3.1.1 Obtención del cDNA completo de *ZmZIM91*

Para la obtención del clon completo de *ZmZIM91*, se diseñaron cebadores basándose en la secuencia de ADN de un gen de maíz que presentaba alta homología y que fue hallada en la base de datos MaizeSequence.org (GRMZM2G058479_T01). Como DNA molde para la reacción de amplificación se utilizó cDNA obtenido por retrotranscripción a partir de RNA de hoja de maíz. Debido a la dificultad técnica para amplificar el clon de *ZmZIM91*, fue necesario realizar un experimento utilizando diferentes cantidades de Betaína y DMSO, (Henke *et al.*, 1997) y se determinó que con DMSO al 5% (ver materiales y métodos) se obtenía una banda específica del tamaño molecular esperado. Tras el clonaje y posterior secuenciación de la banda se comprobó que correspondía al clon completo. La secuencia obtenida contenía 354 aminoácidos (Figura 3-1), un peso molecular teórico de 38 kDa y un pI de 5.17.

3.1.2 Localización subcelular de *ZmZIM91*

Muchos factores de transcripción están principalmente localizados en el núcleo, mientras otros se mueven del citoplasma al núcleo en respuesta a cascadas de señalización. Para establecer la localización subcelular de *ZmZIM91*, se realizó un ensayo transciente en el que se transformaron protoplastos de maíz usando la construcción 35S::*ZmZIM91*:GFP. La proteína *ZmZIM91* muestra un patrón específico de localización nuclear, en contraste con la GFP sola que se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma (Figura 3-2). Esto indica que *ZmZIM91* posee una localización subcelular similar a la de otros miembros de la familia TIFY como es el caso de los JAZ.

```

1  M S H H D G S K P Y Q P R R G P E R H P
1  ATGTCCCACACGACGGAAGCAAGCCATACCAGCCGCGCCGGGGGCCCGAGCGGCACCCG
21  Q P A D G I A A S P P A A V A P S V E H
61  CAGCCAGCGGATGGGATCGCCGCTCGCCTCCCGCCGCGTTGCCCGTTCGGTGGAGCAC
41  L V A A A A E A E A L N R F A A E Q Q Q
121  CTCGTGGCGGCCGCGCCGAGGCGGAGGCATTGAACCGCTTCGCGCGGAACAACAGCAG
61  Q L Q G H E Q E V G E E E E E D E Q E
181  CAGCTGCAGGGGCACGAGCAGGAGGTTGGGGAGGAAGAGGAGGAGGAGGACGAGCAGGAA
81  D E M E E E D E D E H E G Q H G G I G G
241  GACGAGATGGAGGAGGAGGACGAGGATGAGCACGAAGTTCAGCACGGCGGCATCGGTGGG
101  E H V P M D A D A A A A A A A A V S Q
301  GAGCACGTTCCCATGGACGCGGATGCTGCTGCCGCGCGCGCGCGCCGCGAGTCTCGCAG
121  M D P H S A L V A G T V T P M A T N Q L
361  ATGGACCCGCACTCGGCGTTGGTGGCTGGGACTGTGACACCCATGGCGACCAACCAGCTC
141  T L S F Q G E V Y V P D S V S P D K V Q
421  ACCCTCTCATTCCAGGGCGAGGTCTATGTGTTGACTCCGTCTCCCCTGATAAGGTCCAA
161  A V L L L L G G R E L S S L G G A S S S
481  GCCGTGCTTTGCTGCTTGGAGGAGGGAGCTGAGCAGCCTGGGCGGAGCGTCTGCTCT
181  A P Y S K R L N Y P H R V A S L M R F R
541  GCACCTTATAGTAAGAGGTTGAATTATCCACATCGGGTGGCATCTCTGATGAGATTTAGG
201  E K R K E R N F D K K I R Y S V R K E V
601  GAAAAGCGGAAGGAGCGGAACTTTGATAAGAAGATCCGATACTCTGTCCGGAAGGAAGTT
221  A L R M Q R N R G Q F T S S K P K P D E
661  GCACTTAGGATGCAGCGTAATCGAGGTTCAGTTTACATCTTCAAAAACCAAGCCTGATGAA
241  I A A S E M A S A D G S P N W A L V E G
721  ATAGCGGCTTCAGAAATGGCATCCGAGATGGCTCCCGAATTGGGCATTAGTTGAAGGC
261  R P P S A A E C H H C G T N A T A T P M
781  CGACCTCCATCTGCTGCCGAATGCATCACTGTGGTACTAATGCAACAGCTACACCAATG
281  M R R G P D G P R T L C N A C G L M W A
841  ATGCGTCGCGGACCTGATGGACCAAGAACATTATGCAATGCATGTGCCTCATGTGGGCA
301  N K G L L R D V T K S P V P L Q A T Q S
901  AATAAGGTCTCCTGAGGGACGTAACAAAATCTCCTGTACCTCTCCAAGCTACGCAATCA
321  A P H L D G G N G S A M S A P G S E L E
961  GCTCCGCATCTAGATGGTGGTAATGGAAGCGCCATGTCTGCGCCTGGCTCTGAGCTAGAG
341  N A A A A M T N G H E S S S S G V V
1021  AATGCTGCAGCAGCCATGACCAATGGCCACGAGTCATCGAGTAGTGGTGTAA

```

Figura 3-1. Secuencia de ZmZIM91 en aminoácidos y cDNA. En color rojo se señalan los aminoácidos que componen el N-terminal que fue amplificado y los cuadros en azul muestran los putativos sitios de fosforilación por la proteína quinasa CK2 que fueron identificados en la proteína de ZmZIM91.

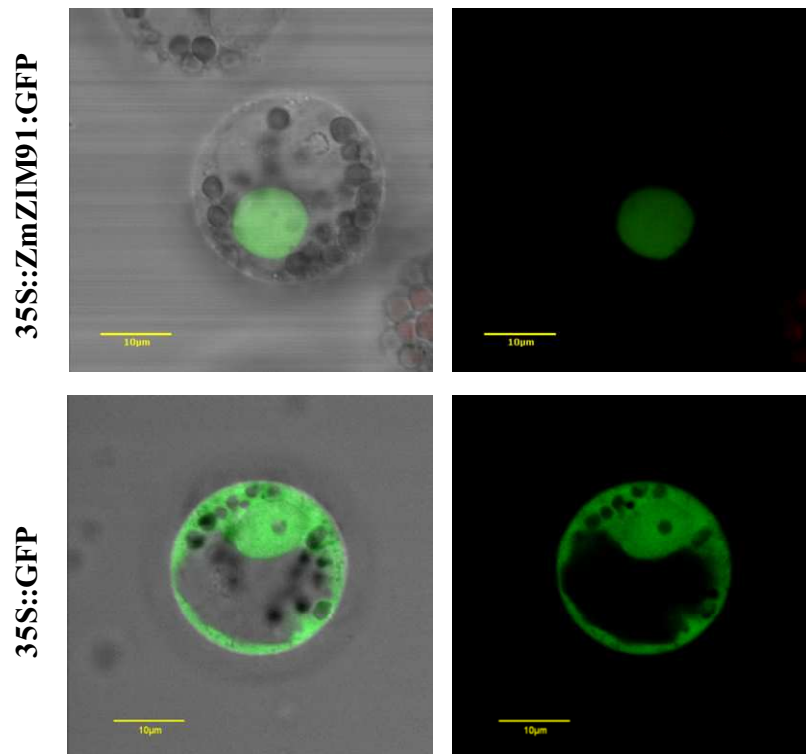


Figura 3-2. Localización subcelular de ZmZIM91 en protoplastos de maíz. 35S::ZmZIM91:GFP fue expresado mediante transformación transciente en protoplastos de maíz por electroporación. En el panel superior se puede observar tanto el campo de la GFP como en el *merge* que ZmZIM91 presenta una localización nuclear (60X). En la parte inferior, se encuentra la GFP, que presenta una localización tanto en el núcleo como en citoplasma (60X). Para todos los paneles la barra de medida en color amarillo (Bar) = 10 μ m.

3.1.3 ZmZIM91 pertenece a la subfamilia ZML de maíz

Para realizar el análisis filogenético de la proteína ZmZIM91, se llevó a cabo una búsqueda de otros miembros de la subfamilia ZML de maíz utilizando la base de datos www.maizesequence.org y realizando un alineamiento de la proteína ZmZIM91 contra el genoma de la línea homocigótica B73, lo anterior permitió la identificación de dos miembros más en maíz. Posteriormente se recopilaron las secuencias proteicas de los 3 miembros de esta subfamilia en *Arabidopsis* que ya habían sido previamente identificados (Nishii *et al.*, 2000), y por último se procedió a comparar la información con los datos recopilados por Bai *et al.* (2011). El árbol filogenético de la subfamilia ZML en maíz y *Arabidopsis* se construyó con el método *unrooted phylogenetic tree* (N-J) del programa ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) con las condiciones que se especifican en los materiales y métodos (Figura 3-3). Se observa que las proteínas de maíz y *Arabidopsis* de la subfamilia ZML son cercanas filogenicamente.

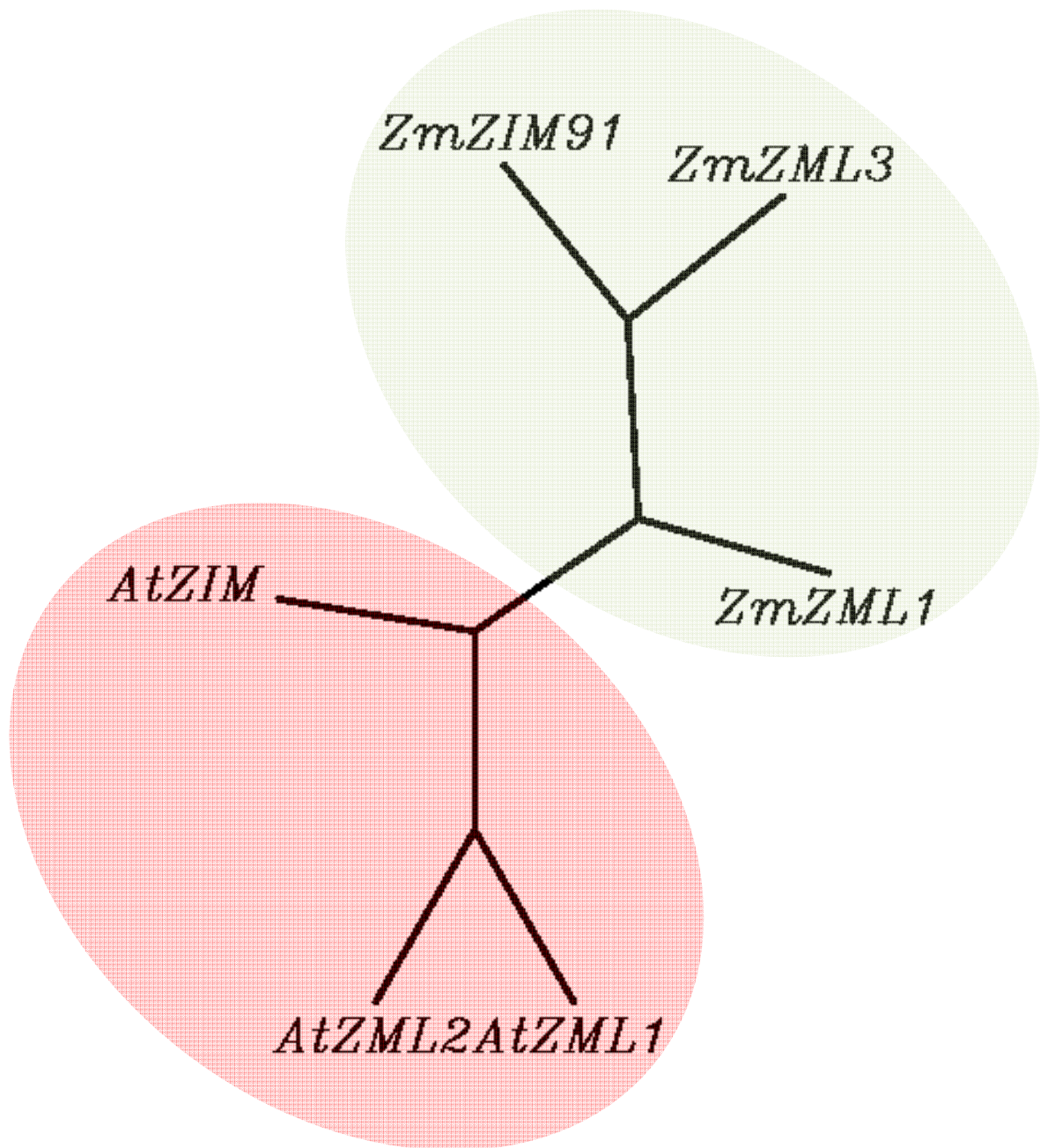


Figura 3-3. Árbol filogenético de la subfamilia ZML en maíz y *Arabidopsis*. Los identificadores para la búsqueda en las bases de datos tanto de *Arabidopsis* (TAIR) como de maíz (Maizesequence.org) son: AtZML1 (AT3G21175.1), AtZML2 (AT1G51600.1), AtZIM (AT4G24470.1), ZmZML1 (GRMZM2G065896_T01), ZmZIM91 (GRMZM2G058479_T01), ZmZML3 (GRMZM2G080509_T01). El círculo verde señala las proteínas ZML de maíz y el círculo rosa contiene las proteínas ZML de *Arabidopsis*.

Por otra parte, de acuerdo a datos de RNA-Seq del trabajo de Li *et al.*, 2010, se observa que los 3 miembros de la familia ZML en maíz tienen una mayor expresión en la base de la segunda hoja de maíz de 9 días (Figura 3-4).

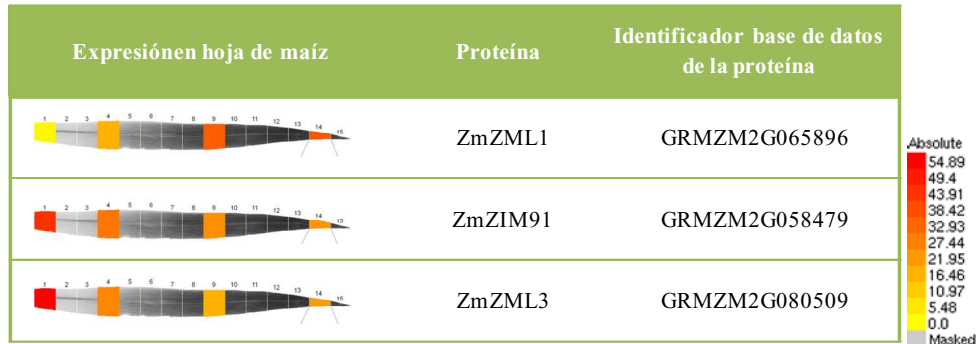


Figura 3-4. Expresión de las proteínas ZML de maíz en hojas de 9 días de la variedad B73. Se observa la expresión de cada uno de los miembros de la subfamilia ZML de maíz de acuerdo con datos de RNA-Seq proporcionados por la base de datos de Maize eFP Browser at Bar.utoronto.ca (Li *et al.*, Nature Genetics, 2010).

3.1.4 Dominios proteicos de ZmZIM91

Con respecto a las otras subfamilias pertenecientes a la familia TIFY, tanto ZmZIM91 como las demás proteínas ZML, contienen además del dominio TIFY y el Jas, un dominio CCT y un putativo dominio de unión a ADN tipo GATA-Zinc Finger (Figura 3-5). El dominio CCT fue descubierto por primera vez en el factor de transcripción TOC1 y las proteínas CONSTANS (CO), las cuales son conocidas por estar involucradas en la señalización fotoperiódica de plantas, además el dominio CCT fue implicado en la mediación de interacciones proteína-proteína (Robson *et al.*, 2001).

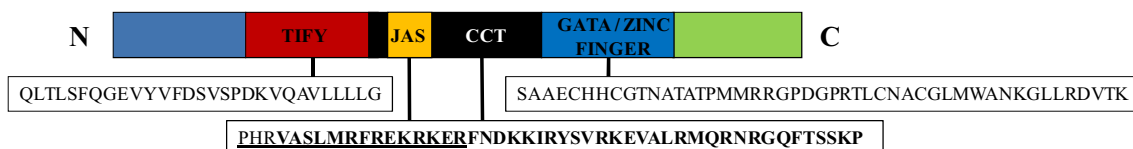


Figura 3-5. Aminoácidos correspondientes a los dominios conservados de ZmZIM91. En el cuadro rojo se encuentra el dominio TIFY y su correspondiente grupo de aminoácidos, en el amarillo está el dominio Jas y los aminoácidos que lo componen están subrayados, en el negro se representa el dominio CCT y el grupo de aminoácidos que lo conforma se señalan en negrilla y finalmente en el cuadro azul se puede ver el dominio GATA-Zinc Finger con sus respectivos aminoácidos.

El alineamiento entre los miembros de la familia ZML de *Arabidopsis* y maíz, muestran que los dominios contenidos en estas proteínas están conservados entre ambas especies (Figura 3-6). Sin embargo, hay divergencias entre los dominios TIFY y Jas de las proteínas de la subfamilia ZML y JAZ.

Mientras el dominio TIFY en los JAZ contiene un TIFYAG conservado, en los ZML se encuentra es el motivo TLSFQ, que además varía en dos aminoácidos en el caso de AtZIM en *Arabidopsis* y ZmZML1 en maíz. Se ha demostrado que el dominio TIFY en los JAZ de *Arabidopsis* es el responsable además de la dimerización de estas proteínas, de la represión y de la interacción con NINJA, sin embargo no se ha descrito función alguna de este dominio para los ZML en ninguna especie. Realizando un análisis de la secuencia aminoacídica que conforma dicho dominio en ZmZIM91, se encontraron dos putativos consensos de represión el LXLXFXGXV (LTLSFQGEV; aminoácidos 140-148) y el XLLLXX (VLLLLG; aminoácidos 162-167) (Figura 3-7). Un motivo similar a XLLLXX fue identificado únicamente en una proteína MYB-R3 (AtMYBL2) en el carboxilo terminal, la cual está involucrada en la regulación negativa de la biosíntesis de antocianinas en *Arabidopsis*, se trata del motivo TLLLFR (Matsui *et al.*, 2008; Kagale y Rozwadowski, 2010). Por otra parte, un nuevo motivo activo de represión R/KLFGV que es similar al LXLXFXGXV fue identificado en al menos 29 factores de transcripción de *Arabidopsis* miembros de las familias ABI3/VP1, ARF, HSF y MYB (Ikeda y Ohme-Takagi, 2009).

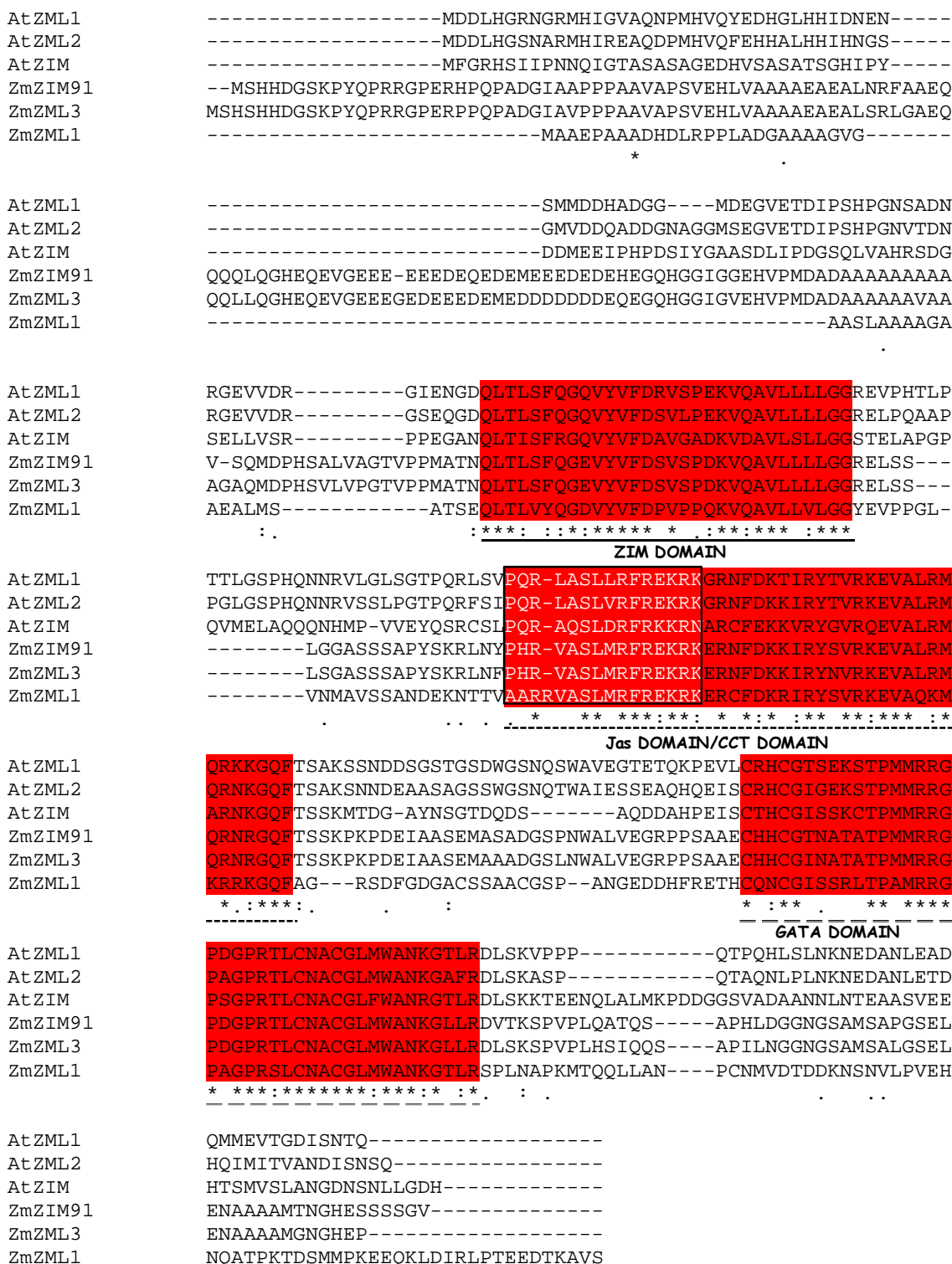


Figura 3-6. Alineamiento entre las proteínas ZIM de *Arabidopsis* y ZML de maíz. En color rojo se enmarcan los dominios conservados entre ambas especies. Los aminoácidos correspondientes al dominio Jas, están inmersos dentro del dominio CCT, y son señalados en blanco.



Figura 3-7. Identificación de motivos de represión putativos en el dominio TIFY de las proteínas ZML de maíz. En la imagen se muestra la posición de los dos motivos de represión putativos que fueron identificados en el dominio TIFY de ZmZIM91, el motivo LTLSFQGEV y el motivo VLLLLLG.

Se ha descrito que el dominio TIFY en los JAZ de *Arabidopsis*, es el responsable de la dimerización de estas proteínas (Melotto *et al.*, 2008; Chini *et al.*, 2009). En este trabajo se llevaron a cabo experimentos de Complementación Bimolecular (BiFC) en protoplastos de maíz y ensayos de doble híbrido para determinar la capacidad de ZmZIM91 para dimerizar y con ambos experimentos se confirmó que ZmZIM91 al igual que los JAZ podía dimerizar (Figura 3-8).

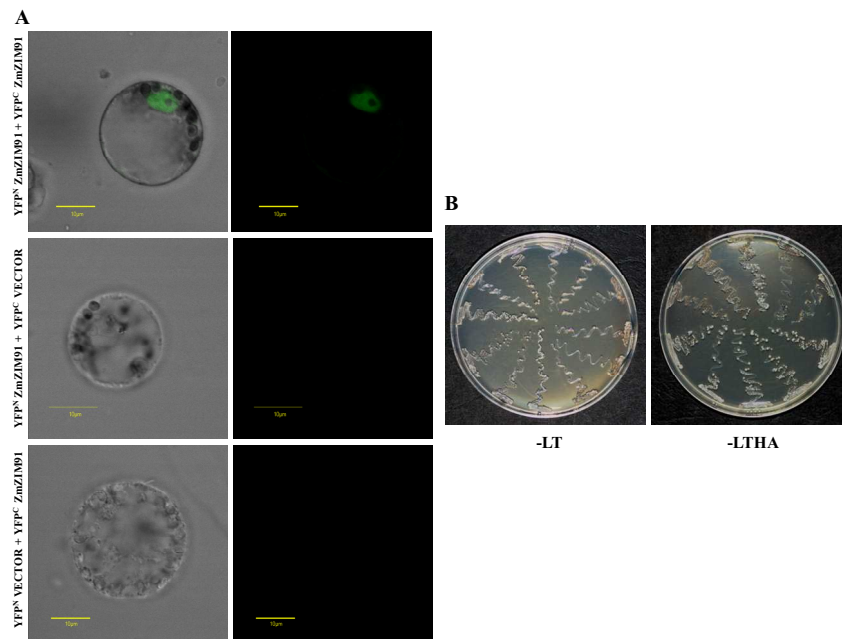


Figura 3-8. ZmZIM91 es capaz de formar dímeros. (A) En el primer panel, se observa la Complementación Bimolecular entre 35S::YFP^N-ZmZIM91 y 35S::YFP^c-ZmZIM91 usando protoplastos de maíz, y en los paneles posteriores se muestran los controles negativos realizados con los vectores vacíos para dicho experimento. En (B) Se muestra el doble híbrido efectuado para confirmar la dimerización de ZmZIM91 usando las construcciones T7::ZmZIM91:PGADT7 y T7::ZmZIM91:PGBKT7. Para todos los paneles de imágenes en A, Bar = 10µm.

Para el análisis de la secuencia del dominio Jas de ZmZIM91, se llevó a cabo un alineamiento con el dominio Jas de las proteínas AtJAI3, AtJAZ1 y AtZML2 de *Arabidopsis* y ZmZIM91 de maíz (Figura 3-9). Los resultados mostraron que entre ambas especies, la región α -hélice está más conservada que la región de bucle o “loop region” ELPIARR que se ha demostrado que es el consenso responsable de la interacción de los JAZ con el receptor de hormona COI1, además en el caso de las proteínas ZmZIM91 y AtZML2 se observa que ambas carece de la secuencia canónica del loop region y en cambio los aminoácidos que se encuentran en dicha posición son YPHRVA para ZmZIM91 y IPQRLA para AtZML2.

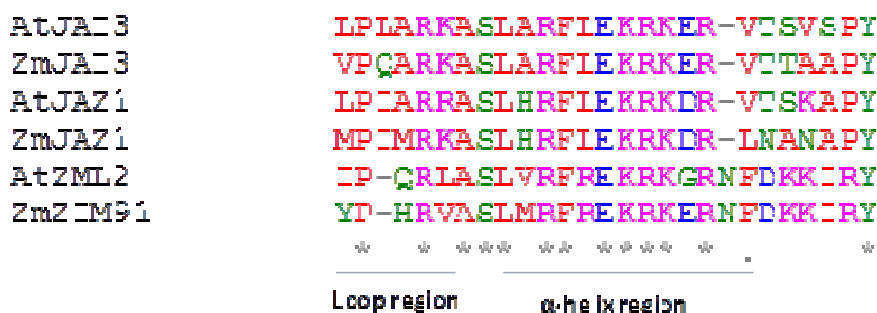


Figura 3-9. Alineamiento entre los dominios Jas de las proteínas AtJAI3, AtJAZ1, AtZML2 y ZmZIM91. La región α -hélice “ α -helix region” presenta mayor grado de conservación que la “loop region”. Esta región cumple un papel fundamental en la interacción con el receptor E3 ubiquitina ligasa COI1, responsable de la degradación de las proteínas JAZ en *Arabidopsis* vía el proteasoma 26S.

Con el fin de estudiar el papel de los ZML en la vía de señalización por ácido jasmónico, se clonaron AtZIM, AtZML1 y AtZML2 en los vectores de expresión pGBKT7 y pGADT7, que fueron utilizados para realizar experimentos de doble híbrido en levadura, en los que se estudió la interacción de las proteínas de la subfamilia ZML de *Arabidopsis* con JAI3, JAZ1, JAZ9 y COI1 de *Arabidopsis* (Figura 3-10). En estos ensayos se pudo determinar que ZIM no interacciona con JAI3, JAZ1 y JAZ9, que ZML1 podía interaccionar con JAI3, mientras ZML2 interaccionó con JAZ1, JAI3 y JAI3fr5C que es una versión truncada de JAI3 que solo tiene el dominio Jas. Por otra parte, ninguno de los miembros de la subfamilia ZML de *Arabidopsis* fue capaz de interaccionar con AtCOI1, ni en presencia de altas concentraciones de CORONATINA.

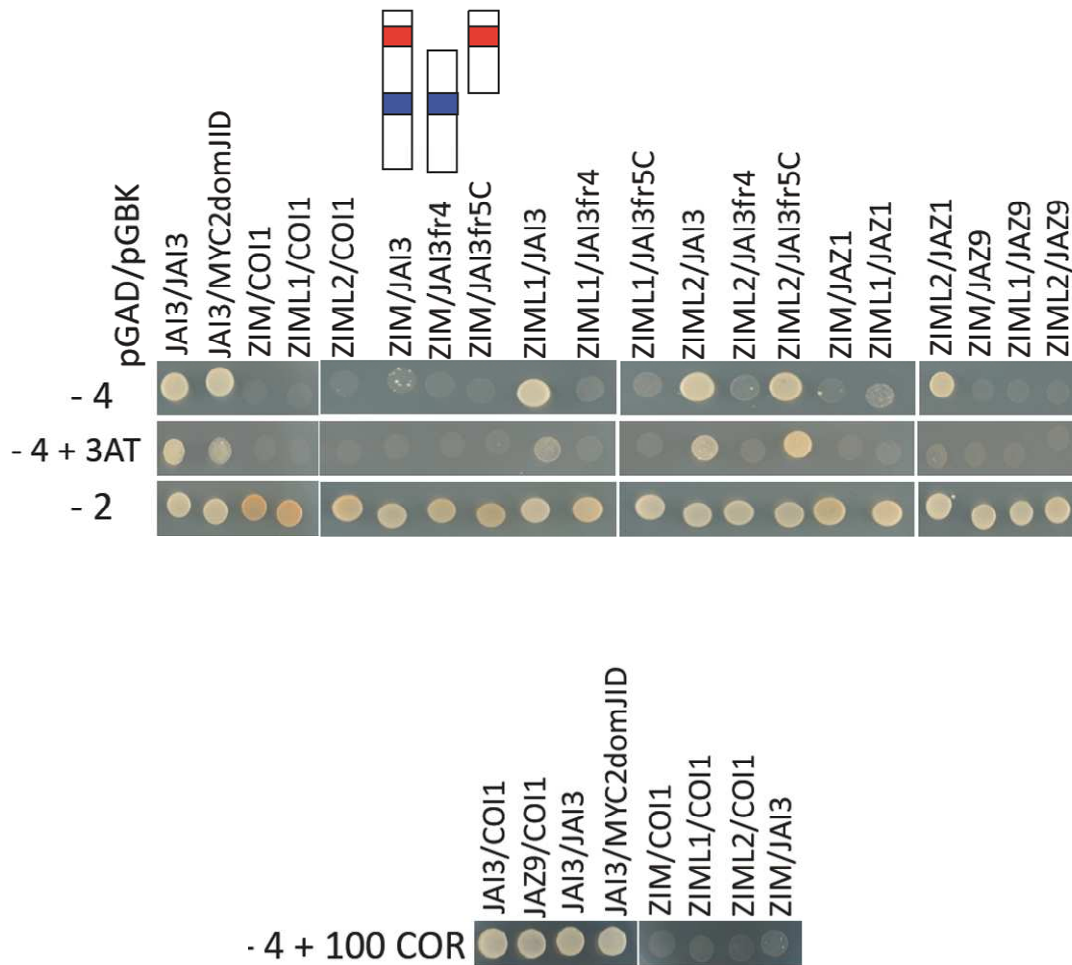


Figura 3-10. Estudio de las interacciones entre las proteínas ZML, JAZ1, JAI3, JAZ9 y COI1 de *Arabidopsis*. En el panel superior se observa las interacciones entre las proteínas ZML y JAZ1, JAZ9, JAI3 y las versiones truncadas de JAI3: JAI3fr4 (versión que contiene solo el dominio ZIM, en color azul) y JAI3fr5C (versión que contiene solo el dominio Jas, en color rojo). En el panel inferior, es presentado el resultado del experimento de doble híbrido, el cual muestra que los ZML de *Arabidopsis* no pueden interactuar con COI1 de *Arabidopsis* en presencia de 100 μM de CORONATINA. (En colaboración con el Dr. Andrea Chini, investigador postdoctoral en el laboratorio del Dr. Roberto Solano, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid).

Por otra parte, durante el análisis de los dominios Jas y CCT, fueron identificados dominios putativos de señales de localización nuclear (*Nuclear Localization Signal, NLS*). El primero se encontró entre los aminoácidos 202–204 (PHRVASLMRFREKRKKERNFDKKIRYSVRK) y acompañado de un grupo de residuos básicos antes y después del dominio putativo de la señal de localización nuclear, este clúster KRK fue identificado por primera vez por Boulikas (1994). La segunda señal de localización nuclear, fue ubicada entre los aminoácidos 197 y 205

(**MRFREKRKE**) y clasificada como una NLS altamente básica (Boulikas, 1994), además este dominio putativo de señal de localización nuclear (**XRXXKRXE**) fue originalmente identificado en el primer *Zinc Finger* de la proteína humana MBP-1 (Baldwin *et. al.*, 1990). Cabe anotar, que aunque similares NLS han sido identificadas en el extremo C-terminal en la región *Zinc Finger* de factores de transcripción de humano, rata, pollo y levadura, que además ha sido descrito que estas proteínas pueden funcionar como activadores (Boulikas, 1994), en la proteína ZmZIM91 no se localizan en la región *Zinc Finger*.

En el dominio N-terminal de la proteína ZmZIM91 también fue identificado un dominio putativo de NLS y otro dominio putativo de señal de exportación nuclear (*Nuclear Export Sequence, NES*). La NLS que corresponde a la secuencia **KPYQPRRGPER**, fue localizado entre los aminoácidos 8 y 18, un dominio similar fue identificado por Chang *et al.* (1990), en un factor de transcripción de ratón AGP/EBP. El dominio putativo de NES en este extremo N-Terminal, se ubicó entre los aminoácidos 41 y 62, el cual corresponde a la secuencia **LVAAAEEAEALNRFAAEQQQL** (Cressman *et al.*, 2001).

Con el fin de determinar si el motivo putativo de NES era funcional, el N-terminal de ZmZIM91 fue clonado en los vectores pCambia 1303 (GUS-GFP) y pCambia 1302 (GFP).

Se realizó un ensayo de bombardeo de células de cebolla utilizando las construcciones 35S::N-terZmZIM91:GFP-GUS y 35S::GFP-GUS. Como resultado se obtuvo que el N-terminal de ZmZIM91 podía estar tanto en núcleo como en citoplasma (Figura 3-11 A), mientras que el vector vacío (35S::GFP-GUS) presentaba una localización citoplasmática propio del vector pCambia 1303. Este experimento permitió confirmar los resultados obtenidos en un experimento preliminar de transfección de hojas de tabaco con el N-terminal de ZmZIM91 clonado en el vector pCambia 1302 (GFP) donde se había detectado que el N-terminal de ZmZIM91 se localizaba tanto en núcleo como en citoplasma (Figura 3-11 B) al igual que el vector vacío pCambia 1302.

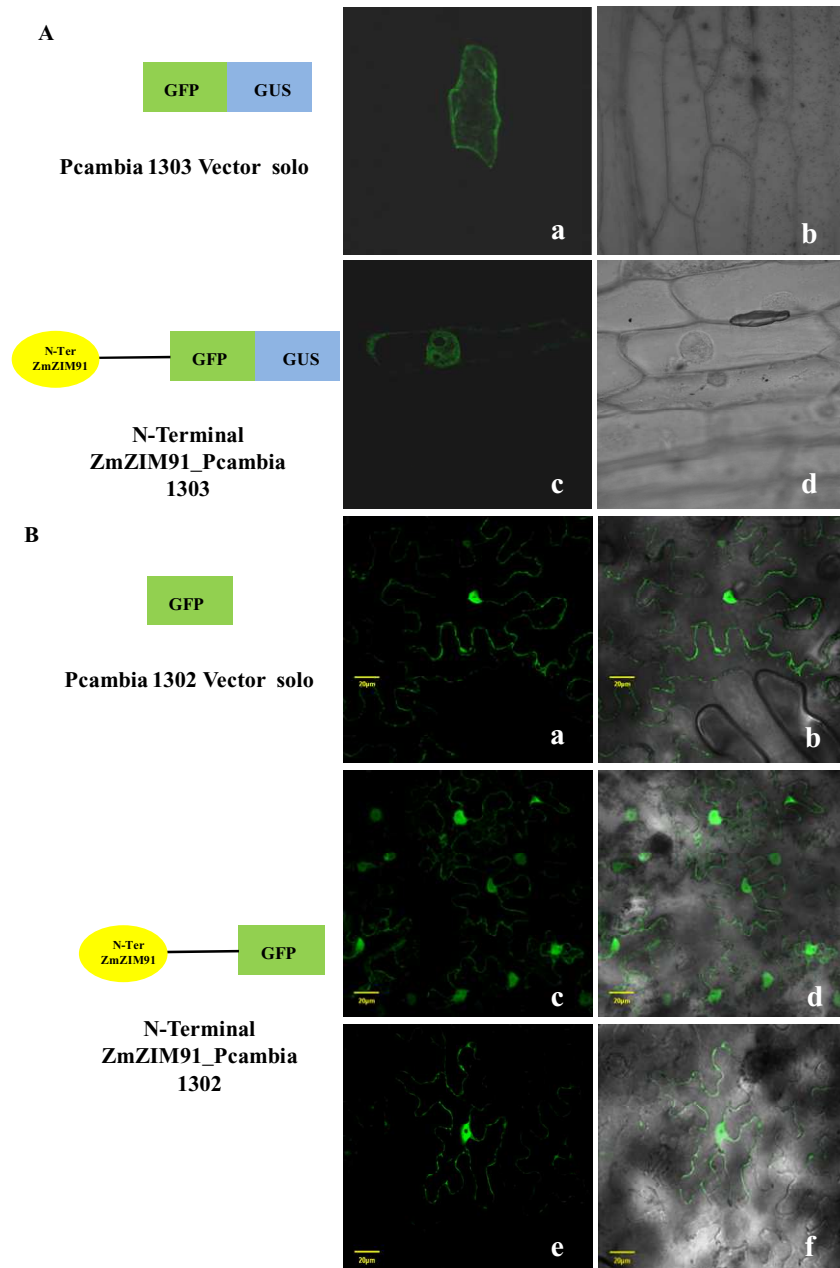


Figura 3-11. Localización de N-terminal de ZmZIM91 en células de cebolla y tabaco. En (A) se observa el experimento llevado a cabo en células de cebolla. En el panel superior (a) se puede observar la localización del vector pCambia 1303 (GUS-GFP), la GFP está localizada solo en el citoplasma; en b se muestra la célula. En el panel inferior (c), se encuentra la imagen del N-terminal de ZmZIM91, localizado tanto en el núcleo como en el citoplasma; en d se enseña la célula. En (B) se muestra el experimento realizado inicialmente en hojas de tabaco. En el panel superior (a y b) se puede observar la localización del vector pCambia 1302 (GFP), la GFP está localizada tanto en núcleo como en el citoplasma. Posteriormente en los paneles de la parte inferior, se encuentra un panorama de células donde se puede ver la localización del N-terminal de ZmZIM91 en el núcleo y en el citoplasma (c y d), a continuación se enseña una ampliación de una célula que sobre expresaba el N-terminal de ZmZIM91 donde se evidencia la localización núcleo-citoplasma (e y f). Para B, paneles a, b, c, d, e, f Bar = 20µm.

3.1.5 ZmZIM91 se degrada en presencia de metil jasmonato por la vía del proteasoma 26S

La estabilidad de ZmZIM91 fue investigada en respuesta a metil jasmonato usando protoplastos de maíz que sobre expresaban la proteína ZmZIM91 fusionada a GFP y realizando el seguimiento de una célula con microscopio confocal. La señal de GFP fue detectada en el núcleo bajo condiciones control a tiempo 0 minutos, 30 minutos y 1 hora, mientras que con aplicación de 25 μM de metil jasmonato a 1 hora la señal de GFP desaparece en gran medida. Por otra parte, cuando se aplicó a los protoplastos 25 μM de metil jasmonato y 5 μM de MG132 (inhibidor específico del proteasoma 26S), se observó mayor conservación de la fluorescencia que en las muestras tratadas sólo con metil jasmonato (Figura 3-12).

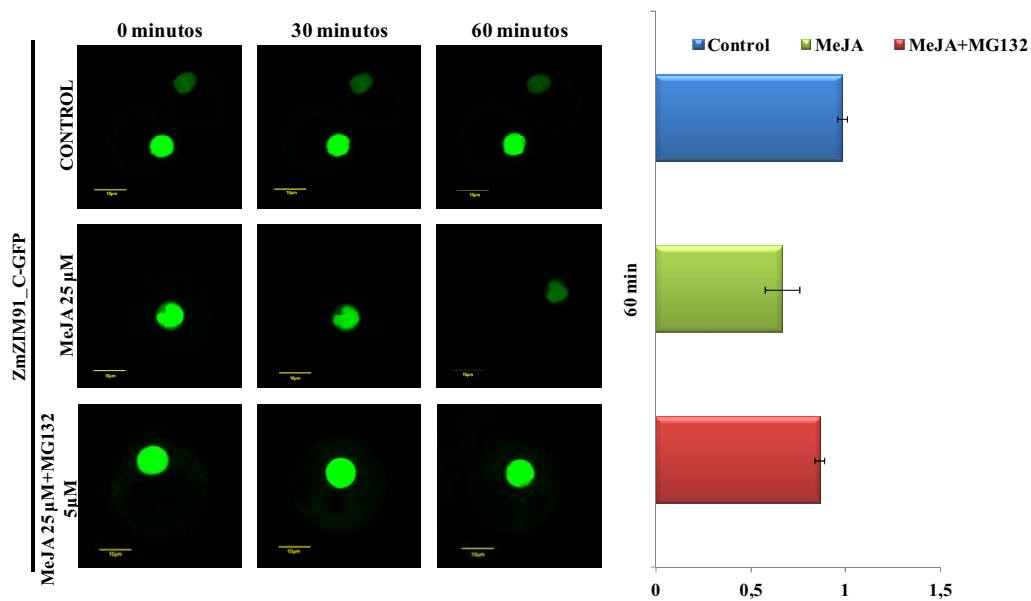


Figura 3-12. Ensayo de degradación por metil jasmonato en protoplastos de maíz de ZmZIM91_C-GFP. En el panel izquierdo, se puede observar las imágenes de protoplastos sin tratar (control), y tratados con 25 μM de metil jasmonato y 25 μM de metil jasmonato y 5 μM de metil jasmonato y 5 μM de MG132. En el panel derecho, se muestra la cuantificación de la GFP de tres replicas biológicas independientes mediante el uso del *software* ImageJ, la normalización se hizo con respecto al ratio de cambio de la fluorescencia al tiempo cero. Para todos los paneles de imágenes Bar = 10 μm .

La degradación de la proteína ZmZIM91 se desencadena mediante la relocalización de dicha proteína dentro del núcleo en gránulos. En el ensayo de degradación efectuado

aplicando MeJA a 1 hora en protoplastos de maíz que sobre expresaban la proteína ZmZIM91 fusionada a GFP, se pudo observar que en el 50% de los casos la degradación llevaba a la formación de un gránulo y en el otro 50% había formación de más de dos (Figura 3-13).

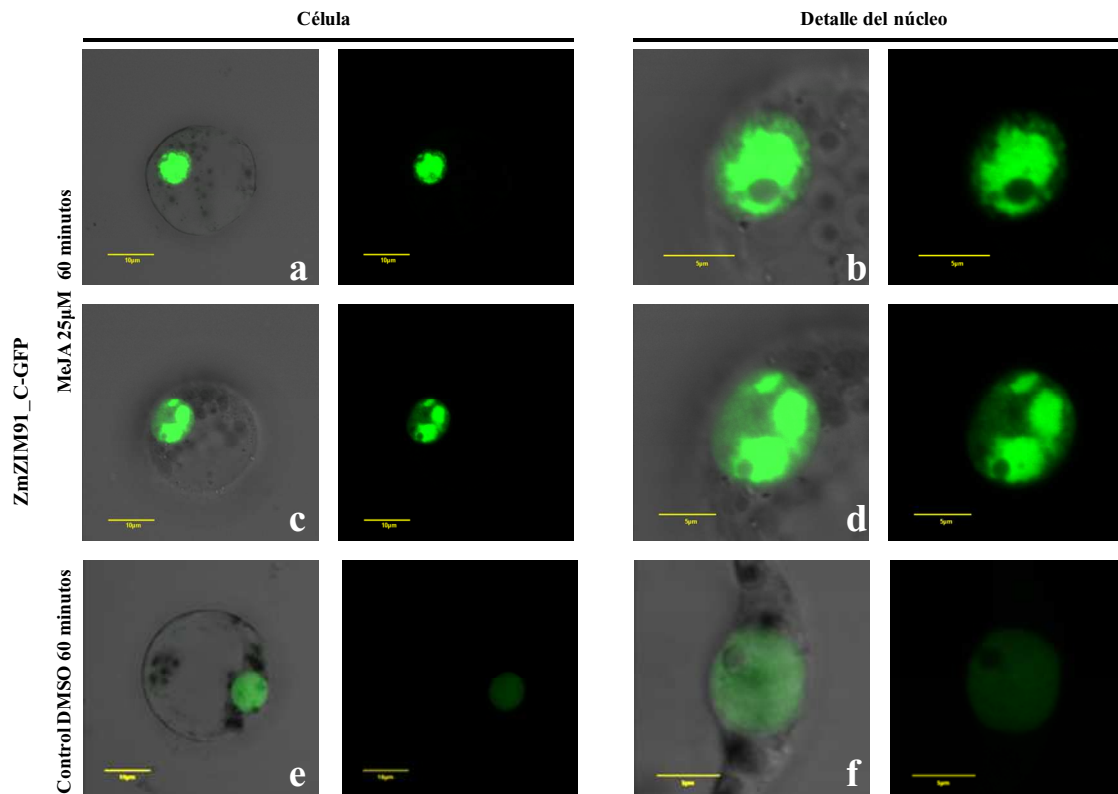


Figura 3-13. Formación de gránulos después de la aplicación de MeJA en protoplastos de maíz sobre expresando la proteína ZmZIM91 fusionada a GFP (60X). (a) y (c) muestran protoplastos expresando 35S::ZmZIM91:GFP después de 1 hora con tratamiento de 25 μ M de MeJA y en (b) y (d) se puede observar el detalle de los núcleos de estos protoplastos y la formación de gránulos por efecto del tratamiento con de MeJA. En (e) y (f) se presenta el control de 35S::ZmZIM91:GFP con DMSO, tanto en un protoplasto completo como en la ampliación de su núcleo. Para a, c y e Bar = 10 μ m

Existen diferentes tipos de gránulos, por ejemplo los gránulos que corresponden a estructuras subnucleares que están enriquecidas en factores de transcripción RNA pre mensajeros y están localizados en regiones intercromáticas (Lamond y Spector, 2003). Para verificar la localización de los gránulos formados por la proteína ZmZIM91 después del tratamiento con MeJA, se llevó a cabo un experimento de transfección en tabaco, después de tres días de agroinfiltración y se realizó aplicación de 100 μ M de

MeJA, posteriormente se adicionó DAPI para determinar la localización de los gránulos formados tras el tratamiento, lo que se observó es que estos gránulos se localizan en la región de la intercromatina (Figura 3-14).

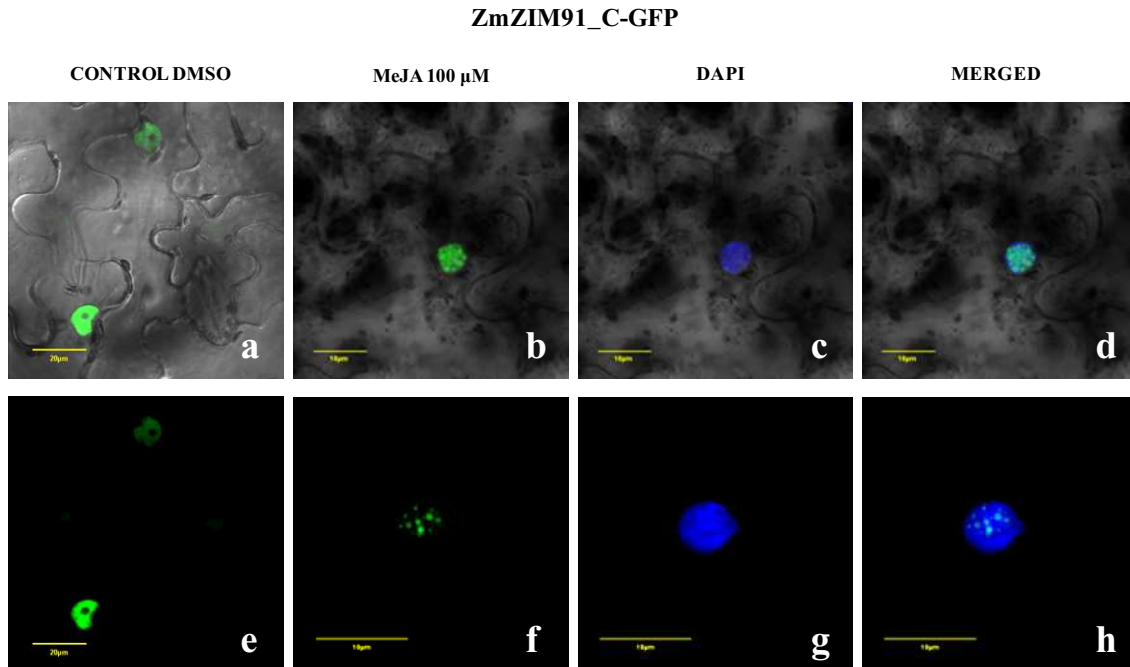


Figura 3-14. Células de tabaco conteniendo la proteína ZmZIM91 fusionada a GFP y tratadas con 100 μ M de MeJA a una hora. En los paneles (a) y (b) se observa la proteína 35S::ZmZIM91:GFP en condiciones control con DMSO. En (b) y (f) se muestra el canal con la GFP, donde se presenta la proteína ZmZIM91 después de 1 hora de tratamiento con 100 μ M de MeJA. En (c) y (g) se muestra el canal del DAPI, donde se puede observar núcleo marcado con dicha tinción. Y finalmente en (d) y (h) se encuentra la imagen de colocalización entre el canal del DAPI y el de GFP que es el que presenta la proteína ZmZIM91 después del tratamiento con MeJA a 1 hora, se observa la localización de los gránulos en la intercromatina. Para el panel a y el e Bar = 20 μ m; para los paneles b, c, d, f, g y h Bar = 10 μ m.

El análisis de la expresión de la proteína ZmZIM91 también se estudio en planta, para ello, se realizaron experimentos de *western blot* con aplicación de de metil jasmonato y MG132 en hojas de plantas de maíz de 9 días y se detectó la respuesta de ZmZIM91 a estos tratamientos usando el anticuerpo endógeno contra ZmZIM91 generado en este trabajo. La sección de la hoja usada para la realización de los *western blot* fue determinada por datos *in silico* encontrados en la literatura de microarrays y RNA-Seq de ZmZIM91 (Figura 3-15A y 3-15B) (Sekhon *et al.*, 2011 y Li *et al.*, 2010).

En las muestras tratadas con 0,01% de metil jasmonato, a 30 minutos se puede ver un incremento de la proteína, mientras que a 1 hora se observa la degradación de la proteína. Al adicionar el inhibidor del proteasoma 26S (100 μ M de MG132), a 1 hora después de la aplicación del tratamiento, se ve que la proteína ZmZIM91 se conserva (Figura 3-16). Los resultados indican que el proteasoma 26S media la degradación de ZmZIM91 en respuesta a metil jasmonato, al igual que lo hace en el caso de las proteínas JAZ de *Arabidopsis* (Chini *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007) y además confirma los resultados obtenidos en los protoplastos de maíz presentados anteriormente.

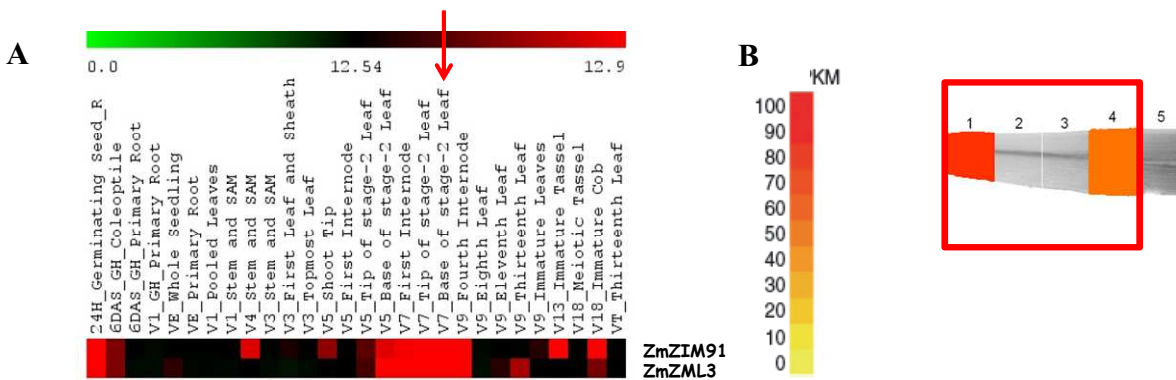


Figura 3-15. Datos de RNA-Seq encontrados para ZmZIM91 y usados para la selección del tejido para el análisis de la proteína por *western blot*. (A) Datos derivados del Atlas del Genoma de maíz (de la transcripción global durante el desarrollo en maíz), solo para dos miembros de la familia ZML en maíz, ZmZIM91 y ZmZML3 (Sekhon *et al.*, 2011). (B) Datos de RNA-Seq para ZmZIM91 del estudio de Li *et al.*, 2010.

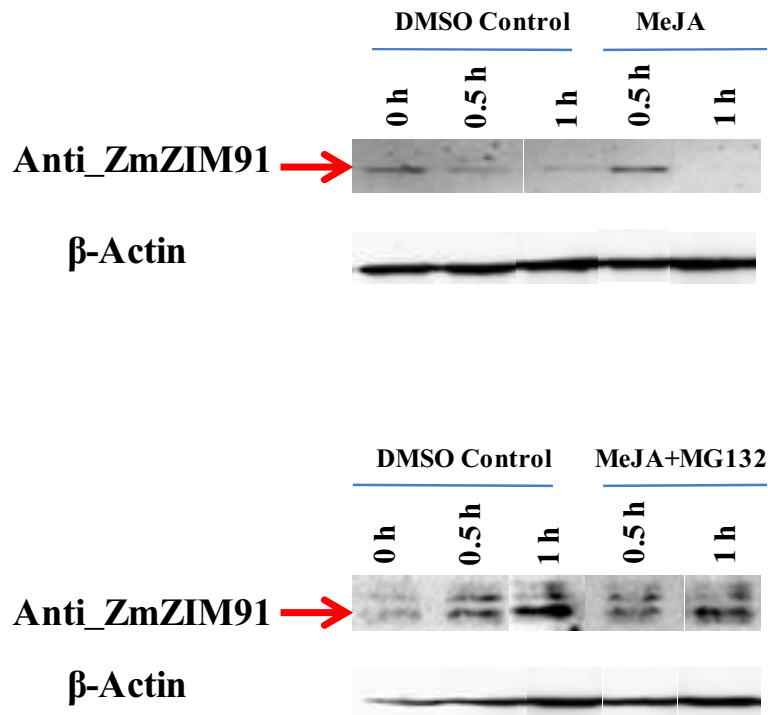


Figura 3-16. Respuesta en plantas silvestres de ZmZIM91 a tratamientos con metil jasmonato y metil jasmonato e inhibidor del proteasoma 26S (MG132). En plantas tratadas con 0,01% de MeJA, ZmZIM91 es degradada a 1 hora, mientras que en plantas bajo tratamientos con 0,01% de MeJA y 100 μ M de MG132, la proteína ZmZIM91 se conserva 1 hora después.

3.1.6. Identificación del consenso *in vitro* de unión a ADN para las proteínas ZmZIM91 de maíz y AtZIM de *Arabidopsis* mediante la técnica *protein-binding microarray* (PBM11)

Para determinar la unión específica a ADN de los putativos factores de transcripción putativos AtZIM de *Arabidopsis* y ZmZIM91 de maíz, primero fueron sobre expresadas en *E.coli* tanto la proteína AtZIM como un clon de ZmZIM91 que contenía los dominios conservados incluyendo el dominio putativo de unión a ADN, GATA-Zinc Finger. Ambas proteínas estaban fusionadas al *tag Maltose Binding Protein* (MBP). Para la realización del experimento en primer lugar se hizo un *western* usando el anticuerpo de la MBP para verificar óptima sobreexpresión de ambas proteínas y su unión al *tag* de la MBP. A continuación, se procedió a la identificación de los sitios de unión a ADN de AtZIM y ZmZIM91 mediante la técnica unión de proteínas a un chip de ADN “protein-binding microarray” (PBM11). El gran número de secuencias que contiene el chip PBM11 permite la cuantificación precisa y a gran escala de los sitios de

factores de transcripción, superando los métodos anteriores de identificación de elementos en *cis* de unión de factores de transcripción (Godoy *et al.*, 2011). El experimento arrojó como resultado dos probables consensos de unión de ADN tanto para ZmZIM91 como para AtZIM. Para ambas proteínas los consensos identificados fueron los mismos: GATC con un 100% y GATA con un 50% (Figura 3-17).

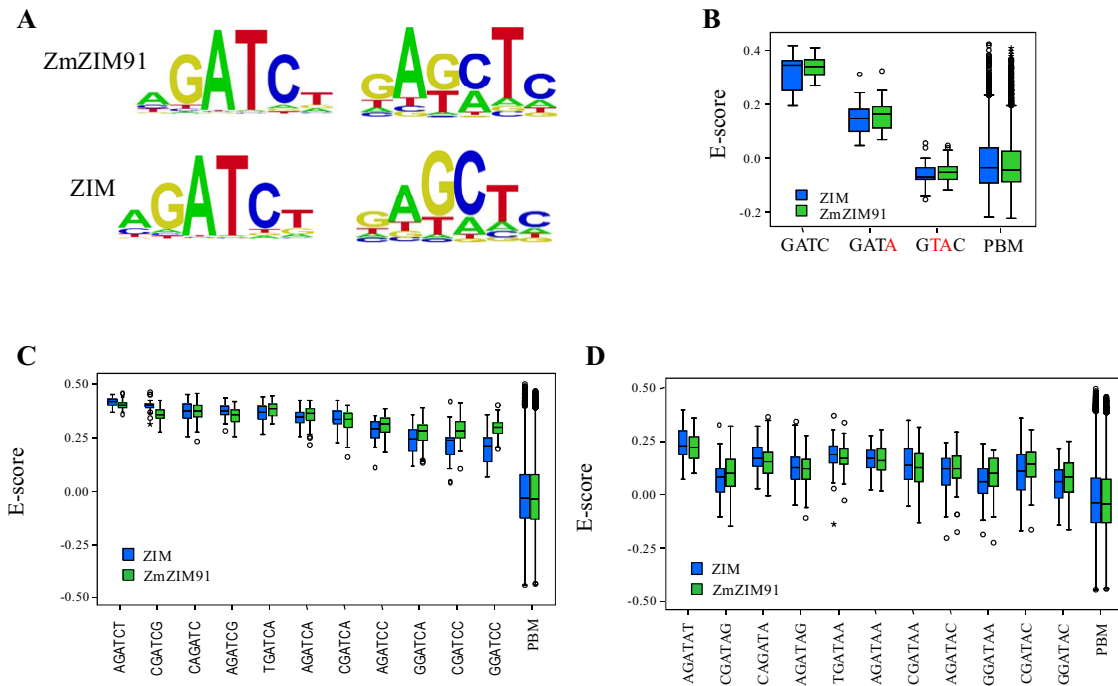


Figura 3-17. Identificación de los motivos *in vitro* de unión a ADN de AtZIM y ZmZIM91. (A) Representación de la matriz de posición de peso correspondiente a ZmZIM91 y AtZIM. Ambas proteínas muestran alta afinidad de unión al elemento 5'-AGATCT-3', seguido por el elemento 5'-GATATC-3'. (B) Diagrama de caja de enriquecimiento de todos los posibles 6-mers que contienen el consenso de 4-mer indicado. Las cajas representan cuartiles desde 25% a 75%, y la línea negra representa la distribución media (cuartil 50%). Las barras indican cuartiles de 1 a 25% (arriba) y 75 a 100% (a bajo) y los puntos denotan los valores extremos de la distribución. Las cajas en azul corresponden a AtZIM y las verdes a ZmZIM91. Ambas proteínas presentan alta y similar afinidad por el consenso 5'-GATC-3' y de baja a media por el elemento 5'-GATA-3' y una no unión a un irrelevante elemento 5'-GTAC-3'. PBM indica la distribución de los puntajes (E-scores) de todos los posibles 6-mers representados en el *microarray*. (C) El diagrama de caja de puntajes (E-scores) de todos los posibles 8-mers que contienen los 6-mer del consenso 5'-AGATCT-3'. Ambas proteínas muestran afinidades similares por el elemento indicado. (D) El diagrama de caja de puntajes (E-scores) de todos los posibles 8-mers que contienen los 6-mer del consenso 5'-GATATC-3'. Ambas proteínas muestran afinidades similares por el elemento indicado (En colaboración con el Dr. José Manuel Franco, la Dra. Irene Vidrieros y el Dr. Roberto Solano. Servicio de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid).

3.1.7 Regulación de ZmZIM91 por la proteína quinasa CK2 de maíz

Como ya se había mencionado anteriormente en la introducción de esta investigación, un clon parcial de ZmZIM91 fue identificado en un trabajo previo mediante la técnica de doble híbrido mediante un cribado de hoja de maíz estresada por sequía usando la subunidad reguladora CK2 β 1 de la proteína quinasa CK2. Por tal motivo, se procedió a realizar experimentos de interacción y fosforilación de ZmZIM91 con CK2 para confirmar si la proteína ZmZIM91 era tanto un interactor de dicha quinasa como un sustrato.

3.1.7.1 Interacción de ZmZIM91 con las subunidades reguladoras CK2 β 1, CK2 β 2, CK2 β 3 y la catalítica CK2 α 1

Para confirmar la interacción entre ZmZIM91 y CK2 β , se utilizó la técnica de Complementación Bimolecular (BiFC) en hojas de tabaco, usando las construcciones 35S::YFP^N-ZmZIM91 y 35S::YFP^C-CK2 β 1. Los resultados mostraron que ZmZIM91 era capaz de interactuar con la subunidad reguladora CK2 β 1. Los controles negativos de ambas proteínas con el vector vacío fueron negativos. Además para verificar la interacción, se utilizó la técnica de *pull down* para lo que ZmZIM91 fue traducida *in vitro* y etiquetada con metionina marcada con ³⁵S ([³⁵S]-Met), y las subunidades reguladoras CK2 β 1, CK2 β 2, CK2 β 3 y la subunidad catalítica CK2 α 1 fue expresada en bacteria y purificada de acuerdo con un protocolo estándar. Como resultado se obtuvo que ZmZIM91 podía interactuar no sólo con CK2 β 1, CK2 β 2, CK2 β 3 sino también con CK2 α 1 (Figura 3-18).

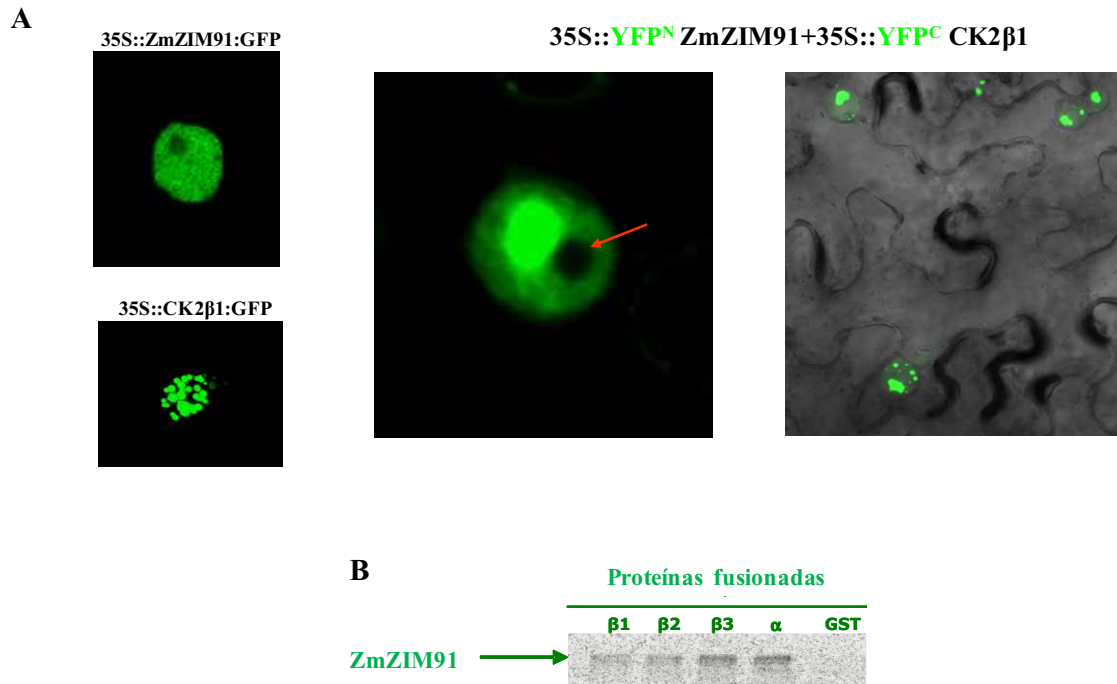


Figura 3-18. ZmZIM91 interacta con la proteína quinasa CK2 de maíz. En (A) utilizando la técnica de complementación bimolecular en hojas de tabaco, se muestra la interacción entre ZmZIM91 y CK2β1. En la parte izquierda, se muestra la localización tanto de 35S::ZmZIM91:GFP como de 35S::CK2β1:GFP y en la parte derecha la interacción entre ambas proteínas (núcleo y panorama respectivamente). En (B) se enseña la interacción entre ZmZIM91 y CK2β1, CK2β2, CK2β3 y CK2α1 mediante un experimento de *pull down*, el control negativo con la GST sola no presenta interacción.

3.1.7.2 CK2β1 y CK2β2 son capaces de relocalizar a ZmZIM91 en gránulos en el núcleo

Ya que la interacción entre ZmZIM91 y CKβ1 se localizó en gránulos en el núcleo, se consideró interesante estudiar si la subunidad reguladora de la proteína quinasa CK2 era capaz de relocalizar a la proteína ZmZIM91 que en condiciones normales está localizada en el núcleo. Por tal motivo, se usaron tres subunidades reguladoras CK2β con un *tag* MYC y ZmZIM91 con un *tag* de GFP. La finalidad de este experimento de co-transformación era poder observar el efecto que causan directamente estas subunidades reguladoras en la localización subcelular de ZmZIM91 ya que la fluorescencia que se observa corresponde solo a dicho factor.

El experimento fue realizado en hojas de tabaco, agroinfiltrando las siguientes combinaciones de construcciones: 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::CKβ1:MYC,

35S::ZmZIM91:GFP y 35S::CK β 2:MYC y 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::CK β 3:MYC. Los resultados obtenidos mostraron que tanto CK β 1 como CK β 2 son capaces de relocalizar a ZmZIM91 en gránulos en el núcleo, mientras que CK β 3 no lo puede hacer con tanta eficiencia, lo que conlleva a pensar que ZmZIM91 tiene más afinidad por CK β 1 y CK β 2 (Figura 3-19A).

También fueron realizados controles de este experimento (Figura 3-19B), donde se puede observar que el vector MYC solo, no afecta la localización de ZmZIM91 que permanece localizado en el núcleo, por tanto, efectivamente son CK β 1 y CK β 2 las que pueden relocalizar a ZmZIM91. También se muestra la localización subcelular de 35S::CK β 1:GFP, 35S::CK β 2:GFP y 35S::CK β 3:GFP, donde se puede ver que las dos primeras subunidades están localizadas en gránulos en el núcleo, mientras que la tercera está tanto en núcleo como en citoplasma.

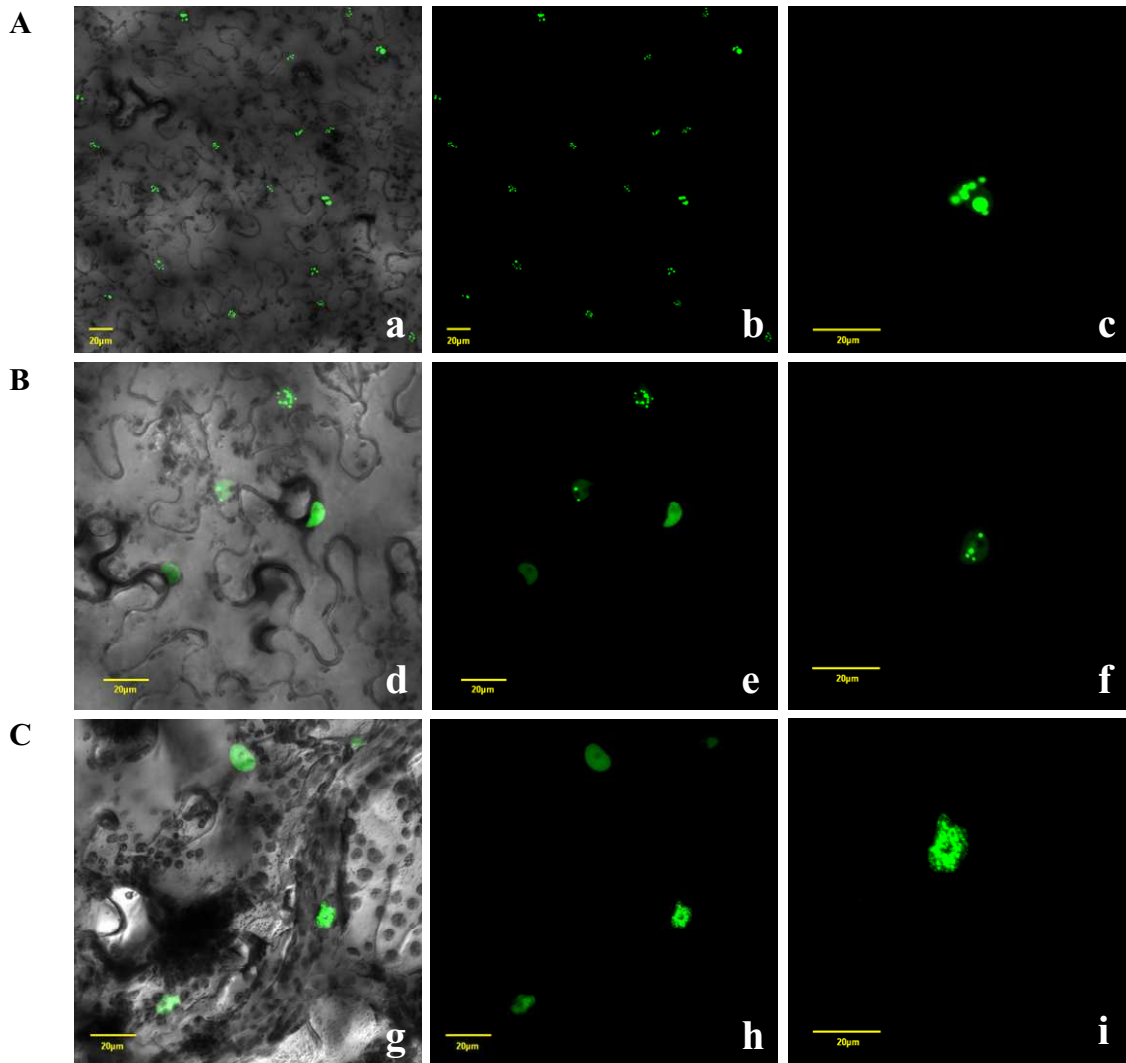


Figura 3-19A. CK β 1 y CK β 2 son capaces de relocalizar eficientemente en el núcleo a ZmZIM91. Para la realización de este experimento se transfectaron hojas de tabaco con 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::CK β 1:MYC, 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::CK β 2:MYC y 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::CK β 3:MYC. En (A) a y b muestran el panorama de 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::CK β 1:MYC, y en c se observa la ampliación de un núcleo con dichas construcciones, donde se puede ver que CK β 1 ha relocalizado a ZmZIM91 (que expresa la GFP) en gránulos en el núcleo de manera eficiente. En (B) d y e muestran el panorama de 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::CK β 2:MYC, y f la ampliación de un núcleo, donde se puede ver que CK β 2 ha relocalizado a ZmZIM91 en gránulos en el núcleo. En (C) en g y h se observa el panorama de 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::CK β 3:MYC, y en i la ampliación de un núcleo, donde se puede ver que CK β 3 no produce ningún efecto sobre ZmZIM91 y por tanto éste se mantiene difuso en el núcleo. Para todas las imágenes Bar = 20 μ m.

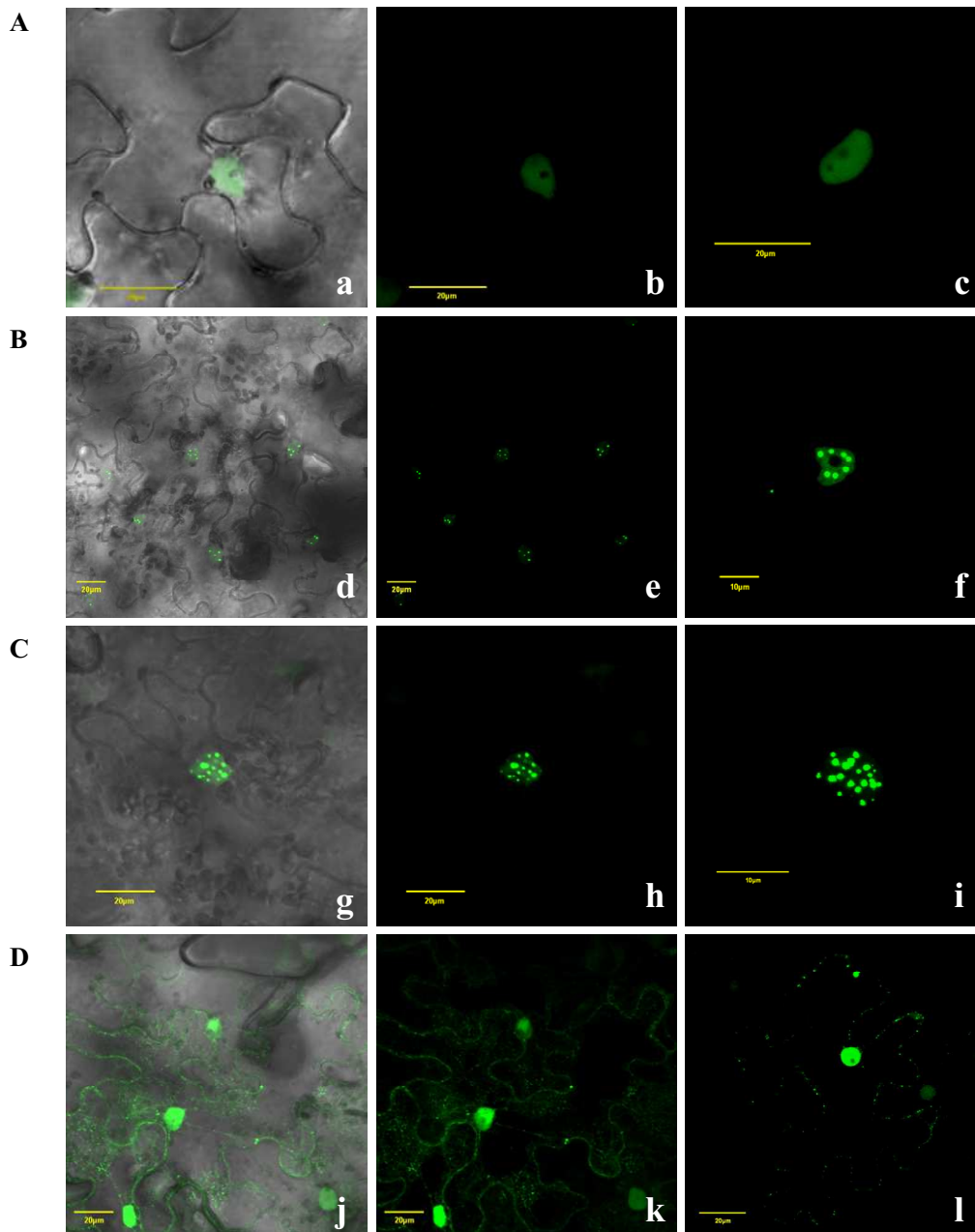


Figura 3-19B. Localización subcelular de las subunidades reguladoras CK β 1, CK β 2 y CK β 3 y de ZmZIM91 con el vector vacío con un *tag* MYC. Para la realización de este experimento se transfectaron hojas de tabaco con 35S::CK β 1:GFP, 35S::CK β 2:GFP, 35S::CK β 3:GFP y 35S::ZmZIM91:GFP con el vector vacío con un *tag* MYC. En (A) a y b se muestra una célula sobre-expresando a 35S::ZmZIM91:GFP con 35S::MYC, y en c la ampliación de un núcleo, donde se puede ver que el vector vacío con el *tag* MYC no afecta la localización subcelular de 35S::ZmZIM91:GFP. En (B) d y e muestran el panorama de 35S::CK β 1:GFP, y f la ampliación de una célula, donde se puede ver que CK β 1 tiene localización en gránulos en el núcleo. En (C) g y h muestran el panorama de 35S::CK β 2:GFP, en i se observa la ampliación de un núcleo, donde se puede ver que CK β 2 tiene localización en gránulos en el núcleo. En (D) j y k muestran el panorama de 35S::CK β 3:GFP, y l la ampliación de una célula, donde se puede ver que CK β 3 tiene localización tanto nuclear como citoplasmática con algunos gránulos. Para a, b, c, d, e, g, h, j, k, l Bar = 20 μ m; para f, i Bar = 10 μ m.

3.1.7.3 La subunidad catalítica CK2 α 1 no puede relocalizar a la proteína ZmZIM91

Experimentos realizados agroinfiltrando hojas de tabaco con 35S::ZmZIM91:GFP y la subunidad catalítica 35S::CK2 α 1:DsRed (Figura 3-20), mostraron que la subunidad catalítica CK2 α 1 que tiene una localización predominantemente nucleolar (Riera *et al.*, 2004), no afecta la localización subcelular de la proteína ZmZIM91.

3.1.7.4 El holoenzima CK2 α 1 β 1 afecta la localización subcelular de la proteína ZmZIM91

Debido a que anteriormente se demostró que la subunidad reguladora CK2 β 1 no sólo podía interaccionar con ZmZIM91, sino que además era capaz de relocalizarla en gránulos nucleares, mientras que CK α 1 solo podía interaccionar con ZmZIM91, se procedió a realizar un experimento de agroinfiltración en hojas de tabaco del holoenzima CK2 α 1 β 1 con ZmZIM91, para observar si el holoenzima CK2 podía afectar a ZmZIM91 a nivel de localización subcelular. En primer lugar, se hizo un experimento donde se usaron las construcciones 35S::YFP^N-ZmZIM91, 35S::YFP^C-ZmCK2 β 1 y 35S::CK2 α 1:DsRed (Figura 3-21). Lo que se observó es que la acción conjunta del holoenzima no sólo relocalizaba a ZmZIM91 en gránulos en el núcleo, sino que la localización subcelular de ZmZIM91 variaba en presencia del holoenzima CK2 α 1 β 1.

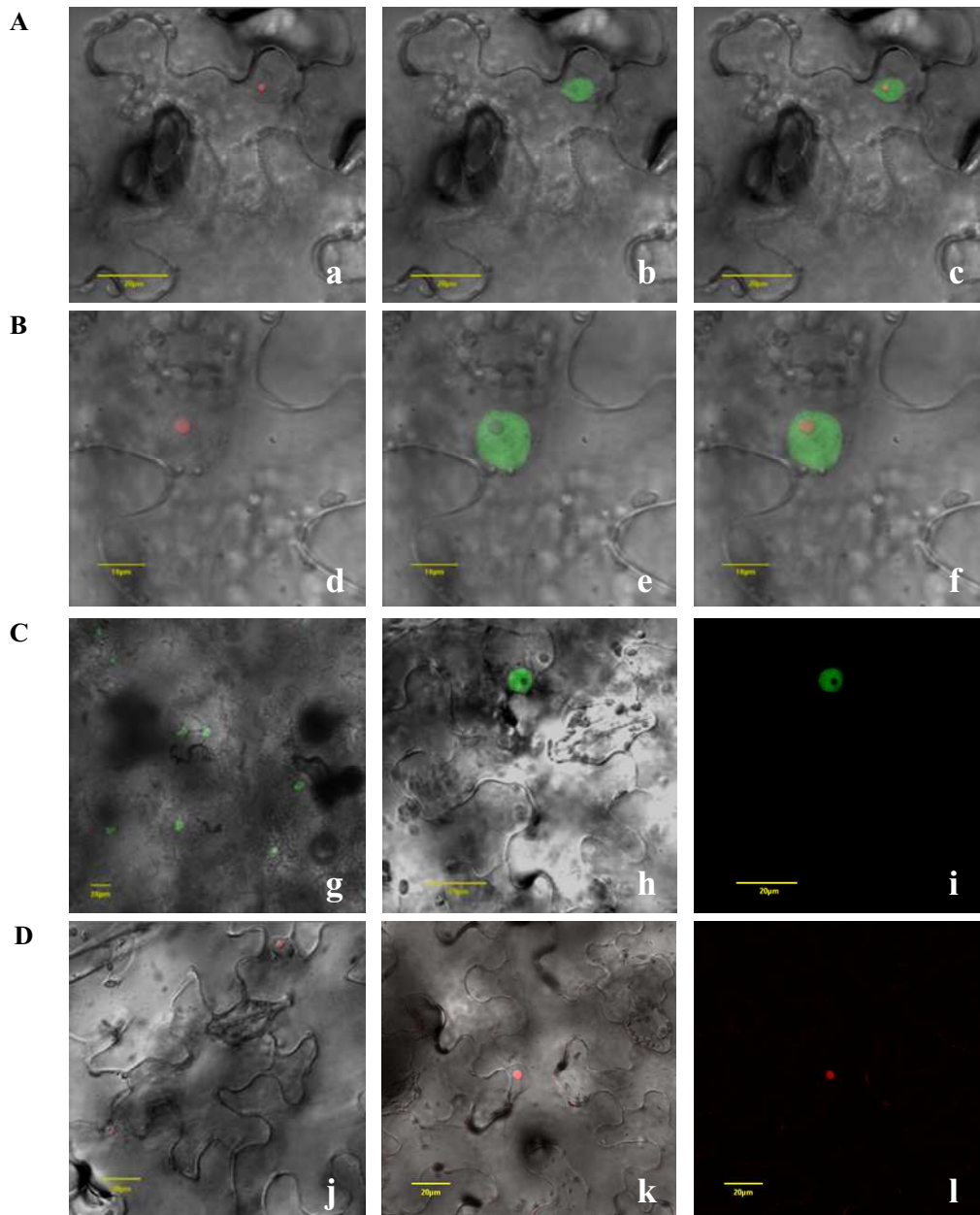


Figura 3-20. La subunidad catalítica CK2 α 1 no puede relocalizar a la proteína ZmZIM91. Para la realización de este experimento se transfectaron hojas de tabaco con 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::CK2 α 1:DsRed, tanto juntos como separados para usarlos como control del experimento. En (A) se muestra una célula que sobre-expresa 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::CK2 α 1:DsRed, en a se muestra el canal de la DsRed, en b el canal de la GFP y en c el *merge* de ambos canales. En (B) se enseña la ampliación de un núcleo que sobre-expresa 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::CK2 α 1:DsRed, en d se puede ver el canal de la DsRed, en e el canal de la GFP y en f el *merge* de ambos canales. En (C) se presenta el control con 35S::ZmZIM:GFP solo, en g se muestra el panorama de células expresando a 35S::ZmZIM91:GFP, y en h e i una sola célula transfectada con 35S::ZmZIM91:GFP. En (D) se presenta el control con 35S::CK2 α 1:DsRed solo, donde se puede observar su localización nucleolar, en j se muestra el panorama de células expresando a 35S::CK2 α 1:DsRed, y en k y l una sola célula transfectada con 35S::CK2 α 1:DsRed. Para a, b, c, g, h, i, j, k, l Bar = 20 μ m; para d, e y f Bar = 10 μ m.

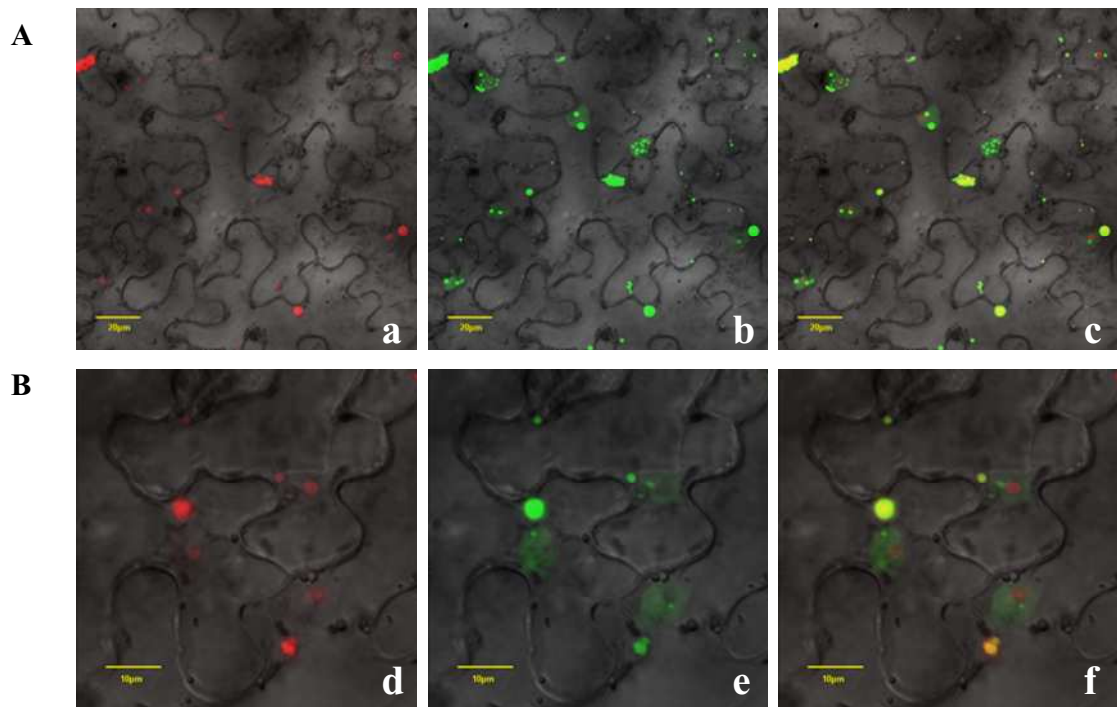


Figura 3-21. El holoenzima CK2 α 1 β 1 puede relocalizar a la proteína ZmZIM91. Para la realización de este experimento se transfectaron hojas de tabaco con 35S::YFP^N-ZmZIM91, 35S::YFP^C-CK2 β 1 y 35S::CK2 α 1:DsRed. En (A) se muestra un panorama de células que sobre-expresan 35S::YFP^N-ZmZIM91, 35S::YFP^C-CK2 β 1 y 35S::CK2 α 1:DsRed, en a se muestra el canal de la DsRed, en b el canal de la GFP, y en c el *merge* de ambos canales. En (B) se enseña la ampliación de una célula que sobre-expresa 35S::YFP^N-ZmZIM91, 35S::YFP^C-CK2 β 1 y 35S::CK2 α 1:DsRed, en d se observa el canal de la DsRed, en e el canal de la GFP y en f el *merge* de ambos canales. En todos los casos las imágenes enseñan que el holoenzima CK2 α 1 β 1 es capaz de cambiar la localización subcelular de ZmZIM91. Para a, b, c Bar = 20 μ m; para d, e y f Bar = 10 μ m.

Por otra parte, para confirmar el resultado anterior, se llevó a cabo otra aproximación que consistió en agroinfiltrar hojas de tabaco con 35S::ZmZIM91:GFP, 35S::CK2 β 1:MYC y 35S::CK2 α 1:DsRed (Figura 3-22), los resultados muestran que CK2 α 1 se va desplazando desde el nucléolo hasta el núcleo y posteriormente sale junto con ZmZIM91 al citoplasma, este efecto es debido probablemente a CK2 β 1, la cual se ha visto que puede transportar sus sustratos y relocalizarlos como en el caso de la subunidad catalítica CK2 α 1 (Riera *et al.*, 2011).

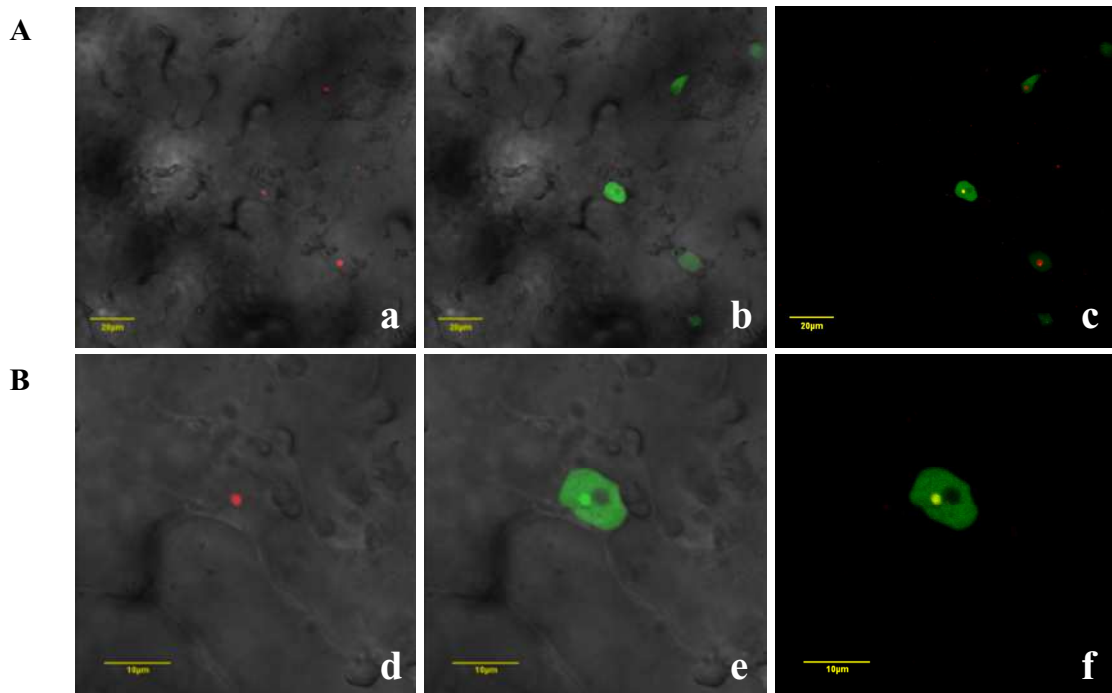


Figura 3-22. La subunidad reguladora CK2 β 1 cambia la localización subcelular de las proteínas CK2 α 1 y ZmZIM91. Para la realización de este experimento se transfectoron hojas de tabaco con 35S::ZmZIM91:GFP, 35S::CK2 β 1:MYC y 35S::CK2 α 1:DsRed. En (A) se muestra un panorama de células que sobre-expresan 35S::ZmZIM91:GFP, 35S::CK2 β 1:MYC y 35S::CK2 α 1:DsRed, en a se muestra el canal de la DsRed, en b el canal de la GFP, en c el *merge* de ambos canales. En algunas células se pueden ver que la subunidad catalítica CK2 α 1 está aún en el nucléolo, mientras en otras ya se ha desplazado al núcleo. En (B) se enseña la ampliación de un núcleo que sobre-expresa 35S::ZmZIM91:GFP, 35S::CK2 β 1:MYC y 35S::CK2 α 1:DsRed, en e se puede ver el canal de la DsRed, en f el canal de la GFP, en g el *merge* de ambos canales. En esta imagen se puede ver como la subunidad catalítica CK2 α 1 sale del nucléolo y entra al núcleo. Para a, b, c Bar = 20 μ m; para d, e y f Bar = 10 μ m.

3.1.7.5 ZmZIM91 es sustrato *in vitro* de la proteína quinasa CK2 de maíz

Ya que anteriormente se demostró que ZmZIM91 era un interactor de la proteína quinasa CK2, se realizaron experimentos de fosforilación *in vitro* para determinar si además ZmZIM91 era sustrato de dicha quinasa (Figura 3-23). En primer lugar, fueron localizados consensos putativos de fosforilación por CK2 en la secuencia aminoacídica de ZmZIM91 (los cuales se muestran en la Figura 3-1). Se realizó un ensayo de actividad quinasa *in vitro* y el resultado que se obtuvo fue que ZmZIM91 es sustrato *in vitro* tanto de CK2 α 1 como del holoenzima CK2 α 1 β 1.

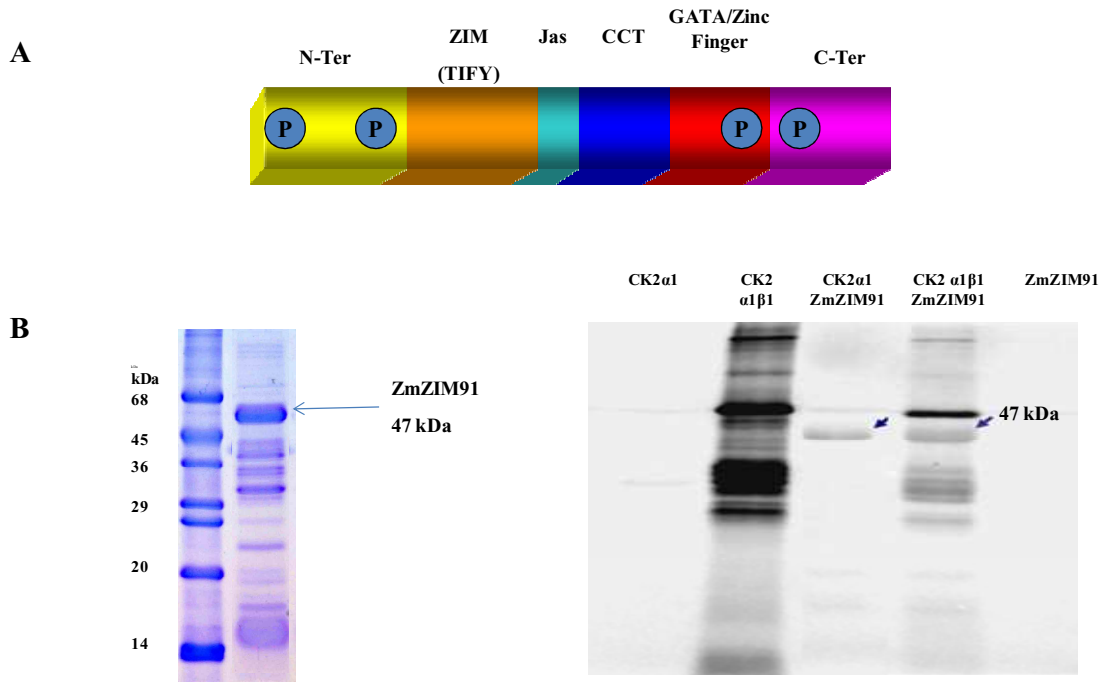


Figura 3-23. ZmZIM91 es sustrato *in vitro* de CK2 α 1 y el holoenzima CK2 α 1 β 1. (A) Se muestra la estructura con los dominios de ZmZIM91 y la localización dentro de ellos de putativos consensos de fosforilación por la proteína quinasa CK2 de maíz. En (B) se muestra a la izquierda la proteína T7::6xHis ZmZIM91 sobre expresada en *E.coli* para el ensayo de fosforilación. El peso molecular de la proteína recombinante ZmZIM91 fue calculado con la herramienta PI en EXPASY (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html) y fue de 47 kDa. A la derecha se enseña el resultado del experimento, donde se puede concluir que ZmZIM91 es sustrato tanto de la subunidad catalítica CK2 α 1 como del holoenzima CK2 α 1 β 1. Como control positivo se usó el holoenzima CK2 α 1 β 1 que se autofosforila y también se enseñan los controles negativos CK2 α 1 y ZmZIM91 solos donde se observa que no hay señal.

3.1.7.6 La fosforilación *in vivo* de ZmZIM91 por la proteína quinasa CK2 de maíz es afectada mediante tratamientos con MeJA

Con el fin de conocer si ZmZIM91 era sustrato *in vivo* de la proteína quinasa CK2, se realizaron ensayos quinasa en gel los cuales permitieron detectar la actividad de proteínas quinasas nativas que fosforilan a ZmZIM91. A diferencia del ensayo de fosforilación *in vitro*, la señal detectada en el ensayo en gel aparece en el lugar correspondiente a la/s quinasa/s y no al sustrato.

Ya que los resultados expuestos hasta el momento indican que la proteína ZmZIM91 está afectada por MeJA, se quiso determinar si la fosforilación de ZmZIM91 por CK2

variaba en presencia de MeJA. Para esto, se procedió a realizar el ensayo quinasa en gel utilizando extractos de raíz de plántulas de maíz de 6 días tratados con 100 μ M de MeJA y como extractos de raíz de plántulas de maíz de 6 días con DMSO (debido a que el MeJA estaba diluido con DMSO). Los extractos fueron tomados a diferentes tiempos: 0 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora y 4 horas. En este experimento, se usó también 5,6-dicloro-1-(β -D-ribofuranosil) benzimidazol (DRB), un inhibidor específico de CK2 que permitiría ubicar la banda exacta correspondiente a CK2 para hacer los respectivos análisis de su comportamiento de fosforilación de ZmZIM91 bajo tratamientos con MeJA (Meggio *et al.*, 1990; Szyszka *et al.*, 1995).

Los resultados obtenidos en el caso del gel que no fue tratado con el inhibidor de CK2, exhiben un incremento de fosforilación de la muestra tratada con MeJA a 30 minutos en comparación con la control, mientras que a 1 hora de tratamiento con MeJA se observa una disminución de la fosforilación, finalmente a las 4 horas tanto en la muestra tratada como en la control se evidencia un incremento de la actividad de la CK2 (Figura 3-24, parte A). Lo anterior, fue concluido con ayuda del gel hecho en paralelo con las mismas condiciones que el anterior, pero tratado con 50 μ M de DRB confirma que la banda que se ve afectada por el tratamiento con MeJA, corresponde a la proteína quinasa CK2 α (Figura 3-24, parte B) ya que tiene un tamaño de 38 kDa y disminuye tanto en las muestras tratadas como en las control.

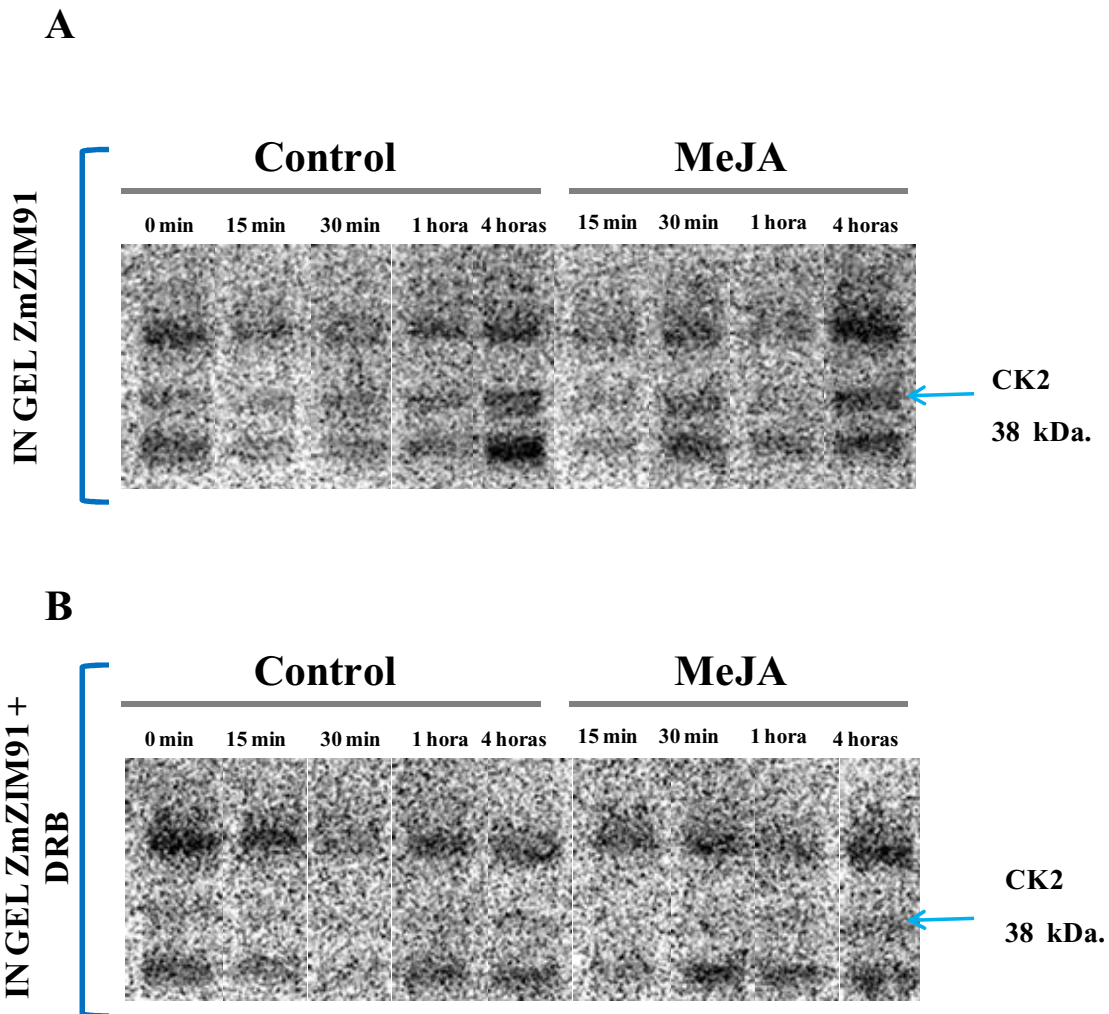


Figura 3-24. ZmZIM91 es sustrato *in vivo* de la proteína quinasa CK2 y es regulada por esta quinasa bajo tratamiento con MeJA. Se usó la técnica de ensayo de quinasa en gel. Se tomaron muestras tanto control como tratadas a 0 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora y 4 horas. En (A) se muestra un gel que contienen la proteína recombinante de ZmZIM91 purificada y extractos de raíz de plántulas de maíz de 6 días tratadas con 100 μ M de MeJA y como control muestras de raíz a los mismos tiempos con DMSO, donde se puede observar que incrementa la actividad de CK2 α a 30 minutos de tratamiento con MeJA, disminuye a 1 hora de tratamiento con MeJA y a 4 horas tanto en la muestra control como en la tratada con MeJA la fosforilación incrementa. En (B) se observa un gel realizado con condiciones idénticas al anterior pero que además fue incubado con 50 μ M de DBR un inhibidor específico de la CK α . En este gel se observa que la banda correspondiente a 38 kDa (CK α) disminuye en todos los casos.

3.2 Discusión de resultados

3.2.1 El dominio ZIM/TIFY en ZmZIM91

La familia TIFY específica de plantas está compuesta por cuatro subfamilias (TIFY, PPD, JAZ y ZML) en *Arabidopsis*, que han sido implicadas en diferentes respuestas a estrés (Ye *et al.*, 2009), de las cuales la subfamilia JAZ ha sido la mejor caracterizada. Sin embargo, pese a la importancia del maíz como cultivo para la alimentación y la generación de biocombustibles y al impacto que puede tener tanto el estrés biótico como abiótico en su producción, no había sido llevado a cabo un estudio de los TIFY en esta especie. Uno de los principales aportes de esta investigación radica en ampliar el conocimiento sobre la subfamilia ZML en maíz, en el cual han sido identificados tres miembros de la subfamilia ZML (Bai *et al.*, 2011), los cuales de acuerdo al árbol filogenético muestran alta conservación con respecto a los homólogos en *Arabidopsis*.

Los miembros de la subfamilia ZML poseen cuatro dominios conservados: el TIFY, el Jas, el CCT y el GATA-*Zinc Finger* (Bai *et al.*, 2011), siendo este último exclusivo de esta subfamilia ZML. ZmZIM91 al igual que los miembros de la subfamilia JAZ, tiene localización nuclear, que es común para factores de transcripción, sin embargo antes del presente trabajo no se había demostrado que ningún miembro de la familia TIFY fuera un factor de transcripción y por tanto siempre se han referido a ellos como factores de transcripción putativos.

Dentro de la caracterización de ZmZIM91 se analizaron los dominios conservados. En el caso del dominio TIFY, se encontró que a diferencia de los otros miembros de las subfamilias que conforman la familia TIFY (TIFY, PPD y JAZ), el consenso TIFYAG no está conservado y en su lugar se encuentra la secuencia aminoacídica TLSFQ (Bai *et al.*, 2011). También se identificaron dos putativos consensos de represión dentro de este dominio que son el XLLLXX (VLLLLG) y el LXLFXGXV (LTLSFQGEV). El dominio TIFY en la subfamilia JAZ también es el responsable de la dimerización de estas proteínas, ya que se demostró que la proteína ZmZIM91 es capaz de dimerizar. Sería interesante realizar un experimento que permita determinar si el dominio TIFY en ZmZIM91 cumple un papel similar en la dimerización que el que desempeña en los miembros de la subfamilia JAZ, a pesar no tener el consenso TIFYAG.

3.2.2 La proteína ZmZIM91 se degrada en presencia de MeJA

La respuesta a estrés biótico causada por insectos herbívoros e infección por patógenos, es mediada por una variedad de hormonas, entre las cuales está el jasmonato (Bari *et al.*, 2009; Pieterse *et al.*, 2009). Los JAs juegan una amplia variedad de papeles en la respuesta a herida y en la producción de metabolitos secundarios (Farmer *et al.*, 1992; Wasternack y Hause, 2002; Lorenzo y Solano, 2005; Shan *et al.*, 2009). La caracterización molecular de ZmZIM91 se llevo a cabo basándose en la información disponible sobre los genes de la subfamilia JAZ de *Arabidopsis*, que como es conocido han sido implicados en la respuesta a jasmonato, ya que su degradación es promovida por esta fitohormona y es mediada por el complejo SCF^{COI1}, lo que a su vez elimina la represión de factores de transcripción como MYC2 y MYC3 (Bai *et al.*, 2011; Thines *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2007; Melotto *et al.*, 2008). En *Arabidopsis* la mayoría de los genes JAZ son inducidos por infección con *Pseudomonas syringae* (Demianski *et al.*, 2012), lo que indica que esta subfamilia en *Arabidopsis* está involucrada en la resistencia a patógenos, mientras que en uva bajo el mismo tratamiento el número de genes que se indujeron fue reducido (Yucheng *et al.*, 2012). Esta diferencia de respuesta entre especies hace que sea relevante estudiar la regulación de la familia TIFY en otras plantas de interés agronómico como es el caso del maíz.

Los resultados obtenidos en la primera parte de esta investigación muestran una respuesta tardía de ZmZIM91 a tratamientos con MeJA, ya que se observa la degradación de la proteína después de una hora de la aplicación del tratamiento, lo que permite determinar que ZmZIM91 es estable en presencia de MeJA, sin embargo debido a que experimentos preliminares de expresión de ZmZIM91 no revelaron cambios significativos a nivel transcripcional de ZmZIM91 bajo tratamientos con MeJA, es probable que el papel relevante de los ZML en respuesta a MeJA sea a nivel de proteína. Por otra parte, un trabajo reciente a cerca de los genes de la subfamilia ZML en uva, mostró que estos fueron inducidos por al menos un tipo de estrés abiótico (Yucheng *et al.*, 2012), este resultado sugiere que es relevante estudiar a ZmZIM91 en relación a estos tipos de estrés en trabajos futuros.

También es necesario mencionar que en los tratamientos con MeJA en protoplastos sobre-expresando ZmZIM91, éste se relocaliza dentro del núcleo en gránulos en la

intercromatina, simultáneamente con su degradación. Los gránulos son estructuras dinámicas, y tanto sus proteínas componentes como el ARN, pueden alternar continuamente entre gránulos y otros lugares nucleares, incluidos los sitios activos de transcripción (Spector y Lamond, 2011). Por tal motivo, podría ser interesante el estudio de la composición y estructura de los gránulos que forma la proteína ZmZIM91 después de la aplicación de MeJA, ya que podría ayudar a generar un modelo que permita entender la maquinaria de degradación por MeJA y así mismo el papel de ZmZIM91 en este proceso.

3.2.3 La variación de la secuencia en el N-terminal del dominio Jas de ZmZIM91 interviene en la interacción con COI1

El motivo LPIARR, el cual está localizado en el N-terminal del motivo Jas y que ha sido descrito como el responsable de la interacción de los JAZ con COI1 en presencia de la hormona JA-Ile (Pauwels y Goossens, 2011), está altamente conservado en proteínas JAZ (JAZ1, JAZ2, JAZ3, JAZ9, JAZ10 Y JAZ12) que interaccionan fuertemente con COI1, lo cual es consistente con la vida media de las proteínas JAZ mediadas por JA (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Chung y Howe, 2009; Grunewald *et al.*, 2009; Pauwels *et al.*, 2010). La importancia del motivo LPIARR en la degradación de los JAZ por tanto es muy relevante, lo que está respaldado por los resultados obtenidos en el estudio realizado a JAZ8, ya que esta proteína carece de este motivo, teniendo en su lugar la secuencia PKASM, lo cual no permite a JAZ8 interaccionar fuertemente con COI1 en presencia de JA-Ile, lo que trae como consecuencia que JAZ8 sea más estable en presencia de la hormona (Shyu *et al.*, 2012).

Experimentos de mutagénesis demostraron que las características únicas de JAZ8 son atribuidas a la variación de la secuencia en la región bucle, al remplazar PKASM por LPIAR, éste obtiene la capacidad de interaccionar con COI1 en presencia de JA-Ile y decrece su estabilidad (Shyu *et al.*, 2012). Estos resultados muestran que el motivo LPIARR funciona *in vivo* como una parte crítica del dominio Jas de los JAZ, que confirman los estudios estructurales anteriores, sin embargo la no presencia del mismo no es excluyente en cuanto a la degradación por JA como es el caso de JAZ8 (Sheard *et al.*, 2010). En el caso de ZmZIM91, el motivo LPIARR no está conservado, en su lugar se encuentran los aminoácidos YPHRVA. Ensayos de doble híbrido entre los ZML y

COI1 de *Arabidopsis* (Figura 3-10) al igual que inter-especie entre ZmZIM91 y COI1 de *Arabidopsis* (Figura 3-25) en presencia de diferentes concentraciones de CORONATINA mostraron que los ZML no son capaces de interactuar con COI1. Sin embargo sería interesante realizar el experimento de interacción entre ZmZIM91 y ZmCOI1, con el fin de determinar si se trata de un mecanismo conservado entre especies. También hay que tener en cuenta que la variación en el N-terminal del dominio Jas de ZmZIM91, puede reflejar la existencia de una funcionalidad específica para la subfamilia ZML.

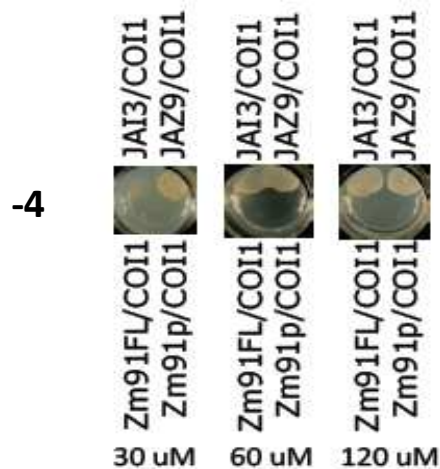


Figura 3-25. ZmZIM91 no es capaz de interactuar con COI1 de *Arabidopsis*. En el resultado del experimento de doble híbrido, se muestra que ni en presencia de altas concentraciones de CORONATINA, ZmZIM91 puede interactuar con COI1 de *Arabidopsis*. Zm91FL es el clon completo de ZmZIM91 y Zm91p es el clon de ZmZIM91 sin el N-terminal de la proteína (En colaboración con el Dr. Andrea Chini, investigador postdoctoral en el laboratorio del Dr. Roberto Solano, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid).

3.2.4 Señales de Localización Nuclear (NLS) y de Exportación Nuclear (NES) de la proteína ZmZIM91

Los consensos putativos de localización nuclear encontrados en entre los dominios Jas y CCT, pueden ser los responsables de la localización de ZmZIM91 en el núcleo, sin embargo en su región N-terminal ZmZIM91 posee tanto un motivo putativo de Señal de Localización Nuclear (NLS) como un motivo putativo de Señal de Exportación Nuclear (NES) que también pueden ser relevantes.

3.2.5 La proteína ZmZIM91 puede unir ADN

Estudios previos acerca de la subfamilia ZML en *Arabidopsis*, no habían demostrado que estos fueran factores de transcripción porque no determinaron la funcionalidad de su dominio GATA-*Zinc Finger* en la unión a ADN, con lo cual no se conocía si se trataban de factores o co-factores de transcripción como los miembros de la subfamilia JAZ. Por tanto, fue llevado a cabo para AtZIM y ZmZIM91 un ensayo *in vitro* de unión de proteína a un chip de ADN, que permitió determinar que los miembros de la subfamilia ZML tanto en *Arabidopsis* como en maíz son un grupo de factores de transcripción que pueden unir directamente ADN, siendo capaces de reconocer los motivos GATC y GATA (Figura 3-26). Además el hecho de que ambos homólogos mostraran la misma preferencia y en iguales proporciones para los consensos identificados, conlleva a pensar que se trata de un resultado sólido.

En mamíferos, el factor de transcripción GATA-1 que es requerido para el normal desarrollo eritroide y megacariocítico, contiene dos *Zinc Finger*, el C-terminal *finger*, el cual es conocido por unir motivos en ADN (A/T)GATA(A/G) y el N-finger, el cual también es capaz de unir ADN pero reconociendo la secuencia consenso GATC (Newton *et al.*, 2001). Los factores GATA son una clase de reguladores transcripcionales presentes en hongos, metazoos y plantas que normalmente reconocen la secuencia consenso WGATAR (W = T or A; R = G or A; Lowry y Atchley, 2000). En plantas, el motivo de ADN GATA ha sido implicado en el control de la transcripción dependiente de luz y dependiente de nitrato (Reyes *et al.*, 2004). La anterior información está acorde con lo resultados obtenidos de unión a ADN de ZmZIM91 si se tiene en cuenta que esta proteína contiene un dominio GATA-*Zinc Finger* y reconoce una secuencia diana típico de este tipo de dominios.

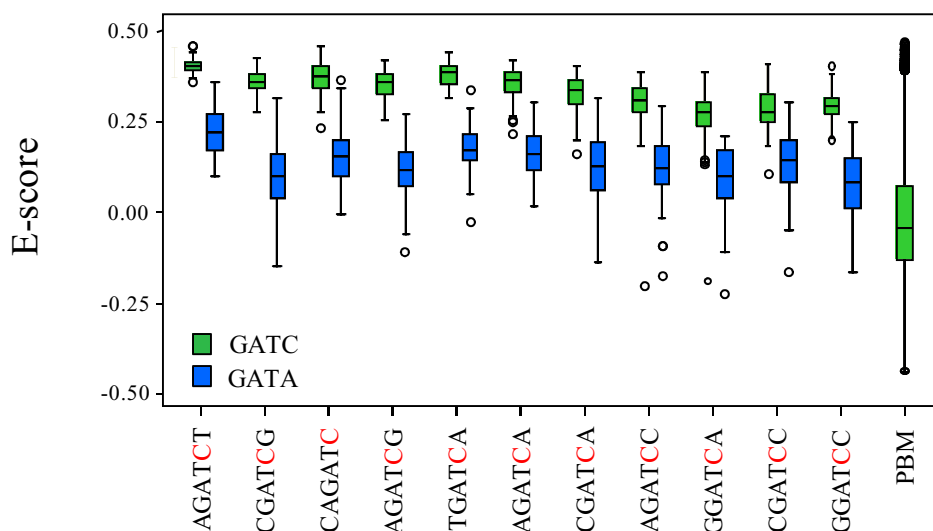


Figura 3-26. Diagrama de caja de puntajes (E-scores) de todos los 8-mers posibles conteniendo los consensos de 6-mer indicados y reconocidos por AtZIM y ZmZIM91. En verde están representados los puntajes correspondientes a los elementos contenidos GATC y en azul están los puntajes de los mismos motivos conteniendo el elemento GATA, donde el C en rojo fue remplazado por A (En colaboración con el Dr. José Manuel Franco, la Dra. Irene Vidrieros y el Dr. Roberto Solano. Servicio de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid).

3.2.6 Modelos hipotéticos de regulación por MeJA de ZmZIM91

Los resultados obtenidos en el capítulo I del presente trabajo, permiten tener una noción a cerca del modelo de comportamiento de ZmZIM91, por tal razón en esta parte de la discusión se proponen dos modelos hipotéticos de regulación para ZmZIM91.

Pese a que los ZML no pueden interaccionar con COI1, es interesante tener en cuenta que se ha demostrado que la proteína de ZmZIM91 es conservada *in vivo* por la presencia de MG132, lo cual indica que se podría degradar vía proteasoma 26S. A pesar de esto el mecanismo por el cual ZmZIM91 es degradado permanece desconocido como en el caso de JAZ8 y otros JAZ de *Arabidopsis*, que se comportan de manera similar a ZmZIM91 en presencia de MeJA.

Una de las hipótesis que se proponen para explicar el mecanismo por el cual se degrada ZmZIM91 por MeJA, es que éste es eliminado por una vía independiente de COI1 que tal vez está involucrado con otras proteínas F-box receptoras de JA. La vía en la cual

este nuevo receptor funcionaría podría ser similar a la acción de COI1 sobre los miembros de la familia JAZ que interaccionan fuertemente con COI1.

Otra hipótesis que se plantea es que la degradación de ZmZIM91 por MeJA vía el proteasoma 26S, se lleve a cabo a través de la interacción con los JAZ, la cual fue demostrada entre los ZML y JAZ de *Arabidopsis*. En el caso de ZML2 el dominio Jas de JAI3 fue suficiente para que existiera la interacción de ambas proteínas, este es el mismo caso de JAZ3 y MYC2 descrito por Chini *et al.* (2009), donde el dominio Jas también fue suficiente para mediar la interacción independiente de la hormona JA entre ambas proteínas. En conclusión, probablemente los JAZ interaccionen con los ZML y en presencia de MeJA sean degradados por el proteasoma 26S en forma de una especie de “complejo degradador” que incluiría a COI1.

3.2.7 La proteína ZmZIM91 interacciona y es fosforilada por la proteína quinasa CK2

La proteína ZmZIM91 es tanto un interactor como sustrato de CK2. El hecho de que ZmZIM91 pudiera interaccionar con tres de las subunidades reguladoras de la CK2 (CK2 β 1, CK2 β 2 y CK2 β 3) y la subunidad catalítica CK2 α 1, pero que sólo CK2 β 1 y CK2 β 2 pudieran relocalizar en gránulos en el núcleo a ZmZIM91, muestra probablemente que tiene más afinidad con estas proteínas que con CK2 β 3. Con respecto a que CK2 α 1 no pueda relocalizar a ZmZIM91 se puede decir que es de esperarse ya que se ha visto en maíz que solo las subunidades reguladoras de la proteína quinasa CK2 tienen la capacidad de transportar sus sustratos (Riera *et al.*, 2011), mientras que las subunidades catalíticas solo pueden fosforilar.

Los resultados también mostraron que el holoenzima CK2 α 1 β 1, relocalizaba a la proteína ZmZIM91, probablemente la CK2 este interviniendo en la regulación de dicha proteína para que cumpla funciones específicas en otros sitios diferentes de su localización habitual en el núcleo cuando es fosforilada.

Por otra parte, los ensayos de fosforilación *in vitro*, evidenciaron que ZmZIM91 era sustrato tanto de CK2 α 1 como del holoenzima CK2 α 1 β 1, lo que era esperado si se tiene en cuenta que ZmZIM91 posee putativos consensos de fosforilación por CK2, sin

embargo aún queda por determinar los residuos específicos de ZmZIM91 que son fosforilados por CK2.

3.2.8 La fosforilación de ZmZIM91 por la proteína quinasa CK2 es regulada por estrés biótico y abiótico

Con el fin de estudiar las modificaciones postraduccionales, más específicamente la fosforilación de ZmZIM91 bajo tratamientos, se usó el ensayo de quinasa en gel. El uso del inhibidor específico de CK2 (DRB), permitió identificar la banda correspondiente a CK2 α con lo cual se pudo evaluar el comportamiento de dicha quinasa bajo el correspondiente tratamiento.

Al realizar el experimento de fosforilación *in vivo* con aplicación de MeJA, lo que se obtuvo fue un incremento de la fosforilación por CK2 a 30 minutos de tratamiento con MeJA y una disminución de la fosforilación por CK2 a 1 hora. A pesar de que se trata de un experimento realizado con raíces tratadas con MeJA y no con hojas como los western, se puede observar una correlación de los datos obtenidos en ambos experimentos, es decir que podría pensarse que la fosforilación por CK2 interviene en la vida media de ZmZIM91 y su respuesta a MeJA.

En investigaciones anteriores también se ha demostrado la reducción de la fosforilación por CK2 de proteínas bajo tratamientos con MeJA. En *Arabidopsis* fue llevado a cabo una investigación para analizar las interacciones postraduccionales en las vías de señalización por MeJA y SA, ambas hormonas median la fosforilación diferencial de sustratos por muchas familias de quinasas. También algunos sustratos fueron fosforilados diferencialmente, incluyendo péptidos derivados del fitocromo A y proteínas del fotosistema II D (Ritsema *et al.*, 2010).

Posterior al tratamiento con MeJA, se llevó a cabo el experimento de quinasa en gel con muestras de raíz tratadas con sequía para evaluar el comportamiento de la fosforilación de ZmZIM91 por CK2 en condiciones de estrés abiótico (Figura 3-27). Se observó que en todos los casos la fosforilación de ZmZIM91 por CK2 incrementa, caso contrario al presentado bajo tratamiento con MeJA. Sería interesante analizar el comportamiento de

la proteína ZmZIM91 bajo sequía para determinar si existe alguna relación entre la conservación o degradación de ZmZIM91 y su fosforilación por CK2.

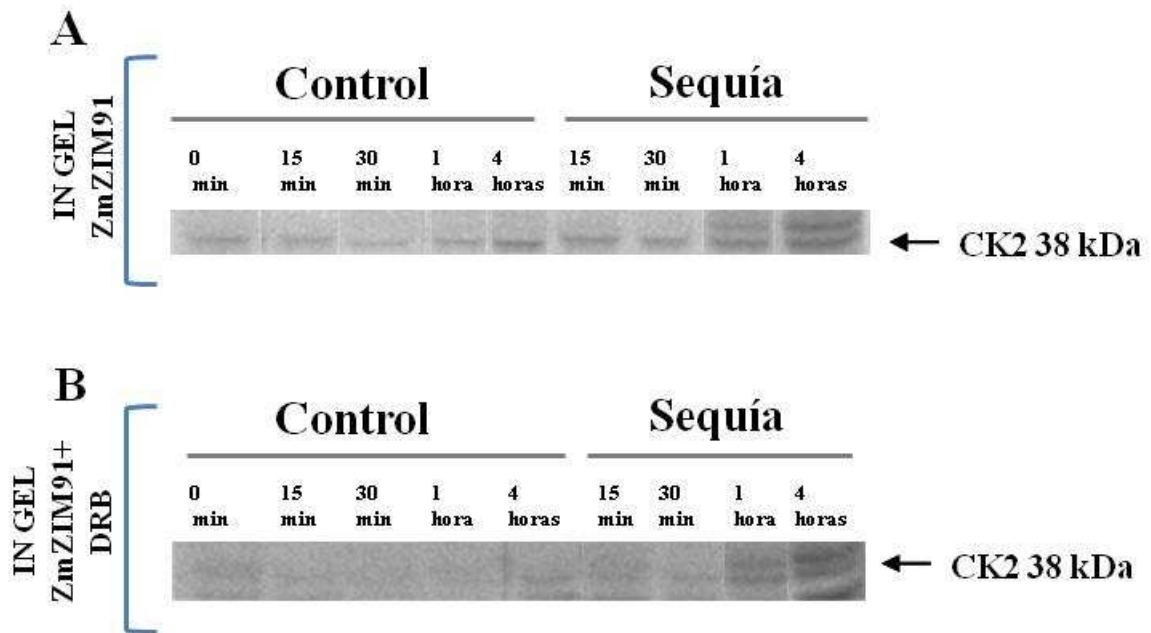


Figura 3-27. ZmZIM91 es sustrato *in vivo* de la proteína quinasa CK2 y es regulada por esta quinasa en sequía. Se usó la técnica de ensayo en gel. Se tomaron muestras tanto control como tratadas a 0 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora y 4 horas. En (A) se muestra un gel que contienen la proteína ZmZIM91 y extractos de raíces de maíz de 6 días tratadas con sequía, donde se puede observar que incrementa la actividad de CK α en todas las muestras tratadas con respecto al control. En (B) Se observa un gel que contiene la proteína ZmZIM91 y extractos de raíces de maíz de 6 días tratadas con sequía, además el gel fue incubado con 50 μ M de DRB un inhibidor específico de la CK α . Se observa que la banda correspondiente a 38 kDa (CK α) prácticamente desaparece.

Capítulo II

Capítulo II

4. Caracterización funcional de la proteína ZmZIM91 de maíz

4.1 Resultados

4.1.1 ChIP-Seq de ZmZIM91 a partir de protoplastos de maíz transfectados

Con el objetivo de conocer la función del factor de transcripción ZmZIM91, se buscó identificar sus genes diana a nivel genómico para lo cual se llevó a cabo un experimento de Inmunoprecipitación de la Cromatina seguida de secuenciación masiva paralela (ChIP-Seq). Esta metodología combina una técnica ampliamente utilizada para el estudio de las interacciones proteína-ADN *in vivo* con las nuevas tecnologías de secuenciación masiva (*Next Generation Sequence*). En esta parte del trabajo, se presentan los resultados del ChIP-Seq proveniente de protoplastos de maíz que sobre expresaban tanto 35S::ZmZIM91:GFP como 35S::GFP, utilizando dos tipos de anticuerpos: 1) el anti_ZmZIM91 (ver materiales y métodos) y 2) un anticuerpo comercial contra la GFP (abcam).

4.1.1.1 Elaboración de ChIP utilizando protoplastos de maíz que sobre-expresaban 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::GFP

Para la identificación de genes diana de ZmZIM91, se generaron anticuerpos contra la proteína endógena de ZmZIM91. La efectividad para realizar inmunoprecipitaciones con estos anticuerpos se validó utilizando ChIP de protoplastos de maíz que sobre-expresaban la proteína ZmZIM91 fusionada a la GFP y como control de este ensayo se usó ChIP de protoplastos que sobre-expresaban el vector de la GFP.

Dado que no existían trabajos previos acerca de la elaboración de ChIP usando protoplastos, fue necesario realizar la puesta a punto del mismo. Para ello, se llevó a cabo un primer experimento de ChIP usando protoplastos de maíz que sobre-expresaban el vector de la GFP y se procedió a probar diversas condiciones de *crosslinking* (tiempo de vacío, concentraciones adecuadas de cantidad de formaldehído y BSA), ya que este es un paso fundamental para el funcionamiento del ChIP (Figura 4-1).

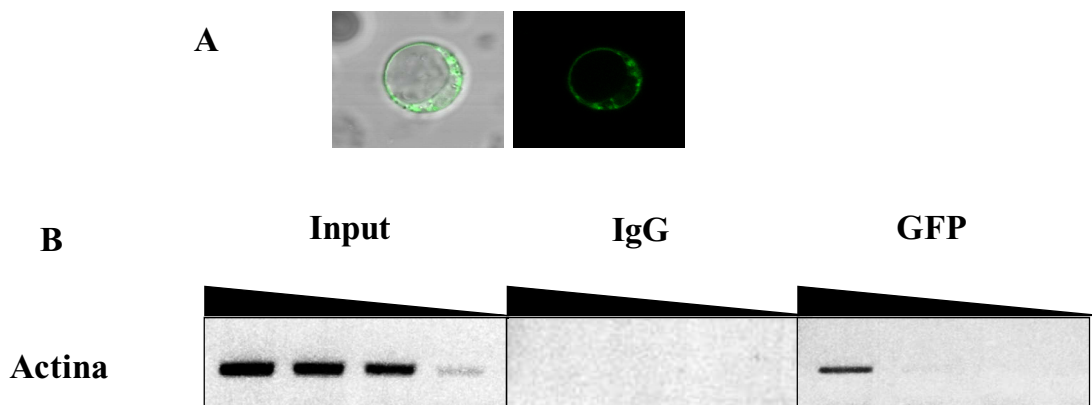


Figura 4-1. Validación mediante PCR semi-cuantitativa de las condiciones óptimas para la preparación de ChIP de protoplastos de maíz que sobre-expresaban 35S::GFP. En (A) se muestra la imagen de los protoplastos de maíz sobre-expresando la GFP, usados para la puesta a punto del ChIP en protoplastos de maíz y en (B) se observan los resultados de PCR semi-cuantitativa usando la actina como control (40 ciclos) para el Input, el anticuerpo secundario contra la IgG (control negativo) y el anticuerpo de la GFP. Las PCRs semi-cuantitativas se realizaron en cuatro diluciones seriadas del material inmunoprecipitado (1, 1/10, 1/100 y 1/1000). El anti_IgG fue usado para determinar la inmunoprecipitación no específica. Las condiciones del experimento fueron: 2.6×10^5 protoplastos con una tasa de eficiencia de transformación mayor del 65% + 1% de formaldehído + 2 μ g de BSA.

Posteriormente, con las condiciones iniciales puestas a punto, se efectuó el ChIP usando protoplastos de maíz transformados por una parte con 35S::ZmZIM91:GFP y por otra con el vector 35S::GFP (Figura 4-2). Para las inmunoprecipitaciones de cada muestra se utilizaron: 1) un anticuerpo contra la GFP (abcam), 2) los dos anticuerpos previamente purificados de ZmZIM91 (anti_ZmZIM91#1 y anti_ZmZIM91#2), 3) un anticuerpo contra histona H3 (abcam) y 4) el anticuerpo secundario contra la IgG. Para evaluar la calidad de los inmunoprecipitados con los diferentes anticuerpos usados, se realizaron PCRs semi-cuantitativas de ChIP utilizando cebadores específicos para amplificar la actina de maíz.

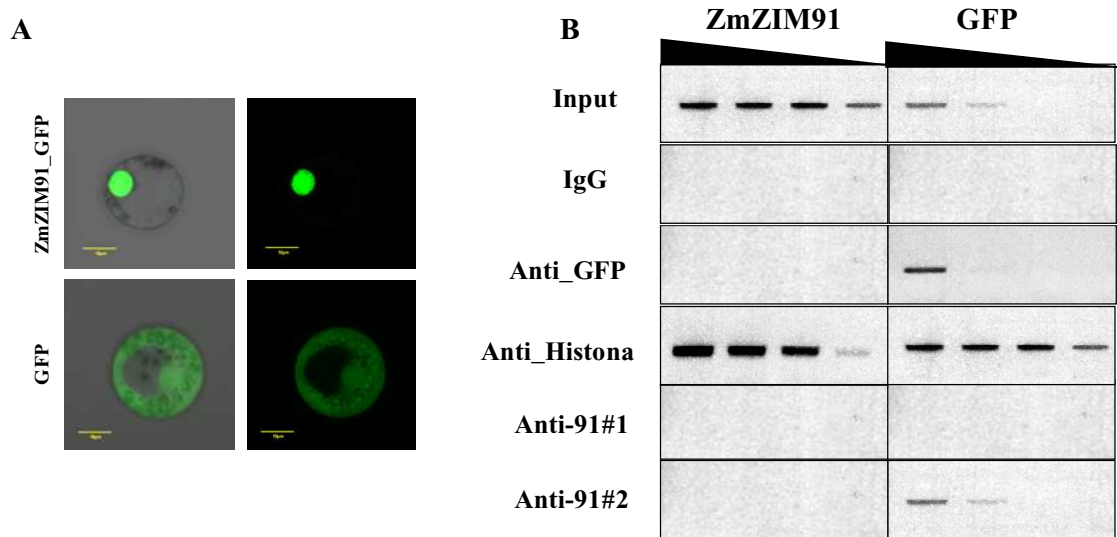


Figura 4-2. Validación de la técnica de ChIP de protoplastos mediante PCR semi-cuantitativa. En el panel (A) se muestran los protoplastos de maíz sobre-expresando 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::GFP (Control). En el panel (B) se presentan las PCRs semi-cuantitativas usando la actina de maíz, para los inmunoprecipitados de 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::GFP. Al lado izquierdo se etiqueta cada muestra: en primer lugar el Input y posteriormente los inmunoprecipitados con el anti_IgG, el anti_GFP, el anti_Histona (como control positivo de la inmunoprecipitación y funcionamiento del ChIP), el anti-91#1 y el anti-91#2.

Los resultados obtenidos en este segundo ensayo de ChIP de protoplastos de maíz, mostraron un comportamiento normal en el caso del Input de ambas muestras donde se observó amplificación de actina. Con las inmunoprecipitaciones usando como control negativo el anticuerpo secundario contra la IgG, no hubo amplificación de actina, lo que indica la ausencia de inmunoprecipitación inespecífica en los protoplastos que sobre-expresaban 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::GFP.

En el caso de las inmunoprecipitaciones con el anticuerpo contra la GFP, en ZmZIM91 la actina no amplifica, mientras que en el del vector de GFP se observa una banda de actina inespecífica, sin embargo como se trata de un control negativo no se considera como un problema para continuar empleando la técnica de ChIP de protoplastos de maíz.

Las PCRs semi-cuantitativas de actina realizadas usando las muestras inmunoprecipitadas con el anti-91#1 y el anti-91#2, mostraron que en el caso de los protoplastos transformados con la GFP, el anticuerpo 2 de ZmZIM91 era inespecífico

ya que la actina se amplificó en este inmunoprecipitado, por tanto se decidió descartar este anticuerpo y realizar las siguientes inmunoprecipitaciones con el anti-91#1.

Los inmunoprecipitados generados con el anticuerpo contra la histona, fueron usado como control positivo del correcto funcionamiento de la inmunoprecipitación realizada sobre los protoplastos de maíz transfectados, debido a que no se conocía un probable gen diana de ZmZIM91. Al amplificar la actina en la PCR semi-cuantitativa de ChIP, se concluye que la inmunoprecipitación funcionó correctamente tanto para los protoplastos que sobre-expresaban 35S::ZmZIM91:GFP como para los que sobre-expresaban 35S::GFP. Además, es necesario tener en cuenta que en las inmunoprecipitaciones usando el anticuerpo contra la histona deben estar inmunoprecipitada la actina, mientras que en el caso de los anticuerpos contra la GFP y contra ZmZIM91 la presencia de actina sería un indicador de inespecificidad.

4.1.1.2 Construcción de librerías a partir del ChIP de protoplastos de maíz usando la tecnología de *ILLUMINA-SOLEXA*

Para la elaboración de las librerías de ChIP-Seq, el protocolo utilizado es el descrito en los materiales y métodos. Tanto para la GFP como para ZmZIM91 se construyeron librerías del Input, el inmunoprecipitado con el anticuerpo de la GFP y el inmunoprecipitado con el anticuerpo contra ZmZIM91: anti-91#1 (Figura 4-3). Cada librería fue elaborada con adaptadores que poseían distintos códigos de barra (adaptadores) que permiten la identificación posterior de cada una de las muestras tras la secuenciación.

Posteriormente a la construcción de las librerías, se llevó a cabo un análisis de la calidad, cuantificación y distribución (entre 200 y 400 pares de bases) de las mismas usando la tecnología del *Bioanalyzer* (Figura 4-4). De acuerdo a estos datos, se decidió enviar a secuenciar 4 librerías: ZmZIM91_antiGFP, ZmZIM91_anti91, Vector GFP_antiGFP, Vector GFP_anti91.

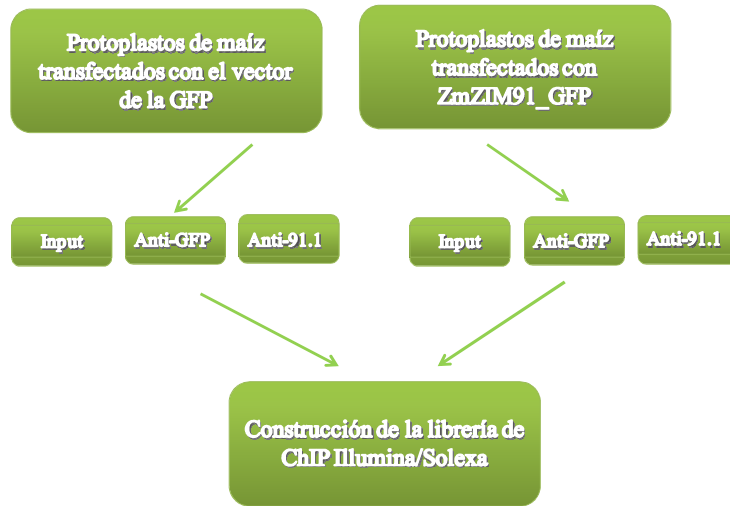


Figura 4-3. Diagrama representando la construcción de la librería de ChIP de protoplastos de maíz usando la tecnología *Illumina/Solexa*.

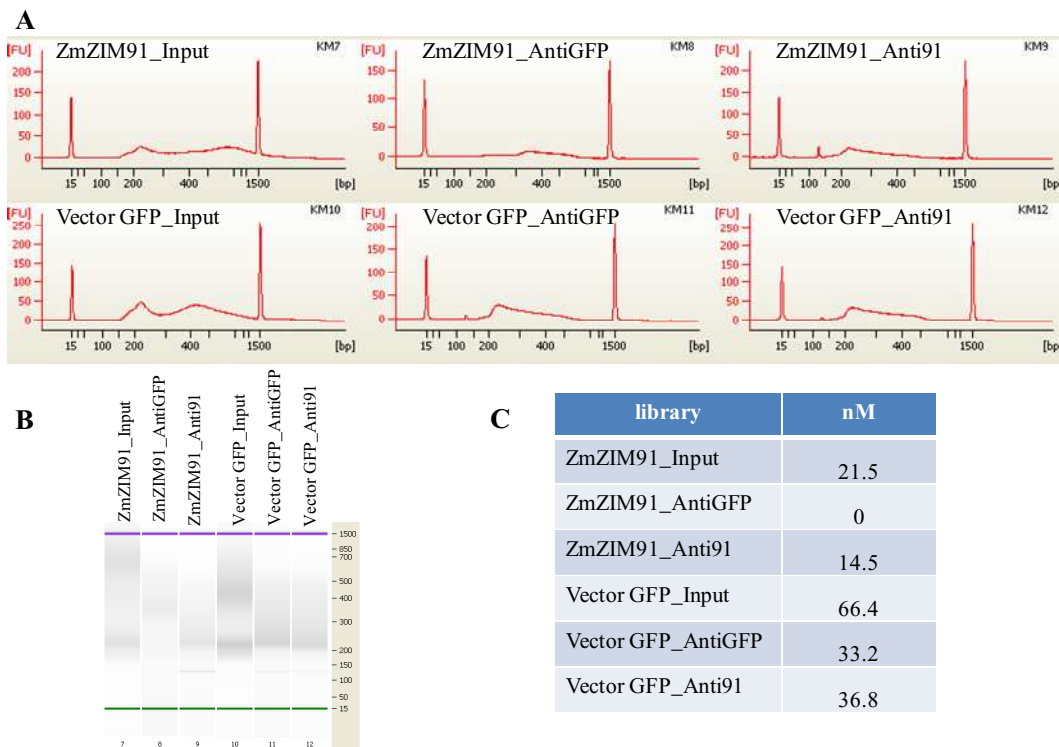


Figura 4-4. Control de la calidad y cuantificación de las muestras de las librerías de ChIP de protoplastos de maíz, usando *Bioanalyzer*. En (A) se muestran los diagramas de las imágenes generadas por *bioanalyzer*, en el caso de ZmZIM91_anti91, GFP_antiGFP y GFP_anti91 se observa un pico de contaminación de aproximadamente 123 pares de bases. En (B) se puede ver la imagen del gel conteniendo cada una de las librerías y en (C) se presenta la cuantificación de cada una de las librerías.

Para la secuenciación por el sistema de *Illumina* fueron enviados aproximadamente unos 20 ng de cada librería, sin embargo en el caso de la librería de ZmZIM91_antiGFP probablemente la cantidad enviada para secuenciar fue menor debido a la baja concentración de la muestra.

4.1.1.3 Mapeo de datos de lecturas cortas en el genoma de maíz e identificación de picos.

Para el mapeo de las lecturas cortas en el genoma de maíz de la variedad B73 fue usado el *software* BOWTIE (Langmead *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos de la secuenciación de las librerías elaboradas con los protoplastos transformados con el vector de GFP (control negativo), fueron de 56.543 lecturas que alineaban con el genoma de maíz para el inmunoprecipitado con el antiGFP, mientras que para el anti91 fueron de 32.305 lecturas (Figura 4-5).

La secuenciación de las librerías de los inmunoprecipitados de lo protoplastos sobre-expresando ZmZIM91 aportó los siguientes resultados: con el antiGFP se obtuvieron 1.062.351 de lecturas en contraste con las obtenidas para el anti91 que fueron 154.994, probablemente porque esta última librería a diferencia de la primera, contenía un pico de contaminación por adaptadores que pueden llegar a interferir en la eficiencia de la obtención de lecturas útiles (Figura 4-5).

Para la identificación de picos o “*peak calling*” se usó el *software Model-based analysis of ChIP-Seq* MACS (Zhang *et al.*, 2008). En un trabajo de comparación de cinco programas muy usados para identificar picos (Rye *et al.*, 2011), se demostró que MACS tiene el mejor rendimiento sobre el análisis manual de conjuntos de datos.

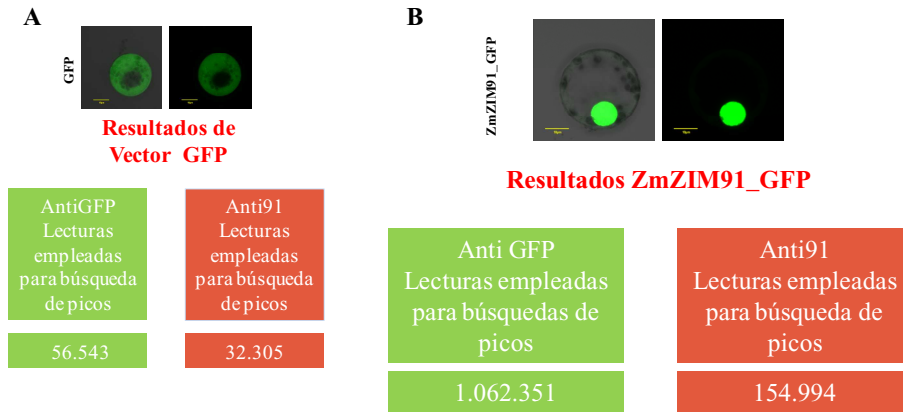


Figura 4-5. Análisis de los datos de las librerías de ChIP de protoplastos de maíz usando BOWTIE y MACS. En (A) se presentan las lecturas que alinean en el genoma de maíz del vector GFP con el antiGFP y el anti91. En (B) Se presentan las lecturas que alinean en el genoma de maíz después de descartar las encontradas en los correspondientes controles negativos (vector GFP) de ZmZIM91 con el antiGFP y el anti91 y que fueron usadas para buscar los picos en cada caso.

4.1.1.4 Información y localización de sitios de unión obtenidos a partir de los análisis estadísticos del ChIP-Seq proveniente de protoplastos de maíz

La cantidad de picos encontrados para ZmZIM91_anti91 fue de 1454, mientras que para ZmZIM91_antiGFP fueron 5824 (Figura 4-6).

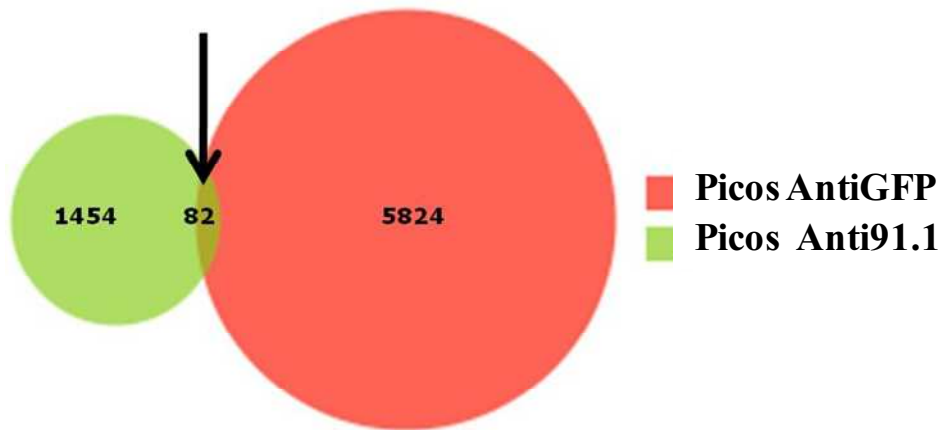


Figura 4-6. Gráfico de la intersección entre los picos de ZmZIM91_anti91 y ZmZIM91_antiGFP. El círculo rosa señala los picos obtenidos con el antiGFP (5824) y el verde los del anti91 (1454), la flecha negra indica los picos que coinciden para ambos anticuerpos (En colaboración con María Katherine Mejía-Guerra del laboratorio del Dr. Erich Grotewold, *Department of Molecular Genetics, Ohio State University, Columbus, Ohio, USA*).

Tanto para los picos obtenidos con el antiGFP como con el anti91, se llevó a cabo un análisis de los mismos y se determinó en ambos casos la localización de los sitios relativos de unión a los genes más cercanos. Para conocer la distribución de los picos, se realizó una búsqueda de los picos relativa a la coordenada de inicio de los genes localizados en la vecindad, en una ventana de 10 Kb aguas arriba y aguas abajo (Figura 4-7 A y B), esta distribución reveló que la unión de ZmZIM91 está altamente enriquecida en las proximidades cercanas a los genes, también se determinó que la mayoría de los picos en ambos casos se encontraban localizados en mayor proporción aguas arriba de los genes, seguido por una gran cantidad de picos dentro del gen y en un porcentaje muy similar a los encontrados aguas abajo (Figura 4-7 C y D). Posteriormente, se realizó un cruce con los picos obtenidos para las librerías generadas con los ChIPs de ZmZIM91 generados con los dos anticuerpos y se obtuvo que 82 interceptaban (Figura 4-6). Dada la complejidad de esta técnica y para tratar de asegurar la identificación de un candidato fiable, se decidió trabajar sólo con los picos que interceptaban, aunque se estima que al llevar a cabo esta estrategia, fueron descartados candidatos positivos.

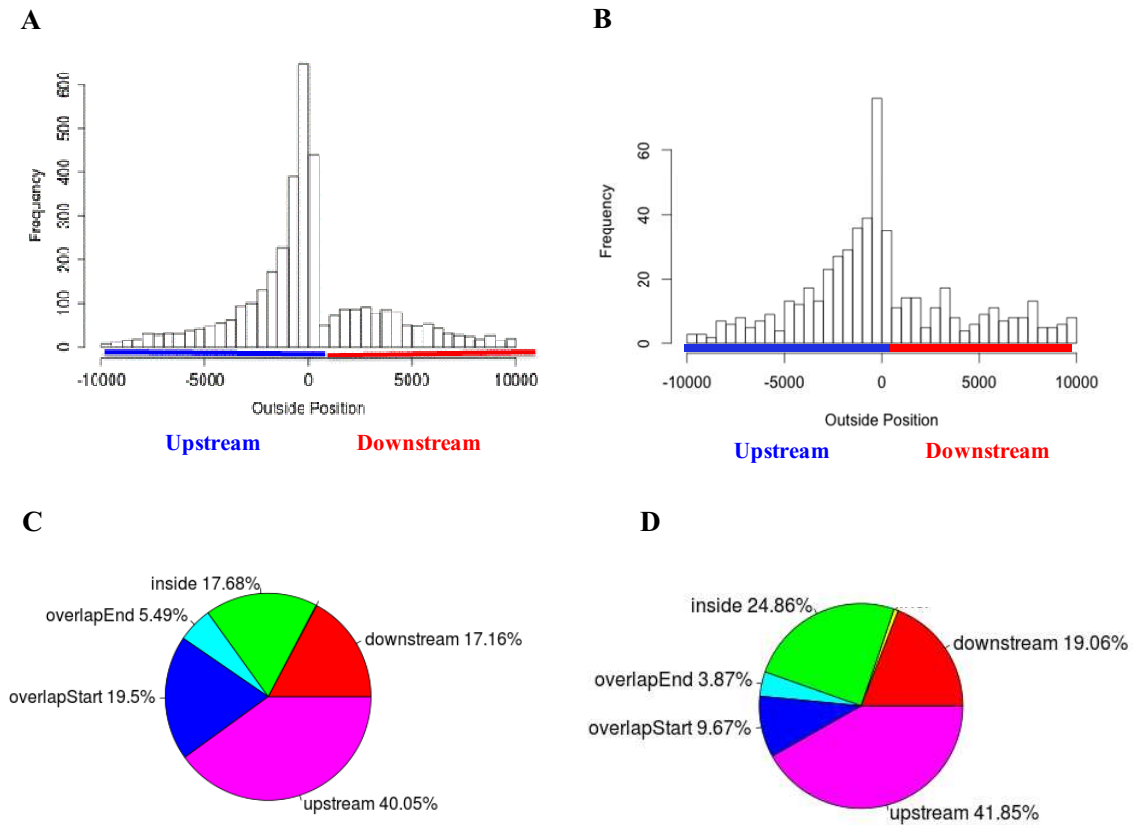


Figura 4-7. Distribución de picos relativa a la coordenada de inicio de los genes ubicados en la vecindad y porcentaje de picos localizados en las zonas adyacentes a los genes cercanos. En (A) y (B) se muestran los histogramas que representan la distribución de picos obtenidos para *ZmZIM91_antiGFP* y *ZmZIM91_anti91*, relativa a la coordenada de inicio de los genes en vecindad en una ventana de 10 Kb aguas arriba y aguas abajo. La barra más alta que en ambos casos está centrada en cero pares de bases, indica que la unión de *ZmZIM91* está enriquecida cerca al TSS. En (C) y (D) se representa el porcentaje de picos localizados en diferentes zonas adyacentes a los genes cercanos para *ZmZIM91_antiGFP* y *ZmZIM91_anti91*: en rosa se presenta el porcentaje de picos aguas arriba (40.05% y 41.85% respectivamente), en azul oscuro el correspondiente a los que solapan con el inicio (19.5% y 9.67%), en rojo los picos aguas abajo (17.16% y 19.06%), en verde los que se encuentran dentro de los genes (17.68% y 24.86%) y finalmente en azul claro el porcentaje de los picos que caen al final de los genes (5.49% y 3.87%) (En colaboración con María Katherine Mejía-Guerra del laboratorio del Dr. Erich Grotewold, *Department of Molecular Genetics, Ohio State University, Columbus, Ohio, USA*).

4.1.1.5 Localización de los picos en el genoma de maíz

A continuación, con los picos de *ZmZIM91* que interceptaban en las librerías generadas con los ChIPs de *ZmZIM91* generados con los dos anticuerpos usados, fueron elaborados dos tipos de archivos con el programa MACS: los *bed* que son los que dan

información de la posición del pico y los wig que son los picos en sí. Ambos archivos fueron usados en el programa IGV 2.1 y a partir de esto fueron generados los gráficos de localización de los picos en cada cromosoma tanto para la librería de ZmZIM91_antiGFP como para la de ZmZIM91_anti91 y para las librerías de los controles de ambos con el vector de GFP (Figura 4-8).

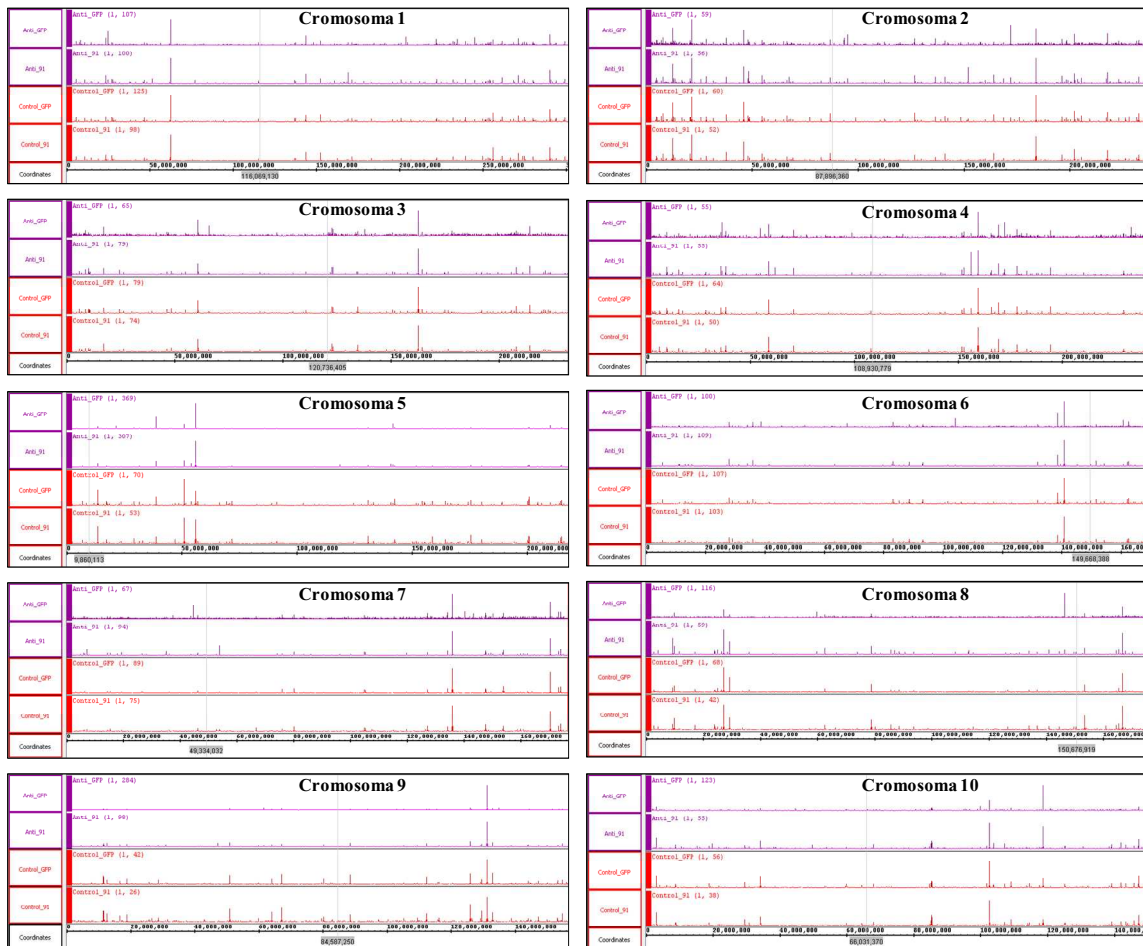


Figura 4-8. Localización de picos en cada cromosoma del genoma de maíz. En lila se presenta en primer lugar los picos correspondientes a las librerías de ZmZIM91_antiGFP y en segundo las de ZmZIM91_anti91. En rojo se muestran los controles con el vector de GFP, primero los correspondientes a las librerías GFP_antiGFP y luego a las de GFP_anti91.

4.1.1.6 Clasificación y anotación de genes diana seleccionados

Los criterios de selección de los picos del ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz seleccionados para la validación fueron 2: 1) *p-value* (mayor de 50) y 2) que estuvieran entre 2000 pares de bases cerca de la región que flanquea la

zona 5' de los genes tanto los picos para la librería de ZmZIM91_antiGFP (Tabla 4-1) como los de la librería de ZmZIM91_anti91 (Tabla 4-2).

Cromosoma	Posición en el genoma	Identificador pico en MACS	P-Value	Gen en la zona que flanquea el pico
1	2908528 2909990	MACS_peak_437	509.97	GRMZM2G436038
1	96314345 96314932	MACS_peak_808	131.70	GRMZM2G070899
1	103616737 103617310	MACS_peak_824	93.26	GRMZM2G057466
1	123772516 123772766	MACS_peak_849	56.18	GRMZM2G009655
1	204693488 204694114	MACS_peak_1000	186.02	GRMZM2G058402
1	278024486 278024815	MACS_peak_1278	51.31	GRMZM2G031138
1	283253736 283254052	MACS_peak_1312	75.80	GRMZM2G463726
2	12600466 12600747	MACS_peak_1521	114.03	GRMZM2G176225
2	15128432 15128977	MACS_peak_1555	79.91	GRMZM2G050234
3	176000444 176001040	MACS_peak_2386	63.77	GRMZM2G135722
3	186381444 186381580	MACS_peak_2453	152.79	GRMZM2G155321
3	218480031 218480344	MACS_peak_2639	70.11	GRMZM2G114444
4	25787643 25788146	MACS_peak_2764	82.28	GRMZM2G147726
4	231411220 231411490	MACS_peak_3163	71.02	GRMZM2G003377
4	231411376 231411686	MACS_peak_3163	71.02	GRMZM2G003411
5	2792233 2792359	MACS_peak_3230	117.64	GRMZM2G108716
5	4256470 4256729	MACS_peak_3250	51.31	GRMZM2G007063
5	77922026 77922073	MACS_peak_3509	69.78	GRMZM2G097207
5	207893065 207893256	MACS_peak_3813	127.85	GRMZM2G320786
5	215267226 215267661	MACS_peak_3884	86.57	GRMZM5G862817
7	140424779 140425342	MACS_peak_4634	93.85	GRMZM2G071147
7	144980649 144980736	MACS_peak_4654	97.39	GRMZM2G096709
7	161958265 161958418	MACS_peak_4761	99.87	GRMZM2G010702
7	161958951 161959052	MACS_peak_4762	67.07	GRMZM2G010702
7	163005646 163005888	MACS_peak_4771	57.33	GRMZM2G144030
8	170055854 170056180	MACS_peak_5351	92.03	GRMZM2G043498
9	137092451 137092950	MACS_peak_5650	94.79	GRMZM2G053908
9	150745517 150745583	MACS_peak_5747	68.86	GRMZM2G438606

Tabla 4-1. Picos que interceptan entre las librerías de ZmZIM91_anti91 y de ZmZIM91_antiGFP. La lista de picos corresponde a la librería de ZmZIM91_antiGFP.

Cromosoma	Posición en el genoma	Identificador pico en MACS	P-Value	Gen en la zona que flanquea el pico
1	2908528 2909990	MACS_peak_119	66.10	GRMZM2G436038
1	96314470 96314757	MACS_peak_184	57.33	GRMZM2G070899
1	103617115 103617592	MACS_peak_188	73.63	GRMZM2G057466
1	123772367 123772766	MACS_peak_200	70.80	GRMZM2G009655
1	204693619 204693824	MACS_peak_258	122.83	GRMZM2G058402
1	278024493 278024904	MACS_peak_316	76.20	GRMZM2G031138
1	283253718 283254346	MACS_peak_319	89.62	GRMZM2G463726
2	12600466 12600834	MACS_peak_340	107.14	GRMZM2G176225
2	15128596 15128956	MACS_peak_345	76.67	GRMZM2G050234
3	176000663 176000935	MACS_peak_605	99.36	GRMZM2G135722
3	186381444 186381757	MACS_peak_617	76.67	GRMZM2G155321
3	218480031 218480536	MACS_peak_642	71.08	GRMZM2G114444
4	25787741 25788091	MACS_peak_674	76.67	GRMZM2G147726
4	231411375 231411686	MACS_peak_797	72.30	GRMZM2G003377
4	231411376 231411686	MACS_peak_797	71.02	GRMZM2G003411
5	2792233 2792556	MACS_peak_814	72.85	GRMZM2G108716
5	4256453 4256778	MACS_peak_816	76.67	GRMZM2G007063
5	77922018 77922073	MACS_peak_875	96.62	GRMZM2G097207
5	207893149 207893256	MACS_peak_956	90.60	GRMZM2G320786
5	215267358 215267696	MACS_peak_967	76.67	GRMZM5G862817
7	140424942 140425225	MACS_peak_1184	99.36	GRMZM2G071147
7	144980649 144980823	MACS_peak_1186	76.67	GRMZM2G096709
7	161958265 161958588	MACS_peak_1205	76.67	GRMZM2G010702
7	161958987 161959052	MACS_peak_1206	52.89	GRMZM2G010702
7	163005782 163005888	MACS_peak_1208	75.30	GRMZM2G144030
8	170055995 170056204	MACS_peak_1321	76.67	GRMZM2G043498
9	137092720 137092950	MACS_peak_1410	140.04	GRMZM2G053908
9	150745517 150745725	MACS_peak_1417	71.30	GRMZM2G438606

Tabla 4-1. Picos que interceptan entre las librerías de ZmZIM91_anti91 y de ZmZIM91_antiGFP. La lista de picos corresponde a la librería de ZmZIM91_anti91

En los picos de mayor interés, seleccionados de acuerdo a los parámetros mencionados anteriormente, se identificaron los genes que se encontraban en las zonas que flanquean los picos y además se examinó en cada una de las secuencias de los picos, si contenían alguno de los motivos de unión a ADN identificado *in vitro* para ZmZIM91: GATA o GATC. Se encontró que el 68% de los genes poseían alguno de los motivos de unión de ZmZIM91. Debido a la escasa información acerca de la función de los genes identificados en las zonas que flanquean los picos, se procedió a realizar una búsqueda de los homólogos en *Arabidopsis* usando para ello la base de datos del TAIR y con esto, se determinó la función putativa para estos genes (*Gene Ontology: GO*) (Anexo I, Tabla SII).

Del total de picos seleccionados para la validación del ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz, se decidió efectuar el análisis de algunos picos que contenían genes que se encontraban en las zonas que flanqueaban la región 5',

interesantes para este trabajo porque están involucrados en la respuesta a estrés. Estos picos fueron localizados en el genoma de maíz con ayuda del *software* IGV 2.1. Las imágenes se muestran en el Anexo I, Figuras SI1 a SI16.

4.1.1.7 Validación de genes diana de ZmZIM91 identificados en el ChIP-Seq proveniente de protoplastos de maíz

La primera validación de los picos fue llevada a cabo mediante PCR semi-cuantitativa de ChIP, para esto fueron diseñados cebadores en la zona central del alineamiento entre las secuencias obtenidas para las librerías de ZmZIM91_antiGFP y las de ZmZIM91_anti91 (ver materiales y métodos), un ejemplo de esto es mostrado en la Figura 4-9.

```

>MACS_peak_824          GFP
GTTTAGTTGATGACTTAATCATGTTTTATTGTTACTGCTATTATCGCTAAGCATCTTGCACCTGTTATGGATAATTGATTGATTATACAAGCTAGAGC
GCGTGGCTGCTAAAAATCATATTGCAAACCTGATTGTGACTATGGGCGTGGTAGGGAAACAACCCAGGAATATCAACGTGCCGTGTTGGTTTCGGTA
CCTACAGCTTTCTTGACTTGGTTGCCGAGTTACTGCTCTTTTGGTACTACATAAGCAATCTGTGGTATCCAAACAATTGGTGTCTTTTCAGTCTGC
TGCTCTGTGGTCAATGCTACTTGTAAATACCGAACTGCAGTAAATGATAGTTTTG

>MACS_peak_188      91
TGCACTGTTATGGATAATTGATTGATTATACAAGCTAGAGCGCGTGGCTGCTAAAAATCATATTGCAAACCTGATTGTGACTATGGGCGTGGTAGGGAA
ACAACCCAGGAATATCAACGTGCCGTGTTGGTTTCGGTACCTACAGCTTTCTTGACTTGGTTGCCGAGTTACTGCTCTTTTGGTACTACATAAGAC
CAATCTGTGGTATCCAAACAATTGGTGTCTGTTTCAGTCTGCTGTCTCTGTGGTCAATGCTACTTGTAAATACCGAACTGCAGTAAATGATAGTTTTG
TTTGACTGCAAAATTGACTAGTTTACCTACGCCTTAGGTGGAGGGTAGGAGCTATCT

MACS_peak_824          GTTTAGTTGATGACTTAATCATGTTTTATTGTTACTGCTATTATCGCTAAGCATCTTGC 60
MACS_peak_188          -----TGC 3
                        ***

MACS_peak_824          ACTGTTATGGATAATTGATTGATTATACAAGCTAGAGCGCTGGCTGCTAAAAATCATAT 120
MACS_peak_188          ACTGTTATGGATAATTGATTGATTATACAAGCTAGAGCGCTGGCTGCTAAAAATCATAT 63
                        *****

MACS_peak_824          TGCAAACCTGATTGTGACTATGGGCGTGGTAGGGAAACAACCCAGGAATATCAACGTGCC 180
MACS_peak_188          TGCAAACCTGATTGTGACTATGGGCGTGGTAGGGAAACAACCCAGGAATATCAACGTGCC 123
                        *****

MACS_peak_824          GTGTTGGTTTCGGTACCTACAGCTTTCTTGACTTGGTTGCCGAGTTACTGCTCTTTTGG 240
MACS_peak_188          GTGTTGGTTTCGGTACCTACAGCTTTCTTGACTTGGTTGCCGAGTTACTGCTCTTTTGG 183
                        *****

MACS_peak_824          TACTACATAAGACCAATCTGTGGTATCCAAACAATTGGTGTCTTTCAGTCTGCTGCTC 300
MACS_peak_188          TACTACATAAGACCAATCTGTGGTATCCAAACAATTGGTGTCTTTCAGTCTGCTGCTC 243
                        *****

MACS_peak_824          TGTGGTCAATGTCTACTTGTAAATACCGAACTGCAGTAAATGATAGTTTTG----- 351
MACS_peak_188          TGTGGTCAATGTCTACTTGTAAATACCGAACTGCAGTAAATGATAGTTTTGACTGCTGC 303
                        *****

MACS_peak_824          -----
MACS_peak_188          AAAATTGACTAGTTTACCTACGCCTTAGGTGGAGGGTAGGAGCTATCT 351
    
```

Figura 4-9. Ejemplo de diseño de cebadores para PCR semi-cuantitativa de picos que interceptaban entre las librerías de ZmZIM91_antiGFP y las de ZmZIM91_anti91. En amarillo se puede ver las secuencias usadas como cebadores de este pico.

Los datos obtenidos con la PCR semi-cuantitativa del ChIP de ZmZIM91 a partir de protoplastos de maíz (Anexo I, Figura SI17), permitieron descartar algunos picos, ya que o bien no amplificaban en el ChIP o amplificaban tanto en el control negativo (GFP_antiGFP, GFP_anti91) como en las muestras de protoplastos que sobreexpresaban 35S::ZmZIM91:GFP (ZmZIM91_antiGFP, ZmZIM91_anti91).

Posteriormente, con el fin de verificar los resultados obtenidos por PCR semi-cuantitativa de ChIP de protoplastos de maíz, se eligieron tres picos candidatos que se consideraban de gran interés debido a que en las zonas que flanqueaban estos picos se encontraban genes relacionados con estrés. Los picos seleccionados fueron el 8, el 14 y el 21, de los que se llevó a cabo la validación por PCR cuantitativa de ChIP de ZmZIM91 de protoplastos de maíz.

En la Figura 4-10, se muestra la lista de los genes que flanquean las regiones donde se encuentran los picos seleccionados para la validación por PCR cuantitativa de ChIP, además de su función putativa, el respectivo homólogo en *Arabidopsis* y la expresión en la hoja de maíz obtenida del trabajo de Lie *et al*, 2010.

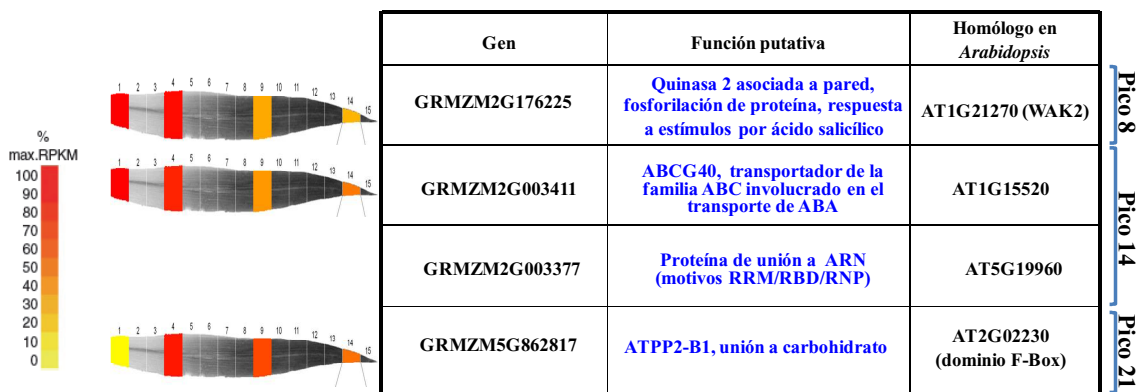


Figura 4-10. Genes seleccionados para la validación por PCR cuantitativa de ChIP de ZmZIM91a partir de protoplastos de maíz. Los genes seleccionados para la validación se flanquean las regiones de los picos encontrados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. A la izquierda se enseña los patrones de expresión de cada gen obtenidos del estudio de Lie *et al.*, 2010 y a la derecha en la tabla se puede ver el nombre del gen, la función putativa sacada de los homólogos en *Arabidopsis*, los cuales están identificados en la última columna.

A continuación, se llevó a cabo la identificación de los picos 8, 14 y 21 en el genoma de maíz usando el *software* IGV 2.1 (Figuras 4-11, 4-12, 4-13 y 4-14). En las imágenes se puede observar que hay lecturas en los ChIP con el anti91 como y con el antiGFP de protoplastos de maíz que sobre-expresaban 35S::ZmZIM91:GFP, mientras que en los controles negativos que eran los ChIP de protoplastos de maíz que sobre-expresaban 35S::GFP, no se obtuvieron lecturas con ninguno de los dos anticuerpos usados (anti91 y antiGFP).

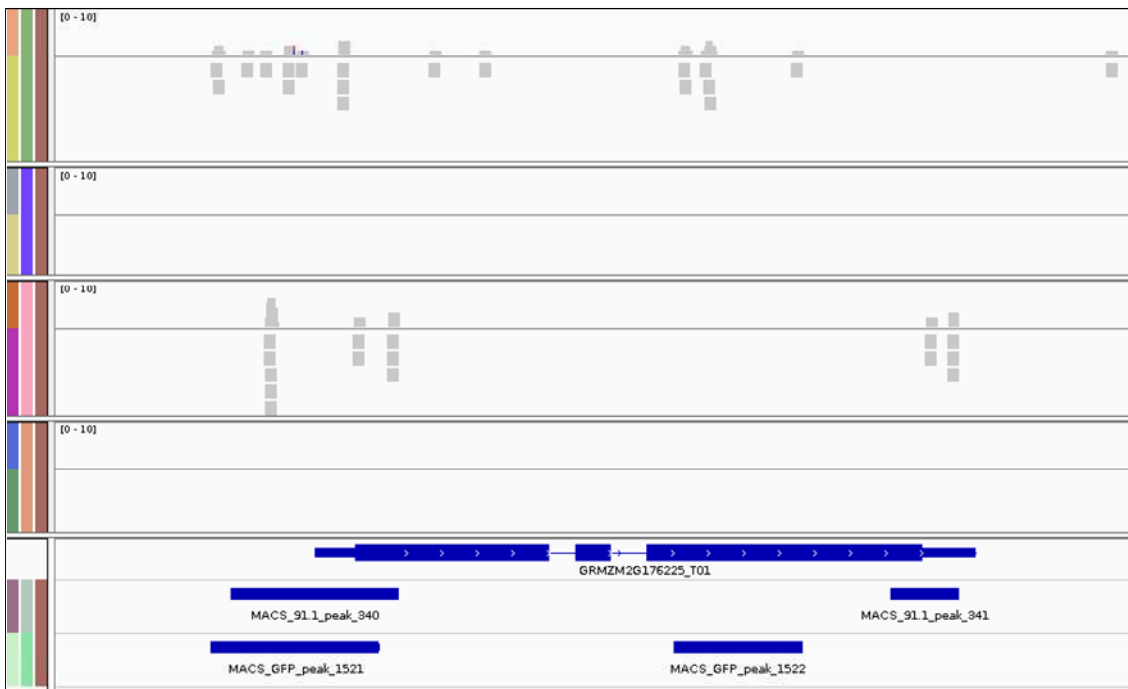


Figura 4-11. Pico 8 detectado en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. Los picos fueron mapeados en el genoma del maíz usando el *software* IGV 2.1. El gen *GRMZM2G176225_T01* se encuentra próximo al pico 8. El orden de cada reglón es el siguiente: En el primero, ZmZIM91_antiGFP; en el segundo, el control negativo GFP_antiGFP; en el tercero, ZmZIM91_anti91 y en el cuarto, el control negativo GFP_anti91. En la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM2G176225_T01* y los identificadores de los picos en MACS para ZmZIM91_antiGFP y ZmZIM91_anti91.

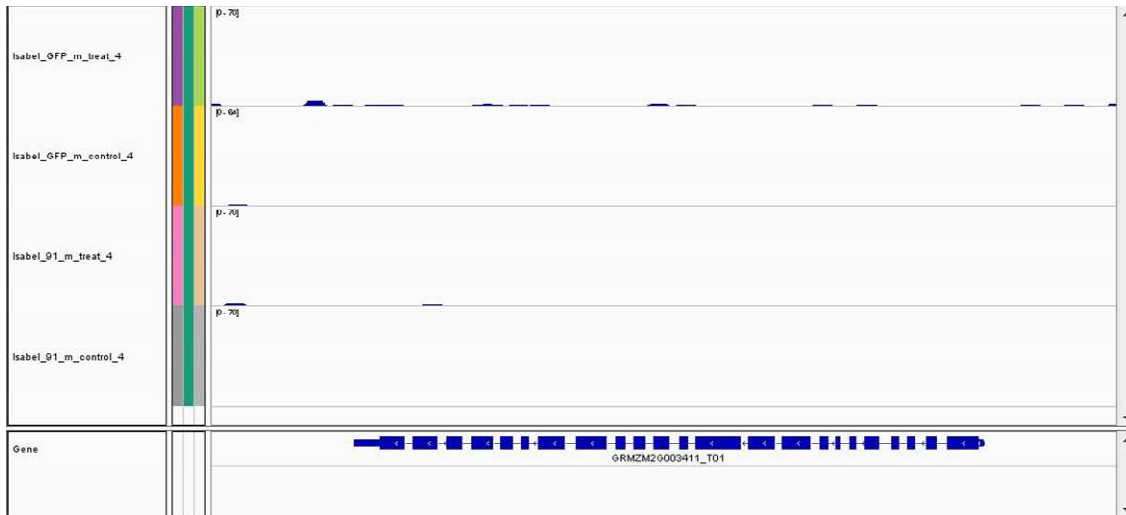


Figura 4-12. Pico 14 detectado en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. Los picos fueron mapeados en el genoma del maíz usando el *software* IGV 2.1. El gen *GRMZM2G003411_T01* se encuentra próximo al pico 14. El orden de cada reglón es el siguiente: En el primero, ZmZIM91_antiGFP; en el segundo, el control negativo GFP_antiGFP; en el tercero, ZmZIM91_anti91 y en el cuarto, el control negativo GFP_anti91. En la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM2G003411_T01* y los identificadores de los picos en MACS para ZmZIM91_antiGFP y ZmZIM91_anti91.

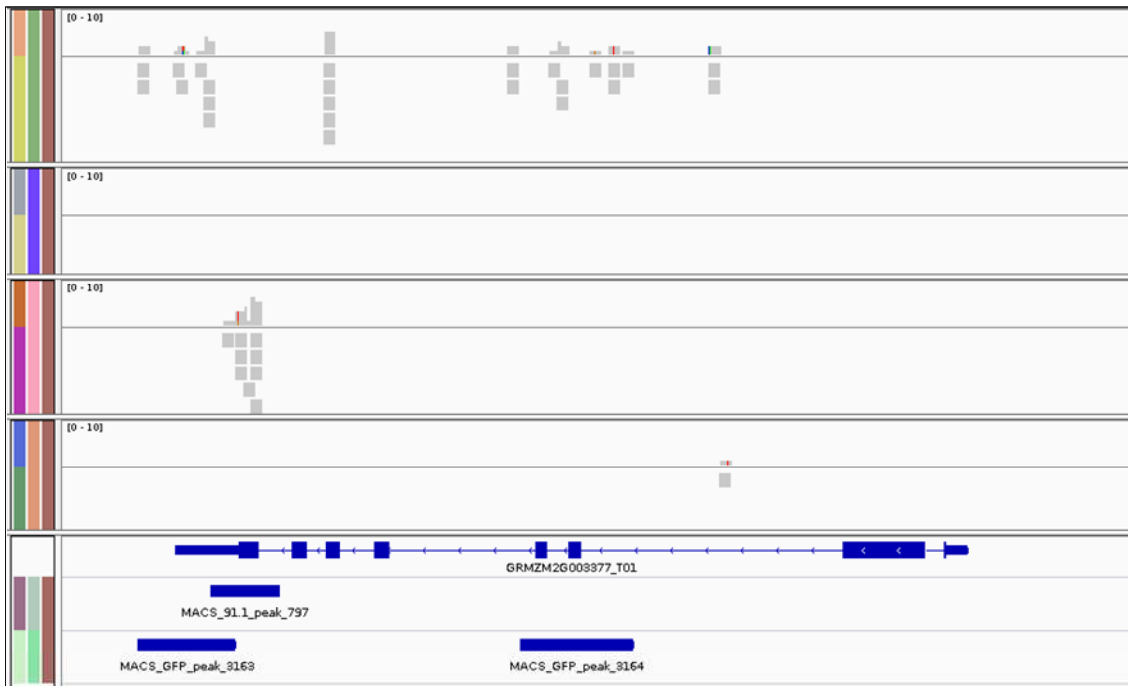


Figura 4-13. Pico 14 detectado en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. Los picos fueron mapeados en el genoma del maíz usando el software IGV 2.1. El gen *GRMZM2G003377_T01* se encuentra próximo al pico 14. El orden de cada reglón es el siguiente: En el primero, ZmZIM91_antiGFP; en el segundo, el control negativo GFP_antiGFP; en el tercero, ZmZIM91_anti91 y en el cuarto, el control negativo GFP_anti91. En la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM2G003377_T01* y los identificadores de los picos en MACS para ZmZIM91_antiGFP y ZmZIM91_anti91.

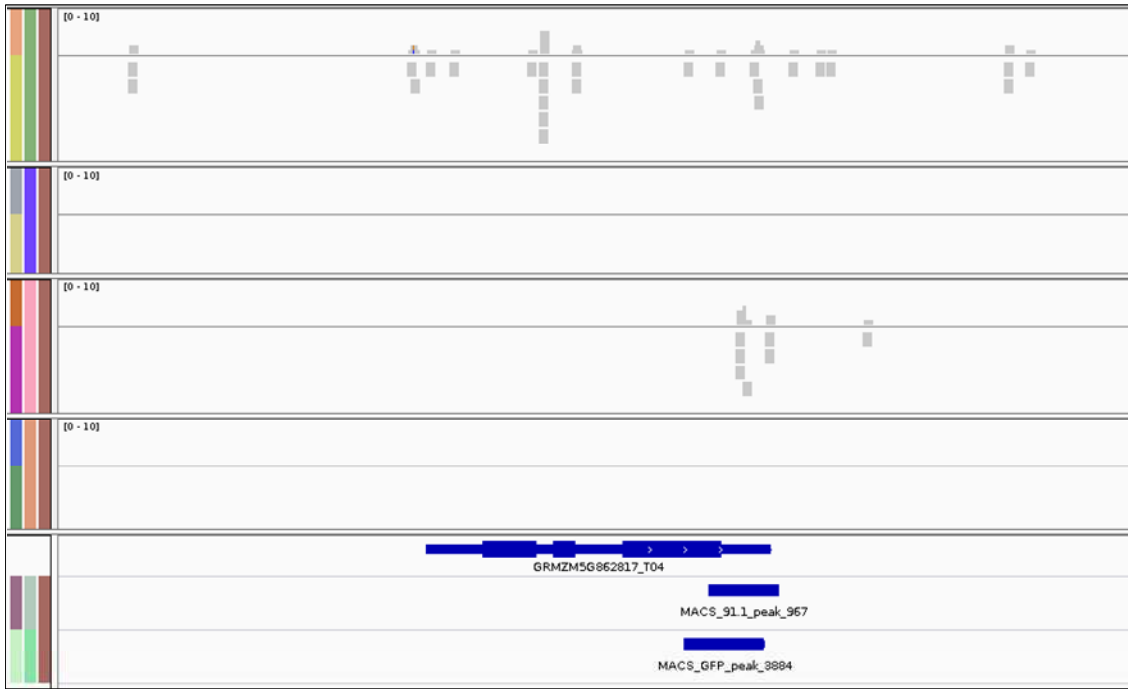


Figura 4-14. Pico 21 detectado en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. Los picos fueron mapeados en el genoma del maíz usando el software IGV 2.1. El gen *GRMZM5G862817_T04* se encuentra próxima al pico 14. El orden de cada reglón es el siguiente: En el primero, ZmZIM91_antiGFP; en el segundo, el control negativo GFP_antiGFP; en el tercero, ZmZIM91_anti91 y en el cuarto, el control negativo GFP_anti91. En la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM5G862817_T04* y los identificadores de los picos en MACS para ZmZIM91_antiGFP y ZmZIM91_anti91.

La PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) para los tres picos, fue hecha utilizando tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas, sobre las muestras de ChIP de protoplastos de maíz: GFP_antiGFP, ZmZIM91_antiGFP, GFP_anti91 y ZmZIM91_anti91 usando *SYBR Green chemistry*. El vector vacío fue usado como control negativo con el fin de asegurarse de que el respectivo pico no correspondía a un artefacto. También se utilizó un control negativo interno de la PCR cuantitativa de ChIP llamado copia, que es un elemento retrotransponible usado como control en este tipo de aproximaciones. Los resultados obtenidos de la PCR cuantitativa de ChIP utilizando cebadores específicos (ver materiales y métodos), permitieron confirmar como positivos los picos 8, 14 y 21 (Figuras 4-15, 4-16 y 4-17) confirmando a su vez los resultados obtenidos con la PCR semi-cuantitativa de ChIP.

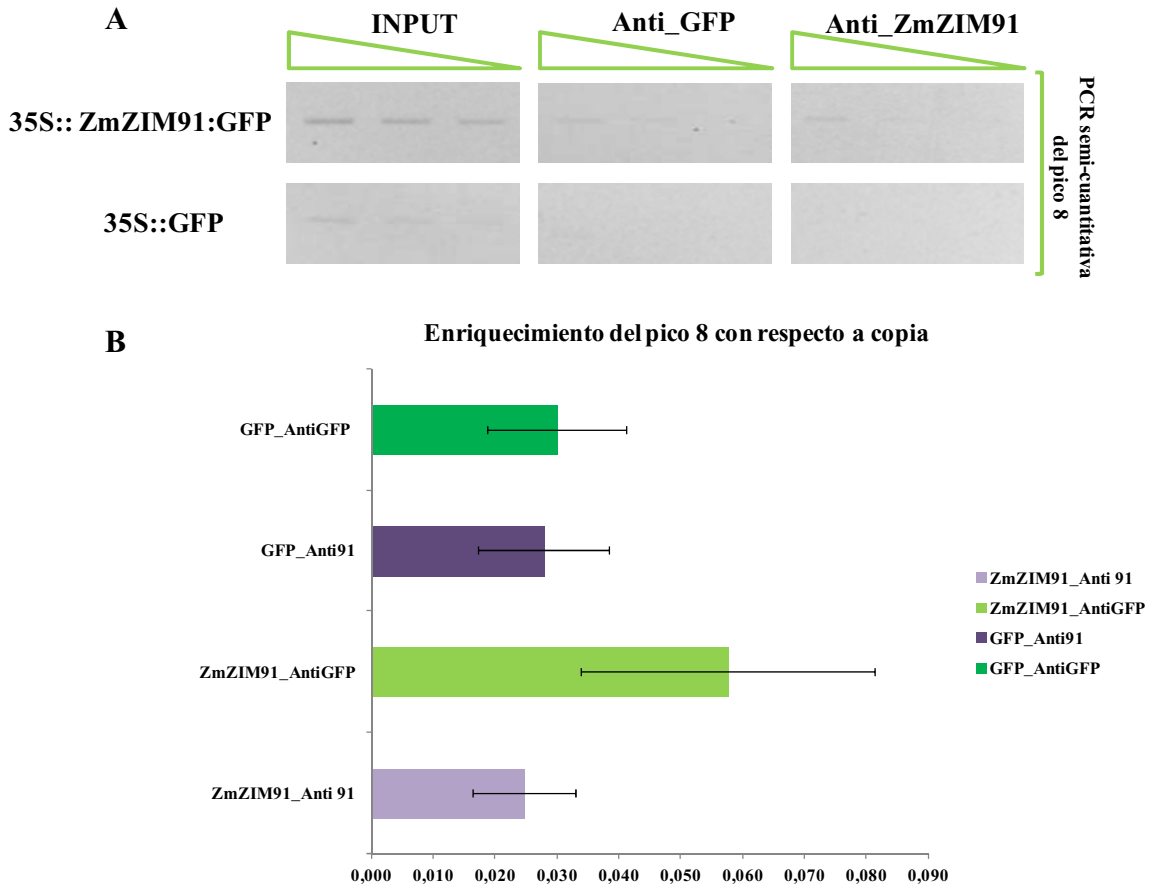


Figura 4-15. Validación del pico 8 utilizando PCR semi-cuantitativa y PCR cuantitativa de muestras de ChIP de protoplastos de maíz. En (A) se muestran los resultados de la PCR semi-cuantitativa de ChIP de protoplastos de 35S::ZmZIM91:GFP y de 35S::GFP, realizada de tres diluciones seriadas del material inmunoprecipitado. La PCR semi-cuantitativa se realizó utilizando cebadores diseñados específicamente para amplificar la secuencia correspondiente al pico 8. Se observa que los protoplastos que sobre-expresaban la GFP, no presentan enriquecimiento del pico 8 en las muestras inmunoprecipitadas con el anti91 y el antiGFP. En (B) se presenta la PCR cuantitativa de ChIP de protoplastos de 35S::ZmZIM91:GFP y de 35S::GFP. Los datos fueron procesados estadísticamente utilizando como control de la PCR cuantitativa el gen de referencia llamado copia. En verde oscuro se presenta la PCR cuantitativa de ChIP del control negativo GFP_antiGFP y en verde claro la de ZmZIM91_antiGFP, en este caso se observa enriquecimiento del pico 8 con respecto al control. En lila oscuro se presenta la PCR cuantitativa de ChIP del control negativo GFP_anti91 y en lila claro la de ZmZIM91_anti91, en este caso el control está más enriquecido que la muestra, sin embargo hay que tener en cuenta que así los protoplastos sobre-expresen la GFP, al usar el anticuerpo contra la proteína ZmZIM91 podría estar inmunoprecipitando la proteína ZmZIM91 endógena de los protoplastos.

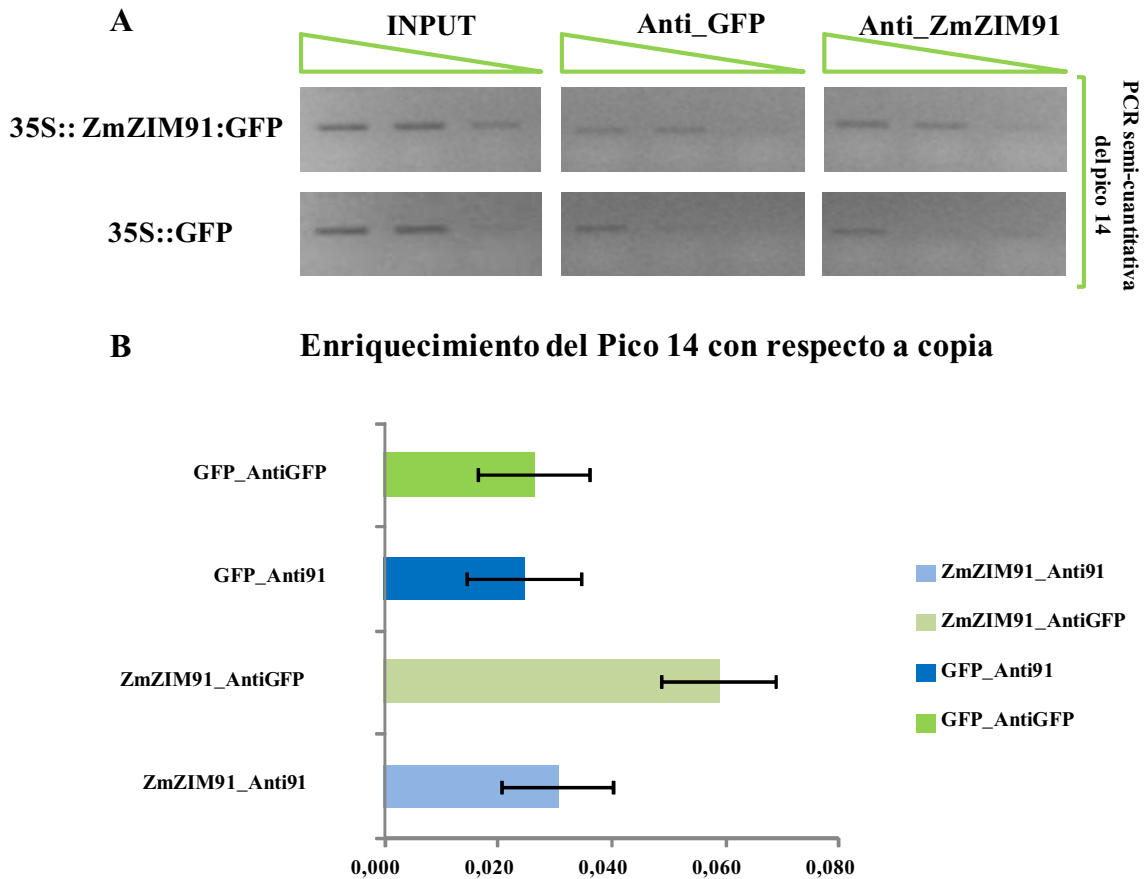


Figura 4-16. Validación del pico 14 utilizando PCR semi-cuantitativa y PCR cuantitativa de muestras de ChIP de protoplastos de maíz. En (A) se muestran los resultados de la PCR semi-cuantitativa de ChIP de protoplastos de 35S::ZmZIM91:GFP y de 35S::GFP, realizada de tres diluciones seriadas del material inmunoprecipitado. La PCR semicuantitativa se realizó utilizando cebadores diseñados específicamente para amplificar la secuencia correspondiente al pico 14. Se observa que los protoplastos que sobreexpresaban la GFP sola presentan menor enriquecimiento en las muestras inmunoprecipitadas con el anti91 y el antiGFP. En (B) se presenta la PCR cuantitativa de ChIP de protoplastos de 35S::ZmZIM91:GFP y de 35S::GFP. Los datos fueron procesados estadísticamente utilizando como control de la PCR cuantitativa el gen de referencia llamado copia. En verde oscuro se presenta la PCR cuantitativa de ChIP del control negativo GFP_antiGFP y en verde claro la de ZmZIM91_antiGFP. En azul oscuro se presenta la PCR cuantitativa de ChIP del control negativo GFP_anti91 y en azul claro la de ZmZIM91_anti91. En ambos casos se puede ver que hay enriquecimiento del pico 14 en el ChIP de protoplastos que sobre-expresaban la proteína ZmZIM91_GFP con respecto al control de ChIP de protoplastos que sobre-expresaban el vector de GFP.

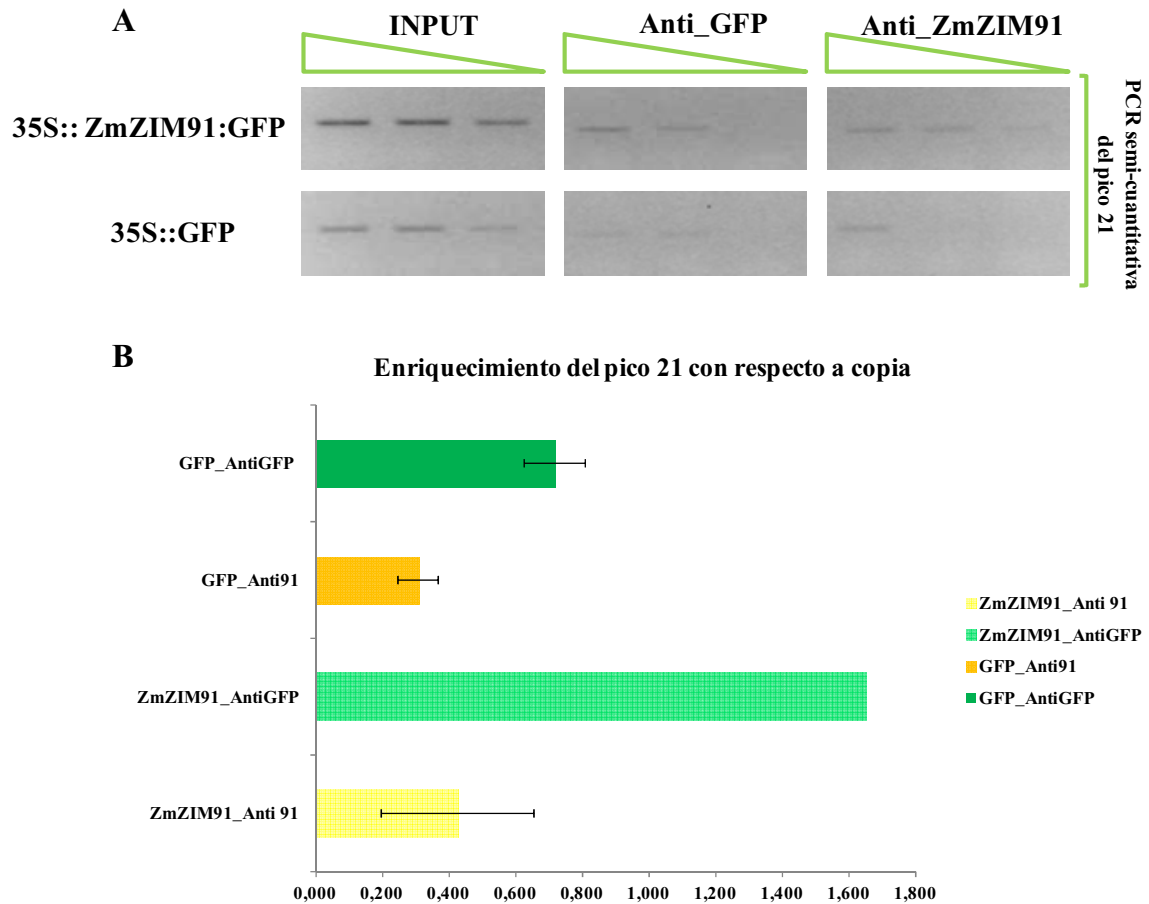


Figura 4-17. Validación del pico 21 utilizando PCR semi-cuantitativa y PCR cuantitativa de muestras de ChIP de protoplastos de maíz. En (A) se muestran los resultados de la PCR semi-cuantitativa de ChIP de protoplastos de 35S::ZmZIM91:GFP y de 35S::GFP, realizada de tres diluciones seriadas del material inmunoprecipitado. La PCR semicuantitativa se realizó utilizando cebadores diseñados específicamente para amplificar la secuencia correspondiente al pico 21. Se observa que los protoplastos que sobreexpresaban la GFP sola presentan menor enriquecimiento en las muestras inmunoprecipitadas con el anti91 y el antiGFP. En (B) se presenta la PCR cuantitativa de ChIP de protoplastos de 35S::ZmZIM91:GFP y de 35S::GFP. Los datos fueron procesados estadísticamente utilizando como control de la PCR cuantitativa el gen de referencia llamado copia. En verde oscuro se presenta la PCR cuantitativa de ChIP del control negativo GFP_antiGFP y en verde claro la de ZmZIM91_antiGFP. En naranja se presenta la PCR cuantitativa de ChIP del control negativo GFP_anti91 y en amarillo la de ZmZIM91_anti91. En ambos casos se puede ver que hay enriquecimiento del pico 21 en el ChIP de protoplastos que sobre-expresaban la proteína ZmZIM91_GFP con respecto al control de ChIP de protoplastos que sobre-expresaban el vector de GFP.

Posteriormente, para estos picos se realizó la búsqueda *in silico* de los motivos GATC y GATA de unión a ADN identificadas *in vitro* para ZmZIM91 mediante el experimento de PBM11.

En los picos 14 y 21, se identificaron cajas GATA y GATC en las secuencias obtenidas con el antiGFP y el anti91, sin embargo en su mayoría eran motivos GATC (Figura 4-18). En el caso del pico 8, no se encontraron motivos de unión a ADN GATA y GATC.

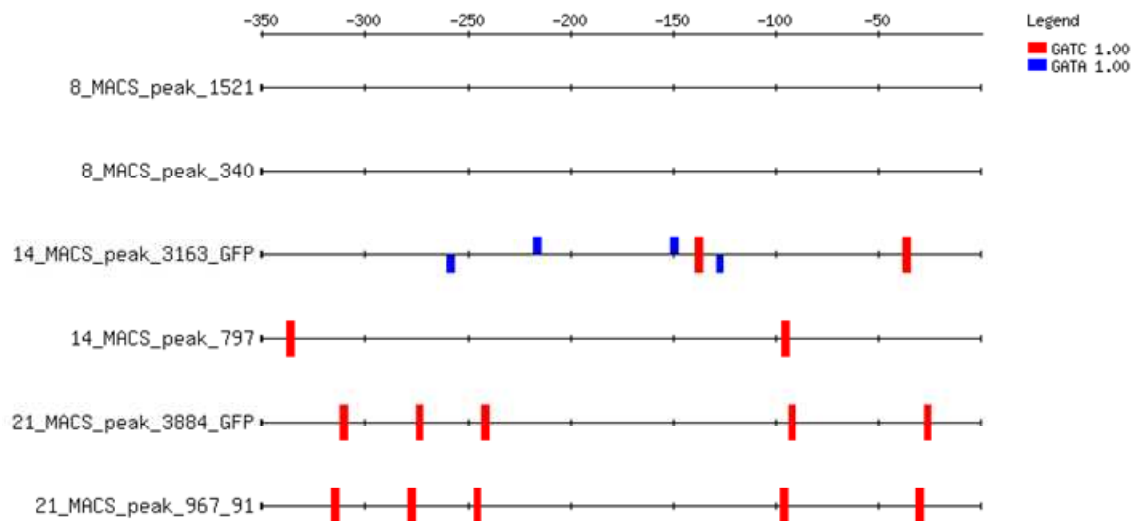


Figura 4-18. Localización en los picos 8, 14 y 21, de los motivos de unión a ADN GATA y GATC identificados *in vitro* para el factor de transcripción ZmZIM91. En la imagen se muestra la localización de los sitios de unión a ADN de ZmZIM91. En los picos 14 y 21 fueron identificados tanto en la secuencia obtenida con el antiGFP como en la secuencia obtenida con el el anti91, los motivos de unión a ADN de ZmZIM91, GATA y GATC. En el pico 8 no fueron detectadas cajas GATA y GATC. En azul se presentan la caja GATA y en rojo se muestran las cajas GATC.

4.1.1.8 Construcción de nuevas librerías de ChIP de ZmZIM91 a partir de protoplastos de maíz

Con el fin de obtener réplicas biológicas del primer ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos, se generaron dos réplicas biológicas más, modificando la elaboración de las librerías reduciendo la cantidad de adaptadores presentes en la muestra para mejorar la eficiencia de la secuenciación (ver materiales y métodos). La calidad de estas librerías fue analizada mediante *bioanalyzer* (Figura 4-19), donde se pudo observar que no tenían picos de contaminación por adaptadores y que además presentaban una mayor concentración. En el momento de escritura de esta tesis doctoral, las muestras fueron enviadas a secuenciar y por lo tanto no se tienen datos a cerca de los nuevos resultados obtenidos que permitan sacar conclusiones acerca del mejoramiento de la técnica.

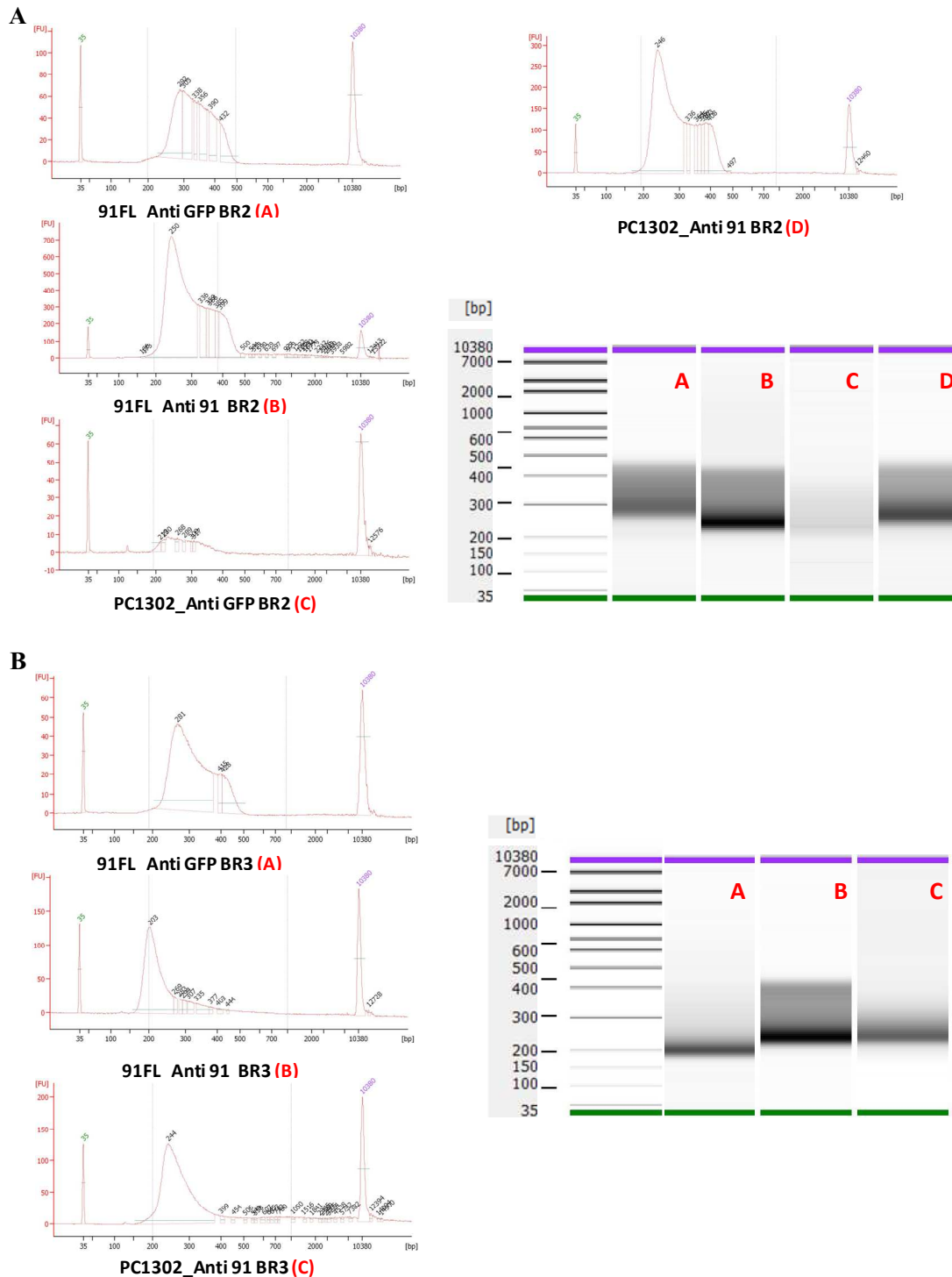


Figura 4-19. Librerías de ChIP de ZmZIM91 a partir de protoplastos de maíz. Cada imagen corresponde al resultado del *bioanalyzer* de cada muestra la librería de ChIP de protoplastos maíz tanto de ZmZIM91 como de la GFP (Vector pCambia 1302: PC1302). En (A) se muestra la réplica biológica 2. Las muestras se identifican de la siguiente manera: A, ZmZIM91_antiGFP; B, ZmZIM91_anti91; C, PC1302_antiGFP y D, PC1302_anti91. En (B) se muestra la réplica biológica 3. Las muestras se identifican de la siguiente manera: A, ZmZIM91_antiGFP; B, ZmZIM91_anti91; C, PC1302_anti91.

4.1.2 Identificación de genes diana de ZmZIM91 en el genoma de maíz usando ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de hojas de plantas de maíz de 9 días

En esta parte del trabajo, se exponen los resultados obtenidos del ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de hojas de plantas de maíz de 9 días, usando el anticuerpo contra la proteína endógena de ZmZIM91 (ver materiales y métodos) que de acuerdo con el ChIP de ZmZIM91 a partir de protoplastos de maíz, era el anticuerpo endógeno que mejor funcionaba. En este caso se utilizó como control el Input y las librerías fueron realizadas de acuerdo con el protocolo expuesto en los materiales y métodos.

4.1.2.1 Preparación y control de calidad de librerías de ChIP de ZmZIM91 a partir de hojas de plantas maíz

Para identificar las regiones genómicas a las que se une *in vivo* ZmZIM91, se realizaron experimentos de ChIP-seq con la tecnología *Illumina-Solexa*, que combina la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) con secuenciación masiva paralela, con el objetivo de identificar los sitios de unión a ADN de dicho factor de transcripción.

Inicialmente se prepararon cuatro librerías de ChIP de hoja de maíz de las muestras inmunoprecipitadas con el anticuerpo endógeno de ZmZIM91 y las muestras del Input. La calidad de las librerías fue medida mediante *Bioanalyzer*. En el caso de las cuatro librerías realizadas con los ChIPs de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz, fue detectado un pico de 123 pares de bases, que correspondía a contaminación por adaptadores, lo que se ha visto que impide una buena secuenciación de las librerías. Este es un problema común en las librerías generadas con el sistema *Solexa-Illumina* y en la mayoría de los casos esta contaminación no puede ser eliminada mediante la electroforesis en gel, dado a que corresponde a adaptadores que se autoligaron y posteriormente amplificaron durante la PCR, cuya concentración es elevada y que debido a la conformación estructural que poseen presentan una migración normal y no son eliminados mediante la purificación por gel. En este trabajo se puso a punto un paso intermedio en la generación de librerías elimina esta contaminación de fragmentos cortos utilizando la tecnología *AMPure XP Beads*.

Antes de llevar a cabo la secuenciación de las muestras fue necesario determinar la concentración exacta de cada librería con *Qubit*, con el fin de evitar que las líneas de secuenciación se colapsaran y no se pudiera obtener unos óptimos resultados.

Luego, se procedió a la secuenciación con el sistema de *Illumina* (*Facility, Ohio State University en Columbus, Ohio, USA*) de tres librerías de ZmZIM91 y el Input (Figura 4-20: A, B, D y E) para ello las muestras fueron mezcladas y divididas en dos líneas de secuenciación (con cuatro muestras cada una) de acuerdo a los diferentes códigos de barras y la concentración de cada muestra. Los protocolos detallados para el funcionamiento de la estación de clúster y secuenciación usando *Genome Analyzer II* están disponibles en la web de *Illumina* (<http://www.illumina.com/>).

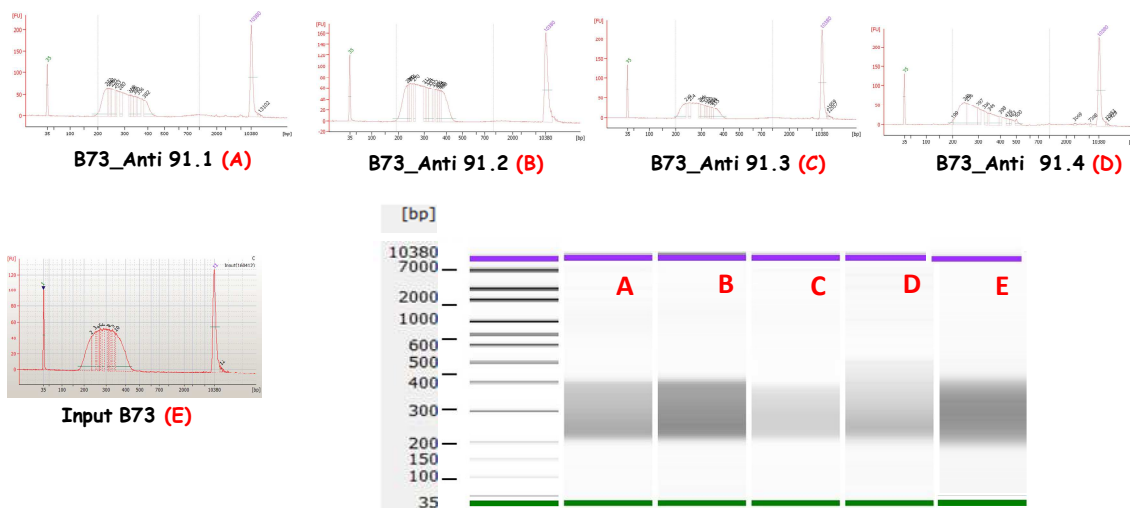


Figura 4-20. Librerías de ChIP de ZmZIM91 a partir de hoja de maíz. Cada imagen corresponde al resultado del *Bioanalyzer* de cada muestra la librería de ChIP de hoja de maíz de ZmZIM91 independiente. En (A) se muestra la réplica biológica 1, llamada B73_anti91.1; en (B) se muestra la réplica biológica 2, llamada B73_anti91.2; en (C) se muestra la réplica biológica 3, llamada B73_anti91.3; en (D) se muestra la réplica biológica 4, llamada B73_anti91.4; y finalmente en (E) se muestra la librería elaborada con el Input. En todos los casos, se puede observar que no hay picos de contaminación por adaptadores en 123 pares de bases.

4.1.2.2 Análisis de datos de ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de hojas de plantas de maíz de 9 días

Para el mapeo de las lecturas cortas en el genoma de maíz de la variedad B73 fue empleado el *software* BOWTIE (Langmead *et al.*, 2009) (Tabla 4-3).

El porcentaje de lecturas alineadas con el genoma de maíz, permiten concluir que la librería correspondiente a la muestra ZmZIM91.2 con un 42,16% es la que presenta mejor calidad, seguida por la ZmZIM91.1 con un 37,79% y finalmente por ZmZIM91.4 con un 21,64%.

Nombre de la librería	Total lecturas	Único alineado_BOWTIE	%	Múltiples alineadas BOWTIE	%	% lecturas alineadas BOWTIE	Total de lecturas alineadas BOWTIE
ZmZIM91.1	72.457.244	6.735.490	9,30%	20.648.167	28,50%	37,79%	27.383.657
ZmZIM91.2	53.387.067	7.789.658	14,59%	14.719.861	27,57%	42,16%	22.509.519
ZmZIM91.4	36.464.983	3.090.484	8,48%	4.802.202	13,17%	21,64%	7.892.686
Input	68.205.250	18.170.029	26,64%	48.688.410	71,39%	98,03%	66.858.439

Tabla 4-3. Resultados de los ChIP-Seq de tres réplicas biológicas de ZmZIM91 provenientes de hojas de plantas de maíz. Los datos generados de la secuenciación fueron analizados con el *software* BOWTIE. Para la librería de ZmZIM91.1 se obtuvieron un total de lecturas de 72.457.244, de las que 27.383.657 alinearon en el genoma de maíz, el equivalente a un 37,79%. Para la librería de ZmZIM91.2 se obtuvieron un total de lecturas de 53.387.067, de las que 22.509.519 alinearon en el genoma de maíz, el equivalente a un 42,16%. Para la librería de ZmZIM91.4 se obtuvieron un total de lecturas de 36.464.983, de las que 7.892.686 alinearon en el genoma de maíz, el equivalente a un 21,64%. Para el Input se obtuvieron un total de lecturas de 68.205.250, de las que 66.858.439 alinearon en el genoma de maíz, el equivalente a un 98,03%.

4.1.2.3 Identificación de genes diana *in vivo* de ZmZIM91

La búsqueda de picos o “*peak calling*” en las secuencias obtenidas de las diferentes librerías se realizó usando el *software Model-based analysis of ChIP-Seq* MACS (Zhang *et al.*, 2008).

Los análisis de los resultados de las tres réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 provenientes de hojas de plantas de maíz, permitieron identificar entre los promotores más enriquecidos en las tres librerías secuenciadas, el promotor del gen de la enzima *Caffeic Acid Omethyltransferase* (COMT) y el del gen *DFR* (AI) (Tabla 4-4). COMT es un gen involucrado en la biosíntesis de lignina. Una de las alteraciones más marcadas a la estructura de la lignina viene de la baja expresión de la enzima *caffeic acid Omethyltransferase* (COMT). Un estudio realizado por Piquemal *et al.* (2002), permitió concluir que la baja expresión de la enzima COMT altera los perfiles de la lignina y el

ester *p*-Hidroxicinámico contenido en el maíz y que además es beneficiosa para la digestibilidad en el maíz. La asociación de COMT con mutantes *brown midrib* (*bm3*) fue identificada en maíz por Vignols *et al.* (1995). Estas mutaciones pueden alterar la composición de la lignina y la digestibilidad e incrementan la cantidad de etanol en un 30% usando procesos convencionales de fermentación de biomasa. Por otra parte, el gen de *ZmA1* pertenece a la ruta de la biosíntesis de antocianinas. En investigaciones previas se ha demostrado que el factor MYB C1 o PL1 (*ZmMYB1* o *ZmMYB2*) (Sainz *et al.*, 1997), activa la expresión del gen de *ZmA1* a través de interacción con las proteínas bHLH R o B (Goff *et al.*, 1992).

De igual forma, se llevo a cabo una búsqueda en los picos de otros promotores enriquecidos en los ChIP-Seq de *ZmZIM91* y se encontró que los promotores de MYB42 y R estaban enriquecidos en las tres réplicas biológicas, mientras que el promotor de C1 estaba enriquecido en dos de las réplicas y finalmente se encontró que los promotores de P1, de *ZmNAC115*, de una proteína de unión a ARN y de CESAA6 estaban enriquecidos en una de las réplicas biológicas (Tabla 4-4). Las proteínas CESA forman una familia génica amplia cuyo número varía entre especies, en maíz se han identificado doce genes que codifican para la celulosa sintasa, estando implicadas en la síntesis de celulosa y por tanto en la formación de pared celular.

Por otra parte y de acuerdo a los datos arrojados por el *software* MACS, se llevó a cabo la búsqueda en el genoma de maíz de otros picos que también estaban muy enriquecidos en las tres réplicas biológicas de *ZmZIM91* utilizando el *software* IGV 2.1. Los resultados se muestran en el Anexo II Figura SIII1 a SIII16, donde además se indica el gen o los genes que se localizan en las zonas que flanquean los picos, su respectivo homólogo en *Arabidopsis* y el putativo proceso biológico en el que está involucrado.

Identificador del gen en maíz	Búsqueda con IGV	Replicas biológicas de ZmZIM91	Nombre del gen diana
GRMZM2G113137	GRMZM2G113137_T01	1	CESAA6
GRMZM2G026930	GRMZM2G026930_T01	3	DFR (A1)
AC196475.3_FG004	AC196475.3_FG004	3	COMT
GRMZM2G419239	GRMZM2G419239_T01	3	MYB42
GRMZM2G084799	GRMZM2G084799	1	P1
GRMZM2G005066	GRMZM2G005066	2	C1
GRMZM5G822829	GRMZM5G822829	3	R
GRMZM2G069047	GRMZM2G069047	1	ZmNAC115
GRMZM2G069102	GRMZM2G069102_T01	1	Proteína que contiene un dominio de reconocimiento a ARN, putativo, expresado.

Tabla 4-4. Identificación de genes diana de ZmZIM91 mediante ChIP-Seq. Se muestran los genes diana identificados en las replicas biológicas del ChIP-Seq de ZmZIM91, algunos fueron encontrados en las tres réplicas biológicas, otros en una y uno solo en dos.

4.1.2.4 ZmZIM91 interactúa con el promotor del gen *ZmCOMT* *in vivo*

En primer lugar, se procedió a localizar el pico correspondiente al promotor del gen *ZmCOMT* en el genoma de maíz usando el *software* IGV 2.1 (Figura 4-21). En la imagen se puede observar un pico similar y muy enriquecido en las tres réplicas biológicas.

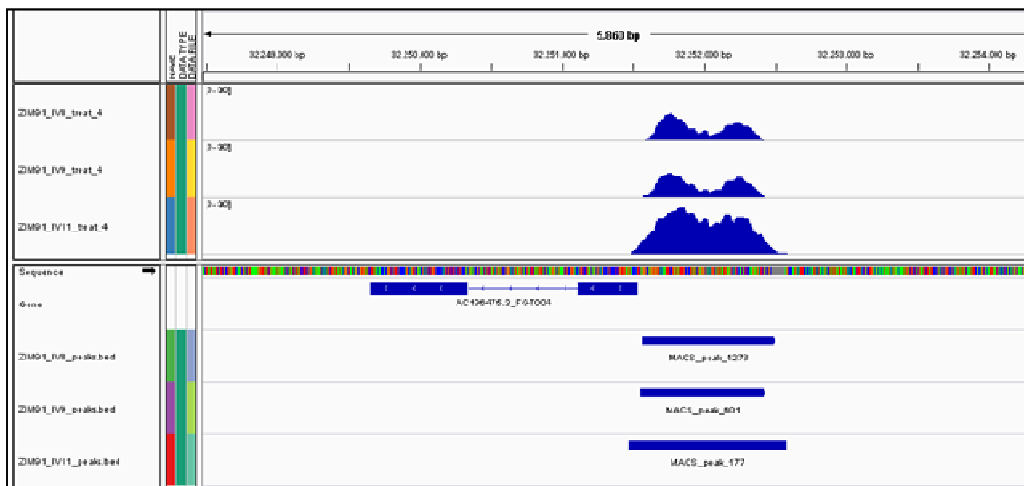


Figura 4-21. Pico detectado en las tres réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 que flanquea el promotor del gen *ZmCOMT*. Los picos fueron mapeados en el genoma del maíz usando el *software* IGV 2.1. En la parte superior se observan los picos de enriquecimiento sobre el promotor del gen de *ZmCOMT* y en la parte inferior se puede ver el diagrama del gen de *ZmCOMT* y los identificadores en MACS de los picos detectados en cada réplica biológica.

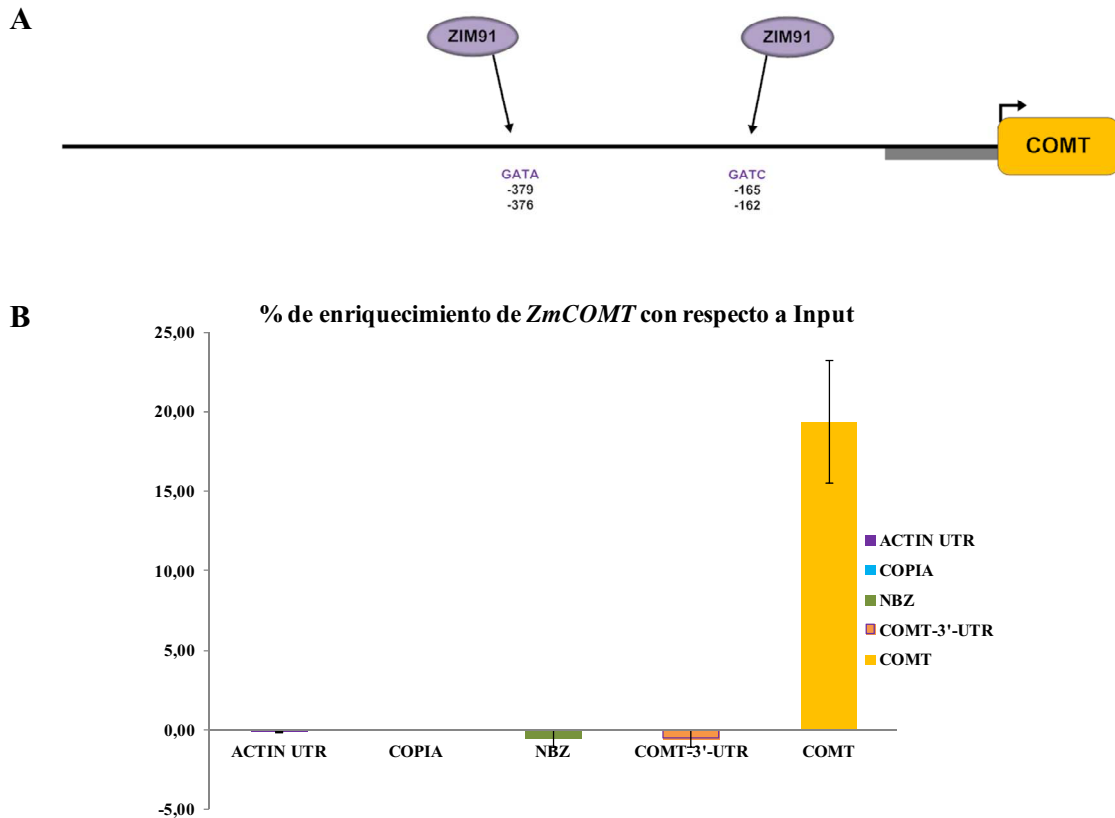


Figura 4-22. Validación por PCR cuantitativa en tiempo real del promotor de *ZmCOMT* en muestras de ChIP de *ZmZIM91* a partir de hojas de plantas de maíz. En (A) se muestra el esquema del promotor del gen *ZmCOMT*, las cajas en color lila representan los sitios GATA y GATC. En (B) se muestra la PCR cuantitativa del promotor de *ZmCOMT* de cuatro réplicas biológicas de muestras de ChIP de *ZmZIM91*, al igual que la de los controles negativos. La gráfica se calculó como porcentaje de enriquecimiento de *ZmCOMT* con respecto al Input.

4.1.2.5 *ZmZIM91* reprime al promotor del gen de maíz *ZmCOMT* *in vivo*

La validación por PCR cuantitativa de ChIP confirmó que *ZmZIM91* podía unirse al promotor del gen *ZmCOMT*, por consiguiente para determinar cuál era el papel regulador de *ZmZIM91* sobre *ZmCOMT*, fue llevado a cabo un ensayo de expresión transiente en protoplastos de maíz, donde el promotor de *ZmCOMT* (1 kb desde la región reguladora 5') estaba fusionado al gen reportero de la luciferasa y *ZmZIM91* estaba fusionado a la GFP. Como resultado se obtuvo que *ZmZIM91* es capaz de reducir la expresión del promotor de *ZmCOMT* aproximadamente en un 50% (Figura 4-23), lo que convierte a *ZmZIM91* en un represor de la expresión de *ZmCOMT*.

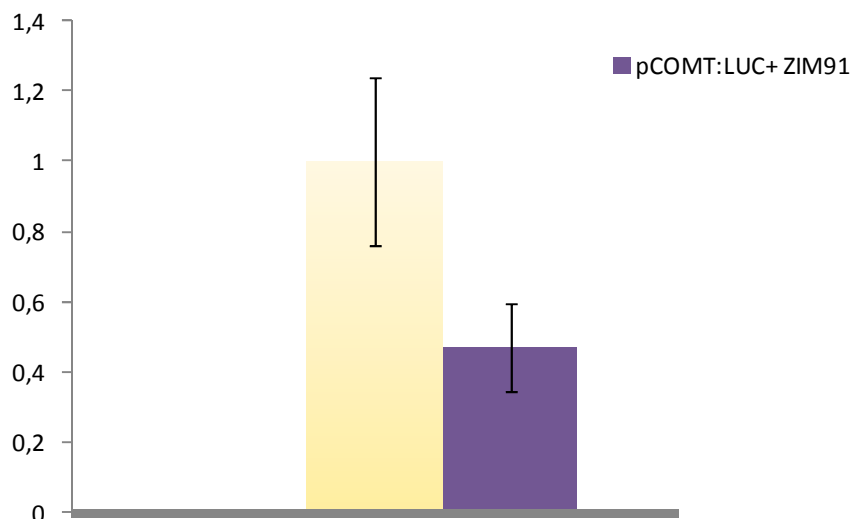


Figura 4-23. ZmZIM91 reprime el promotor del gen de *ZmCOMT*. Mediante un ensayo de luciferasa en protoplastos de maíz, se determinó que *ZmZIM91* era capaz de reprimir el promotor de *ZmCOMT* aproximadamente en un 50%.

4.1.2.6 *ZmZIM91* se une al promotor del gen *ZmA1* *in vivo*

Para realizar la validación del promotor del gen *ZmA1*, fueron llevados a cabo experimentos independientes de nano PCR cuantitativa de ChIP de *ZmZIM91* a partir de hojas de plantas de maíz (Fluidigm), en estos experimentos se usaron como control negativo actina UTR, copia, NBZ y *ZmCOMT*-3'UTR. Los datos fueron procesados siguiendo los parámetros descritos en los materiales y métodos.

Los resultados muestran que el promotor del gen *ZmA1* se encuentra enriquecido 5,5 veces en los ChIPs de *ZmZIM91*. En el promotor del gen *ZmA1* fueron identificadas cajas GATA y GATC, indicando que *in vivo* *ZmZIM91* podría unirse al promotor del gen *ZmA1* a través de los motivos de unión a ADN GATA y GATC (Figura 4-24).

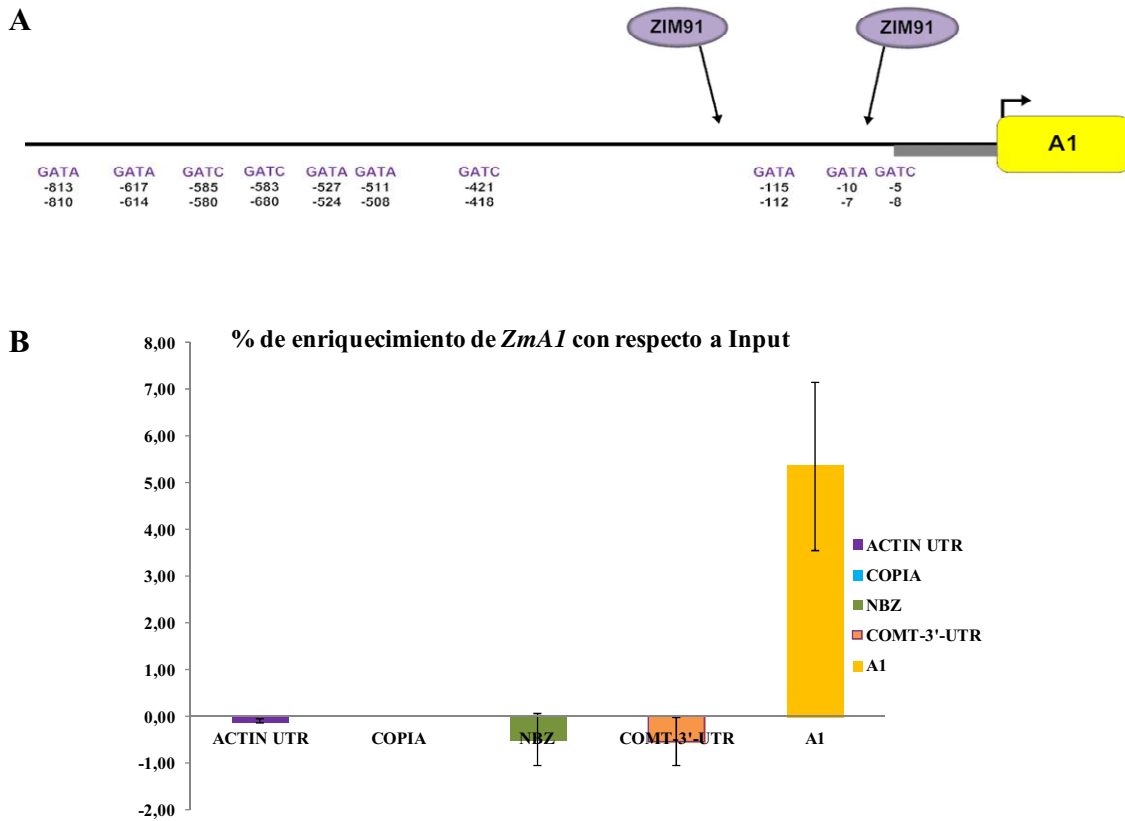


Figura 4-24. Validación por PCR cuantitativa en tiempo real del promotor de *ZmA1* en muestras de CHIP de *ZmZIM91* a partir de hojas de plantas de maíz. En (A) se muestra el esquema del promotor del gen *ZmA1*, las cajas en color lila representan los sitios GATA y GATC. En (B) se muestra la PCR cuantitativa del promotor de *ZmA1* de cuatro réplicas biológicas de muestras de CHIP de *ZmZIM91*, al igual que la de los controles negativos. La gráfica se calculó como porcentaje de enriquecimiento de *ZmA1* con respecto al Input.

4.1.2.7 *ZmZIM91* reprime al promotor del gen de maíz *ZmA1* *in vivo*

Con el fin de estudiar el papel de *ZmZIM91* sobre el promotor del gen *ZmA1*, se realizó un ensayo de luciferasa, utilizando expresión transiente en protoplastos de maíz. Teniendo en cuenta que el nivel basal del promotor de *ZmA1* es muy bajo, se usó para realizar el experimento el complejo activador C1+R que además permitiría estimar de una forma más clara la acción de *ZmZIM91* sobre el promotor de *ZmA1*. Lo que se observó fue que *ZmZIM91* podía generar una fuerte reducción de la activación que producía el complejo C1+R sobre el promotor de *ZmA1* (Figura 4-25), indicando esto que *ZmZIM91* puede actuar como un represor de la transcripción del gen *ZmA1*.

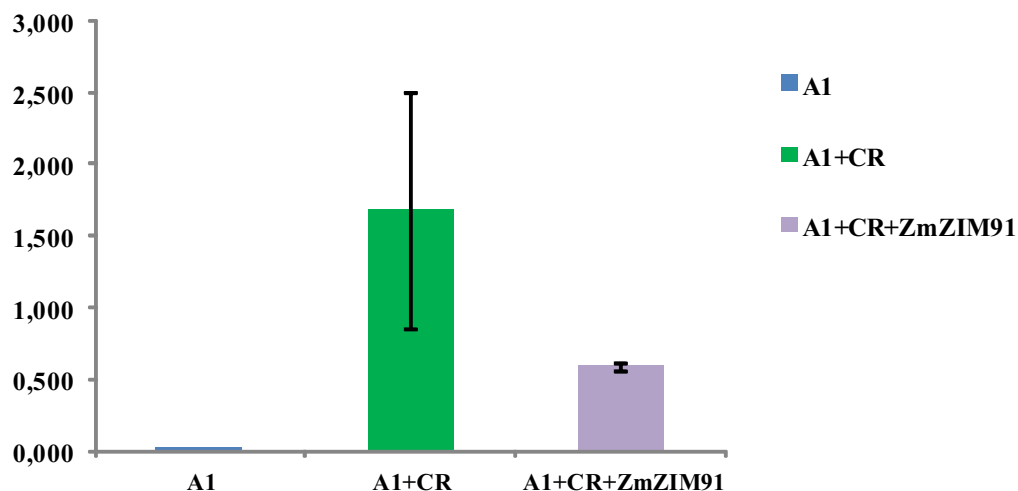


Figura 4-25. ZmZIM91 reprime el promotor del gen de *ZmA1*. Mediante un ensayo de luciferasa en protoplastos de maíz, se determinó que ZmZIM91 era capaz de reprimir el promotor del gen de *ZmA1*. Debido a que el nivel basal del promotor del gen de *ZmA1* es muy bajo (en color azul), se usó el complejo C+R para activarlo (en color verde) y se adicionó a ZmZIM91, el cual es capaz de reprimir el promotor de *ZmA1* interfiriendo en la activación del mismo por el complejo C+R (en color lila).

4.1.2.8 La interacción *in vivo* entre ZmZIM91 y los promotores de *ZmCOMT* y de *ZmA1* se reduce en presencia de MeJA

Con el fin de determinar si el tratamiento con MeJA influía en la interacción ADN-proteína de ZmZIM91, se llevaron a cabo experimentos de ChIP en hojas de maíz de 9 días tratadas con MeJA 0,01%, utilizando el anticuerpo que reconoce la proteína endógena de ZmZIM91. Al realizar una PCR cuantitativa en tiempo real con los cebadores de los promotores de *ZmCOMT* y *ZmA1*, se obtuvo que el porcentaje del enriquecimiento de ambos promotores en las muestras de ChIP tratadas con MeJA fue menor que el porcentaje de enriquecimiento de las muestras de ChIP control tratadas solo con DMSO (el DMSO fue usado para diluir el MeJA). Lo anterior se refleja en que el valor obtenido del cociente entre las muestras tratadas y sin tratar fue menor de 1 (Figura 4-26), lo que indica un menor porcentaje de enriquecimiento generado por el tratamiento. El procesamiento de los datos se hizo siguiendo el manual SABiosciences (*ChampionChIP™ PCR Array*).

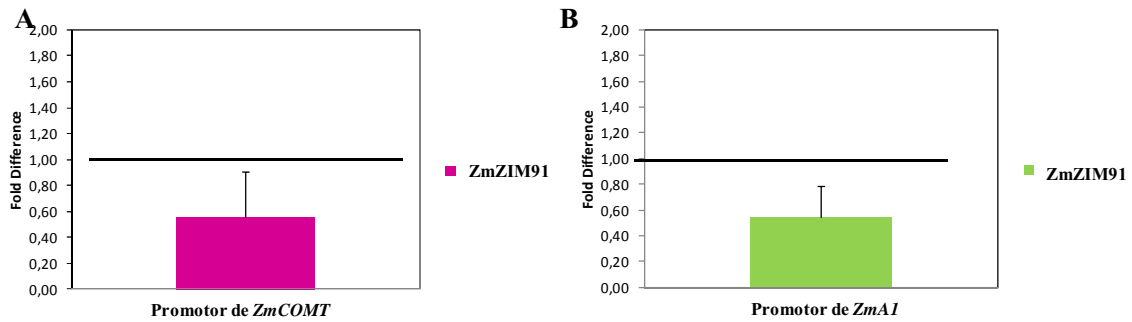


Figura 4-26. La interacción *in vivo* entre ZmZIM91 y los promotores de *ZmCOMT* y de *ZmA1* se reduce en presencia de MeJA. En ambos casos se observa el resultado de la PCR cuantitativa de CHIP de muestras tratadas con la hormona MeJA al 0,01% de dos réplicas biológicas de CHIP de hoja de maíz con el anticuerpo de ZmZIM91. En (A) se enseña la PCR cuantitativa de CHIP usando los cebadores del promotor de *ZmCOMT* y en (B) se enseña la PCR cuantitativa de CHIP usando cebadores del promotor de *ZmA1*.

4.1.3 Identificación de otras proteínas que interactúan con ZmZIM91

Debido a que resultados de ChIP-Seq de ZmZIM91 indicaban que este factor se unía al promotor del gen *ZmCOMT*, se procedió a realizar un análisis en la literatura tanto del gen como de los factores que se habían descrito como reguladores de su promotor, encontrando que los factores MYB-R2R3 del subgrupo cuatro regulaban este gen a nivel transcripcional, específicamente se conocía que el factor de transcripción ZmMYB31 que es capaz de unirse *in vivo* al promotor del gen *ZmCOMT* (Fornalé *et al.*, 2010), así como ZmMYB42 (Gray *et al.*, 2012; Sonbol *et al.*, 2009). Los MYB-R2R3 del subgrupo cuatro han sido descritos como represores de genes de la biosíntesis de lignina.

En investigaciones anteriores, ZmMYB31 y ZmMYB42 fueron sobre-expresados empleando la planta modelo *Arabidopsis thaliana* como sistema heterólogo y se encontró que eran capaces de reducir el contenido de lignina (Sonbol *et al.*, 2009; Fornalé *et al.*, 2010). También ha sido descrito que los genes implicados en la síntesis de los monolignoles incrementan sus niveles de expresión cuando la planta sufre herida mecánica y aplicación de MeJA. En particular se conoce que en respuesta a herida en *Arabidopsis AtCOMT* incrementa su expresión, pero esta inducción es dependiente de *AtCOI* (Reymond, 2000). Esto indica la existencia de una conexión entre la inducción de *ZmCOMT* por herida y la respuesta a la aplicación de MeJA. Adicionalmente, como

ya se ha mencionado *ZmZIM91* se degrada por la aplicación de MeJA y actúa como un represor de *ZmCOMT* al igual que los MYB-R2R3 del subgrupo cuatro.

Basándose en la información anterior y con el fin de conocer si existía una conexión biológica entre la regulación efectuada al promotor del gen *COMT* por *ZmZIM91* y los MYB-R2R3 *ZmMYB31* y *ZmMYB42*, se realizaron experimentos de interacción proteína-proteína usando la técnica de Complementación Bimolecular en protoplastos de maíz. Los resultados de estos experimentos permitieron concluir que *ZmZIM91* puede interactuar con *ZmMYB31* y *ZmMYB42* (Figura 4-27) y que dicha interacción en ambos casos es tanto en núcleo como en citoplasma.

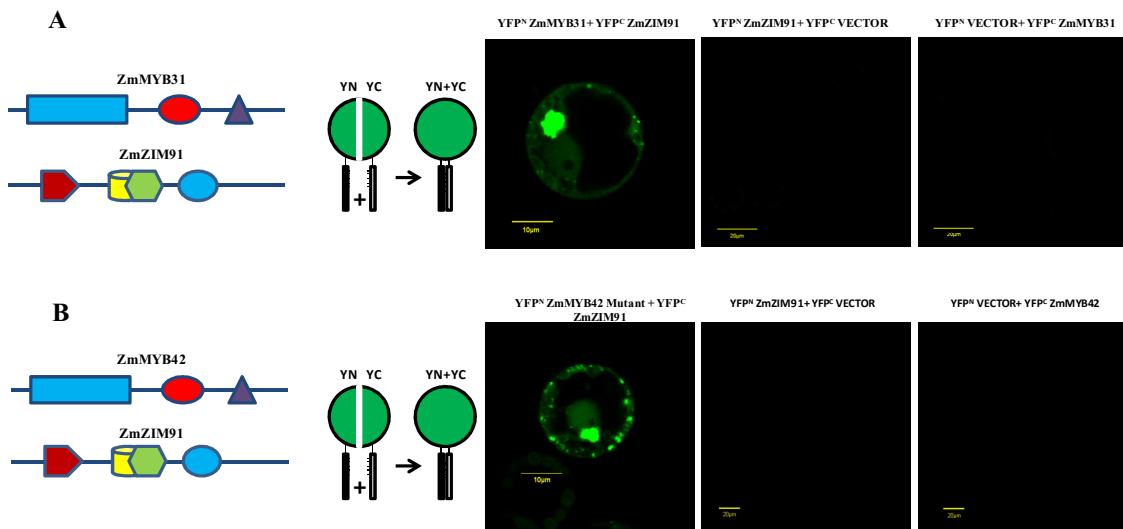


Figura 4-27. Interacción por Complementación Bimolecular entre *ZmZIM91* y *ZmMYB31*, y entre *ZmZIM91* y *ZmMYB42*. Protoplastos de maíz fueron transfectados con los vectores de Complementación Bimolecular. En (A) se enseña la interacción entre *ZmZIM91* y *ZmMYB31* y sus respectivos controles negativos. En (B) se muestra la interacción entre *ZmZIM91* y *ZmMYB42* y sus respectivos controles negativos. En ambos casos la interacción entre las dos proteínas tiene localización en núcleo y citoplasma. Para los paneles que muestran la interacción entre las proteínas Bar = 10μm. Para las imágenes de los controles Bar = 20μm.

Seguidamente, dado que se consideró que probablemente *ZmZIM91* y los MYB-R2R3 del subgrupo cuatro, formaban parte de un sistema conjunto de regulación del promotor de *ZmCOMT* y que la presencia de cajas AC y GATA/GATC en el promotor de *ZmCOMT* conformaban un módulo regulador en *cis*, por tanto, se procedió a analizar si

este putativo módulo estaba conservado evolutivamente, para lo cual se evaluó *in silico* la presencia de dichas cajas en el promotor de *COMT* en otras especies de gramíneas.

Para evaluar la conservación del putativo módulo regulador AC/(GATA/GATC) entre especies de gramíneas, se utilizó el *software matrix-scan*, que efectúa la identificación de regiones enriquecidas por elementos reguladores en *cis* usando el *software matrix-scan* (ver materiales y métodos) que detecta regiones cortas de ADN que muestran una significativa densidad de elementos reguladores en *cis* putativos. Buscando identificar regiones enriquecidas en elementos reguladores en *cis* (CRERs) (Turatsinze, 2008).

En la Figura 4-28, se identificaron zonas enriquecidas en elementos reguladores en *cis* en el promotor del gen *COMT* en las gramíneas, sin embargo es de destacar que en el *Sorgo bicolor* no se evidencia la conservación del módulo AC/(GATA/GATC).

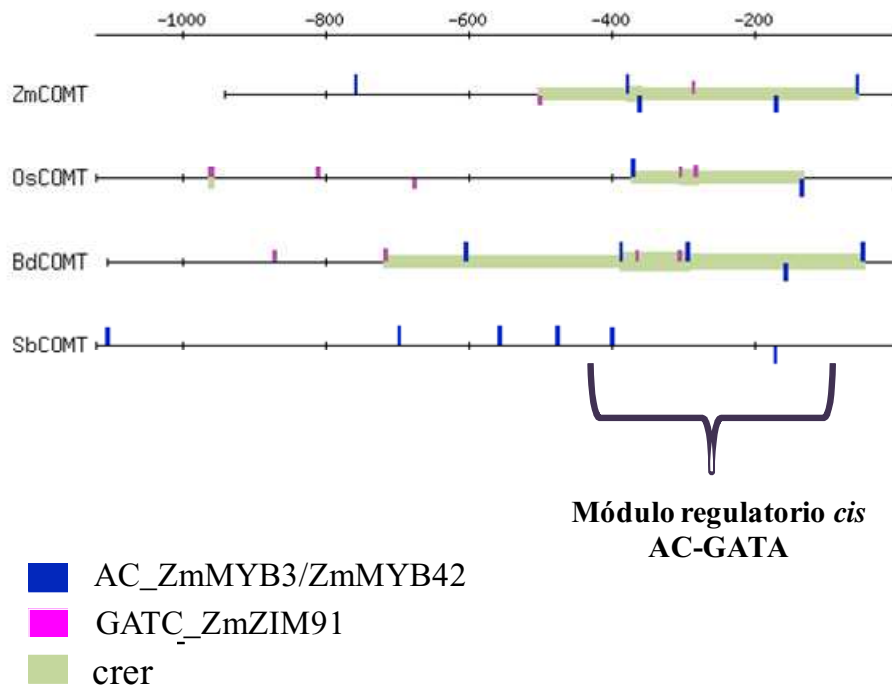


Figura 4-28. El módulo regulador putativo AC-GATA en el promotor del gen de *COMT* está conservado en las gramíneas. En azul se muestra la posición de las cajas AC y en lila se enseña la localización de las cajas GATC sobre el promotor del gen *COMT* en las gramíneas. Se observa que la conservación en *Sorgo bicolor* no se mantiene, ya que solo se localizan cajas AC.

4.2 Discusión de resultados

4.2.1 Identificación de genes diana de ZmZIM91 mediante la técnica de ChIP-Seq de protoplastos de maíz

Uno de los principales objetivos de la presente tesis doctoral era determinar si ZmZIM91 era un factor de transcripción. Posteriormente a establecer si ZmZIM91 era un factor de transcripción, se quería conocer las secuencias de ADN a la que se unía *in vivo* y cuáles eran sus genes diana para identificar en qué procesos biológicos estaba involucrado.

Los datos obtenidos anteriormente para ZmZIM91 permitían sugerir que estaba involucrado en la regulación de genes de respuesta a estrés, ya que como se describió en el capítulo I, fue identificado en un cribado de doble híbrido de una librería de hoja estresada por sequía utilizando la subunidad reguladora $\beta 1$ de la proteína quinasa CK2 de maíz, de la que se sabe que está implicada en diferentes procesos biológicos incluyendo estrés. Parte del proceso de determinación de la relevancia biológica del factor ZmZIM91 era la identificación de sus genes diana, para ello se utilizó la técnica de ChIP-Seq, que permite la identificación de las regiones de unión de factores de transcripción en el genoma (Buck y Lieb, 2004; Jiang y Pugh, 2009).

En primer lugar, se quería verificar si el anticuerpo que reconoce la proteína endógena de ZmZIM91, producido y purificado en este trabajo era efectivo para realizar inmunoprecipitaciones. Para ello, se llevó a cabo un experimento de ChIP-Seq usando protoplastos de maíz que sobre-expresaban la proteína ZmZIM91 fusionada a la GFP y protoplastos que sobre-expresaban el vector de la GFP, para ambos casos se realizaron inmunoprecipitaciones, por un lado con un anticuerpo comercial contra GFP y por otro con el anticuerpo contra ZmZIM91, con el fin de comparar los resultados de la secuenciación obtenidos con ambos anticuerpos y estimar la calidad del anticuerpo ZmZIM91. De acuerdo con los resultados obtenidos se pudo determinar que el anticuerpo ZmZIM91 tenía especificidad ya que se encontraron picos en común con el anticuerpo comercial de la GFP.

Debido a que la mayoría de los genes que fueron seleccionados de acuerdo a la posición de los picos en sus regiones 5' no estaban caracterizados en maíz, fue necesario realizar una búsqueda de sus homólogos en *Arabidopsis*. Interesantemente se encontró que estos genes fueron catalogados como de respuesta a patógenos, en un trabajo donde se realizó un análisis global de la expresión génica en *Arabidopsis* de genes de respuesta a patógenos y ciclo celular durante la infección por pequeños virus de ADN (*Geminivirus*) que usan la maquinaria de replicación de la planta para amplificar sus genomas (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2008). En esta investigación se llevó a cabo un análisis de microarray del transcriptoma de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a infección por *cabbage leaf curl virus* (CaLCuV), descubriendo 5,365 genes (con una tasa de falsos positivos de 0.005) diferencialmente expresados en hojas infectadas de roseta después de 12 días de post-inoculación. Lo que conlleva a pensar que ZmZIM91 podría estar modulando genes de respuesta a patógenos, esta hipótesis sería coherente si se tiene en cuenta que ZmZIM91 responde a MeJA, al igual que muchos genes implicados en defensa como por ejemplo MYC2 que induce respuestas mediadas por JA tales como defensa contra patógenos necrotrópicos (Lorenzo *et al.*, 2004; Boter *et al.*, 2004; Dombrecht *et al.*, 2007).

Después de llevar a cabo una pre-selección de candidatos usando PCR semi-cuantitativa de ChIP, se decidió realizar PCR cuantitativa de ChIP con los picos que contenían promotores de genes que podrían ser interesantes. Finalmente, se obtuvo una validación positiva de los picos 14 y 21, ya que la proporción obtenida entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del gen de referencia copia del ChIP de protoplastos que sobre-expresaban 35S::ZmZIM91:GFP fue mayor que la obtenida en la PCR cuantitativa del ChIP de protoplastos que sobre-expresaban 35S::GFP.

4.2.2 Identificación de genes diana de ZmZIM91 mediante la técnica de ChIP-Seq de hojas de maíz

Ya que los resultados obtenidos en el experimento de ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos permitieron determinar que el anticuerpo contra ZmZIM91 era funcional para inmunoprecipitar, se procedió a usarlo para realizar el experimento de ChIP-Seq de ZmZIM91 *in vivo* utilizando hojas de plantas de maíz de 9 días. En este estudio, los resultados iniciales del ChIP-Seq ZmZIM91 proveniente de hojas de plantas

de maíz sugieren cientos de genes diana para ZmZIM91 *in vivo* involucrados en distintos procesos.

Los resultados obtenidos de la secuenciación de las tres réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 provenientes de hojas de plantas de maíz, permitió identificar genes diana de ZmZIM91 que estaban involucrados en la ruta de la biosíntesis de los fenilpropanoides. Para la validación fueron seleccionados *ZmCOMT* y *ZmA1*, porque presentaban un mayor enriquecimiento en los resultados de la secuenciación masiva de acuerdo a los análisis realizados.

Los ácidos fenólicos, flavonoides y lignina juegan un papel crucial en la defensa en plantas y la tolerancia al estrés (Dixon y Paiva, 1995), por tanto al ZmZIM91 estar regulando tanto a *ZmCOMT* como *ZmA1*, probablemente indique que la relevancia biológica del factor de transcripción ZmZIM91 está en la respuesta a estrés biótico, más específicamente en defensa.

Debido a que se ha descrito anteriormente que ZmMYB31 el cual está involucrado en respuesta a herida, interactúa *in vivo* con los promotores de los genes *ZmCOMT* y *ZmA1* (Fornalé *et al.*, 2010), y además a que se conoce que condiciones de herida u otros estreses inducen la formación de lignina, se estudio la respuesta de ZmZIM91 en condiciones de herida (Figura 4-29), siendo este resultado interesante, dado que se vio que este factor se degrada a una hora por herida lo que le da soporte al hecho de que regule genes involucrados en la ruta de los fenilpropanoides.

La influencia de la composición de lignina en la digestibilidad de la pared celular ha sido estudiada en diferentes gramíneas (Smith y Flinn, 1985, 1991; Chesson *et al.*, 1986; Jung y Vogel, 1986; Buxton y Russell, 1988; Buxton y Martin, 1989; Jung, 1989; Grabber *et al.*, 1992). El mutante de maíz bm3, en el cual la actividad de COMT está reducida de un 70 a 90%, muestra niveles bajos de los constituyentes de la pared celular, fibra detergente ácida, lignina detergente ácida y también incremento de la digestibilidad (Grand *et al.*, 1985; Vignols *et al.*, 1995; Guillaumie *et al.*, 2008). En plantas transgénicas de maíz en las que la expresión de *ZmCOMT* y la biosíntesis de la subunidad de lignina S están de-reguladas, la digestibilidad de las hojas y los tallos es de un 2 y 7%, respectivamente, en comparación con las plantas silvestres (Piquemal *et*

al., 1998). Esto muestra la importancia de *ZmCOMT* en la producción de bioetanol y otros alcoholes, lo que a su vez conlleva a determinar que *ZmZIM91* puede jugar un papel importante en la producción de biocombustibles.

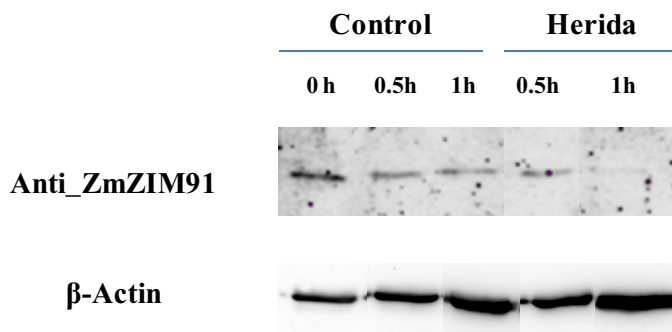


Figura 4-29. Respuesta de *ZmZIM91* a tratamiento de herida en hojas de plantas silvestres de maíz. En el panel superior usando en anti91, se observa la respuesta de *ZmZIM91* al tratamiento de herida en plantas silvestres a 1 hora, evidenciándose la degradación de *ZmZIM91*. En el panel inferior se muestra el control de carga del *western* usando para esto el anticuerpo de la β -Actina.

En esta investigación, además de identificar la interacción *in vivo* de *ZmZIM91* con los promotores de los genes *ZmCOMT* y *ZmA1*, se demostró que *ZmZIM91* actuaba como represor de ambos promotores. Los represores transcripcionales son generalmente clasificados como activos o pasivos (Hanna-Rose y Hansen, 1996). Aproximadamente el 6% del proteoma de *Arabidopsis* está representado por represores transcripcionales de los cuales el 30% tienen función como activos represores (Kagale y Rozwadowski, 2010).

La expresión de los represores de lignina está controlada por desarrollo y medioambiente. El fino control espacial y temporal de la deposición de lignina depende de la acción antagónica de los represores y activadores para asegurar el nivel preciso de acumulación de lignina en las células, tejidos u órganos específicos. Los diferentes genes de biosíntesis de lignina y activadores, están preferencialmente expresados en tejidos altamente lignificados durante el desarrollo, mientras que muchos represores están expresados preferencialmente en tejidos no lignificados o poco lignificados. (Zhao y Dixon, 2010). La activación de la deposición de lignina en la defensa de la planta puede ocurrir a través de la represión de los represores de lignina más que por la

inducción de los activadores. Es bien conocido que la lignina es inducida en respuesta a factores de estrés ambiental, tal como herida, estrés mecánico y patógenos, ya que algunos genes de la vía de los monolignoles están inducidos específicamente por estrés (Escamilla-Trevino *et al.*, 2010; Bhuiyan *et al.*, 2009).

La represión de *ZmCOMT* y *ZmA1* por *ZmZIM91* podría estar indicando la participación activa de *ZmZIM91* en la regulación de la producción de lignina y antocianinas, ya que en condiciones normales o sin presencia de estrés mantiene reprimidos ambos genes, mientras que una situación de herida o presencia de la hormona MeJA, al promoverse la degradación de *ZmZIM91* deja libre a estos genes para que puedan desempeñar su papel y así mismo pueda la planta responder frente al estrés. Por ejemplo en el caso de *ZmCOMT* una importante enzima en la regulación del flujo de metabolitos hacia la lignina (Figura 4-30), la herida conlleva a que este gen ayude a la producción de lignificación de la planta como respuesta defensiva.

La lignina es uno de los biopolímeros más abundantes del planeta, es probable que se encuentre bajo la regulación de diferentes mecanismos, uno de ellos podría ser manejado por *ZmZIM91*. De igual forma, la presencia de lignina no es deseable en la biomasa destinada a la alimentación animal, por lo cual también es interesante el estudio de probables modificaciones biotecnológicas con miras a reducir el contenido de lignina. En este contexto, se sugiere que la sobre-expresión de *ZmZIM91* puede ayudar a obtener plantas que sean más digeribles, lo cual rebajaría los costos de producción de biocombustibles, convirtiendo a *ZmZIM91* en una herramienta biotecnológica útil para el aprovechamiento del maíz en la producción de biocombustibles.

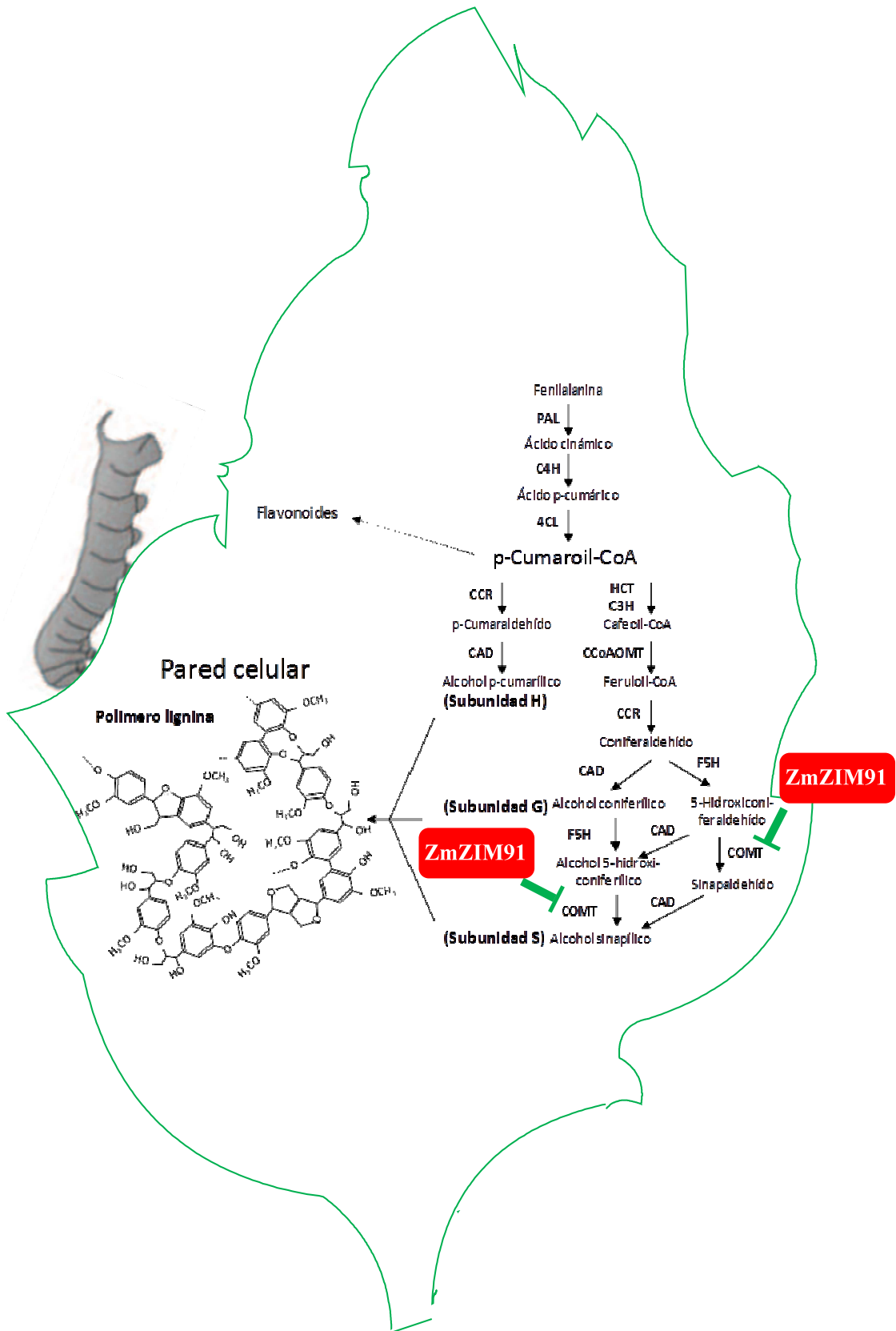


Figura 4-30. La represión del promotor de *ZmCOMT* por *ZmZIM91* puede tener un impacto significativo en la reducción del contenido de lignina en maíz. (Adaptado de Fornalé, S. *et al.*, 2010).

En el caso de *ZmA1*, el hecho de que *ZmZIM91* pueda competir con el complejo activador de C1+R sobre este promotor, es evidencia de que *ZmZIM91* en condiciones normales, mantiene controlado dicho gen, el cual es activado cuando *ZmZIM91* es degradado, generándose así la producción de antocianinas. También cabe anotar que se ha demostrado que el MeJA aumenta la producción de las antocianinas en el maíz, en este trabajo se sugiere que se debe a la degradación de sus represores como en es el caso de *ZmZIM91*.

También el hecho de que *ZmZIM91* pueda regular tanto un gen de la biosíntesis de la lignina como otro de la biosíntesis de antocianinas sugiere que la ruta de la biosíntesis de lignina y la de antocianinas pueden ser reguladas por una red transcripcional común.

Por otra parte, los datos obtenidos de la PCR cuantitativa de las muestras de ChIP de *ZmZIM91* de hojas de maíz tratadas con MeJA a 1 hora, evidenciaron una menor interacción de *ZmZIM91* con los promotores de los genes de *ZmCOMT* y *ZmA1*, demostrando la importancia del efecto de la hormona sobre la regulación de ambos promotores.

Los genomas de las eucariotas poseen cientos de E3 ligasas las cuales proveen especificidad para los procesos de degradación de las proteínas. En este trabajo se pudo demostrar que *ZmZIM91* era degradado por la vía del proteasoma 26S, aunque no se conoce el funcionamiento del mecanismo. En este contexto, es importante mencionar que en un trabajo realizado en *Arabidopsis* acerca del gen diana de *ZmZIM91*, *COMT*, se observó que dicho gen aumentaba su expresión en condiciones de herida, pero que sin embargo en mutantes de *coi1* sometidos a herida, la expresión de *COMT* decrecía, lo cual indicaba que la expresión del gen *COMT* era dependiente de *COI1* (Reymond *et al.*, 2000). Esto indica la existencia de una conexión entre la inducción de *ZmCOMT* por herida y la respuesta a la aplicación de MeJA. Lo anterior podría apoyar la hipótesis del complejo degradador planteado en la discusión de resultados del capítulo I conformado por *ZmZIM91/JAZ/COI1*, teniendo en cuenta que sin la presencia de *COI1* no se pueden degradar los represores y por lo tanto los niveles de *COMT* se mantienen bajos.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la caracterización de *ZmZIM91*, se ha propuesto un modelo hipotético del mecanismo de regulación de *ZmZIM91* utilizando

como ejemplo el promotor del gen de *ZmCOMT*, en la Figura 4-31A se muestra el modelo sin presencia de MeJA en condiciones control, mientras en la Figura 4-31B se plantea el modelo bajo condiciones de tratamiento con MeJA. En el modelo propuesto se tiene en cuenta el hecho de que *ZmCOMT* pertenece a la ruta de los fenilpropanoides, que responde a estrés por herida, y que además que es reprimido por ZmZIM91 y que en presencia de MeJA el sistema de represión sobre *ZmCOMT* por ZmZIM91 desaparece al ser este factor de transcripción degradado por la fitohormona en cuestión.

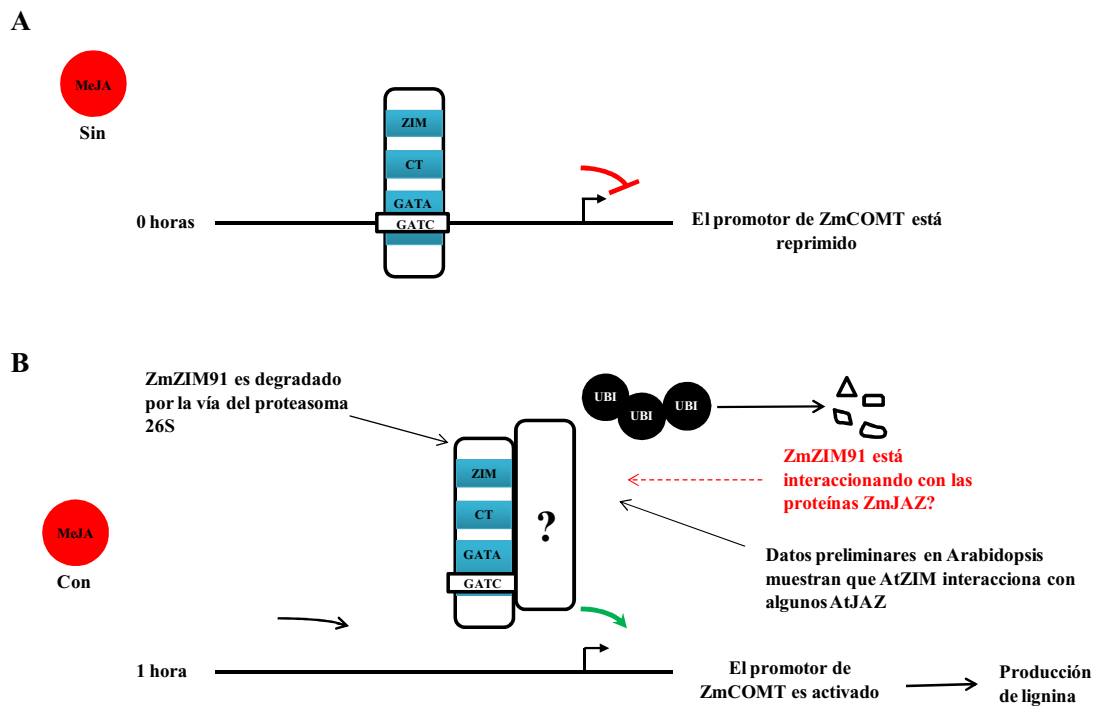


Figura 4-31. Modelo propuesto de regulación del promotor de *ZmCOMT* por el factor de transcripción ZmZIM91 de maíz. En (A) se presenta el modelo de regulación de ZmZIM91 sobre el promotor de *ZmCOMT* sin presencia de MeJA, enseñando que el promotor de *ZmCOMT* mantiene reprimido en condiciones normales o sin presencia de estrés. En (B) se muestra un modelo de regulación del factor ZmZIM91 sobre el promotor de *ZmCOMT* en presencia de MeJA, donde ZmZIM91 es degradado vía proteasoma 26S, dejando libre a *ZmCOMT* para que sea activado y se pueda generar pared y por consiguiente se produzca lignina.

Finalmente, cabe anotar que en el presente trabajo se logró identificar el papel de ZmZIM91 como un factor de transcripción que interviene en la regulación de genes de la biosíntesis de la lignina y las antocianinas, pudiéndose establecer un proceso biológico en el que está involucrado ZmZIM91.

4.2.3 Diferencias entre las técnicas de ChIP-Seq empleadas

Los resultados obtenidos de la secuenciación de las librerías de ChIP de ZmZIM91 tanto en hojas de maíz como en protoplastos de maíz sobre-expresando la proteína, permitieron identificar diferentes tipos de genes candidatos, sin embargo fueron encontradas diferencias entre ambas aproximaciones.

El ChIP-Seq proveniente de protoplastos que sobre-expresaban ZmZIM91 es una técnica que incorpora alta complejidad y muchos controles que permiten eliminar falsos positivos. Con esta técnica solo se obtuvieron lecturas y no picos de los dos genes diana (*ZmCOMT* y *ZmA1*) más enriquecidos en las librerías de ChIP de ZmZIM91 realizado con hojas de maíz, lo que conlleva a pensar que probablemente el hecho de que se utilicen células sin pared pueda afectar los resultados con respecto al enriquecimiento de algunos genes diana y además que es probable que no puedan ser identificados candidatos positivos.

Por otra parte, para validar los picos obtenidos con el ChIP-Seq de protoplastos, se validó el pico 14, usando tanto PCR semi-cuantitativa (Figura 4-32A) como PCR cuantitativa (Figura 4-32B) en las muestras de ChIP de ZmZIM91 realizado con hojas de maíz. Los resultados confirmaron el enriquecimiento del pico 14 en los ChIP de hoja de maíz, siendo el resultado igual al obtenido en las PCR cuantitativas de ChIP de protoplastos.

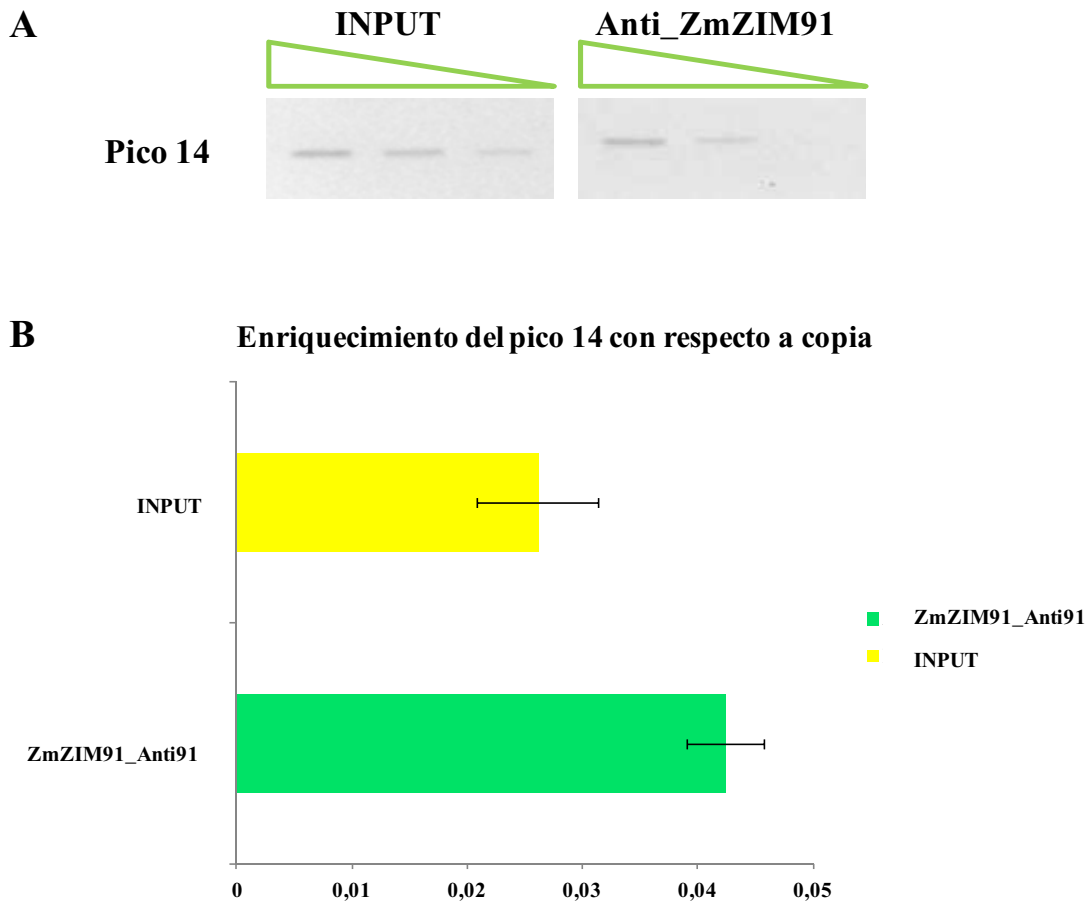


Figura 4-32. Validación utilizando PCR semi-cuantitativa y PCR cuantitativa de muestras de ChIP de hojas de plantas de maíz del pico 14. En (A) se muestran los resultados de la PCR semi-cuantitativa de ChIP de hojas de plantas de maíz de 9 días, realizada de tres diluciones seriales del material inmunoprecipitado. La PCR semi-cuantitativa se realizó utilizando cebadores diseñados específicamente para amplificar la secuencia correspondiente al pico 14. En (B) se presenta la PCR cuantitativa de ChIP de hojas de plantas de maíz de 9 días. La gráfica muestra el enriquecimiento del pico 14 con respecto a copia, donde se observa mayor enriquecimiento en el inmunoprecipitado usando en anti91 que en el Input.

Analizando y comparando los datos obtenidos con las dos técnicas de ChIP-Seq, se encontró que la cantidad de lecturas obtenidas en los ChIP-Seq provenientes de hojas de maíz que alineaban con el genoma de maíz fueron mayores que las que se obtuvieron con el ChIP-Seq proveniente de protoplastos de maíz. En cuanto a las librerías de ChIP de ZmZIM91 utilizando hojas de maíz, se obtuvo que para B73_ZmZIM91.1 eran 27.383.657 lecturas, el equivalente a un 37,79%; para B73_ZmZIM91.2 eran 22.509.519 lecturas, el equivalente a un 42,16%; para B73_ZmZIM91.4 eran 7.892.686 lecturas, el equivalente a un 21,64% y finalmente para el Input eran 66.858.439 lecturas,

el equivalente a un 98,03%. En el caso de las librerías realizadas usando ChIPs de protoplastos de maíz que sobre-expresaban ZmZIM91 se obtuvo con el antiGFP 1.062.351 lecturas mientras que con el anti91 se obtuvieron 154.994 lecturas. La diferencia entre los resultados (lecturas) en ambas técnicas puede radicar en la metodología para realizarlas, ya que fue mejorada para ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de hojas de maíz. El mejoramiento se vio reflejado en la calidad y cantidad de lecturas obtenidas de la secuenciación que podían ser alineadas en el genoma de maíz. Por tal razón, no se puede descartar que el ChIP-Seq proveniente de protoplastos de maíz, no sea una metodología válida para ser usada en caso de ausencia de anticuerpos específicos y mutantes, sin embargo, deben ser tenidas en cuenta las limitantes que tiene este tipo de aproximación.

Otro punto importante a destacar en cuanto las muestras de ChIP-Seq efectuado con protoplastos de maíz, es la variación de la cantidad de lecturas obtenidas entre los anticuerpos usados (anti91 y antiGFP), ya que probablemente en el caso de ZmZIM91_anti91 el hecho de que la librería tuviera un banda de contaminación de 123 pares (contaminación por adaptadores), interfirió con la secuenciación de los fragmentos de interés y en cambio favoreció la lectura de secuencias sobre-representadas que correspondían a adaptadores. En el momento de realización de estas librerías, debido a que la técnica del ChIP-Seq proveniente de protoplastos de maíz estaba en construcción y puesta a punto, no fueron descontaminadas, sin embargo como actualmente la contaminación por adaptadores ha sido detectada como uno de los principales problemas en la obtención de la baja cantidad de lecturas que alinean con los genomas, para elaboración de las librerías de ChIP tanto de hojas de maíz como las réplicas biológicas restantes de ChIP-Seq efectuado a partir de protoplastos de maíz, fue usada la tecnología de *AMPure Beads*, que permite eliminar la contaminación por adaptadores, lo que aumenta la calidad de las librerías.

4.2.4 Hipótesis de la existencia de un módulo regulatorio entre ZmZIM91, ZmMYB31 y ZmMYB42

Datos proporcionados por esta investigación, así como trabajos previos realizados por Fornalé *et al.* (2006, 2010) y Sonbol *et al.* (2009), sugieren que ZmZIM91, ZmMYB31 y ZmMYB42, pueden tener papeles y mecanismos similares de regulación. Además de

lo anterior, los resultados de interacción entre estos factores de transcripción, los análisis bioinformáticos de los módulos reguladores putativos AC/GATC y el hecho de haber identificado dos genes diana comunes que podían interactuar *in vivo* con estos factores de transcripción y ser reprimidos por ellos, conllevaron a plantear la existencia de un módulo regulador entre los ZML y los MYB del subgrupo IV.

La interacción proteína-proteína entre ZmZIM91 y los factores MYB (ZmMYB31 y ZmMYB42), fue clave para el entendimiento del proceso regulador de los genes *ZmCOMT* y *ZmA1*. De manera más general, muchos otros factores de transcripción relativos a los MYB se conoce que regulan diferentes ramas del metabolismo de flavonoides en plantas y que son capaces de jugar amplios papeles en la regulación del metabolismo de los fenilpropanoides.

Los factores de transcripción MYB contienen un dominio conservado de unión de ADN (DBD) que es homólogo al DBD animal c-Myb (Aasland *et al.*, 1996) este dominio está conformado típicamente por entre una a cuatro repeticiones imperfectas (R) (Dubos *et al.*, 2010) cada repetición es de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud y codifica para un 3 a-hélice. La subfamilia más grande de los MYB son los MYBs R2R3, que tiene miembros involucrados en la regulación metabólica en diversas vías, incluyendo compuestos fenólicos, tales como antocianinas, proantocianidinas, flavonoles, ligninas y bencenoides volátiles, en una amplia gama de especies de plantas diferentes (Spitzer-Rimon *et al.*, 2010; Dubos *et al.*, 2010; Petroni y Tonelli, 2011; Feller *et al.*, 2011). Algunos de estos MYBs R2R3 son sensibles a jasmonato, tales como PAP1, que regula la expresión de genes de la biosíntesis de antiocianinas y en consecuencia, induce acumulación de antocianinas en *Arabidopsis* (Borevitz *et al.*, 2000; Shan *et al.*, 2009). Ha sido bien establecido que las proteínas MYB R2R3 interactúan y ejercen una regulación combinatoria con los factores de transcripción bHLH para activar la biosíntesis fenólica. Dentro de estos complejos de proteínas, los MYBs R2R3 confieren la especialidad para los efectos aguas abajo y parecen estar conservados en todo el reino vegetal (Petroni y Tonelli, 2011; Feller *et al.*, 2011). Por ejemplo, en *Arabidopsis*, los factores de transcripción bHLH TT8, GL3 y EGL3 pueden interactuar con PAP1. Los jasmonatos pueden afectar la abundancia y actividad de estas proteínas MYB y bHLH, tanto a nivel transcripcional como a nivel post-traducciona, a través de la expresión

inducida de los factores de transcripción correspondientes y la interacción con las proteínas JAZ (Qi *et al.*, 2011; Maes *et al.*, 2008).

El estudio de la regulación del gen *ZmCOMT* ha abierto una puerta al conocimiento de cómo estos factores pueden estar interaccionando para regular dicho gen, actuando en forma de módulo regulador. En la actualidad se han venido adelantando estudios a gran escala de redes reguladoras, esto debido a que se sabe que los genes no actúan solos sino en combinación con otros genes para regular rutas de señalización.

A través del uso de herramientas bioinformáticas se han llegado a identificar módulos reguladores en plantas. En el trabajo realizado por Ding *et al.*(2011), fueron identificados 18638 posibles combinaciones de módulos reguladores en *Arabidopsis*. La identificación de módulos reguladores en *cis* (CRMs) puede ser un gran avance para entender el mecanismo regulador de los genes. A pesar de la existencia de sitios de unión de más de 3 factores de transcripción en un módulo regulador en *cis*, estudios en plantas consideran únicamente la co-ocurrencia de sitios de unión de uno o dos factores de transcripción (Ding *et al.*, 2011). En esta tesis, se formula la hipótesis de la existencia de un módulo regulador compuesto por 2 factores de transcripción: ZmZIM91/ZmMYB31 o ZmMYB42 (Figura 4-33).

Tanto el promotor del gen *ZmCOMT* como el promotor del gen *ZmA1*, posee elementos GATA y ACII. Un análisis a nivel filogenético más detallado sobre la conservación de las cajas GATA (motivo de unión de ZmZIM91) y ACII (Motivo de unión de ZmMYB31) en el promotor del gen de *COMT* en las gramíneas, permitió determinar que el módulo regulador putativo compuesto por ZmZIM91/ZmMYB31 o ZmZIM91/ZmMYB42 está evolutivamente conservado. La elaboración de un serial ChIP de ZmZIM91/ZmMYB31 o ZmZIM91/ZmMYB42, podría ser útil para demostrar la existencia del módulo regulador propuesto en esta investigación.

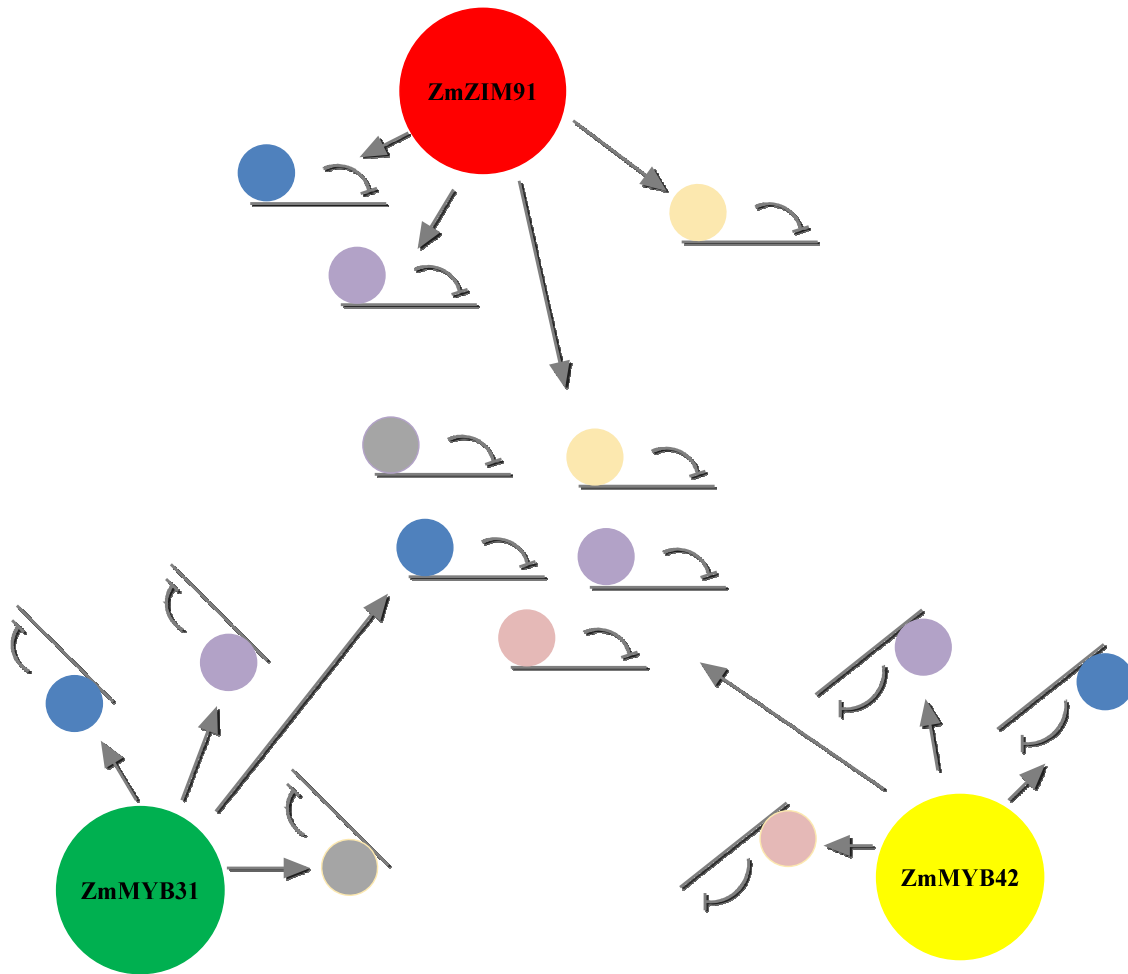


Figura 4-33. Modelo hipotético de módulo regulatorio entre ZmZIM91 y ZmMYB31 o ZmZIM91 y ZmMYB42. La figura muestra, promotores de genes diana específicos de cada uno de los factores de transcripción representados y promotores de genes diana comunes entre ellos.

Conclusiones

5. Conclusiones

1. ZmZIM91 interacciona *in vitro* con la subunidad catalítica CK2 α 1 y las reguladoras CK2 β 1, CK2 β 2 y CK2 β 3 .
2. Las subunidades reguladoras CK2 β 1, CK2 β 2 y el holoenzima CK2 α 1 β 1 pueden relocalizar a ZmZIM91. Mientras que CK2 β 3 al igual que CK2 α 1 no afectan la localización subcelular de ZmZIM91.
3. La proteína ZmZIM91 es sustrato *in vitro* e *in vivo* de la proteína quinasa CK2 de maíz. Además la fosforilación de ZmZIM91 por la proteína quinasa CK2 varía en situaciones de estrés por sequía y MeJA.
4. La proteína ZmZIM91 presenta diversos dominios putativos de señales de localización nuclear (NLS), ubicados en sus dominios JAS y CCT. En el N-terminal de ZmZIM91 también se identificó otra secuencia de NLS y una señal *export* (NES).
5. La proteína ZmZIM91 es capaz de dimerizar y degradarse en presencia de la hormona MeJA vía el proteasoma 26S.
6. Las secuencias GATC y GATA fueron identificadas como los motivos de unión a ADN tanto *in vitro* como *in vivo* de la proteína ZmZIM91.
7. Mediante el uso de la técnica de ChIP-Seq fueron identificados genes diana de ZmZIM91. El factor de transcripción ZmZIM91 regula negativamente los genes *ZmCOMT* y *ZmA1*, implicados en la biosíntesis de los fenilpropanoides.
8. El estudio de la regulación del gen *ZmCOMT* permitió identificar a los factores ZmMYB R2R3 del subgrupo IV (ZmMYB31 y ZmMYB42) como proteínas que interaccionan con ZmZIM91.

Materiales y Métodos

6. Materiales y métodos

6.1 Cepas de bacterias y levaduras

6.1.1 Cepas bacterianas

En la realización de los experimentos de este trabajo se usaron las siguientes cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*:

- ✓ *E. coli* DH5 α F' para la amplificación de plásmidos y construcciones.
- ✓ *E. coli* TOP10 para la amplificación de plásmidos y construcciones.
- ✓ *E. coli* BL21 para la sobreexpresión de proteínas recombinantes.
- ✓ *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 para la transformación transitoria en *Nicotiana bentamiana*.

Los cultivos de *E. coli* se realizaron en medio LB a 37°C suplementado con el antibiótico necesario en cada caso de acuerdo al plásmido usado para la construcción (Kanamicina, Ampicilina o Espectinomicina).

Para el crecimiento de la cepa EHA105 *A. tumefaciens* se utilizó medio YEB a 28°C, suplementado con los antibióticos correspondientes: Rifampicina y Kanamicina.

Medio Luria-Bertoni (LB): 10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl. Ajustar el pH a 7,5 con NaOH. Para preparar medio LB sólido, añadir 15 g/l agar. Autoclavar.

Medio Yeast Extract Broth (YEB): 5 g/l extracto de carne, 1 g/l extracto de levadura, 5 g/l peptona, 0,5% sacarosa, 2 mM MgSO₄. Ajustar el pH a 7,5 con NaOH. Para preparar medio YEB sólido, añadir 15 g/l agar. Autoclavar.

6.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

La cepa de levadura *S. cerevisiae* empleada para la realización de los experimentos de doble híbrido fue la AH109 (Clontech) cuyo genotipo (MATa, trp1-901, leu2-3, 112,

ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS-MEL1TATAlacZ, MEL1) le confiere auxotrofia para la leucina (L), el triptófano (T), la histidina (H), la adenina (A) y el uracilo (U). Los cultivos se realizaron a 30°C en medio rico YPD (suplementado con A en ocasiones, YPDA) o medio mínimo SD suplementado con L, T, H, A o U, según el caso.

6.2 Plásmidos y construcciones

6.2.1 Plásmidos

Los plásmidos usados en esta tesis se presentan a continuación en la siguiente tabla 6-1:

PLÁSMIDO	SELECCIÓN	USO	REFERENCIA
pCR®II y pCR®2.1	Ampicilina (Amp ^R)	Clonación de productos de PCR	Invitrogen
pENTRY3C	Kanamicina (Km ^R)	Clonación de productos de PCR	Invitrogen
pDONR 207	Espectinomicina	Clonación de productos de PCR	Gateway, Invitrogen
pDONR 221	Km ^R	Clonación de productos de PCR	Gateway, Invitrogen
pET-28 ^a	Km ^R	Sobreexpresión proteínas en <i>E.coli</i>	Novagen
pGEX4T1	Amp ^R	Sobreexpresión proteínas en <i>E.coli</i>	Amersaham Pharmacia Biotech
PDESTH1	Amp ^R	Sobreexpresión proteínas en <i>E.coli</i> Vector con <i>tag</i> de MBP	Gateway
pCambia 1302	Km ^R	Vector binario utilizado en transformación transitoria	CambiaTM

pCambia 1303	Km ^R	Vector binario utilizado en transformación transitoria	CambiaTM
pCambia 2300	Km ^R	Vector binario que fue modificado para ser utilizado en transformación transitoria (pCambia 2300 y dsRED tag; pCambia 2300 y Myc tag)	CambiaTM
pGJ1425	Amp ^R	Vector utilizado para la transformación transitoria de células vegetales	Jach <i>et al.</i>, 2001
PLOLA	Amp ^R	Vector utilizado para la transformación transitoria de células vegetales	Ferrando <i>et al.</i>, 2000
YFP ^N	Km ^R	Vector binario utilizado en transformación transitoria para Complementación Bimolecular	Ferrando <i>et al.</i>, 2000
YFP ^C	Km ^R	Vector binario utilizado en transformación transitoria para Complementación Bimolecular	Ferrando <i>et al.</i>, 2000
C-GFP	Amp ^R	Vector utilizado en transformación transitoria	Gateway, Invitrogen
PGBKT7	Bacteria: Km ^R Levadura: TRP1	Vector usado para ensayo de doble híbrido; dominio BD	Clontech
PGADT7	Bacteria: Amp ^R Levadura: LEU2	Vector usado para ensayo de doble híbrido; dominio AD	Clontech
PGBKT7	Bacteria: Km ^R	Vector usado para ensayo de doble	Gateway

	híbrido;		
	dominio BD		
PGADT7	Bacteria: Amp ^R	Vector usado para ensayo de doble híbrido; dominio AD	Gateway

Tabla 6-1. Plásmidos Usados.

Las concentraciones de antibióticos y suplementos utilizadas para la selección de las bacterias fueron las siguientes:

- ✓ Ampicilina: 100 µg/ml
- ✓ Kanamicina: 25 µg/ml para bacterias y plantas
- ✓ Rifampicina: 100 µg/ml
- ✓ Espectinomicina: 100 µg/ml
- ✓ IPTG: 23,8 µg/ml

6.2.2 Construcciones

Para efectuar el clonaje de ZmZIM91, se utilizaron plántulas de *Zea Mays* de la variedad W64+/+ de 6 días de germinación, crecidas en rollo de papel y cámara de germinación con un fotoperíodo de 16 horas luz a 28°C/8 horas de oscuridad a 22°C, una humedad del 60% y 100% iluminación (20.000 luxes). Las semillas empleadas para la germinación de plántulas se esterilizan con etanol absoluto por 5 minutos, luego se retira el etanol y se adiciona hipoclorito cálcico (5g/100ml) durante 10 minutos, posteriormente se realizan tres lavados con agua Mili-Q estéril y se resuspenden de nuevo las semillas en hipoclorito cálcico durante 7 minutos, a continuación se dejan las semillas 10 minutos dentro de una bomba de vacío y por último se realizan 5 lavados con agua Mili-Q estéril de 10 minutos cada uno. Para llevar a cabo los análisis se tomó por separado la parte aérea de las plántulas y la raíz y se congeló el material vegetal a -80°C.

Las construcciones utilizadas en el presente trabajo se listan en la tabla 6-2 junto con sus dianas de clonaje y la región.

CONSTRUCCIÓN	VECTOR	DIANAS DE CLONAJE	ORIGEN DNA	REGIÓN CLONADA
ZmZIM91	pCR2.1	Fragmento de PCR	PCR cDNA	cDNA completo
ZmZIM91	pENTRY3C	Fragmento de PCR	PCR cDNA	cDNA completo
ZmZIM91	pDONR 207	Fragmento de PCR	PCR cDNA	cDNA completo
ZmZIM91	pDONR 221	Fragmento de PCR	PCR cDNA	cDNA completo
ZmZIM91	pCambia1302	BglII-BglII	pCR2.1-ZmZIM91	Región codificante
ZmZIM91	C-GFP	Recombinación del pDONR 207 ZmZIM91	pDONR 207 ZmZIM91	Región codificante
ZmZIM91	YFP ^N	Recombinación del pENTRY3C ZmZIM91	pENTRY3C ZmZIM91	Región codificante
ZmZIM91	YFP ^C	Recombinación del pENTRY3C ZmZIM91	pENTRY3C ZmZIM91	Región codificante
ZmZIM91	pCambia 2300 + PLOLA Myc	BglII-SpeI	pCambia1302 ZmZIM91	Región codificante
ZmZIM91	pGBKT7	EcoRI-Sall	pCR2.1-ZmZIM91	Región codificante
ZmZIM91	pGADT7	EcoRI-XhoI/Sall	pCR2.1-ZmZIM91	Región codificante
ZmZIM91	pET28a	EcoRI-Sall	pCR2.1-ZmZIM91 DOBLE	Región codificante

			HÍBRIDO	
ZmZIM91	pGEX4T1		pCambia1302 ZmZIM91	Región codificante
N-Terminal ZmZIM91	pCAMBIA1303	NCOI	pCR2.1- ZmZIM91	N-terminal 1pb- 255pb)
AtZIM	pDONR 207	Fragmento de PCR	PCR cDNA	cDNA completo
AtZIM	pDONR 221	Fragmento de PCR	PCR cDNA	cDNA completo
AtZIM	PDESTH1	Recombinación de pDONR 221 AtZIM	pDONR 221 AtZIM	Región codificante
AtZIM	PGADT7	Recombinación de pDONR 207 AtZIM	pDONR 207 AtZIM	Región codificante
AtZIM	PGBKT7	Recombinación de pDONR 207 AtZIM	pDONR 207 AtZIM	Región codificante
AtZML1	pDONR 207	Fragmento de PCR	PCR cDNA	cDNA completo
AtZML1	pDONR 221	Fragmento de PCR	PCR cDNA	cDNA completo
AtZML1	PDESTH1	Recombinación de pDONR 221 AtZML1	pDONR 221 AtZML1	Región codificante
AtZML1	PGADT7	Recombinación de pDONR 207 AtZML1	pDONR 207 AtZML1	Región codificante
AtZML1	PGBKT7	Recombinación de pDONR 207 AtZML1	pDONR 207 AtZML1	Región codificante

Materiales y métodos

AtZML2	PGADT7	Recombinación de pDONR 207 AtZML1	En colaboración con el Dr. Andrea Chini y el Dr. Roberto Solano (CNB-Madrid)	Región codificante
AtZML2	PGBKT7	Recombinación de pDONR 207 AtZML1	En colaboración con el Dr. Andrea Chini y el Dr. Roberto Solano (CNB-Madrid)	Región codificante
CK2β1	pGEX4T1		Elaborada por la Dra. Marta Riera	Región codificante
CK2β1	YFP ^N	Recombinación del pENTRY3C CK2β1	Elaborada por la Dra. Marta Riera	Región codificante
CK2β1	YFP ^C	Recombinación del pENTRY3C CK2β1	Elaborada por la Dra. Marta Riera	Región codificante
CK2β2	pGEX4T1		Elaborada por la Dra. Marta Riera	Región codificante
CK2β3	pGEX4T1		Elaborada por la Dra. Marta Riera	Región codificante
CK2α1	pGEX4T1		Elaborada por la Dra. Marta Riera	Región codificante
CK2α1	pCambia 2300 pGJ1425		pCambia 1302 CK2α1 Elaborada por la Dra. Marta Riera	Región codificante
<i>pZmCOMT::luc</i>	pMSZO11	BamHI/KpnI	Elaborada por Xinhui Shi	Promotor 1000 kb
<i>pZmA1::luc</i>			Sainz et al., 1997	Promotor

C1+R

C-GFP

En colaboración
con el Dr. Erich
Grotewold

Tabla 6-2. Construcciones utilizadas.

6.2.3 Cebadores.

A continuación en la Tabla 6-3, se muestran los cebadores diseñados durante el presente trabajo, usados para realizar el clonaje:

Nombre del cebador	Secuencia cebador (5'-3')
ZmZIM91_2hFw_EcoRI	GGAATTCATGTCCCACCACGACGGAAGC
ZmZIM91_2hRev_XhoI	CCTCGAGAACACCACTACTCGATGACTCG
ZmZIM91_speFw	C ACC ATG TCC CAC CAC GAC GGA AGC
ZmZIM91_SpeRv	CATAACACCACTACTCGATGACTC
ZmZIM91_Gateway_Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGTCCCACCACGACGGAAGC
ZmZIM91_Gateway_Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAACACCACTACTCGATGACTCG
ZIM_Gateway_Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGTTTGGTCGCCATTCGATTATCC
ZIM_Gateway_Rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTGATCACCTAACAGATTAG
ZML1_Gateway_Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGATGATCTTCATGGAAGAAATGG
ZML1_Gateway_Rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTGTGTGTGCTAATGTCACCAG

Tabla 6-3. Cebadores de ADN usados para realizar los clones en este estudio.

En la Tabla 6-4, se muestran los cebadores utilizados para realizar la PCR semi-cuantitativa de ChIP de protoplastos de maíz:

Nombre del cebador	Secuencia cebador <i>Forward</i> (5'-3')	Secuencia cebador <i>Reverse</i> (5'-3')
ICVB ChIP2009_Pico 1	CAAGACGTCAACAACACTGC	AACCGACATCTCCGGGTCGT
ICVB ChIP2009_Pico 2	TGGACTCGTCAAAATCAGGACAGC	TGCTGCGTGCGGTGCAGAATCC
ICVB ChIP2009_Pico 3	TACAAGCTAGAGCGCGTGGC	TACTGCAGTTCGGTATTACA
ICVB ChIP2009_Pico 4	GGAGGAAACCAAGAAAGAA	ACCTGTCCCAAACGGCCTA
ICVB ChIP2009_Pico 5	GCTGACGACAGCCATGCAC	ACCCAGTAGTCCTAGGCA
ICVB ChIP2009_Pico 6	TCAGTCCAGGACAATTAAT	CTCTGTGAGGACTGAAGAG
ICVB ChIP2009_Pico 7	CCTACAAACCTTTCAGACA	TAGGCCTATTATTGGAATG
ICVB ChIP2009_Pico 8	ATTGTTTGCATATGAGTCG	TTTGCCATTTGTTTCTGCG
ICVB ChIP2009_Pico 9	ATTTGCTTTCGCTCTCTC	CAGTTACCAGCATGGTCTGA
ICVB ChIP2009_Pico 10	AGGCTTTTTTCTACGCAATC	ACCGCTATGGTGAATTGGA
ICVB ChIP2009_Pico 11	ACAGCCAATCCACACCTCGCT	TTTATGCCTCGAGATCCAA
ICVB ChIP2009_Pico 12	TAGCTCGAGCTATTTGGCT	GCAGAAGTGGAAACCCTGGG
ICVB ChIP2009_Pico 13	GGCAAGCGATTGTTCCATC	GAGCAGCTGTTTTCGTGAT
ICVB ChIP2009_Pico 14	CTGATCCTTACACAACATT	CGCTGATCCTCTGTTTTGA
ICVB ChIP2009_Pico 15	TCTGTACTTTCTCCTTTCA	CGGAGGGAGGCCTTATAG
ICVB ChIP2009_Pico 16	TGTTGGGAATACTTTCAGG	TGGAGGTGCTCCAGGCTTG
ICVB ChIP2009_Pico 17	GGTGTAGAAACAGACAGCC	CGAGCTTGACGCGTCCGCT
ICVB ChIP2009_Pico 18	GCCAGATGCAAAAGAGAACC	ATTGCCTGGCTTTGTAGCAC
ICVB ChIP2009_Pico 19	CATGCGATGCGACAGTAGAT	GGATTACCATCTCCCGGTCT
ICVB ChIP2009_Pico 20	TCGAATAATGATTGTCTATTG	CGTCGTCTCACGTTCCGCACGT
ICVB ChIP2009_Pico 21	AACTGGAAGAGAGGTCTTA	GTGTTCTCCATTGGTGATT
ICVB ChIP2009_Pico 22	GCTGCCGCCTGCCGACGCG	TCCACACAACCTAACGGCCC
ICVB ChIP2009_Pico 23	ACCATACCATTCCCACACT	CGGTGGACGGAGAGACAGG
ICVB ChIP2009_Pico 24	GCTGTTTCAATTCAGACATG	TAGCACCCGATTGTAATCT
ICVB ChIP2009_Pico 25	TCTATCCTTCTCGCGTTGG	TCAACAGCCACCACCAGAC
ICVB ChIP2009_Pico 26	TGTTTCACTGACTCTTGGG	AAGGTGACGCTGAAAAGAA
ICVB ChIP2009_Pico 27	ACTGCTAGAAATGTGGCACG	TCTTCAATGCTGGGCGCTC
ICVB ChIP2009_Pico 28	ATAAGGAGGACGAAGTTGG	GGATCTGGAACCCTGCAAA
ICVB ChIP2009_Pico 29	GGTCTGCAGCATCCACGGC	TGGGCGTGCGGGTGGGTGC
ICVB ChIP2009_Pico 30	GCGCGGGGCTTACGTGTTT	ATCATCACCTCATCCCC
ICVB ChIP2009_Pico 31	GCCCAGTGCTGAAGCTTAC	TTTCTTCGTCGTGAAGCTT
ICVB ChIP2009_Pico 32	CGTCTTACC GCCTCGCT	CGGGTATATAGCCGTTGCC
ICVB ChIP2009_Pico 33	TGAGATCACGCTGTCACCA	TGCGCGTGATGCGGTGGAG
ICVB ChIP2009_Pico 34	ACGTAGA ACTGCCACTGACG	TTCTCACTGACCGACTGACG
ICVB ChIP2009_Pico 35	TCGAGATGATGCAGCTTTTG	GTTCATTATCCGAGGAAGC
ICVB ChIP2009_Pico 36	ACTCTGGACGCTTGTGTTGCT	GTGTCACTCAGGGTCCGTCT
ICVB ChIP2009_Pico 37	ACAGACTTGGGCAATCCATC	TGGTTGCTCGAGA ACTGTTG
ICVB ChIP2009_Pico 38	GGCTTCCAGCTTCTCTCTGA	CTGCTGGTGACCTGAATCAA
ICVB ChIP2009_Pico 39	AGGGTCAACTCAAACCGTTG	CAAACGTTGTCTCGGTCAAA
ICVB ChIP2009_Pico 40	CACAAGCAGACGTGTCCAGT	CATGCATTTGGAACAGTTGG
ICVB ChIP2009_Pico 41	GGTGTGGGGATTTTGTGTTG	CCAAATTCACGCCGAATC
ICVB ChIP2009_Pico 42	GAAGACAAGGCGGAGTTCTG	AATTTAGCACGACGGGTTTG
ICVB ChIP2009_Pico 43	GTGGTGGTGGGTCGAGT	CTGGGTAGCCAGTTCCAC
ICVB ChIP2009_Pico 44	ATATCCGAATGCGAGAGCAG	GGAACACTGTGCTGCCTGTA
ICVB ChIP2009_Pico 45	TGCACCAAGACAGACGGATA	CCGGATTGTTTGTGTCCTT
ICVB ChIP2009_Pico 46	CCTTCGAAATCGACAGCAC	AACCACATCGCACTGGTTTT
ICVB ChIP2009_Pico 47	AAACAAGTCAACCGAACGAC	TCAAGAAAACCGAACCCAAC

Tabla 6-4. Cebadores utilizados para la validación por PCR semi-cuantitativa de los picos identificados en el ChIP-Seq proveniente de protoplastos de maíz.

En la Tabla 6-5, se muestran los cebadores utilizados para realizar la PCR cuantitativa de ChIP de protoplastos de maíz:

Nombre del cebador	Secuencia cebador <i>Forward</i> (5'-3')	Secuencia cebador <i>Reverse</i> (5'-3')
ICVB ChIP-QPCR_Pico 4	CCATGTAGCGGTGTAAGGG	GGGACCAGACATTAGGAACC
ICVB ChIP-QPCR_Pico 7	TAAAGCCTTCTCGAGCCTCT	TATCACATGTGCAGGACCAA
ICVB ChIP-QPCR_Pico 8	CAAATTGAATTGGCACCTTG	TCAAATGAGAGACCAAAGTCAGA
ICVB ChIP-QPCR_Pico 10	CCTCTAGCCATTGGCAATTT	GTCTGTGACCGATTGTTTGG
ICVB ChIP-QPCR_Pico 11	CCCTTCGGCTTATTATACGTG	TGCCGATTCTGTAATTATGCTT
ICVB ChIP-QPCR_Pico 12	GGTGGAAACAAAGACAGGAGA	GCTCAAGTTTACAGCTTTGCC
ICVB ChIP-QPCR_Pico 14	GCTCTGATATTAGGGCAGATCA	GCACATTTGCTATGGCTTGT
ICVB ChIP-QPCR_Pico 15	TAGGGTTATCTGGGCCAAAC	CTGCTGCTGCAGTCTTAGAG
ICVB ChIP-QPCR_Pico 16	AACAGTTACTTCGCCAACCC	TGTTGAACCGAGGAGGCTAT
ICVB ChIP-QPCR_Pico 17	CATCTCGCACGTGATAAGT	TTCAGATTCCGAAACGACAG
ICVB ChIP-QPCR_Pico 20	AGTCAGTACCTAATCTGCATCCAC	CACGTGGACGAGTTGCTAAG
ICVB ChIP-QPCR_Pico 21	GGATCTTAGTTAGATTTGTAGTGCGT	CTGGGCATAGGCAAGACAC
ICVB ChIP-QPCR_Pico 23	GCCATACTGTCTCAGACCCA	GGAAACGCACGAAGCTAAAT
ICVB ChIP-QPCR_Pico 24	GCCGATCTAGAAGCTACCCA	GTGCATGCCAATCAGAGTGT
ICVB ChIP-QPCR_Pico 26	CAGGTGCATATGTTGAGCGT	GTGATTCAAACCGGAGAAGA
ICVB ChIP-QPCR_Pico 28	TTGTAAAGTTGAAGCCCATTG	TCTCGTCGCCCTTATTCT
ICVB ChIP-QPCR_Pico 29	GCGAACGGCACGATTAT	CTGCTGTGCCTGTGCTGTA
ICVB ChIP-QPCR_Pico 34	CTATGCGACATCATGCGTTT	CATCGGCACGTGAGATTC
ICVB ChIP-QPCR_Pico 35	TGGAACCCAGTACGCAATAA	AGGAAGCGAGTTGGTCCTAA
ICVB ChIP-QPCR_Pico 36	GACGGCCACAAGTCAGAAA	GTCCGTCTTGCTTTGCTTC
ICVB ChIP-QPCR_Pico 37	CTAGATGGCTGGATGCAGAA	AGTTCCTTGGATGGTTGCTC
ICVB ChIP-QPCR_Pico 39	GGTGGCTGACCTGACTAGACT	CCTACGGAACACGGAAGGA
ICVB ChIP-QPCR_Pico 40	AAGGGCTTAGAGGTGACCAA	TGGGATAGAGTGATGATGTGC
ICVB ChIP-QPCR_Pico 41	GTTGAAAGAGGAGGGATTGG	CCGCGTCGCCTTTATTAT
ICVB ChIP-QPCR_Pico 42	AAACCAGCCATAAATCCAG	GCCGAAGTTCAAGAGAGGAG
ICVB ChIP-QPCR_Pico 43	TTCGCTTGGAGCTTTCTTCT	GCCCAAATCTATACTGGGTAGC
ICVB ChIP-QPCR_Pico 44	ACAAGATTCGTCCTCGGAAC	TGGAGGGCATTGTCATTGT
ICVB ChIP-QPCR_Pico 45	CCATTAATGAAGGCCGAGAG	CGGATTGTTTGTGTCCTTG
ICVB ChIP-QPCR_Pico 46	CCTTCGAAATCGACAGCAC	TTGTCACCATCATGATCAACTC
ICVB ChIP-QPCR_Pico 47	GGATCGGAAGCTGACAGTG	CACGAGGGTCCAAGTCATC
Copia-qPCR	CGATGTGAAGACAGCATTCT	CTCAAGTGACATCCCATGTGT

Tabla 6-5. Cebadores utilizados para la validación por PCR cuantitativa de los picos identificados en el ChIP-Seq proveniente de protoplastos de maíz.

En la Tabla 6-6, se muestran los cebadores utilizados para realizar la PCR cuantitativa de ChIP de hojas de plantas de maíz de 9 días:

Nombre del cebador	Secuencia cebador <i>Forward</i> (5'-3')	Secuencia cebador <i>Reverse</i> (5'-3')
COMT qPCR	TCACGCAAACCTAACGCATA	TATGCGCGCACTAATTCAAG
KM_qPCR_A1prox-A1	AGGAGCTCCAGCTAGATGTGTC	CTGCAACTACCGGCATATCTCT
ICVB ChIP-QPCR_Pico 14	GCTCTGATATTAGGGCAGATCA	GCACATTGCTATGGCTTGT
Copia-qPCR	CGATGTGAAGACAGCATTCCT	CTCAAGTGACATCCCATGTGT
KM_qPCR_Bz1prox-A1	CATACGGCACAGGTTTAGTCAC	GATTGTACGGGATCTGGTCTA
ZmActin	TTTAAGGCTGCTGCTACTGCTGTAGA	CACTTTCTGCTCATGGTTTAAGG
ZmCOMT3'-UTR	TCTGCGTGAATTGCTCTGTC	GAGAGCAATTAACCGCCATGT

Tabla 6-6. Cebadores utilizados para la validación por PCR cuantitativa de los picos identificados en el ChIP-Seq proveniente de hojas de plantas de maíz.

6.3 Métodos

6.3.1 Técnicas empleadas para el clonaje de ADN.

El proceso de elaboración de una construcción implica la utilización de múltiples técnicas que a continuación se detallan. Todas ellas se han extraído o se han basado en los protocolos descritos en los manuales *Molecular Cloning: A laboratory Manual* (Sambrock y Russel, 2001) y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1989).

6.3.2 Preparación de células competentes

6.3.2.1 Obtención de células competentes por choque térmico de *Escherichia coli*

El protocolo seguido para la preparación de células competentes de *E.coli* para transformación por choque térmico es el descrito por Hanahan (Hanahan, 1983).

6.3.2.2 Obtención de células competentes por choque térmico de *Agrobacterium tumefaciens*

Para la preparación de células competentes por choque térmico de *Agrobacterium tumefaciens*, se inocula una colonia en 2 ml de medio YEB suplementado con rifampicina (Rf) y carbenicilina (Cb), se incuba O/N a 28°C, posteriormente se inocula

50 µl del cultivo inicial en 50 ml de medio YEB-Rf-Cb y se incuba a 28°C en agitación hasta que alcanza una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0,5-0,8. Se deja enfriar el cultivo en hielo durante 15-30 minutos. Se centrifuga el cultivo a 5000 rpm durante 5 min a 4°C. Luego el sobrenadante se descarta y el pellet se resuspende en 10 ml de solución A fría a 4°C. Posteriormente, se centrifuga a 5000 rpm durante 5 min a 4°C. Se vuelve a descartar el sobrenadante y se resuspende el pellet en 1 ml de solución fría a 4°C de 20 mM CaCl₂. Finalmente se generan alícuotas de 50 µl, que son congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C.

Solución A: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8.

6.3.2.3 Transformación de células competentes de *Escherichia Coli* por choque térmico

Para la transformación de *E.Coli* se añade primero 50-100 ng de ADN plasmídico o el producto de ligación a una alícuota de células competentes, previamente descongelada en hielo. A continuación el ADN y las células, se mezclan y se incuban en hielo durante 20-30 minutos. Luego se aplica un choque térmico de 42°C durante 45 segundos. Se incuban las células en hielo durante 2 minutos. Se añade 800 µl de medio LB, se incuban durante 45-60 minutos a 37°C en agitación. Se centrifugan a 6000 rpm durante 1 minuto. El sedimento bacteriano se resuspende en 200 µl del sobrenadante. Y finalmente se siembra en placas de LB (con el antibiótico correspondiente para la selección de transformantes) y se incuban a 37°C, en posición invertida, durante toda la noche (12-16 h).

6.3.2.4 Transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* por choque térmico

Para la transformación de *Agrobacterium*, en primer lugar se añade 1 µg de ADN plasmídico a una alícuota de 30 µl de células competentes, se mezclan e incuban en hielo durante 5 minutos. Se introduce la muestra en nitrógeno líquido durante 5 minutos y seguidamente en un baño a 37°C durante 5 minutos más. Posteriormente, se añade 1 ml de medio YEB a la muestra y se incuba durante 3-4 horas a 28°C. Se centrifuga 5

minutos a 2000 rpm. Las células se resuspenden en 200 µl de medio YEB Rif-antibiótico correspondiente al vector usado. Las placas son incubadas a 28°C protegidas de la luz, durante 2 días aproximadamente (hasta la aparición de colonias). Luego, se seleccionan algunas colonias y se inoculan en 3 ml de medio YEB suplementado con los antibióticos correspondientes. Y finalmente se crecen los cultivos hasta saturación a 28°C y con agitación.

6.3.3 Obtención de ADN plasmídico

Para la obtención de ADN plasmídico, se sigue el protocolo del kit comercial *Plasmid Mini Kit* (QIAGEN®). Asimismo, para obtener mayores cantidades de ADN plasmídico se elaboraron *MaxiPreps con el QIAGEN® Plasmid Purification Kit*, usando el protocolo propuesto por la casa comercial (Ver *Handbook QIAGEN Plasmid Midi, Maxi, Mega, and Giga Kits. For purification of ultrapure plasmid DNA*).

6.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de ADN por el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó para elaborar construcciones o comprobar la presencia del inserto de interés en las colonias transformadas.

Las enzimas ADN polimerasa termoestables empleadas fueron las comerciales *Pfu DNA Polymerase* (Stratagene) y *Ex Taq™ Polymerase* (Takara), todas ellas con una baja tasa de error (*HF, high fidelity*). Para el clonaje de fragmentos se utilizaron ambas *Taq* combinadas y para la comprobación de insertos de interés en colonias se usó únicamente la Takara.

Debido a que la secuencia de ADN de *ZmZIM91* tiene un alto contenido de GC, la PCR para la obtención del clon presentaba bandas inespecíficas (Figura 6-1A). Para solventar dicho problema, se realizó un experimento utilizando diferentes cantidades de Betaina y DMSO (Figura 6-1B) (Henke, 1997) y se determinó que las condiciones 1 donde se usó DMSO al 5% eran las óptimas ya que se obtuvo una banda específica.

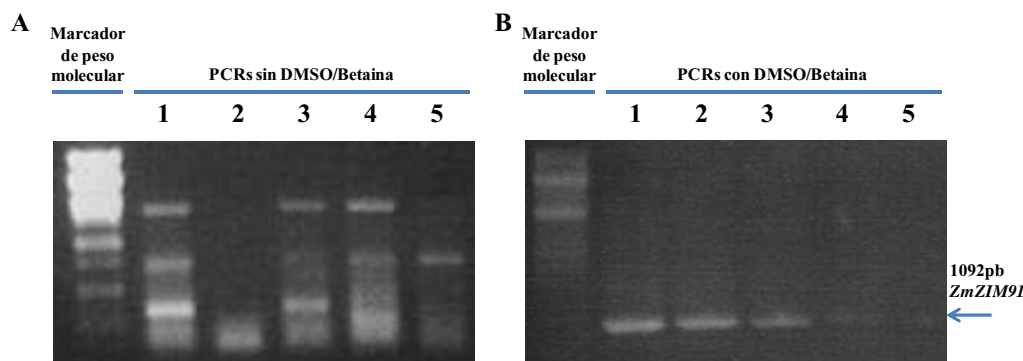


Figura 6-1. Puesta a punto de condiciones óptimas de PCR para la obtención del clon de *ZmZIM91*. En (A) se observan bandas inespecíficas en las directas PCRs realizadas sin DMSO y sin Betaina, usando oligos específicos para la obtención del clon completo de *ZmZIM91*. Para la amplificación de *ZmZIM91* se utilizaron diferentes cDNAs: 1. Raíz control, 2. Hoja control, 3. Hoja sequía, 4. Raíz sequía y 5. Hoja NaCl. En (B) se muestran diferentes condiciones de PCRs usando oligos específicos para la obtención del clon completo de *ZmZIM91* y DMSO y/o Betaina. En todos los casos fue utilizado cDNA de Hoja control. Las diferentes condiciones fueron: 1. DMSO 5%, 2. DMSO 10%, 3. Betaina 1M, 4. Betaina 2M y 5. Betaina 2M+DMSO 5%.

Las condiciones generales para realizar la PCR se muestran a continuación (Tablas 6-7 y 6-8), aunque para cada caso en particular se modificó la temperatura de emparejamiento (unos 2-5°C por debajo de la T_m del cebador con la T_m más baja), el tiempo de extensión (las ADN polimerasas incorporan aproximadamente 1 kb/min) o el número de ciclos para optimizar la amplificación. El volumen de reacción utilizado fue en la mayoría de casos de 50 µl.

PCR MIX	
cDNA molde	1 µl
Primer Fw	0,5 µl (10 mM)
Primer Rv	0,5 µl (10 mM)
dNTPs	4 µl
Buffer 10X	5 µl
DMSO	2,5 µl (5%)
Taq TaKara	0,25 µl
Pfu	0,5 µl
H2O	Hasta 50 µl

Tabla 6-7. Condiciones generales de PCR.

1 ciclo	2 min 94°C	Pre-desnaturalización
X ciclos (entre 24 y 35) (1)	15 seg 94°C	Desnaturalización
	30 seg X°C (2)	Hibridación
	X seg 72°C (3)	Extensión
1 ciclo	5 min 72 °C	Extensión final

Tabla 6-8. Condiciones de la reacción de PCR.

(1) El número de ciclos de amplificación depende del tipo de PCR: para comprobar la presencia de un inserto normalmente es de 30 ciclos y para clonar fragmentos de ADN es de 30 ciclos, y en el caso de análisis de expresión por RT-PCR de 25.

(2) En general, se ha utilizado una temperatura 2°C inferior a la T_m del cebador con T_m más baja.

(3) Depende de longitud del fragmento; la *Taq* incorpora 1Kb/min.

6.3.5 Digestión enzimática del ADN plasmídico

La digestión con enzimas de restricción permite la liberación del inserto, el gen reportero o el gen de resistencia antibiótica, con el fin de verificar el estado de una construcción. Una unidad de enzima es la cantidad necesaria de enzima para digerir 1 µg de ADN durante 1 hora a 37°C, en el tampón apropiado. En general las digestiones se llevaron a cabo utilizando 5 µl de ADN. Las enzimas que han sido empleadas durante este trabajo pertenecen a las casas comerciales Fermentas o Roche.

6.3.6 Electroforesis de fragmentos de ADN y ARN en gel de agarosa

La migración electroforética de las PCRs de cDNA se ha llevado a cabo, en geles de agarosa al 1%, al igual que para digestiones y prácticas estándar, mientras que para las PCR semi-cuantitativas de CHIP se usaron geles de agarosa al 2%.

Para el ARN se usaron geles de 1,5%, con 0,05% de bromuro de etidio.

Para cargar el ADN y el ARN en el gel se añade tampón colorante de carga en el gel. La migración se realiza, normalmente, a un voltaje constante de 100 Voltios en 1X TAE.

Soluciones:

- TAE 1X: 40 mM Tris Base, 20 mM HAc, 2 mM EDTA pH 8.
- Tampón de carga 10X: 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol, 50% glicerol, 10 mM EDTA pH 8.

6.3.7 Extracción y purificación de fragmentos de ADN, reacción de ligación y recombinaciones

Para la extracción de fragmentos de ADN desde gel de agarosa, tras la migración de los mismos, se ha utilizado el *kit QIAquick® Gel Extraction Kit* (QIAGEN), según las indicaciones del fabricante. Una vez purificados, los productos de PCR en el caso de los vectores de clonaje con enzimas de restricción, fueron ligados siguiendo las instrucciones de la casa comercial. En el caso de los fragmentos de ADN digeridos, las ligaciones se realizaron en un volumen de 10 µl y una unidad de enzima T4 ligasa (Roche). Por regla general, la proporción de ADN de inserto y vector empleada fue de 3:1. Las reacciones se incubaron a 4°C durante 14 horas.

Para los clones que fueron hechos utilizando vectores de tecnología Gateway de Invitrogen, las reacciones fueron llevadas a cabo con BP en el caso de un vector de entrada o con LR en caso de un vector de destino, siguiendo el protocolo proporcionado por Invitrogen.

6.3.8 Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación de ácidos nucleicos se ha realizado por espectrofotometría utilizando un *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* y el programa informático ND-1000 V3.1.0 (*NanoDrop Technologies Inc.*).

6.3.9 Extracción y purificación de ARN de maíz

El material vegetal usado para la extracción de ARN, fueron plántulas de *Zea Mays* de la variedad W64+/+ de 6 días de germinación, crecidas en rollo de papel y cámara de

germinación con un fotoperíodo de 16 horas luz a 28°C/8 horas de oscuridad a 22°C, una humedad del 60% y 100% iluminación (20.000 luxes).

El ARN en todos los casos, fue elaborado usando Trizol.

Se deben utilizar morteros libres de RNasas, a continuación, se trituran 300 mg de material vegetal con nitrógeno (N₂) líquido hasta obtener un polvo fino, posteriormente se resuspende el tejido macerado en 1 ml de Trizol, la muestra se deja a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la completa disociación de los complejos nucleoprotéicos, se adiciona 0.2 ml de cloroformo, se agitan los tubos durante 15 segundos y se dejan 3 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugan a 12,000 x g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo y se añade 0.5 ml de isopropanol, la muestra se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifuga a 12,000 x g durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente el sobrenadante se retira y el pellet se lava con etanol fresco al 75%, por último se centrifuga la muestra a 7,500 x g durante 5 minutos a 4°C, se retira el sobrenadante, se deja secar el pellet a temperatura ambiente durante 15 minutos y se resuspende el ARN en agua *milli-Q* libre de RNasas.

6.3.10 Elaboración de cDNA

Para la elaboración del cDNA se usaron las muestras de ARN obtenidas como se indica en el apartado anterior y el *Kit QuantiTect® Reverse Transcription*, siguiendo el protocolo de QIAGEN (*Handbook For cDNA synthesis with integrated removal of genomic DNA contamination. For use in real-time two-step RT-PCR*).

6.3.11 Transformación transiente en protoplastos de maíz

Para el aislamiento de protoplastos, se utilizó la hoja 2 de plantas de la línea híbrida B73 x MO17 crecidas durante 13 días en condiciones de oscuridad a 28°C y con un 70% de humedad.

El material conformado por grupos de 12 hojas debe ser cortado cuidadosamente con cuchillas quirúrgicas y sobre una superficie de vidrio para evitar causar herida ya que

reduce la eficiencia de obtención de protoplastos. Las finas capas del material vegetal cortado, se colocan en un erlenmeyer con la solución enzimática, posteriormente se les aplica vacío durante 15 minutos. El erlenmeyer con el material vegetal se pone en agitación a 50 rpm, durante 2.5 horas en oscuridad, luego para liberar los protoplastos se aumentan las revoluciones por minuto a 90 durante 30 minutos más. Los protoplastos son filtrados a través de un filtro de 35µm de poro y lavados con 10 ml de *buffer A*. A continuación se da un *spin* a 1000 rpm por 2 minutos y se remueve el sobrenadante cuidadosamente para no tocar el pellet (protoplastos) dejando 1 ml de *buffer A*. Se lavan con 10 ml de *buffer A*, se resuspenden delicadamente, de nuevo se llevan a la centrifuga a 1000 rpm por 2 minutos y se repite el lavado una vez más. La transformación de los protoplastos se realiza mediante electroporación de la siguiente forma: se adiciona 20 µg de ADN y *buffer A* a las cubetas de electroporar de 2mm (150ul en total), se mezcla el ADN con el *buffer A* y luego se adiciona 150 µl de protoplastos (1-2x10⁵), se mezcla con cuidado y posteriormente se electroporan a 0.15V, con dos pulsos a 200 UF. Los protoplastos electroporados se recuperan de la cubeta con 700 µl de *buffer A* y se transfieren a nuevo tubo. Por último, las muestras deben ser guardadas durante 14 horas a temperatura ambiente, en oscuridad y en posición horizontal.

Reactivos:

Buffer A: 0.6M Manitol, 10mM KCL, 10mM MES.

Solución enzimática: 10 ml de *buffer A*, Celulasa 0.3g, macerozima 0.06g. Resuspender en el *buffer A* la celulasa y la macerozima con una espátula. Nota: No usar vórtex, ya que las enzimas son sensibles al oxígeno. Incubar la solución enzimática 10 minutos a 55°C, llevar a temperatura ambiente colocando la solución sobre hielo. Adicionar 50ul 1M CaCl₂ y 100ul 10% BSA, mezclar cuidadosamente. Darle un *Spin* a la solución enzimática por 1 minuto a 4000 rpm antes de usar.

Equipamento: 35µm *mesh*, cuchillas quirúrgicas, superficie de vidrio para cortar, erlenmeyer.

6.3.12 Transformación transitoria por biolística en epidermis de cebolla

Para la preparación de la muestra biológica, las células epidérmicas de escamas de bulbo de cebolla se colocan en placas con medio MS con Manitol, 4 horas antes de bombardear. La preparación de partículas de oro se realiza de la siguiente manera: En un *ependorf* de 1,5 ml de la marca *Treff Lab*, se pesan 60 mg de partículas y se añade 1 ml de EtOH HPLC. El oro es agitado en un vórtex durante 10 minutos. A continuación se centrifugan las partículas de oro 1 minuto a 10000 rpm y se descarta el sobrenadante. Posteriormente, se añade 1 ml de glicerol estéril 50% al *ependorf* que contiene las partículas de oro y luego, el *ependorf* se agita con vórtex durante 30 segundos. El paso 2 es repetido y se realizan dos lavados más con glicerol. Las partículas de oro se resuspenden en 1 ml de glicerol estéril 50%, y se agitan con vórtex durante 1 minuto. Finalmente, se reparten alícuotas de 20 μ l que son mantenidas a -20°C hasta su uso.

Para realizar la precipitación del ADN, las partículas de oro preparadas anteriormente son sonicadas durante 15 segundos antes de ser utilizadas, a continuación se agitan con vórtex las partículas (20 μ l), y se añaden al mismo tiempo (todo en frío y en agitación): 1,5 μ g/ μ l de DNA (en un total de aproximadamente 10 μ l), 50 μ l CaCl₂ 2.5 M, 20 μ l espermidina 0,1 M, este paso se realiza durante 10 minutos, posteriormente las muestras se incuban 15 min en hielo, luego se da un *spin* de centrifuga, se descarta el sobrenadante y se añade 250 μ l de EtOH HPLC frío. Las muestras se agitan manualmente de 3-5 minutos. Posteriormente se realiza un *spin* de centrifuga 15 segundos a 5000 rpm y se descarta el sobrenadante. A continuación se añade 120 μ l de EtOH HPLC frío y se incuban las muestras hasta el momento de bombardear. Sobre la membrana utilizada para el bombardeo, se colocan 10 μ l de las partículas de oro que contienen el ADN y la membrana se deja secar de 5-10 minutos. Las epidermis de cebolla son bombardeadas con el *PDS1000/He*, realizando dos disparos por cada placa Petri, girando la placa 90° entre cada disparo. Y finalmente la epidermis bombardeada es incubada en oscuridad a 22-24 °C durante 16-24 horas.

6.3.13 Transformación transitoria de hojas de tabaco mediante infiltración de *Agrobacterium*

La cepa de *Agrobacterium* es transformada por choque térmico con las construcciones de interés, luego se siembran y se dejan 2 días a 28°C. Posteriormente, se inocula una colonia en 30 ml de medio YEB Rif-Kana y se deja toda la noche a 28°C en agitación a 250 rpm. Al día siguiente el cultivo es centrifugado, y se diluye el pellet en la solución de inducción, se deja a temperatura ambiente durante 2 horas y finalmente se infiltra el *Agrobacterium* con una jeringa de 2 ml en las hojas de las plantas de tabaco (*Nicotiana Benthamiana*) de un mes.

Buffer de inducción (200ml): 196 ml de agua Mili-Q, 2 ml de MgCl₂ 1M, 2 ml MES 1M, pH 5,6 con KOH, 200 µl de Acetosiringona.

6.3.14 Obtención de proteínas recombinantes

En la presente tesis fueron producidas dos tipos de proteínas recombinantes: unas fusionadas a una etiqueta de 6×His y otras fusionadas a GST. Las primeras sirvieron para la obtención de dos anticuerpos policlonales contra la proteína ZmZIM91 y el estudio de su actividad quinasa *in vitro* e *in vivo*, y las segundas para realizar la purificación del anticuerpo producido contra la proteína ZmZIM91. En ambos casos la sobre-expresión se llevó a cabo en la cepa bacteriana *E. coli* BL21.

6.3.14.1 Sobreexpresión de proteínas recombinantes fusionadas a His o GST en *E.Coli* BL21

Inicialmente, se transforman las células competentes de *E.coli* BL21 con las construcciones y se seleccionan en placas con la resistencia adecuada. Se inocula una colonia en 4 ml LB-antibiótico correspondiente y se incuba toda la noche a 37°C a 250 rpm. Posteriormente, se inocula 1 ml cultivo en 500 ml de LB con la resistencia adecuada (dilución 1:50), se deja crecer a 37° C hasta que alcance una OD₆₀₀ de 0,7-0,8 (tarda unas 2h). Se guarda una alícuota de 1ml de cultivo (control negativo pre-inducción). Luego se lleva a cabo una inducción con IPTG 1mM (alternativamente se puede utilizar 0,5 mM IPTG, el crecimiento de la bacterias es más lento pero favorece la

producción de las proteínas en la fracción soluble más que en los cuerpos de inclusión) y se deja crecer de 3-5 horas a 37°C en agitación a 250 rpm. Se centrifuga el cultivo a 6500 rpm durante 15 min a 4°C, se recoge el pellet bacteriano y se guarda a -20 °C para su posterior purificación.

6.3.14.1.1 Extracción y purificación de proteínas recombinantes fusionadas a His o GST y sobreexpresadas en *E.Coli* BL21

Las proteínas producidas durante el desarrollo de esta tesis se encontraban en la fracción soluble. Se procedió entonces a su extracción y purificación, usando los protocolos específicos para proteínas fusionadas a 6×His o a GST.

6.3.14.1.2 Obtención de proteínas recombinantes fusionadas a His

La extracción de proteínas bacterianas y purificación se hizo siguiendo el protocolo de Quiagen para obtención de proteínas fusionadas a *His-tag*.

La proteína de interés se expresa como una proteína de fusión con el marcador *His-Tag* en su extremo N-terminal. Este marcador interacciona con el NiSO₄ presente en la resina con la que se purifica la proteína, que se eluye con una solución que contiene imidazol, el cual disrupta la interacción anterior. Se utiliza una columna *Poly-Prep® Chromatography* (BioRad) equilibrada con la resina comercial *Chelating Sepharose Fast Flow* (Amersham Biosciences) cargada con iones Ni²⁺. Los pasos para equilibrar la columna son los siguientes: Se añade 500 µl de resina *Chelating Sepharose Fast Flow* a la columna, posteriormente se lava la columna con 10 ml de agua destilada y se pasan 20 ml de *Charger buffer* 1X en dos pasos de 10 ml cada uno, luego se pasan 10 ml de *binding buffer* para quitar el exceso de níquel de la columna y finalmente se pasa la muestra por la columna. Para la elución de la muestra, se lava la columna con 5 ml de *wash buffer* a 20 mM, 40 mM, 60 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM y 500 mM de imidazol, se recogen las fracciones y se realiza un gel SDS-PAGE que se tiñe con *Coomassie blue* para detectar la fracción que contiene la mayor concentración de proteína y la mayor pureza. Todos los pasos se realizan a 4°C.

Tampón de carga 8X : 50 mM NiSO₄.

Tampones de lavado: 20 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,5 M NaCl, entre >20 y <100 mM imidazol.

Tampones de elución: 20 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,5 M NaCl, entre 100 mM y hasta 1 M imidazol.

6.3.14.1.3 Obtención de proteínas recombinantes fusionadas a GST

El pellet bacteriano se resuspende en 20 ml de tampón NETN suplementado con los inhibidores de proteasas 1 mM de PMSF, 1 μ M de pepstatina, 2 μ g/ml de aprotinina y 2 μ g/ml de leupeptina. A continuación, se realiza la sonicación del pellet resuspendido 3x45 segundos con una potencia 4-5 al 50-60%, manteniendo la muestra en hielo. Luego, se centrifuga la muestra a 3500 rpm durante 30 min a 4°C, se recupera el sobrenadante y se repite la centrifugación, se vuelve a recuperar el sobrenadante y se guarda a 4°C hasta el momento de la purificación.

La preparación de la resina GSH-sefarosa e inmovilización de las proteínas recombinantes fusionadas a GST se lleva a cabo siguiendo los pasos mencionados a continuación: Se lava 1 ml de 'slurry' al 50% de resina GSH-sefarosa (*Amersham Pharmacia Biotech*) con 3x5 ml (10 vol.) de NENT. Entre lavado y lavado se dejan precipitar las bolas por gravedad, a las que se les añade el lisado obtenido en el apartado anterior (unos 20 ml) y se mantienen en rotación a 4°C durante 14 horas. Al día siguiente las bolas se lavan con 3x2 ml (4 volúmenes) de NENT-0,7 M NaCl, 3x4 volúmenes de NENT y 2x4 volúmenes de tampón TST. Por último la proteína se eluye usando 2 ml de *Glutathione Elute Buffer* frío.

Tampón NaCl-EDTA-Tris-NP40 (NETN): 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 20 mM Tris-HCl pH 8, 0,5% NP40.

Tampón TST: 50 mM Tris-HCl pH 8, 0,15 M NaCl, 0,1% Triton X-100.

Glutathione Elute Buffer: 50 mM Tris-HCl, 30 mM Reduced Glutathione, pH 8.0.

6.3.15 Obtención de anticuerpos policlonales contra la proteína ZmZIM91

La producción de los dos anticuerpos contra la proteína ZmZIM91 fue realizada en el servicio de animalario del Centro de Investigación y Desarrollo (CID-CSIC).

Se inmunizaron dos conejos con tres inyecciones subcutáneas de 150 µg (1 ml) de proteína recombinante ZmZIM91 purificada por gel de acrilamida y disuelta en 50 mM Tris-HCl pH 7,5. Antes de comenzar la inmunización de los conejos, se les extrajo sangre para obtener suero preinmune. Después de la primera dosis, el resto de dosis se inyectaron en intervalos de tres semanas, tras las cuales se procedió a desangrar a los animales. La sangre extraída proveniente de cada conejo, fue alícuotada en tubos de 1 ml que fueron guardados a -80 °C para su adecuada conservación.

6.3.16 Purificación de anticuerpos policlonales contra la proteína ZmZIM91

Los anticuerpos específicos de ZmZIM91 fueron purificados siguiendo el método descrito por Bar-Peled (Bar- Peled y Raikhel, 1996). La resina sefarosa *GSH-sepharose resin* (1 ml de 50% “*slurry*”) (Qiagen, Valencia, CA) debe ser equilibrada con *buffer* (50 mM Tris pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.5 % Triton-X). A continuación la resina se incuba con la proteína ZmZIM91 fusionada a GST durante dos horas en rotación a 4°C. Posteriormente, la resina se recupera por centrifugación (500g, 2 minutos) y se lava cinco veces con 10 ml de *buffer*. Seguido al paso de lavado, únicamente la GST o la proteína fucionada a GST permanece unida a la resina sefarosa GSH. Para la unión covalente a las bolas de sefarosa GSH de la proteína ZmZIM91 fusionada a GST, la resina es lavada dos veces con 10 ml de 0.2 M borato-NaOH (pH 8.6), cada 5 minutos. El sobrenadante se remueve después de la centrifugación (500g, 2 minutos), y se adiciona 2 ml de solución fresca de DMP (2 ml 0.2 M trietanolamina, pH 8.3; 15.5 mg de dimetil pimelimidato-HCl, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a 1 ml de resina (la concentración final de DMP debe ser de 20 mM). Después de 30 minutos de mezcla continua a temperatura ambiente, las muestras se centrifugan (500g, 2 minutos) y el sobrenadante se remueve. La reacción de unión se detiene con la adición de 0.2 M etanolamina-HCl (pH 8.2) por 1 hora, luego la resina se lava dos veces por 3 minutos

con 2 ml de 0.1 M glicina-HCl (pH 2.5), para remover las moléculas no unidas covalentemente. La resina se lava dos veces con 10 ml TBS (50 mM Tris pH 7.5; 150 mM NaCl). Posteriormente, se adiciona el anticuerpo de ZmZIM91 a la resina que tiene unida la proteína ZmZIM91 fusionada a la GST. Después de 4 horas de mezcla continua a 4°C, se realiza un *spin* de la resina (500g, 2 minutos, 4°C), se descarta el sobrenadante, y se lava la resina cinco veces, durante 5 minutos cada vez, con 10 ml de TBS frío, seguido por dos lavados con 1 ml de 0.1x TBS. Los anticuerpos específicos se eluyen incubando la resina durante 5 minutos con 0.5 ml de 0.1 M glicina-HCl (pH 2.5). El pH del anticuerpo eluido purificado se debe ajustar a 7 con 2 M Tris-HCl.

6.3.17 Análisis de proteínas mediante *western blot*

Para los tratamientos de MeJA y MeJA +MG132, fue usada la base de la hoja 2 de plantas de 9 días de la línea homocigótica B73 (4 cm a partir de la base de la hoja, donde según datos de RNA-Seq, habían mayores niveles de expresión de ZmZIM91 (Li *et al.*, 2010)), crecidas bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz a 28°C y 8 horas de oscuridad a 28°C, con un porcentaje de humedad del 60-70%. En cada caso se hicieron 3 réplicas biológicas usando grupos de 3 plantas para cada una.

Los tratamientos de las plantas de maíz con MeJA fueron realizados como se indica a continuación: Se esparce sobre las hojas de las plantas de maíz 0,01% de MeJA diluido en agua destilada (inicialmente el MeJA se diluye en DMSO hasta una concentración del 10%), con ayuda de un spray, de igual manera se llevan a cabo los tratamientos con el control con DMSO diluido en agua destilada.

En el caso de los tratamientos de plantas de maíz con MeJA +MG132, se siguieron los mismos pasos que para los tratamientos con MeJA. Los tratamientos fueron hechos con 0,01% de MeJA mezclado con 100 µM de MG132 y diluidos en agua destilada. Para el control se usa DMSO diluido en agua destilada.

Para llevar a cabo el análisis de la proteína ZmZIM91 *in vivo*, se utilizó el anticuerpo purificado ZmZIM91#1.

6.3.17.1 Obtención de extractos proteicos vegetales

Se obtuvieron extractos proteicos de hoja de maíz de 9 días llevando a cabo el siguiente procedimiento: Se tritura en un mortero el tejido congelado con nitrógeno líquido. Se transfiere el material pulverizado a un *ependorf*. Se añade el tampón de extracción que debe ser aproximadamente un tercio del volumen de material pulverizado, y se realiza un vórtex vigoroso cada 3 minutos durante 20 minutos, manteniendo las muestras en hielo. Finalmente, se centrifugan las muestras a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se transfieren los sobrenadantes a nuevos tubos *ependorf*. Los extractos de proteína se pueden guardar a -20°C.

Tampón de extracción de proteínas: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 150 mM de NaCl, 5X de inhibidores de proteasas.

6.3.17.2 Cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas se utilizó el método estándar descrito por Bradford (1976). Su rango de detección varía entre 1-20 µg/ml y se basa en el cálculo de una recta de regresión a partir de una serie de diluciones de concentración conocida.

6.3.17.3 Electroforesis de proteínas en gel SDS-PAGE y tinción de *comassie*

La electroforesis en gel desnaturante de SDS/poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó según Sambrook y col. (1989), utilizando los sistemas *Miniprotean* Gel-2 y 3 (Biorad), con espaciadores de 1,5 mm. El voltaje utilizado fue de 80-100 V.

Soluciones:

- *Lower Buffer*: 1,5 M Tris HCl pH 8,8; 0,4% SDS
- *Upper Buffer*: 0,5 M Tris HCl pH 6,8; 0,4% SDS
- Tampón de electroforesis 10X: 1,92 M glicina; 0,25 M Tris HCl, pH 8,3; 1% SDS
- Tampón de muestras 2X: 125 mM Tris HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol; 0,04% azul de bromofenol

- Poliacrilamida (SDS-PAGE)

6.3.17.4 Visualización de las proteínas por tinción de *coomassie*

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñe con una solución de azul de *Coomassie* durante 20 minutos a temperatura ambiente y luego se destiñe con metanol/acético/agua (30:10:60), hasta poder ver las bandas de proteínas.

Solución de Coomassie: 50% (p/v) ácido tricloroacético; 0,45% (p/v) *Coomassie Brilliant Blue* (Sigma)

6.3.17.5 Transferencia de proteínas y tinción de *ponceau*

La transferencia de las proteínas separadas en gel SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa se realizó con el aparato *Transfer Blot Semidry* (Bio-Rad), durante 45 min y con un amperaje constante de 20V/gel. La transferencia se realiza con los elementos en el siguiente orden: papel *Whatman* 3MM, membrana de nitrocelulosa, gel de poliacrilamida y papel *Whatman* 3MM, todos ellos embebidos en tampón de transferencia.

Después de la transferencia, las membranas se tiñen con rojo *ponceau* para comprobar la correcta transferencia de las proteínas, para ello las membranas se sumergen en solución de *ponceau* durante 1 minuto en agitación suave. Posteriormente, se lavan las membranas con PBS 1X para quitar el exceso de *ponceau* y se bloquean con leche diluída en PBS 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de este procedimiento las membranas se incuban con el anticuerpo como se explica a continuación o también se pueden dejar secar y guardar para futuras hibridaciones con el anticuerpo de interés.

Solución de Ponceau: 0,1% Ponceau disuelto en 1% (v/v) ácido acético.

6.3.17.6 Hibridación e inmunodetección mediante ECL

Para la hibridación e inmunodetección mediante ECL, después del bloqueo de la membrana, se añade la solución con el anticuerpo primario y se incuba durante 14 horas a 4°C y en agitación suave. Al día siguiente se realizan 3 lavados de 10 minutos con 1X PBS-T. Se adiciona la solución con el anticuerpo secundario y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se realizan 3 lavados de 10 minutos con 1X PBS-T y se mantiene la membrana en PBS-T, hasta ser revelada utilizando el equipo LAS 4000. Los dos reactivos del kit de detección ECL (Amersham) en relación 1:1 (1 ml de mezcla por membrana) se mezclan y se reparten sobre la membrana que ha sido previamente colocada con la superficie donde están las proteínas hacia arriba, sobre un plástico transparente y finalmente se introduce dentro de LAS 4000, se selecciona las condiciones de preferencia que para este trabajo fueron en el caso de la detección del anticuerpo: Chemiluminescent, incremento, cada 10 segundos y en el caso de la membrana para obtener la imagen del marcador de color: White, precisión, 60 segundos. Finalmente se capturan las imágenes y se sobreponen ambas imágenes para identificar el tamaño de las bandas detectadas con el anticuerpo.

Soluciones:

PBS-T: 0,1% Tween 20 disuelto en 1X PBS.

Solución de bloqueo: 5% leche desnatada en polvo disuelta en PBS-T

6.3.18 Ensayos de fosforilación

Se realizaron dos diferentes tipos de ensayos de fosforilación: en primer lugar, ensayos quinasa en tubo y en segundo, ensayos quinasa en gel. Con los primeros se comprobó la actividad *in vitro* de ZmZIM91 por la proteína quinasa CK2 de maíz, para lo que se usaron proteínas que estaban fusionadas a una etiqueta 6×His. En este ensayo se probó tanto la fosforilación de ZmZIM91 por la subunidad catalítica CK2 α 1 como por el holoenzima CK2 α 1 β 1.

Por otra parte, el ensayo quinasa en gel permitió analizar la actividad de transfosforilación de las proteínas quinasas nativas, presentes en extractos crudos de proteínas de plántulas de maíz de 6 días frente a ZmZIM91.

6.3.18.1 Ensayo quinasa *in vitro*

Los experimentos de fosforilación *in vitro* se llevaron a cabo utilizando las proteínas ZmZIM91, CK2 β 1 y CK2 α 1 sobre expresadas en *E.coli* e incubadas con ATP frío (el holoenzima CK2 α 1 β 1 fue reconstituido antes de realizar el ensayo) y posteriormente se llevó a cabo un ensayo de fosforilación *in vitro* con [γ 33P]-ATP.

Para los ensayos de fosforilación con la proteína quinasa CK2 de maíz, se usó 0,4 μ g de proteína purificada ZmZIM91, adicionando 2 pmol de subunidad catalítica CK2 α sola y también con 2 pmol de subunidad CK2 β (la quinasa se dejó previamente a temperatura ambiente por 30 minutos para permitir su reconstitución) en un volumen total de 30 μ l de tampón CK2 (8.9 mM de MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 27 mM de β -glicerolfosfato, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.08 mM ATP y 3 μ Ci [γ 33P]-ATP).

Las muestras se incuban 20 minutos a 30°C. La reacción de fosforilación se detiene adicionando tampón de carga a las muestras, posteriormente se cargan las proteínas en un gel SDS-PAGE al 15%, que es teñido con *Coomassie blue* y desteñido con ácido acético y que finalmente se seca con una bomba de vacío, para su exposición en una pantalla de *phosphorimager*. Tras 1 hora, la pantalla se revela utilizando un equipo llamado STORM que permite capturar la imagen.

6.3.18.2 Ensayo quinasa en gel

Para este ensayo fueron usadas raíces de maíz de 6 días de la variedad W64, tratadas con sequía y 100 μ M de MeJA, además de sus respectivos controles que en el caso del tratamiento con MeJA eran tratadas con DMSO. Los extractos fueron hechos el mismo día del experimento para ser usados frescos.

Se trituran 100 mg de material fresco con Nitrógeno líquido. El material triturado es resuspendido en 80 μ l del tampón de extracción. Las muestras se dejan en hielo durante

20 minutos, realizando vórtex cada 3 minutos. Posteriormente las muestras son centrifugadas a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y cuantificadas con *Bradford*.

Para cada ensayo se usan 50 µg de extracto de proteínas y se les adiciona tampón de carga 5X. Las muestras son hervidas durante 3 minutos y se mantienen en hielo mientras se cargan en un gel SDS-PAGE.

La técnica consiste en separar las proteínas procedentes de extractos de raíz de plántulas de maíz de 6 días tratadas con 100µM de MeJA y extractos de raíz de plántulas de maíz tratados con DMSO para usar como control, en un gel SDS-PAGE desnaturizante que contiene como sustrato copolimerizado la proteína purificada de ZmZIM91. Posteriormente, las proteínas son renaturalizadas en el gel realizando varios lavados y, por último, son sometidas al ensayo de fosforilación sumergiendo el gel en el tampón de reacción.

Tampón de extracción de proteínas: 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM DTT, 2mM Na₃VO₄, 2 mM NaF, 10 mM β-glicerolfosfato, 1 mM PMSF, 1 µM pepsatina, 2 µg/ml aprotinina, 2 µg/ml pepstatina, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 0,5 % Nonidet NP40.

6.3.18.2.1 Preparación del gel SDS-PAGE copolimerizado con ZmZIM91

Los geles SDS-PAGE se preparan como se indicó anteriormente, la única diferencia radica en que antes de añadir el APS y el TEMED, se deben incorporar 0,25 mg/ml de la proteína ZmZIM91 purificada. Los componentes del gel con la proteína deben mezclarse bien con el fin de que el sustrato quede uniformemente repartido.

Los geles deben prepararse con un espesor de 0,75 mm. Además, es necesario utilizar un marcador de peso molecular visible que permita controlar la posterior identificación del tamaño de las proteínas de interés. Las muestras utilizadas para realizar este ensayo fueron extractos de raíces de plantas de maíz de 6 días tratadas y control.

6.3.18.2.2 Renaturalización y reacción de fosforilación

Al finalizar la electroforesis de los geles de proteína, se procede a realizar lavados de estos geles de 30 minutos cada uno, con 150 ml (3x50 ml) de tampón A en agitación y a temperatura ambiente, para eliminar el SDS. Posteriormente se da inicio al proceso de renaturalización de las proteínas, realizando tres lavados con 150 ml de tampón B (3x50 ml), los dos primeros de 30 min y el último durante 14 horas, en agitación y a 4°C.

Antes de iniciar la reacción, el gel se lava una vez más con 50 ml de tampón C durante 30 min y temperatura ambiente. Se incuba en 10 ml de tampón C que contiene 25 µM de ATP y 10 µl de [γ 33P]-ATP, durante 1 hora a temperatura ambiente. El [γ 33P]-ATP no unido covalentemente a las proteínas se elimina realizando diez lavados de 30 min con 500 ml (10x50 ml) de tampón D, en agitación y a temperatura ambiente (hasta detectar una señal de unas 10-20 cpm). Estos lavados también permiten fijar las proteínas al gel. Por último, el gel debe secarse y exponerse en una pantalla de *Phosphorimager* durante 3 días.

Tampón A: 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 mM DTT, 0,1 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 0,5 mg/ml BSA, 1% Triton X-100.

Tampón B: 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 0,1 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF.

Tampón C: 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 2 mM EGTA, 0,1 mM Na₃VO₄, 12 mM MgCl₂.

Tampón D: 5% TCA, 1% Na₂PPi.

6.3.18.2.3 Tratamiento de geles quinasa en gel con DRB

Con el fin de identificar la banda correspondiente a la proteína quinasa CK2 en los geles de fosforilación *in vivo*, se utilizó el inhibidor específico de CK2 (DRB). Este compuesto se debe adicionar en el último lavado con el tampón C, antes de la incubación con el [γ 33P]-ATP, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La concentración utilizada de DRB para los experimentos realizados en este trabajo fue de 50 μ M y los geles control fueron incubados con DMSO (dimetil sulfoxido) ya que el DRB fue diluido en DMSO.

6.3.19 Ensayos de interacción proteína-proteína

6.3.19.1 Sistema de doble híbrido

Para la detección de la interacción entre dos proteínas mediante la técnica de doble híbrido, se utilizó la cepa *S.cerevisiae* AH109 incluida dentro del sistema MATCHMAKER *Two-hybrid 3* de Clontech. Esta cepa contiene tres genes reporteros: His3, Ade1 y X-Gal. El hecho de presentar un tercer marcador reduce la posibilidad de falsos positivos respecto al sistema original, que no más presenta como marcadores His3 y X-Gal. Los experimentos de transformación, selección se realizan según los protocolos estándar del sistema MATCHMAKER de Clontech.

En este trabajo, para clonar en el vector pGBKT7 se utilizaron las dianas EcoRI-SalI, mientras que para clonar en el vector pGADT7 se usaron EcoRI/SalI o XhoI/SalI dependiendo del inserto.

6.3.19.2 Complementación Bimolecular

Las secuencias utilizadas para este experimento fueron clonadas en dos plásmidos pENTRY3C modificados para Complementación Bimolecular (BiFC) GATEWAY desarrollados por A. Ferrando (<http://www.ibmcp.upv.es/FerrandoLabVectors.php>, López-Paz *et al.* (2009)) y fueron transfectados tanto en plantas de *N. benthamiana* como en protoplastos de maíz. La detección de la YFP se hizo con el microscopio Confocal Olympus.

6.3.19.3 Ensayo de interacción ‘TnT pull-down’

El ensayo ‘TnT pull-down’ se empleó para confirmar la interacción entre ZmZIM91 y la proteína quinasa CK2. Este experimento permite establecer la interacción directa *in vitro* entre proteínas.

En primer lugar se inmovilizaron en resina GSH-sefarosa las proteínas GST:CK2β1, GST:CK2β2, GST:CK2β3 y GST:CK2α1 y GST para utilizarla como control, y se transcribió y tradujo *in vitro* la proteína ZmZIM91, que estaba clonada en el vector de expresión pET28. Para ello se usó el *kit TnT® Coupled Reticulocyte Lysate System* (Promega), que incluye todos los reactivos necesarios para realizar la reacción excepto la metionina marcada con ³⁵S ([³⁵S]-Met).

Debido a que no se puede cuantificar la cantidad de proteína inmovilizada en la resina, se cargaron entre 5 y 10 µl de cada una de las resinas de las proteínas fusionadas a GST junto con una muestra que contenía 1 µg de BSA en un gel SDS-PAGE que posteriormente se tiñó con Comassie y que permitió determinar la concentración de proteína en la resina comparando la intensidad de las distintas bandas. Para el experimento usó aproximadamente 1 µg de proteína fusionada a resina.

Procedimiento:

En primer lugar, se realiza bajo campana, la transcripción y traducción *in vitro* de ZmZIM91 clonada en el vector pET28 en un volumen final de 100 µl (20 µl para cada proteína inmovilizada), usando para ello los siguientes reactivos y componentes:

1,5 µg DNA molde (vector pET28)
30 µl Rabbit Reticulocyte Lysate
2,4 µl Reaction Buffer
1,2 µl RNA polymerase
1,2 µl Aminoacid mixture minus Met
1,2 µl RNAasin
3 µl [³⁵S]-Met

Esta reacción se incubó durante 2 horas a 30°C. Luego, en un *ependorf* de 0,5 ml, se mezcla 1 µg (aprox.) de proteína recombinante inmovilizada en la resina GSH-sefarosa con el volumen necesario de resina lavada y resuspendida con TST para obtener 40 µl de 'slurry' al 50%. Posteriormente, se añade al 'slurry' 200 µl de tampón de unión, 0,24 µl de 1M de DTT, 3 µl de suero pre-inmune y 3 µl de 100 mM de PSMF y se incubó en rotación durante 1 hora a 4°C. A continuación se incorpora 20 µl de reacción TnT a la

resina y se incuba en rotación durante aproximadamente 14 horas a 4°C. La resina es lavada 4 veces con 0,5 ml con tampón RIPA, se mezcla por inversión y se deja precipitar por gravedad manteniendo la muestra en hielo. Luego se descartar el sobrenadante y se resuspende en 30 µl de 2X tampón de muestras, se deja hervir durante 3 minutos y se mantiene en hielo durante 5 minutos más. Se da un pulso de centrifuga (30 segundos a velocidad máxima) y se carga de 25-30 µl de sobrenadante en un gel SDS-PAGE. Finalmente, tras la separación, se seca el gel y se expone toda la noche, en una pantalla de *phosphorimager*.

Tampón de unión: 20 mM HEPES pH 7,9, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 10% glicerol, 0,2% NP40.

Tampón RIPA: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,2% NP40.

6.3.20 Determinación de motivos de unión a ADN mediante la técnica unión de proteínas a un microarray de ADN (PBM11)

La elaboración del experimento de PBM11 de ZmZIM91 y AtZIM fue llevado a cabo en colaboración con el Dr. José Manuel Franco, la Dra. Irene Vidrieros y el Dr. Roberto Solano del Servicio de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid. La técnica de PBM11 se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Godoy *et al.* (2011) (Figura 6-2). Para ello se usan las proteínas sobre-expresadas (en este caso ZmZIM91_MBP y AtZIM_MBP), sin purificar, las que son hibridadas durante 2.5 horas a temperatura ambiente con un microarray que contiene secuencias de ADN independientes (11-*mers* en todas las posibles dobles cadenas, 4.2 millones compactadas en 240,000 puntos). Posteriormente, el microarray se lava varias veces y se incuba con un anticuerpo primario contra la proteína de unión a la maltosa (MBP) y un secundario marcado con un fluoroforo (*DyLight 549*). Finalmente, el microarray se procesa usando un escáner GenePix 4000B y la intensidad de la señal se cuantifica con el *software* GenePix Pro 5.1, generando los consensos de unión de ADN de las proteínas estudiadas.

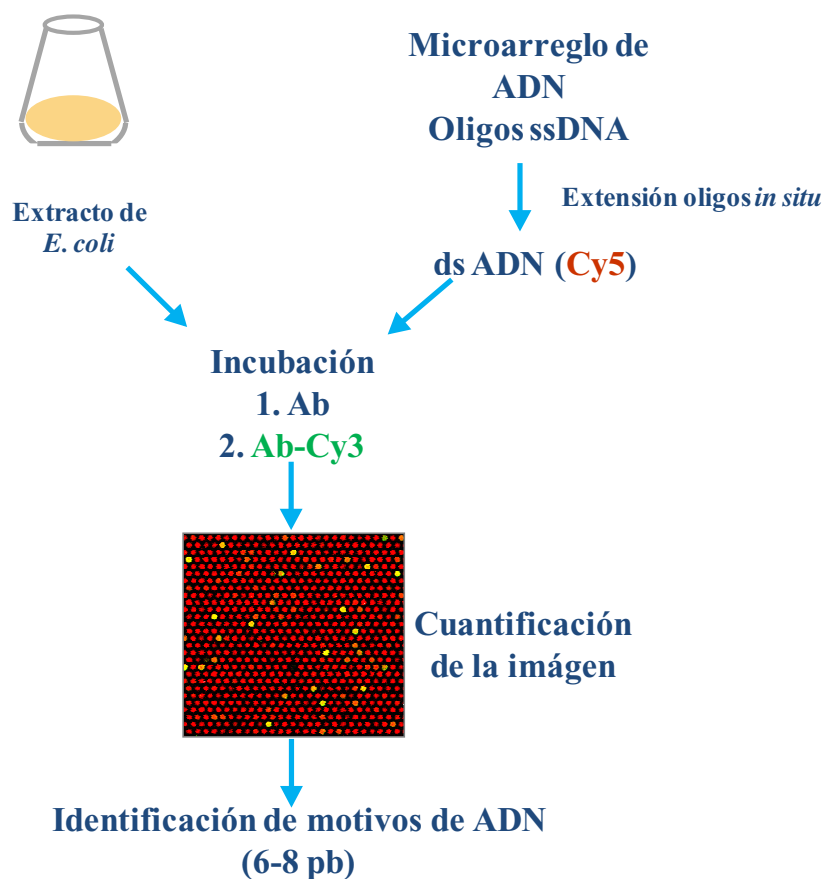


Figura 6-2. Pasos realizados para la detección de motivos de unión de ADN de factores de transcripción mediante la técnica unión de proteínas a un microarray de ADN (PBM11).

6.3.21 Experimentos de Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Todos los experimentos de ChIP tanto de hojas como de protoplastos de maíz fueron realizados en colaboración con el Dr. Kengo Morohashi y la Dra. Antje Feller, investigadores post-doctorales en el laboratorio del Dr. Erich Grotewold, *Department of Molecular Genetics, Ohio State University, Columbus, Ohio, USA*, siguiendo el protocolo descrito por Morohashi en el 2007, pero con modificaciones.

6.3.21.1 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) a partir de protoplastos transfectados con 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::GFP. Versión 1.0

Aquí se explica el primer protocolo generado para la realización de ChIP de protoplastos.

El material empleado para la realización de los ChIPs son protoplastos de maíz de plantas etioladas de la variedad MO17xB73 de 13 días. Los protoplastos se aíslan como y se transfectan con las construcciones de interés (para este caso con 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::GFP). Al día siguiente de la transformación de los protoplastos, se realiza un conteo de la cantidad de protoplastos transformados usando microscopio confocal y una cámara de malassez y se estima la eficiencia de transformación (debe ser mayor a 65%). Posteriormente, se procede a realizar el *crosslinking* del material adicionando 100 μ l *buffer A* (es el mismo que se usa para los protoplastos) que además contiene 1 mM de PMSF, 1% de Formaldehido y 0.25% de BSA. A continuación se aplica vacío durante 10 minutos, y se añade 2 M de glicina y posteriormente se continúa con la incubación en vacío por 5 minutos más. Luego se realizan dos lavados con el *buffer A* (1ml), se centrifugan las muestras a 2000 rpm por 2.5 minutos, se retira el sobrenadante y se guardan los protoplastos a -80°C hasta su uso.

Los protoplastos prepreparados, son resuspendidos en 500 μ l de *lysis buffer* para obtener el extracto de cromatina, luego a la muestra se le realiza vórtex durante 30 segundos y posteriormente, se lleva a cabo la fragmentación de la cromatina a un rango de 100–1,000 bp (~500 bp en promedio) mediante sonicación empleando un *Biorupter* (UCD-200TM, Diagenode Inc.) con las siguientes condiciones: 30 sec ON y 30 sec OFF al nivel de poder H por 30 minutos y se centrifuga el material a 10,000 \times g por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, el sobrenadante se incuba con 30 μ l de espermatozoos de salmón/proteína agarosa A durante 4 horas con rotación a 4°C. La muestra es centrifugada a 3.000 rpm durante 1 minuto a 4°C.

El sobrenadante es transferido a cinco tubos nuevos con 100 μ l cada uno, a los que se les adiciona el respectivo anticuerpo y se incuban durante aproximadamente 14 horas en rotación a 4°C. Adicionalmente, se guarda una pequeña cantidad de extracto como fracción de Input.

Nota. Para esta investigación, en cada inmunoprecipitación se usó 100 μ l de extracto de cromatina y la cantidad de anticuerpo que se menciona a continuación: 2 μ l o 1 mg de IgG (abcam), 2 μ l o 1 mg de histona H3 (abcam), 0.5 μ l de anticuerpo contra la GFP (abcam), 5 μ l o 1 mg de anticuerpo purificado contra ZmZIM91.

Al siguiente día, a cada uno de los extractos de protoplastos incubados con los anticuerpos (100 µl) se les adiciona 40 µl de esperma de salmón *ADN/Protein A-agarose beads* (Upstate Biotechnology, Charlottesville, VA) y se continúa con la incubación durante 4 horas más a 4°C. Luego, las muestras son centrifugadas durante 1 minuto a 3.000 rpm y el sobrenadante es descartado.

Después de la incubación, las *beads* son lavadas dos veces con 0.5 ml de *lysis buffer*, dos veces con LNDET y finalmente dos veces con TE. Las *beads* lavadas y la fracción de Input son resuspendidas en *elution buffer* e incubados durante 14 horas a 65°C para llevar a cabo el *reverse-crosslinking* del inmunoprecipitado (para que las proteínas se degraden y queden solo los fragmentos de ADN que han sido inmunoprecipitados).

Finalmente el ADN del CHIP y el ADN del Input es purificado usando el *PCR Purification kit* (Qiagen, Valencia, CA).

Soluciones:

Lysis buffer: 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% deoxycholate, 0.1% SDS, 10 mM Na butyrate, 1 mM PMSF, 1X plant proteinase inhibidor cocktail (sigma).

Buffer A: 0.6M Manitol, 10mM KCL, 10mM MES.

LNDET: 0.25 M LiCl, 1% NP40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA.

TE: 10 mM Tris-Cl, pH 7.5. 1 mM EDTA.

Elution buffer: 1% SDS, 0.1 M NaHCO₃, 1 mg/ml proteinase K.

6.3.21.2 Inmunoprecipitación de la cromatina (CHIP) a partir de protoplastos transfectados con 35S::ZmZIM91:GFP y 35::GFP. Versión 2.0

Este protocolo ha sido adaptado del protocolo para *chromatin immunoprecipitation* para material de plantas con *Dynabeads* descrito por el Dr. Kengo Morohashi (morohashi.1@osu.edu).

Cada experimento individual de CHIP se realizó a partir de aproximadamente 3×10^5 protoplastos de maíz transformados con el DNA de interés (con un porcentaje de eficiencia de transformación superior al 60%), provenientes de la mezcla de tres transformaciones independientes de 1×10^5 protoplastos de maíz.

El primer paso para iniciar este protocolo, es la preparación de las *Dynabeads/Protein A* (Invitrogen). Las *Dynabeads* se resuspenden delicadamente, posteriormente se transfirieron 30 μ l de *Dynabeads* a un *ependorf* de 1.5 ml por cada anticuerpo, al mismo tiempo en otro *ependorf* de 1.5 ml se adiciona 90 μ l de *Dynabeads* en caso de tener tres muestras: anticuerpo 1, anticuerpo 2 e Input.

A continuación, se lava cada tubo que contiene las *Dynabeads* dos veces con 500 μ l de *lysis buffer*, poniendo cada vez los tubos en un soporte magnético durante 30 segundos y descartando el sobrenadante. Antes de retirar el sobrenadante del último lavado, los tubos con las *Dynabeads* se mantienen en el soporte magnético, mientras en tubos nuevos *ependorf* de 1.5 ml se prepara una mezcla de 100 μ l *blocking buffer* con 1 μ l (or 1 μ g) de cada anticuerpo (en el caso del antiGFP se adicionaron 0,5 μ l y para el anti91 10 μ l). Posteriormente, se transfiere la mezcla del *blocking buffer* con el anticuerpo en las *Dynabeads* lavadas y se incuban durante 14 horas en rotación a 4°C. Por otra parte, se adiciona 300 μ l de *blocking buffer* sin anticuerpo en el tubo que contiene los 90 μ l de *Dynabeads* y se incuba durante 14 horas en rotación a 4°C (las *Dynabeads* sin anticuerpo serán usadas al día siguiente para la *preclearation* de las muestras a usar en las inmunoprecipitaciones).

En este caso el material empleado para la realización de los ChIPs fueron protoplastos de plantas de maíz etioladas de la variedad MO17xB73 de 13 días. Los protoplastos fueron aislados y transfectados con 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::GFP. Posterior a la obtención de los protoplastos transformados, se procedió a realizar el *crosslinking* del material adicionando 100 μ l *buffer A* (es el mismo que se usa para los protoplastos) que además debe contener 1 mM de PMSF, 1% de formaldehído y 0.25% de BSA. A continuación se aplica vacío por 10 minutos, y se añade 2 M de glicina y se continúa con la incubación en vacío por 5 minutos más. Luego se realizan dos lavados con el *buffer A* (1ml), se centrifugan las muestras a 2000 rpm por 2.5 minutos, se retira el sobrenadante y se guardan los protoplastos a -80°C hasta su uso.

Las muestras se resuspenden en 500 µl de *lysis buffer* para realizar la preparación del extracto de cromatina, luego se les da un vórtex durante 30 segundos y posteriormente, se realiza la fragmentación de la cromatina a un rango de 100–1,000 bp (~500 bp en promedio) mediante sonicación empleando un *Biorupter* (UCD-200TM, Diagenode Inc.) con las siguientes condiciones: 30 sec ON y 30 sec OFF al nivel de poder H por 30 minutos y se centrifuga el material a 10,000 ×g por 10 minutos a 4°C. A continuación, se descarta el *blocking buffer* sin anticuerpo contenido en el *ependorf* con los 90 µl de *Dynabeads*, se le adiciona los 500 µl de extracto de cromatina generado anteriormente y se mantiene en incubación a 4 °C durante cuatro horas más.

Después de las cuatro horas de la incubación del extracto, los *ependorf* que tiene el *blocking buffer* con los anticuerpos, y el que contiene los 500 µl del extracto de cromatina, se colocan en el soporte magnético durante 30 segundos, se descarta el sobrenadante de los tubos que contienen el *blocking buffer* con los anticuerpos y se le adiciona a cada uno, 100 µl del extracto de cromatina que fue incubada el *ependorf* con los 90 µl de *Dynabeads*. Se debe almacenar 100 µl de la cromatina a 4°C para generar el Input. Las *Dynabeads* con los extractos de cromatina se incuban en rotación durante 14 horas a 4°C.

Posteriormente, los tubos incubados, se colocan en el soporte magnético durante 30 segundos y el sobrenadante es descartado. A continuación, se realizan 2 lavados con 0.5 ml de *lysis buffer*, 2 lavados con 0.5 ml de LNDET y 2 lavados con 0.5 ml de TE, utilizando siempre el soporte magnético. Las *Dynabeads* se resuspenden en 50 µl de *elution buffer* y son incubadas durante 10 minutos a 65°C, luego se colocan los tubos en el soporte magnético y se recuperan los 50 µl en un nuevo tubo *ependorf*, se repite el paso una vez más, para obtener un volumen final de 100 µl. Por otro lado, se adiciona 70 µl de *elution buffer* a 30 µl de extracto de cromatina inicial para producir el Input (30% de la cromatina inicial). Todas las muestras incluyendo los Input, son incubadas durante 14 horas a 65°C para llevar a cabo el "reverse-crosslinking". Por último, el ADN de las muestras se purifica usando el *PCR Purification kit* (Qiagen, Valencia, CA).

Soluciones:

Lysis buffer: 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% deoxycholate, 0.1% SDS, 10 mM Na butyrate, 1 mM PMSF, 1X plant proteinase inhibitor cocktail (sigma).

Blocking buffer: BSA (10 mg/ml), 10 µl Yeast transfer RNA (10µg/µl) 20 µl of t-RNA, Up to 1 ml with Lysis Buffer.

Buffer A: 0.6M Manitol, 10mM KCL, 10mM MES.

LNDET: 0.25 M LiCl, 1% NP40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA.

TE: 10 mM Tris-Cl, pH 7.5. 1 mM EDTA.

Elution buffer: 1% SDS, 0.1 M NaHCO₃, 1 mg/ml proteinase K.

6.3.21.3 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) a partir de hojas de plantas de maíz de 9 días de la variedad B73

En primer lugar, se debe realizar la preparación de las *Dynabeads/Protein A* (Invitrogen). Las *Dynabeads* se resuspenden delicadamente, posteriormente se transfirieren 30 µl de *Dynabeads* a un *ependorf* de 1.5 ml por cada anticuerpo, al mismo tiempo en otro *ependorf* de 1.5 ml se adiciona 90 µl de *Dynabeads* en caso de tener tres muestras: anticuerpo 1, anticuerpo 2 e Input.

A continuación, se lava cada tubo que contiene las *Dynabeads* dos veces con 500 µl de *lysis buffer*, poniendo cada vez los tubos en un soporte magnético durante 30 segundos y descartando el sobrenadante. Antes de retirar el sobrenadante del último lavado, los tubos con las *Dynabeads* se mantienen en el soporte magnético, mientras en tubos nuevos *ependorf* de 1.5 ml se prepara una mezcla de 100 µl *blocking buffer* con 10 µl (or 1 µg) de cada anticuerpo (en este caso el anti91). Posteriormente, se transfiere la mezcla del *blocking buffer* con el anticuerpo en las *Dynabeads* lavadas y se incuban durante 14 horas en rotación a 4°C. Por otra parte, se adiciona 300 µl de *blocking buffer* sin anticuerpo en el tubo que contiene los 90 µl de *Dynabeads* y se incuba durante 14 horas en rotación a 4°C (las *Dynabeads* sin anticuerpo serán usadas al día siguiente para la *preclearation* de las muestras a usar en las inmunoprecipitaciones).

El material empleado para la realización de los ChIPs fue la base de la segunda hoja de plantas de maíz de 9 días. Para cada ChIP se usan cuatro hojas provenientes de plantas distintas (300 mg), a continuación se realiza el *crosslinking* del material sumergiéndolo en 10 ml *buffer A*, se le aplica vacío por 20 minutos, se le añade 2 M de glicina y se continúa con el vacío por 10 minutos. El material se lava 6 veces con abundante agua destilada.

Las muestras se resuspenden en 500 µl de *lysis buffer* para realizar la preparación del extracto de cromatina, luego se les da un vórtex durante 30 segundos y posteriormente, se realiza la fragmentación de la cromatina a un rango de 100–1,000 bp (~500 bp en promedio) mediante sonicación empleando un *Biorupter* (UCD-200TM, Diagenode Inc.) con las siguientes condiciones: 30 sec ON y 30 sec OFF al nivel de poder H por 30 minutos y se centrifuga el material a 10,000 ×g por 10 minutos a 4°C. A continuación, se descarta el *blocking buffer* sin anticuerpo contenido en el *ependorf* con los 90 µl de *Dynabeads*, se le adiciona los 500 µl de extracto de cromatina generado anteriormente y se mantiene en incubación a 4 °C durante cuatro horas más.

Después de las cuatro horas de la incubación del extracto, los *ependorf* que tiene el *blocking buffer* con los anticuerpos, y el que contiene los 500 µl del extracto de cromatina, se colocan en el soporte magnético durante 30 segundos, se descarta el sobrenadante de los tubos que contienen el *blocking buffer* con los anticuerpos y se le adiciona a cada uno, 100 µl del extracto de cromatina que fue incubada el *ependorf* con los 90 µl de *Dynabeads*. Se debe almacenar 100 µl de la cromatina a 4°C para generar el Input. Las *Dynabeads* con los extractos de cromatina se incuban en rotación durante 14 horas a 4°C.

Posteriormente, los tubos incubados, se colocan en el soporte magnético durante 30 segundos y el sobrenadante es descartado. A continuación, se realizan 2 lavados con 0.5 ml de *lysis buffer*, 2 lavados con 0.5 ml de LNDDET y 2 lavados con 0.5 ml de TE, utilizando siempre el soporte magnético. Las *Dynabeads* se resuspenden en 50 µl de *elution buffer* y son incubadas durante 10 minutos a 65°C, luego se colocan los tubos en el soporte magnético y se recuperan los 50 µl en un nuevo tubo *ependorf*, se repite el paso una vez más, para obtener un volumen final de 100 µl. Por otro lado, se adiciona 70 µl de *elution buffer* a 30 µl de extracto de cromatina inicial para producir el Input

(30% de la cromatina inicial). Todas las muestras incluyendo los Input, son incubadas durante 14 horas a 65°C para llevar a cabo el "reverse-crosslinking". Por último, el ADN de las muestras se purifica usando el *PCR Purification kit* (Qiagen, Valencia, CA).

Soluciones:

Lysis buffer: 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% deoxycholate, 0.1% SDS, 10 mM Na butyrate, 1 mM PMSF, 1X plant proteinase inhibitor cocktail (sigma).

Blocking buffer: BSA (10 mg/ml), 10 µl Yeast transfer RNA (10µg/µl) 20 µl of t-RNA, Up to 1 ml with Lysis Buffer.

Buffer A: 0.4 M sucrose, 10 mM Tris pH8, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1% Formaldehyde.

LNDET: 0.25 M LiCl, 1% NP40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA.

TE: 10 mM Tris-Cl, pH 7.5. 1 mM EDTA.

Elution buffer: 1% SDS, 0.1 M NaHCO₃, 1 mg/ml proteinase K.

6.3.22 Test de enriquecimiento y análisis por PCR semi-cuantitativa y cuantitativa de ChIP

Para el test de enriquecimiento usando PCR semi-cuantitativa, se usó como control negativo a copia. Las PCRs semi-cuantitativas fueron hechas utilizando diluciones seriadas de las muestras inmunoprecipitadas (1, 1/10 y 1/100) y el Input. La mix usada se describe en la Tabla 6-9 y a continuación, las condiciones de PCR utilizadas:

Componente	Por Rxn	7 Rxn MM
10X PCR Buffer w/o MgCl ₂	2.0 µl	14 µl
MgCl ₂	0.6 µl	4.2 µl
dNTPs 10 mM	0.4 µl	2.8 µl
Cebador A (50 µM)	0.1 µl	0.7 µl
Cebador B (50 µM)	0.1 µl	0.7 µl
dH ₂ O	15.72µl	110.04 µl
Platinum Taq	0.08 µl	0.56 µl
Template DNA	1 µl	-
Total Vol	20.0 µl	140 µl

Tabla 6-9. Reacción de PCR para validación de muestras de ChIP.

Condiciones de PCR:

- Paso 1:95°C por 3 minutos
- Paso 2:95° C por 30 segundos
- Paso 3:55° C por 30 segundos
- Paso 4:72° C por 30 segundos
- 40 ciclos del paso 2 al paso 4

Los resultados de los productos de PCR semi-cuantitativa fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% y cuantificados por tinción con EtBr.

Por otra parte, la PCR cuantitativa de ChIP de protoplastos de maíz (en tiempo real) fue realizada usando el iQTM SYBR Green supermix (Bio-Rad, Hercules, CA) en una reacción de PCR de 10 µl de acuerdo con el protocolo recomendado. Los cebadores se diseñaron usando el *software* de *GenScript* específico para el diseño de cebadores para PCR cuantitativa en tiempo real. Los cebadores pueden amplificar una zona de 100 pares de bases.

Para la reacción de 10 µl *iQTMSYBR Green supermix*, se usa 1 µl de ADN de ChIP de protoplastos de maíz o ADN Input y 0.3 µM de cada cebador. La PCR cuantitativa para ChIP de protoplastos de maíz fue realizada usando BioRad CFX96 real-time PCR Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA) con las siguientes condiciones:

Paso 1:95°C por 3 minutos
Paso 2:95° C por 10 segundos
Paso 3:60° C por 15 segundos
Paso 4:72° C por 30 segundos
40 ciclos del paso 2 al paso 4

Seguida por la determinación de curva de *melting*. Con todos los experimentos, fueron usados controles sin ADN y muestras con el Input.

La PCR cuantitativa de ChIP de hojas de maíz fue realizada mediante la tecnología Fluidigm, utilizando la plataforma del Servicio de Genómica del *Centre de Recerca en Agrigenòmica* (CRAG), Barcelona.

6.3.23 Preparación de ChIP-Seq para la plataforma *Solexa-Illumina*

La preparación de las librerías de ChIP de protoplastos de maíz versión 1.0 (Figura 6-3), se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Kengo Morohashi, investigador del laboratorio del Dr. Erich Grotewold, mientras la construcción de las librerías los ChIP de protoplastos versión 2.0 (Figura 6-3) y las librerías de ChIP de hojas de maíz (Figura 6-4) fue realizada en el *Centre de Recerca en Agrigenòmica* (CRAG) en colaboración con Jorge Enrique Salazar Henao del laboratorio del Dr. David Caparrós-Ruiz del Departamento de Genética Molecular del CRAG, Barcelona.

Para la construcción de las librerías, fue necesario poner la técnica a punto ya que los reactivos usados en USA no eran los mismos que se podían adquirir en España, sin embargo, este experimento se realizó basándose en el protocolo elaborado por el Dr. Kengo Morohashi (morohashi.1@osu.edu).

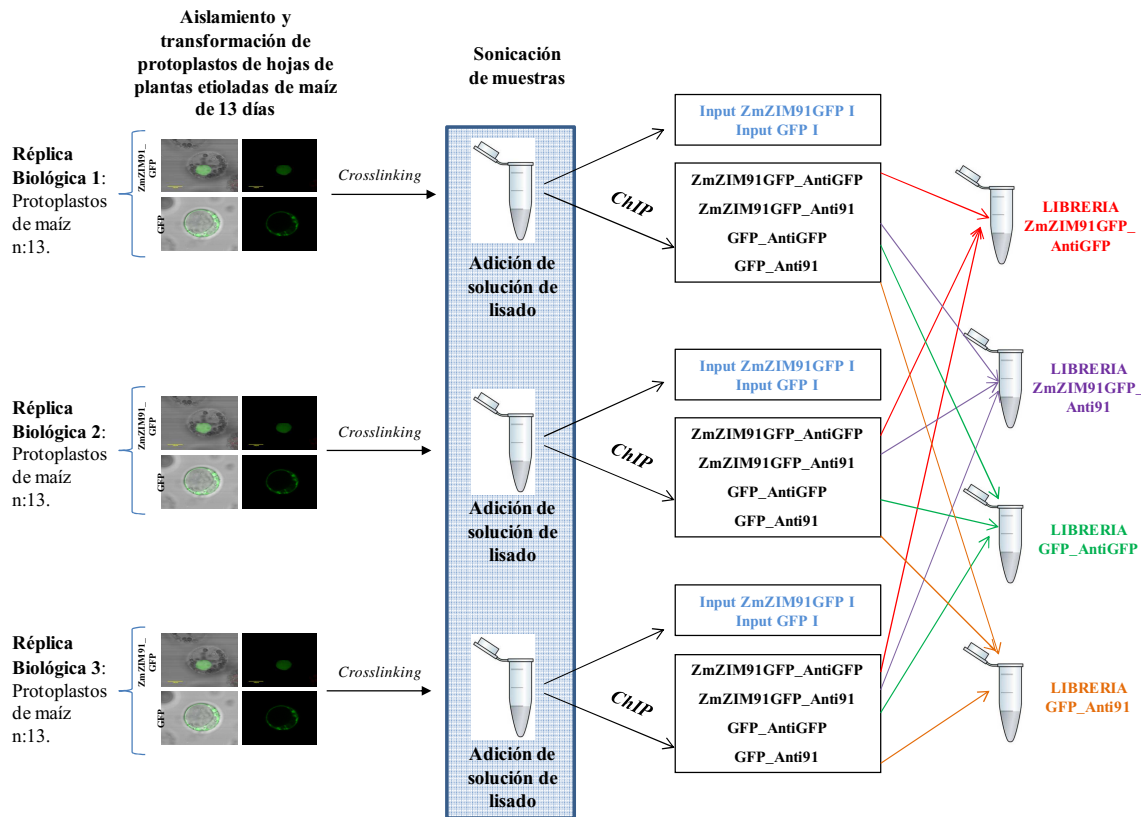


Figura 6-3. Procedimiento de elaboración de librerías de ChIP de protoplastos de maíz sobre expresando 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::GFP. En la imagen se observan los pasos que se realizaron para la construcción de una librería de ChIP de protoplastos de maíz. Todas las réplicas biológicas fueron elaboradas utilizando este procedimiento.

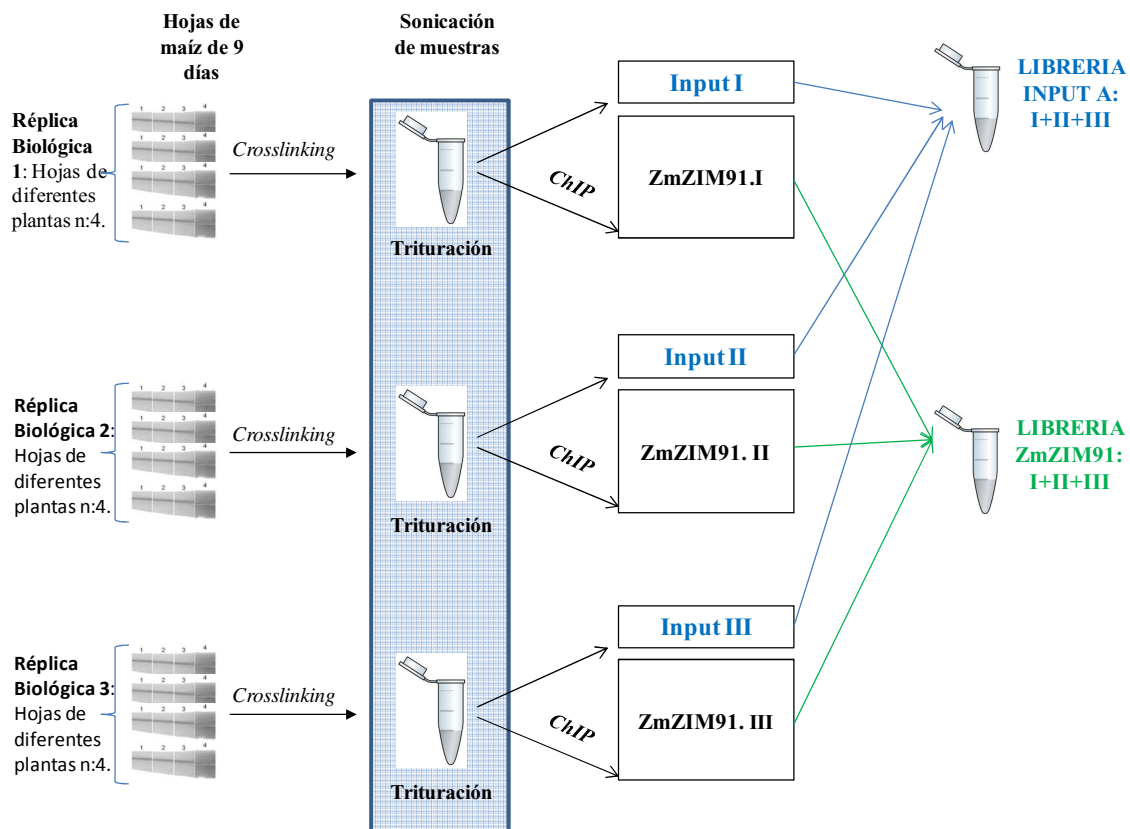


Figura 6-4. Procedimiento de elaboración de librerías de ChIP de hojas de plantas de maíz de 9 días. En la imagen se observan los pasos que se realizaron para la elaboración de una librería de ChIP de hojas de plantas de maíz de 9 días. Todas las réplicas biológicas fueron hechas utilizando este procedimiento.

El procedimiento estándar contiene los siguientes pasos:

1. Reparación del final de los fragmentos de ADN
2. Adición de colas “A”
3. Ligación de adaptadores
4. Fraccionamiento de tamaño por gel de agarosa
5. Amplificación por PCR (~ 20 ciclos)
6. Purificación
7. Cuantificación y control de calidad de las librerías
8. Descontaminación de librerías usando *AMPure beads*
9. Cuantificación y control de calidad de las librerías

Para reparar los finales de los fragmentos de ADN, se diluye la polimerasa ADN *klenow* 1:5 con agua a una concentración final de U/ μ l y se prepara la siguiente mix de reacción en tubos de PCR de 0.2 ml:

~30 μ l de ChIP enriquecido de ADN, 5 μ l de 10x T4 DNA ligase *buffer* con 10mM ATP, 2 μ l 10mM dNTP mix, 0.5 μ l T4 DNA polimerasa (3U/ μ l) (NEB), 0.5 μ l Polimerasa ADN Klenow (NEB) (1U/ μ l), 0.5 μ l T4 PNK (10U/ μ l) (NEB) y agua libre de DNAsas hasta 50 μ l.

Posteriormente, se incuba la reacción a 20°C durante 30 minutos en un termociclador. Luego se procede a purificar el ADN usando *QIAGEN PCR purification kit* siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La elución se hace con 35 μ l de *elution buffer* (EB).

A continuación para adicionar las bases “A” a los extremos finales 3' de los fragmentos de ADN se llevo a cabo la preparación de la siguiente reacción:

34.5 μ l de muestra de ADN, 5 μ l de NEB *buffer* 2, 10 μ l de 1mM dATP, 0.5 μ l de Klenow exo (3' to 5' exo minus) (5U/ μ l) (NEB) y la reacción se lleva a 50 μ l con agua libre de DNAsas.

Luego la reacción es incubada a 37°C por 30 minutos en un termociclador. La purificación del ADN es llevada a cabo usando el *mini Elute QIAGEN purification Kit*, y cada muestra se eluye en 13 μ l de agua libre de DNAsas.

Para la ligación de los adaptadores a los fragmentos de ADN, se diluye el *adapter oligo mix* (15 μ M) a 1:10 (para una concentración final de 1.5 μ M) en agua libre de DNAsas para ajustarlo a las pequeñas cantidades de ADN. La T4 DNA ligasa Ultrapura (Enzymatics, 600U/ μ l) se diluye 10 veces con 1x T4 *ligase buffer* de T4 DNA ligasa Ultrapura y a continuación se prepara la siguiente reacción:

13 μ l de muestra de ADN, 15 μ l de 2x Rapid DNA *ligase buffer* de T4 DNA ligasa Ultrapura, 1 μ l de *adapter oligo mix* diluido, 1 μ l de T4 DNA ligasa Ultrapura

(Enzymatics) diluída (1/10) y se ajusta la reacción hasta 30 μ l con agua libre de DNAsas.

La anterior reacción es incubada a temperatura ambiente por 15 minutos y purificada usando *miniElute QIAGEN purification kit* y cada muestra se eluye en 20 μ l de EB.

A continuación, se realiza el paso del fraccionamiento de tamaño, para lo cual en primer lugar, se cargan en un gel de agarosa de 2% 10 μ l de la muestra de fragmentos de ADN ligados a los adaptadores, y se cortan 2mm de gel alrededor de 200-400 bp. Se guardan 10 μ l en caso de fallos en los siguientes pasos. La purificación se realiza usando el *QIAGEN purification Kit*, y las muestras son eluídas en 50 μ l de EB. Seguidamente, con el fin de minimizar la contaminación por adaptadores, antes de realizar la PCR para el enriquecimiento de las muestras, se procede a tratar las muestras utilizando la tecnología *AMPure beads* y se eluyen en 50 μ l de EB. Antes del uso de las *AMPure beads* hay que realizar la calibración del *ratio AMPure beads:muestra* ya que modificando dicho *ratio* se modifica el tamaño de los fragmentos de ADN eliminados.

Posteriormente se lleva a cabo el enriquecimiento de fragmentos de ADN modificados con adaptadores, para lo que se prepara la siguiente reacción de mix de PCR:

25 μ l de ADN (guardar 25 μ l), 10 μ l de 5x HF Phusion buffer, 1.5 μ l de 10mM dNTP, 1 μ l de PCR 1.0 primer (25 μ M), 1 μ l de PCR 2.0-Index primer (25 μ M), 0.5 μ l de Phusion Hot polymerase (source, units) y 11 μ l de agua libre de DNAsas hasta 50 μ l.

La amplificación se lleva a cabo mediante el siguiente protocolo de PCR:

- a. 30 segundos a 98°C
- b. 18 ciclos
 - 40 segundos a 98°C
 - 30 segundos a 65°C
 - 30 segundos a 72°C
- c. 5 minutos a 72°C
- d. 10°C α

Después de la PCR, las muestras se purifican usando *mini Elute QIAGEN purification Kit*, con 12 µl de EB y se realiza un *Bioanalyzer* de las muestras para verificar la concentración y la calidad (es importante tener en cuenta que la banda de contaminación por adaptadores autoligados es de 123 pb).

En caso de contaminación por adaptadores, se procede a realizar la descontaminación de las muestras utilizando de nuevo la tecnología *AMPure beads*. Las librerías son eluidas de nuevo en 12 µl de EB y se vuelven a chequear las muestras usando *Bioanalyzer*. Finalmente, antes de la secuenciación se cuantifica la concentración de las librerías usando *Qubit* (Invitrogen).

6.3.24 Ensayo de Luciferasa usando protoplastos de maíz transformados transientemente

Para los ensayos de expresión transiente de Luciferasa usando los promotores de los genes de *ZmCOMT* y *ZmA1*, fueron transformados por electroporación protoplastos de maíz de plantas etioladas de 13 días de la variedad MO17xB73. Este experimento se realizó de acuerdo con Sainz *et al.*, 1997, con algunas modificaciones.

Todos los plasmidos de ADN fueron purificados usando el *Maxi-Prep Kit* (Qiagen, Valencia, CA). Los µg de ADN utilizados en el experimento se presentan a continuación: 1 µg de regulador, 3 µg del plasmido reportero (*pCOMT::Luc*; *pA1::Luc*) y *p35S::GFP* (el vector vacío del plasmido). Para el ensayo de expresión transiente de *firefly luciferase* y *Renilla luciferase* (Renilla), fue usado el *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega, Madison, WI). Para normalizar la actividad de luciferasa en cada muestra se incluye el reportero *Renilla luciferase*, 10 µg de *p35S::Renilla*.

6.3.25 Captura de imágenes fluorescente mediante Microscopia Confocal

Las imágenes obtenidas de localización subcelular y Complementación Bimolecular para este trabajo fueron realizadas utilizando un Microscopio Confocal FV 1000 Olympus del Servicio de Imágenes del CRAG.

6.3.26 Procesamiento y análisis de datos

6.3.26.1 Análisis de secuencias de nucleótidos

La secuenciación se ha realizado mediante un secuenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems) en el servicio de Secuenciación del CRAG, Barcelona. Las comparaciones de secuencias con las bases de datos (Maizesequence.org) se han realizado mediante BLASTN (compara la secuencia de nucleótidos con bases de datos de nucleótidos) y BLASTX (compara la secuencia de nucleótidos traducida con bases de datos de secuencias de proteínas). Los alineamientos de secuencias se han realizado con el programa de alineamiento múltiple CLUSTAL W, (versión 1.5; Higgins *et al.*, 1994), disponible en la dirección <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>. La visualización y optimización de los alineamientos nucleotídicos se realizó mediante el programa Sequencher 5.1, de *Gene Codes Corporation* (<http://genecodes.com/>).

6.3.26.2 Árbol filogenético

Para la realización del árbol filogenético de la familia ZML en *Arabidopsis* y maíz se utilizó el programa *Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW* (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>). Los parámetros usados se presentan a continuación:

Output format: CLUSTAL

Pairwise Alignment: SLOW/ACCURATE

Sequences: Protein

Pairwise Alignment Parameters:

For FAST/APPROXIMATE:

K-tuple(word) size:1, Window size:5, Gap Penalty: 3, Number of Top Diagonals: 5, Scoring Method: PERCENT.

For SLOW/ACCURATE:

Gap Open Penalty: 10.0, Gap Extension Penalty: 0.1, Select Weight Matrix: BLOSUM (for PROTEIN).

Multiple Alignment Parameters:

Gap Open Penalty:10, Gap Extension Penalty: 0.05, Weight Transition: NO, Hydrophilic Gaps:YES, Select Weight Matrix: BLOSUM (for PROTEIN)

Posteriormente, se ejecuta el múltiple alineamiento y se procede a elaborar el árbol filogenético usando *unrooted phylogenetic tree* (N-J) (<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>).

6.3.26.3 Cuantificación de GFP de las imágenes obtenidas mediante microscopia confocal

La cuantificación de la GFP de los protoplastos de maíz transfectados con 35S::ZmZIM91:GFP y tratados con MeJA 25µM, se realizó utilizando el programa ImageJ, que está basado en Java y que permite el procesamiento de imágenes. El *software* ImageJ ha sido desarrollado por *the National Institutes of Health* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

El procesamiento estadístico de los datos obtenidos con el *software* ImageJ fue realizado calculando una tasa de cambio de la fluorescencia con respecto al tiempo cero. Se utilizaron datos de tres réplicas biológicas.

6.3.26.4 Procesamiento y análisis de datos de ChIP-Seq

El procesamiento de los datos de ChIP-Seq fue realizado en colaboración con María Katherine Mejía Guerra del laboratorio del Dr. Erich Grotewold.

Para el procesamiento de los datos crudos obtenidos de la secuenciación de las librerías de ChIP-Seq fue utilizado el *software* BOWTIE, que es un ultrarrápido, y eficiente alineador de lectura corta (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>). Para el

llamado de picos de los datos obtenidos de la secuenciación de las librerías de ChIP-Seq fue usado el *software* MACS (*Model-based Analysis for ChIP-*), el cual, empíricamente modela la longitud de los fragmentos secuenciados de ChIP, que tienden a ser más cortos que las estimaciones de la sonicación o el tamaño de la construcción de las librerías, y lo utiliza para mejorar la resolución espacial de sitios de unión previsto. (<http://liulab.dfci.harvard.edu/MACS/>). Para realizar la localización de los picos de ChIP-Seq obtenidos con MACS, se usó el programa IGV 2.1 (*Integrative Genomics Viewer*:<http://www.broadinstitute.org/igv/node/236>).

6.3.26.5 Procesamiento de datos de PCR cuantitativa de ChIP de protoplastos de maíz

El procesamiento estadístico de los datos de la PCR cuantitativa de ChIP de protoplastos, se realizó empleando un ΔCt , donde el enriquecimiento de los picos se calculó con respecto a copia.

6.3.26.6 Procesamiento de datos de PCR cuantitativa de ChIP de hojas de plantas de maíz de 9 días (Fluidigm)

El procesamiento estadístico de estas muestras se llevó a cabo usando el manual de SABiosciences (ChampionChIP™ PCR Array. Real-Time PCR-Based Pathway or Disease-Focused. Profiling of Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Samples, Version 1.1-10/20/2009).

Los valores fueron normalizados con respecto al Input (porcentaje de enriquecimiento con respecto a Input).

6.3.26.7 Procesamiento de datos de PCR cuantitativa de ChIP de hojas de plantas de maíz de 9 días tratadas con MeJA

El procesamiento estadístico de estas muestras se llevó a cabo usando el manual de SABiosciences. Para las PCR cuantitativas de ChIPs con tratamiento, se calculó el *Fold Difference* de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \text{Fold Difference} &= \text{Fold Enrichment G2} / \text{Fold Enrichment G1} \\ &= 2^{(\Delta\Delta\text{Ct [IP] S2} - \Delta\Delta\text{Ct [IP] S1})} \end{aligned}$$

Donde el Grupo 1 (G1) corresponde a los datos del ChIP control con DMSO y el Grupo 2 (G2) es el grupo experimental en este caso los datos obtenidos del ChIP de MeJA al 0,01%.

6.3.26.8 Procesamiento de datos de Luciferasa

Los datos de *firefly* luciferasa fueron normalizados empleando los valores obtenidos con *Renilla* luciferasa, los datos muestran 3 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas (n=9). *Renilla* estaba en un vector que se empleó como control de la transformación (Dual-luciferase reporter assay system kit, Promega, Madison, WI).

6.3.26.9 Identificación de cajas GATA y GATC en promotores

Para la identificación de los motivos de unión a ADN GATA y GATC (Tabla 6-10), se empleó el *software DNA-pattern* (<http://rsat.ulb.ac.be/>) (Thomas-Chollier, 2008).

PatID	Strand	Pattern	SeqID	Start	End	matching_seq	Score
START_END	DR	-	8_MACS_peak_1521	-351	-1	-	0
START_END	DR	-	8_MACS_peak_340	-351	-1	-	0
START_END	DR	-	14_MACS_peak_3163_GFP	-351	-1	-	0
GATA	D	GATA	14_MACS_peak_3163_GFP	-218	-215	gcatGATAatg	1
GATA	D	GATA	14_MACS_peak_3163_GFP	-151	-148	ctctGATAtag	1
GATA	R	GATA	14_MACS_peak_3163_GFP	-260	-257	caatGATAaacc	1
GATA	R	GATA	14_MACS_peak_3163_GFP	-129	-126	tgctGATAcggt	1
GATC	DR	GATC	14_MACS_peak_3163_GFP	-139	-136	ggcaGATCatac	1
GATC	DR	GATC	14_MACS_peak_3163_GFP	-38	-35	ccctGATCctta	1
START_END	DR	-	14_MACS_peak_797	-351	-1	-	0
GATC	DR	GATC	14_MACS_peak_797	-338	-335	ccctGATCctta	1
GATC	DR	GATC	14_MACS_peak_797	-97	-94	agagGATCagcg	1
START_END	DR	-	21_MACS_peak_3884_GFP	-351	-1	-	0
GATC	DR	GATC	21_MACS_peak_3884_GFP	-312	-309	ttgaGATCaggg	1
GATC	DR	GATC	21_MACS_peak_3884_GFP	-275	-272	tgggGATCgggc	1
GATC	DR	GATC	21_MACS_peak_3884_GFP	-243	-240	aaagGATCttag	1
GATC	DR	GATC	21_MACS_peak_3884_GFP	-94	-91	cccaGATCactc	1
GATC	DR	GATC	21_MACS_peak_3884_GFP	-28	-25	ttacGATCacac	1
START_END	DR	-	21_MACS_peak_967_91	-351	-1	-	0
GATC	DR	GATC	21_MACS_peak_967_91	-316	-313	ttgaGATCaggg	1
GATC	DR	GATC	21_MACS_peak_967_91	-279	-276	tgggGATCgggc	1
GATC	DR	GATC	21_MACS_peak_967_91	-247	-244	aaagGATCttag	1
GATC	DR	GATC	21_MACS_peak_967_91	-98	-95	cccaGATCactc	1
GATC	DR	GATC	21_MACS_peak_967_91	-32	-29	ttacGATCacac	1

Tabla 6-10. Resultados obtenidos empleando el *software* DNA-pattern de motivos de unión a ADN GATA y GATC en los picos 8, 14 y 21 identificados en el CHIP-Seq de protoplastos de maíz.

6.3.26.10 Procesamiento y análisis de datos de regiones enriquecidas en elementos reguladores en *cis* CRERs

Para la detección de módulos reguladores en *cis* (CRMs) se empleó el *Software RSA-tools - matrix-scan* (<http://rsat.ulb.ac.be/>).

Para realizar la búsqueda de CRERs empleando este programa se generó un modelo de *background* de orden 3, empleando las regiones 5' de los genes de maíz, los promotores de *COMT* (ZmCOMT, OsCOMT, BdCOMT, SbCOMT) y matrices en formato Transfac con los sitios de unión de ZmZIM91 y los MYB R2 R3 del subgrupo IV de maíz. Estas matrices se generaron empleando los datos obtenidos *in vitro* mediante PMB11 para ZmZIM91 y los datos de SELEX existentes para ZmMYB31 (Fornalé et al., 2010).

Bibliografía

7. Bibliografía

- Aasland, R., Stewart, A.F., Gibson, T.** (1996) The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIB. *Trends in biochemical sciences*, **21**, 87-8.
- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., and Shinozaki, K.** (1997) Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell*, **9**, 1859-1868.
- Agarwal, M., Hao, Y., Kapoor, A., Dong, C.H., Fujii, H., Zheng, X., and Zhu, J.K.** (2006) A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *J Biol Chem.*, **281**, 37636-37645.
- Achuo, E.A., Prinsen, E., Hofte, M.** (2006) Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici*. *Plant Pathology*, **55**, 178–186.
- Ascencio- Ibáñez, J.T., Sozzani, R., Lee, T.J., Chu, T.M., Wolfinger, R.D., Cella, R. and Hanley-Bowdoin, L.** (2008) Global analysis of Arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiol.*, **148**, 436–454.
- Ashby, A.M., Watson, M.D., Loake, G.J., and Shaw, C.H.** (1988) Ti plasmid-specified chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 toward vir-inducing phenolic compounds and soluble factors from monocotyledonous and dicotyledonous plants. *J Bacteriol.*, **170**, 4181–4187.
- Asselbergh, B., De Vleeschauwer, D., and Hofte, M.** (2008) Global switches and fine-tuning-ABA modulates plant pathogen defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**, 709-719.
- Atkinson, N.J. and Urwin, P.E.** (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 3523-3543.
- Austin, M.J., Muskett, P., Kahn, K., Feys, B.J., Jones, J.D.G., and Parker, J.E.** (2002) Regulatory role of SGT1 in early R gene-mediated plant defenses. *Science*, **295**, 2077-2080.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K.** (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*. (Greene and Wiley-Interscience, NY, USA).

- Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P.** (2002) The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science*, **295**, 2073-2076.
- Bai, Y., Meng, Y., Huang, D., Qi, Y., and Chen, M.** (2011) Origin and evolutionary analysis of the plant-specific TIFY transcription factor family. *Genomics*, **98**, 128–136.
- Bailey, P.C., Martin, C., Toledo-Ortiz, G., Quail, P.H., Huq, E., Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., and Weisshaar, B.** (2003) Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **15**, 2497-2502.
- Bailey, T.L., and Elkan, C.** (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.*, **2**, 28-36.
- Balkunde, R., Pesch, M., and Hu" Iskamp, M.** (2010) Trichome patterning in *Arabidopsis thaliana*: From genetic to molecular models. In *Plant Development, Current Topics in Developmental Biology*, Vol. 91, M.C.P. Timmermans, ed (Amsterdam: Elsevier), pp. 299–321.
- Baldwin, A.L., Baldwin, C.P., and Cole, R.** (1990) Stress-resistant families and stress-resistant children. In: Rolf J, Masten A, Cicchetti D, Nuechterlein K, Weintraub S, editors. *Risk and protective factors in the development of psychopathology. Cambridge University Press*, 257–280.
- Ballesteros, M.L., Bolle, C., Lois, L.M., Moore, J.M., Vielle-Calzada, J-P, Grossniklaus, U., and Chua, N-H.** (2001) LAF1, a MYB transcription activator for phytochrome A signaling. *Genes & Dev.*, **15**, 2613-2625.
- Bari, R., and Jones, J.D.G.** (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.*, **69**, 473–488.
- Barozzi, I., Termanini, A., Minucci, S., and Natoli, G.** (2011) Fish the ChIPs: a pipeline for automated genomic annotation of ChIP-Seq data. *Biology Direct*, **6**, 1-7.
- Bar-Peled, M., and Raikhel, N.V.** (1996) A method for isolation and purification of specific antibodies to a protein fused to the GST. *Anal Biochem.*, **241**, 140-142.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., Zhao, K.** (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, **129**, 823-837.
- Beattie, G.A.** (2011) Water relations in the interaction of foliar bacterial pathogens with plants. *Annual Review of Phytopathology*, **49**, 533–555.

- Benedetti, C.E., Xie, D., and Turner, J.G.** (1995) COI1-dependent expression of an Arabidopsis vegetative storage protein in flowers and siliques and in response to coronatine or methyl jasmonate. *Plant Physiol.*, **109**, 567-572.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., and Solano, R.** (2002) Constitutive expression of ETHYLENERESPONSE-FACTOR1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J.*, **29**, 23-32.
- Bhuiyan, N.H. et al.** (2009) Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. *J. Exp. Bot.*, **60**, 509–521.
- Bolanos-Garcia V.M., Fernandez-Recio J., Allende J.E., Blundell T.L.** (2006) Identifying interaction motifs in CK2 β —a ubiquitous kinase regulatory subunit. *Trends Biochem. Sci.*, **31**, 654–661.
- Borevitz, J.O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R.A., and Lamb, C.** (2000) Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell*, **12**, 2383–2394.
- Boter, M., Ruiz-Rivero, O., Abdeen, A., and Prat, S.** (2004) Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and Arabidopsis. *Genes Dev.*, **18**, 1577-1591.
- Boulikas, T.** (1994) Putative Nuclear Localization Signals (NLS) in Protein Transcription Factors. *Journal of Cellular Biochemistry*, **55**, 32-58.
- Bout, S., and Vermerris, W.** (2003) A candidate-gene approach to clone the sorghum Brown midrib gene encoding caffeic acid O-methyltransferase. *Mol Genet Genomics*, **269**, 205-214.
- Boyer, J.S.** (1982) Plant productivity and the environment. *Science*, **218**, 443–448.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Braun, E.L., and Grotewold, E.** (1999) Newly discovered plant c-myb-like genes rewrite the evolution of the plant myb gene family. *Plant Physiol.*, **121**, 21-24.
- Broun, P.** (2005) Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in Arabidopsis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**, 272–279.
- Brown, R.L., Kazan, K., McGrath, K.C., Maclean, D.J., and Manners, J.M.** (2003) A role for the GCCboxin jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gene of Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **132**, 1020-1032.

- Browse, J.** (2009) Jasmonate passes muster: A receptor and targets for the defense hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **60**, 183–205.
- Browse, J.** (2009) The power of mutants for investigating jasmonate biosynthesis and signaling. *Phytochemistry*, **70**, 1539–1546.
- Buck, M.J., and Lieb, J.D.** (2004) ChIP-chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments. *Genomics Mar*, **83(3)**, 349–60.
- Burr, F.A., Burr, B., Scheffler, B.E., Blewitt, M., Wienand, U., and Matz, E.C.** (1996) The maize repressor-like gene intensifier1 shares homology with the r1/b1 multigene family of transcription factors and exhibits missplicing. *Plant Cell*, **8**, 1249–1259.
- Buxton D.R., Martin G.C.** (1989) Forage quality of plant parts of perennial grasses and relationship to phenology. *Crop Sci.*, **29**, 429–435.
- Buxton D.R., Russell J.R.** (1988) Lignin constituents and cell-wall digestability of grass and legume stems. *Crop Sci.*, **28**, 553–558.
- Chang, C-J, Chen, T-T, Lei, H-Y, Chen, D-S, Lee, S-C.** (1990) Molecular cloning of a transcription factor, AGP/EBP, that belongs to members of the C/EBP family. *Mol Cell Biol.*, **10**, 6642–6653.
- Chen, M., Chory, J. and Fankhauser, C.** (2004) Light signal transduction in higher plants. *Annu. Rev. Genet.*, **38**, 87–117.
- Cheong, Y.H., Chang, H.-S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T., and Luan, S.** (2002) Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **129**, 661–677.
- Chesson, A., Stewart, C.S., Dalgarno, K., King, T.P.** (1986) Degradation of isolated grass mesophyll, epidermis and fibre cell walls in the rumen and by cellulolytic rumen bacteria in axenic culture. *J. Appl. Bacteriol.*, **60**, 327–336.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L., and Solano, R.** (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, **448**, 666–671.
- Chini, A., Fonseca, S., Chico, J.M., Fernández-Calvo, P., and Solano, R.** (2009) The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between Arabidopsis JAZ proteins. *Plant J.*, **59**, 77–87.
- Chini, A., Boter, M., and Solano, R.** (2009) Plant oxylipins: COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acid-signalling module. *FEBS J.*, **276**, 4682–4692.

- Chinnusamy, V., Schumaker, K., Zhu, J.K.** (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot.*, **55**, 225–236
- Chung, H.S., Koo, A.J.K., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., Jones, A.D., and Howe, G.A.** (2008) Regulation and Function of Arabidopsis JASMONATE ZIM-Domain Genes in Response to Wounding and Herbivory. *Plant Physiology*, **146**, 952–964.
- Chung, H.S., Niu, Y., Browse, J., and Howe, G.A.** (2009) Top hits in contemporary JAZ: an update on jasmonate signaling. *Phytochemistry*, **70**, 1547–1559.
- Chung, H.S., and Howe, G.A.** (2009) A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signaling by a stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-domain protein JAZ10 in Arabidopsis. *Plant Cell*, **21**, 131–145.
- Chung, H.S., Cooke, T.F., Depew, C.L., Patel, L.C., Ogawa, N., Kobayashi, Y., and Howe, G.A.** (2010) Alternative splicing expands the repertoire of dominant JAZ repressors of jasmonate signaling. *Plant J.*, **63**, 613–622.
- Chung, H.S., Niu, Y., Browse, J., and Howe, G.A.** (2009) Top hits in contemporary JAZ: An update on jasmonate signaling. *Phytochemistry*, **70**, 1547–1559.
- Cramer, G.R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M. and Shinozaki, K.** (2011) Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, **11**:163.
- Creelman, R.A. and Mullet, J.E.** (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**, 355–381.
- Creelman, R.A., and Mulpuri, R.** (2002) The oxylipin pathway in Arabidopsis. The Arabidopsis Book, eds., C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz, *American Society of Plant Biologists*, Rockville, MD, pp 1-24, doi/10.1199/tab.0012, <http://www.aspb.org/publications/Arabidopsis/>
- Cressman, D.E, O'Connor, W.J., Greer, S.F., Zhu, X-S, and Ting, J.P-Y.** (2001) Mechanisms of Nuclear Import and Export That Control the Subcellular Localization of Class II Transactivator. *The Journal of Immunology*, **167**, 3626-3634.
- Crossley, M., Merika, M., and Orkin, S.H.** (1995) Self-Association of the Erythroid Transcription Factor GATA-1 Mediated by Its Zinc Finger Domains. *Molecular and Cellular Biology*, 2448–2456.
- Davuluri, R.V., Sun, H., Palaniswamy, S.K., Matthews, N., Molina, C., Kurtz, M., and Grotewold, E.** (2003) AGRIS: Arabidopsis gene regulatory information server, an information resource of Arabidopsis cis-regulatory elements and transcription factors. *BMC Bioinformatics*, **4**, 25.

- De Geyter, N., Gholami, A., Goormachtig, S. and Goossens, A.** (2012) Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science*, **17**, 349-359.
- De Sutter, V., Vanderhaeghen, R., Tilleman, S., Lammertyn, F., Vanhoutte, I., Karimi, M., Inze, D., Goossens, A., and Hilson, P.** (2005) Exploration of jasmonate signalling via automated and standardized transient expression assays in tobacco cells. *Plant J.*, **44**, 1065-1076.
- Deeks, M.J., and Hussey, P.J.** (2009) Plant Actin Biology. *eLS*. DOI: 10.1002/9780470015902.a0021255.
- del Pozo, J.C., Dharmasiri, S., Hellmann, H., Walker, L., Gray, W.M., and Estelle, M.** (2002) AXR1-ECR1-dependent conjugation of RUB1 to the Arabidopsis cullin AtCUL1 is required for auxin response. *Plant Cell*, **14**, 421-433.
- Deluc, L., Barrieu, F., Marchive, C., Lauvergeat, V., Decendit, A., Richard, T., Carde, J.P., Merillon, J.M., and Hamdi, S.** (2006) Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiol.*, **140**, 499-511.
- Demianski, A.J., Chung, K.M., and Kunkel, B.N.** (2011) Analysis of Arabidopsis JAZ gene expression during *Pseudomonas syringae* pathogenesis. *Mol. Plant Pathol.*, **13**, 46-57.
- Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M., and Turner, J.G.** (2002) COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in Arabidopsis. *Plant J.*, **32**, 457-466.
- Devoto, A. and Turner, J.G.** (2003) Regulation of jasmonate-mediated plant responses in Arabidopsis. *Ann. Bot. (Lond)*, **92**, 329-337.
- Devoto A, Turner JG.** (2005) Jasmonate-regulated Arabidopsis stress signalling network. *Physiol. Plant.* **123**,161–72
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M.** (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, **435**, 441-445.
- Dias, A.P., Braun, E.L., McMullen, M.D., and Grotewold, E.** (2003) Recently duplicated maize R2R3 Myb genes provide evidence for distinct mechanisms of evolutionary divergence after duplication. *Plant Physiol.*, **131**, 610-620.
- Dias, A.P., and Grotewold, E.** (2003) Manipulating the accumulation of phenolics in maize cultured cells using transcription factors. *Biochemical Engineering Journal*, **14**, 207.

- Dievart, A. and Clark, S.E.** (2003) Using mutant alleles to determine the structure and function of leucine-rich repeat receptor-like kinases. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **6**, 507–516.
- Ding, J., Hu, H., and Li, X.** (2011) Thousands of cis-regulatory sequence combinations are shared by Arabidopsis and Poplar. *Plant Physiology*, DOI:10.1104/pp.111.186080.
- Dixon, R.A., and Paiva, L.N.** (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell.*, **7**, 1085–1097.
- Doi, K., Hosaka, A., Nagata, T., Satoh, K., Suzuki, K., Mauleon, R., Mendoza, M.J., Bruskiwich, R., and Kikuchi, S.** (2008) Development of a novel data mining tool to find cis-elements in rice gene promoter regions. *BMC Plant Biol.*, **8**, 20.
- Dombrecht, B., Xue, G.P., Sprague, S.J., Kirkegaard, J.A., Ross, J.J., Reid, J.B., Fitt, G.P., Sewelam, N., Schenk, P.M., Manners, J.M., and Kazan, K.** (2007) MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in Arabidopsis. *Plant Cell*, **19**, 2225–2245.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., and Lepiniec, L.** (2010) MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.*, **15**, 573–581.
- Ehltng, J., Mattheus, N., Aeschliman, D.S., Li, E., Hamberger, B., Cullis, I.F., Zhuang, J., Kaneda, M., Mansfield, S.D., Samuels, L., et al.** (2005) Global transcript profiling of primary stems from Arabidopsis thaliana identifies candidate genes for missing links in lignin biosynthesis and transcriptional regulators of fiber differentiation. *Plant J.*, **42**, 618-640.
- Ellis, C., Karafyllidis, I., and Turner, J.G.** (2002) Constitutive activation of jasmonate signaling in an Arabidopsis mutant correlates with enhanced resistance to Erysiphe cichoracearum, Pseudomonas syringae, and Myzus persicae. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **15**, 1025-1030.
- EscamillaTreviño L.L., Shen H., Uppalapati S.R., Ray T., Tang Y., Hernandez T., Yin Y., Xu Y., Dixon R.A.** (2010) Switchgrass (*Panicum virgatum*) possesses a divergent family of cinnamoyl CoA reductases with distinct biochemical properties. *New Phytol.*, **185**, 143–155.
- Etheridge, N., Chen, Y.F. and Schaller, G.E.** (2005) Dissecting the ethylene pathway of Arabidopsis. *Brief Funct. Genomic. Proteomic.*, **3**, 372–381.
- Fan, L.M., Zhao, Z. and Assmann, S.M.** (2004) Guard cells: a dynamic signaling model. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**, 537–546.
- FAO.** Water at a Glance. www.fao.org/nr/water/docs/waterataglance.pdf.

- Feller, A., Machemer, K., Braun, E.L., and Grotewold, E.** (2011) Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors, *Plant J.*, **66**, 94–116.
- Feng, S., Ma, L., Wang, X., Xie, D., Dinesh-Kumar, S.P., Wei, N., and Deng, X.W.** (2003) The COP9 signalosome interacts physically with SCFCO11 and modulates jasmonate responses. *Plant Cell*, **15**, 1083-1094.
- Fernández-Calvo, P., Chini, A., Fernández-Barbero, G., Chico, J.M., Gimenez-Ibanez, S., Geerinck, J., Eeckhout, D., Schweizer, F., Godoy, M., Franco-Zorrilla, J.M., Pauwels, L., Witters, E., Puga, M.I., Paz-Ares, J., Goossens, A., Reymond, P., De Jaeger, G., Solano, R.** (2011) The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell*, **23**, 701–715.
- Feys, B., Benedetti, C.E., Penfold, C.N., and Turner, J.G.** (1994) Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell*, **6**, 751–759.
- Filhol, O., Martiel, J.L., Cochet, C.** (2004) Protein Kinase CK2: a new view of an old molecular complex. *EMBO reports*, **5**, 351-355.
- Fonseca, S., Chico, J.M., and Solano, R.** (2009). The jasmonate pathway: The ligand, the receptor and the core signalling module. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **12**, 539–547.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., and Solano, R.** (2009) (+)-7-iso- Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 344–350.
- Fornalé, S., Sonbol, F.M., Maes, T., Capellades, M., Puigdomenech, P., Rigau, J., and Caparros-Ruiz, D.** (2006) Down-regulation of the maize and Arabidopsis thaliana caffeic acid O-methyl-transferase genes by two new maize R2R3-MYB transcription factors. *Plant Mol Biol.*, **62**, 809-823.
- Fornalé, S., Shi, X., Chai, C., Encina, A., Irar, S., Capellades, M., Fuguet, E., Torres, J.L., Rovira, P., Puigdomenech, P., et al.** (2010) ZmMYB31 directly represses maize lignin genes and redirects the phenylpropanoid metabolic flux. *Plant J.*, **64**, 633-644.
- Franken, P., Schrell, S., Peterson, P.A., Saedler, H., and Wienand, U.** (1994) Molecular analysis of protein domain function encoded by the myb-homologous maize genes C1, Zm 1 and Zm 38. *Plant J.*, **6**, 21-30.

- Fu, C., Mielenz, J.R., Xiao, X., Ge, Y., Hamilton, C.Y., Rodriguez, M., Jr., Chen, F., Foston, M., Ragauskas, A., Bouton, J., et al.** (2011) Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., and Ohme-Takagi, M.** (2000) Arabidopsis ethylenesponsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell*, **12**, 393-404.
- Galaxy.** [<http://main.g2.bx.psu.edu/>].
- Gao, F., Foat, B.C., and Bussemaker, H.J.** (2004) Defining transcriptional networks through integrative modeling of mRNA expression and transcription factor binding data. *BMC Bioinformatics*, **5**, 31.
- Geerinck, J., Pauwels, L., De Jaeger, G., and Goossens, A.** (2010) Dissection of the one-MegaDalton JAZ1 protein complex. *Plant Signal. Behav.*, **5**, 1039–1041.
- Gfeller, A., Liechti, R., and Farmer, E.E.** (2010) Arabidopsis jasmonate signaling pathway. *Sci. Signal.*, **3**: cm4.
- Giri AP, Wunsche H, Mitra S, Zavala JA, Muck A, et al.** (2006) Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VII. Changes in the plant's proteome. *Plant Physiol.* **142**,1621–41.
- Godoy, M., Franco-Zorrilla, J.M., Pérez-Pérez, J., Liveros, J.C., Lorenzo, O., and Solano, R.** (2011) Improved protein-binding microarrays for the identification of DNA-binding specificities of transcription factors. *The Plant Journal*, **66**, 700–711.
- Goecks, J., Nekrutenko, A., and Taylor, J.** (2010) Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol.*, **11**, R86.
- Goel, A.K, Lundberg, D., Torres, M.A., Matthews, R., Akimoto-Tomiyama, C., Farmer, L., Dangl, J.L., Grant, S.R.** (2008) The *Pseudomonas syringae* type III effector HopAM1 enhances virulence on water-stressed plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**, 361–370.
- Goff, S.A., Cone, K.C., and Fromm, M.E.** (1991) Identification of functional domains in the maize transcriptional activator C1: comparison of wild-type and dominant inhibitor proteins. *Genes Dev.*, **5**, 298-309.
- Goff, S.A., Cone, K.C., and Chandler, V.L.** (1992) Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: evidence for a direct

- functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes Dev.*, **6**, 864-875.
- Gonzalez, A., Zhao, M., Leavitt, J.M., and Lloyd, A.M.** (2008) Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/ Myb transcriptional complex in Arabidopsis seedlings. *Plant J.*, **53**, 814–827.
- Grabber J.H., Jung G.A., Abrams S.M., Howard D.B.** (1992) Digestion kinetics of parenchyma and sclerenchyma cell walls isolated from orchardgrass and switchgrass. *Crop Sci.*, **32**, 806–810.
- Grand C., Parmentier P., Boudet A., Boudet A.M.** (1985) Comparison of lignins and of enzymes involved in lignification in normal and brown midrib (bm3) mutant maize seedlings. *Physiol. Veg.*, **23**, 905–911.
- Grant, M.R., and Jones, J.D.G.** (2009) Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science*, **324**, 750–752.
- Gray, J., Caparrós-Ruiz, D., and Grotewold, E.** (2012) Grass phenylpropanoids: Regulate before using!. *Plant Science*, **184**, 112– 120.
- Gray, W.M., Muskett, P.R., Chuang, H.W., and Parker, J.E.** (2003) Arabidopsis SGT1b is required for SCFTIR1-mediated auxin response. *Plant Cell*, **15**, 1310-1319.
- Grotewold, E., Drummond, B.J., Bowen, B., and Peterson, T.** (1994) The mybhomologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell*, **76**, 543-553.
- Grotewold, E., Chamberlin, M., Snook, M., Siame, B., Butler, L., Swenson, J., Maddock, S., St Clair, G., and Bowen, B.** (1998) Engineering secondary metabolism in maize cells by ectopic expression of transcription factors. *Plant Cell*, **10**, 721-740.
- Grotewold, E.** (2008) Transcription factors for predictive plant metabolic engineering: are we there yet?. *Curr Opin Biotechnol*, **19**, 138-144.
- Grunewald, W., Vanholme, B., Pauwels, L., Plovie, E., Inze', D., Gheysen, G., and Goossens, A.** (2009) Expression of the Arabidopsis jasmonate signalling repressor JAZ1/TIFY10A is stimulated by auxin. *EMBO Rep.*, **10**, 923–928.
- Guerineau, F., Benjdia, M., and Zhou, D.X.** (2003) A jasmonate-responsive element within the *A. thaliana* vsp1 promoter. *J. Exp. Bot.*, **54**, 1153-1162.
- Guillaumie, S., Pichon, M., Martinant, J.-P., Bosio, M., Goffner, D., and Barriere, Y.** (2007a) Differential expression of phenylpropanoid and related genes in

- brown-midrib bm1, bm2, bm3, and bm4 young near-isogenic maize plants. *Planta*, **226**, 235-250.
- Guillaumie, S., Pichon, M., Martinant, J.P., Bosio, M., Goffner, D., and Barriere, Y.** (2007b) Differential expression of phenylpropanoid and related genes in brown-midrib bm1, bm2, bm3, and bm4 young near-isogenic maize plants. *Planta*, **226**, 235-250.
- Guillaumie, S., Goffner, D., Barbier, O., Martinant, J.P., Pichon, M., and Barriere, Y.** (2008) Expression of cell wall related genes in basal and ear internodes of silking brownmidrib- 3, caffeic acid O-methyltransferase (COMT) down-regulated, and normal maize plants. *BMC Plant Biol.*, **8**, 71.
- Hanahan D.** (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
- Hanna-Rose, W., Hansen, U.** (1996) Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors. *Trends Genet.*, **12**, 229-34.
- He, A., Kong, S.W., Ma, Q., and Pu, W.T.** (2011) Co-occupancy by multiple cardiac transcription factors identifies transcriptional enhancers active in heart. *Proc Natl Acad Sci.*, **108**, 5632–5637.
- He, Q., Bardet, A.F., Patton, B., Purvis, J., Johnston, J., Paulson, A., Gogol, M., Stark, A., and Zeitlinger, J.** (2011) High conservation of transcription factor binding and evidence for combinatorial regulation across six Drosophila species. *Nat Genet.*, **43**, 414–420.
- Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y.C., Laslo, P., Cheng, J.X., Murre, C., Singh, H., and Glass, C.K.** (2010) Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol Cell.*, **38**, 576–589.
- Henke W, Herdel K, Jung K, Schnorr D and Loening S.A.** (1997) Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, **25**, 3957–3958.
- Herms DA, Mattson WJ.** (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *Q. Rev. Biol.* **67**, 283–335.
- Hidalgo, P., Garreton, V., Berrios, C.G., Ojeda, H., Jordana, X., Holuigue, L.** (2001) A Nuclear Casein Kinase 2 Activity Is Involved in Early Events of Transcriptional Activation Induced by Salicylic Acid in Tobacco. *Plant Physiol*, **125**, 396–405.
- Howe, G.A., and Jander, G.** (2008) Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol*, **59**,41–66.

- Ikeda, M., and Ohme-Takagi, M.** (2009) A novel group of transcriptional repressors in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.*, **50**, 970-5.
- Ishida, T., Kurata, T., Okada, K., and Wada, T.** (2008) A genetic regulatory network in the development of trichomes and root hairs. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **59**, 365–386.
- Jiang, C. and Pugh, B.F.** (2009) Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat Genet*, **10**, 161-172.
- Johnson, D.S., Mortazavi, A., Myers, R.M., and Wold, B.** (2007) Genome-wide mapping of *in vivo* protein-DNA interactions. *Science*, **316**, 1497-1502.
- Jothi, R., Cuddapah, S., Barski, A., Cui, K., and Zhao, K.** (2008) Genome-wide identification of *in vivo* protein-DNA binding sites from ChIP-Seq data. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 5221-5231.
- Jung H.G.** (1989) Forage lignins and their effects on fiber digestibility. *Agron. J.*, **81**, 33–38.
- Jung H.G., Vogel, K.P.** (1986) Influence of Lignin on Digestibility of Forage Cell Wall Material. *J. Anim. Sci.*, **62**, 1703–1712.
- Kagale, S., Rozwadowski, K.** (2010) Small yet effective: The Ethylene responsive element binding factor-associated Amphiphilic Repression (EAR) motif. *Plant Signal Behav.*, **5**, 691-4.
- Kang, H.G., Klessig, D.F.** (2005) Salicylic acid-inducible Arabidopsis CK2-like activity phosphorylates TGA2. *Plant Mol Biol*, **57**, 541–557.
- Kanhonou, R., Serrano, R., Ros Palau, R.** (2001) A catalytic subunit of the sugar beet protein kinase CK2 is induced by salt stress and increases NaCl tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol Biol*, **47**, 571–579.
- Katou, S., Yoshioka, H., Kawakita, K., Rowland, O., Jones, J.D.G., Mori, H., and Doke, N.** (2005) Involvement of PPS3 phosphorylated by elicitor-responsive mitogen-activated protein kinases in the regulation of plant cell death. *Plant Physiol.*, **139**, 1914–1926.
- Katsir, L., Chung, H.S., Koo, A.J.K., and Howe, G.A.** (2008) Jasmonate signaling: A conserved mechanism of hormone sensing. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **11**, 428–435.
- Katsir, L., Schillmiller, A.L., Staswick, P.E., He, S.Y., and Howe, G.A.** (2008) COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 7100–7105.
- Kaufmann, K., Muino, J.M., Jauregui, R., Airoidi, C.A., Smaczniak, C., Krajewski, P., and Angenent, G.C.** (2009) Target genes of the MADS

- transcription factor SEPALLATA3: integration of developmental and hormonal pathways in the Arabidopsis flower. *PLoS Biol*, **7**, e1000090.
- Kazan, K.** (2006) Negative regulation of defence and stress genes by EAR-motifcontaining repressors. *Trends Plant Sci.*, **11**, 109-112.
- Kazan, K., and Manners, J.M.** (2008) Jasmonate signaling: Toward an integrated view. *Plant Physiol.*, **146**, 1459–1468.
- Kepinski, S. and Leyser, O.** (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, **435**, 446-451.
- Kharchenko, P.V., Tolstorukov, M.Y., and Park, P.J.** (2008) Design and analysis of ChIP-seq experiments for DNA-binding proteins. *Nat Biotech.*, **26**, 1351-1359.
- Kidder, B.L., Hu, G., and Zhao, K.** (2011) ChIP-Seq: technical considerations for obtaining high-quality data. *Nature Immunology*, **12**, 918-922.
- Kim, S.R., Choi, J.L., Costa, M.A., and An, G.** (1992) Identification of G-box sequence as an essential element for methyl jasmonate response of potato proteinase inhibitor II promoter. *Plant Physiol.*, **99**, 627-631.
- Kim, S.R., Kim, Y., and An, G.** (1993) Identification of methyl jasmonate and salicylic acid response elements from the nopaline synthase (nos) promoter. *Plant Physiol.*, **103**, 97-103.
- Koo, A.J.K., Howe, G.A.** (2009) The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry*, **70**, 1571-1580.
- Koroleva, O.A., Tomlinson, M., Parinyapong, P., Sakvarelidze, L., Leader, D., Shaw, P. and Doonan, J.H.** (2004) CycD1, a putative G1 cyclin from *Antirrhinum majus*, accelerates the cell cycle in cultured tobacco BY-2 cells by enhancing both G1/S entry and progression through S and G2 phases. *Plant Cell*, **16**, 2364–2379.
- Kunkel, B.N. and Brooks, D.M.** (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**, 325-331.
- Kuppusamy, K.T., Walcher, C.L., and Nemhauser, J.L.** (2009) Crossregulatory mechanisms in hormone signaling. *Plant Mol. Biol.*, **69**, 375–381.
- Lackman, P., González-Guzmán, M., Tilleman, S., Carqueijeiro, I., Cuéllar Pérez, A., Moses, T., Seoh, M., Kannoh, Y., Häkkinen, S.T., Van Montagu, M.C.E., Theveleinf, J.M., Maaheimoa, H., Oksman-Caldenteya, K-M., Rodriguez, P.L., Rischer, H. and Goossens, A.** (2011) Jasmonate signaling involves the abscisic acid receptor PYL4 to regulate metabolic reprogramming in Arabidopsis and tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 5891-5896.

- Lamond, A.I., Spector, D.L.** (2003) Nuclear speckles: A model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **4**, 605–612.
- Landt, S.G., Marinov, G.K., Kundaje, A., Kheradpour, P., Pauli, F., Batzoglou, S., Bernstein, B.E., Bickel, P., Brown, J.B., Cayting, P., Chen, Y., DeSalvo, G., Epstein, C. et. al.** (2012) ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, **22**, 1813–1831.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L.** (2009) Ultrafast and memoryefficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.*, **10**, R25.
- Lee, T.I., Rinaldi, N.J., Robert, F., Odom, D.T., Bar-Joseph, Z., Gerber, G.K., Hannett, N.M., Harbison, C.T., Thompson, C.M., Simon, I., et al.** (2002) Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **298**, 799-804.
- Lehnert, S., Götz, C., Kartarius, S., Schäfer, B., Montenarh, M.** (2008) "Protein kinase CK2 interacts with the splicing factor hPrp3p." *Oncogene*, **27(17)**, 2390-2400.
- Li, P., Ponnala, L., Gandotra, N., Wang, L., Si, Y., Tausta, S.L., Kebrom, T.H., Provart, N., Patel, R., Myers, C.R., et al.** (2010) The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome. *Nat Genet.*, **42**, 1060-1067.
- Lin, W-J, and Sheu, G-T.** (1994) Traugh JA: Effects of autophosphorylation on casein kinase II activity: Evidence from mutations in the β subunit. *Biochemistry*, **33**, 6998–7004.
- Litchfield DW** (2003) Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J.*, **369**, 1–15.
- Liu, Y., Schiff, M., Serino, G., Deng, X.W., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2002) Role of SCF ubiquitinligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to tobacco mosaic virus. *Plant Cell*, **14**, 1483-1496.
- Liu, T., Ortiz, J.A., Taing, L., Meyer, C.A., Lee, B., Zhang, Y., Shin, H., Wong, S.S., Ma, J., Lei, Y., Pape, U.J., Poidinger, M., Chen, Y., Yeung, K., Brown, M., Turpaz, Y., and Liu, X.S.** (2011) Cistrome: an integrative platform for transcriptional regulation studies. *Genome Biology*, **12**:R83.
- Lobell, D.B., Schlenker, W., Costa-Roberts, J.** (2011) Climate Trends and Global Crop Production Since 1980. *Science*, **333**, 616-620.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J.J., and Solano, R.** (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*, **15**, 165-178.

- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sanchez-Serrano, J.J., and Solano, R.** (2004) JASMONATEINSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell*, **16**, 1938-1950.
- Lorenzo, O. and Solano, R.** (2005) Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**, 532-540.
- Lowry, J.A., and Atchley, W.R.** (2000) Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain. *J Mol Evol.*, **50**, 103–115.
- Iyer VR, Horak CE, Scafe CS, Botstein D, Snyder M, Brown PO.** (2001) Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature*, **409**, 533-538.
- Maes, L. et al.** (2008) Functional specialization of the TRANSPARENT TESTA GLABRA1 network allows differential hormonal control of laminal and marginal trichome initiation in Arabidopsis rosette leaves. *Plant Physiol*, **148**, 1453–1464.
- Mahalingam, R., Gomez-Buitrago, A., Eckardt, N., Shah, N., Guevara-Garcia, A., Day, P., Raina, R., and Fedoroff, N.V.** (2003) Characterizing the stress/defense transcriptome of Arabidopsis. *Genome Biol.*, **4**, R20.
- Malone, B.M., Tan, F., Bridges, S.M., and Peng, Z.** (2011) Comparison of Four ChIP-Seq Analytical Algorithms Using Rice Endosperm H3K27 Trimethylation Profiling Data. *PLoS ONE*, **6**, 1-12.
- Mandaokar, A., Thines, B., Shin, B., Lange, B.M., Choi, G., Koo, Y.J., Yoo, Y.J., Choi, Y.D., Choi, G., and Browse, J.** (2006) Transcriptional regulators of stamen development in Arabidopsis identified by transcriptional profiling. *Plant J.*, **46**, 984–1008.
- Mannervik, M., Nibu, Y., Zhang, H., Levine, M.** (1999) Transcriptional coregulators in development. *Science*, **284(5414)**, 606-609.
- Matys, V., Kel-Margoulis, O.V., Fricke, E., Liebich, I., Land, S., Barre-Dirrie, A., Reuter, I., Chekmenev, D., Krull, M., Hornischer, K., Voss, N., Stegmaier, P., Lewicki-Potapov, B., Saxel, H., Kel, A.E., and Wingender, E.** (2006) TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 108-110.
- Matsui, K., Umemura, Y., Ohme-Takagi M.** (2008) AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J.*, **55**, 954-67.

- McConn, M., Browse, J.** (1996) The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an Arabidopsis mutant. *Plant Cell*, **8**, 403–416
- McConn, M., Creelman, R.A., Bell, E., Mullet, J.E., and Browse, J.** (1997) Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5473-5477.
- McGrath, K.C., Dombrecht, B., Manners, J.M., Schenk, P.M., Edgar, C.I., Maclean, D.J., Scheible, W.R., Udvardi, M.K., and Kazan, K.** (2005) Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of Arabidopsis transcription factor gene expression. *Plant Physiol.*, **139**, 949-959.
- Meggio F, Pinna LA** (2003) One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?. *FASEB J.*, **17**, 349–368.
- Melotto, M., Mecey, C., Niu, Y., Chung, H.S., Katsir, L., et al.** (2008) A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *Plant J.*, **55**, 979–988.
- Menke, F.L.H., Champion, A., Kijne, J.W., and Memelink, J.** (1999) A novel jasmonate- and elicitorresponsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene Str interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *EMBO J.*, **18**, 4455-4463.
- Mohr, P.G. and Cahill, D.M.** (2003) Abscisic acid influences the susceptibility of Arabidopsis thaliana to Pseudomonas syringae pv. tomato and Peronospora parasitica. *Functional Plant Biology*, **30**, 461–469.
- Mulekar, J.J., Bu, Q., Chen, F., Huq, E.** (2012) Casein kinase II alpha subunits affect multiple developmental and stress-responsive pathways in Arabidopsis. *Plant J*, **69**, 343–354.
- Mussig, C., Biesgen, C., Lisso, J., Uwer, U., Weiler, E.W., and Altmann, T.** (2000) A novel stressinducible 12-oxophytodienoate reductase from Arabidopsis thaliana provides a potential link between brassinosteroid action and jasmonic acid synthesis. *J. Plant Physiol.*, **157**, 143-152.
- Myers, R.M., Stamatoyannopoulos, J., Snyder, M., Dunham, I., Hardison, R.C., Bernstein, B.E., Gingeras, T.R., Kent, W.J., Birney, E., Wold, B., et al.** (2011) A user's guide to the encyclopedia of DNA elements (ENCODE). *PLoS Biol.*, **9**: e1001046. doi: 10.1371/journal.pbio.1001046.
- Newton, M.A., Kendzierski, C.M., Richmond, C.S., Blattner, F.R., and Tsui, K.W.** (2001) On differential variability of expression ratios: improving statistical

- inference about gene expression changes from microarray data. *J. Comput. Biol.*, **8**, 37-52.
- Nieva, C., Busk, P.K., Dominguez-Puigjaner, E., Lumbreras, V., Testillano, P.S., Risueno, M.C., Pages, M.** (2005) Isolation and functional characterisation of two new bZIP maize regulators of the ABA responsive gene *rab28*. *Plant Mol Biol*, **58**, 899–914.
- Niinemets, U.** (2010) Responses of forest trees to single and multiple environmental stresses from seedlings to mature plants: past stress history, stress interactions, tolerance and acclimation. *Forest Ecology and Management*, **260**, 1623–1639.
- Nishii, A., Takemura, M., Fujita, H., Shikata, M., Yokota, A., and Kohchi, T.** (2000) Characterization of a novel gene encoding a putative single zinc-finger protein, ZIM, expressed during the reproductive phase in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1402-1409.
- Niu, Y., Figueroa, P., and Browse, J.** (2011) Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*, **62**, 2143–2154.
- Norman-Setterblad, C., Vidal, S., and Palva, E.T.** (2000) Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **13**, 430-438.
- Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. and Piater, L.** (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.*, **198**, 249–266.
- Ohme-Takagi, M. and Shinshi, H.** (1995) Ethylene-inducible DNA-binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell*, **7**, 173-182.
- Pauwels, L., and Goossens, A.** (2008) Fine-tuning of early events in the jasmonate response. *Plant Signal. Behav.*, **3**, 846–847.
- Pauwels, L., Inzé, D., Goossens, A.** (2009) Jasmonate-inducible gene: What does it mean?. *Trends Plant Sci.*, **14**, 87–91.
- Pauwels, L. and Goossens, A.** (2011) The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell*, **23**, 3089–3100.
- Penning, B.W., Hunter, C.T., 3rd, Tayengwa, R., Eveland, A.L., Dugard, C.K., Olek, A.T., Vermerris, W., Koch, K.E., McCarty, D.R., Davis, M.F., et al.** (2009) Genetic resources for maize cell wall biology. *Plant Physiol*, **151**, 1703-1728.

- Penninckx, I.A.M.A., Eggermont, K., Terras, F.R.G., Thomma, B.P.H.J., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Metraux, J.P., Manners, J.M., and Broekaert, W.F.** (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell*, **8**, 2309-2323.
- Penninckx, I.A.M.A., Thomma, B.P.H.J., Buchala, A., Metraux, J.P., and Broekaert, W.F.** (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**, 2103-2113.
- Petroni, K. and Tonelli, C.** (2011) Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. *Plant Sci.*, **181**, 219–229.
- Pieterse, C. M. J., van Wees, S. C. M., van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J., and van Loon, L. C.** (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**, 1571-1580.
- Piquemal J., Lapierre C., Myton K., O'Connell A., Schuch W., GrimaPettenati J., Boudet A.M.** (1998) Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. *Plant J.*, **13**, 71–83.
- Plana, M., Itarte, E., Eritja, R., Goday, A., Pages, M., Martinez, M.C.** (1991) Phosphorylation of maize RAB-17 protein by casein kinase 2. *J Biol Chem*, **266**, 22510–22514.
- Pooma, W., Gersos, C., and Grotewold, E.** (2002) Transposon insertions in the promoter of the *Zea mays* *al* gene differentially affect transcription by the Myb factors P and C1. *GENETICS*, **161**, 793-801.
- Priest, H.D., Filichkin, S.A., and Mockler, T.C.** (2009) Cis-regulatory elements in plant cell signaling. *Curr Opin Plant Biol.*, **12**, 643-649.
- Ptashne, M.** (1988) How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature*, **335**, 683-689.
- Qi, T. et al.** (2011) The jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-repeat/bHLH/MYB complexes to regulate jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **23**, 1795–1814.
- Quail, M.A., Kozarewa, I., Smith, F., Scally, A., Stephens, P.J., Durbin, R., Swerdlow, H., Turner, D.J.** (2008) A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system. *Nat Methods.*, **5**, 1005-10.

- Rabinowicz, P.D., Braun, E.L., Wolfe, A.D., Bowen, B., and Grotewold, E.** (1999) Maize R2R3 Myb genes: Sequence analysis reveals amplification in the higher plants. *GENETICS*, **153**, 427-444.
- Raes, J., Rohde, A., Christensen, J.H., Van de Peer, Y., and Boerjan, W.** (2003) Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **133**, 1051-1071.
- Ramsay, N.A., and Glover, B.J.** (2005) MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends Plant Sci*, **10**, 63-70.
- Reguera, M., Peleg, Z., Blumwald, E.** (2011) Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1819**, 186-194.
- Ren B, Robert F, Wyrick JJ, Aparicio O, Jennings EG, Simon I, Zeitlinger J, Schreiber J, Hannett N, Kanin E.** (2000) Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science*, **290**, 2306-2309.
- Reyes, R., Haendel, M., Grant, D., Melançon, E., and Eisen, J.S.** (2004) Slow degeneration of zebrafish Rohon-Beard neurons during programmed cell death. *Dev. Dyn.*, **229**, 30-41.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M., and Farmer, E.E.** (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. *Plant Cell*, **12**, 707-719.
- Riera, M., Figueras, M., López, C., Goday, A., and Pagès, M.** (2004) Protein kinase CK2 modulates developmental functions of the abscisic acid responsive protein Rab17 from maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 9879-9884.
- Riera, M., Irar, S., Vélez-Bermúdez, I.C., Carretero-Paulet, L., Lumbreras, V., Pagès, M.** (2011) Role of Plant-Specific N-Terminal Domain of Maize CK2 β 1 Subunit in CK2 β Functions and Holoenzyme Regulation. *PLoS ONE*, **6**, 1-7.
- Riera, M., Vélez-Bermúdez, I.C., Legnaioli, T. and Pagès, M.** (2013) Specific features of plant CK2. JOURNAL/BOOK TITLE: The Wiley-IUBMB Series on Biochemistry and Molecular Biology: Protein Kinase CK2. Edited by Lorenzo A. Pinna. WILEY-BLACKWELL. ISBN-13: 978-0-4709-6303-6.
- Ritsema T, van Zanten M, Leon-Reyes A, Voesenek LACJ, Millenaar FF, et al.** (2010) Kinome Profiling Reveals an Interaction Between Jasmonate, Salicylate and Light Control of Hyponastic Petiole Growth in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE*, **5**(12).
- Rivas-Astroza, M., Xie, D., Cao, X., and Zhong, S.** (2011) Mapping personal functional data to personal genomes. *Oxford University Press*.

- Rizhsky, L., Liang, H.J., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., Mittler, R.** (2004) When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology*, **134**, 1683–1696.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., and Jones, J.D.G.** (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just JASMONATESALICYLATE antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **49**, 317–343.
- Robertson, G., Hirst, M., Bainbridge, M., Bilenky, M., Zhao, Y., Zeng, T., Euskirchen, G., Bernier, B., Varhol, R., Delaney, A., et al.** (2007) Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing. *Nat Methods*, **4**, 651–657.
- Rojó, E., Leon, J., and Sanchez-Serrano, J.J.** (1999) Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in Arabidopsis thaliana. *Plant J.*, **20**, 135–142.
- Rolland, F. and Sheen, J.** (2005) Sugar sensing and signalling networks in plants. *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 269–271.
- Romero, I., Fuertes, A., Benito, M.J., Malpica, J.M., Leyva, A., and Paz-Ares, J.** (1998) More than 80R2R3-MYB regulatory genes in the genome of Arabidopsis thaliana. *Plant J.*, **14**, 273–284.
- Roth, B.A., Goff, S.A., Klein, T.M., and Fromm, M.E.** (1991) C1- and R-dependent expression of the maize Bz1 gene requires sequences with homology to mammalian myb and myc binding sites. *Plant Cell*, **3**, 317–325.
- Rouster, J., Leah, R., Mundy, J., and Cameron-Mills, V.** (1997) Identification of a methyl jasmonateresponsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain. *Plant J.*, **11**, 513–523.
- Rowland, O., Ludwig, A.A., Merrick, C.J. et al.** (2005) Functional analysis of Avr9/Cf-9 rapidly elicited genes identifies a protein kinase, ACIK1, that is essential for full Cf-9-dependent disease resistance in tomato. *Plant Cell*, **17**, 295–310.
- SABiosciences.** (2009) User manual, ChampionChIP™ PCR Array Real-Time PCR-Based Pathway or Disease-Focused Profiling of Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Samples. Version 1.1.
- Sainz, M.B., Grotewold, E., and Chandler, V.L.** (1997) Evidence for direct activation of an anthocyanin promoter by the maize C1 protein and comparison of DNA binding by related Myb domain proteins. *Plant Cell*, **9**, 611–625.
- Sambrook, J., and Russel, D.W.** (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA).

- Sasaki, Y., Asamizu, E., Shibata, D., Nakamura, Y., Kaneko, T., Awai, K., Amagai, M., Kuwata, C., Tsugane, T., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K.-I., Ohta, H., and Tabata, S.** (2001) Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in Arabidopsis by cDNA macroarray: self activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *DNA Res.*, **8**, 153-161.
- Schaller, F.** (2001) Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules. *J. Exp. Bot.*, **52**, 11-23.
- Schaller, F., Schaller, A., and Stintzi, A.** (2005) Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *J. Plant Growth Regul.*, **23**, 179-199.
- Schnable, P.S., Ware, D., Fulton, R.S., Stein, J.C., Wei, F., Pasternak, S., Liang, C., Zhang, J., Fulton, L., Graves, T.A., et al.** (2009) The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science*, **326**, 1112-1115.
- Schwechheimer, C., Serino, G., and Deng, X.W.** (2002) Multiple ubiquitin ligase-mediated processes require COP9 signalosome and AXR1 function. *Plant Cell*, **14**, 2553-2563.
- Sekhon, R.S., Lin, H., Childs, K.L., Hansey, C.N., Buell, C.R., de Leon, N., and Kaeppler, S.M.** (2011) Genome-wide atlas of transcription during maize development. *Plant J.*, **66**, 553-63.
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y.W., Hwang, I., Lee, J.S., and Choi, Y.D.** (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4788-4793.
- Serna, L., and Martin, C.** (2006) Trichomes: Different regulatory networks lead to convergent structures. *Trends Plant Sci.*, **11**, 274-280.
- Shah, J.** (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **6**, 365-371.
- Shan, X., Zhang, Y., Peng, W., Wang, Z., Xie, D.** (2009) Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, **60**, 3849-60.
- Sheard, L.B., et al.** (2010) Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, **468**, 400-405.
- Shikata, M., Takemura, M., Yokota, A., and Kohchi, T.** (2003) Arabidopsis ZIM, a plan-specific GATA factor, can function as a transcriptional activator. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 2495-2497.
- Shikata, M., Matsuda, Y., Ando, K., Nishii, A., Takemura, M., Yokota, A., and Kohchi, T.** (2004) Characterization of Arabidopsis ZIM, a member of a novel

- plant-specific GATA factor gene family. *Journal of Experimental Botany*, **55**, 631-639.
- Smale, S.T., Kadonaga, J.T.** (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.*, **72**, 449–479.
- Smith K.F., Flinn P.** (1991) Monitoring the performance of a broad-based calibration for measuring the nutritive value of two independent populations of pasture using near infrared reflectance (NIR) spectroscopy. *Aust. J. Exp. Agric.*, **31**, 205–210.
- Smith, Z.R., and Long, J.A.** (2010) Control of Arabidopsis apical-basal embryo polarity by antagonistic transcription factors. *Nature*, **464**, 423-426.
- Solano, R., Nieto, C., Avila, J., Canas, L., Diaz, I., and Paz-Ares, J.** (1995) Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB.Ph3) from *Petunia hybrida*. *EMBO J.*, **14**, 1773-1784.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., and Ecker, J.R.** (1998) Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSEFACTOR1. *Genes Dev.*, **12**, 3703-3714.
- Solano, R. and Ecker, J.R.** (1998) Ethylene gas: perception, signaling and response. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **1**, 393-398.
- Sonbol, F.M., Fornale, S., Capellades, M., Encina, A., Tourino, S., Torres, J.L., Rovira, P., Ruel, K., Puigdomenech, P., Rigau, J., et al.** (2009) The maize ZmMYB42 represses the phenylpropanoid pathway and affects the cell wall structure, composition and degradability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.*, **70**, 283-296.
- Song, S., Qi, T., Huang, H., Ren, Q., Wu, D., Chang, C., Peng, W., Liu, Y., Peng, J., and Xie, D.** (2011) The Jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **23**, 1000–1013.
- Spector, D.L., and Lamond, A.I.** (2011) Nuclear Speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **3**:a000646.
- Spitzer-Rimon, B., Marhevka, E., Barkai, O., Marton, I., Edelbaum, O., Masci, T., Prathapani, N-K., Shklarman, E., Ovadis, M. and Vainstein, A.** (2010) EOBII, a gene encoding a flower-specific regulator of phenylpropanoid volatiles' biosynthesis in *petunia*. *Plant Cell*, **22**, 1961–1976.
- Staswick, P.E., Su, W., and Howell, S.H.** (1992) Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6837–6840.

- Staswick, P.E., Yuen, G.Y., and Lehman, C.C.** (1998). Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J.*, **16**, 747–754.
- Staswick, P.E., Tiryaki, I.** (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 2117–27
- Staswick, P.E.** (2008) JAZing up jasmonate signaling. *Trends in Plant Science*, **13**, No.2.
- Stracke, R., Ishihara, H., Huep, G., Barsch, A., Mehrrens, F., Niehaus, K., and Weisshaar, B.** (2007) Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *Plant J.*, **50**, 660-677.
- Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B.** (2001) The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol.*, **4**, 447-456.
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C.V., Estelle, M., and Zheng, N.** (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*, **446**, 640-645.
- Taylor, L.P., and Grotewold, E.** (2005) Flavonoids as developmental regulators. *Curr Opin Plant Biol.*, **8**, 317-323.
- Tchieu, J.H., Fana, F., Fink, J.L., Harper, J., Nair, T.M., Niedner, R.H., Smith, D.W., Steube, K., Tam, T.M., Veretnik, S., et al** (2003) The PlantsP and PlantsT functional genomics databases. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 342–344.
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Doczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J.L., Hirt, H.** (2004) The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell*, **15**, 141–152.
- The ENCODE Project Consortium.** (2004) The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science*, **306**, 636–640.
- The ENCODE Project Consortium.** (2011) A user's guide to the encyclopedia of DNA elements (ENCODE). *PLoS Biol.*, **9**, e1001046. doi: 10.1371/journal.pbio.1001046.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., and Browse, J.** (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCFCO11 complex during jasmonate signalling. *Nature*, **448**, 661-665.
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I.A.M.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A., and Broekaert, W.F.** (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in

- Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 15107-15111.
- Tiryaki, I. and Staswick, P.E.** (2002) An Arabidopsis mutant defective in jasmonate response is allelic to the auxin-signaling mutant *axr1*. *Plant Physiol.*, **130**, 887-894.
- Ton, J., Flors, V., and Mauch-Mani, B.** (2009) The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science*, **14**, 310–317.
- Tosoni, K., Costa, A., Sarno, S., D'Alessandro, S., Sparla, F., Pinna, L.A., Zottini, M., Ruzzene, M.** (2011) The p23 co-chaperone protein is a novel substrate of CK2 in Arabidopsis. *Mol Cell Biochem*, **356**, 245–254.
- Traw, M.B., and Bergelson, J.** (2003) Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **133**, 1367–1375.
- Turatsinze, J.V., Thomas-Chollier, M., Defrance, M. and van Helden, J.** (2008) Using RSAT to scan genome sequences for transcription factor binding sites and cis-regulatory modules. *Nat Protoc*, **3**, 1578-1588.
- Turner, J.G., Ellis, C., and Devoto, A.** (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*, **14** Suppl, S153-S164.
- Ucar, D., Beyer, A., Parthasarathy, S., and Workman, C.T.** (2009) Predicting functionality of protein-DNA interactions by integrating diverse evidence. *Bioinformatics*, **25**, i137-144.
- Valouev, A., Johnson, D.S., Sundquist, A., Medina, C., Anton, E., Batzoglou, S., Myers, R.M., Sidow, A.** (2008) Genome-wide analysis of transcription factor binding sites based on CHIP-Seq data. *Nat Methods*, **5**, 829-834.
- Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., and Pieterse, C.M.J.** (2009) Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry*, **70**, 1581–1588.
- Vanholme, B., Grunewald, W., Bateman, A., Kohchi, T., and Gheysen, G.** (2007) The tify family previously known as ZIM. *Trends Plant Sci.*, **12**, 239-244.
- Vélez-Bermúdez, I., Irar, S., Carretero-Paulet, L., Pagès, M., Riera, M.** (2011) Specific characteristics of CK2B regulatory subunits in plants. *Mol Cell Biochem*, **356**, 255–260.
- Vick, B., and Zimmerman, D.C.** (1984) Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiol.*, **75**, 458-461.

- Vignols, F., Rigau, J., Torres, M.A., Capellades, M., and Puigdomenech, P.** (1995) The brown midrib3 (bm3) mutation in maize occurs in the gene encoding caffeic acid O-methyltransferase. *Plant Cell*, **7**, 407–416.
- Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, C.A., Cook, R.J., and Browse, J.** (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7209–7214.
- Wang, C., Xu, J., Zhang, D., Wilson, Z.A., and Zhang, D.** (2011) An effective approach for identification of *in vivo* protein-DNA binding sites from paired-end ChIP-Seq data. *BMC Bioinformatics*, **11**:81.
- Wang, H.C., Wu, J.S., Chia, J.C., Yang, C.C., Wu, Y.J., Juang, R.H.** (2009) Phytochelatin Synthase Is Regulated by Protein Phosphorylation at a Threonine Residue Near Its Catalytic Site. *J Agric Food Chem*, **57**, 7348–7355.
- Wang, X., Elling, A.A., Li, X., Li, N., Peng, Z., He, G., Sun, H., Qi, Y., Liu, X.S., and Deng, X.W.** (2009) Genome-wide and organ-specific landscapes of epigenetic modifications and their relationships to mRNA and small RNA transcriptomes in maize. *Plant Cell*, **21**, 1053–1069.
- Wasternack, C., and Hause, B.** (2002) Jasmonates and octadecanoids: Signals in plant stress responses and development. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **72**, 165–221.
- Wasternack, C.** (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.*, **100**, 681–697.
- White, D.W.R.** (2006) PEAPOD regulates lamina size and curvature in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 13238–13243.
- Wiese, J., Kranz, T., Schubert, S.** (2004) Induction of pathogen resistance in barley by abiotic stress. *Plant Biology*, **6**, 529–536.
- Wu, S., Wang, J., Zhao, W., Pounds, S., and Cheng, C.** (2010) ChIP-PaM: a new algorithm to identify protein-DNA interaction using ChIP-Seq data. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, **7**, 18.
- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., and Turner, J.G.** (1998) COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science*, **280**, 1091–1094.
- Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D., and Xie, D.** (2002) The SCFCO11 ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. *Plant Cell*, **14**, 1919–1935.

- Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., Peng, W., Luo, H., Nan, F., Wang, Z., and Xie, D.** (2009) The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell*, **21**, 2220–2236.
- Yan, Y., Stolz, S., Chételat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L., and Farmer, E.E.** (2007) A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell*, **19**, 2470–2483.
- Yoshida, Y., Sano, R., Wada, T., Takabayashi, J., and Okada, K.** (2009) Jasmonic acid control of GLABRA3 links inducible defense and trichome patterning in Arabidopsis. *Development*, **136**, 1039–1048.
- Zhang, F., Gonzalez, A., Zhao, M., Payne, C.T., and Lloyd, A.** (2003) A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of Arabidopsis. *Development*, **130**, 4859–4869.
- Zhang, H-B. et al.** (2012) Tobacco transcription factors NtMYC2a and NtMYC2b form nuclear complexes with the NtJAZ1 repressor and regulate multiple jasmonate-inducible steps in nicotine biosynthesis. *Mol. Plant.*, **5**, 73–84.
- Zhang, J.Z., Creelman, R.A. and Zhu, J.K.** (2004) From laboratory to field. Using information from Arabidopsis to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. *Plant Physiol.*, **135**, 615–621.
- Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eeckhoute, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W., et al.** (2008) Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.*, **9**, R137.
- Zhang, Y., Turner, J.G.** (2008) Wound-Induced Endogenous Jasmonates Stunt Plant Growth by Inhibiting Mitosis. *PLoS ONE*, **3**, 11.
- Zhang, Y., Gao, M., Singer, S.D., Fei, Z., Wang, H., and Wang, X.** (2012) Genome-Wide Identification and Analysis of the TIFY Gene Family in Grape. *PLoS ONE*, **7**, 1-9.
- Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R.** (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.*, **23**, 283–333.
- Zhao, Q., Wang, H., Yin, Y., Xu, Y., Chen, F. And Dixon, R.A.** (2010) Syringyl lignin biosynthesis is directly regulated by a secondary cell wall master switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 14496–14501.
- Zhu, C., Byers, K.J., McCord, R.P., Shi, Z., Berger, M.F., Newburger, D.E., Saulrieta, K., Smith, Z., Shah, M.V., Radhakrishnan, M., Philippakis, A.A., Hu, Y., De Masi, F., Pacek, M., Rolfs, A., Murthy, T., Labaer, J., and Bulyk, M.L.** (2009) High-resolution DNAbinding specificity analysis of yeast transcription factors. *Genome Res.*, **19**, 556-566.

- Zimmermann, I.M., Heim, M.A., Weisshaar, B., and Uhrig, J.F. (2004)**
Comprehensive identification of *Arabidopsis thaliana* MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins. *Plant J.*, **40**, 22–34.

ANEXO I

ChIP-Seq de ZmZIM91

proveniente de

protoplastos de maíz

Picos seleccionados para la validación del ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz

Pico	Anticuerpo	Identificador en MACS	Genes en la zona flanqueante 5' y función putativa
1	GFP	437	GRMZM2G436038 (Ribosomal protein)
	91,1	119	
2	GFP	808	GRMZM2G070899 (GTPasa activ/GTP binding, defense, response to cadmium ion, vesicle mediated transport)
	91,1	184	
3	GFP	824	GRMZM2G057466 (Hidroxilase modif hist/Jumonji: response to chitin)
	91,1	188	
4	GFP	849	GRMZM2G009655 (Ubiquitin depen/metabolic process, UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 10)
	91,1	200	
5	GFP	1000	GRMZM2G058402 (Negative regulator of metabolic process/ ATPase inhibitor activity)
	91,1	258	
6	GFP	1278	GRMZM2G031138 (Metabolic process/UDP-glycosyltransferase activity)
	91,1	316	
7	GFP	1312	GRMZM2G463726 (C2 calcium/lipid-binding plant phosphoribosyltransferase family protein)
	91,1	319	
8	GFP	1521	GRMZM2G176225 (WAK53a-OsWAK receptor-like protein kinase/calcium binding/cytoplasmic serine/threonine protein kinase induced by salicylic)
	91,1	340	
9	GFP	1555	GRMZM2G050234 (Metabolic process/2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein, oxidoreductase activity)
	91,1	345	
10	GFP	2386	GRMZM2G135722 (Metabolic process/UDP-Glycosyltransferase superfamily protein, transferase activity/Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase)
	91,1	605	
11	GFP	2453	GRMZM2G155321 (GRMZM2G155285/F-box)
	91,1	617	
12	GFP	2639	GRMZM2G114444 (basic Helix-Loop-Helix 121 (bHLH121)/DNA binding, sequence-specific DNA binding transcription factor activity)
	91,1	642	
13	GFP	2764	GRMZM2G147726 (GTPasa activ/GTP binding/ response to cadmium ion)
	91,1	674	
14	GFP	3163	GRMZM2G003377 (RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein, RNA binding, nucleotide binding, nucleic acid binding/GRMZM2G003411 ABA transport)
	91,1	797	
15	GFP	3230	GRMZM2G108716 (TFIIS: Regulation of the transc RNA polimerase II promoter/F-box family protein: zinc ion binding/GRMZM5G899149 Ribosomal protein S26e family protein)
	91,1	814	
16	GFP	3250	GRMZM2G007063 (Defense/Inflamation/bZIP protein BZO2H3 mRNA, protein heterodimerization activity, sequence-specific DNA binding transcription factor activity/COP1-INTERACTIVE PROTEIN 1/GRMZM2G305254 immune response)
	91,1	816	
17	GFP	3509	GRMZM2G097207 (Hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds)
	91,1	875	
18	GFP	3591	GRMZM2G129713 (FAD binding / catalytic/ electron carrier/ oxidoreductase)
19	91,1	926	GRMZM2G014444 (Structural constituent of ribosome/traslation)
20	GFP	3813	GRMZM2G320786 (Lignin catabolic process/flavonoides)
	91,1	956	
21	GFP	3884	GRMZM5G862817 (F-box)
	91,1	967	
22	GFP	4634	GRMZM2G071147 (Uncharacterized)
	91,1	1184	
23	GFP	4654	GRMZM2G096709 (Regulation of transcription/ATP binding/Growth-regulating factor)
	91,1	1186	
24	GFP	4761	GRMZM2G010702 (Uncharacterized)
	91,1	1205	
25	GFP	4762	GRMZM2G010702 (Uncharacterized)
	91,1	1206	

Pico	Anticuerpo	Identificador en MACS	Genes en la zona flanqueante 5' y función putativa
26	GFP	4771	GRMZM2G144030 (Eukaryotic translation initiation factor 5A/RNA binding/elongation/ribosoma binding/osmotic stress)
	91,1	1208	
27	GFP	5351	GRMZM2G043498 (PX_domain; The Phox Homology domain, a phosphoinositide binding module)
	91,1	1321	
28	GFP	5650	GRMZM2G053908 (Transmembrane transport/binding)
	91,1	1410	
29	GFP	5747	GRMZM2G438606 (Uncharacterized)
	91,1	1417	
30	91,1	813	GRMZM2G002805 (Zinc ion binding/stress response/chitin response: plan defense elicitor)
31	GFP	2453	GRMZM2G155285 (F-box domain: E3 ubiquitin ligase SCF complex that functions in phosphorylation mediated ubiquitination)
32	GFP	3256	GRMZM5G897818 (DNA replication/G-protein coupled receptor protein signaling pathway/DNA binding/Nucleotide binding)
33	GFP	3408	GRMZM2G012926 (Phosphopantetheine binding) (GRMZM2G012209: Chloride transport/cell volume homeostasis)
34	91,1	95	Involved in abscisic acid (ABA) signal transduction. Negative regulator of ABA promotion of stomatal closure.
35	91,1	111	Involved in the acquisition of freezing tolerance.
36	91,1	656	INVOLVED IN: signal transduction, protein amino acid phosphorylation, regulation of transcription, DNA-dependent
37	91,1	751	Encodes a putative (NAD+) aldehyde dehydrogenase.
38	91,1	793	INVOLVED IN: metabolic process
39	91,1	803	Protein serine/threonine kinase activity, protein kinase activity, kinase activity, ATP binding
40	91,1	849	FUNCTIONS IN: protein binding; INVOLVED IN: apoptosis, defense response
41	91,1	903	Involved in Cu detoxification
42	91,1	963	Protein serine/threonine kinase activity, protein kinase activity, kinase activity, ATP binding, INVOLVED IN: protein amino acid phosphorylation
43	91,1	1070	Helicase activity, binding, DNA binding, nucleic acid binding, ATP binding
44	91,1	1345	Rac GTPase activator activity; INVOLVED IN: signal transduction
45	91,1	1365	ATP-BINDING CASSETTE C8, MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN 6
46	91,1	1369	Protein serine/threonine kinase activity, kinase activity, ATP binding; INVOLVED IN: transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway, protein amino acid phosphorylation
47	91,1	1406	Involved in sorting seed storage proteins into vacuoles

Tabla SI1. Picos seleccionados para validación del ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. En la primer columna se encuentra la numeración de cada pareja de cebadores diseñados con el programa PRIMER3; en la segunda, los anticuerpos con los que se encontró cada pico que está identificado en la tercer columna y finalmente en la cuarta, se muestran los identificadores de los genes de las zonas que flanquean los picos y el GO encontrado para sus homólogos en *Arabidopsis*.

Identificación de putativos genes diana de ZmZIM91 en el ChIP-Seq de protoplastos de maíz

Otros picos enriquecidos en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos fueron localizados con ayuda del *software* IGV y se muestran a continuación:

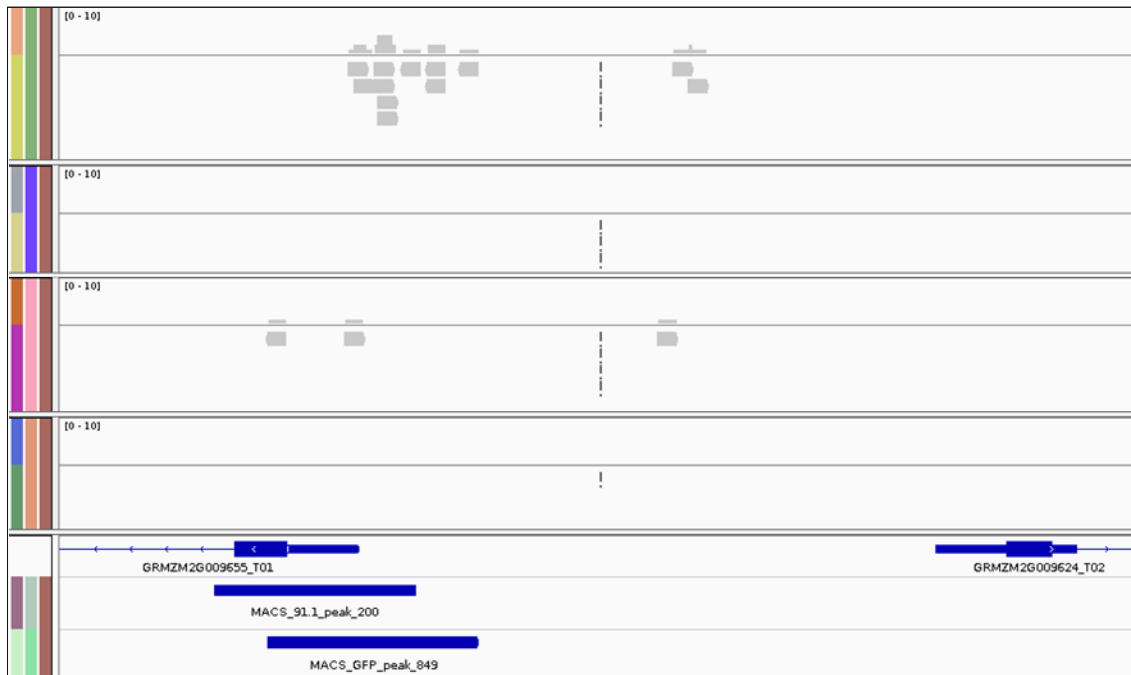


Figura S11. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. Los picos fueron mapeados en el genoma del maíz usando el *software* IGV 2.1. El gen *GRMZM2G009655_T01* se encuentra próximo a los picos. El orden de cada región es el siguiente: En el primero, ZmZIM91_antiGFP; en el segundo, el control negativo GFP_antiGFP; en el tercero, ZmZIM91_anti91 y en el cuarto, el control negativo GFP_anti91. En la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM2G009655_T01* y los identificadores de los picos en con MACS para ZmZIM91_antiGFP y ZmZIM91_anti91.

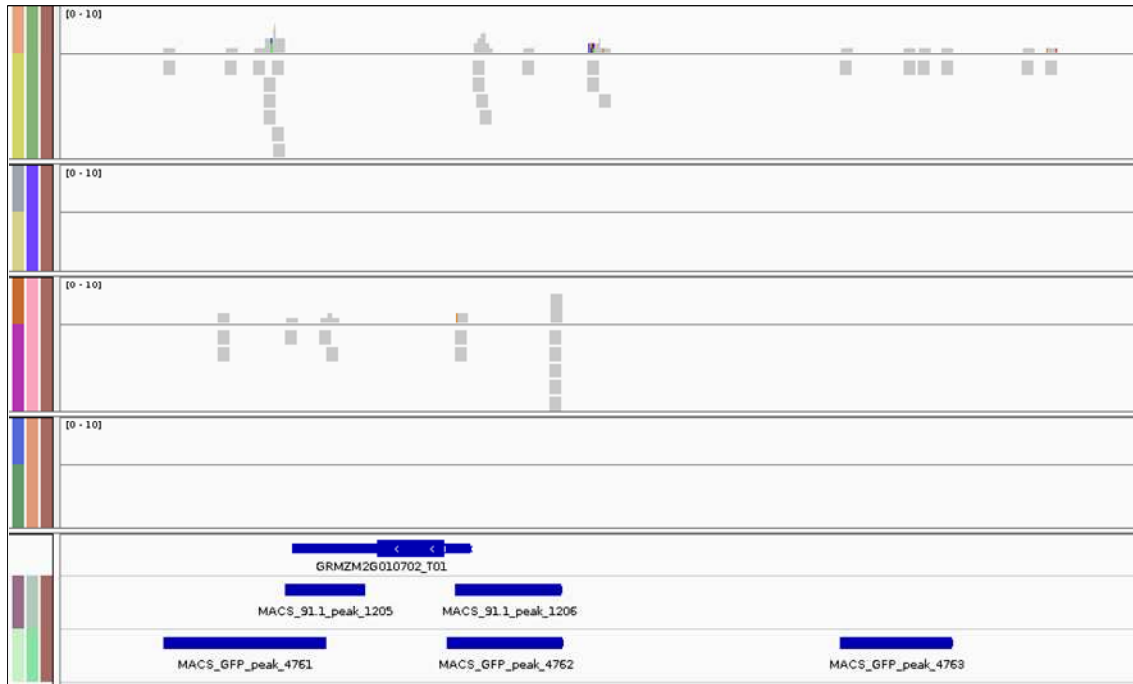


Figura S12. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. Los picos fueron mapeados en el genoma del maíz usando el *software IGV 2.1*. El gen *GRMZM2G010702_T01* se encuentra próximo a los picos. El orden de cada reglón es el siguiente: En el primero, ZmZIM91_antiGFP; en el segundo, el control negativo GFP_antiGFP; en el tercero, ZmZIM91_anti91 y en el cuarto, el control negativo GFP_anti91. En la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM2G010702_T01* y los identificadores de los picos en con MACS para ZmZIM91_antiGFP y ZmZIM91_anti91.

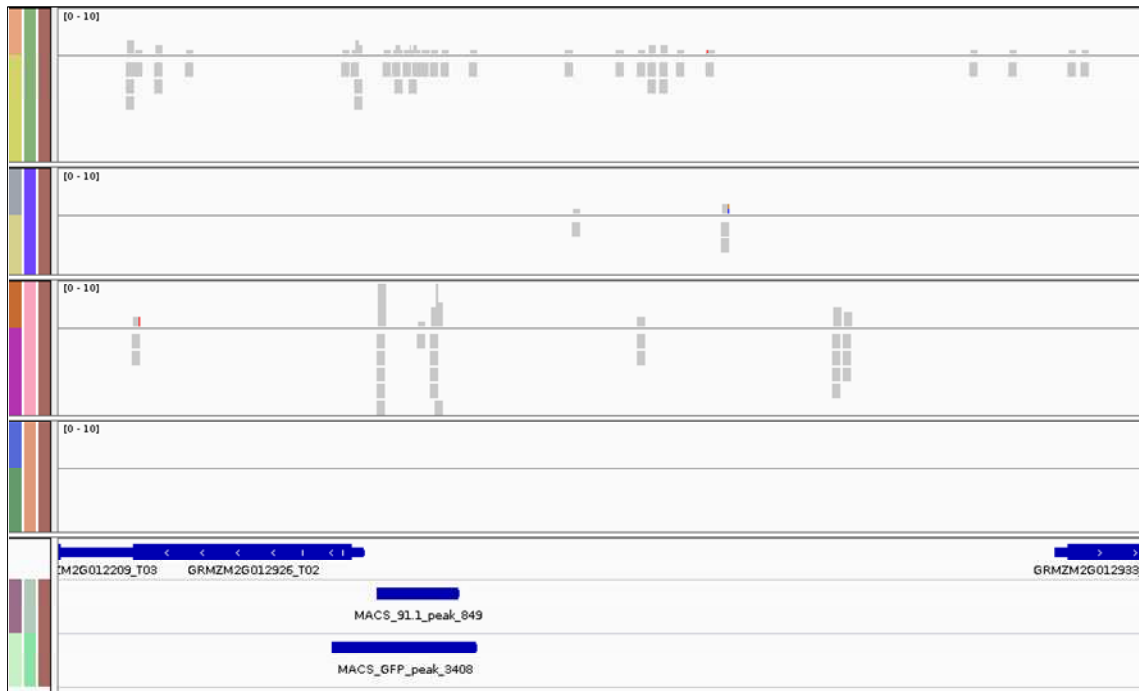


Figura S13. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. Los picos fueron mapeados en el genoma del maíz usando el *software* IGV 2.1. El gen *GRMZM2G012926_T02* se encuentra próximo a los picos. El orden de cada reglón es el siguiente: En el primero, ZmZIM91_antiGFP; en el segundo, el control negativo GFP_antiGFP; en el tercero, ZmZIM91_anti91 y en el cuarto, el control negativo GFP_anti91. En la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM2G012926_T02* y los identificadores de los picos en con MACS para ZmZIM91_antiGFP y ZmZIM91_anti91.

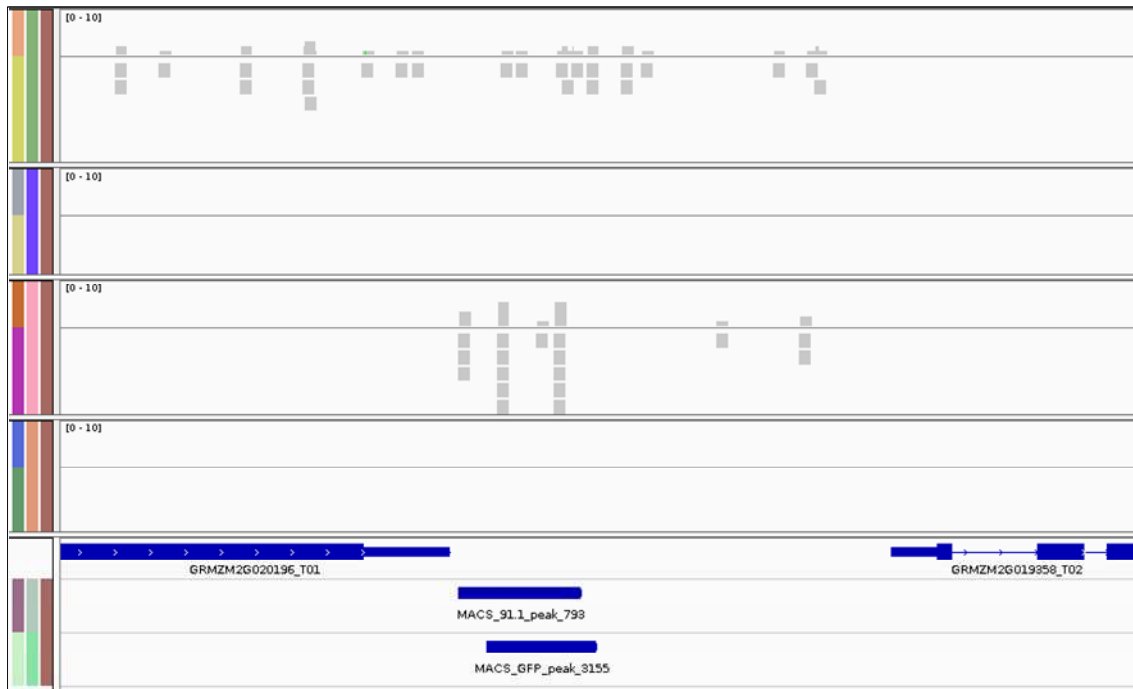


Figura S14. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. Los picos fueron mapeados en el genoma del maíz usando el software IGV 2.1. Los genes *GRMZM2G019358_T02* y *GRMZM2G020196_T01* se encuentran próximos a los picos. El orden de cada reglón es el siguiente: En el primero, ZmZIM91_antiGFP; en el segundo, el control negativo GFP_antiGFP; en el tercero, ZmZIM91_anti91 y en el cuarto, el control negativo GFP_anti91. En la parte inferior se puede ver el diagrama de los genes *GRMZM2G019358_T02* y *GRMZM2G020196_T01* y los identificadores de los picos en con MACS para ZmZIM91_antiGFP y ZmZIM91_anti91.

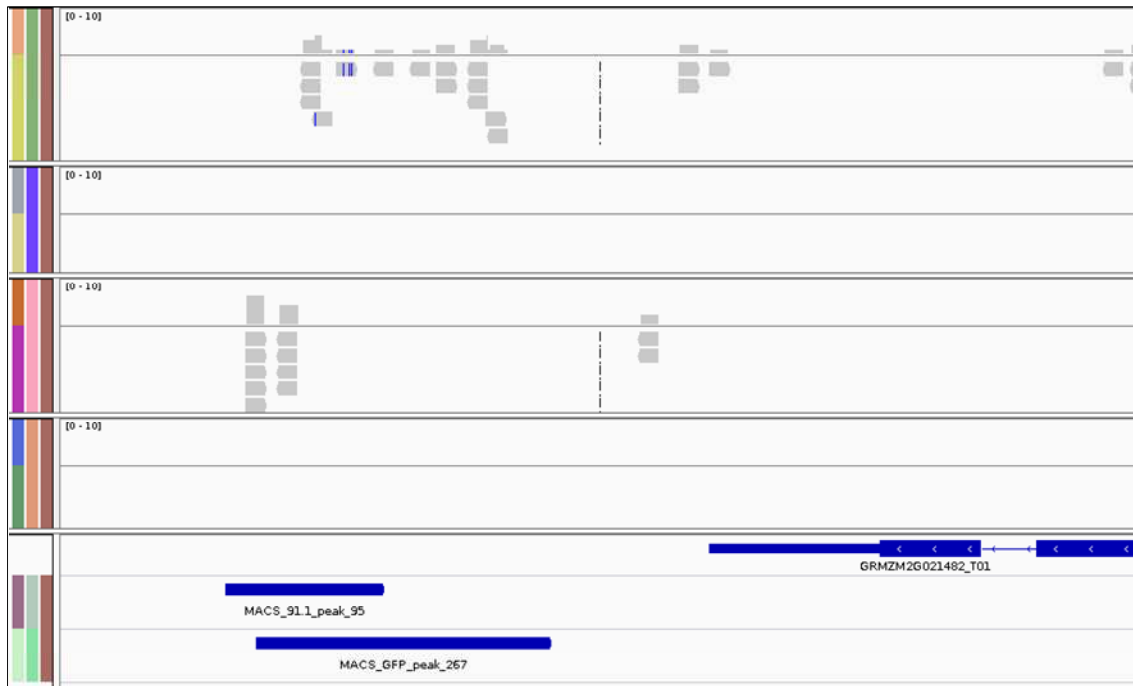


Figura S15. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. Los picos fueron mapeados en el genoma del maíz usando el *software* IGV 2.1. El gen *GRMZM2G021482_T01* se encuentra próximo a los picos. El orden de cada reglón es el siguiente: En el primero, ZmZIM91_antiGFP; en el segundo, el control negativo GFP_antiGFP; en el tercero, ZmZIM91_anti91 y en el cuarto, el control negativo GFP_anti91. En la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM2G021482_T01* y los identificadores de los picos en con MACS para ZmZIM91_antiGFP y ZmZIM91_anti91.

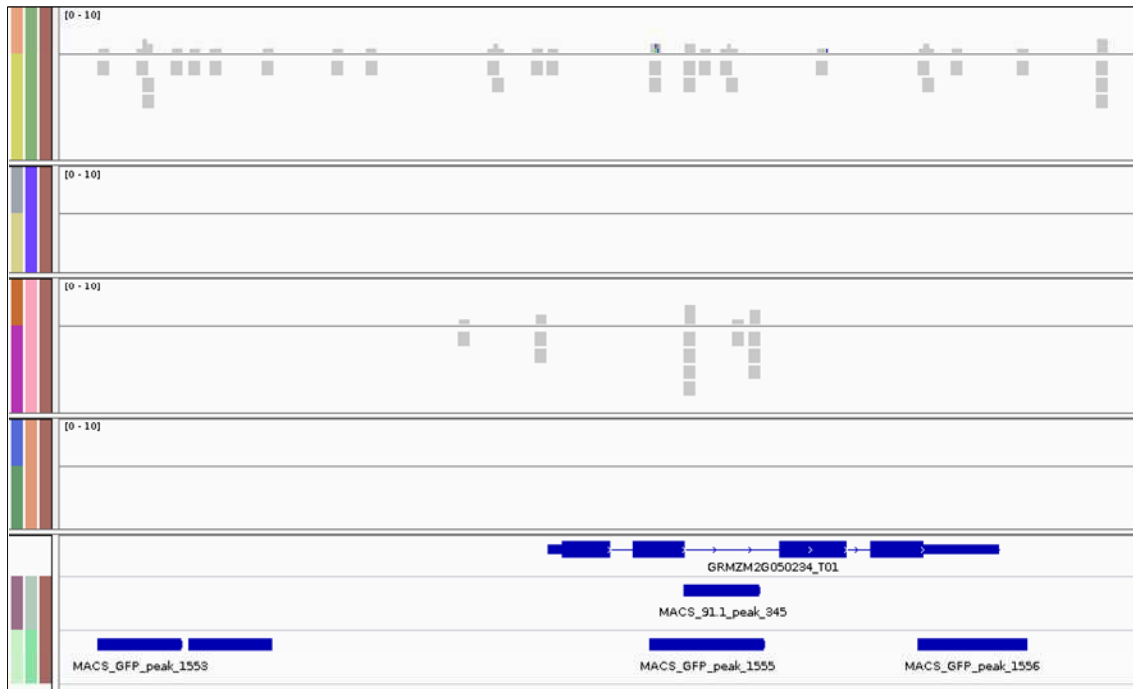


Figura SI6. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. Los picos fueron mapeados en el genoma del maíz usando el *software IGV 2.1*. El gen *GRMZM2G050234_T01* se encuentra próximo a los picos. El orden de cada reglón es el siguiente: En el primero, ZmZIM91_antiGFP; en el segundo, el control negativo GFP_antiGFP; en el tercero, ZmZIM91_anti91 y en el cuarto, el control negativo GFP_anti91. En la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM2G050234_T01* y los identificadores de los picos en con MACS para ZmZIM91_antiGFP y ZmZIM91_anti91.

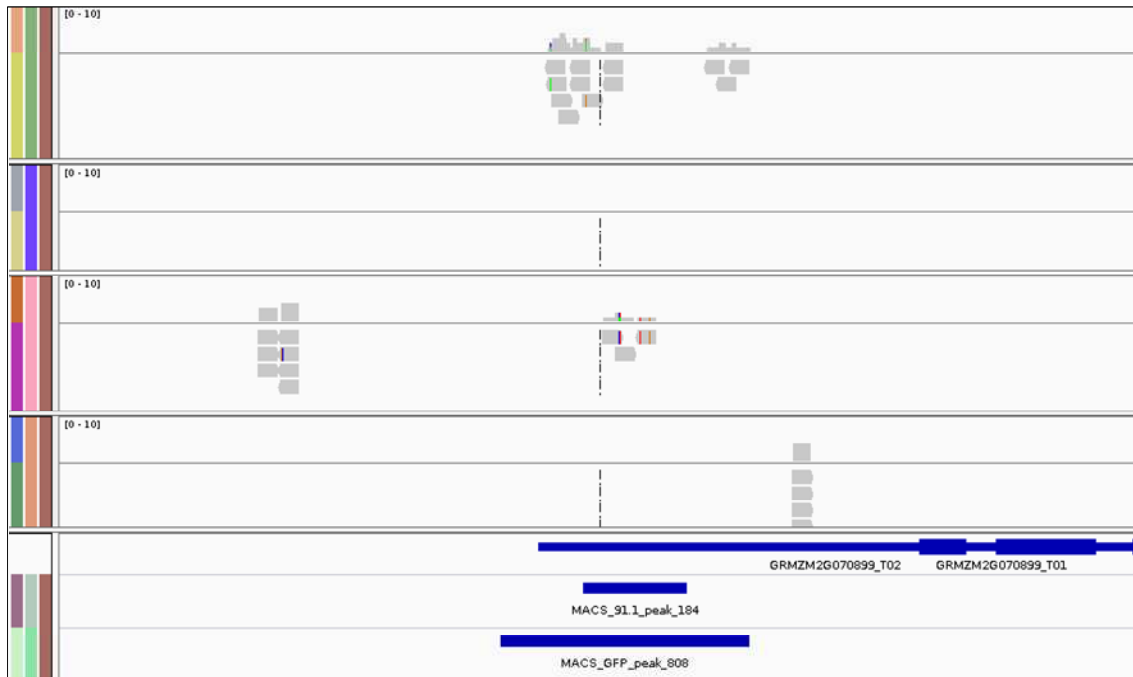


Figura SI7. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. Los picos fueron mapeados en el genoma del maíz usando el software IGV 2.1. El gen *GRMZM2G070899_T02* se encuentra próximo a los picos. El orden de cada reglón es el siguiente: En el primero, ZmZIM91_antiGFP; en el segundo, el control negativo GFP_antiGFP; en el tercero, ZmZIM91_anti91 y en el cuarto, el control negativo GFP_anti91. En la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM2G070899_T02* y los identificadores de los picos en con MACS para ZmZIM91_antiGFP y ZmZIM91_anti91.

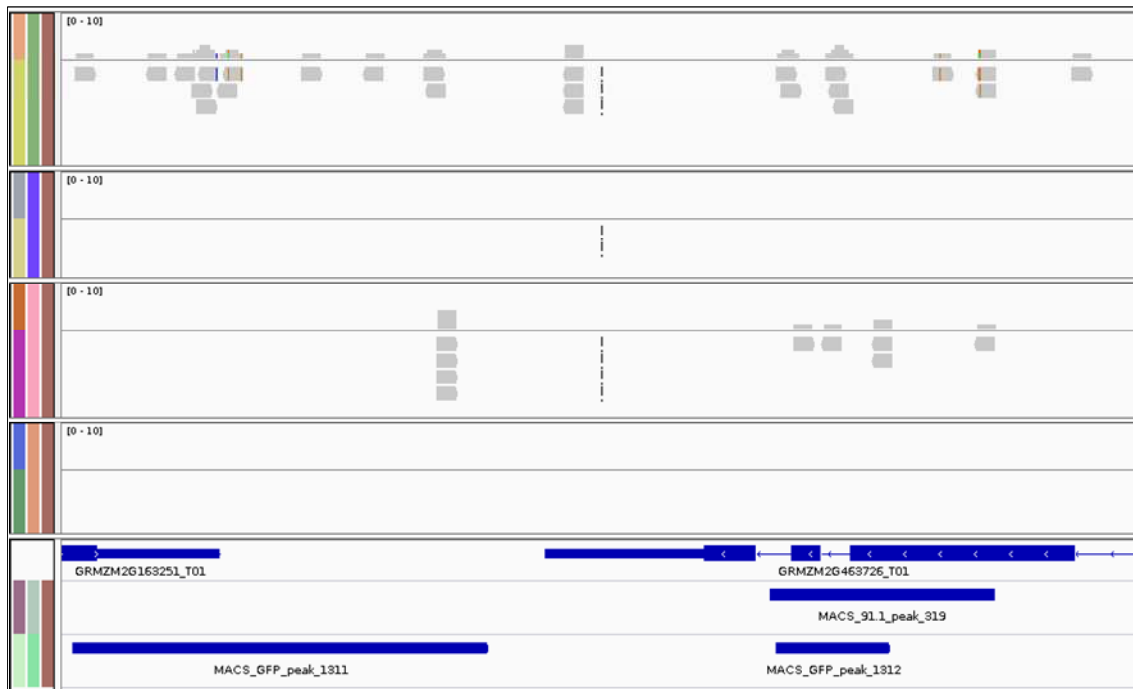


Figura SI8. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. Los picos fueron mapeados en el genoma del maíz usando el *software IGV 2.1*. Los genes *GRMZM2G163251_T01* y *GRMZM2G463726_T01* se encuentran próximos a los picos. El orden de cada reglón es el siguiente: En el primero, ZmZIM91_antiGFP; en el segundo, el control negativo GFP_antiGFP; en el tercero, ZmZIM91_anti91 y en el cuarto, el control negativo GFP_anti91. En la parte inferior se puede ver el diagrama de los genes *GRMZM2G163251_T01* y *GRMZM2G463726_T01* y los identificadores de los picos en con MACS para ZmZIM91_antiGFP y ZmZIM91_anti91.

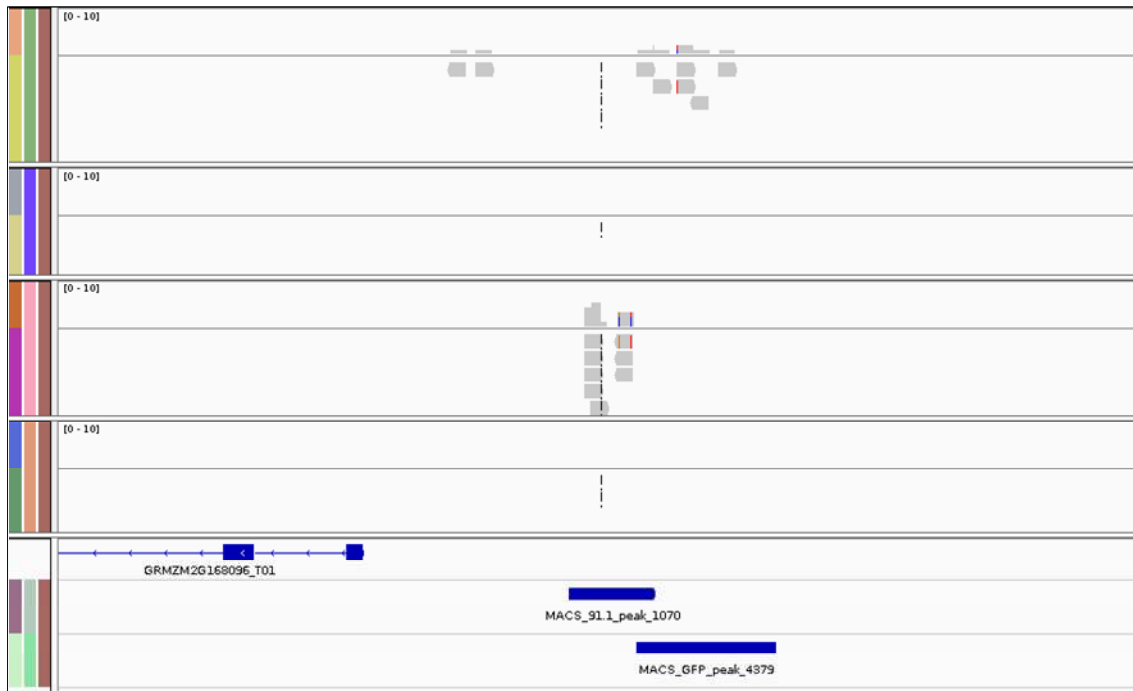


Figura S19. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. Los picos fueron mapeados en el genoma del maíz usando el software *IGV 2.1*. El gen *GRMZM2G168096_T01* se encuentra próximo a los picos. El orden de cada reglón es el siguiente: En el primero, ZmZIM91_antiGFP; en el segundo, el control negativo GFP_antiGFP; en el tercero, ZmZIM91_anti91 y en el cuarto, el control negativo GFP_anti91. En la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM2G168096_T01* y los identificadores de los picos en con MACS para ZmZIM91_antiGFP y ZmZIM91_anti91.



Figura SI10. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. Los picos fueron mapeados en el genoma del maíz usando el *software* IGV 2.1. El gen *GRMZM2G169020_T08* se encuentra próximo a los picos. El orden de cada reglón es el siguiente: En el primero, ZmZIM91_antiGFP; en el segundo, el control negativo GFP_antiGFP; en el tercero, ZmZIM91_anti91 y en el cuarto, el control negativo GFP_anti91. En la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM2G169020_T08* y los identificadores de los picos en con MACS para ZmZIM91_antiGFP y ZmZIM91_anti91.

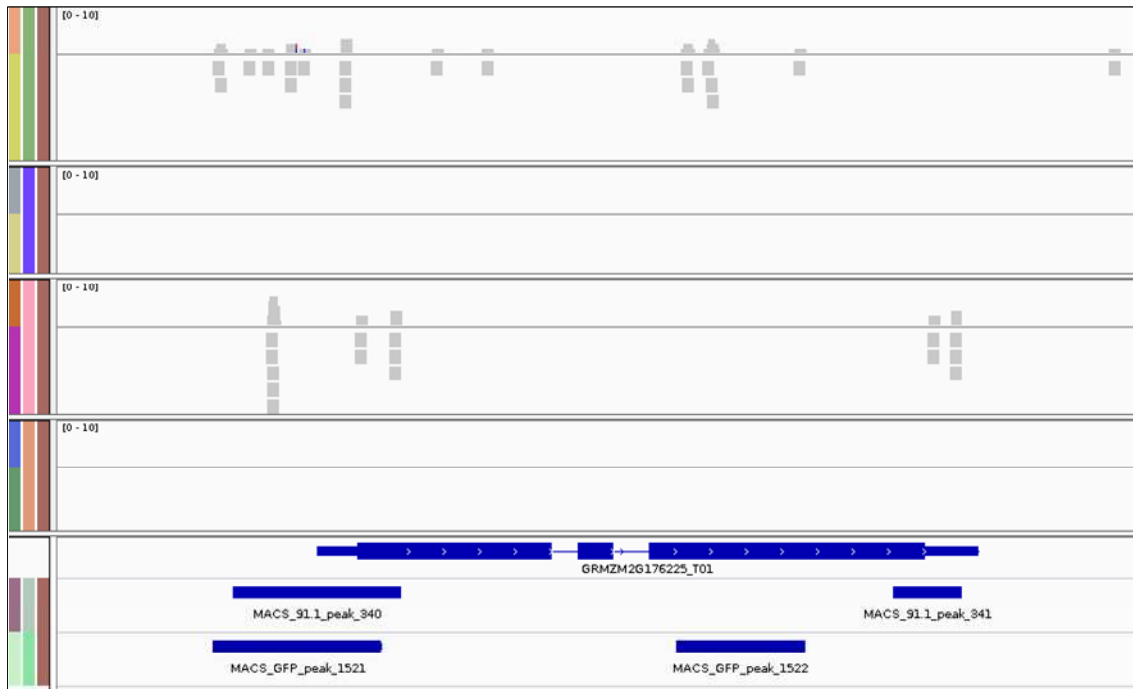


Figura SI11. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. Los picos fueron mapeados en el genoma del maíz usando el *software IGV 2.1*. El gen *GRMZM2G176225_T01* se encuentra próximo a los picos. El orden de cada reglón es el siguiente: En el primero, ZmZIM91_antiGFP; en el segundo, el control negativo GFP_antiGFP; en el tercero, ZmZIM91_anti91 y en el cuarto, el control negativo GFP_anti91. En la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM2G176225_T01* y los identificadores de los picos en con MACS para ZmZIM91_antiGFP y ZmZIM91_anti91.

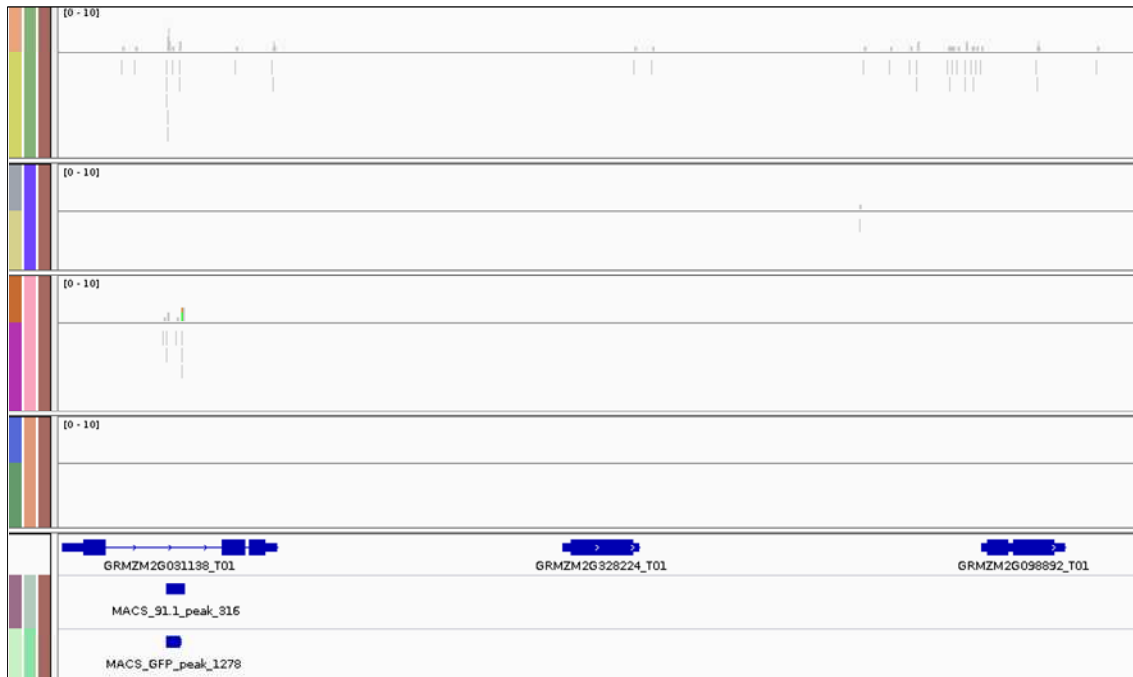


Figura SI12. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. Los picos fueron mapeados en el genoma del maíz usando el software IGV 2.1. Los genes *GRMZM2G031138_T01* y *GRMZM2G822824_T01* se encuentran próximos a los picos. El orden de cada reglón es el siguiente: En el primero, ZmZIM91_antiGFP; en el segundo, el control negativo GFP_antiGFP; en el tercero, ZmZIM91_anti91 y en el cuarto, el control negativo GFP_anti91. En la parte inferior se puede ver el diagrama de los genes *GRMZM2G031138_T01* y *GRMZM2G822824_T01* y los identificadores de los picos en con MACS para ZmZIM91_antiGFP y ZmZIM91_anti91.

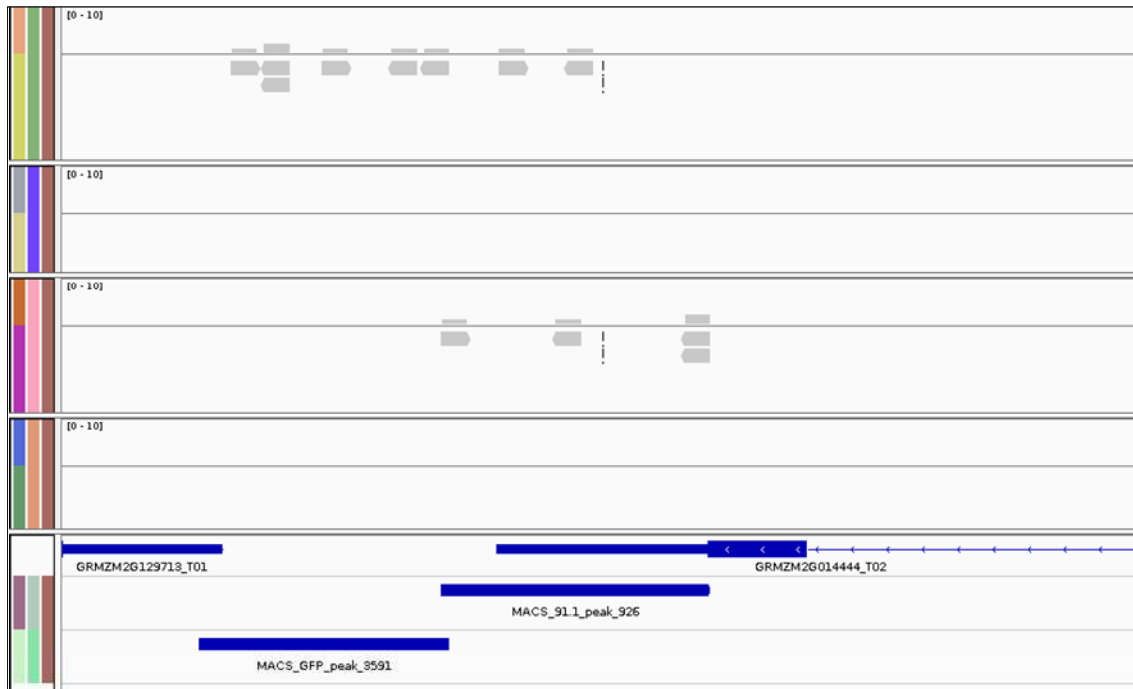


Figura SI13. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. Los picos fueron mapeados en el genoma del maíz usando el *software IGV 2.1*. El gen *GRMZM2G014444_T02* se encuentra próximo a los picos. El orden de cada reglón es el siguiente: En el primero, ZmZIM91_antiGFP; en el segundo, el control negativo GFP_antiGFP; en el tercero, ZmZIM91_anti91 y en el cuarto, el control negativo GFP_anti91. En la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM2G014444_T02* y los identificadores de los picos en con MACS para ZmZIM91_antiGFP y ZmZIM91_anti91.

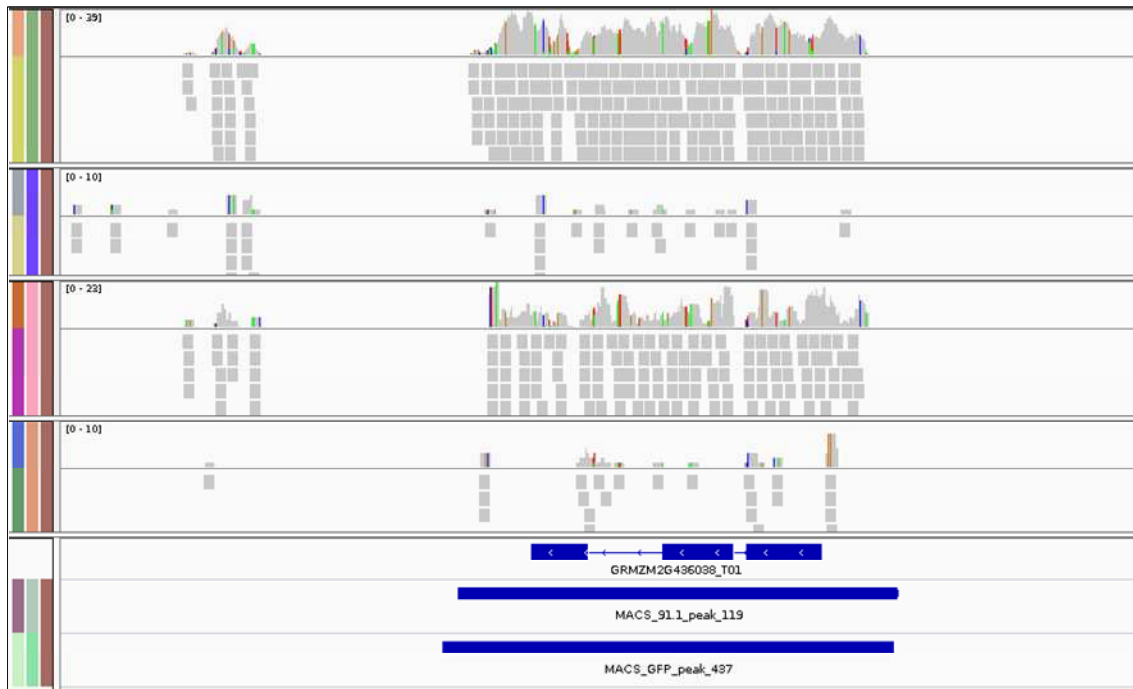


Figura SI14. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. Los picos fueron mapeados en el genoma del maíz usando el *software* IGV 2.1. El gen *GRMZM2G436038_T01* se encuentra próximo a los picos. El orden de cada reglón es el siguiente: En el primero, ZmZIM91_antiGFP; en el segundo, el control negativo GFP_antiGFP; en el tercero, ZmZIM91_anti91 y en el cuarto, el control negativo GFP_anti91. En la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM2G436038_T01* y los identificadores de los picos en con MACS para ZmZIM91_antiGFP y ZmZIM91_anti91.

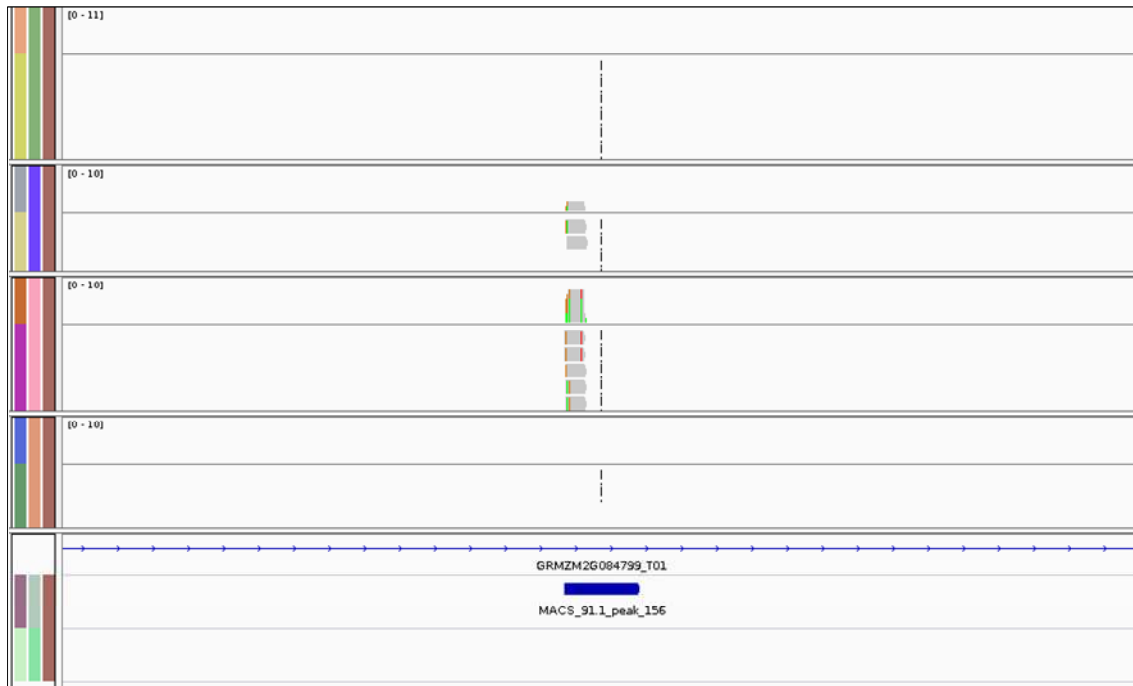


Figura SI15. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. Los picos fueron mapeados en el genoma del maíz usando el *software IGV 2.1*. El gen *GRMZM2G084799_T01 (P1)* se encuentra próximo a los picos. El orden de cada reglón es el siguiente: En el primero, ZmZIM91_antiGFP; en el segundo, el control negativo GFP_antiGFP; en el tercero, ZmZIM91_anti91 y en el cuarto, el control negativo GFP_anti91. En la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM2G084799_T01 (P1)* y los identificadores de los picos en con MACS para ZmZIM91_antiGFP y ZmZIM91_anti91.

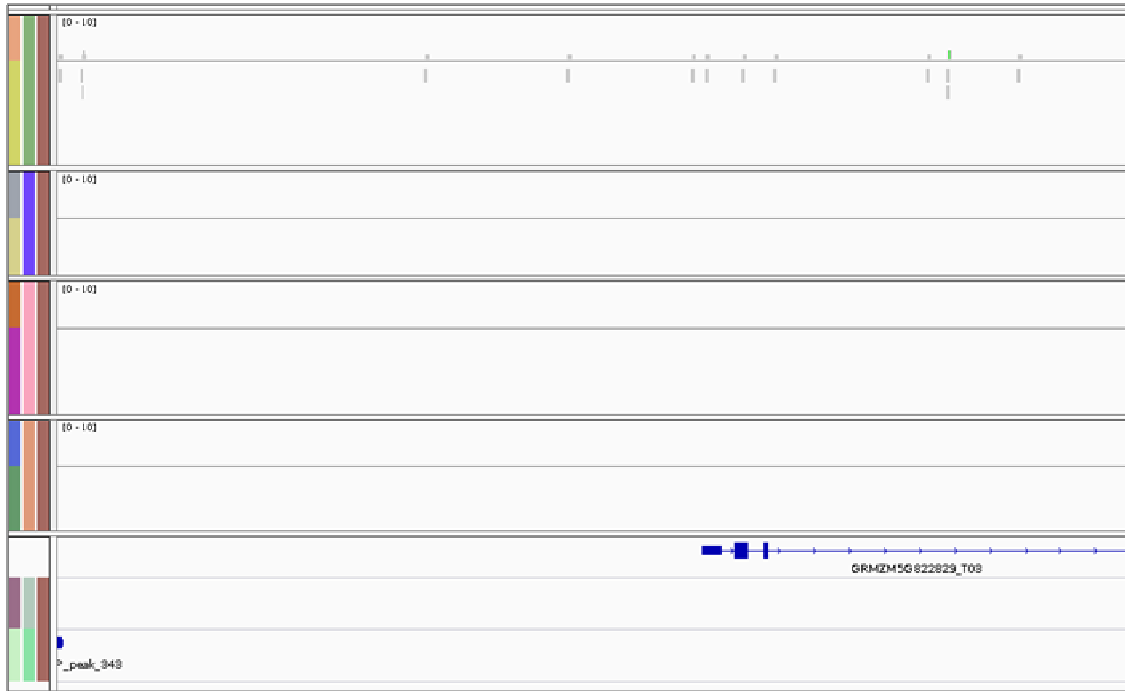
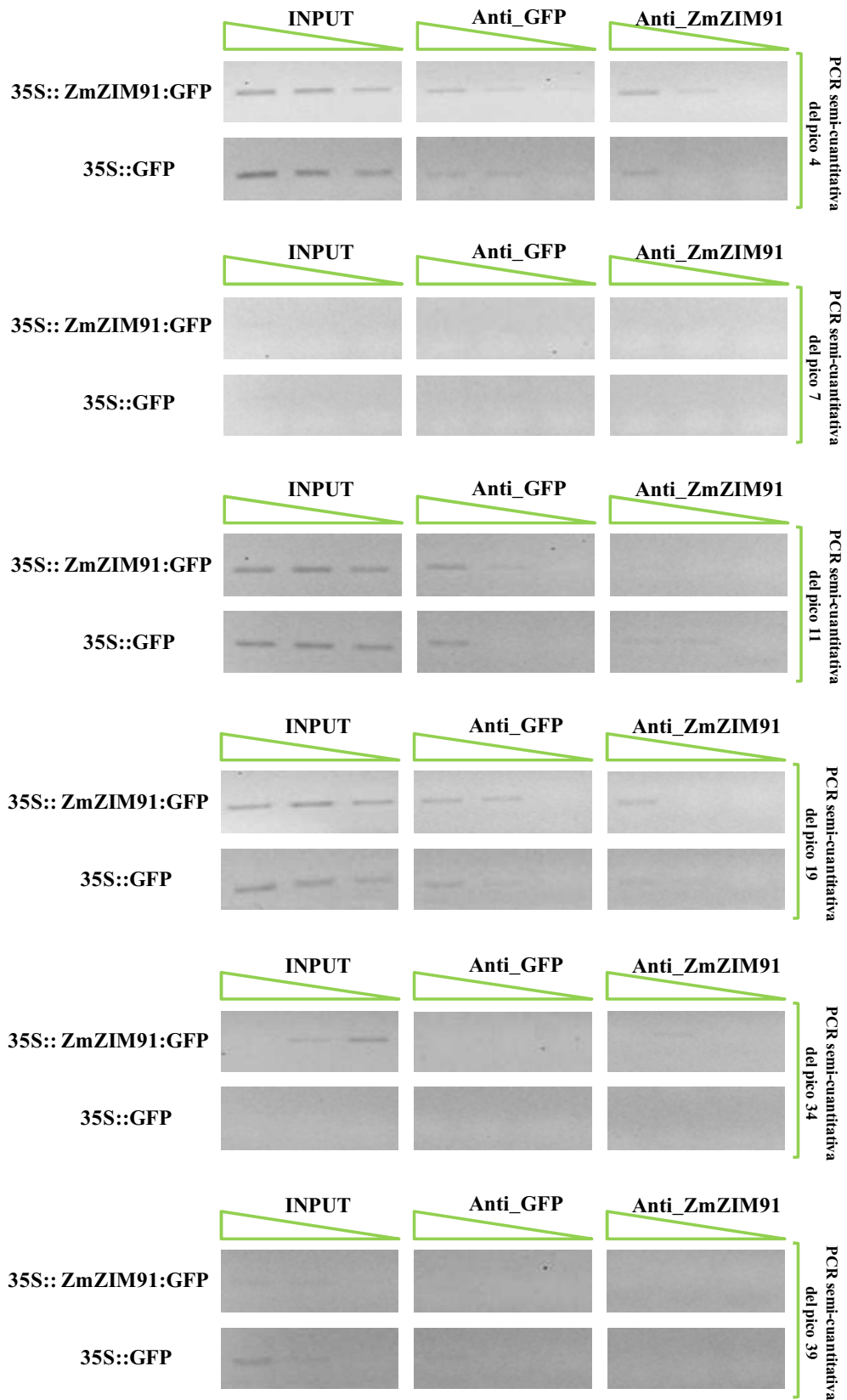


Figura SI16. Picos detectados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. Los picos fueron mapeados en el genoma del maíz usando el *software* IGV 2.1. El gen *GRMZM5G822829_T03 (R)* se encuentra próximo a los picos. El orden de cada reglón es el siguiente: En el primero, ZmZIM91_antiGFP; en el segundo, el control negativo GFP_antiGFP; en el tercero, ZmZIM91_anti91 y en el cuarto, el control negativo GFP_anti91. En la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM5G822829_T03 (R)* y los identificadores de los picos en con MACS para ZmZIM91_antiGFP y ZmZIM91_anti91.

Validación de picos por PCR semi-cuantitativa de CHIP de protoplastos de maíz que sobre-expresan 35S::ZmZIM91:GFP y CHIP de protoplastos de maíz que sobre-expresan 35S::GFP



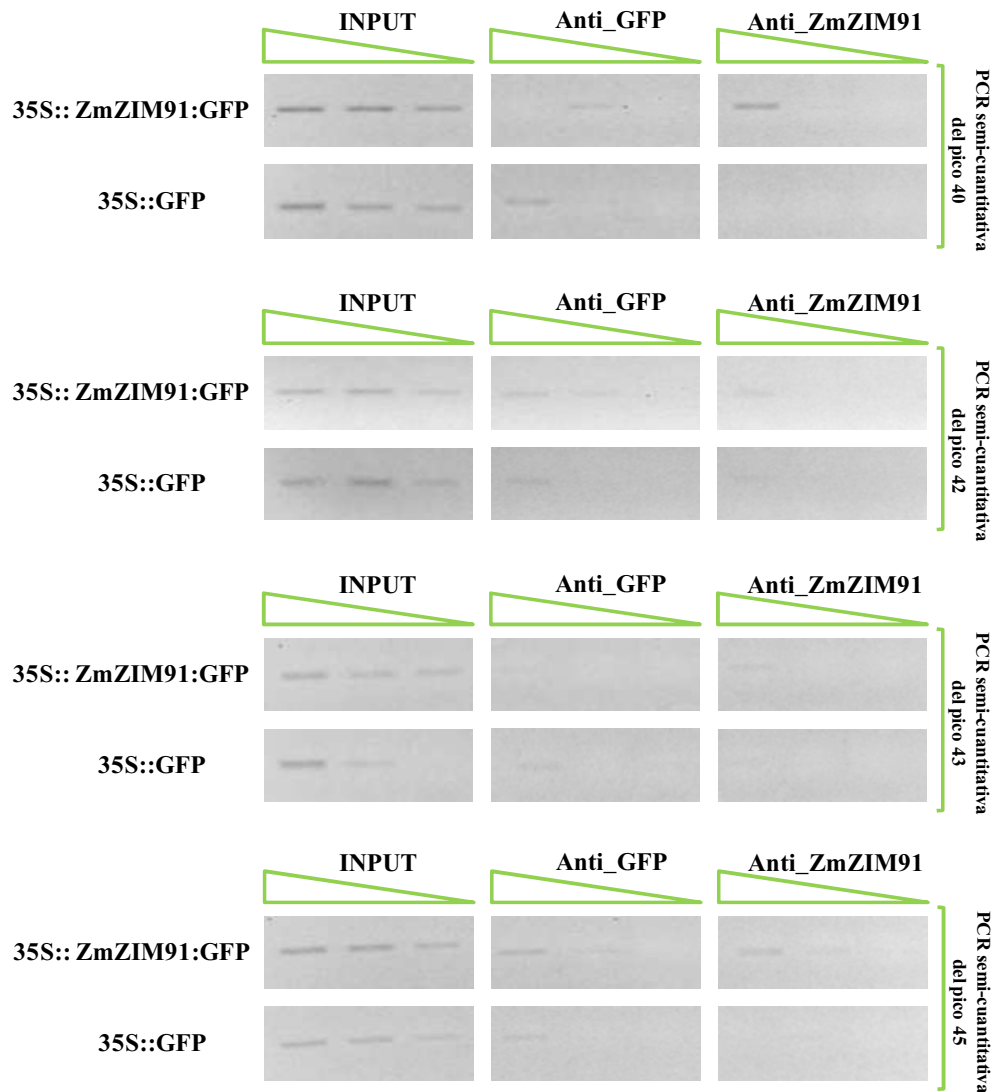


Figura SI17. PCRs semi-cuantitativas de picos identificados en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de protoplastos de maíz. Las PCRs semi-cuantitativas de ChIP, se hicieron en diluciones seriadas del material de ChIP de protoplastos de maíz que sobre-expresaban 35S::ZmZIM91:GFP y de ChIP de protoplastos de maíz que sobre-expresaban 35S::GFP, utilizando las muestras del Input y las inmunoprecipitaciones realizadas con el Anti_GFP y el Anti_ZmZIM91 para cada caso.

ANEXO II

**ChIP-Seq de ZmZIM91
proveniente de hojas de
plantas de maíz de 9 días**

Identificación de genes diana putativos de ZmZIM91 en el ChIP-Seq de hojas de plantas de maíz de 9 días

Otros picos enriquecidos en el ChIP-Seq de ZmZIM91 proveniente de hojas de plantas de maíz de 9 días, fueron localizados con ayuda del *software* IGV y se muestran a continuación:

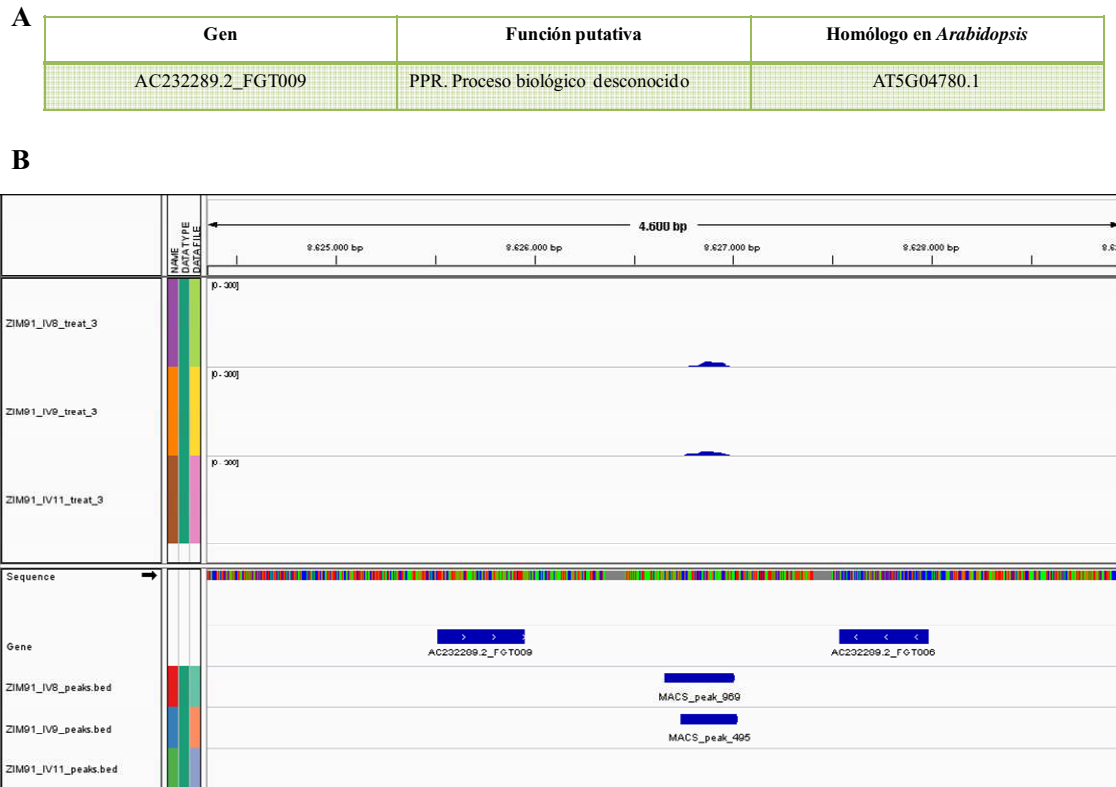


Figura SIII. Pico detectado en dos réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz. El gen *AC232289.2_FGT009* se encuentra próximo a los picos. En (A) se muestra una tabla que contiene el identificador del gen en maíz, su función putativa y el homólogo en *Arabidopsis*. En (B) fueron mapeados los picos en el genoma del maíz usando el *software* IGV 2.1. En la parte superior se observan los picos de enriquecimiento en dos de las réplicas biológicas sobre el promotor del gen *AC232289.2_FGT009* y en la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *AC232289.2_FGT009* y los identificadores en MACS de los picos detectados en cada réplica biológica.

A

Gen	Función putativa	Homólogo en <i>Arabidopsis</i>
AC216872.3_FGT002	Factor de transcripción AP2/B3- <i>like</i> . Desarrollo de flores y hojas, regulación de la transcripción, dependiente de ADN.	AT1G01030.1

B

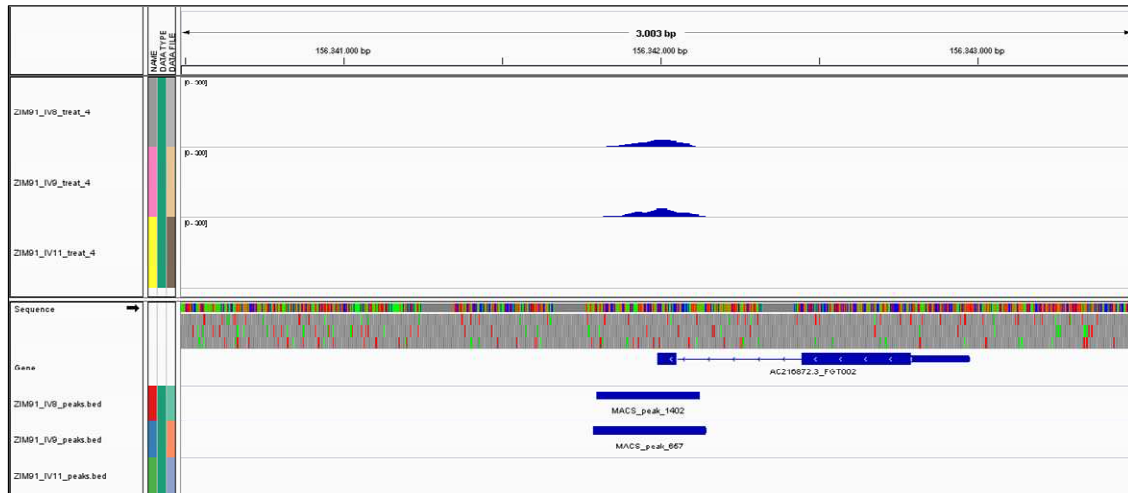


Figura SII2. Pico detectado en dos réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz. El gen *AC2168723_FGT002* se encuentra próximo a los picos. En (A) se muestra una tabla que contiene el identificador del gen en maíz, su función putativa y el homólogo en *Arabidopsis*. En (B) fueron mapeados los picos en el genoma del maíz usando el *software IGV 2.1*. En la parte superior se observan los picos de enriquecimiento en dos de las réplicas biológicas sobre el promotor del gen *AC2168723_FGT002* y en la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *AC2168723_FGT002* y los identificadores en MACS de los picos detectados en cada réplica biológica.

A

Gen	Función putativa	Homólogo en <i>Arabidopsis</i>
GRMZM5G844124	Transcripción dependiente de ADN, elongación, generación de precursores de metabolitos y energía, fotosíntesis, translación.	ATCG00820.1
GRMZM2G400925	Transportador de sulfato, transportador transmembrana.	AT3G15990.1

B

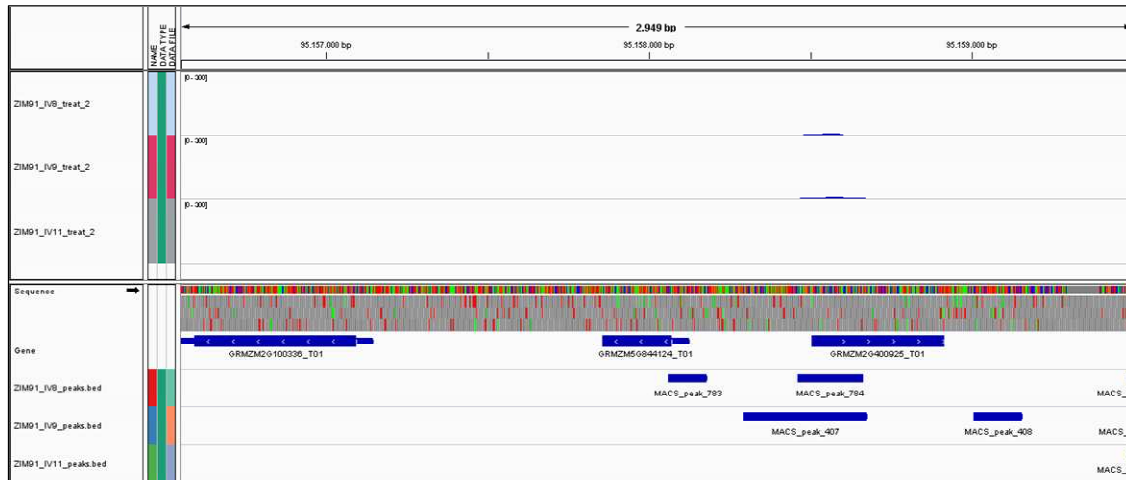


Figura SII3. Pico detectado en tres réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz. Los genes *GRMZM5G844124* y *GRMZM2G400925* se encuentran próximos a los picos. En (A) se muestra una tabla que contiene el identificador del gen en maíz, su función putativa y el homólogo en *Arabidopsis*. En (B) fueron mapeados los picos en el genoma del maíz usando el *software IGV 2.1*. En la parte superior se observan los picos de enriquecimiento en las tres réplicas biológicas sobre los promotores de los genes *GRMZM5G844124* y *GRMZM2G400925* y en la parte inferior se puede ver el diagrama de los genes *GRMZM5G844124* y *GRMZM2G400925* y los identificadores en MACS de los picos detectados en cada réplica biológica.



Figura SII4. Pico detectado en tres réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz. El gen *GRMZM5G869030* se encuentra próximo a los picos. En (A) se muestra una tabla que contiene el identificador del gen en maíz, su función putativa y el homólogo en *Arabidopsis*. En (B) fueron mapeados los picos en el genoma del maíz usando el *software* IGV 2.1. En la parte superior se observan los picos de enriquecimiento en las tres réplicas biológicas sobre el promotor del gen *GRMZM5G869030* y en la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM5G869030* y los identificadores en MACS de los picos detectados en cada réplica biológica.

A

Gen	Función putativa	Homólogo en <i>Arabidopsis</i>
GRMZM2G047681	Unión a fosfopanteteína.	AT4G09150.2

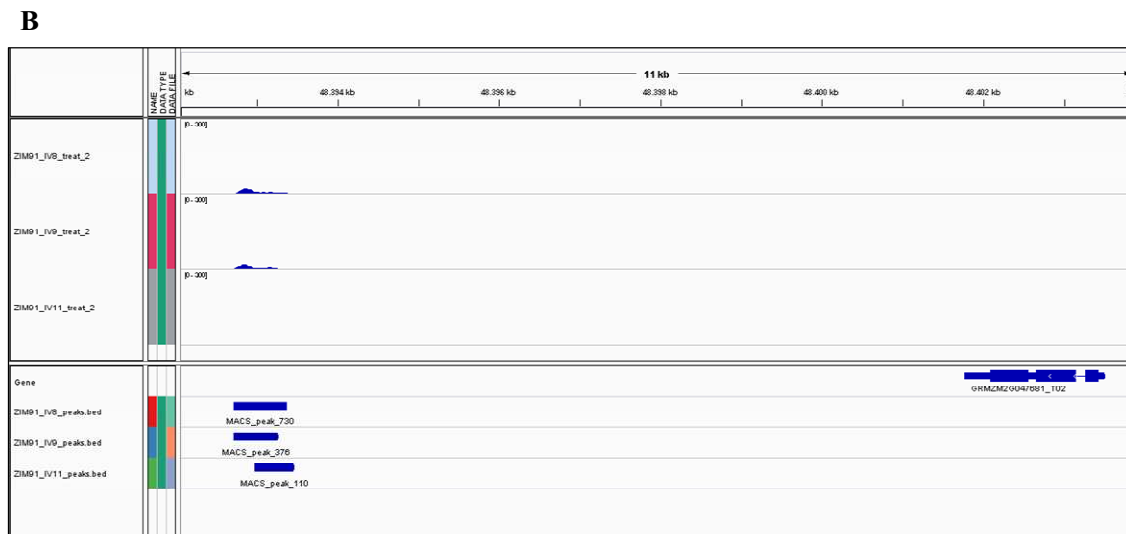


Figura SII5. Pico detectado en tres réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz. El gen *GRMZM2G047681* se encuentra próximo a los picos. En (A) se muestra una tabla que contiene el identificador del gen en maíz, su función putativa y el homólogo en *Arabidopsis*. En (B) fueron mapeados los picos en el genoma del maíz usando el *software* IGV 2.1. En la parte superior se observan los picos de enriquecimiento en las tres réplicas biológicas sobre el promotor del gen *GRMZM2G047681* y en la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM2G047681* y los identificadores en MACS de los picos detectados en cada réplica biológica.

A

Gen	Función putativa	Homólogo en <i>Arabidopsis</i>
AC207533.2_FGT002	División celular, crecimiento celular, citoquinesis por formación de célula plate, finalización del desarrollo embrionario en la dormancia de la semilla, especificación de patrones embrionarios, especificación del meristemo apical de la raíz primaria, glicosilación de proteínas, regulación de la diferenciación celular, maduración de la semilla, cohesión de la cromatida hermana, fase de transición del meristemo para la reproducción vegetativa.	AT3G08850.1

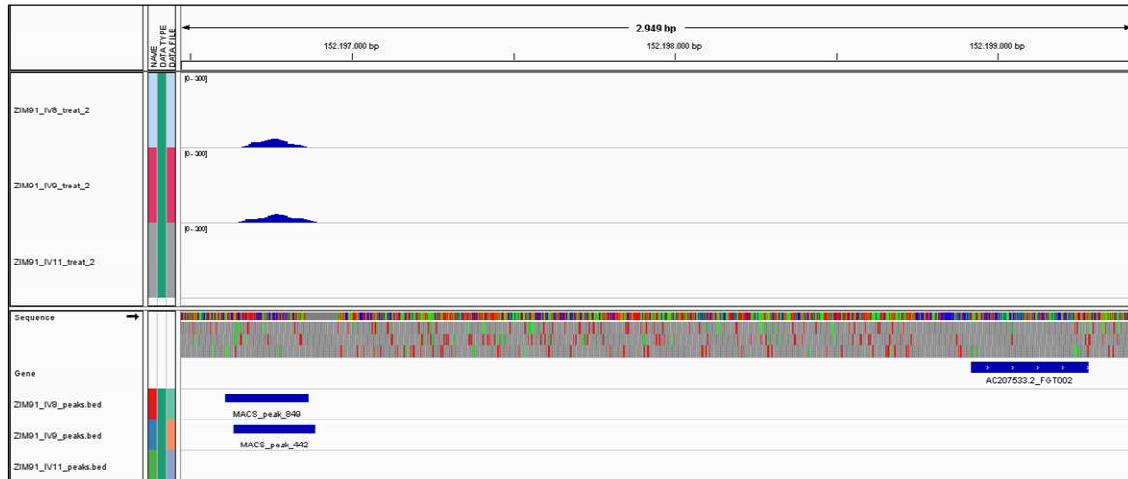
B

Figura SII6. Pico detectado en dos réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz. El gen *AC207533.2_FGT002* se encuentra próximo a los picos. En (A) se muestra una tabla que contiene el identificador del gen en maíz, su función putativa y el homólogo en *Arabidopsis*. En (B) fueron mapeados los picos en el genoma del maíz usando el *software IGV 2.1*. En la parte superior se observan los picos de enriquecimiento en dos de las réplicas biológicas sobre el promotor del gen *AC207533.2_FGT002* y en la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *AC207533.2_FGT002* y los identificadores en MACS de los picos detectados en cada réplica biológica.

A

Gen	Función putativa	Homólogo en <i>Arabidopsis</i>
AC209062.3_FGT002	Desconocida.	No homólogo en <i>Arabidopsis</i>



Figura SII7. Pico detectado en dos réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz. El gen *AC209062.3_FGT002* se encuentra próximo a los picos. En (A) se muestra una tabla que contiene el identificador del gen en maíz, su función putativa y el homólogo en *Arabidopsis*. En (B) fueron mapeados los picos en el genoma del maíz usando el *software IGV 2.1*. En la parte superior se observan los picos de enriquecimiento en dos de las réplicas biológicas sobre el promotor del gen *AC209062.3_FGT002* y en la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *AC209062.3_FGT002* y los identificadores en MACS de los picos detectados en cada réplica biológica.

A

Gen	Función putativa	Homólogo en <i>Arabidopsis</i>
GRMZM2G427444_T01	Procesos de reducción-oxidación.	ATCG01250.1
GRMZM2G427369_T02	Transporte de sulfato, transporte transmembrana, transporte.	AT3G15990.1
GRMZM2G358180_T01	Transcripción dependiente de ADN, elongación, generación de precursores de metabolitos y energía, fotosíntesis, reacción a luz, cadena del transporte fotosintético de electrones, transporte fotosintético de electrones en fotosistema II, ensamble de fotosistema II.	ATCG00280.1

B

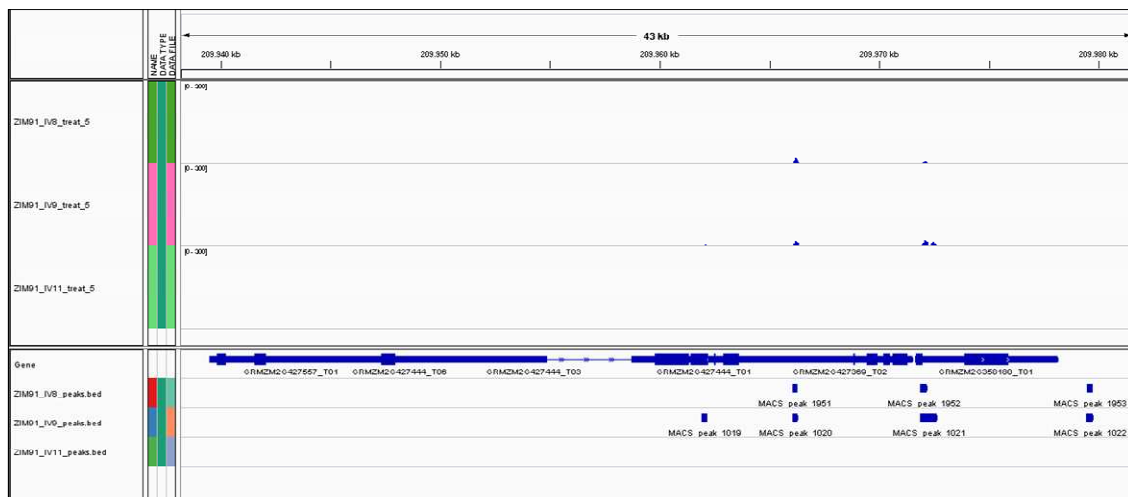


Figura SII8. Pico detectado en dos réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz. Los genes *GRMZM2G427444_T01*, *GRMZM2G427369_T02* y *GRMZM2G358180_T01* se encuentran próximos a los picos. En (A) se muestra una tabla que contiene el identificador del gen en maíz, su función putativa y el homólogo en *Arabidopsis*. En (B) fueron mapeados los picos en el genoma del maíz usando el *software IGV 2.1*. En la parte superior se observan los picos de enriquecimiento en dos de las réplicas biológicas sobre los promotores de los genes *GRMZM2G427444_T01*, *GRMZM2G427369_T02* y *GRMZM2G358180_T01* y en la parte inferior se puede ver el diagrama de los genes *GRMZM2G427444_T01*, *GRMZM2G427369_T02* y *GRMZM2G358180_T01* y los identificadores en MACS de los picos detectados en cada réplica biológica.

A

Gen	Función putativa	Homólogo en <i>Arabidopsis</i>
GRMZM5G849152_T01	Desconocida.	No homólogo en <i>Arabidopsis</i>

B

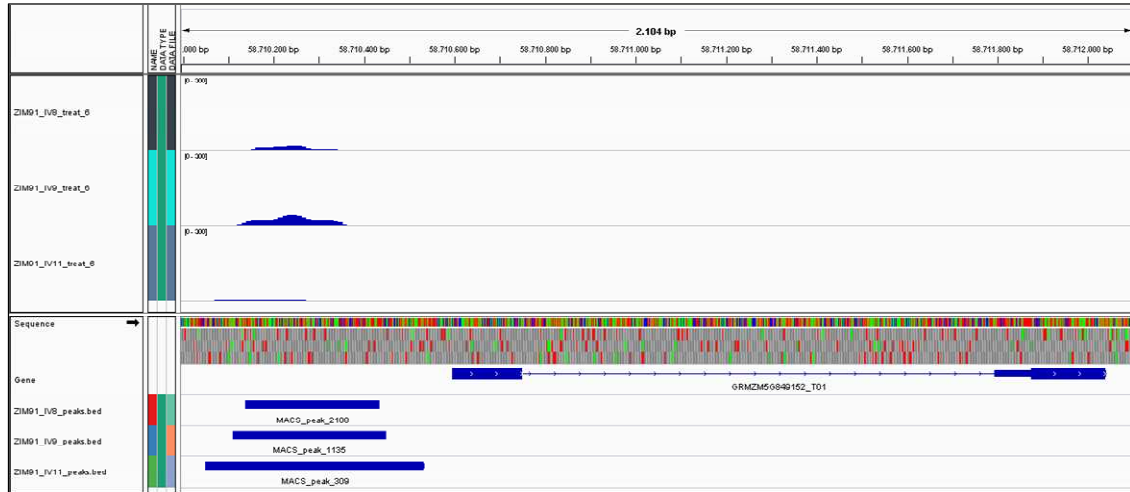


Figura SII9. Pico detectado en tres réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz. El gen *GRMZM5G849152_T01* se encuentra próximo a los picos. En (A) se muestra una tabla que contiene el identificador del gen en maíz, su función putativa y el homólogo en *Arabidopsis*. En (B) fueron mapeados los picos en el genoma del maíz usando el *software* IGV 2.1. En la parte superior se observan los picos de enriquecimiento en las tres réplicas biológicas sobre el promotor del gen *GRMZM5G849152_T01* y en la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM5G849152_T01* y los identificadores en MACS de los picos detectados en cada réplica biológica.

A

Gen	Función putativa	Homólogo en <i>Arabidopsis</i>
GRMZM2G157517	Transformación mediada por ADN, metilación de la lisina de histona.	AT4G13460.1
GRMZM2G055151	Procesos catabólicos nucleares de transcripción de mRNA.	AT1G26580.1
GRMZM2G055567	Transcripción dependiente de ADN, elongación, generación de precursores de metabolitos y energía, fotosíntesis, transcripción, dependencia a ADN.	ATCG00180.1

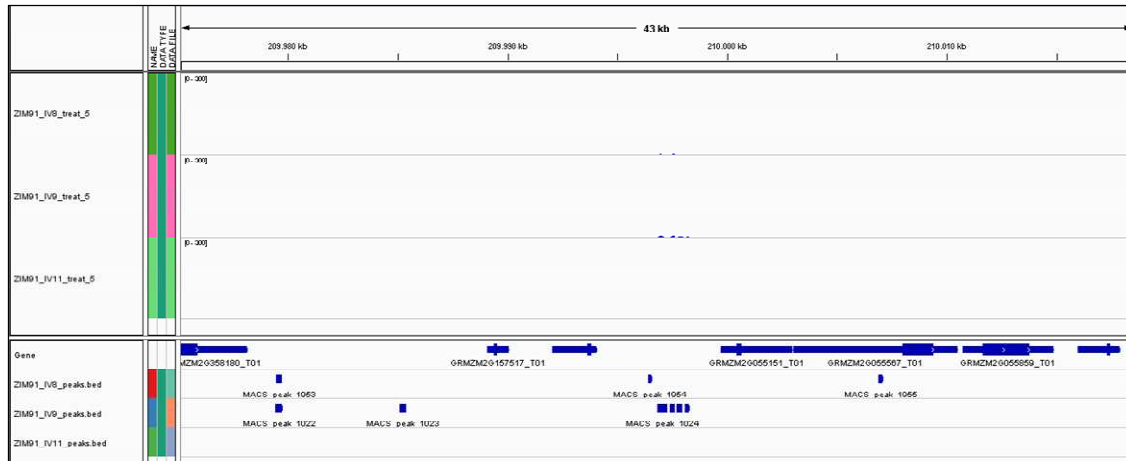
B

Figura SIII10. Pico detectado en dos réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz. Los genes *GRMZM2G157517*, *GRMZM2G055151* y *GRMZM2G055567* se encuentran próximos a los picos. En (A) se muestra una tabla que contiene el identificador del gen en maíz, su función putativa y el homólogo en *Arabidopsis*. En (B) fueron mapeados los picos en el genoma del maíz usando el software *IGV 2.1*. En la parte superior se observan los picos de enriquecimiento en dos de las réplicas biológicas sobre los promotores de los genes *GRMZM2G157517*, *GRMZM2G055151* y *GRMZM2G055567* y en la parte inferior se puede ver el diagrama de los genes *GRMZM2G157517*, *GRMZM2G055151* y *GRMZM2G055567* y los identificadores en MACS de los picos detectados en cada réplica biológica.

A

Gen	Función putativa	Homólogo en <i>Arabidopsis</i>
GRMZM2G138349_T04	Transporte vesícula Golgi, crecimiento celular, morfogénesis celular, fusión de la membrana celular, transporte endosomal, transporte intracelular de proteínas, proteínas dianas, proteínas diana a vacuola, regulación de la actividad de ARF GTPase, transporte mediado vesícula.	AT4G21160.1

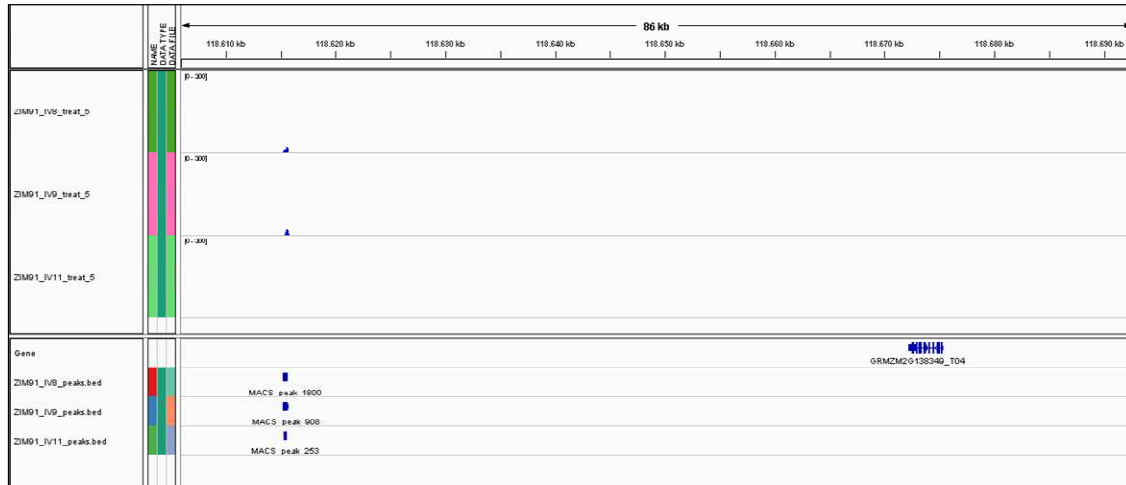
B

Figura SIII11. Pico detectado en tres réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz. El gen *GRMZM2G138349_T04* se encuentra próximo a los picos. En (A) se muestra una tabla que contiene el identificador del gen en maíz, su función putativa y el homólogo en *Arabidopsis*. En (B) fueron mapeados los picos en el genoma del maíz usando el *software IGV 2.1*. En la parte superior se observan los picos de enriquecimiento en las tres réplicas biológicas sobre el promotor del gen *GRMZM2G138349_T04* y en la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM2G138349_T04* y los identificadores en MACS de los picos detectados en cada réplica biológica.

A

Gen	Función putativa	Homólogo en <i>Arabidopsis</i>
GRMZM2G115895_T01	Vía de señalización por luz roja o rojo lejano, regulación de la transcripción, dependiente de ADN, huida a la sombra.	AT2G46970.1

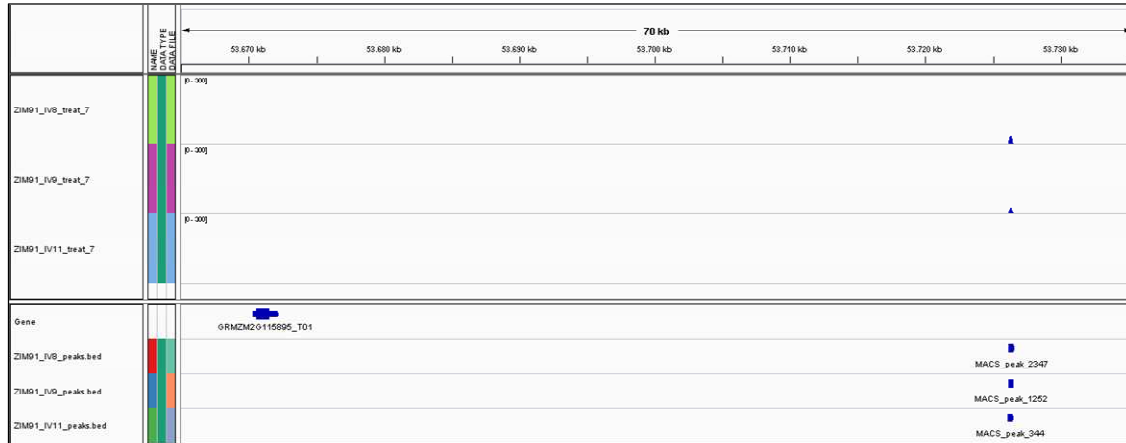
B

Figura SIII12. Pico detectado en tres réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz. El gen *GRMZM2G115895_T01* se encuentra próximo a los picos. En (A) se muestra una tabla que contiene el identificador del gen en maíz, su función putativa y el homólogo en *Arabidopsis*. En (B) fueron mapeados los picos en el genoma del maíz usando el *software IGV 2.1*. En la parte superior se observan los picos de enriquecimiento en las tres réplicas biológicas sobre el promotor del gen *GRMZM2G115895_T01* y en la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM2G115895_T01* y los identificadores en MACS de los picos detectados en cada réplica biológica.

A

Gen	Función putativa	Homólogo en <i>Arabidopsis</i>
GRMZM2G473511_T01	Fosforilación de proteínas.	AT1G66920.2
GRMZM5G825193	Respuesta a defensa, proceso metabólico de glicerol, proceso metabólico de lípidos, modificación de mRNA, proceso metabólico de maltosa, fosforilación de proteínas.	AT1G66980.1

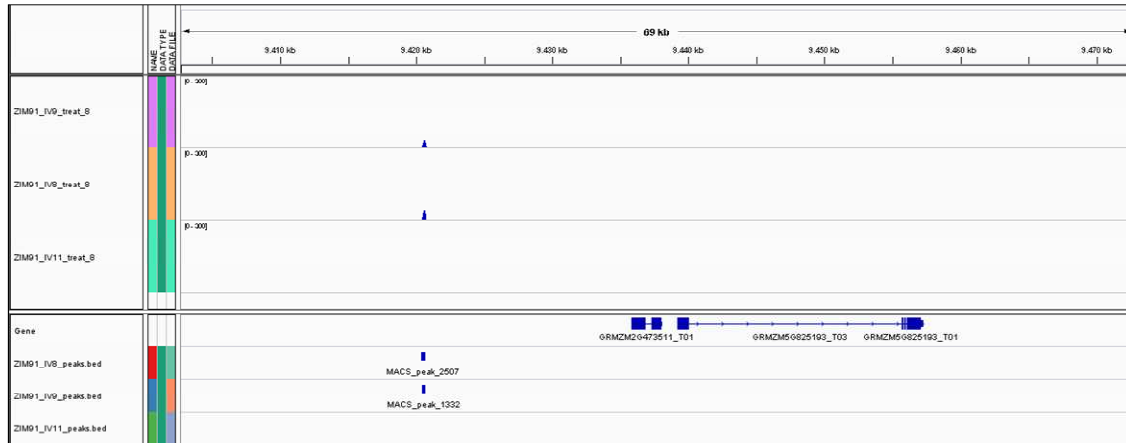
B

Figura SIII13. Pico detectado en dos réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz. Los genes *GRMZM2G473511_T01* y *GRMZM5G825193* se encuentran próximos a los picos. En (A) se muestra una tabla que contiene el identificador del gen en maíz, su función putativa y el homólogo en *Arabidopsis*. En (B) fueron mapeados los picos en el genoma del maíz usando el *software* IGV 2.1. En la parte superior se observan los picos de enriquecimiento en dos de las réplicas biológicas sobre los promotores de los genes *GRMZM2G473511_T01* y *GRMZM5G825193* y en la parte inferior se puede ver el diagrama de los genes *GRMZM2G473511_T01* y *GRMZM5G825193* y los identificadores en MACS de los picos detectados en cada réplica biológica.

A

Gen	Función putativa	Homólogo en <i>Arabidopsis</i>
GRMZM2G005947_T01	Transporte de lípidos, glicosilación de proteínas.	AT2G36360.5

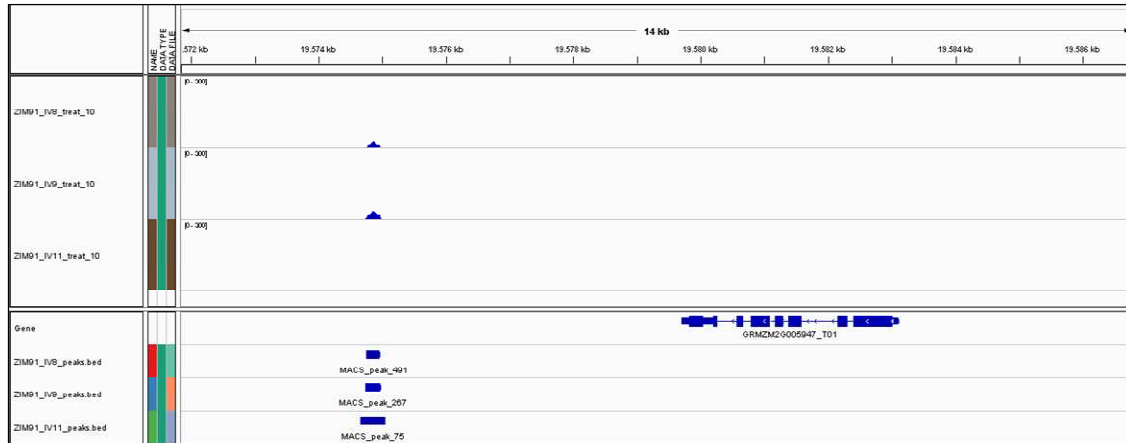
B

Figura SIII14. Pico detectado en dos réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz. El gen *GRMZM2G005947_T01* se encuentra próximo a los picos. En (A) se muestra una tabla que contiene el identificador del gen en maíz, su función putativa y el homólogo en *Arabidopsis*. En (B) fueron mapeados los picos en el genoma del maíz usando el *software IGV 2.1*. En la parte superior se observan los picos de enriquecimiento en las tres réplicas biológicas sobre el promotor del gen *GRMZM2G005947_T01* y en la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM2G005947_T01* y los identificadores en MACS de los picos detectados en cada réplica biológica.

A

Gen	Función putativa	Homólogo en <i>Arabidopsis</i>
GRMZM2G575954_T01	Desconocida.	No homólogo en <i>Arabidopsis</i>

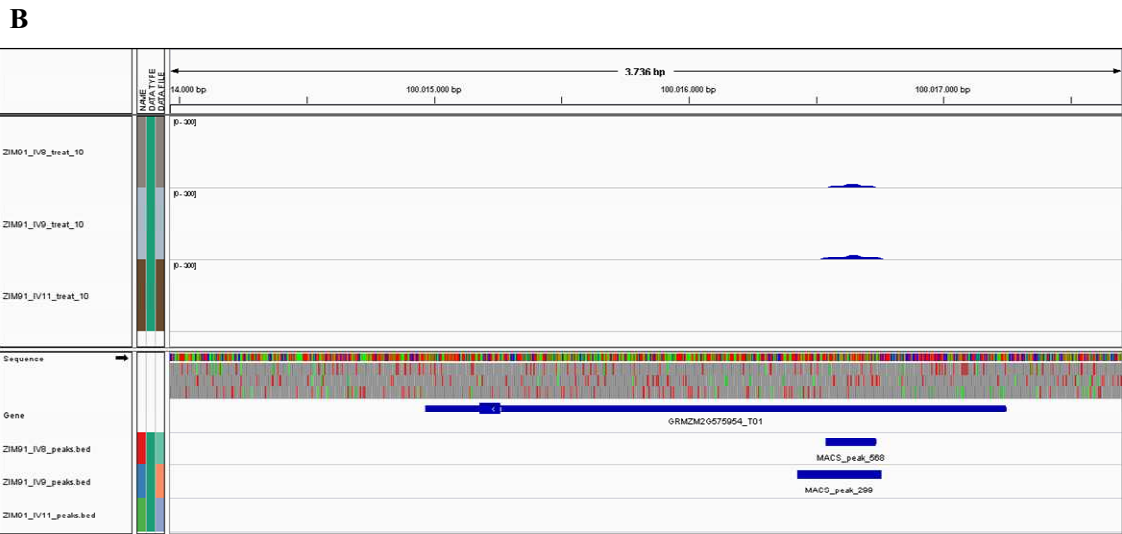


Figura SIII15. Pico detectado en dos réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz. El gen *GRMZM2G575954_T01* se encuentra próximo a los picos. En (A) se muestra una tabla que contiene el identificador del gen en maíz, su función putativa y el homólogo en *Arabidopsis*. En (B) fueron mapeados los picos en el genoma del maíz usando el *software* IGV 2.1. En la parte superior se observan los picos de enriquecimiento en dos de las réplicas biológicas sobre el promotor del gen *GRMZM2G575954_T01* y en la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM2G575954_T01* y los identificadores en MACS de los picos detectados en cada réplica biológica.

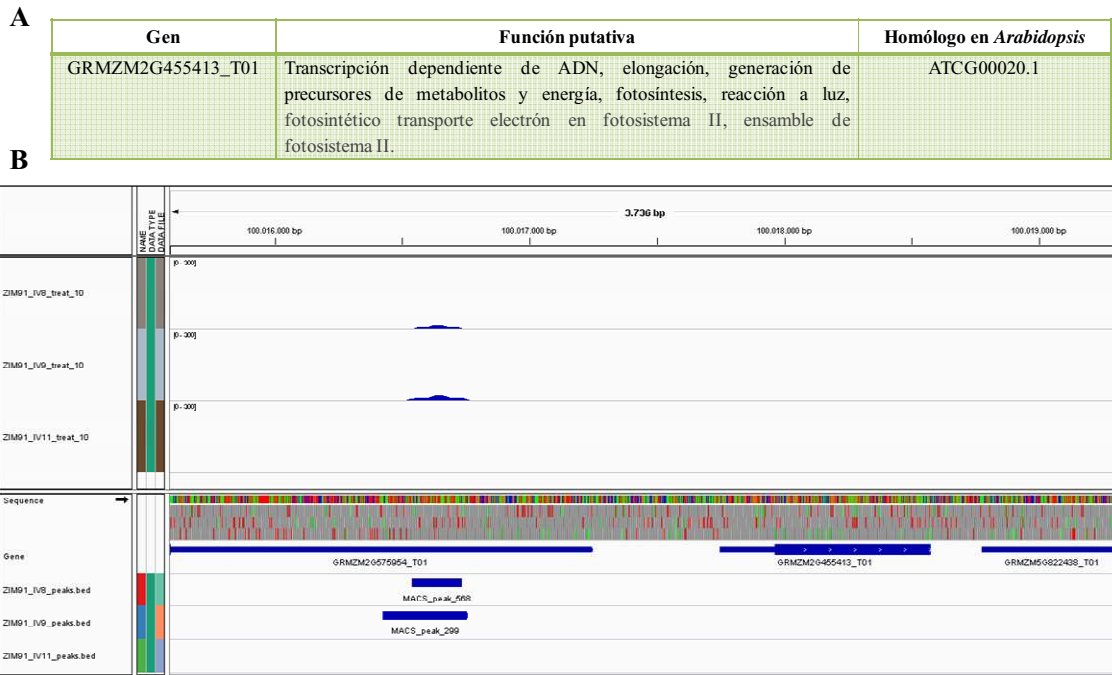


Figura SIII16. Pico detectado en dos réplicas biológicas de ChIP-Seq de ZmZIM91 de hojas de plantas de maíz. El gen *GRMZM2G455413_T01* se encuentra próximo a los picos. En (A) se muestra una tabla que contiene el identificador del gen en maíz, su función putativa y el homólogo en *Arabidopsis*. En (B) fueron mapeados los picos en el genoma del maíz usando el *software* IGV 2.1. En la parte superior se observan los picos de enriquecimiento en dos de las réplicas biológicas sobre el promotor del gen *GRMZM2G455413_T01* y en la parte inferior se puede ver el diagrama del gen *GRMZM2G455413_T01* y los identificadores en MACS de los picos detectados en cada réplica biológica.

ANEXO III
PUBLICACIONES

Specific characteristics of CK2 β regulatory subunits in plants

Isabel Cristina Velez-Bermudez · Sami Irar ·
Lorenzo Carretero-Paulet · Montserrat Pagès ·
Marta Riera

Received: 13 June 2011 / Accepted: 24 June 2011
© Springer Science+Business Media, LLC. 2011

Abstract In all eukaryotes, the typical CK2 holoenzyme is an heterotetramer composed of two catalytic (CK2 α and CK2 α') and two regulatory (CK2 β) subunits. One of the distinctive traits of plant CK2 is that they present a greater number of genes encoding for CK2 α/β subunits than animals or yeasts, for instance, in Arabidopsis and maize both CK2 α/β subunits belong to multigenic families composed by up to four genes. Here, we conducted a genome-wide survey examining 34 different plant genomes in order to investigate if the multigenic property of CK2 β genes is a common feature through the entire plant kingdom. Also, at the level of structure, the plant CK2 β regulatory subunits present distinctive features as (i) they lack about 20 aminoacids in the C-terminal domain, (ii) they present a specific N-terminal extension of about 90 aminoacids that shares no homology with any previously characterized functional domain, and (iii) the acidic loop region is poorly conserved at the aminoacid level. Since there is no data about CK2 β or holoenzyme structure in plants, in this study, we use human CK2 β as a template to predict a

structure for *Zea mays* CK2 β 1 by homology modeling and we discuss about possible structural changes in the acidic loop region that could affect the enzyme regulation.

Keywords Protein kinase CK2 · CK2 β regulatory subunit · Multigenic family · Acidic loop · Homology modeling

Introduction

In plants, protein kinase CK2 is a key enzyme involved in relevant processes such as plant growth and light-regulated gene expression; circadian rhythm; cell-cycle regulation and development; and biotic and abiotic stress responses [1–7]. As in the case of mammals, the typical CK2 holoenzyme is a heterotetrameric complex composed of two catalytic (CK2 α and CK2 α') and two regulatory (CK2 β) subunits. CK2 β regulatory subunits are inactive and present no homology to regulatory subunits or domains of other protein kinases. The CK2 β regulatory subunits are involved in the assembly of CK2 tetrameric complexes, in enhancing catalytic activity and stability of CK2 α and in modulation of the substrate specificity of CK2 [8]. In addition, CK2 β can interact and regulate other proteins in the absence of CK2 α subunits [9, 10].

In contrast to animals, plants present a high number of genes encoding for CK2 α/β subunits: in humans there are two genes encoding for catalytic subunits (CK2 α/α') and only one for CK2 β regulatory subunits [11, 12], whereas in Arabidopsis and maize, both CK2 α/β subunits belong to multigenic families composed by up to four genes [2, 13–18]. However, the presence of multiple CK2 α/β isoforms in plants is unlikely to be redundant, since specific

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11010-011-0971-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

I. C. Velez-Bermudez · S. Irar · L. Carretero-Paulet ·
M. Pagès · M. Riera (✉)

Molecular Genetics Department, Centre for Research
on Agricultural Genomics CRAG (CSIC-IRTA-UAB-UB),
Campus UAB 08193 Bellaterra, Cerdanyola del Vallès,
Barcelona, Spain
e-mail: marta.riera@cid.csic.es

L. Carretero-Paulet
Institute for Plant Molecular and Cell Biology – IBMCP
(CSIC-UPV) Integrative Systems Biology Group,
C/Ingeniero Fausto Elio s/n., 46022 Valencia, Spain

functions have been associated to each isoform [19]. For instance, in maize, we previously described differential subcellular localization and expression levels for each CK2 β isoform [7, 15]. In Arabidopsis, only CK2B3 and CK2B4 isoforms play a role in circadian-clock regulation [2, 17] and specific CK2 holoenzymes present differential substrate specificity [20]. Also in tobacco differential expression of genes encoding protein kinase CK2 subunits in the plant cell cycle has been described [21]. Here, we conducted a genome-wide survey examining 34 different plant genomes in order to investigate if the multigenic property of CK2 β genes is a common trait of plant kingdom.

The CK2 α catalytic subunits are highly conserved among eukaryotic organisms, but the level of identity between plant, yeast and human CK2 β subunits is not so high. Despite the elucidation of the human CK2 α/β subunits and holoenzyme and maize CK2 α structure [22–24], there is no data about CK2 β or holoenzyme structure in plants. All plant CK2 β subunits preserve in their central core the characteristic CK2 β feature, the zinc finger region that contains four conserved cysteine residues involved in CK2 β dimerization. However, there are distinctive features in plant CK2 β : (i) they are about twenty aminoacids shorter in the C-terminal domain, (ii) they present a specific N-terminal extension of about ninety aminoacids that shares no homology with any previously characterized functional domain, and (iii) the acidic loop region present in animal CK2 is poorly conserved in plant sequences. Here, using human CK2 β as template we predict a hypothetical structure for *Zea mays* CK2 β 1 and describe its structural features to give clues to understanding its molecular functions.

Materials and methods

Plant CK2 β regulatory subunits sequence analysis

Searches were performed throughout the proteomes of thirty plant species with whole sequenced genomes (Supplemental Table 1). For the not fully sequenced genomes, sequences were retrieved from UNIPROT. We have used BLASTP [25] and *Zea mays* CK2 β 1 as a query [15]. Hits returning *E* values <10E–5 were considered as significant. Sequences were aligned using CLUSTAL [26] and the resulting alignments examined individually. Finally, redundant sequences and alternatively spliced isoforms were discarded.

Homology modeling for *Zea mays* CK2 β 1 was performed by comparative modeling approach using three automated homology modeling programs, MODELLER 9v9 (<http://www.salilab.org/modeller/>), SWISS-MODEL [27], and GENO3D [28]. Human CK2 β structure (PDB ID: 1JWH) was used as as template [23]. CHIMERA program

(<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) was used for viewing the sequences and structures.

Results and discussion

The CK2 β regulatory subunits families in plants

In order to identify and classify all CK2 β homologue genes in plant species, searches were performed throughout the proteomes of thirty-four plant species with whole sequenced genomes *Zea mays* CK2 β 1 as a query [14]. As a result, 90 sequences, corresponding to the CK2 β gene families of red and green algae, moss, lycophytes, gymnosperms, and angiosperms, representing the main plant evolutionary lineages were found (Table 1 and Supplemental Table 1). Unicellular algae species showed a single CK2 β gene, while land plants commonly showed three-to-five CK2 β genes. It could be argued that evolutionary expansion of the CK2 β gene family is related to the acquisition of multicellularity. However, it is not very likely since only one gene was found in the multicellular algae *Volvox carteri* as well as in all the animal species examined, except *Drosophila melanogaster* that present two genes. In addition, the fungal species (including unicellular yeasts) and protist (as *Plasmodium falciparum*) also showed two genes copies (Supplemental Table 2). Additional gene family expansion would have occurred in specific plant lineages, as reflected the higher number of CK2 β genes found in the genomes of the dicots *Malus domestica* (eleven) or *Glycine max* (six). In these specific cases, redundancy could be also considered, even if the main hypothesis links the presence of multiple isoforms in plants to specific functions [2, 15, 17, 20, 21]. Similarly, lineage-specific contraction of this family could be observed in *Medicago truncatula*, bearing one CK2 β gene. In monocots there is also heterogeneity between the different CK2 β families, since three to four genes are found in *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, and *Brachypodium distachyon* but only one or two genes are found in *Hordeum vulgare* and *Oryza sativa*. It is possible that the sizes of the CK2 β gene families differ mainly because of differential rates of gene duplication and retention and may reflect species-specific adaptations. This observation is in agreement with the proposed ancient origin of the basic genetic toolkit of land plants [29]; much of plant diversity may have arisen largely following the duplication and adaptive specialization of pre-existing genes [30]. Differential evolutionary expansion of this family reflects the prevalence of gene duplication in land plant genome evolution [31–34] as well as the major role of polyploidization in speciation of vascular plants [35, 36].

Table 1 CK2 β regulatory subunits genes in plants

Species name	Family	Clade/lineage	Number of CK2 β genes
<i>Cyanidioschyzon merolae 10D</i>	Cyanidiaceae	Red algae	1
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Chlamydomonadaceae	Green algae	1
<i>Chlorella variabilis NC64A</i>	Chlorellaceae	Green algae	1
<i>Chlorella vulgaris C-169</i>	Chlorellaceae	Green algae	1
<i>Micromonas sp. RCC299</i>	Mamiellaceae	Green algae	1
<i>Micromonas pusilla CCMP1545</i>	Mamiellaceae	Green algae	1
<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	Mamiellaceae	Green algae	1
<i>Ostreococcus tauri</i>	Mamiellaceae	Green algae	1
<i>Volvox carteri</i>	Volvocaceae	Green algae	1
<i>Selaginella moellendorffii</i>	Selaginellaceae	Spike moss	3
<i>Physcomitrella patens</i>	Funariaceae	Moss	4
<i>Picea sitchensis</i>	Pinaceae	Gymnosperms	2
<i>Solanum lycopersicum</i>	Solanaceae	Dicot (Asterids)	5
<i>Nicotiana tabacum</i>	Solanaceae	Dicot (Asterids)	2
<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	Dicot (Rosids)	2
<i>Cucumis sativus</i>	Cucurbitaceae	Dicot (Rosids)	2
<i>Populus trichocarpa</i>	Salicaceae	Dicot (Rosids)	4
<i>Ricinus communis</i>	Euphorbiaceae	Dicot (Rosids)	2
<i>Jatropha curcas</i>	Euphorbiaceae	Dicot (Rosids)	2
<i>Malus x domestica</i>	Rosaceae	Dicot (Rosids)	11
<i>Fragaria vesca</i>	Rosaceae	Dicot (Rosids)	3
<i>Medicago truncatula</i>	Fabaceae	Dicot (Rosids)	1
<i>Glycine max</i>	Fabaceae	Dicot (Rosids)	6
<i>Lotus japonicus</i>	Fabaceae	Dicot (Rosids)	3
<i>Carica papaya L.</i>	Caricaceae	Dicot (Rosids)	2
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	Dicot (Rosids)	4
<i>Arabidopsis lyrata</i>	Brassicaceae	Dicot (Rosids)	5
<i>Brassica oleracea</i>	Brassicaceae	Dicot (Rosids)	2
<i>Theobroma cacao</i>	Malvaceae	Dicot (Rosids)	2
<i>Oryza sativa Japonica</i>	Poaceae	Monocot	2
<i>Brachypodium distachyon</i>	Poaceae	Monocot	4
<i>Zea mays</i>	Poaceae	Monocot	4
<i>Sorghum bicolor</i>	Poaceae	Monocot	3
<i>Hordeum vulgare</i>	Poaceae	Monocot	1

Homology modeling of maize CK2 β 1 regulatory subunit

Homology modeling is based on the fact that protein tertiary structure is better conserved than amino acid sequence [37]. Thus, we have used human CK2 β sequence and structure as a template to predict a possible tertiary structure of maize CK2 β 1. As shown in the alignment in Fig. 1a, the sequence identity between the central core of maize CK2 β 1 (82–276) and human CK2 β is 51%. Unfortunately, since the plant specific N-terminal domain of maize CK2 β 1 (1–81) presents no homology with other protein or domains either in sequence or in structure, the

prediction programs were unable to determine tertiary structure for this domain.

The human CK2 β subunit (1–215) is a compact globular homodimer organized in seven α -helices and three β -sheets [24]. The tertiary structure predicted for the central core of maize CK2 β 1 (82–276) overlaps with the human CK2 β structure in almost all the structure (1–197) (Fig. 1b). Since maize CK2 β 1 is eighteen aminoacids shorter than human CK2 β in the C-terminal domain, the α 7 helix of human CK2 β (196–202) is not present in the maize structure. The other six α -helices and three β -strands overlap in both structures. It is noteworthy that the most diverging region between both structures corresponds to the acidic loop

counterpart [40]. Work is in progress to confirm if the plant specific N-terminal domain and the low-conserved acidic loop have a role in modulation of the enzyme in plants.

Acknowledgments M.R. was financed by I3P-CSIC2006 and CONSOLIDER (CSD2007-00057) from MICINN (Spain), I.C. V-B. by predoctoral fellowship FPI2007 from MICINN (Spain) and L. C-P. by Juan de la Cierva Programme, MICINN (Spain). This work was supported by grant BIO2009-13044-CO2-01 from MICINN (Spain).

References

- Lee Y, Lloyd AM, Roux SJ (1999) Antisense expression of the CK2 alpha-subunit gene in Arabidopsis. Effects on light-regulated gene expression and plant growth. *Plant Physiol* 119:989–1000
- Sugano S, Andronis C, Ong MS, Green RM, Tobin EM (1999) The protein kinase CK2 is involved in regulation of circadian rhythms in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12362–12366
- Espunya MC, Combettes B, Dot J, Chaubet-Gigot N, Martínez MC (1999) Cell-cycle modulation of CK2 activity in tobacco BY-2 cells. *Plant J* 19:655–666
- Hidalgo P, Garretton V, Berrios CG, Ojeda H, Jordana X, Holuigue L (2001) A nuclear casein kinase 2 activity is involved in early events of transcriptional activation induced by salicylic acid in tobacco. *Plant Physiol* 125:396–405
- Moreno-Romero J, Espunya M, Platara M, Ariño J, Martínez M (2008) A role for protein kinase CK2 in plant development: evidence obtained using a dominant-negative mutant. *Plant J* 55:118–130
- Portolés S, Más P (2007) Altered oscillator function affects clock resonance and is responsible for the reduced day-length sensitivity of CKB4 overexpressing plants. *Plant J* 51:966–977
- Riera M, Figueras M, López C, Goday A, Pagès M (2004) Protein kinase CK2 modulates developmental functions of the abscisic acid responsive protein Rab17 from maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9879–9884
- Meggio F, Boldyreff B, Marin O, Marchiori F, Perich JW, Issinger O-G, Pinna LA (1992) The effect of polylysine on casein-kinase-2 activity is influenced by both the structure of the protein/peptide substrates and the subunit composition of the enzyme. *Eur J Biochem* 205:939–945
- Bibby A, Litchfield DW (2005) The multiple personalities of the regulatory subunit of protein kinase CK2: CK2 dependent and CK2 independent roles reveal a secret identity for CK2beta. *Int J Biol Sci* 1:67–79
- Bolano-Garcia VM, Fernandez-Recio J, Allende JE, Blundell TL (2006) Identifying interaction motifs in CK2[beta]—a ubiquitous kinase regulatory subunit. *Trends Biochem Sci* 31:654–661
- Allende J, Allende C (1995) Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J* 9:313–323
- Lozeman F, Litchfield D, Piening C, Takio K, Walsh K, Krebs E (1990) Isolation and characterization of human cDNA clones encoding the alpha and the alpha' subunits of casein kinase II. *Biochemistry* 29:8436–8447
- Dobrowolska G, Boldyreff B, Issinger O-G (1991) Cloning and sequencing of the casein kinase 2 [alpha] subunit from *Zea mays*. *Biochim Biophys Acta* 1129:139–140
- Peracchia G, Jensen AB, Culiáñez-Macià FA, Grosset J, Goday A, Issinger O-G, Pagès M (1999) Characterization, subcellular localization and nuclear targeting of casein kinase 2 from *Zea mays*. *Plant Mol Biol* 40:199–211
- Riera M, Peracchia G, De Nadal E, Ariño J, Pagès M (2001) Maize protein kinase CK2: regulation and functionality of three β regulatory subunits. *Plant J* 25:365–374
- Collinge MA, Walker JC (1994) Isolation of an Arabidopsis thaliana casein kinase II β subunit by complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol Biol* 25:649–658
- Perales M, Portolés S, Más P (2006) The proteasome-dependent degradation of CKB4 is regulated by the Arabidopsis biological clock. *Plant J* 46:849–860
- Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Hayashida N, Kamada H, Shinozaki K (1993) Cloning and characterization of two cDNAs encoding casein kinase II catalytic subunits in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 21:279–289
- Riera M, Peracchia G, Pagès M (2001) Distinctive features of plant protein kinase CK2. *Mol Cell Biochem* 227:119–127
- Dennis MD, Browning KS (2009) Differential phosphorylation of plant translation initiation factors by *Arabidopsis thaliana* CK2 holoenzymes. *J Biol Chem* 284:20602–20614
- Espunya MC, Lopez-Giraldez T, Hernan I, Carballo M, Martinez MC (2005) Differential expression of genes encoding protein kinase CK2 subunits in the plant cell cycle. *J Exp Bot* 56:3183–3192
- Niefind K, Guerra B, Pinna LA, Issinger O-G, Schomburg D (1998) Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays* at 2.1 Å resolution. *EMBO J* 17:2451–2462
- Niefind K, Guerra B, Ermakowa I, Issinger O-G (2001) Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J* 20:5320–5331
- Chantalat L, Leroy D, Filhol O, Nueda A, Benitez MJ, Chambaz EM, Cochet C, Dideberg O (1999) Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *EMBO J* 18:2930–2940
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22:195–201
- Combet C, Jambon M, Deleage G, Geourjon C (2002) Geno3D: automatic comparative molecular modelling of protein. *Bioinformatics* 18:213–214
- Rensing S, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A et al (2008) The physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319:64–69
- Flagel LE, Wendel JF (2009) Gene duplication and evolutionary novelty in plants. *New Phytol* 183:557–564
- Blanc G, Wolfe KH (2004) Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell* 16:1667–1678
- Bowers JE, Chapman BA, Rong J, Paterson AH (2003) Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature* 422:433–438
- Lespinet O, Wolf YI, Koonin EV, Aravind L (2002) The role of lineage-specific gene family expansion in the evolution of eukaryotes. *Genome Res* 12:1048–1059
- Moore RC, Purugganan MD (2005) The evolutionary dynamics of plant duplicate genes. *Curr Opin Plant Biol* 8:122–128
- Otto SP, Whitton J (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annu Rev Genet* 34:401–437

36. Wood TE, Takebayashi N, Barker MS, Mayrose I, Greenspoon PB, Rieseberg LH (2009) The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:13875–13879
37. Marti-Renom MA, Stuart AC, Fiser As, Sanchez R, Melo F, Sali A (2000) Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29:291–325
38. Meggio F, Boldyreff B, Issinger O-G, Pinna LA (1994) Casein kinase 2 down-regulation and activation by polybasic peptides are mediated by acidic residues in the 55–64 region of the beta-subunit. A study with calmodulin as phosphorylatable substrate. *Biochemistry* 33:4336–4342
39. Leroy D, Heriché J-K, Filhol O, Chambaz EM, Cochet C (1997) Binding of polyamines to an autonomous domain of the regulatory subunit of protein kinase CK2 induces a conformational change in the holoenzyme. *J Biol Chem* 272:20820–20827
40. Riera M, Pages M, Issinger O-G, Guerra B (2003) Purification and characterization of recombinant protein kinase CK2 from *Zea mays* expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 29:24–32

Role of Plant-Specific N-Terminal Domain of Maize CK2 β 1 Subunit in CK2 β Functions and Holoenzyme Regulation

Marta Riera^{1,3}, Sami Irar^{1,3}, Isabel C. Vélez-Bermúdez¹, Lorenzo Carretero-Paulet^{1,2,3*}, Victoria Lumbreras¹, Montserrat Pagès^{1*}

1 Department of Molecular Genetics, Centre for Research on Agricultural Genomics CRAG (CSIC-IRTA-UAB), Barcelona, Spain, **2** Department of Applied Biology (Area of Genetics). University of Almería, Spain

Abstract

Protein kinase CK2 is a highly pleiotropic Ser/Thr kinase ubiquitous in eukaryotic organisms. CK2 is organized as a heterotetrameric enzyme composed of two types of subunits: the catalytic (CK2 α) and the regulatory (CK2 β). The CK2 β subunits enhance the stability, activity and specificity of the holoenzyme, but they can also perform functions independently of the CK2 tetramer. CK2 β regulatory subunits in plants differ from their animal or yeast counterparts, since they present an additional specific N-terminal extension of about 90 aminoacids that shares no homology with any previously characterized functional domain. Sequence analysis of the N-terminal domain of land plant CK2 β subunit sequences reveals its arrangement through short, conserved motifs, some of them including CK2 autophosphorylation sites. By using maize CK2 β 1 and a deleted version (Δ NCK2 β 1) lacking the N-terminal domain, we have demonstrated that CK2 β 1 is autophosphorylated within the N-terminal domain. Moreover, the holoenzyme composed with CK2 α 1/ Δ NCK2 β 1 is able to phosphorylate different substrates more efficiently than CK2 α 1/CK2 β 1 or CK2 α alone. Transient overexpression of CK2 β 1 and Δ NCK2 β 1 fused to GFP in different plant systems show that the presence of N-terminal domain enhances aggregation in nuclear speckles and stabilizes the protein against proteasome degradation. Finally, bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays show the nuclear and cytoplasmic location of the plant CK2 holoenzyme, in contrast to the individual CK2 α/β subunits mainly observed in the nucleus. All together, our results support the hypothesis that the plant-specific N-terminal domain of CK2 β subunits is involved in the down-regulation of the CK2 holoenzyme activity and in the stabilization of CK2 β 1 protein. In summary, the whole amount of data shown in this work suggests that this domain was acquired by plants for regulatory purposes.

Citation: Riera M, Irar S, Vélez-Bermúdez IC, Carretero-Paulet L, Lumbreras V, et al. (2011) Role of Plant-Specific N-Terminal Domain of Maize CK2 β 1 Subunit in CK2 β Functions and Holoenzyme Regulation. PLoS ONE 6(7): e21909. doi:10.1371/journal.pone.0021909

Editor: Arthur J. Lustig, Tulane University Health Sciences Center, United States of America

Received: December 23, 2010; **Accepted:** June 14, 2011; **Published:** July 15, 2011

Copyright: © 2011 Riera et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: MR was financed by I3P-CSIC2006, ICV-B by predoctoral fellowship FPI2007 from MICINN (Spain) and LC-P by Juan de la Cierva Programme, MICINN (Spain). This work was also supported by grant BIO2009-13044-CO2-01 from MICINN (Spain) and CONSOLIDER-INGENIO 2010 MEC (CSD2007-00057). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: montse.pages@cid.csic.es

³ These authors contributed equally to this work.

³ Current address: Integrative Systems Biology Group, Institute for Plant Molecular and Cell Biology - IBMCP (CSIC-UPV), Valencia, Spain

Introduction

Protein kinase CK2 is a constitutively active, highly conserved serine/threonine protein kinase that is ubiquitously distributed in eukaryotes. CK2 is one of the most pleiotropic kinases known, able to phosphorylate and interact with multiple cellular proteins [1,2]. In mammals the typical CK2 holoenzyme is a heterotetrameric complex composed of two catalytic (CK2 α and CK2 α') and two regulatory (CK2 β) subunits. The CK2 β regulatory subunits are inactive and present no homology to regulatory subunits or domains of other protein kinases. In the classical model of CK2 tetrameric holoenzyme, CK2 β regulatory subunits are involved in the assembly of CK2 tetrameric complexes, in enhancing catalytic activity and stability of CK2 α and in modulation of the substrate specificity of CK2 [3]. However, CK2 β subunits also have additional functions in addition to regulation of the holoenzyme, since they can interact with and regulate other proteins in the absence of CK2 α subunits [4,5]. Structural analysis by X-ray crystallographic assays shows that CK2 tetramers are subject to

disassembly and re-assembly [6]. In addition, localization studies of individual CK2 subunits indicate that both types of subunits have been found in different compartments [7,8]. These findings indicate that individual CK2 subunits may have an independent role. All these evidences support the idea of the independent role of the individual CK2 subunits versus the classical holoenzyme.

In plants CK2 is involved in relevant processes such as plant growth and light-regulated gene expression [9], circadian rhythm [10,11], cell-cycle regulation and development [12,13], salicylic acid mediated defense [14] and abiotic stress responses [15]. CK2 α/β subunits family is expanded in plant genomes relative to animal genomes, since they belong to multigenic families composed by up to 4 genes. As reported in animals, differential subcellular localization of plant CK2 subunits suggests specific functions for each CK2 subunit or CK2 isoform [15,16]. This hypothesis is also supported by new findings showing that specific CK2 holoenzyme isoforms can regulate the initiation of translation in *Arabidopsis* [17]. In maize, three genes for each CK2 α/β have been described to date [18–20]. A fourth CK2 β gene (CK2 β 4) has

been found in the Maize Genomic Database (MaizeGD) and is included in this paper. Since it was crystallized [21], maize CK2α1 subunit has been widely studied as a model of CK2 structure and it has been used successfully to design inhibitors of the holoenzyme [22]. This is due to the biochemical characteristics of maize CK2α, which is highly stable and has more specific activity than the human holoenzyme. Comparative studies demonstrate that the maize holoenzyme is less stable than the human counterpart [23]. However, despite copious data on CK2α, little is known about CK2β regulatory subunits and CK2 holoenzyme in maize. Plants have a greater diversity of CK2β subunits than animals or yeasts [24]. Although plant CK2βs preserve in their central core the characteristic CK2β features, they lacked 20 aminoacids from the C-terminal domain and contain a specific N-terminal extension of about 90 aminoacids. This N-terminal region shares no homology with any previously characterized functional domain. The absence of functional data about this domain prompted us to investigate its putative role in: (i) CK2β functions and (ii) CK2 holoenzyme regulation. Using maize CK2β1 and a deleted version lacking N-terminal domain (ΔNCK2β1) we demonstrate that this plant-specific N-terminal extension affects both CK2β and CK2 holoenzyme properties. In addition, we postulate a new role for CK2β subunits in plants, since CK2β1 releases CK2α1 subunits from the nucleolus and the CK2 holoenzyme can be found all over the cell. These findings show that *in vivo* localization of the plant CK2 holoenzyme is different from that of the independent CK2α/β subunits alone. Even though the N-terminal domain of CK2β is not involved in this export mechanism, the data reported here indicates a role of this domain in regulation of both CK2β subunits and CK2 holoenzyme in plants.

Results

Sequence and evolutionary analysis of the N-terminal domain of plant CK2β subunits

All plant CK2β subunits display an extra domain located N-terminal to the highly conserved CK2β central region. These N-terminal CK2β domains are poorly conserved both in length and in primary sequence. At the amino acid composition level, they are significantly enriched in phosphorylable residues such as Ser

(averaging ca. 10%), Thr and Tyr. Using the N-terminal domain of maize CK2β1 as a query, BLAST searches were performed in different protein databases, including the whole proteome of selected plant species (Table S1). As a result, 34 sequences corresponding to CK2β from 13 species representative of the main land plant evolutionary lineages were identified (Table S2). Additional searches of the protein databases were performed through HMMer using as a query a hidden Markov models (HMM) profile constructed on the basis of the alignment of 33 N-terminal domains. Despite HMM profiles perform better in detecting remote homologies [25], only land-plant species CK2β sequences were detected. The architecture of conserved motifs throughout the N-terminal domains was examined and represented over the corresponding alignment (Figure 1). Despite the high degree of divergence within the N-terminal domain, 15 short conserved motifs were found, some of them matching the consensus phosphorylation sites for specific protein kinases (Table S4), including putative CK2 autophosphorylation sites (motifs 1 and 5). Some motifs were highly conserved across almost every sequence examined (e.g. motif 1, particularly rich in acidic amino acids and including at least six Ser and/or Thr residues consensus of CK2 phosphorylation) while many others were apparently specific to certain evolutionary lineages (e.g. motif 5).

Genomic structure provides an independent criterion to assess the evolutionary relatedness among genes and functional domains. Exon/intron organization of plant CK2β for which the genomic sequences were available was determined. In all land-plant CK2β genes, location of the first intron was conserved at the same relative position of the N-terminal domain, just before motif 1. The first intron always showed phase 0 at the junction with exon 1 and phase 1 at the junction with exon 2 (Figure 1), supporting the acquisition of the N-terminal domain by land plants as encoded by a single exon.

To gain further insights into the evolutionary history of the land plant CK2β N-terminal domain, we performed a phylogenetic analysis of CK2β proteins from different eukaryotic kingdoms. For this purpose, we constructed a sequence dataset of 69 CK2β protein sequences, including sequences from animals and from several non-land plant species (algae, fungi, and protists) also displaying N-terminal extensions (Tables S2 and S3). Phylogenetic

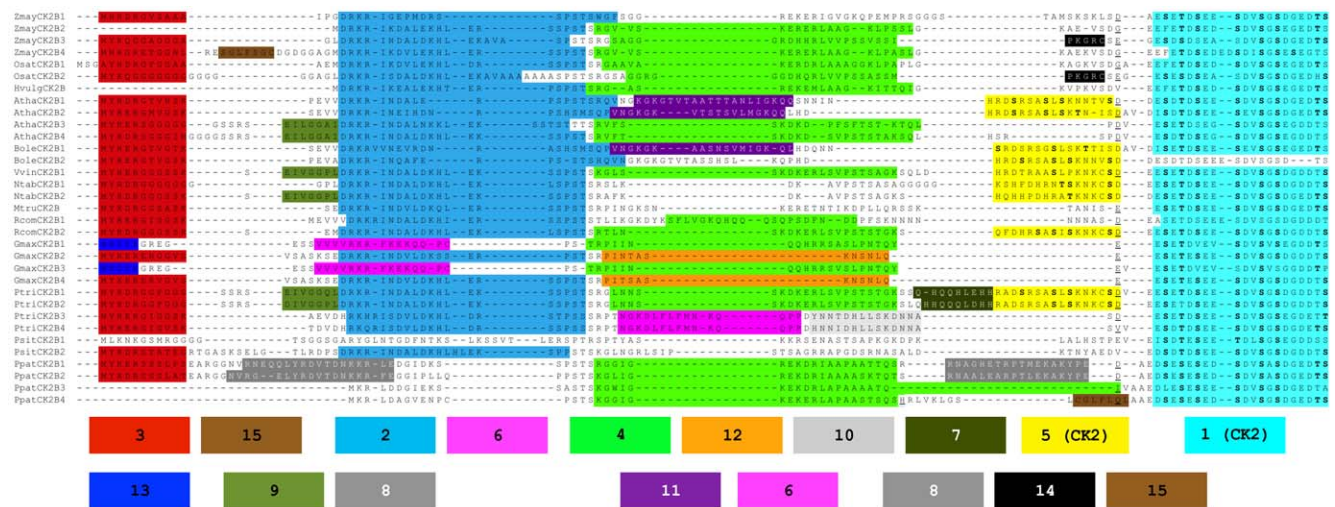


Figure 1. Multiple Sequence Alignment of N-terminal domains of land plant CK2β regulatory subunits. Conserved not-overlapping motifs identified in the MEME analysis are background-coloured. Positions in bold correspond to Serine and Threonine (S, T) residues predicted as CK2 phosphorylation sites. Location of the first intron is underlined. doi:10.1371/journal.pone.0021909.g001

analyses were conducted using two independent methods: Neighbor Joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML) [26–29]. A clade clustering all land-plant CK2β subunits could be unambiguously retrieved in both NJ and ML trees (Figure S1 and S2) and is clearly separated from other clades grouping CK2β from other organisms and also containing N-terminal extensions.

The N-terminal domain of maize CK2β1 affects the CK2 holoenzyme activity

To ascertain whether the plant specific N-terminal domain of maize CK2β1 affects CK2 holoenzyme regulation, we first analyzed if the domain is needed for CK2 holoenzyme assembly, CK2β/CK2β dimerization or interaction with CK2 substrates. We prepared constructs harbouring different deletions of the CK2β1 protein (Figure 2A) to perform two-hybrid assays. No significant interaction was detected between empty AD/BD-clone combinations (data not shown). Deletion del1 ΔNCK2β1 (80–276) strongly interacts with other CK2α catalytic subunits (CK2α2) as well as with full-length CK2β1. However, deletions del2 (180–276), corresponding to CK2β without N-terminal domain and acidic region and del3 (1–80), which corresponds to the N-terminal domain alone, do not interact neither with CK2α2 nor with CK2β1 subunits (Figure 2A). Therefore, these results demonstrate that CK2β N-terminal domain is not essential for intra-holoenzyme interactions.

We have previously demonstrated that recombinant maize CK2α and CK2β subunits can assemble in a functional tetrameric complex, and autophosphorylation of CK2β subunits demonstrates the functionality of the holoenzyme [20]. As previously observed in animals, dimerization of CK2β subunits seems to be a pre-requisite for holoenzyme formation [30]. Here we have reconstituted the active holoenzyme using the CK2α1 catalytic subunit and the deleted version of CK2β1 subunit (del1 ΔNCK2β1 (80–276)) and we found that in absence of the N-terminal domain of CK2β1, the CK2α1/ΔNCK2β1 holoenzyme is also functional and autophosphorylatable (Figure 2B). Comparative CK2 autophosphorylation assays using holoenzymes CK2α1/CK2β1 and CK2α1/ΔNCK2β1 have been done and quantification of the autophosphorylation of both holoenzymes shows that CK2α1/CK2β1 was about 25% more phosphorylated than CK2α1/ΔNCK2β1 (Figure 2B, right). It is noteworthy that when GST-CK2β1 is overexpressed in *E. coli*, a lower band (L) of about 30 kDa appears in addition to a higher band (H) corresponding to the fusion protein (56 kDa). Both bands are highly phosphorylated by CK2α *in vitro*. Purification and subsequent protein sequencing of this lower band demonstrate that it corresponds to intermediate products containing the N-terminal region of CK2β1. Moreover, the region corresponding to the CK2β1 N-terminal alone (1–80) fused to GST (fusion protein of 31 kDa) and overexpressed in *E. coli* was also highly phosphorylated by CK2α1 *in vitro* (Figure 2B). Taken together, all these results suggest that autophosphorylation of CK2β1 occurs in high proportion at the residues located in the N-terminal domain.

To test whether CK2 activity was affected by the N-terminal domain of CK2β subunits, we compared the ability of both CK2 holoenzymes (CK2α1/CK2β1 and CK2α1/ΔNCK2β1) to phosphorylate *in vitro* substrates as β-casein, *in vivo* substrates as Rab17 or interacting partners as maize transcription factor ZIM-like. Interestingly, the holoenzyme composed by CK2α1/ΔNCK2β1 is able to phosphorylate β-casein, Rab17 and ZIM-like in greater amount than CK2α1 alone or CK2α1/CK2β1 (Figure 2C). These results points towards a possible role of the N-terminal domain of CK2β subunits as a negative regulator of CK2 activity. To

confirm this hypothesis, we added increasing amounts of CK2β1 N-terminal domain (1–80) to the *in vitro* phosphorylation assays with the holoenzyme composed by CK2α1/ΔNCK2β1. The addition of exogenous CK2β1 N-terminal domain to the CK2α1/ΔNCK2β1 holoenzyme decreases its phosphorylation efficiency towards the substrates tested, ZIM-like (Figure 2D), β-casein and Rab17 (Figure S3). In conclusion, these results suggest that the N-terminal domain of CK2β subunits competes with the substrate for phosphorylation and down-regulate CK2α activity.

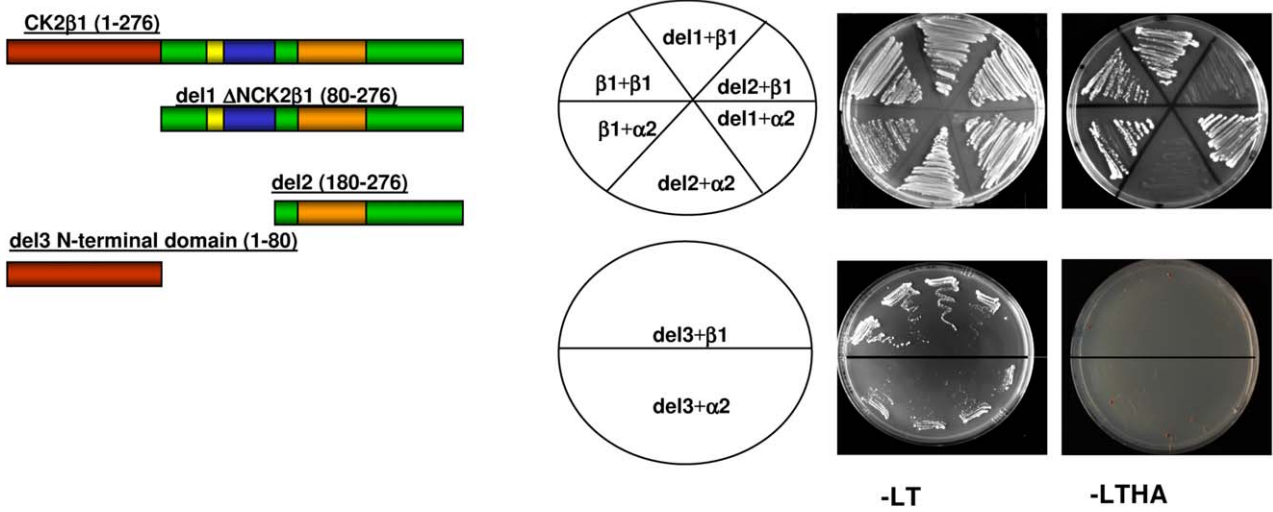
The N-terminal domain of CK2β1 enhances stability of CK2β1 against proteasome degradation

To determine whether the N-terminal domain of CK2β subunits is involved in regulation of their subcellular localization, the deleted version of CK2β1 (del1 ΔNCK2β1 (80–276)) was fused to GFP and examined by confocal microscopy in different plant systems: immature maize embryos (10 DAP) transformed by particle bombardment, agroinfiltrated tobacco leaves and onion epidermal cells (Figure 3 and Figure S4).

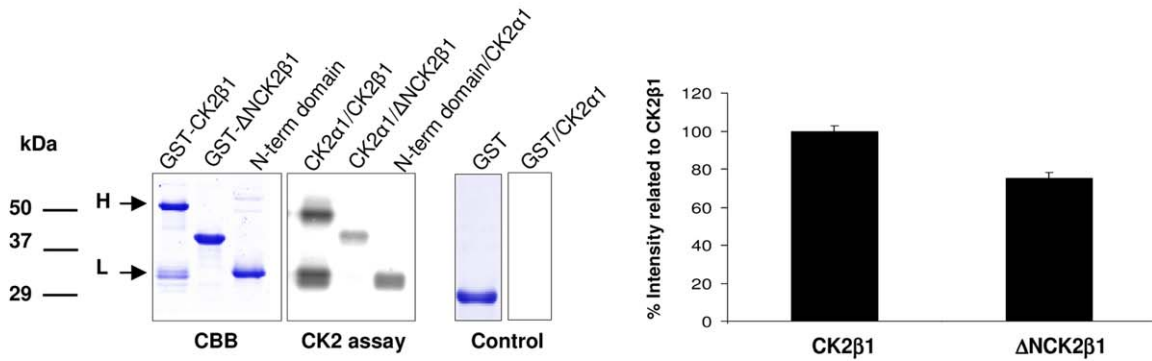
In all plant systems examined the results obtained show that both CK2β1 and ΔNCK2β1 are mainly located in the nucleus, but whereas in the transformation with CK2β1 most of cells presented nuclear speckles, in cells transformed with ΔNCK2β1 we found two different patterns: cells presenting a diffuse nuclear pattern as well as cells showing nuclear speckles. Any nuclear speckle structures were observed in cells transformed with GFP alone. Since the total number of transformed cells after maize bombardment is much lower than in tobacco cells, we counted the percentage of ΔNCK2β1 cells presenting speckles *vs.* a diffuse pattern in agroinfiltrated tobacco leaves (Figure 3B). Only 29% of cells transformed with ΔNCK2β1 presented speckles *vs.* 71% with diffuse pattern, whereas for cells transformed with full-length CK2β1 96% of the cells presented speckles. Therefore, the absence of nuclear aggregates in the ΔNCK2β1 cells could be linked to the deletion of the N-terminal domain.

To test if the better ability of CK2β1 *vs.* ΔNCK2β1 to form nuclear aggregates affects the protein stability, we performed cell-free degradation assays. Total protein extracts from tobacco leaves transformed with CK2β1 and ΔNCK2β1 fused to GFP were maintained for 10, 30, 60 min at 30°C without protein inhibitors, and aliquots were analyzed by Western blot using anti-GFP antibody (Figure 4A, left). Results obtained suggest that the amount of both CK2β1 and ΔNCK2β1 decreased over time. Subsequently, we added proteasome inhibitor MG132 to test whether the degradation observed was due to the proteasome pathway. In samples treated with MG132 the fusion protein remained stable, indicating that MG132 protects CK2β1 and ΔNCK2β1 against proteasome degradation. The relative amount of remaining proteins was estimated from these data and plotted, and the rates of protein degradation for ΔNCK2β1 was considerably higher than the rates for CK2β1 (Figure 4A, right). These results suggest that the protein lacking the N-terminal domain is more susceptible to degradation by proteasome than the full-length CK2β1. To examine the effect of the N-terminal domain on CK2β1 degradation by the proteasome pathway, we treated transformed tobacco leaves with cycloheximide (CHX) to inhibit *de novo* protein synthesis and we observed samples by confocal microscopy for up to 24 h (Figure 4B). After 4 h of treatment with CHX, the immunofluorescent signal was visible in both CK2β1 and ΔNCK2β1 samples. In parallel, we have taken samples of treated cells at different times and analyzed them by Western blot. In agreement with the results obtained by confocal analysis, the *in vivo* stability at short times is similar for both proteins (Figure S5). However, after 24 h, we detected the

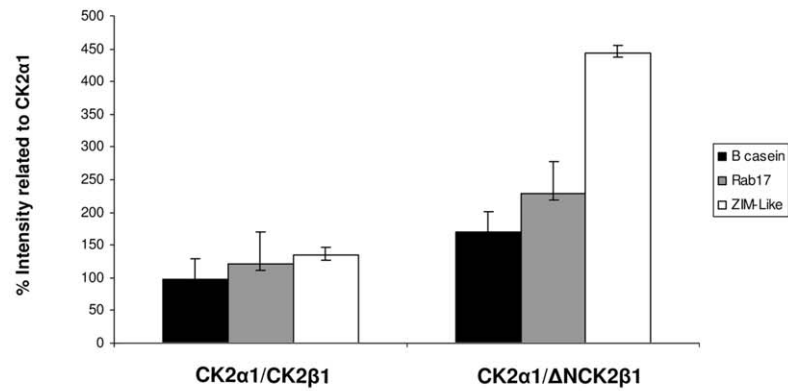
A



B



C



D

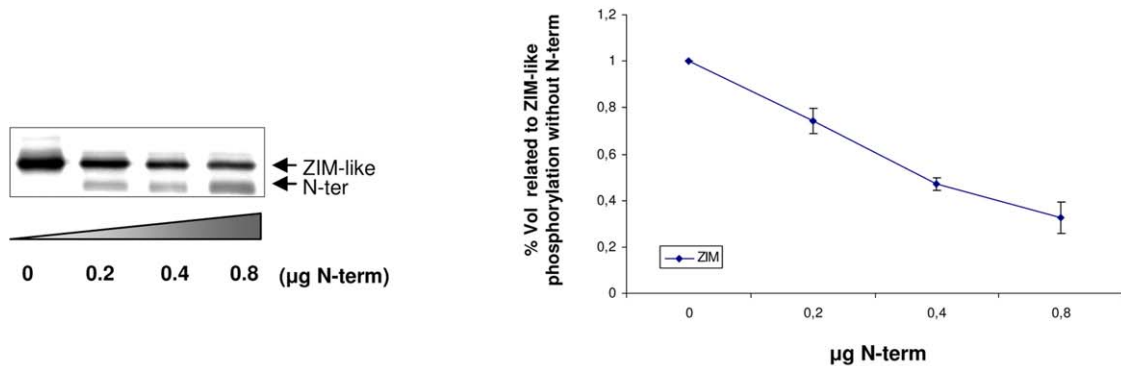


Figure 2. Intra-holoenzyme interactions using yeast two-hybrid system and in vitro CK2 phosphorylation assays using CK2 holoenzymes reconstituted with CK2 α 1 and regulatory subunits CK2 β 1 and Δ NCK2 β 1. (A) Left, Schematic representation of truncated versions of maize CK2 β 1 regulatory subunit used in the assay. Deletion 1, del1 Δ NCK2 β 1 (80–276): CK2 β 1 without N-terminal region, deletion 2 (del2) (180–276): CK2 β 1 without N-terminal region and acidic region and deletion 3 (del3) (1–80): N-terminal region alone. Right, Interactions between truncated versions of CK2 β 1 subunit and CK2 α 2/CK2 β 1 subunits with the two-hybrid system. The indicated transformants were selected in Leu-Trp plates and replated in selective plates lacking Leu-Trp-His-Ade. (B) Left panel, Gel stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB) containing the fusion proteins GST-CK2 β 1, GST- Δ NCK2 β 1 and GST-N-terminal domain (1–80) used in the autophosphorylation and CK2 phosphorylation assays. Middle panel, Autophosphorylation of reconstituted holoenzymes CK2 α 1/CK2 β 1, CK2 α 1/ Δ NCK2 β 1 and in vitro phosphorylation of N-terminal domain (1–80) protein by CK2 α 1. In the first lane H, high molecular weight protein corresponding to fusion protein GST-CK2 β 1 (56 kDa) and L, low molecular weight protein, corresponding to intermediate products of about 30 kDa from fusion protein GST-CK2 β 1. Right panel, Coomassie Brilliant Blue (CBB) and CK2 phosphorylation of GST protein alone (control). Right, Quantification of phosphorylated bands corresponding to CK2 α 1/CK2 β 1 and CK2 α 1/ Δ NCK2 β 1 holoenzymes. 100% intensity corresponds to autophosphorylation of CK2 β 1. The data shown are calculated average values \pm SD of three independent experiments. (C) Quantification of in vitro phosphorylation of β -casein, Rab17 protein and ZIM-like transcription factor by CK2 α 1/CK2 β 1 and CK2 α 1/ Δ NCK2 β 1 reconstituted holoenzymes. 100% intensity corresponds to the phosphorylation of each protein by CK2 α 1 alone. The data shown are calculated average values \pm SD of three independent experiments. (D), Left, In vitro phosphorylation of ZIM-like protein with CK2 α 1/ Δ NCK2 β 1 (lane 1). In lanes 2 to 4 increasing amounts of CK2 β 1 N-terminal domain (1–80) has been added: 0.2 μ g (lane 2), 0.4 μ g (lane 3) and 0.8 μ g (lane 4). Right, Relative phosphorylation of ZIM-like with the holoenzyme composed by CK2 α 1/ Δ NCK2 β 1 with increasing amounts of CK2 α 1 N-terminal domain (1–80) (lanes 2–4) compared to phosphorylation of ZIM-like with CK2 α 1/ Δ NCK2 β 1 holoenzyme (lane 1, assigned a value of 1). The data plotted (mean \pm SD) represent three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0021909.g002

immunofluorescent signal only in cells transformed with CK2 β 1, indicating the requirement of ongoing protein synthesis to maintain steady-state levels of Δ NCK2 β 1 protein. When samples were treated with MG132 and CHX+MG132, we are able to detect cells transformed with Δ NCK2 β 1 after 24 h of treatment, indicating that proteasome inhibition protects Δ NCK2 β 1 from degradation.

Localization of CK2 α 1/CK2 β 1 holoenzyme is different from its CK2 individual subunits

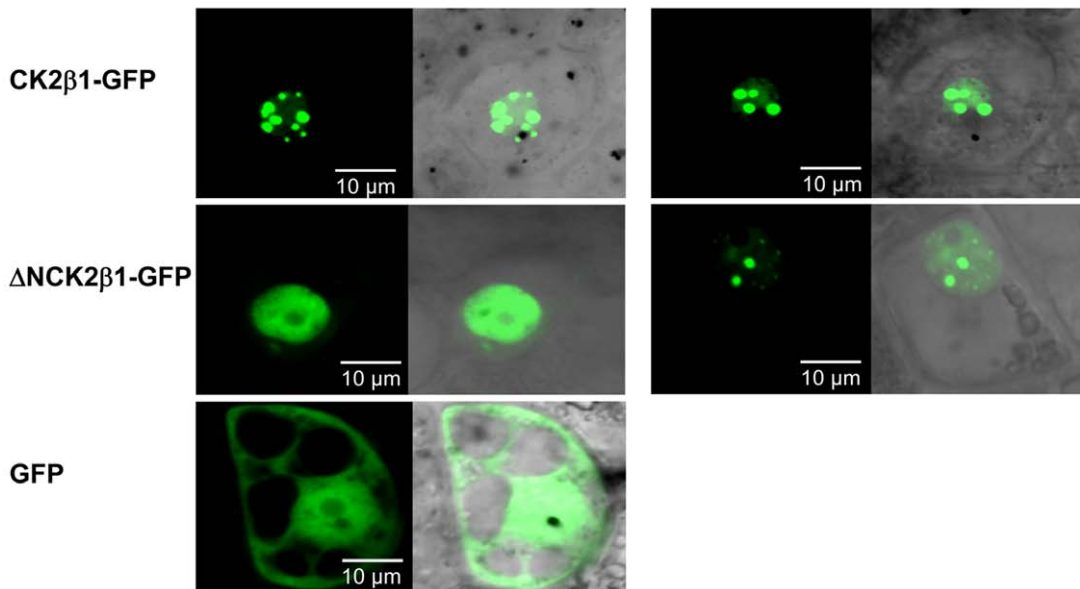
Different localization of plant CK2 subunits have been previously demonstrated [16]. In maize all CK2 α subunits described to date (CK2 α 1 to CK2 α 3) present nuclear localization with high accumulation in nucleolus; whereas CK2 β 1 and CK2 β 2 are mainly located in nuclear speckles and CK2 β 3 can be found in both nucleus and cytoplasm [15]. However, nothing is known about plant CK2 holoenzyme localization. To investigate that, we conducted Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) assays in agroinfiltrated tobacco leaves [31,32]. In that system, CK2 α 1 and CK2 β 1 split YFP tagged proteins must interact *in vivo* to reconstitute YFP fluorescence. In CK2 heterotetramer the two CK2 β subunits associate as a stable dimer in the core of the holoenzyme whereas the two CK2 α are located in the external part without interacting among themselves [29]. Using BiFC we show that CK2 β 1 subunits dimerize and present the same nuclear speckled localization described for CK2 β 1 fused to GFP (Figure 5A). Interestingly, the CK2 holoenzyme CK2 α 1/CK2 β 1 is located not only in nucleus but also in cytoplasmic aggregates (Figure 5B). Next, we performed BiFC reconstituting the holoenzyme with CK2 α 1 and Δ NCK2 β 1. As expected, Δ NCK2 β 1 interacted with split CK2 α 1, being also found in nucleus and cytoplasm, as in the case of CK2 α 1/CK2 β 1 holoenzyme (Figure 5B). To confirm the presence of the CK2 holoenzyme in the cytoplasm, we perform an alternative approach by co-transfecting tobacco leaves with CK2 α 1-GFP and CK2 β 1 fused to a non-fluorescence tag (Myc). This method allows to verify that the fluorescence signal detected in the cytoplasm is due to the presence of CK2 α 1-GFP in this compartment. Since CK2 α 1-GFP/CK2 β 1-Myc holoenzyme is also located in nucleus and cytoplasm, we confirmed that CK2 β 1-Myc is able to modify CK2 α 1-GFP localization from nucleus/nucleolus to nucleus and cytoplasm aggregates. In addition, we have used plants co-transfected with CK2 α 1-GFP/CK2 β 1-Myc to perform subcellular fractionation and Western blot analysis using anti-GFP antibody (Figure 5C). In control plants overexpressing CK2 α 1-GFP alone,

CK2 α 1 subunit was mainly detected in nuclear soluble fraction (N) whereas in plants co-transfected with CK2 α 1-GFP/CK2 β 1-Myc, CK2 α 1 is increased in the insoluble fraction (I), which includes all insoluble particles from nucleus and cytoplasm. These results suggest that CK2 β 1-Myc is able to shift CK2 α 1-GFP from nuclear fraction to insoluble aggregates in both nucleus and cytoplasm.

Discussion

Land plant CK2 β subunits show distinctive features from their eukaryotic counterparts, including the formation of expanded families, shorter C-terminal domains and longer N-terminal domains. Preliminary *in-silico* analysis of the plant specific N-terminal domain indicates that it presents no homology with other protein or domains either in sequence or in structure. In addition, prediction programs were unable to determine a secondary structure for this domain. In an attempt to understand the role and functionality of this domain in plants, we performed a complete sequence analysis. The domain is arranged through short, conserved motifs, many of them putatively corresponding to specific kinase phosphorylation sites, including CK2 autophosphorylation sites. The domain may have evolved through the gain and loss of short conserved motifs, resulting in a mosaic pattern. The occurrence of N-terminal extensions is not exclusive of land plants, having been also found in fungi, intracellular protozoan parasites and algae. However, we did not find any protein or domain outside land plant CK2 β s showing significant identity at the sequence level with the N-terminal domain. Moreover, phylogenetic analysis shows a separated clade clustering all land plant CK2 β subunits. As expected, green and red algae CK2 β sequences clustered at the base of the land plant clade. However, branching of the single representative from the red algae *Cyanidioschyzon merolae*, which diverged from other photosynthetic eukaryotes 1.5 billion years ago, was less bootstrap supported [33]. Also protists and fungi are separated from land plants in both phylogenetic trees, in accordance to previously reported data that demonstrate the early diverging evolution of CK2 β from plants [34]. Furthermore, the exon/intron structure of genomic sequences encoding for the CK2 β N-terminal domain was absolutely conserved in all land plant CK2 β genes analyzed. All together, these results support the independent acquisition of the N-terminal domain by land plants as a single exon. Further evolutionary diversification of land plant CK2 β would have involved differential gene family expansion, which may have promoted the acquisition of additional functional specificities by multiplying

A



B

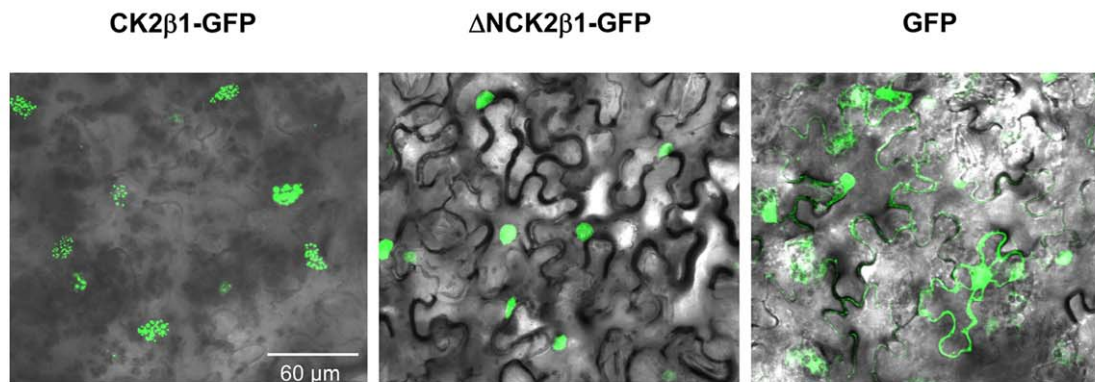


Figure 3. Subcellular localization of CK2β1-GFP and ΔNCK2β1-GFP in maize immature embryos (10 DAP) and Agrobacterium-infiltrated tobacco leaves. (A) Epifluorescence and bright-field images (merged with epifluorescence) (60×) of 10 DAP embryos cells transformed by particle bombardment with the indicated constructs (CK2β1-GFP, ΔNCK2β1-GFP and GFP alone). (B) Upper, General views (40×) of *Nicotiana benthamiana* leaves infiltrated with a mixture of *Agrobacterium* suspensions harbouring the indicated constructs (CK2β1-GFP, ΔNCK2β1-GFP and GFP alone) and the gene silencing suppressor HcPro. Bottom, Quantification of cells presenting speckled pattern in cells transformed with CK2β1 and ΔNCK2β1. The graphic representation correspond to average for data corresponding to 3 independent experiments ±SD (n = 100). doi:10.1371/journal.pone.0021909.g003

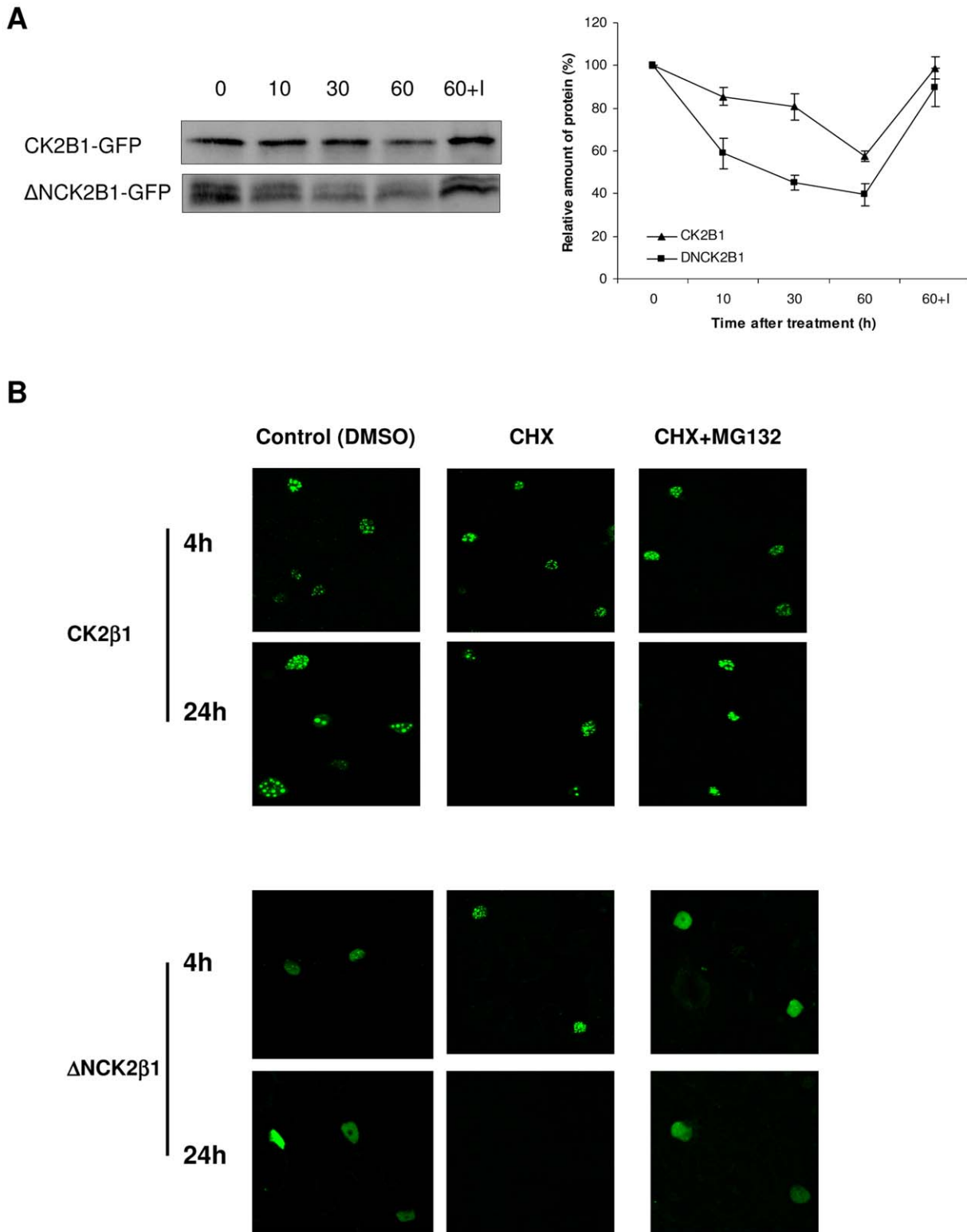


Figure 4. Protein degradation of CK2β1 and ΔNCK2β1. (A) Immunodetection of CK2β1-GFP protein and ΔNCK2β1-GFP protein in transformed *N. benthamiana* leaves using anti-GFP antibody. Protein extracts were incubated at 30°C in an *in vitro* degradation buffer (see Experimental procedures) with or without proteasome inhibitor (MG132) for the indicated time (min). 30 μg of total protein was loaded onto gels. 60+l indicates extracts treated with 100 μM MG132. Each signal strength was measured by Quantity One and plotted in the right panel as the relative amount of remaining protein. Quantitative data (mean ±SD) represent three independent experiments. (B) General views (40×) of *Nicotiana benthamiana* leaves infiltrated with CK2β1-GFP and ΔNCK2β1-GFP with different treatments: control, cycloheximide treatment (CHX, 50 μM), and CHX (50 μM)+proteasome inhibitor MG132 (100 μM) combination treatment after 4 and 24 hours. The images shown are representative of more than 5 independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0021909.g004

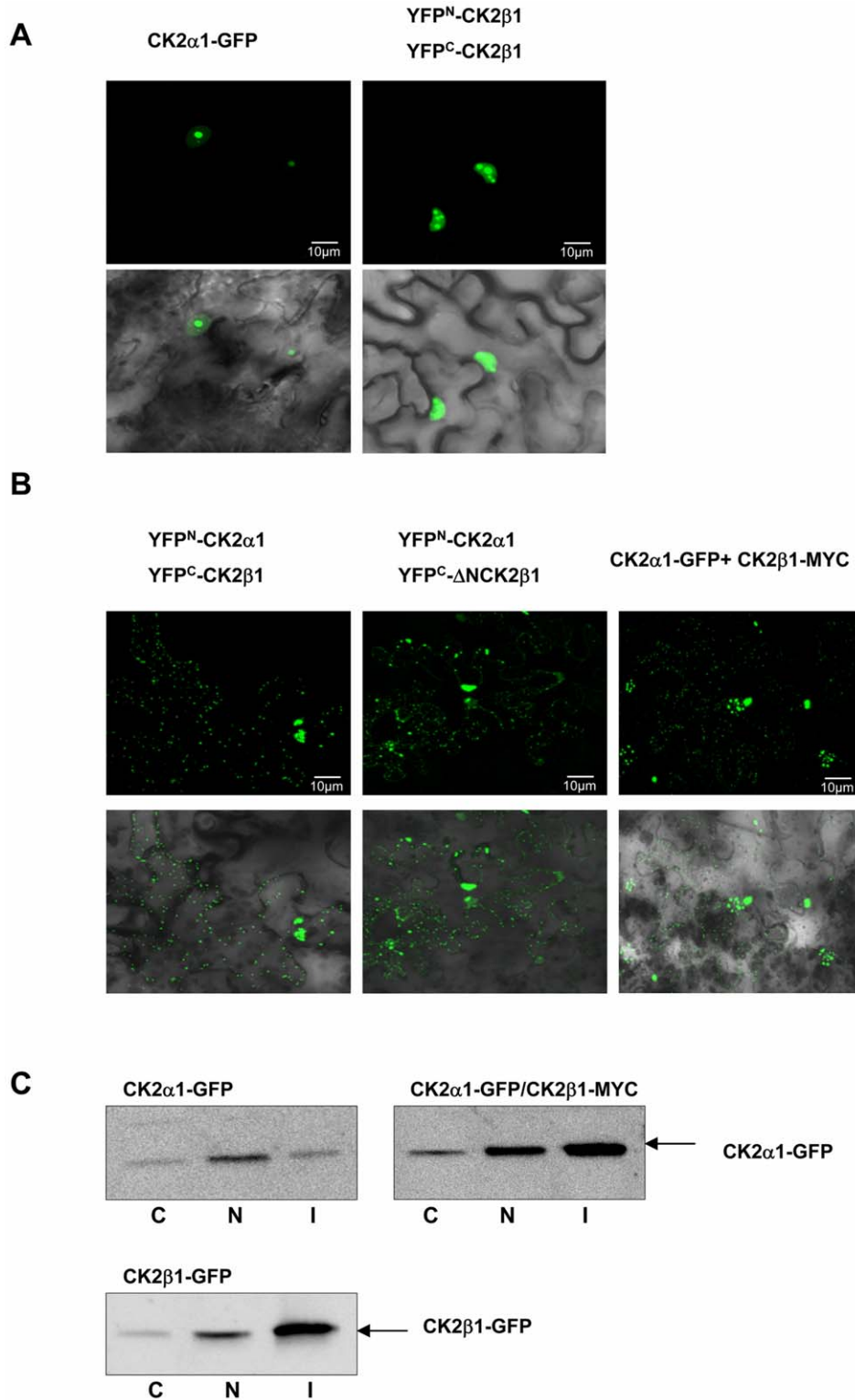


Figure 5. Subcellular localization of CK2 individual subunits and CK2 holoenzyme in leaf epidermis of *N. benthamiana* plants. (A) General views (40×) of *Nicotiana benthamiana* leaves co-infiltrated with a mixture of *Agrobacterium* suspensions harbouring the indicated constructs: CK2α1-GFP (left), YFP^N-CK2β1/YFP^C-CK2β1 (right) together with gene silencing suppressor HcPro. (B) General views (40×) of *Nicotiana benthamiana* leaves co-infiltrated with *Agrobacterium* containing the gene silencing suppressor HcPro and the following pair constructs: YFP^N-CK2α1/YFP^C-CK2β1 (left), YFP^N-CK2α1/YFP^C-ΔNCK2β1 (middle), and CK2α1-GFP/CK2β1-Myc (right). In panel A and B upper correspond to epifluorescence images and bottom to bright-field images (merged with epifluorescence). (C) Immunodetection of CK2α1-GFP and CK2β1-GFP proteins using anti-GFP antibody in *N. benthamiana* leaves transformed with CK2α1-GFP, CK2α1-GFP/CK2β1-Myc and CK2β1-GFP. C corresponds to cytosolic fraction, N to nuclear fraction and I to insoluble fraction (including nuclear and cytosolic aggregates). doi:10.1371/journal.pone.0021909.g005

the number of putative regulatory networks in which they could be involved.

Despite of the elucidation of maize CK2α catalytic structure, no structure for the plant CK2β regulatory subunit has been reported to date. Here, by using a two-hybrid approach we show that the CK2β N-terminal domain did not affect intra-molecular (CK2α/β or CK2β/β) holoenzyme interactions. These results indicate that the N-terminal domain is located in the external part of the holoenzyme, although structural studies such as the crystallization of the CK2β regulatory subunit would be needed to localize it with greater precision.

Most animal CK2β subunits are autophosphorylated only at two highly conserved residues, Ser² and Ser³ [35]. This consensus is only partially conserved in plants: in all plant species Ser² is conserved as Ser residue (Ser⁸³ in maize CK2β1), but Ser³ is replaced in all plant sequences analyzed by acidic residues (Asp or Glu). In contrast to animals, land plant CK2β subunits present additional putative autophosphorylation sites (motifs 1 and 5). For instance, maize CK2β1 has five additional Ser residues at the motif 1 of the N-terminal domain that might be targets for CK2 autophosphorylation. Motif 1 is rich in Asp and Glu residues and is one of the most conserved in all plant N-terminal sequences (Figure 1). In addition, CK2β1 subunits present additional Ser residues located in the central core of the protein not present in animal CK2β proteins. Our *in vitro* phosphorylation assays show that the holoenzyme reconstituted with CK2α1 and CK2β1 is higher autophosphorylated than the holoenzyme with CK2α1 and ΔNCK2β1 (Figure 2B). Moreover, the N-terminal domain alone is highly phosphorylated by CK2α1 *in vitro*. Taken together, these results suggests that the putative CK2 consensus sites located in the N-terminal domain are functional and might be involved in regulating CK2 activity. *In vitro* phosphorylation assays showed that when the holoenzyme is reconstituted with CK2α1 and ΔNCK2β1 the phosphorylation of several substrates is enhanced. These results point towards a possible role of the N-terminal domain of CK2β down-regulating CK2α subunit activity. The competition assays using the N-terminal fragment support this hypothesis. The N-terminal extension of the protist *Plasmodium falciparum* has also been postulated to act as a down-regulator of CK2α subunits [36], even though our analysis supports the independent origin of the N-terminal domain of land plant CK2β.

The greater efficiency of the maize holoenzyme without the N-terminal domain is also consistent with the results of our previous studies comparing human *vs.* maize holoenzyme, which demonstrated a high stability and high specific activity of human CK2 holoenzyme (without N-terminal domain) compared to its maize counterpart [23]. It has been recently reported that a splicing variant of maize CK2α1 (named CK2α-4) could act as a specific negative regulator of CK2 activity [37]. Taken together, all these results suggest that maize CK2 activity could be regulated by different mechanisms involving both CK2α/β subunits.

Functional studies were performed in order to assess whether the presence of the N-terminal domain has a role in regulation of CK2β subcellular localization. Our results show that maize CK2β1 is highly prone to aggregation in nuclear speckles and the deletion of N-terminal domain decreases this accumulation of CK2β1 in stable nuclear aggregates. It has been reported for other proteins such as mammalian PGC-1α and transcription factor ATF4 that aggregation in nuclear bodies protects against proteasome degradation [38,39]. Here we show that maize CK2β1 is also degraded by the ubiquitin-dependent proteasome pathway as described for *Arabidopsis* CK2β4 [40]. Interestingly, cell-free degradation assays show that deletion of the N-terminal domain increases the rate of CK2β1 protein degradation. Our findings indicate a role for the N-terminal

domain in enhancing CK2β1 aggregation in nuclear speckles, where the protein is assumed to be tightly complexed and less accessible to degradation machinery. Nevertheless, although the N-terminal domain can be considered as an “enhancer” of CK2β1 protein aggregation, it is not essential since ΔNCK2β1 can also aggregate. Thus, we can consider that aggregation in nuclear speckles protects CK2β1 against fast degradation by proteasome even though the protein is eventually degraded.

In human cells, CK2β is normally expressed at a higher level than CK2α catalytic subunits, allowing part of CK2β to be incorporated and stabilized into CK2 tetramers, whereas the excess CK2β is rapidly degraded with a half-life of less than 1 h [41]. Our results indicate that maize CK2β1 regulatory subunits are more stable than their animal counterparts probably due to their aggregation in nuclear speckles. Since the nature of these aggregates remains unclear, further experiments should be done to elucidate their composition and functional role.

We have previously demonstrated that different localization of the individual maize CK2α and CK2β isoforms [15] but nothing was known about holoenzyme localization in plants. Here by using BiFC we show the *in vivo* localization of CK2 holoenzyme in plant cells. Whereas individual subunits CK2α1 and CK2β1 present a nuclear localization, the holoenzyme CK2α1/CK2β1 is assembled in nucleus and is exported to the cytoplasm, where is complexed in aggregates. After analyzing the localization of the holoenzyme reconstituted with ΔNCK2β1, we conclude that the N-terminal domain is not involved in this export to the cytoplasm. In mammals it has recently been reported that CK2β regulatory subunits are required for the export of the holoenzyme as an ectokinase bound to the external surface of the cell membrane [42]. The same authors postulate a role of CK2β exporting not only CK2α but other CK2 interacting proteins. Our results implicate CK2β in the shift from nucleus/nucleolus to cytoplasm of CK2α subunits in plants. Further experiments may elucidate whether this export mechanism also involves other proteins.

In conclusion, our research shed new light on the regulation of protein kinase CK2 in plants. The whole amount of data shown in this work suggests that the plant-specific N-terminal domain of CK2β subunits was acquired in plants, as a single exon, for regulatory purposes, particularly in terms of regulation of holoenzyme activity and stabilization.

Materials and Methods

Plant CK2β regulatory subunits sequence analysis

Search for CK2β protein sequences was performed through BLAST and HMMER [43,44]. Protein sequences were aligned using CLUSTALW and MUSCLE and the resulting alignments further edited through the MEGA 4.0 Alignment Explorer tool [45–47]. The MEME v. 3.5.7 tool was used to search for repeated sequence patterns (motifs) conserved across proteins [48]. Settings were changed to search for short motifs (3–20 aminoacids) showing any number of repetitions per sequence and position (p-values < 1e-4). Search for functional domain and motifs was performed through the PROSITE and INTERPRO databases [49]. NetPhosK v1.0 server was used to predict kinase specific phosphorylation sites [50]. The location, distribution and phases of introns at the genomic sequences encoding for the N-terminal CK2β domain were determined using GENEWISE [50,51]. Phylogenetic analyses performed are detailed in Text S1.

Yeast two-hybrid assays

The Matchmaker two-hybrid system (Clontech) was used to perform yeast two-hybrid assays. For the two-hybrid assays,

truncated versions of CK2β1 (del1 ΔNCK2β1 (80–276) del2 (180–276), and del3 N-terminal domain (1–80)) were generated by PCR and cloned into pGBT9 or pGBT7 vectors into EcoRI/SalI sites. The specific primers used were detailed in Table S5. The other two-hybrid constructs used in the assays (pGBT9-CK2β1, pGAD424-CK2β1 and pGAD424-CK2α2) were previously described in [20]. Yeast (AH109 strain) transformation was performed according to the manufacturer's instructions. Yeast cells were cotransformed with the different pairs of BD-AD constructs and transformants were selected on minimal synthetic dropout medium (SD) -Leu-Trp (SD-LT). To test for protein-protein positive interaction, independent colonies were transferred to SD- -Leu-Trp-His-Ade (SD-LTHA).

Recombinant protein expression and purification and *in vitro* autophosphorylation and CK2 activity assays

For expression and purification of recombinant CK2β proteins, the cDNAs of full-length CK2β1, del1 ΔNCK2β1 (80–276) and del3 N-terminal domain (1–80) were digested from pGBT9/pGBT7 vectors using EcoRI/SalI sites and cloned in expression vector pGEX-4T-1 in frame to GST protein. The constructs were transformed into *E. coli* BL21(DE), and the proteins were expressed and purified as GST (Glutathione-S-Transferase) fusions as previously described [20] and according manufacturer's manual. Protein concentration of purified proteins (GST-CK2β1, GST-ΔNCK2β1 and GST-N-terminal domain) was determined by Bioanalyzer methods (Agilent technology) according to the manufacturer's instructions.

For the *in vitro* autophosphorylation assay, the holoenzymes CK2α1/CK2β1 and CK2α1/ΔNCK2β1 were reconstituted using 100 ng CK2α1 (Kinase Detect, Denmark) and 400 ng of GST-CK2β1 or GST-ΔNCK2β1 in a total volume of 30 μl CK2 buffer (8.9 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 27 mM β-glycerol phosphate, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.08 mM ATP, 3 μCi of [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol). In the case of the CK2 activity assays, the holoenzymes CK2α1/CK2β1 and CK2α1/ΔNCK2β1 were reconstituted as described for the autophosphorylation assays and 0.6 μg of the different substrates tested (β-casein, GST-N-terminal domain, Rab17 or ZIM-like) were added to the reaction. In the competition assays, increasing amounts of N-terminal domain (1–80) (from 0.2 to 0.8 μg) were added to the reaction containing CK2α1/ΔNCK2β1 holoenzyme and 0.6 μg of β-casein, Rab17 or ZIM-like as substrates. In all cases, the samples were incubated for 30 min at 30°C. Reactions were stopped by addition of electrophoresis sample buffer, and the phosphorylated proteins were separated by 12% SDS-PAGE, visualized by PhosphoImager analysis and the intensity of the phosphorylated bands obtained was quantified by Quantity One (Bio-Rad) software according the manufacturer's suggestions.

Cell-free degradation assays, western blot analysis and subcellular fractionation

The *in vitro* cell-free degradation assays was modified from [40]. 0.2 g transformed *N. benthamiana* leaves with CK2β1-GFP and ΔNCK2β1-GFP were ground in liquid nitrogen and resuspended in buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT and 5 mM ATP). Equal amounts of extracts were transferred to individual tubes and incubated at 30°C and aliquots were taken at 20, 40 and 60 min. One aliquot was incubated with 100 μM of protein inhibitor MG132 (Enzo, Life Sciences, Inc.) for 1 h at 30°C. Reactions were stopped by adding protein gel-loading buffer. For Western blot analysis, proteins were electrophoresed on 12% SDS-PAGE gels, transferred to immobi-

lon-P membranes (Millipore) and incubated with purchased antibodies against GFP (Invitrogen). The immunocomplexes were revealed using the ECL detection kit system (Super Signal West Femto, Pierce). Subcellular fractionation was done according to [38]. Briefly, transformed tobacco leaves were excised, ground in liquid nitrogen and resuspended in hypotonic buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 μM dithiothreitol, and a protease inhibitor cocktail (1.6 mM aprotinin, 50 mM leupeptin, 1 mM pepstatin, 10 mM E-64 and 1 mM PMSF)). The extracts were homogenized and centrifuged at 10,000 rpm for 1 min. The supernatant was collected as the cytosolic fraction (C). The pellet was extracted in a high salt buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 μM dithiothreitol, and a protease inhibitor cocktail), and the soluble fraction was collected as nuclear extracts following another centrifugation (N). The remaining insoluble pellet was resuspended in SDS lysis buffer (I).

Transient expression of GFP fusions in maize, *Nicotiana benthamiana* leaves and onion cells

For transient expression of GFP fusions in maize, tobacco and onion cells CK2β1 and del1 ΔNCK2β1 cDNAs were amplified by PCR using specific primers (Table S5) and cloned into binary vector pCAMBIA1302 under the control of a CamV 35S promoter and fused in the 3' region with the GFP using BglIII-SpeI sites for CK2β1 and BglIII site for ΔNCK2β1. Additionally, the cDNA CK2β1 was amplified by PCR using specific primers (Table S5) and cloned in pLOLA vector [52] into BglIII site in frame with Myc tag. The fusion CK2β1-Myc was transferred to pCAMBIA2300 using KpnI restriction site. For maize transformation immature maize embryos about 1 mm long were aseptically dissected from ears of field-grown maize plants (AxBxB73) after 10 days of pollination (10 DAP). Isolated embryos were placed o/n at 24°C in plates containing MS medium supplemented with 2.2 mg/L of 2,4D. 4 h before transformation embryos were moved to MS plates with 16 g/L of mannitol and were transiently transfected with GFP constructs by particle bombardment using the Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad). Plasmid DNA containing the different constructs was precipitated onto gold particles using CaCl₂ and spermidine, and 1.5 μg DNA was delivered into intact maize tissue. After 24 h, the fluorescence of the bombarded cells were viewed using a FV 1000 confocal microscope (Olympus, <http://www.olympus.com/>). The same methodology was used to visualize the GFP fusion protein in epidermal onion cells. Young, fully expanded leaves from 5 week old tobacco plants were transiently transfected with *Agrobacterium tumefaciens* GV3101/pMP90 transformed with the GFP construct together with the silencing suppressor HcPro as has been described in [30,31]. After 3–4 days, infiltrated areas from leaves were excised and examined by FV 1000 confocal microscopy (Olympus). For treatment with cycloheximide (CHX) and protease inhibitor MG132 leaves were excised and placed in sealed Petri dishes submerged into the solutions containing CHX 50 μM and MG132 100 μM in 2 ml of phosphate buffer. Treated and control samples were ground in liquid nitrogen and resuspended in buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 5 mM ATP, and protease inhibitor cocktail) and analyzed by Western blot analysis as described above.

Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays

For BiFC assays, the cDNAs corresponding to the CK2α1, CK2β1 and ΔNCK2β1 were cloned in the GATEWAY-compatible vector pENTRY3C (Invitrogen). The cDNA CK21 was amplified by PCR using the specific primers detailed in Table S5 and the PCR fragment was cloned into BamHI-XhoI sites. The cDNAs of full-length CK2β1,

and del1 Δ NCK2 β 1 (80–276) were digested from pGBT9 vector using EcoRI/SalI sites and transferred to pENTRY3C. The three pENTRY3C plasmids were recombined by Gateway reaction into pYFP^N43 and pYFP^C43 vectors (kindly provided by A. Ferrando, University of Valencia, Spain, <http://www.ibmcp.upv.es/FerrandoLabVectors.php>.) to produce YFP^N-CK2 β 1, YFP^C-CK2 β 1, YFP^N-CK2 α 1 and YFP^C- Δ NCK2 β 1. Transformation of *N.benthamiana* leaves and visualization was performed as described above for transient expression of GFP fusions.

Supporting Information

Text S1 Phylogenetic analysis of CK2 β regulatory subunits. Phylogenetic analyses were performed on the basis of amino acid sequence alignments using two independent methods: Neighbor Joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML). NJ analyses were implemented in MEGA 4.0 using the default settings [47] Prior to ML analysis; the best-fitting amino acid substitution model was selected using the Akaike information criterion as implemented in ProtTest v1.4 [26]. The resulting model: JTT with (i) an estimated proportion of invariable sites and (ii) a heterogeneous distribution of substitution rates across proteins with eight categories and an estimated shape parameter, was implemented in PHYML v3.0 to infer ML trees, using the subtree pruning and regrafting option to optimize tree topology searching [27–29]. To provide confidence on the resulting tree topology, a bootstrap analysis with 1,000 and 100 replicates in NJ and ML analyses, respectively, was performed.

(DOC)

Table S1 Summary of genome databases searched for CK2 β protein kinases.

(DOC)

Table S2 Summary of 34 land plant CK2 β sequences. Sequence identifier refers to the UNIPROT database, excepting for species examined independently, in which case the accession from the corresponding database was indicated (Table S1). The * designs sequence incomplete at its N-terminal end. Some genes have been identified to encode for alternatively spliced variants. In such cases, only a single representative protein sequence is shown.

(DOC)

Table S3 Summary of 7 algae, 14 animal, 12 fungal and 2 protists CK2 β sequences from representative species.

Sequence identifier refers to the UNIPROT database, excepting for species examined independently, in which case the accession from the corresponding database was used (Table S1). The * indicates sequences incomplete at its N-terminal end.

(DOC)

Table S4 Summary of conserved motifs identified by MEME in plant CK2 β subunits. Matches of motifs with specific kinase phosphorylation sites, predicted by NetPhos K v1.0 and PROSITE searches are shown. DNAPK: DNA activated protein kinase, CDC2: Cell division cycle 2, RSK: 90 kDa ribosomal S6 kinase, TK: Tyrosine kinase, ATM: Ataxia Telangiectasia-Mutated.

(DOC)

Table S5 List of primers used in this study.

(DOC)

Table S5 List of primers used in this study.

(PDF)

Figure S1 Unrooted Maximum Likelihood phylogenetic tree of CK2 β regulatory subunits. The tree is based on the CLUSTAL alignment of 69 CK2 β protein sequences. The clade clustering land plant CK2 β is indicated. Non-land plant CK2 β showing N-terminal extensions are in bold. Bootstrap values are

displayed next to the corresponding nodes. The tree is drawn to scale, with branch lengths proportional to evolutionary distances. The scale bar indicates the estimated number of amino acid substitutions per site.

(PDF)

Figure S2 Unrooted Neighbor Joining phylogenetic tree of CK2 β regulatory subunits. The tree is based on the CLUSTAL alignment of 69 CK2 β protein sequences. The clade clustering land plant CK2 β is indicated. Non-land plant CK2 β showing N-terminal extensions are in bold. Bootstrap values are displayed next to the corresponding nodes. The tree is drawn to scale, with branch lengths proportional to evolutionary distances. The scale bar indicates the estimated number of amino acid substitutions per site.

(PDF)

Figure S3 Quantification of Rab17 and β -casein phosphorylation with CK2 α 1/ Δ NCK2 β 1 holoenzyme and increasing amounts of CK2 β 1 N-terminal domain (1–80). Relative phosphorylation of Rab17 and β -casein with the holoenzyme composed by CK2 α 1/ Δ NCK2 β 1 with increasing amounts of CK2 β 1 N-terminal domain (1–80) compared to phosphorylation of both substrates with CK2 α 1/ Δ NCK2 β 1 holoenzyme alone (assigned a value of 1). The data plotted (mean \pm SD) represent three independent experiments.

(PDF)

Figure S4 Subcellular localization of CK2 β 1-GFP and Δ NCK2 β 1-GFP in *Agrobacterium*-infiltrated tobacco leaves and onion cells. (A) Upper and middle panels show detail of fluorescent nucleus (60 \times) of cells from tobacco leaves infiltrated with a mixture of *Agrobacterium* suspensions harbouring the indicated constructs (CK2 β 1-GFP, Δ NCK2 β 1-GFP) and the gene silencing suppressor HcPro. In upper panel right, a confocal image of nuclear DAPI staining of cells transformed with CK2 β 1-GFP is shown (60 \times). General views (40 \times) of control cells infiltrated with GFP alone and HcPro are shown in the bottom of the panels. (B) Detail of fluorescent nucleus (60 \times) of onion cells transformed with CK2 β 1-GFP and Δ NCK2 β 1-GFP by particle bombardment. General views of onion cells (40 \times) transformed with GFP alone are shown on the right. In all cases epifluorescence and bright-field images (merged with epifluorescence) are shown.

(TIF)

Figure S5 Immunodetection of CK2 β 1-GFP protein and Δ NCK2 β 1-GFP protein in transformed *N. benthamiana* leaves using anti-GFP antibody. (A) Control and Cycloheximide treatment (CHX, 50 μ M). Aliquots have taken at different times (30', 1 h, 2 h and 4 h) (B) Control, Cycloheximide treatment (CHX, 50 μ M) and proteasome inhibitor MG132 (100 μ M). Aliquots have taken at different times (4 h and 8 h). In all analysis, 30 μ g of total extracts has been loaded. The hybridization against Rubisco protein is shown as loading control.

(TIF)

Figure S4 Subcellular localization of CK2 β 1-GFP and Δ NCK2 β 1-GFP in *Agrobacterium*-infiltrated tobacco leaves and onion cells. (A) Upper and middle panels show detail of fluorescent nucleus (60 \times) of cells from tobacco leaves infiltrated with a mixture of *Agrobacterium* suspensions harbouring the indicated constructs (CK2 β 1-GFP, Δ NCK2 β 1-GFP) and the gene silencing suppressor HcPro. In upper panel right, a confocal image of nuclear DAPI staining of cells transformed with CK2 β 1-GFP is shown (60 \times). General views (40 \times) of control cells infiltrated with GFP alone and HcPro are shown in the bottom of the panels. (B) Detail of fluorescent nucleus (60 \times) of onion cells transformed with CK2 β 1-GFP and Δ NCK2 β 1-GFP by particle bombardment. General views of onion cells (40 \times) transformed with GFP alone are shown on the right. In all cases epifluorescence and bright-field images (merged with epifluorescence) are shown.

(TIF)

Figure S5 Immunodetection of CK2 β 1-GFP protein and Δ NCK2 β 1-GFP protein in transformed *N. benthamiana* leaves using anti-GFP antibody. (A) Control and Cycloheximide treatment (CHX, 50 μ M). Aliquots have taken at different times (30', 1 h, 2 h and 4 h) (B) Control, Cycloheximide treatment (CHX, 50 μ M) and proteasome inhibitor MG132 (100 μ M). Aliquots have taken at different times (4 h and 8 h). In all analysis, 30 μ g of total extracts has been loaded. The hybridization against Rubisco protein is shown as loading control.

(TIF)

Figure S4 Subcellular localization of CK2 β 1-GFP and Δ NCK2 β 1-GFP in *Agrobacterium*-infiltrated tobacco leaves and onion cells. (A) Upper and middle panels show detail of fluorescent nucleus (60 \times) of cells from tobacco leaves infiltrated with a mixture of *Agrobacterium* suspensions harbouring the indicated constructs (CK2 β 1-GFP, Δ NCK2 β 1-GFP) and the gene silencing suppressor HcPro. In upper panel right, a confocal image of nuclear DAPI staining of cells transformed with CK2 β 1-GFP is shown (60 \times). General views (40 \times) of control cells infiltrated with GFP alone and HcPro are shown in the bottom of the panels. (B) Detail of fluorescent nucleus (60 \times) of onion cells transformed with CK2 β 1-GFP and Δ NCK2 β 1-GFP by particle bombardment. General views of onion cells (40 \times) transformed with GFP alone are shown on the right. In all cases epifluorescence and bright-field images (merged with epifluorescence) are shown.

(TIF)

Figure S5 Immunodetection of CK2 β 1-GFP protein and Δ NCK2 β 1-GFP protein in transformed *N. benthamiana* leaves using anti-GFP antibody. (A) Control and Cycloheximide treatment (CHX, 50 μ M). Aliquots have taken at different times (30', 1 h, 2 h and 4 h) (B) Control, Cycloheximide treatment (CHX, 50 μ M) and proteasome inhibitor MG132 (100 μ M). Aliquots have taken at different times (4 h and 8 h). In all analysis, 30 μ g of total extracts has been loaded. The hybridization against Rubisco protein is shown as loading control.

(TIF)

Figure S5 Immunodetection of CK2 β 1-GFP protein and Δ NCK2 β 1-GFP protein in transformed *N. benthamiana* leaves using anti-GFP antibody. (A) Control and Cycloheximide treatment (CHX, 50 μ M). Aliquots have taken at different times (30', 1 h, 2 h and 4 h) (B) Control, Cycloheximide treatment (CHX, 50 μ M) and proteasome inhibitor MG132 (100 μ M). Aliquots have taken at different times (4 h and 8 h). In all analysis, 30 μ g of total extracts has been loaded. The hybridization against Rubisco protein is shown as loading control.

Figure S5 Immunodetection of CK2 β 1-GFP protein and Δ NCK2 β 1-GFP protein in transformed *N. benthamiana* leaves using anti-GFP antibody. (A) Control and Cycloheximide treatment (CHX, 50 μ M). Aliquots have taken at different times (30', 1 h, 2 h and 4 h) (B) Control, Cycloheximide treatment (CHX, 50 μ M) and proteasome inhibitor MG132 (100 μ M). Aliquots have taken at different times (4 h and 8 h). In all analysis, 30 μ g of total extracts has been loaded. The hybridization against Rubisco protein is shown as loading control.

(TIF)

Figure S5 Immunodetection of CK2 β 1-GFP protein and Δ NCK2 β 1-GFP protein in transformed *N. benthamiana* leaves using anti-GFP antibody. (A) Control and Cycloheximide treatment (CHX, 50 μ M). Aliquots have taken at different times (30', 1 h, 2 h and 4 h) (B) Control, Cycloheximide treatment (CHX, 50 μ M) and proteasome inhibitor MG132 (100 μ M). Aliquots have taken at different times (4 h and 8 h). In all analysis, 30 μ g of total extracts has been loaded. The hybridization against Rubisco protein is shown as loading control.

(TIF)

Acknowledgments

We thank Dr A. Ferrando for kindly providing the BiFC GATEWAY-modified vectors before publication, Dr. J. López-Moya for p35S::HcPro, M.Capellades for help in maize embryo bombardment and Imma Perez-Salamó for help in two-hybrid experiments.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MR MP. Performed the experiments: MR SI ICV-B LC-P. Analyzed the data: MR SI ICV-B LC-P. Contributed reagents/materials/analysis tools: MR SI ICV-B LC-P. Wrote the paper: MR VL LC-P MP.

References

- Meggio F, Pinna LA (2003) One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J* 17: 349–368.
- Litchfield DW (2003) Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J* 369: 1–15.
- Meggio F, Boldyreff B, Marin O, Pinna LA, Issinger OG (1992) Role of β subunit of casein kinase-2 on the stability and specificity of the recombinant reconstituted holoenzyme. *Eur J Biochem* 204: 293–297.
- Bibby AC, Litchfield DW (2005) The multiple personalities of the regulatory subunit of protein kinase CK2: CK2 dependent and CK2 independent roles reveal a secret identity for CK2 β . *Int J Biol Sci* 1: 67–79.
- Bolanos-Garcia VM, Fernandez-Rocio J, Allende JE, Blundell TL (2006) Identifying interaction motifs in CK2 β -a ubiquitous kinase regulatory subunit. *Trends Biochem Sci* 31: 654–661.
- Niefind K, Guerra B, Ermakova I, Issinger OG (2001) Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J* 20: 5320–5331.
- Faust M, Montenarh M (2000) Subcellular localization of protein kinase CK2. *Cell Tissue Res* 301: 329–340.
- Filhol O, Nueda A, Martel V, Gerber-Scockaert D, Benitez MJ, et al. (2003) Live-cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual subunits. *Mol Cell Biol* 23: 975–987.
- Lee Y, Lloyd AM, Roux SJ (1999) Antisense expression of the CK2 alpha-subunit gene in Arabidopsis. Effects on light-regulated gene expression and plant growth. *Plant Physiol* 119: 989–1000.
- Sugano S, Andronis C, Ong MS, Green RM, Tobin EM (1999) The protein kinase CK2 is involved in regulation of circadian rhythms in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 12362–12366.
- Portolés S, Más P (2007) Altered oscillator function affects clock resonance and is responsible for the reduced day-length sensitivity of CKB4. *Plant J* 51: 966–977.
- Espunya MC, Combettes B, Dot J, Chaubet-Gigot N, Martinez MC (1999) Cell-cycle modulation of CK2 activity in tobacco BY-2 cells. *Plant J* 19: 655–666.
- Moreno-Romero J, Espunya MC, Platara M, Ariño J, Martinez MC (2008) A role for protein kinase CK2 in plant development: evidence obtained using a dominant-negative mutant. *Plant J* 55: 118–130.
- Hidalgo P, Carretón V, Berrios CG, Ojeda H, Jordana X, et al. (2001) Nuclear Casein Kinase 2 Activity Is Involved in Early Events of Transcriptional Activation Induced by Salicylic Acid in Tobacco. *Plant Physiol* 125: 396–405.
- Riera M, Figueras M, López C, Goday A, Pagès M (2004) Protein kinase CK2 modulates developmental functions of the abscisic acid responsive protein Rab17 from maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 9879–9884.
- Salinas P, Fuentes D, Vidal E, Jordana X, Echeverria M, et al. (2006) An extensive survey of CK2 alpha and beta subunits in *Arabidopsis*: multiple isoforms exhibit differential subcellular localization. *Plant Cell Physiol* 47: 1295–1308.
- Dennis MD, Browning KS (2009) Differential Phosphorylation of Plant Translation Initiation Factors by Arabidopsis thaliana CK2 Holoenzymes. *J Biol Chem* 284: 20602–20614.
- Dobrowolska K, Boldyreff B, Issinger OG (1991) Cloning and sequencing of the casein kinase 2 α subunit from *Zea mays*. *Biochem Biophys Acta* 1129: 139–140.
- Peracchia G, Jensen AB, Culiñán-Maciá FA, Grosset J, Goday A, et al. (1999) Characterization, subcellular localization and nuclear targeting of casein kinase II from *Zea mays*. *Plant Mol Biol* 40: 199–211.
- Riera M, Peracchia G, de Nadal E, Ariño J, Pagès M (2001) Maize protein kinase CK2: Regulation and functionality of three β regulatory subunits. *Plant J* 25: 365–374.
- Niefind K, Guerra B, Pinna LA, Issinger OG, Schomburg D (1998) : Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays* at 2.1 Å resolution. *EMBO J* 17: 2451–2462.
- Niefind K, Raaf J, Issinger OG (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: Protein kinase CK2: from structures to insights. *Cell Mol Life Sci* 66: 1800–1816.
- Riera M, Pagès M, Issinger OG, Guerra B (2003) Purification and characterization of recombinant protein kinase CK2 from *Zea mays* expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 29: 24–32.
- Riera M, Peracchia G, Pagès M (2001) Distinctive features of plant protein kinase CK2. *Mol Cell Biochem* 227: 119–127.
- Krogh A, Brown M, Mian IS, Sjölander K, Haussler D (1994) Hidden Markov models in computational biology. Applications to protein modeling. *J Mol Biol* 235: 1501–1531.
- Abascal F, Zardoya R, Posada Dv (2005) ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21: 2104–2105.
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* 8: 275–282.
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52: 696–704.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, et al. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59: 307–321.
- Graham KC, Litchfield DW (2000) The regulatory beta subunit of protein kinase CK2 mediates formation of tetrameric CK2 complexes. *J Biol Chem* 275: 5003–5010.
- Bracha-Drori K, Shichrur K, Katz A, Oliva M, Angelovici R, et al. (2004) Detection of protein–protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* 40: 419–427.
- Walter M, Chaban C, Schütze K, Batistic O, Weckermann K, et al. (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* 40: 428–438.
- Yoon HS, Hackett JD, Ciniglia C, Pinto G, Bhattacharya D (2004) A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol Biol Evol* 21: 809–818.
- Pyerin W, Ackermann K (2003) The genes encoding human protein kinase CK2 and their functional links. *Progr Nuclear Acid Res Mol Biol* 74: 239–273.
- Litchfield DW, Lozeman FJ, Cicirelli MF, Harrylock M, Ericsson LH, et al. (1991) Phosphorylation of the beta subunit of casein kinase II in human A431 cells. Identification of the autophosphorylation site and a site phosphorylated by p34cdc2. *J Biol Chem* 266: 20380–20389.
- Holland Z, Prudent R, Reiser J-B, Cochet C, Doerig C (2009) Functional analysis of protein kinase CK2 of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic Cell* 8: 388–397.
- Lebska M, Szczegielniak J, Dobrowolska G, Cozza G, Moro S, et al. (2009) A novel splicing variant encoding putative catalytic alpha subunit encoding putative catalytic alpha subunit of maize protein kinase CK2. *Physiol Plant* 136: 251–263.
- Sano M, Tokudome S, Shimizu N, Yoshikawa N, Ogawa C, et al. (2007) Intramolecular control of protein stability, subnuclear compartmentalization, and coactivator function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha. *J Biol Chem* 282: 25970–25980.
- Lassot I, Estrabaud E, Emiliani S, Benkirane M, Benarous R, et al. (2005) p300 modulates ATF4 stability and transcriptional activity independently of its acetyltransferase domain. *J Biol Chem* 280: 41537–41545.
- Perales M, Portolés S, Más P (2006) The proteasome-dependent degradation of CKB4 is regulated by the Arabidopsis biological clock. *Plant J* 46: 849–860.
- Lüscher B, Litchfield DW (1994) Biosynthesis of casein kinase II in lymphoid cell lines. *Eur J Biochem* 220: 21–26.
- Rodríguez FA, Contreras C, Bolanos-Garcia V, Allende JE (2008) Protein kinase CK2 as an ectokinase: the role of the regulatory CK2 β subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 5693–5698.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.
- Durbin R, Eddy SR, Krogh A, Mitchison G (1998) Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876–4882.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32: 1792–1797.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596–1599.
- Bailey TL, Williams N, Misleh C, Li WW (2006) MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res* 34: 369–373.
- Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Bateman A, Birney E, et al. (2001) The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Nucleic Acids Res* 29: 37–40.
- Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4: 1633–1649.
- Birney E, Clamp M, Durbin R (2004) GeneWise and Genomewise. *Genome Res* 14: 988–995.
- Ferrando A, Farràs R, Jásik J, Schell J, Koncz C (2000) Intron-tagged epitope: a tool for facile detection and purification of proteins expressed in Agrobacterium-transformed plant cells. *Plant J* 22: 553–560.

9

Specific Features of Plant CK2

MARTA RIERA, ISABEL CRISTINA VÉLEZ-BERMÚDEZ,
TOMMASO LEGNAIOLI, AND MONTSERRAT PAGÈS

ABSTRACT

Plant CK2 is a pleiotropic enzyme involved in multiple processes related to plant growth and development. In this chapter, we summarize data available on plant CK2 enzymes, in order to clarify the distinctive features and functions of plant protein kinase CK2. Thus, specific characteristics of plant CK2 catalytic, regulatory subunits, and holoenzymes as well as functional aspects and physiological roles of plant CK2 are detailed.

INTRODUCTION

Protein kinase CK2 is an evolutionary conserved enzyme present in all eukaryotes (Litchfield, 2003). The existence of plant CK2-like activity was first described in wheat germ in the 1980s (Yan and Tao, 1982). Monomeric forms (CK2 α catalytic subunits alone) and oligomeric forms (presumably tetrameric, according to its molecular size) with CK2-like activity were isolated from different plant sources such as maize (Dobrowolska et al., 1989; Dobrowolska et al., 1991), pea (Datta and Cashmore, 1989), or broccoli (Klimczak et al., 1992); however, the presence of CK2 β regulatory subunits in plant holoenzymes was not clear until 1994, when the CK2 β subunits were isolated in *Arabidopsis* by yeast complementation (Collinge and Walker, 1994). In the case of maize, CK2 β subunits were isolated in 2001 (Riera et al., 2001a), confirming that, also in plants, CK2 holoenzyme is a heterotetrameric complex composed of two catalytic (CK2 α) and two regulatory (CK2 β) subunits. The plant CK2 holoenzymes share with their mammalian counterparts the main biochemical properties, since they are constitutively active, independent of second messengers, they can use both ATP and GTP as phosphate donors, and present specificity for acidic substrates. Plant CK2 is a pleiotropic enzyme involved in relevant processes such as plant growth and development, light-regulated gene expression, circadian rhythm, cell-cycle regulation, or responses to biotic and abiotic

stress, among others (Riera et al., 2001b). However, plant CK2 presents specific features that will be discussed in this chapter.

CK2 α CATALYTIC SUBUNITS

The CK2 α catalytic subunits are highly conserved among eukaryotic organisms. In Figure 9.1, the alignment between the four maize CK2 α catalytic subunits and human CK2 α/α' shows a high degree of identity. The following are present in plant CK2 α : characteristic CK2 α domains as the Glycine loop, responsible for ATP binding; the Lysine-rich cluster, involved in downregulation of the enzyme and nuclear targeting; and the catalytic loop and the activation segment.

Striking differences between animal and plant CK2 α are located in N-terminal and C-terminal domains. In the N-terminal region of some plant CK2 α sequences, it has been described as the presence of chloroplast transit peptide (cTP). Chloroplastic CK2 α (cpCK2 α) isoforms were first described in mustard and Arabidopsis (Ogrzewalla et al., 2002; Loschelder et al., 2004; Salinas et al., 2006). Using prediction programs such as ChloroP or PSORT (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>, www.psорт.org) these types of isoforms (containing the transit peptide cTP) have been found in most higher plants (Turkeri et al., 2012). As summarized in Table 9.1, no chloroplast CK2 α isoforms have been found in genomes of lower plants (moss and algae) that have been analyzed. Recent phylogenetic analysis suggests that regulation through cpCK2 isoforms in plants appeared later in evolution (Turkeri et al., 2012). The chloroplast phosphoproteome recently published reveals that cpCK2 is a central regulator of different chloroplast functions, such as the control of the cross talk between chloroplast gene expression and general metabolism and the maintenance of chloroplast transcription apparatus (Reiland et al., 2009). As shown in Table 9.2, several chloroplastic proteins involved in transcriptional and post-transcriptional regulation have been described as cpCK2 substrates, such as sigma factors AtSIG1,6 (Schweer et al., 2010a; Schweer et al., 2010b); preprotein receptor Toc159 (Agne et al., 2010); transcriptionally active chromosome subunits (TAC) TAC16, TAC10, and TAC5 (Reiland et al., 2009) as well as RNA-binding proteins RNP29 and RNP33, 28RNP or p34, which phosphorylation has been implicated in the stabilization of plastid mRNAs (Kanekatsu et al., 1993; Kanekatsu et al., 1995; Lisitsky and Schuster 1995; Reiland et al., 2009). Furthermore, chloroplastic metabolic enzymes such as carbonic anhydrase and ATP synthase or maize photosystem II subunit CP29 are also *in vitro* phosphorylated by CK2 (Testi et al., 1996; Kanekatsu et al., 1998;

Figure 9.1. Protein sequence alignment of catalytic CK2 α subunits from Zea Mays. Maize CK2 α subunits ZmCK2 α 2 (GRMZM2G047855); ZmCK2 α 4 (GRMZM2G141903); ZmCK2 α 1 (GRMZM2G143602) and ZmCK2 α 3 (GRMZM5G845755) were aligned with CK2 α (4503095) CK2 α' (4503097) subunits from *Homo sapiens*. ZmCK2 α 2 (GRMZM2G047855); ZmCK2 α 4 (GRMZM2G141903) present a chloroplast transit peptide (cTP) in their N-terminal domain. The N-terminal region and functional domains conserved in these proteins are underlined. Invariant residues are indicated by *, similar residues by :, and semi-conservative changes by .

Table 9.1. Summary of Number of CK2 α / β Genes Found in 28 Plant Species. cTP, Chloroplastic Transit Peptide.

Species Name	Family	Clade/ Lineage	CK2 α genes	cpCK2 α genes	CK2 β genes
<i>Cyanidioschyzon merolae 10D</i>	Cyanidiaceae	red algae	1	0	1
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Chlamydomonadaceae	green algae	2	0	1
<i>Chlorella variabilis NC64A</i>	Chlorellaceae	green algae	1	0	1
<i>Chlorella vulgaris C-169</i>	Chlorellaceae	green algae	1	0	1
<i>Micromonas sp. RCC299</i>	Mamiellaceae	green algae	1	0	1
<i>Micromonas pusilla CCMP1545</i>	Mamiellaceae	green algae	1	0	1
<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	Mamiellaceae	green algae	1	0	1
<i>Ostreococcus tauri</i>	Mamiellaceae	green algae	1	0	1
<i>Selaginella moellendorffii</i>	Selaginellaceae	spike moss	1	0	3
<i>Physcomitrella patens</i>	Funariaceae	moss	4	0	4
<i>Picea sitchensis</i>	Pinaceae	Gymnosperms	2	1	2
<i>Solanum lycopersicum</i>	Solanaceae	dicot (Asterids)	3	1	5
<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	dicot (Rosids)	3	1	2
<i>Cucumis sativus</i>	Cucurbitaceae	dicot (Rosids)	3	2	2
<i>Populus trichocarpa</i>	Salicaceae	dicot (Rosids)	4	3	4
<i>Ricinus communis</i>	Euphorbiaceae	dicot (Rosids)	2	1	2
<i>Manihot esculenta</i>	Euphorbiaceae	dicot (Rosids)	4	2	10
<i>Malus x domestica</i>	Rosaceae	dicot (Rosids)	5	2	11
<i>Fragaria vesca</i>	Rosaceae	dicot (Rosids)	3	3	3
<i>Medicago truncatula</i>	Fabaceae	dicot (Rosids)	2	1	1
<i>Glycine max</i>	Fabaceae	dicot (Rosids)	6	2	6
<i>Carica papaya L.</i>	Caricaceae	dicot (Rosids)	3	2	2
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	dicot (Rosids)	4	1	4
<i>Arabidopsis lyrata</i>	Brassicaceae	dicot (Rosids)	4	1	5
<i>Oryza sativa ssp. japonica</i>	Poaceae	monocot	3	1	2
<i>Brachypodium distachyon</i>	Poaceae	monocot	4	2	4
<i>Zea mays</i>	Poaceae	monocot	4	2	4
<i>Sorghum bicolor</i>	Poaceae	monocot	2	1	3

Table 9.2. List of Plant CK2 Substrates.

Name	Type	Specie	Role	Reference
<i>Light-signal transduction pathway and circadian clock</i>				
AT-1	DNA binding factor	Pea	Binds to AT1-box elements in light regulated promoters	Datta and Cashmore, 1989
ATBP-1	DNA binding factor	Pea	Binds to AT1-box elements in light regulated promoters	Tjaden and Coruzzi, 1994
GBF1	bZIP TF	Arabidopsis	Binds to G-box elements in light regulated promoters	Klimeczak et al., 1995
Opaque2	bZIP TF	Maize	Circadian clock regulated	Ciceri et al., 1997
CCA1	Myb-related TF	Arabidopsis	Circadian clock regulator	Sugano et al., 1998
LHY, OsLHY	Myb-related TF	Arabidopsis, Rice	Circadian clock regulator	Sugano et al., 1998; Ogiso et al., 2010
HY5	bZIP TF	Arabidopsis	Promotes photomorphogenesis	Hardtke et al., 2000
HFR1	bHLH TF	Arabidopsis	Promotes photomorphogenesis	Park et al., 2008
PIF1	Phytochrome interacting factor	Arabidopsis	Repress photomorphogenesis	Bu et al., 2011
<i>Abiotic and biotic stress</i>				
Rab17,ERD14, TAS-14	LEA proteins	Maize, Arabidopsis, tomato,wheat	Stress responsive proteins	Plana et al.,1991; Alsheikh et al.,2003; Godoy et al., 1994
TsDHN1,2	Dehydrins	<i>Theilungiaella salsuginea</i>	Stress responsive proteins	Rahman et al., 2011
EmBP-2/ZmBZ-1	bZIP TF	Maize	Activate transcription of the abscisic acid-inducible gene rab28	Nieva et al., 2005
TGA2	bZIP TF	Arabidopsis	Binds to promoter of salicylic-induced genes	Kang and Klessig, 2005
p23	co-chaperone protein	Arabidopsis	Plant response to Salicylic acid	Tosomi et al., 2011
PCS	phytochelatin synthase	Arabidopsis	Synthesis of heavy metal-binding peptides	Wang et al., 2009

Continued

Table 9.2. (Continued)

Name	Type	Specie	Role	Reference
Chromatin associated and nuclear proteins				
lamina-like protein	lamina matrix protein	Pea	Nuclear stability, chromatin organization	Li and Roux, 1992
MFPI	coil-coil protein	Tomato	Structural roles in nuclear matrix and chloroplast	Meier et al., 1996; Samanigo et al., 2006
NopA64/nopA61	nucleolin-like phosphoproteins	<i>Allium cepa</i>	Located in nucleolus	de Carcer et al., 1997
P-proteins	Ribosomal proteins	<i>Allium cepa</i> Maize	Complex with 60S ribosomal subunits	Bailey-Serres, et al., 1997
DNA helicase I	DNA helicase I	Pea	DNA transcription	Tuteja et al., 2003
DNA topoisomerase I	DNA topoisomerase I	Pea	DNA transcription	Tuteja et al., 2003
HMGB proteins	High mobility group B proteins	Maize, Arabidopsis	Chromatin associated proteins	Stemmer et al., 2002
SSRP1	structure-specific recognition protein	Maize	Chromatin associated proteins	Krohn et al., 2003
eIF2ab/3c/4b/5	elongation initiation factors	Arabidopsis, maize, wheat	Translation initiation	Dennis and Browning, 2009
Histone deacetylase 2B	Histone deacetylase	Arabidopsis	Chromatin remodeling enzyme	Dennis and Browning, 2009

Chloroplast machinery

Chloroplast RNPs/28RNP/p34/ RNP29,33	Ribonucleoproteins	Spinach Arabidopsis	RNA binding proteins involved in chloroplast RNA processing and stabilization	Kanekatsu et al., 1993; Kanekatsu et al., 1995; Lisitsky et al., 1995; Reiland et al., 2009
CP29 TOC159	photosystem II subunit preprotein receptor	Maize Arabidopsis	Light harvesting complex Import	Testi et al., 1996 Agne et al., 2010
SIG1/SIG6	plastid sigma factors	Arabidopsis	Nuclear-encoded chloroplast preproteins from the cytosol Gene-regulatory proteins for promoter binding and transcription initiation	Schweer et al., 2010
Others				
CFOCF1-ATPase	Chloroplast ATP synthase (b subunit)	Spinach	ATP synthesis	Kanekatsu et al., 1998
C2	subunit of the 20S proteasome	Rice	Protein degradation of ubiquitinated proteins	Umeda et al., 1997
gp100/gp96	Glycyrrhizin (GL)-Binding Protein (gp100)	Soybean	Lipoxygenase that catalyzes the oxygenation of unsaturated fatty acids	Otsuki et al., 1994; Otsuki et al., 1995
β -Conglycinin α Subunit calreticulin apyrase	β -Conglycinin α Subunit calreticulin apyrase	Soybean Spinach Pea	Storage protein Ca ²⁺ binding protein ATP hydrolisis	Ralet et al., 1999 Baldan et al., 1996 Hsieh et al., 2000

Reiland et al., 2009). The cpCK2 α isoforms present biochemical properties similar to nuclear CK2 (Salinas et al., 2006; Schweer et al., 2010b; Turkeri et al., 2012). Until now, the presence of CK2 β subunits has not been described in chloroplast; however, the catalytic activity of Arabidopsis cpCK2 α is enhanced in the presence of exogenous CK2 β suggesting that cpCK2 α could be somehow modulated by CK2 β regulatory subunits (Salinas et al., 2006).

As the case of human CK2 α' , which is 40 amino acids shorter than human CK2 α , plant CK2 α present a C-terminal region shorter than mammalian CK2 (Figure 9.1). This specific characteristic of plant CK2 α subunits gives them higher stability and more specific activity than animal CK2 α subunits and was one of the main reasons why maize CK2 α 1 was the first CK2 α catalytic subunit crystallized (Niefind et al., 1998). Since then, most of the CK2 α structures are based on the enzyme from *Zea mays*, and the structure of maize CK2 α (zmCK2 α) in complex with the ATP-analogue adenosine 5'-(β , γ -imido)-triphosphate (AMPPNP) and two magnesium ions has been described as a functional reference structure (Niefind et al., 2009). However, it has to be noticed that even though there is a degree of identity of more than 77% between maize and human CK2, significant differences have been found between both structures suggesting that plant enzymes can behave differently in terms of regulation (Battistutta and Lolli, 2011).

For maize CK2 α -1 gene, an alternative splicing isoform (named CK2 α -4) has been described and reported that could act as a specific negative regulator of CK2 activity (Lebska, 2009). In addition, other plant databases, such as those of Arabidopsis and maize (<http://www.arabidopsis.org>, <http://maizesequence.org>), predict alternative splicing variants for both CK2 α / β subunits suggesting that this regulatory mechanism could be involved in CK2 gene regulation in plants.

CK2 β REGULATORY SUBUNITS

As in the case of animals, plant CK2 β subunits present three main properties: they are inactive by themselves but can stimulate CK2 α catalytic activity, they confer stability to the enzyme, and they provide specificity for the interaction with substrates and inhibitors. However, as shown in Figure 9.2, the level of identity between the plant and human CK2 β regulatory subunits is not as high as in the case of CK2 α .

Despite the elucidation of the human CK2 β subunit, holoenzyme and maize CK2 α structure (Niefind et al., 1998, 2001; Chantalat et al., 1999), no data exist about CK2 β or holoenzyme structure in plants. The human CK2 β subunit is a compact globular homodimer organized in seven α -helices and three β -sheets (Chantalat et al., 1999). The tertiary structure predicted for the central core of maize CK2 β 1 (82–276) almost overlaps with the human CK2 β structure (1–197), indicating that, as in the case of catalytic subunits, plant and human CK2 β are structurally related (Veléz-Bermudez et al., 2011). All plant CK2 β subunits preserve in their central core the characteristic CK2 β feature, the zinc finger region that contains four conserved Cysteine residues involved in CK2 β dimerization. But, as for the catalytic subunits, there are distinctive features in plant CK2 β located in the N-terminal region, in the acidic loop, and in the C-terminal domain. The CK2 β subunits present

```

GRMZM2G098208 -----MDRKRIKDALEKHLER--SSPSTSRGVVS--K 28
GRMZM2G148216 MNRGRETGGNLRESGLFSGCDGDDGAG-MDRKRIKDVLEKHLER--SSPSTSRGVVS--K 55
GRMZM2G161611 -----MYKQGGAGGGAG-LDRKRINDALDKHLEKAVASPSTSRGSAGGGR 44
GRMZM5G857992 -----MHRDRGVSAAAIIPGDRKRIGEPMD----R--SSPSTSWGFSGG-R 38
23503295 -----

```

N-terminal region

```

GRMZM2G098208 ERERLAAGK---LPSSLGKAE-VSDGEE--FETDSED--SDVSGSEGEDTSWISWFCTLR 80
GRMZM2G148216 ERERLAAGK---LPASLGKAEKVSDGEE--FETDSEDESDISGSESEGTSWISWFCTLR 110
GRMZM2G161611 DHRLVVPVPS--SVSSIPKGR-CSEGE----SDSDSEASDVSGSDGEDTSWISWYCNLR 95
GRMZM5G857992 EKERIGVGKQPEMPRSGGGSTAMSKKLSDAESETDSESDVSGSDGEDTSWISWFCSLK 98
23503295 -----MSSSEEVSWISWFCGLR 17

```

```

GRMZM2G098208 GNEFFCEIDDDYIQDDFNLCGLSNQVPYYDYALDLILDIESSNDGFTEEQNELIESSAE 140
GRMZM2G148216 GNEFFCEIDDDYIQDDFNLCGLSMQVPYYDYALDLILDIESS--DDTYTEERKEFIELSAE 169
GRMZM2G161611 GNEFFCEVDDDYIQDDFNLCGLSSQVPYYDYALDLILDIESSHGDMFTEEQNELVESAAE 155
GRMZM5G857992 GNEFFCEVDDDYIQDDFNLCGLSNQVPYYDYALDLILDVESSHGDMLTEEQNELIESAAE 158
23503295 GNEFFCEVDEDDYIQDKFNLTGLNEQVPHYRQALDMILDLEPDEELDNPNQSDLIEQAAE 77

```

```

*****.:*****.** ** ** ** * ** ** ** **
          KEN box      D-box      Acidic stretch

```

```

GRMZM2G098208 MLYGLIHARYILTSKGLAAMLEKFKNYDFGRCPRVYCCGQPCLPAGQSDVPRSSTVKIYC 200
GRMZM2G148216 ILYGLIHARYILTSKGLAAMLEKFKNRDFGGCPRVYCCGQPCLPAGQSDVPRSSTVKIYC 229
GRMZM2G161611 MLYGLIHARYILTSKGLAAMLEKYKNYDFGRCPRVYCCGQPCLPVGQSDIHRSSTVKIYC 215
GRMZM5G857992 MLYGLIHVRYIITSKGLSAMLKRYRNVDFGRCPRVNCSGQPLPVGQSDVPRSSTVKIYC 218
23503295 MLYGLIHARYILTNRGIAQMLEKYQGGDFGYCPRVYCENQMLPIGLSDIPGAMVKLYC 137

```

```

:*****.:*****.:** ** ** ** **
          Zinc finger domain

```

```

GRMZM2G098208 PKCEELNYPRSKYQGNIDGSYFGTTFPHLFLMTYSHLKPQKPSQQYTPRVVFGFKLHKPS- 259
GRMZM2G148216 PKCEELNYPISMYQGSIDGSYFGTTFPHLFLMTYPHLKPQKPPQQYTPRVVFGFKHHKPS- 288
GRMZM2G161611 PKCEDIYYPRSKYQGNIDGAYFGTTFPHLFLMTYEHLKPQKLSQRYVPRVVFGFKLHKP-- 273
GRMZM5G857992 PRCEDIYTPRSKYLSNIDGYFGTTFPHLFLMTYPHLKPQKPLQYVPRVVFGFKIRKP-- 276
23503295 PKCMDVYTPKSSRHHHTDGAYFGTGFPHLMFMVHPEYRKPRANQFVPRLYGFKIHPMAY 197

```

```

*: * : * * ** ** ** ** * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :
          Positive regulatory region

```

```

GRMZM2G098208 -----
GRMZM2G148216 -----
GRMZM2G161611 -----
GRMZM5G857992 -----
23503295 QLQLQAASNFKSPVKTIR 215

```

===

Figure 9.2. Protein sequence alignment of regulatory CK2 β subunits from *Zea Mays*. Maize CK2 β subunits ZmCK2 β 2, (GRMZM2G098208); ZmCK2 β 4 (GRMZM2G148216); ZmCK2 β 3 (GRMZM2G161611); and ZmCK2 β 1 (GRMZM5G857992) were aligned with the CK2 β subunit from *Homo sapiens* (23503295). The plant specific N-terminal region and the characteristic CK2 β domains are underlined. Unchanged residues are indicated by *, similar residues by :, and semi-conservative changes by .

a specific N-terminal extension of about ninety amino acids that share no homology with any previously characterized functional domain. Most of the animal CK2 β subunits are autophosphorylated only at two highly conserved residues, Ser² and Ser³ (Litchfield et al., 1991). The functional significance of this autophosphorylation is still unknown, but it appears that it may enhance CK2 β stability (Zhang et al., 2002). The N-terminal region of plant CK2 β subunits present additional putative autophosphorylation sites. For instance, maize CK2 β 1 has five additional Serine residues in this domain that are highly phosphorylated by CK2 α 1 *in vitro*. It was recently demonstrated that the presence of plant-specific N-terminal domain in plant CK2 β subunits affects their CK2 activity, since this region competes with the substrate for phosphorylation and can be described as a downregulator of the CK2 α activity (Riera et al., 2011).

Another characteristic of plant CK2 β subunits is that the acidic loop region is poorly conserved in plant sequences (Figure 9.2). In human CK2 β subunits, the acidic loop region (residues 55–64) has been described as a regulatory region since it contains the binding domain for polyamines (Meggio et al., 1994). In maize, for example, the amino acid composition of CK2 β 1 acidic loop differs from that of human CK2 β (Vélez-Bermúdez et al., 2011). There are only 3 acidic residues of 10, and 2 of them are in the same position (136 DVESSHGDML 145). The maize acidic loop presents high heterogeneity since contains different types of residues: basic (as His), nonpolar (as Val, Gly, Leu, and Met), and polar (Ser). In animals, it has been shown that mutations in residues in the acidic loop region affect the CK2 activity (Leroy et al., 1997); therefore, it is likely that the differences found in this region could also affect plant enzyme regulation.

The C-terminal domain of animals CK2 β is only partially present in plant CK2 β (see alignment in Figure 9.2). The crystal structure of human holoenzyme demonstrated that this region is involved in interaction with the catalytic subunits (Niefind et al., 2001). This may imply that in plants the interaction between CK2 α / β subunits is weaker than in the case of CK2 human holoenzyme, probably affecting the biochemical properties of plant CK2, as demonstrated by comparative studies between maize and human CK2 holoenzymes, in which maize holoenzyme is less stable than the human counterpart (Riera et al., 2003). The C-terminal region of human CK2 β also mediates the association with other kinases such as A-Raf, c-Mos, or the checkpoint kinase Chk1 (Boldyreff and Issinger, 1997; Chen et al., 1997; Guerra et al., 2003) and also this C-terminal region is phosphorylated by p34^{cdc2} (Litchfield et al., 1991). However, in plants, no interaction among CK2 β and other kinases neither CK2 phosphorylation by other kinases has been described so far.

CK2 HOLOENZYME

It is noteworthy that both plant CK2 α / β subunits belong to multigenic families with high variability of members (Table 9.1).

The multiplicity of CK2 α / β genes can be explained in most cases by gene duplication common in plants (Blanc et al., 2000), and the presence of pseudogenes cannot be excluded. For instance, in Arabidopsis, the genes coding for CK2 α subunits αA At5g67380 and αB At3g50000 and the four genes encoding for CK2 β

subunits ($\beta 1$ to $\beta 4$) are located in duplicated regions of the genome, suggesting that they were generated by duplication events (Salinas et al., 2006). There is a high variability in the number of CK2 genes between the species, for instance, unicellular algae species showed from 1 to 3 CK2 α genes and a single CK2 β gene, while land plants commonly showed three to five CK2 α/β genes. Thus, it could be a possibility that evolutionary expansion of the CK2 α/β gene family is related to the acquisition of multicellularity. In the case of CK2 β subunits, phylogenetic analysis demonstrates the early diverging evolution of CK2 β from plants and the exon/intron structure analysis of genomic sequences encoding for the CK2 β suggests that their plant-specific N-terminal domain was acquired in plants, as a single exon, for regulatory purposes, particularly in terms of regulation of holoenzyme activity and stabilization (Riera et al., 2011).

It has been clearly demonstrated for the mammalian CK2 enzyme that the CK2 tetramer is not a stable complex but a dynamic, transient heterocomplex that can be subject to disassembly and reassembly being possible to find both individual subunits alone as tetrameric forms in different cell compartment and probably with specific functions (Niefind et al., 2001). Moreover, the identification of several CK2 β -specific interacting proteins supports the idea that both subunits might have biological functions other than those attributed to the CK2 holoenzyme (Bibby and Litchfield, 2005).

In plants, the presence of multiple CK2 α/β isoforms is unlikely to be redundant, since specific functions have been associated to each isoform. In maize, for instance, we have demonstrated that maize CK2 α/β subunits assemble into a structural tetrameric complex that has very similar properties to those described in other organisms (Graham and Litchfield, 2000), thus, while CK2 α subunits are unable to self-associate, preferential interactions between CK2 α/β and CK2 β/β isoforms exist (Riera et al., 2001a). Furthermore, experiments conducted in *Arabidopsis* also show that specific CK2 holoenzymes (composed with different isoforms) present differential substrate specificity toward several plant initiation factors (Dennis and Browning, 2009; Dennis et al., 2009).

Several authors have reported tissue-specific distribution of plant CK2 subunits. In *A. thaliana*, all CK2 α/β subunits were constitutively expressed in the tissues examined (inflorescences, stems, rosette leaves, and roots from 5-week-old plants) but with different expression levels of their transcripts and interestingly, among the four CK2 α subunits, the chloroplastic isoform (cpCK2 α) present the highest expression in all examined tissues (Salinas et al., 2006). The gene expression of CK2 subunits has also been analyzed during maize embryo development, and our results indicate that while the expression of the nuclear isoforms as CK2 $\alpha 1$ or CK2 $\alpha 3$ subunits is quite constitutive, CK2 β subunits are expressed differentially during embryo development (Riera et al., 2001a). In BY-2 tobacco cells, differences in the transcripts levels of CK2 α and CK2 β encoding genes throughout the cell cycle has been described and correlates with the cyclic changes in CK2 activity also described by the same group (Espunya et al., 1999; Espunya et al., 2005). In addition, by using *in situ* hybridization, it has been shown that the spatial and temporal pattern of expression of CK2 α/β subunits correlates with the appearance of the meristems, and high levels of transcripts are also present in differentiated tissues with high mitotic activity (Espunya and Martinez, 2003).

Differential subcellular localization for each CK2 α / β isoform has been described in maize (Riera et al., 2001a; Riera et al., 2011) and Arabidopsis (Salinas et al., 2006).

As shown in Figure 9.3, maize CK2 α 1 and CK2 α 3 isoforms present nuclear localization with high accumulation in nucleolus; whereas CK2 α 4, which contains the cTP signal, is located in chloroplasts. However, we cannot discard the possibility that small pools of CK2 α , undetectable by microscopy, may coexist in the cytoplasm. In human cells, CK2 α subunits shuttle between nucleus and cytoplasm, but they do not seem to be strongly accumulated in the nucleolus, as in the case of plants (Martel et al., 2002; Filhol et al., 2003). Concerning the CK2 β regulatory subunits, CK2 β 1,

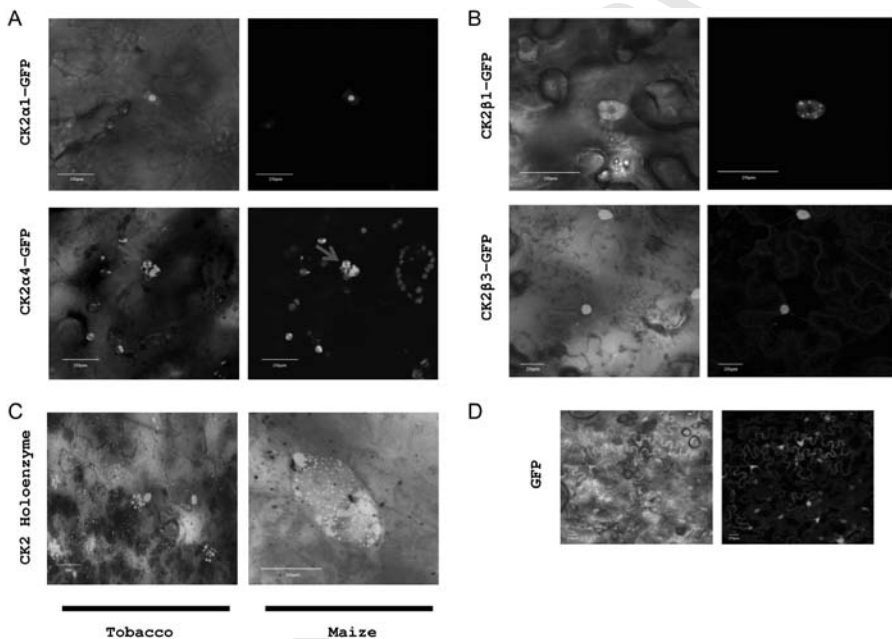


Figure 9.3. Subcellular localization of maize CK2 individual subunits and CK2 holoenzyme in leaf epidermis of *N. benthamiana* plants and in maize embryo. (A) General views (40X) of *Nicotiana benthamiana* leaves co-infiltrated with a mixture of *Agrobacterium* suspensions harboring the indicated constructs: CK2 α 1-GFP located in nucleus/nucleolus (upper), and CK2 α 4-GFP located in chloroplast (lower), together with gene silencing suppressor HcPro. (B) General views (40X) of *Nicotiana benthamiana* leaves co-infiltrated with *Agrobacterium* containing the gene silencing suppressor HcPro and CK2 β 1-GFP, located in nuclear speckles (upper), and CK2 β 3-GFP, located in nucleus and cytoplasm (lower). In panel A and B, left corresponds to bright-field images (merged with epifluorescence) and right to epifluorescence images. Red arrow points out the chloroplasts, and chlorophyll is in red. (C) General views (40X) of Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) assays in agro-infiltrated tobacco leaves (left) and maize immature embryos transformed by bombardment (right). In both cases, bright-field images (merged with epifluorescence) are shown. (D) 20X views of leaves from *N. benthamiana* plants transiently transformed by agroinfiltration with pCambia 1302 vector with GFP alone as control and HcPro. Bar = 20 μ m. For color detail, see color plate.

CK2 β 2, and CK2 β 4 are mainly located in nuclear speckles, whereas CK2 β 3 can be found in both nucleus and cytoplasm (Riera et al., 2004). In maize, it has been recently reported that the presence of plant-specific N-terminal domain of CK2 β enhances the protein aggregation in nuclear speckles, where it is assumed to be tightly complexed and less accessible to degradation machinery (Riera et al., 2011). Little is known about CK2 holoenzyme localization in plants, but recent work performed in our lab by using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays shows the nuclear and cytoplasmic location of the maize CK2 holoenzyme composed by α 1 β 1 subunits, in contrast to the individual CK2 α / β subunits localization, mainly observed in the nucleus (Figure 9.3). Thus, the differential localization of plant CK2 α / β isoforms in the cell suggests that both types of subunits could be found independently in different cellular compartments, and they probably independently move in the cell, as reported for animals (Faust and Montenarh 2000; Martel et al., 2002; Filhol et al., 2003).

Another example of the specific role of plant CK2 isoforms is found in Arabidopsis where only CK2B3 and CK2B4 isoforms have been described to play a role in circadian-clock regulation (Sugano et al., 1999; Perales et al., 2006). In addition, it has been shown that CKB4 isoform is ubiquitinated and subsequently degraded by the proteasome pathway in a process controlled by the circadian clock (Perales et al., 2006). In animals, it has been demonstrated that CK2 β subunits are degraded by a proteasome-dependent pathway and that phosphorylation enhances CK2 β protein stability (Zhang et al., 2002). In the case of Arabidopsis, the phosphorylated isoforms of CKB4 are the preferred substrate for degradation. This is a clear example of both the conserved similarities (phosphorylation, ubiquitination, and degradation) and distinctive features (stability of isoforms) between CK2 β subunits in plants and mammals.

To sum up, it is likely that in plants, regulation of the CK2 isoforms expression, degradation, and subcellular distribution could be a mechanism for regulating the substrate specificity of CK2 through the formation of different CK2 holoenzyme complexes.

PHYSIOLOGICAL ROLE OF CK2 IN PLANTS

Through the years, genetic approaches have been difficult in the case of plant CK2 as a result of the multiple genes coding for CK2 α / β subunits and also because of the evidence that yeast CK2 is essential for viability, since depletion of CK2 α is lethal for the organisms (Padmanabha et al., 1990). Several strategies have been used to partially inactivate CK2 activity in plants. The Arabidopsis CK2 α antisense plants were the first CK2 transgenic lines described, and their phenotype confirmed the role of CK2 in light-regulated gene expression and plant growth (Lee et al., 1999). Moreover, a dominant-negative for CK2 α has been described. In this case, a CK2 kinase-inactive mutant has been generated by site-directed mutagenesis of an essential Lysine residue of CK2 α . Phenotypes associated with these plants affect chloroplast development, cotyledon expansion, and root and shoot growth, as well as different aspects of plant development as cell division, cell expansion, and auxin

transport (Moreno-Romero et al., 2008; Moreno-Romero et al., 2011; Marquès-Bueno et al., 2011).

Recently, two different groups published *Arabidopsis* CK2 α 1a2a3 triple mutant, which were obtained by genetic crosses (Lu et al., 2011; Mulekar et al., 2012). These plants present significant decrease of CK2 activity and a clear phenotype of late flowering. According to Lu et al. (2011), analysis of their phenotype suggests that CK2 α subunits are involved in the regulation of the pace of the circadian clock influencing its period of oscillation. Results obtained by Mulekar et al. (2012) suggest that CK2 α subunits also affect diverse developmental and stress responsive pathways in *Arabidopsis*. On the other hand, overexpression of the regulatory subunits (such as CKB3 or CKB4) in *Arabidopsis* displays increased CK2 activity, a reduction of the subjective day length inducing alterations in clock-regulated gene expression, hypocotyl elongation, and flowering time (Sugano et al., 1999; Perales et al., 2006).

In animals, CK2 is able to phosphorylate and regulate a huge number of substrates involved in multiple processes (Meggio and Pinna, 2003). A smaller number of substrates have been found in plants (Table 9.2).

It is clear that CK2 has a prominent role in light-regulated gene expression in plants. CK2 phosphorylation regulates the DNA binding stability and activity of several light-related transcription factors. For instance, phosphorylation of the transcription factors AT-1 and ATBP-1 by CK2 inhibit their *in vitro* binding to AT-rich regions in the promoter of the light-regulated gene (Datta and Cashmore, 1989; Tjaden and Coruzzi, 1994). Another example is GBF1, an *Arabidopsis* transcription factor that binds to the light-responsive elements (G-box) of light-regulated genes such as *cab* and *rbcS*. In this case, CK2 phosphorylation gives the opposite effect, because it increases the G-box-binding ability of GBF1 (Klimczak et al., 1992; Klimczak et al., 1995).

Phosphorylation of circadian clock proteins is an essential post-transcriptional mechanism in the regulation of circadian clocks, and protein kinase CK2 has been shown to regulate key clock components in several eukaryotic systems, including *Neurospora*, *Drosophila*, mice, and *Arabidopsis*. For review, see Mizoguchi et al. (2006). In *Arabidopsis*, it has also been shown that relevant circadian clock components as the two Myb-related transcription factors—circadian clock-associated 1 (*CCA1*) and late elongated hypocotyl (*LHY*)—interact with and are phosphorylated by CK2, and this regulation is essential for the proper functioning of the clock (Sugano et al., 1998; Sugano et al., 1999; Daniel et al., 2004; Portolés and Más 2007). In rice, phosphorylation of circadian clock components such as OsLHY has been described, and further analysis suggests that CK2 affects the circadian clock and the flowering time through independent pathways, implying a diversification of these mechanisms during evolution of higher plants (Ogiso et al., 2010).

Relevant studies in *Neurospora* described a role for CK2 in the regulatory mechanism of circadian clock known as temperature compensation that allows maintaining the clock as robust and accurate over a broad range of physiological temperatures (Mehra et al., 2009). Recently in *Arabidopsis*, it has been shown that CK2 and CCA1 activities display inverse temperature sensitivity. In this way they constitute a mechanism capable of counterbalancing temperature effects on the circadian oscillator.

Thus, this work demonstrates a prominent role of CK2 in regulation of temperature compensation mechanisms in *Arabidopsis* (Portolés and Más, 2011).

Photomorphogenesis is a process by which plant development is controlled by light. CK2 is a central regulator of this process since phosphorylation could differentially regulate the stability of positively and negatively acting transcription factors functioning in this process. Positive regulators, such as bZIP transcription factor HY5 or bHLH transcription factor HFR1, are degraded in darkness and stabilized by CK2-mediated phosphorylation under light conditions (Hardtke et al., 2000; Park et al., 2008). Conversely, the negatively acting transcription factor PIF1 (phytochrome interacting factor 1) is stable in the dark, and its degradation through the ubiquitin/26S proteasomal pathway in response to light is enhanced by CK2-mediated phosphorylation (Bu et al., 2011). Another transcription factor, the basic leucine zipper Opaque2 (O2), is phosphorylated by CK2 during maize seed development, and its phosphorylation is light dependent and under diurnal control (Ciceri et al., 1997).

Plant CK2 is also involved in response to abiotic and biotic stress. A role of plant CK2 in response to salt stress was first demonstrated using yeast complementation approaches, since overexpression of CK2 α subunit from sugar beet increase NaCl tolerance in *S. cerevisiae* (Kanhonou et al., 2001). Also overexpression of maize CK2 β 1 in yeast cells lacking one of the CK2 β isoforms display a phenotype of increased sensitivity to sodium and lithium ions (Riera et al., 2001a). More recently, the phenotype of *Arabidopsis* CK2a1a2a3 triple mutants that are hyposensitive to NaCl confirms the role of CK2 in response to salt stress in plants (Mulekar et al., 2012). Many stress-related proteins are substrates of CK2. Late embryogenesis abundant (LEA) proteins/Rab/dehydrins are among the most common plant proteins involved in adaptation to water or osmotic stress. In maize Rab17 protein is induced by abscisic acid (ABA) and strongly phosphorylated by CK2 (Plana et al., 1991). We also demonstrated that through interaction and phosphorylation, CK2 modulates developmental functions of Rab17 in seed germination in response to osmotic stress (Riera et al., 2004). The homologues of Rab17 proteins in tomato (TAS14) and in *Arabidopsis* (ERD14) are also phosphorylated by CK2 (Godoy et al., 1994; Alsheikh et al., 2003). Functional role of dehydrins remains elusive; however, recent works as phosphorylation of dehydrins TsDHN1, 2 from *Thellungiella salsuginea* support the hypothesis that dehydrins stabilize the cytoskeleton under stress conditions and that phosphorylation may be involved in this stabilization (Rahman et al., 2011). In addition, in maize, binding activity of bZIP transcription factors EmBP-2/ZmBZ-1 is modulated by CK2 phosphorylation. Both factors are nuclear proteins that bind to ABRE (ABA Responsive Elements) and activate transcription of the abscisic acid-inducible gene *rab28* (Nieva et al., 2005), thus, suggesting that CK2 regulation of Rab proteins is not only by directly phosphorylation but also at the level of gene expression. There are few data about activation of CK2 by plant hormones. Salicylic acid (SA) is an important phytohormone involved in the activation of defense responses against biotic stress. It was reported that SA increases nuclear CK2 activity in tobacco plants (Hidalgo et al., 2001). In *Arabidopsis*, SA treatment enhanced the phosphorylation of bZIP transcription factor TGA2, negatively influencing its DNA-binding ability (Kang and Klessig, 2005). Recently, the co-chaperone p23,

also involved in SA signaling, has been identified as a new substrate for CK2 in *Arabidopsis* (Tosoni et al., 2011). Moreover, it has been shown that activity of phytochelatin synthase (PCS), a protein involved in biotic and heavy metal stress responses in plants, is increased following phosphorylation by CK2 (Wang et al., 2009).

CK2 also plays a prominent role phosphorylating proteins involved in many DNA-dependent processes, such as DNA replication, transcription, translation, recombination, repair, or ribosome biogenesis.

Arabidopsis and wheat translation initiation factors eIF2alpha, eIF2beta, eIF3c, eIF4B and eIF5 are phosphorylated by CK2 (Dennis and Browning, 2009; Dennis et al., 2009). In these works, it is postulated that, by differential phosphorylation of initiation factor complexes, CK2 holoenzymes may regulate the translation of specific mRNAs or the stability of various initiation factors in response to abiotic or biotic stress, development, or changes in the cell cycle. In maize, eukaryotic translation initiation factor 5A (ZmEIF5A) co-purifies with the catalytic subunit of protein kinase CK2 and is phosphorylated by this enzyme. This phosphorylation plays a role in the regulation of the nucleocytoplasmic shuttling of eIF5A in plant cells (Lebska et al., 2010; Lewandowska-Gnatowska et al., 2011).

The acidic phosphoproteins (P-proteins) P0, P1, and P2 interact with elongation factors, mRNA, and tRNA during translation, and CK2 phosphorylation of the P-proteins caused dynamic changes in the P-protein complex (Hasler et al., 1991; Bailey-Serres et al., 1997).

Among the nuclear proteins regulated by CK2 phosphorylation in plants, there are the high mobility group (HMG) proteins that are described as chromosomal proteins and seem to act primarily as architectural facilitators in the manipulation of nucleoprotein complexes. Several maize and *Arabidopsis* HMGB proteins are phosphorylated by CK2, and this phosphorylation increases their thermal stability and affects their DNA binding activity (Stemmer et al., 2002; Stemmer et al., 2003; Krohn et al., 2003).

In peas, enzymes involved in DNA transcription as DNA helicase I (PDH65) and DNA topoisomerase I are modified by phosphorylation. In the case of PDH65, the DNA and RNA unwinding activities were upregulated after phosphorylation of PDH65 with CK2 and *cdc2* protein kinases (Tuteja et al., 2008). For DNA topoisomerase I, its activity increased after phosphorylation with exogenous CK2 and PKC (Tuteja et al., 2003).

In animals, the nuclear matrix (NM), which plays a major role in growth-related activities, is a primary locus for CK2 signaling (Yu et al., 2001). In plants, several NM associated proteins have been found to be phosphorylated by CK2: the pea functional homologues of lamins (Li and Roux, 1992) and MFP1 from tomato and *Allium cepa* (Meier et al., 1996; Samaniego et al., 2006), and their phosphorylation seems to modulate their binding to NM. Also NopA64, a nucleolar protein that shares immunological determinants with mammalian nucleolin, is phosphorylated by CK2 (de Cárcer et al., 1997).

Finally, as shown in Table 9.2, other kinds of proteins have been described as plant CK2 substrates, as calreticulin, which is specifically phosphorylated in plants. In addition, it seems that this protein is not a CK2 substrate in other animal systems such as rat liver (Baldan et al., 1996) and storage proteins, proteasome subunits,

or enzymes as lipoxygenase or apyrase (Ohtsuki et al., 1994; Ohtsuki et al., 1995; Umeda et al., 1997; Ralet et al., 1999; Hsieh et al., 2000).

REFERENCES

- Agne B, Andrès C, Montandon C, Christ B, Ertan A, Jung F, Infanger S, Bischof S, Baginsky S, Kessler F. 2010. The Acidic A-Domain of Arabidopsis Toc159 Occurs as a Hyperphosphorylated Protein. *Plant Physiol* 153:1016–1030.
- Alsheikh MK, Heyen BJ, Randall SK. 2003. Ion binding properties of the dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation. *J Biol Chem* 278:40882–40889.
- Bailey-Serres J, Vangala S, Szick K, Lee CH. 1997. Acidic phosphoprotein complex of the 60S ribosomal subunit of maize seedling roots. Components and changes in response to flooding. *Plant Physiol* 114:1293–1305.
- Baldan B, Navazio L, Friso A, Mariani P, Meggio F. 1996. Plant calreticulin is specifically and efficiently phosphorylated by protein kinase CK2. *Biochem Biophys Res Commun* 221:498–502.
- Battistutta R, Lolli G. 2011. Structural and functional determinants of protein kinase CK2 α -phosphatase: facts and open questions. *Mol Cell Biochem* 356:67–73.
- Bibby A, Litchfield DW. 2005. The multiple personalities of the regulatory subunit of protein kinase CK2: CK2 dependent and CK2 independent roles reveal a secret identity for CK2 β . *Int J Biol Sci* 1:67–79.
- Blanc G, Barakat A, Guyot R, Cooke R, Delseny M. 2000. Extensive duplication and reshuffling in the Arabidopsis genome. *Plant Cell* 12:1093–1101.
- Boldyreff B, Issinger O-G. 1997. A-Raf kinase is a new interacting partner of protein kinase CK2 β subunit. *FEBS Letters* 403:197–199.
- Bu Q, Zhu L, Dennis MD, Yu L, Lu SX, Person MD, Tobin EM, Browning KS, Huq E. 2011. Phosphorylation by CK2 enhances the rapid light-induced degradation of phytochrome interacting factor 1 in Arabidopsis. *J Biol Chem* 286:12066–12074.
- Ciceri P, Gianazza E, Lazzari B, Lippoli G, Genga A, Hoschek G, Schmidt R, Viotti A. 1997. Phosphorylation of Opaque 2 changes diurnally and impacts its DNA binding activity. *Plant Cell* 9:97–108.
- Collinge MA, Walker JC. 1994. Isolation of an Arabidopsis thaliana casein kinase II beta subunit by complementation in Saccharomyces cerevisiae. *Plant Mol Biol* 25:649–658.
- Chantalat L, Leroy D, Filhol O, Nueda A, Benitez MJ, Chambaz EM, Cochet C, Dideberg O. 1999. Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *EMBO J* 18:2930–2940.
- Chen M, Li D, Krebs EG, Cooper JA. 1997. The casein kinase II beta subunit binds to Mos and inhibits Mos activity. *Mol Cell Biol* 17:1904–1912.
- Daniel X, Sugano S, Tobin EM. 2004. CK2 phosphorylation of CCA1 is necessary for its circadian oscillator function in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:3292–3297.
- Datta N, Cashmore A. 1989. Binding of a pea nuclear protein to promoters of certain photo-regulated genes is modulated by phosphorylation. *Plant Cell* 1:1069–1077.
- de Cárcer G, Cerdido A, Medina FJ. 1997. NopA64, a novel nucleolar phosphoprotein from proliferating onion cells, sharing immunological determinants with mammalian nucleolin. *Planta* 201:487–495.

- Dennis MD, Browning KS. 2009. Differential phosphorylation of plant translation initiation factors by *Arabidopsis thaliana* CK2 holoenzymes. *J Biol Chem* 284:20602–20614.
- Dennis MD, Person MD, Browning KS. 2009. Phosphorylation of plant translation initiation factors by CK2 enhances the *in vitro* interaction of multifactor complex components. *J Biol Chem* 284:20615–20628.
- Dobrowolska G, Boldyreff B, Issinger OG. 1991. Cloning and sequencing of the casein kinase 2 alpha subunit from *Zea mays*. *Biochim Biophys Acta* 1129:139–140.
- Dobrowolska G, Meggio F, Marchiori F, Pinna LA. 1989. Specificity determinants of maize casein kinase-IIB are related to but distinct from those of rat liver casein kinase-2. *Biochim Biophys Acta* 1010:274–277.
- Espunya MC, Combettes B, Dot J, Chaubet-Gigot N, Martínez MC. 1999. Cell-cycle modulation of CK2 activity in tobacco BY-2 cells. *Plant J* 19:655–666.
- Espunya MC, Lopez-Giraldez T, Hernan I, Carballo M, Martínez MC. 2005. Differential expression of genes encoding protein kinase CK2 subunits in the plant cell cycle. *J Exp Bot* 56:3183–3192.
- Espunya MC, Martínez MC. 2003. *In situ* hybridization analysis of protein kinase CK2 expression during plant development. *Physiol Plant* 117:573–578.
- Faust M, Montenarh M. 2000. Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function? *Cell Tissue Res* 301:329–340.
- Filhol O, Nueda A, Martel V, Gerber-Scokaert D, Benitez MJ, Souchier C, Saoudi Y, Cochet C. 2003. Live-Cell Fluorescence Imaging Reveals the Dynamics of Protein Kinase CK2 Individual Subunits. *Mol Cell Biol* 23:975–987.
- Godoy J, Lunar R, Torres-Schumann S, Moreno J, Rodrigo R, Pintor-Toro J. 1994 Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. *Plant Mol Biol* 26:1921–1934.
- Graham KC, Litchfield DW. 2000. The regulatory beta subunit of protein kinase CK2 mediates formation of tetrameric CK2 complexes. *J Biol Chem* 275:5003–5010.
- Guerra B, Issinger O-G, Wang JYJ. 2003. Modulation of human checkpoint kinase Chk1 by the regulatory [beta]-subunit of protein kinase CK2. *Oncogene* 22:4933–4942.
- Hardtke CS, Gohda K, Osterlund MT, Oyama T, Okada K, Deng XW. 2000. HY5 stability and activity in *Arabidopsis* is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. *EMBO J* 19:4997–5006.
- Hasler P, Brot N, Weissbach H, Parnassa AP, Elkon KB. 1991. Ribosomal proteins P0, P1, and P2 are phosphorylated by casein kinase II at their conserved carboxyl termini. *J Biol Chem* 266:13815–13820.
- Hidalgo P, Garretton V, Berrios CG, Ojeda H, Jordana X, Holuigue L. 2001. A Nuclear Casein Kinase 2 Activity Is Involved in Early Events of Transcriptional Activation Induced by Salicylic Acid in Tobacco. *Plant Physiol* 125:396–405.
- Hsieh HL, Song CJ, Roux SJ. 2000. Regulation of a recombinant pea nuclear apyrase by calmodulin and casein kinase II. *Biochim Biophys Acta* 1494:248–255.
- Kanekatsu M, Ezumi A, Nakamura T, Ohtsuki K. 1995. Chloroplast Ribonucleoproteins (RNPs) as Phosphate Acceptors for Casein Kinase II: Purification by ssDNA-Cellulose Column Chromatography. *Plant Cell Physiol* 36:1649–1656.
- Kanekatsu M, Munakata H, Furuzono K, Ohtsuki K. 1993. Biochemical characterization of a 34 kda ribonucleoprotein (p34) purified from the spinach chloroplast fraction as an effective phosphate acceptor for casein kinase II. *FEBS Letters* 335:176–180.

- Kanekatsu M, Saito H, Motohashi K, Hisabori T. 1998. The beta subunit of chloroplast ATP synthase (CF0CF1-ATPase) is phosphorylated by casein kinase II. *Biochem Mol Biol Int* 46:99–105.
- Kang HG, Klessig DF. 2005. Salicylic acid-inducible Arabidopsis CK2-like activity phosphorylates TGA2. *Plant Mol Biol* 57:541–557.
- Kanhonou R, Serrano R, Ros Palau R. 2001. A catalytic subunit of the sugar beet protein kinase CK2 is induced by salt stress and increases NaCl tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol Biol* 47:571–579.
- Klimczak L, Schindler U, Cashmore A. 1992. DNA binding activity of the Arabidopsis G-box binding factor GBF1 is stimulated by phosphorylation by casein kinase II from broccoli. *Plant Cell* 4:87–98.
- Klimczak L, Collinge M, Farini D, Giuliano G, Walker J, Cashmore A. 1995. Reconstitution of Arabidopsis casein kinase II from recombinant subunits and phosphorylation of transcription factor GBF1. *Plant Cell* 7:105–115.
- Krohn NM, Stemmer C, Fojan P, Grimm R, Grasser KD. 2003. Protein kinase CK2 phosphorylates the high mobility group domain protein SSRP1, inducing the recognition of UV-damaged DNA. *J Biol Chem* 278:12710–12715.
- Lebska M, Ciesielski A, Szymona L, Godecka L, Lewandowska-Gnatowska E, Szczegieliński J, Muszynska G. 2010. Phosphorylation of maize eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) by casein kinase 2: identification of phosphorylated residue and influence on intracellular localization of eIF5A. *J Biol Chem* 285:6217–6226.
- Lebska M, Szczegieliński J, Dobrowolska G, Cozza G, Moro S, Muszynska G. 2009. A novel splicing variant encoding putative catalytic alpha subunit of maize protein kinase CK2. *Physiol Plant* 136:251–263.
- Lee Y, Lloyd AM, Roux SJ. 1999. Antisense Expression of the CK2 α Subunit Gene in Arabidopsis. Effects on Light-Regulated Gene Expression and Plant Growth. *Plant Physiol* 119:989–1000.
- Leroy D, Heriche JK, Filhol O, Chambaz EM, Cochet C. 1997. Binding of polyamines to an autonomous domain of the regulatory subunit of protein kinase CK2 induces a conformational change in the holoenzyme. A proposed role for the kinase stimulation. *J Biol Chem* 272:20820–20827.
- Lewandowska-Gnatowska E, Szymona L, Lebska M, Szczegieliński J, Muszynska G. 2011. Phosphorylation of maize eukaryotic translation initiation factor on Ser2 by catalytic subunit CK2. *Mol Cell Biochem* 356:241–244.
- Li H, Roux SJ. 1992. Casein kinase II protein kinase is bound to lamina-matrix and phosphorylates lamin-like protein in isolated pea nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8434–8438.
- Lisitsky I, Schuster G. 1995. Phosphorylation of a chloroplast RNA-binding protein changes its affinity to RNA. *Nucleic Acids Res* 23.
- Litchfield DW. 2003. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J* 369:1–15.
- Litchfield DW, Lozeman FJ, Cicirelli MF, Harrylock M, Ericsson LH, Piening CJ, Krebs EG. 1991. Phosphorylation of the beta subunit of casein kinase II in human A431 cells. Identification of the autophosphorylation site and a site phosphorylated by p34cdc2. *J Biol Chem* 266:20380–20389.
- Loschelder H, Homann A, Ogrzewalla K, Link G. 2004. Proteomics-based sequence analysis of plant gene expression—the chloroplast transcription apparatus. *Phytochemistry* 65:1785–1793.

- Lu SX, Liu H, Knowles SM, Li J, Ma L, Tobin EM, Lin C. 2011. A role for protein kinase CK2 alpha subunits in the Arabidopsis circadian clock. *Plant Physiol* 157:1537–1545.
- Marquès-Bueno MM, Moreno-Romero J, Abas L, De Michele R, Martínez MC. 2011. A dominant negative mutant of protein kinase CK2 exhibits altered auxin responses in Arabidopsis. *Plant J* 67:169–180.
- Martel V, Filhol O, Nueda A, Cochet C. 2002. Dynamic localization/association of protein kinase CK2 subunits in living cells: a role in its cellular regulation? *Ann NY Acad Sci* 973:272–277.
- Meier I, Phelan T, Gruissem W, Spiker S, Schneider D. 1996. MFP1, a novel plant filament-like protein with affinity for matrix attachment region DNA. *Plant Cell* 8:2105–2115.
- Meggio F, Boldyreff B, Issinger O-G, Pinna LA. 1994. Casein Kinase 2 Down-Regulation and Activation by Polybasic Peptides Are Mediated by Acidic Residues in the 55–64 Region of the β Subunit. A Study with Calmodulin As Phosphorylatable Substrate. *Biochemistry* 33:4336–4342.
- Meggio F, Pinna LA. 2003. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J* 17:349–368.
- Mehra A, Shi M, Baker CL, Colot HV, Loros JJ, Dunlap JC. 2009. A Role for Casein Kinase 2 in the Mechanism Underlying Circadian Temperature Compensation. *Cell* 137:749–760.
- Mizoguchi T, Putterill J, Ohkoshi Y. 2006. Kinase and Phosphatase: The Cog and Spring of the Circadian Clock, In: Kwang WJ (Ed.), *Int Rev Cytol*. Academic Press, pp. 47–72.
- Moreno-Romero J, Armengot L, Marquès-Bueno M, Cadavid-Ordóñez M, Martínez M. 2011. About the role of CK2 in plant signal transduction. *Mol Cell Biochem* 356:233–240.
- Moreno-Romero J, Espunya M, Platara M, Ariño J, Martínez M. 2008. A role for protein kinase CK2 in plant development: evidence obtained using a dominant-negative mutant. *Plant J* 55:118–130.
- Mulekar JJ, Bu Q, Chen F, Huq E. 2012. Casein kinase II alpha subunits affect multiple developmental and stress-responsive pathways in Arabidopsis. *Plant J* 69:343–354.
- Niefind K, Guerra B, Ermakowa I, Issinger O-G. 2001. Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J* 20:5320–5331.
- Niefind K, Guerra B, Pinna LA, Issinger O-G, Schomburg D. 1998. Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from Zea mays at 2.1 Å resolution. *EMBO J* 17:2451–2462.
- Niefind K, Raaf J, Issinger OG. 2009. Protein kinase CK2 in health and disease: Protein kinase CK2: from structures to insights. *Cell Mol Life Sci* 66:1800–1816.
- Nieva C, Busk PK, Dominguez-Puigjaner E, Lumberras V, Testillano PS, Risueno MC, Pages M. 2005. Isolation and functional characterisation of two new bZIP maize regulators of the ABA responsive gene rab28. *Plant Mol Biol* 58:899–914.
- Ogiso E, Takahashi Y, Sasaki T, Yano M, Izawa T. 2010. The role of casein kinase II in flowering time regulation has diversified during evolution. *Plant Physiol* 152:808–820.
- Ogrzewalla K, Piotrowski M, Reinbothe S, Link G. 2002. The plastid transcription kinase from mustard (*Sinapis alba* L.). A nuclear-encoded CK2-type chloroplast enzyme with redox-sensitive function. *Eur J Biochem* 269:3329–3337.
- Ohtsuki K, Nakamura S, Shimoyama Y, Shibata D, Munakata H, Yoshiki Y, Okubo K. 1995. A 96-KDa Glycyrrhizin-Binding Protein (gp96) from Soybeans Acts as a Substrate for

- Case in Kinase II, and Is Highly Related to Lipoyxygenase3. *J Biochem (Tokio)* 118:1145–1150.
- Ohtsuki K, Ohishi M, Karino A, Kanekatsu M, Shamsa F. 1994. Purification and Characterization of 100-kDa Glycyrrhizin (GL)-Binding Protein (gp100) as an Effective Phosphate Acceptor for CK-II and the Effect of GL on the Phosphorylation of gp100 by CK-II *in Vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 198:1090–1098.
- Padmanabha R, Chen-Wu J, Hanna D, Glover C. 1990. Isolation, sequencing, and disruption of the yeast CKA2 gene: casein kinase II is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10:4089–4099.
- Park HJ, Ding L, Dai M, Lin R, Wang H. 2008. Multisite phosphorylation of Arabidopsis HFR1 by casein kinase II and a plausible role in regulating its degradation rate. *J Biol Chem* 283:23264–23273.
- Perales M, Portolés S, Más P. 2006. The proteasome-dependent degradation of CKB4 is regulated by the Arabidopsis biological clock. *Plant J* 46:849–860.
- Plana M, Itarte E, Eritja R, Goday A, Pages M, Martinez MC. 1991. Phosphorylation of maize RAB-17 protein by casein kinase 2. *J Biol Chem* 266:22510–22514.
- Portolés S, Más P. 2007. Altered oscillator function affects clock resonance and is responsible for the reduced day-length sensitivity of CKB4 overexpressing plants. *Plant J* 51:966–977.
- Portolés S, Más P. 2011. The Functional Interplay between Protein Kinase CK2 and CCA1 Transcriptional Activity Is Essential for Clock Temperature Compensation in Arabidopsis. *PLoS Genet* 6:e1001201.
- Rahman LN, Smith GST, Bamm VV, Voyer-Grant JAM, Moffatt BA, Dutcher JR, Harauz G. 2011. Phosphorylation of *Thellungiella salsuginea* Dehydrins TsDHN-1 and TsDHN-2 Facilitates Cation-Induced Conformational Changes and Actin Assembly. *Biochemistry* 50:9587–9604.
- Ralet M-C, Fouques D, Leonil J, Molle D, Meunier J-C. 1999. Soybean β -Conglycinin α Subunit is Phosphorylated on Two Distinct Serines by Protein Kinase CK2. *J Protein Chem* 18:315–323.
- Reiland S, Messlerli G, Baerenfaller K, Gerrits B, Endler A, Grossmann J, Gruissem W, Baginsky S. 2009. Large-Scale Arabidopsis Phosphoproteome Profiling Reveals Novel Chloroplast Kinase Substrates and Phosphorylation Networks. *Plant Physiol* 150:889–903.
- Riera M, Figueras M, Lopez C, Goday A, Pages M. 2004. Protein kinase CK2 modulates developmental functions of the abscisic acid responsive protein Rab17 from maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9879–9884.
- Riera M, Irar S, Vélez-Bermúdez IC, Carretero-Paulet L, Lumbreras V, Pagès M. 2011. Role of Plant-Specific N-Terminal Domain of Maize CK2b1 Subunit in CK2B Functions and Holoenzyme Regulation. *PLoS ONE* 6:e21909.
- Riera M, Pages M, Issinger OG, Guerra B. 2003. Purification and characterization of recombinant protein kinase CK2 from *Zea mays* expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 29:24–32.
- Riera M, Peracchia G, de Nadal E, Arino J, Pages M. 2001a. Maize protein kinase CK2: regulation and functionality of three beta regulatory subunits. *Plant J* 25:365–374.
- Riera M, Peracchia G, Pages M. 2001b. Distinctive features of plant protein kinase CK2. *Mol Cell Biochem* 227:119–127.

- Salinas P, Fuentes D, Vidal E, Jordana X, Echeverria M, Holuigue L. 2006. An extensive survey of CK2 alpha and beta subunits in Arabidopsis: multiple isoforms exhibit differential subcellular localization. *Plant Cell Physiol* 47:1295–1308.
- Samaniego R, Jeong SY, de la Torre C, Meier I, Moreno Diaz, de la Espina S. 2006. CK2 phosphorylation weakens 90 kDa MFP1 association to the nuclear matrix in *Allium cepa*. *J Exp Bot* 57:113–124.
- Schweer J, Turkeri H, Kolpack A, Link G. 2010a. Role and regulation of plastid sigma factors and their functional interactors during chloroplast transcription—recent lessons from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Cell Biol* 89:940–946.
- Schweer J, Turkeri H, Link B, Link G. 2010b. AtSIG6, a plastid sigma factor from Arabidopsis, reveals functional impact of cpCK2 phosphorylation. *Plant J* 62:192–202.
- Stemmer C, Leeming DJ, Franssen L, Grimm R, Grasser KD. 2003. Phosphorylation of Maize and Arabidopsis HMGB Proteins by Protein Kinase CK2 α †. *Biochemistry* 42:3503–3508.
- Stemmer C, Schwander A, Bauw G, Fojan P, Grasser KD. 2002. Protein kinase CK2 differentially phosphorylates maize chromosomal high mobility group B (HMGB) proteins modulating their stability and DNA interactions. *J Biol Chem* 277:1092–1098.
- Sugano S, Andronis C, Green RM, Wang ZY, Tobin EM. 1998. Protein kinase CK2 interacts with and phosphorylates the Arabidopsis circadian clock-associated 1 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11020–11025.
- Sugano S, Andronis C, Ong MS, Green RM, Tobin EM. 1999. The protein kinase CK2 is involved in regulation of circadian rhythms in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12362–12366.
- Testi MG, Croce R, Laureto PP-D, Bassi R. 1996. A CK2 site is reversibly phosphorylated in the photosystem II subunit CP29. *FEBS Letters* 399:245–250.
- Tjaden G, Coruzzi G. 1994. A novel AT-rich DNA binding protein that combines an HMG-like DNA binding protein with a putative transcription domain. *Plant Cell* 6:107–118.
- Tosoni K, Costa A, Sarno S, D'Alessandro S, Sparla F, Pinna LA, Zottini M, Ruzzene M. 2011. The p23 co-chaperone protein is a novel substrate of CK2 in Arabidopsis. *Mol Cell Biochem* 356:245–254.
- Turkeri H, Schweer J, Link G. 2012. Phylogenetic and functional features of the plastid transcription kinase cpCK2 from Arabidopsis signify a role of cysteinyl SH-groups in regulatory phosphorylation of plastid sigma factors. *FEBS J* 279:395–409.
- Tuteja N, Beven AF, Shaw PJ, Tuteja R. 2008. A pea homologue of human DNA helicase I is localized within the dense fibrillar component of the nucleolus and stimulated by phosphorylation with CK2 and cdc2 protein kinases. *Plant J* 25:9–17.
- Tuteja N, Reddy MK, Mudgil Y, Yadav BS, Chandok MR, Sopory SK. 2003. Pea DNA Topoisomerase I Is Phosphorylated and Stimulated by Casein Kinase 2 and Protein Kinase C. *Plant Physiol* 132:2108–2115.
- Umeda M, Manabe Y, Uchimiya H. 1997. Phosphorylation of the C2 subunit of the proteasome in rice (*Oryza sativa* L.). *FEBS Letters* 403:313–317.
- Velez-Bermudez I, Irar S, Carretero-Paulet L, Pagès M, Riera M. 2011. Specific characteristics of CK2B regulatory subunits in plants. *Mol Cel Biochem* 356:255–260.
- Wang H-C, Wu J-S, Chia J-C, Yang C-C, Wu Y-I, Juang R-H. 2009. Phytochelatin Synthase Is Regulated by Protein Phosphorylation at a Threonine Residue Near Its Catalytic Site. *J Agric Food Chem* 57:7348–7355.

- Yan TF, Tao M. 1982. Purification and characterization of a wheat germ protein kinase. *J Biol Chem* 257:7037–7043.
- Yu S, Wang H, Davis A, Ahmed K. 2001. Consequences of CK2 signaling to the nuclear matrix. *Mol Cell Biochem* 227:67–71.
- Zhang C, Vilk G, Canton DA, Litchfield DW. 2002. Phosphorylation regulates the stability of the regulatory CK2 subunit. *Oncogene* 21:3754–3764.

